



“Enfermedad hepática grasa no alcohólica: evaluación del perfil inflamatorio hepático”

Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas.

Prácticas Bioquímicas especiales

Victoria Cairolí, Licenciatura en Bioquímica

Dra. Pamela Valva, Directora

Dra. María Victoria Preciado, Codirectora

Dr. Gustavo Bertot, Codirector

Lugar de trabajo: Instituto Multidisciplinario de Investigación en Patologías Pediátricas (IMIPP-
CONICET-GCBA) División Patología, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires,
Argentina.

Agradecer en primer lugar a mi familia y amigos por el apoyo incondicional durante toda la carrera.

A todo el equipo del IMIPP, por el buen trato y la disposición para ayudarme en todo lo que fuera necesario, y, en especial, a mi directora, la Dra. Pamela Valva, por la paciencia y dedicación de todo este último año.

A la Universidad Nacional De La Plata, por brindarme una educación gratuita y de calidad.

Índice

1. Introducción.....	3
2. Objetivos	7
2.1. General.....	7
2.2. Específicos	7
3. Materiales y métodos	8
3.1. Pacientes y Muestras.....	8
3.2. Metodología	9
3.2.1 Caracterización Histológica	9
3.2.2 Caracterización de poblaciones celulares presentes en el infiltrado	9
3.2.3 Análisis estadístico	12
4. Resultados	13
4.1 Caracterización clínica e histológica de los pacientes.....	13
4.2 Caracterización de poblaciones celulares presentes en el infiltrado.....	17
4.3 Evaluación de poblaciones linfocitarias en relación a la severidad del daño hepático.....	24
5. Conclusiones.....	27
6. Perspectivas a futuro.....	29
7. Referencias.....	30

1. Introducción

Generalidades

La Enfermedad Hepática Grasa No Alcohólica (EHGNA) es una entidad clínico-patológica que se define por la presencia de esteatosis hepática no asociada al consumo de alcohol, por lo cual representa una preocupación nutricional grave debido a la alta prevalencia de sobrepeso y obesidad. La EHGNA ha adquirido relevancia médica en los últimos años por ser una de las causas más comunes de enfermedad hepática crónica tanto en pacientes pediátricos como adultos. Esta enfermedad abarca un espectro de presentaciones histológicas que van desde la esteatosis simple (acúmulo de grasa macrovacuolar en el hepatocito) hasta la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA, esteatosis macro- y microvacuolar acompañada de inflamación y evidencias de daño celular). La importancia de establecer el estado histológico del hígado del paciente radica en la diferencia entre la evolución del EHGNA, dado que en la esteatosis simple es favorable, pero la EHNA puede derivar en cirrosis y/o en el desarrollo de un carcinoma hepático^{1,2,3}.

El diagnóstico de certeza de EHGNA requiere de la evaluación clínica e histopatológica de los pacientes, por lo que es fundamental la realización de la biopsia hepática para tal fin. La biopsia brinda información tanto del grado de esteatosis, como de los cambios en la arquitectura global del hígado debidos a la inflamación y a la fibrosis a diferencia de los métodos por imágenes convencionales, los cuales sólo permiten detectar la presencia de esteatosis, pero no diferenciar esteatosis simple de EHNA. Es por ello que, a pesar de ser un método invasivo, la biopsia sigue siendo el “gold standard” para el diagnóstico de EHGNA y particularmente del EHNA^{4,5}.

Para tal fin, se ha establecido un sistema estándar de nomenclatura y un sistema de puntuación unificado para la interpretación de las biopsias⁶. El sistema gradúa en forma semicuantitativa la esteatosis (0-3), la inflamación lobulillar (0-2), la balonización hepatocelular (0-2) y la fibrosis (0-4) que son las principales características histológicas identificables en las muestras de los pacientes. En base a la puntuación de la esteatosis, la inflamación y la balonización se determina el grado de actividad (NAS; *Non alcoholic fatty liver disease Activity Score*). De esta forma se clasifican casos con $NAS \leq 2$ como esteatosis simple, casos con $NAS 3-4$ *borderline* y casos con $NAS \geq 5$ como EHNA. Finalmente, las características histopatológicas de la EHNA en pacientes adultos y pediátricos, muestran ciertas diferencias. El diagnóstico pediátrico representa un desafío dado que la balonización hepatocelular, la zona del

parénquima afectada por la fibrosis y la inflamación observada en adultos con EHNA no se observan frecuentemente en niños^{7,8}.

Patogénesis

La obesidad es una enfermedad crónica multifactorial compleja caracterizada por el aumento de tejido adiposo, como consecuencia de una falla en los mecanismos que mantienen la homeostasis energética. En la actualidad, representa la enfermedad crónica no transmisible más prevalente en el mundo⁹. La EHNA está fuertemente asociada a la obesidad con datos que demuestran prevalencias mayores al 80% en pacientes obesos y solo 16% en individuos con índice de masa corporal normal y sin factores de riesgo metabólico¹⁰.

Se considera que el tejido adiposo es metabólicamente activo. La regulación en el tamaño de los depósitos grasos es un proceso complejo que involucra una variedad de tejidos y de mediadores químicos como las adipocinas secretadas por el tejido adiposo y citoquinas proinflamatorias¹¹. Diversos estudios han postulado la hipótesis de los “dos eventos” para explicar la patogénesis del EHNA, donde el “primer evento” es la acumulación hepática de lípidos y el “segundo evento” la injuria y la inflamación. No está claro cuál es el trastorno metabólico primario que dispara el primer evento; sin embargo, la esteatosis es el prerrequisito para los eventos subsiguientes que conducen al daño hepático y a la fibrosis. La disfunción mitocondrial juega un papel central en la progresión de esteatosis simple a EHNA y de ésta a cirrosis. El aumento de la producción de especies reactivas del oxígeno, como consecuencia de la peroxidación lipídica, y la permeabilización de la membrana externa mitocondrial dan como resultado la activación de una cascada de eventos, que incluyen la liberación de diversas citoquinas e interleucinas y la muerte celular, que en su conjunto conducen a la inflamación. Finalmente, en respuesta a estos procesos las células estrelladas, principales productoras de matriz extracelular, que están normalmente quiescentes, se activan y desencadenan la fibrogénesis hepática (Figura 1)^{12,13,14}.

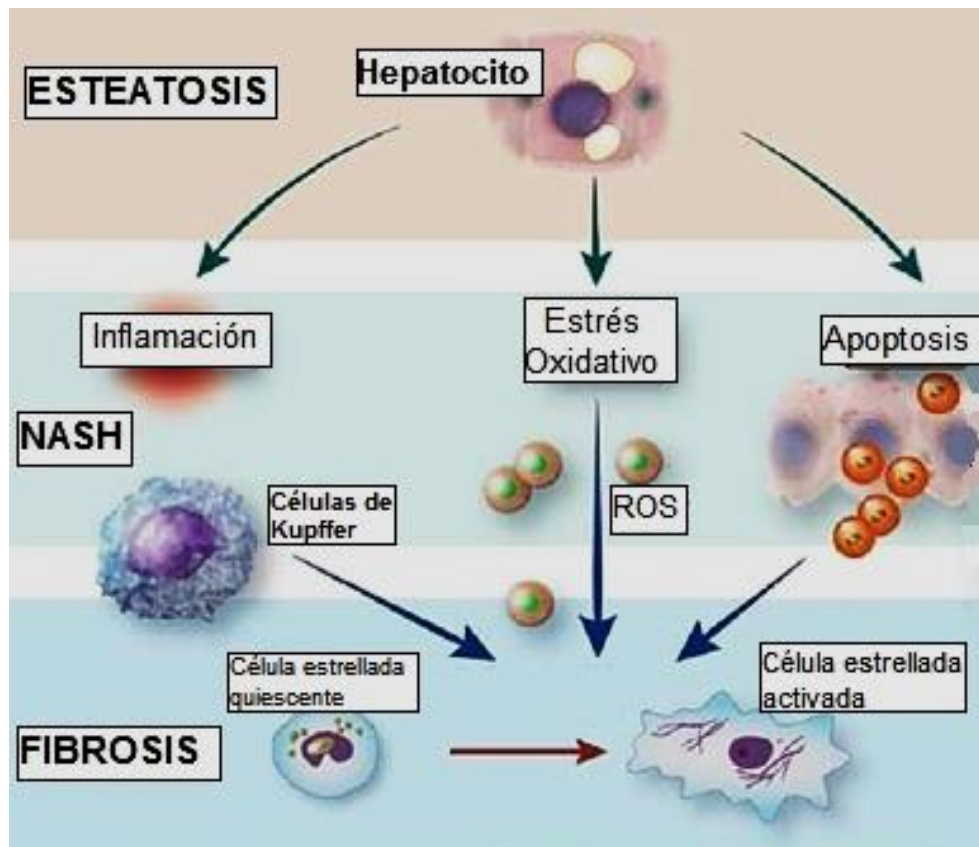


Figura 1. Mecanismos que llevan al progreso de la enfermedad desde la esteatosis simple a EHNA y fibrosis avanzada. Los hepatocitos cargados de lípidos, principalmente en forma de triglicéridos, son más susceptibles a sufrir múltiples eventos secundarios que conducen al desarrollo de EHNA, la cual ocurre por mecanismos que incluyen apoptosis de hepatocitos, estrés oxidativo e inflamación hepática. Esta progresión puede resultar en la activación de las células estrelladas quiescentes, llevando a la fibrosis hepática. Adaptado de Alkhoury N, McCullough AJ. *Noninvasive diagnosis of NASH and liver fibrosis within the spectrum of NAFLD. Gastroenterol Hepatol (N Y) 2012; 8:661–668.*

Cabe resaltar que el hígado es el órgano interno más grande del cuerpo de un adulto y sus funciones metabólicas opacan cualquier percepción de su papel como órgano inmunológico. Sin embargo, es un mediador de la inmunidad local y sistémica así como un sitio importante de la regulación inmunitaria. Su estructura anatómica y vascularización hacen que exista un continuo intercambio de información a nivel inmunológico, lo cual contribuye a crear un *milieu* único de citoquinas y factores de crecimiento. Es entonces este microambiente el que determina el balance entre la tolerancia y la inflamación en el hígado sano¹⁵. El microambiente inmunitario hepático es complejo y está compuesto por diversos tipos celulares (hepatocitos, células sinusoidales, células de Kupffer y linfocitos)^{16,17}; sin embargo, su composición y localización puede verse afectada ante procesos patológicos^{14,15}. Si bien se considera que la inflamación sostenida a nivel intrahepático es crítica en la progresión de la esteatosis simple a la EHNA; no está claro cuál es la composición celular del infiltrado inflamatorio hepático y cuál es el posible rol de cada población en la patogenia. Es por ello que en el presente trabajo, se comprobó la presencia de ciertas

poblaciones celulares del microambiente hepático, y se realizó el análisis en el contexto del daño hepático para evaluar su participación en la patogenia de la EHGNA. A su vez, se realizó el análisis comparativo entre pacientes pediátricos y adultos para valorar si existen perfiles diferenciales en ambos grupos etarios^{14,15,16}.

Hipótesis:

Teniendo en cuenta que:

- I. la EHGNA abarca un espectro de presentaciones histológicas clínicamente relevantes que incluyen desde la esteatosis simple hasta la EHNA, donde la primera presenta una evolución favorable en tanto la EHNA puede progresar a cirrosis o carcinoma hepático,
- II. la inflamación es una característica remarcable que define a la patología,
- III. el hígado es un mediador de la inmunidad local y sistémica así como un sitio importante de la regulación inmunitaria,
- IV. aún no están completamente dilucidados los mecanismos de patogenia,
- V. el microambiente inmunitario hepático está compuesto por diversos tipos celulares y se postula que serían importantes en la patogenia,

Existen poblaciones celulares vinculadas a la patogenia de la EHGNA que se correlacionan con el daño hepático y su progresión.

2. Objetivos

2.1. General

Caracterizar el infiltrado inflamatorio presente en el microambiente hepático y relacionarlo con la patogénesis de la Enfermedad Hepática Grasa No Alcohólica (EHGNA) en niños y adultos.

2.2. Específicos

En biopsias hepáticas fijadas en formol e incluidas en parafina de pacientes pediátricos y adultos con EHGNA:

1. Evaluar la presencia y localización de diversas poblaciones linfocitarias.
2. Relacionar los hallazgos con los parámetros histológicos de daño hepático.
3. Comparar la presentación de la enfermedad en pacientes pediátricos y adultos.
4. Integrar el conocimiento surgido para establecer el aporte en la patogenia.

3. Materiales y métodos

3.1. Pacientes y Muestras

Se incluyeron 26 pacientes pediátricos provenientes del Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez y 35 pacientes adultos provenientes del Hospital Italiano de Buenos Aires.

Criterios de Inclusión: esteatosis en ecografía y síndrome metabólico parcial o completo.

Criterios de Exclusión: ingesta de alcohol promedio >30 g/día hombres y >20 g/día mujeres, otra causa conocida de enfermedad hepática: enfermedad de Wilson, déficit de α 1-antitripsina, hepatitis virales (HCV, HBV), CBP, HAI, hemocromatosis genética, portador HIV, hipo o hipertiroidismo no controlado, consumo de medicamentos que causen esteatosis hepática, contraindicación para punción biopsia hepática, trasplante hepático previo, pérdida de peso significativa reciente (> 5% del peso total dentro de los 6 meses previos), síndrome metabólico parcial, de causa secundaria a enfermedades endocrinológicas, lesiones hipotalámicas y síndromes genéticos, historia de nutrición parenteral completa, cirugía bariátrica, sospecha o carcinoma hepático confirmado.

Se analizaron en forma prospectiva muestras de biopsia hepática fijadas en formol e incluidas en parafina (BHFFIP). Las muestras fueron obtenidas por los médicos de los Servicios de Hepatología de los hospitales antes mencionados para realizar el diagnóstico de dicha patología siguiendo los procedimientos habituales de toma de muestra. No se realizaron biopsias específicamente para este estudio, sólo se incluyeron las muestras de los pacientes que se realizaron la misma para el diagnóstico y, mediante la cual, se confirmó la patología.

Además, se obtuvieron los datos de edad, sexo, peso y talla (índice de masa corporal), concentración de transaminasas, colesterol y triglicéridos de las historias clínicas.

Este estudio cuenta con la aprobación de los Comités de Docencia e Investigación y de Bioética del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. En todos los casos se obtuvo un consentimiento informado firmado por los pacientes adultos o por los padres de los pacientes pediátricos y un asentimiento informado firmado por los niños (>7 años) para la participación en el trabajo.

3.2. Metodología

3.2.1 Caracterización Histológica

Se realizó como parte del diagnóstico de rutina. En todos los casos, los cortes de biopsia hepática debieron contar con, al menos, 10 espacios porta para ser considerados material representativo para su evaluación. Las secciones de tejido fueron teñidas con hematoxilina y eosina, tricrómico de Masson, reticulina de Gomori y PAS. Se evaluaron según el sistema estándar de nomenclatura unificado para la interpretación de las biopsias (*NAFLD scoring system proposed by the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease NASH Clinical Research Network*). Como se mencionó previamente, el sistema gradúa en forma semicuantitativa la esteatosis (0-3), la inflamación lobular (0-2) y la balonización hepatocelular (0-2). De esta forma, los pacientes se clasificaron como EHNA a aquellos en los que la sumatoria de todos estos componentes fue mayor a 5, *borderline* a aquellos que se encontraron entre 3-4 y con esteatosis simple a los que la sumatoria fue menor a 3. Además, el sistema gradúa de manera semicuantitativa a la fibrosis (0-4).

Si bien dicha caracterización fue realizada por los médicos patólogos como parte del diagnóstico, durante el trabajo se realizó la revisión de los informes y de las tinciones para identificar estructuras histológicas hepáticas y características propias de la patología.

3.2.2 Caracterización de poblaciones celulares presentes en el infiltrado

La evaluación de las poblaciones celulares en las biopsias hepáticas se realizó mediante inmunohistoquímica, basada en la especificidad de anticuerpos dirigidos contra marcadores celulares de las poblaciones de interés seguido del revelado con diversos sistemas de detección que constan de anticuerpos secundarios conjugados. Todos los ensayos incluyeron un control positivo y un control negativo del ensayo realizado sobre muestras de amígdalas. En el caso del control negativo se reemplazó el anticuerpo primario específico para cada marcador por *buffer* fosfato salino (PBS, pH=7,4).

Se determinaron poblaciones de: linfocitos T (LT) *helpers* (h), LT citotóxicos (CTL), LT reguladores (reg) y LTh17. Para todas las marcaciones el procedimiento fue similar, pero variaron las condiciones de incubación de los anticuerpos primarios y los sistemas de detección utilizados. Los mismos se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1

Población linfocitaria	Marcador celular	Ac primario	Dilución del Ac	Condición de incubación del Ac	Sistema de detección
CTL	CD8	monoclonal de conejo anti-CD8 humano (clon SP57, VENTANA, Roche)	Listo para usar	30 min a 37°C	<i>Vectastain Elite ABC</i> (VECTOR)
LTh	CD4	monoclonal de conejo anti-CD4 humano (clon SP35, VENTANA, Roche)	Listo para usar	1 h a 37°C	<i>Vectastain Elite ABC</i> (VECTOR)
LTreg	FoxP3	Monoclonal de ratón anti-FoxP3 humano (clon 236A/E7, Abcam)	1/100 (dilución en Buffer TBS-BSA 1%)	1 h a 25°C	<i>PolyTek HRP anti-Mouse Polymerized Imaging System</i> (ScyTek Laboratorios).
LTh17	IL-17	policonal de cabra anti-IL-17A humano (R&D Systems)	1/100 (dilución en Buffer PBS-BSA 1%)	18 h a 4°C	<i>Cell & Tissue Staining Goat Kit</i> (R&D Systems)

Brevemente, se procedió a la desparafinización de los cortes de las BHFFIP con xilol y posterior hidratación por pasajes sucesivos en etanol 100 °, 96 ° y 70 °, para concluir con lavados con agua destilada y PBS. Luego, se realizó el desenmascaramiento antigénico en *buffer* citrato 0,01 M pH 6 en autoclave, para lo cual se introdujeron las muestras en dicho *buffer* dentro del autoclave precalentado, y se mantuvieron por 5 minutos a 20 psi. Terminado el proceso se incubaron durante 20 min a 25°C para que descienda gradualmente la temperatura y se realizó un lavado de 10 min en buffer PBS. Por último, se inactivó la peroxidasa endógena por tratamiento con H₂O₂ 3% en agua destilada durante 30 min a 25°C, y el exceso se eliminó por lavados con agua destilada y *buffer* PBS.

Posteriormente se procedió al bloqueo de unión inespecífica mediante la incubación con un suero por 20 minutos en cámara húmeda a 25°C (estos son provistos por cada sistema de detección y son específicos de los mismos). Dado que los hepatocitos expresan altas concentraciones de biotina endógena y las marcaciones que utilizan los sistemas de detección *Vectastain Elite ABC* (VECTOR) y *Cell & Tissue Staining Goat Kit* (R&D Systems) se basan en la unión de un

anticuerpo secundario biotinilado a avidina/streptavidina conjugada a peroxidasa, se realizó el bloqueo de biotina endógena (HRP, peroxidasa de rábano picante, del inglés *horseradish peroxidase*). Para tal fin, las muestras se incubaron con una solución de avidina durante 15 minutos seguido de una solución de biotina no conjugada durante 15 minutos y un lavado de 10 minutos en *buffer* PBS (Biotin Blocking System, DakoCytomation).

Luego se incubó con el anticuerpo primario y se procedió a la amplificación de la señal tal como se describe en la tabla 1. Para ello se lavó el exceso de anticuerpo primario con *buffer* PBS, se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado anti-Fc gamma de conejo (*Vectastain Elite ABC*, VECTOR) o de cabra (*Cell & Tissue Staining Goat Kit*, R&D Systems) en cámara húmeda durante 30 minutos. Se lavó con *buffer* PBS y se incubó otros 30 minutos con estreptavidina-HRP. Cuando se utilizó el sistema de detección *PolyTek HRP anti-Mouse Polymerized Imaging System* (ScyTek Laboratorios), se lavó el exceso de anticuerpo primario con *buffer* PBS y se incubó solamente con el anticuerpo secundario anti-Fc gamma de ratón dado que dicho anticuerpo está conjugado a directamente a varias moléculas de peroxidasas.

Finalmente, en todos los casos se reveló con el sustrato de peroxidasa Diaminobencidina (DAB Substrate Kit for Peroxidase, Vector) durante 5 minutos y se cortó la reacción con agua destilada. Luego se contracoloró con hematoxilina, se deshidrató por pasajes sucesivos en etanol 96 °, 100 ° y xilol, y se montó con Bálsamo de Canadá para su posterior observación al microscopio óptico con los objetivos 10x, 20x, 40x y 100x. Las imágenes se registraron con una cámara de fotos AxioCam 503 color (Carl Zeiss) acoplada a un microscopio Zeiss AxioStar1 con el programa AxioVision LE V 4.8.2.0.

La evaluación de la distribución y localización de las células que componen el microambiente la realizó el Dr. Martín Medin, médico patólogo especialista en hígado. La cuantificación se realizó tanto a nivel portal/periportal como lobulillar, de esta manera se logra analizar el tejido hepático en su totalidad y definir posibles patrones tisulares área específicos. En el primer caso se contaron en todos los espacios porta de la muestra, el número de linfocitos positivos para cada marcador, así como el número de linfocitos totales a un aumento de 400x, expresándose los resultados como el número de linfocitos+/ número de linfocitos totales por espacio porta. En el segundo caso se realizó el recuento de los linfocitos positivos para cada marcador en 10 campos al azar a 400x, el resultado se expresó como el número de linfocitos + en 10 campos.

3.2.3 Análisis estadístico

Para comparar las medias entre grupos se utilizaron ANOVA o test de Student. Para determinar las diferencias entre grupos que no se distribuyan normalmente se compararon las medias mediante el test de Mann-Whitney o Kruskal Wallis. Por otro lado, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson's para calcular el grado de asociación entre variables continuas normalmente distribuidas y el de Spearman para variables no paramétricas. Se utilizó el programa GraphPadInStat versión 5.01 (Graphpad, San Diego, CA, USA).

4. Resultados

4.1 Caracterización clínica e histológica de los pacientes

Las características generales de los pacientes pediátricos y adultos estudiados se resumen en la Tabla 2. Brevemente, se enrolaron 61 casos con diagnóstico presuntivo de EHNA de los cuales 26 fueron pediátricos [11,50 años (4-17)] y 35 adultos [49 años (28-72)].

En cuanto a las características clínicas, el 79,17% de los pacientes pediátricos fueron obesos y el 20,83% presentó sobrepeso. El 23,81% de los pacientes presentaron hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia. Se observaron niveles de ALT y AST elevadas en el 62,5% y el 29,17% de los casos, respectivamente. Por su parte, en los pacientes adultos, el 68,57% fueron obesos y el 31,43% presentó sobrepeso. La hipercolesterolemia y/o hipertrigliceridemia se observó en el 85,71% de los casos y con respecto a las transaminasas, ALT estuvo aumentada casi en la totalidad de los pacientes (97,14%) y AST en el 62,86% de los mismos.

Con respecto a las características histológicas, en todos los casos pediátricos se observó esteatosis >5%, con predominio del estadio de mayor severidad (estadio 3), es decir, esteatosis que afecta a más del 66% de los hepatocitos del lobulillo, en el 65,39% de los casos. La actividad inflamatoria lobulillar hallada fue leve en el 80,77% de los casos, moderado en un 7,69% y severa en un 7,69%. La balonización hepatocelular fue moderada en la mayoría de los casos (69,23%). La fibrosis fue: estadio 1 en el 15,38% de los casos, estadio 2 en el 23,08%, estadio 3 en el 57,69% y estadio 4 en el 3,85% (cirrosis). En los pacientes adultos se observó esteatosis leve en el 17,13% de los casos, moderada en el 28,57% y severa en el 54,21%. La actividad inflamatoria lobulillar fue leve en 62,86% de las biopsias y moderada en 17,14%. Es importante destacar que un 20% de los casos no presentó inflamación lobulillar y que no se observó inflamación severa en ninguno de los pacientes adultos incluidos en el estudio. La balonización hepatocelular fue leve en el 62,86% de los casos. La fibrosis fue: estadio 0 en el 68,57% de los casos, estadio 1 en el 14,29%, estadio 2 en el 11,43% y estadio 3 en el 5,71%. Ningún paciente adulto presentó fibrosis estadio 4 (cirrosis).

En la figura 2 se pueden observar casos representativos de la histopatología que presentaron los pacientes. En base a la puntuación de la esteatosis, la inflamación y la balonización se determinó el grado de actividad, NAS y se clasificaron los casos como con esteatosis simple, *borderline* y EHNA. En la serie

pediátrica no se observaron casos con esteatosis simple, pero el 23,08% fue clasificado como *borderline* y el 76,92% presentó EHNA. En la serie de pacientes adultos, el 11,43% de los casos fueron clasificados como esteatosis simple, el 37,43% como *borderline* y el 51,43% como EHNA.

El análisis comparativo entre parámetros bioquímicos y la severidad del daño mostró que no se observan diferencias significativas entre los niveles de colesterol o triglicéridos con respecto a la severidad de la esteatosis, la inflamación y la fibrosis en ambos grupos etarios. Además, es importante mencionar que los parámetros no mostraron diferencias según la clasificación NAS en ninguno de los grupos. Sin embargo, con respecto a las transaminasas solo en los pacientes pediátricos ALT mostró mayores niveles en los casos con estadios avanzados de esteatosis ($p=0,009$). Asimismo, los niños con EHNA presentaron niveles aumentados de ALT con respecto a los pacientes clasificados como *borderline* ($p=0,032$) (Figura 3).

Tabla 2: Caracterización clínica e histológica de los pacientes estudiados

Factor	Pacientes	
	Pediátricos	Adultos
Edad (años) mediana (rango)	11,50 (4-17)	49 (28-72)
Sexo (masculino %)	65,38	54,28
IMC		
• Sobrepeso %	20,83	31,43
• Obeso %	79,17	68,57
Transaminasas*		
ALT (IU/l) mediana (rango)	40,50 (15-213)	81 (31-279)
• % elevada	62,5	97,14
AST (IU/l) mediana (rango)	31,50 (16-126)	50 (22-208)
• % elevada	29,17	62,86
Perfil lipídico		
• Colesterol mg/dl	154,5 (88-224)	207 (126-327)
• Triglicéridos mg/dl	100 (28-212)	180 (60-465)
Características Histológicas #		
Esteatosis (%)		
• 0 (<5%)	-	-
• 1 (5-33%)	15,38	17,13
• 2 (33-66%)	19,23	28,57
• 3 (>66%)	65,39	54,28
Inflamación Lobular (n° focos)		
• 0	3,85	20
• 1 (<2)	80,77	62,86
• 2 (2-4)	7,69	17,14
• 3(<4)	7,69	-
Balonización (%)		
• 0	-	14,28
• 1 (pocas células)	69,23	62,86
• 2 (muchas células)	30,77	22,86
“NAFLD activity score” (%)		
• Esteatosis Simple	-	11,43
• <i>Borderline</i>	23,08	37,14
• EHNA	76,92	51,43
Fibrosis (%)		
• 0	-	68,57
• 1	15,38	14,29
• 2	23,08	11,43
• 3	57,69	5,71
• 4	3,85	-
n	26	35

IMC: índice de masa corporal. Para determinar sobrepeso y obesidad en pacientes pediátricos se utilizaron las tablas recomendadas por la Sociedad Argentina de Pediatría. En el caso de los pacientes adultos: normopeso (<25,0 Kg/m²), sobrepeso (25,0-29,9 Kg/m²) y Obesidad (≥30 Kg/m²). *ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa. Valores normales en pacientes pediátricos: ALT ≤32 UI/L; AST ≤48 UI/L; en adultos ALT ≤40 UI/L; AST ≤42 UI/L. # Grado de esteatosis: score 0 (<5% células), 1 (5-33% células), 2 (33-66% células) y 3 (>66% células); inflamación lobular: score 0 (0 focos), 1 (<2 focos), 2 (2-4 focos) y 3 (>4 focos); grado de balonización: score 0 (ausente), 1 (pocas células) y 2 (muchas células); estadio de fibrosis: score 1 (mínima); 2 (fibrosis portal/periportal zona 3), 3 (fibrosis en puente) y 4 (cirrosis).

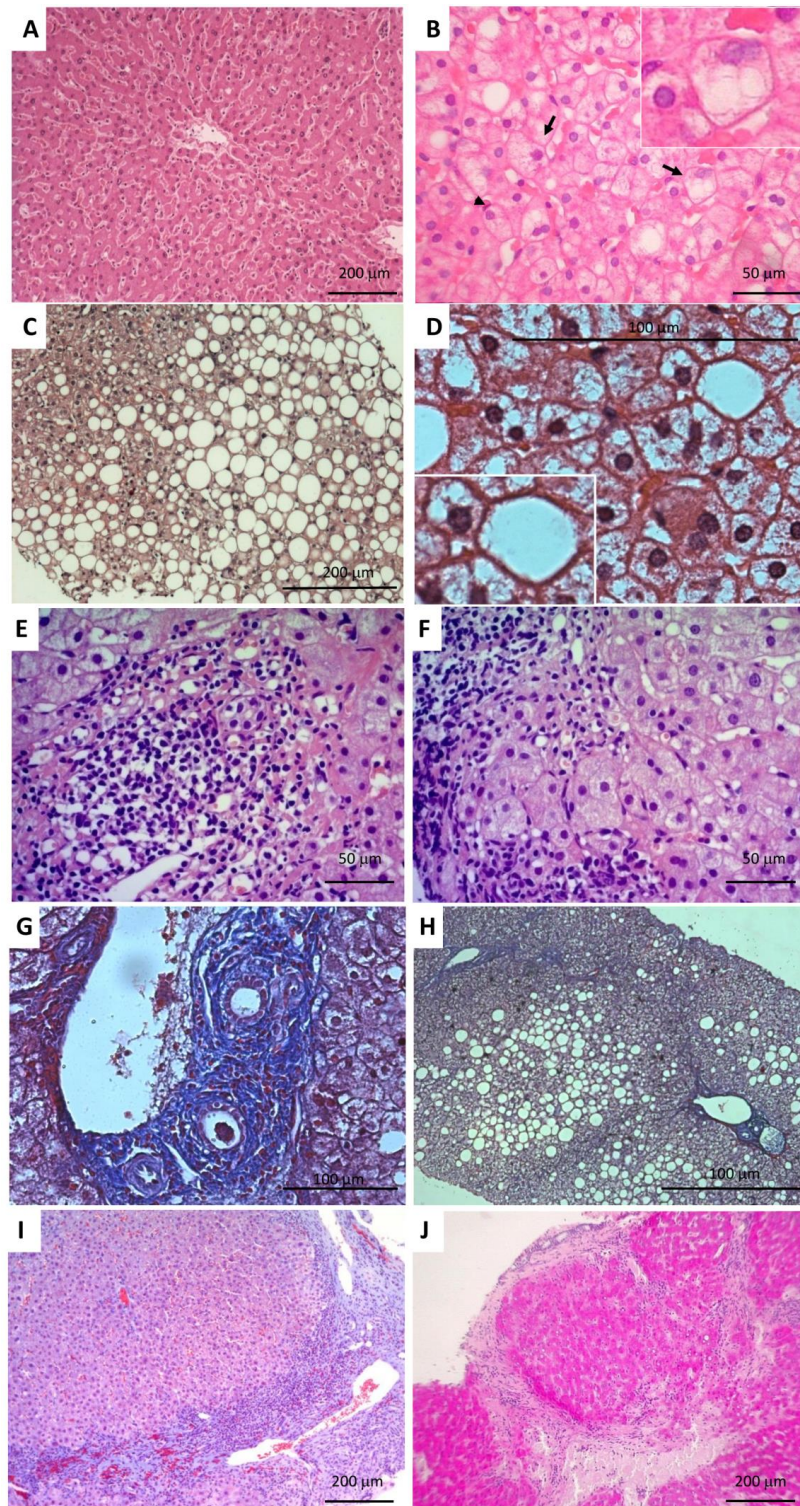


Figura 2. Cambios histopatológicos presentes en los pacientes estudiados. A) Muestra hepática control normal (H&E). B) Cambios hepatocelulares indicados por flechas, el recuadro muestra balonización hepatocelular (H&E). C) Esteatosis macrovacuolar (H&E). D) Esteatosis mixta, el recuadro muestra esteatosis macro- y microvacuolar (H&E). E) Inflamación lobulillar (H&E). F) Infiltrado inflamatorio portal con marcada actividad de interfase (H&E). G) Fibrosis portal (F1) (tinción tricrómico de Masson). H) Fibrosis porto-porto (F2) (tricrómico de Masson). I) Fibrosis porto-porto (F2) (tricrómico de Masson). J) Fibrosis porto-porto-porto (F3) (PAS).

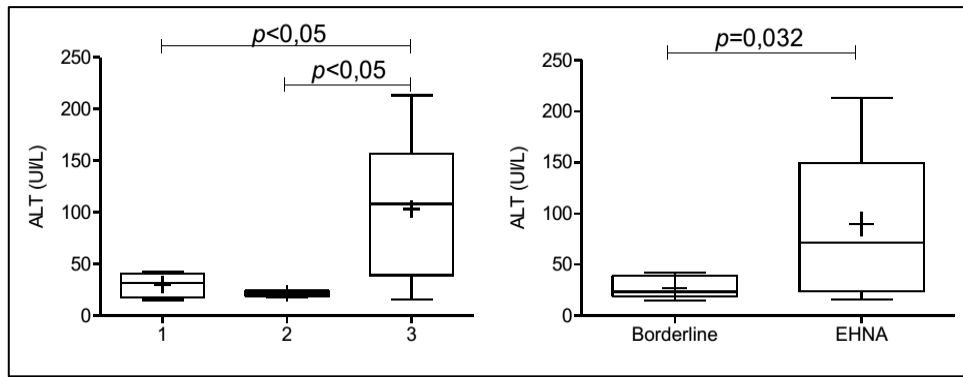


Figura 3. ALT en pacientes pediátricos en relación a la severidad de la esteatosis y a la clasificación NAS. Los resultados se representan en diagramas de cajas. La línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana. Las líneas horizontales por fuera de las cajas representan los percentilos 5 y 95. La media se indica como +.

4.2 Caracterización de poblaciones celulares presentes en el infiltrado

Para evaluar la frecuencia y la distribución de los linfocitos que infiltran el hígado de los pacientes con EHGNA, analizar su relación con parámetros histológicos de daño hepático y determinar su rol en la patogenia de la enfermedad, se realizó la caracterización del infiltrado inflamatorio.

Las figuras 4, 5, 6 y 7 muestran imágenes representativas de las inmunomarcaciones para la detección de CTL (CD8+), LTh (CD4+), LTreg (Foxp3+) y LTh17 (IL-17A+). Se pueden observar que las inmunomarcaciones de CTL y LTh presentaron una localización en membrana, mientras que las de LTreg una localización nuclear, y únicamente la marcación de la citoquina IL-17A, como marcador de LTh17, presentó una tinción de localización citoplasmática. En cada figura se incluyen imágenes de los controles positivos y negativos realizados en forma paralela a cada ensayo.

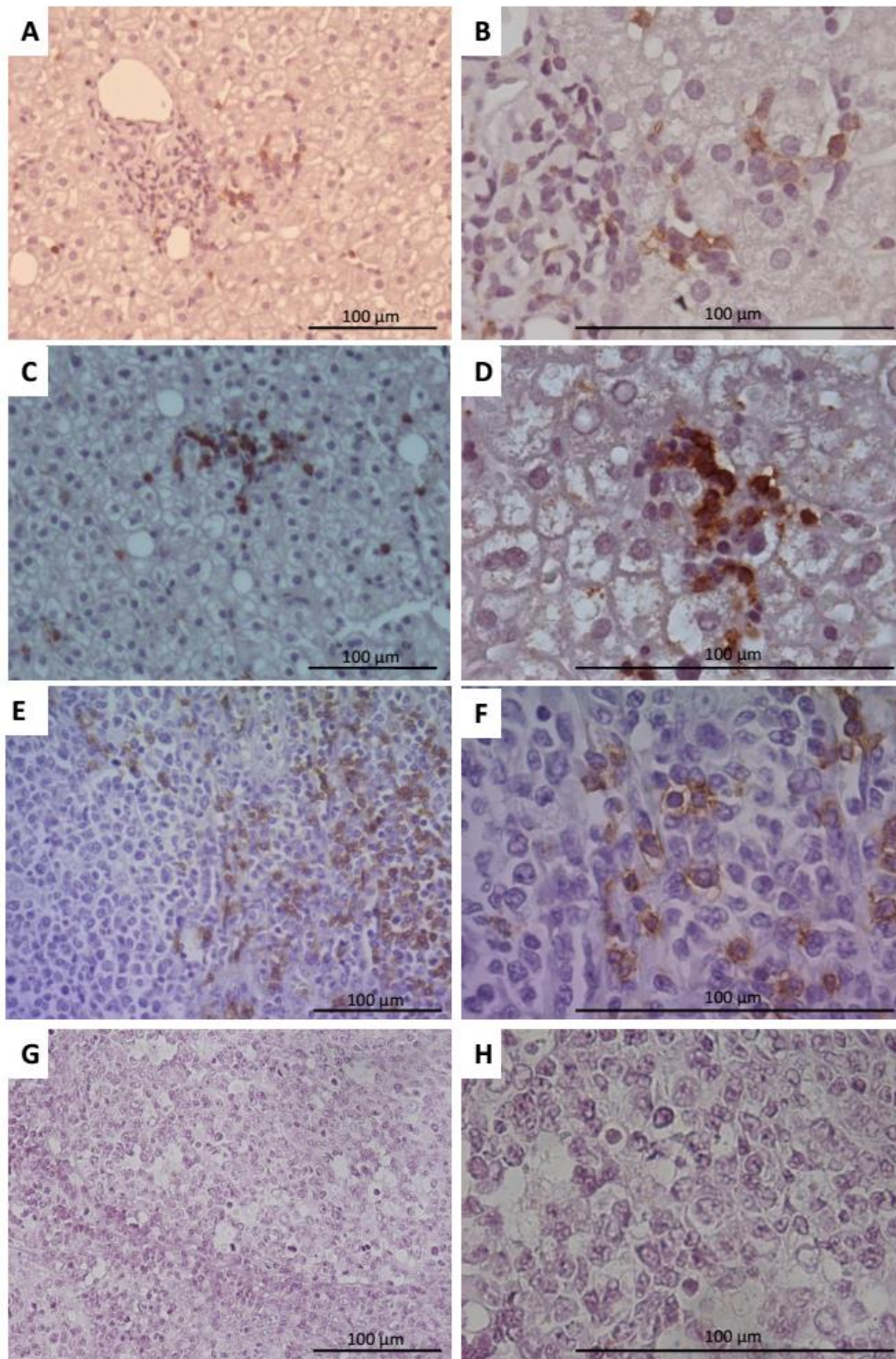


Figura 4. Linfocitos T citotóxicos. (A-D) Imágenes representativas de las inmunomarcaciones de CTL en biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina de pacientes con EHGNA. (A y B) muestra CTL en el área portal, y (C y D) en área lobulillar. (E-H) Imágenes representativas de controles positivos y negativos en biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina de amígdalas. (E y F) controles positivos, (G y H) controles negativos. (A, C, E y F) Magnificación 400X. (B, D, F y H) Magnificación 1000X.

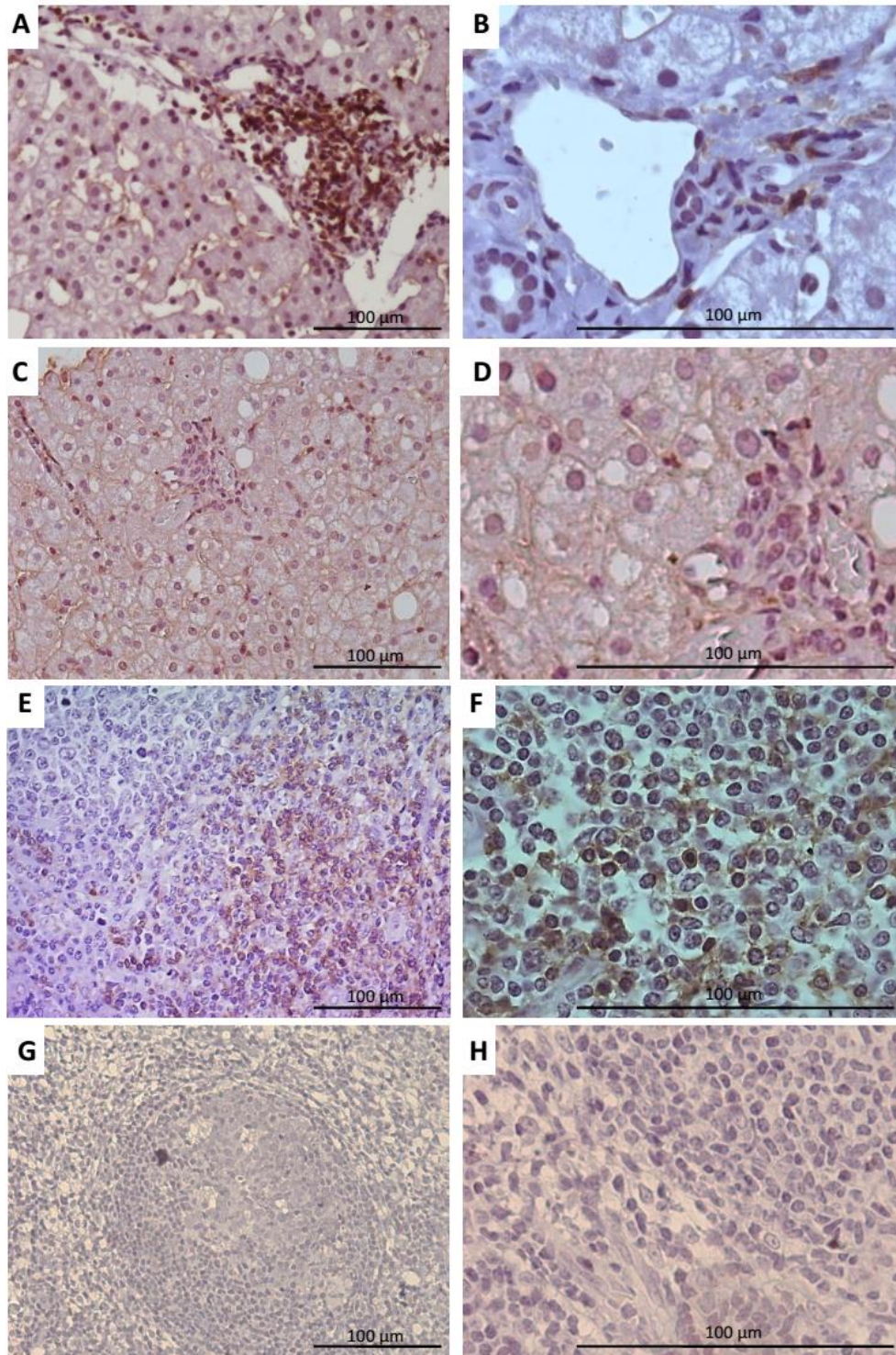


Figura 5. Linfocitos T *helper*. (A-D) Imágenes representativas de las inmunomarcaciones de LTh en biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina de pacientes con EHGNA. (A y B) muestran LTh en el área portal, y (C y D) en área lobulillar. (E-H) Imágenes representativas de controles positivos y negativos en biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina de amígdalas. (E y F) controles positivos, (G y H) controles negativos. (A, C, E y F) Magnificación 400X. (B, D, F y H) Magnificación 1000X.

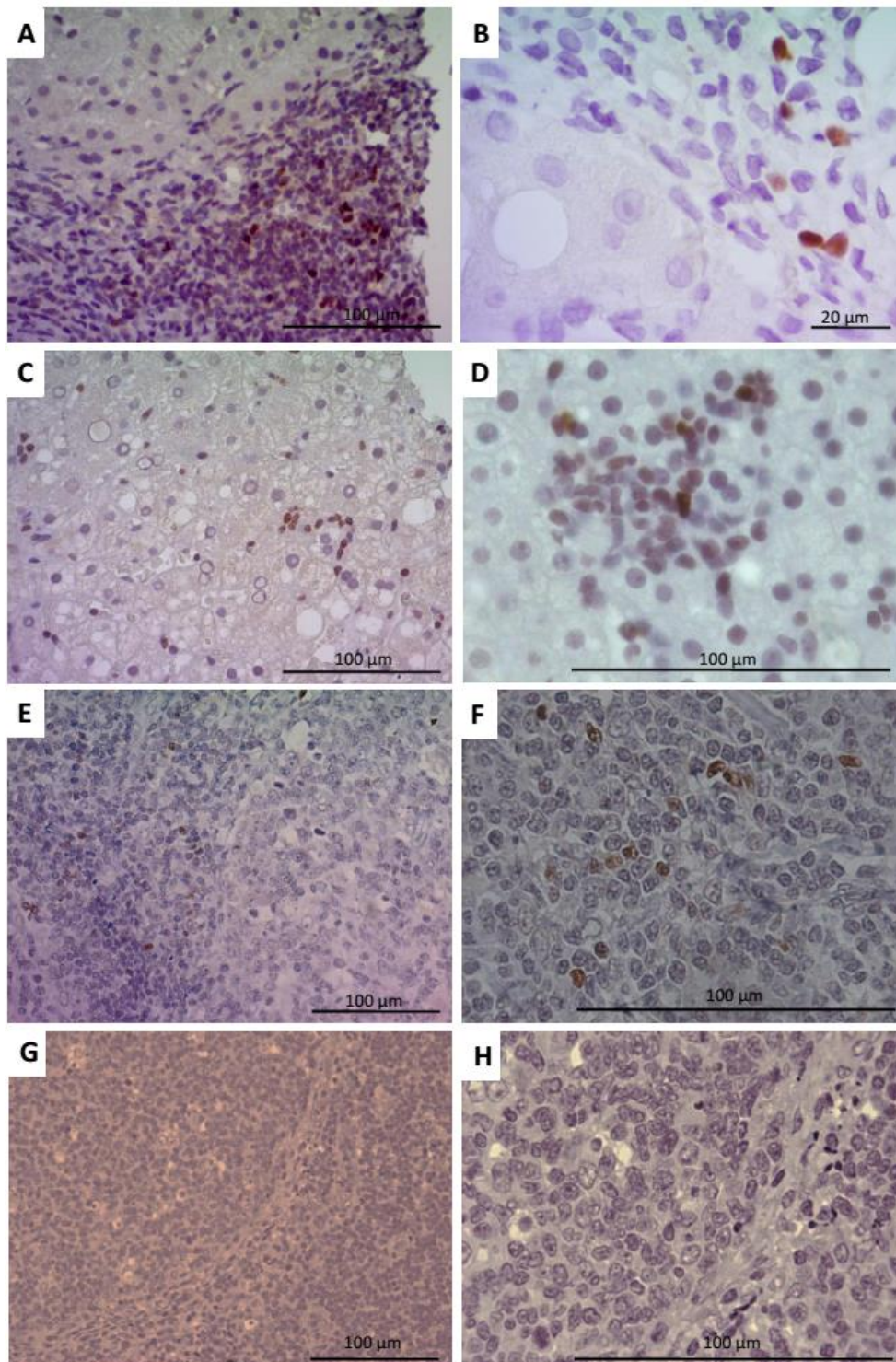


Figura 6. Linfocitos T reguladores. (A-D) Imágenes representativas de las inmunomarcaciones de LTreg en biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina de pacientes con EHGNA. (A y B) muestra LTreg en el área portal, y (C y D) en área lobulillar. (E-H) Imágenes representativas de controles positivos y negativos en biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina de amígdalas. (E y F) controles positivos, (G y H) controles negativos. (A, C, E y F) Magnificación 400X. (B, D, F y H) Magnificación 1000X.

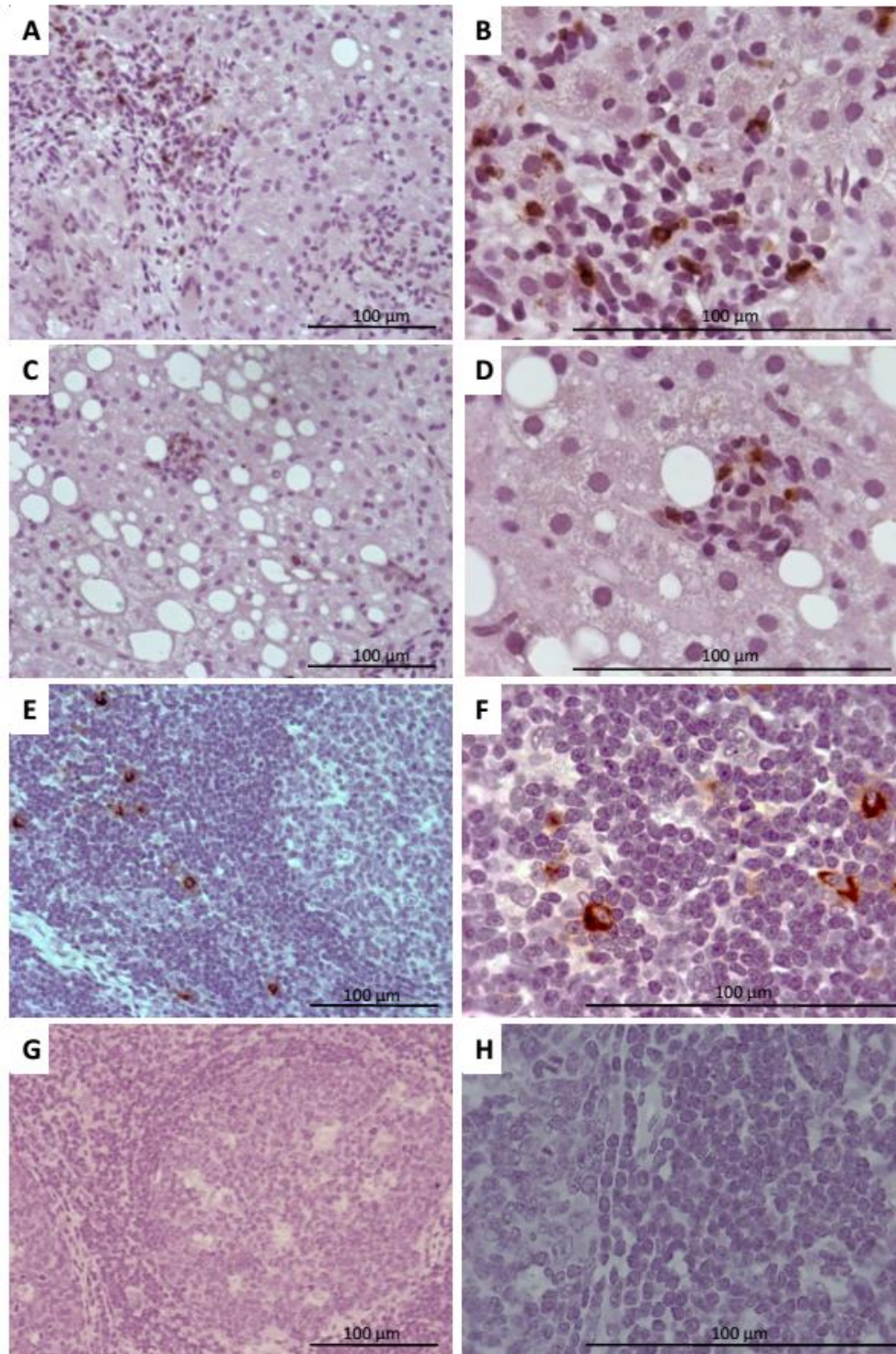


Figura 7. Linfocitos T *helper*17. (A-D) Imágenes representativas de las inmunomarcaciones de LTh17 en biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina de pacientes con EHGNA. (A y B) muestra LTh17 en el área portal, y (C y D) en área lobulillar. (E-H) Imágenes representativas de controles positivos y negativos en biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina de amígdalas. (E y F) controles positivos, (G y H) controles negativos. (A, C, E y F) Magnificación 400X. (B, D, F y H) Magnificación 1000X.

Todas las poblaciones linfocitarias evaluadas se encontraron presentes principalmente en las áreas portales/periportales (P/P) con escasa presencia lobulillar. Los resultados de la cuantificación muestran que, a nivel portal, hubo frecuencias similares de CTL y LTh tanto en pacientes pediátricos como en adultos. Por su parte, en relación a las subpoblaciones de Th, se observaron frecuencias similares de linfocitos LTreg y LTh17 en niños, pero escasa presencia de LTh17 en adultos (Tablas 3 y 4). En pacientes pediátricos se encontraron a nivel lobulillar representados principalmente los CTL mientras que en adultos las frecuencias de CTL y Th fueron similares. Es importante destacar que la mayoría de los casos de ambos grupos etarios no demostraron presencia de LTh17 a nivel lobulillar (Tablas 3 y 4).

Tabla 3: Cuantificación de las poblaciones linfocitarias del infiltrado inflamatorio hepático presentes en pacientes pediátricos con EHGNA

Poblaciones celulares	Área Portal/Periportal	Área Lobulillar
CTL	0,508 (0-0,704)	32,5 (1-61)
LTh	0,505 (0,220-0,807)	6 (0-22)
LTreg	0,038 (0-0,113)	0,5 (0-7)
LTh17	0,030 (0-0,123)	0 (0-6)

Los resultados de recuentos del área Portal/Periportal se expresan número de linfocitos+/- número de linfocitos totales por espacio porta y los resultados del área lobulillar cómo el número de linfocitos + en 10 campos de 40x. En ambos casos los resultados se expresan como Mediana (rango).

Tabla 4: Cuantificación de las poblaciones linfocitarias del infiltrado inflamatorio hepático presentes en pacientes adultos con EHGNA

Poblaciones celulares	Área Portal/Periportal	Área Lobulillar
CTL	0,464 (0,244-0,689)	32 (0-135)
LTh	0,472 (0-0,840)	31,5 (0- 67)
LTreg	0,071 (0-0,605)	4,5 (0-53)
LTh17	0 (0-0,059)	0 (0-21)

Los resultados de recuentos del área Portal/Periportal se expresan número de linfocitos+/- número de linfocitos totales por espacio porta y los resultados del área lobulillar cómo el número de linfocitos + en 10 campos de 40x. En ambos casos los resultados se expresan como mediana (rango).

Teniendo en cuenta estos perfiles, se realizó el análisis comparativo de la cuantificación de cada población a nivel portal y lobulillar entre ambos grupos etarios.

Como se muestra en la figura 8, se observaron diferencias significativas en la cuantificación de LTh y de la subpoblación de LTreg entre los pacientes pediátricos y adultos. Particularmente, a nivel lobulillar tanto los LTh como los LTreg demostraron menor presencia en los pacientes pediátricos ($p=0,0025$ y $p=0,0096$ respectivamente). Por su parte, a nivel portal solo la población de LTreg presento diferencias, siendo significativamente mayor en pacientes adultos ($p=0,0062$). Finalmente, no se observaron diferencias cuantitativas significativas entre los CTL y LTh17 de ambos grupos.

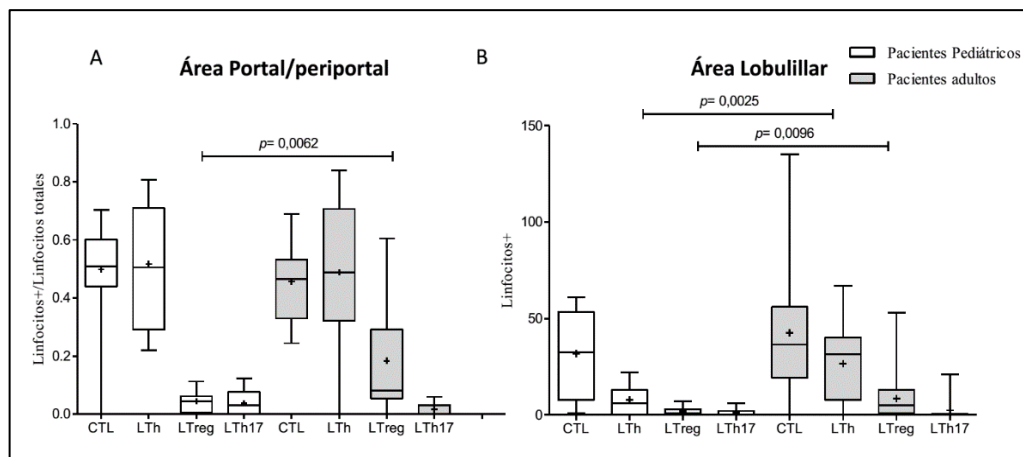


Figura 8. Poblaciones linfocitarias del infiltrado inflamatorio hepático presentes en pacientes pediátricos y adultos con EHGNA. A) Área portal/periportal, B) área lobulillar. Los resultados se representan en diagramas de cajas. La línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana. Las líneas horizontales por fuera de las cajas representan los percentilos 5 y 95. La media se indica como +. Los resultados de recuentos del área Portal/Periportal se expresan como número de linfocitos+/ número de linfocitos totales por espacio porta y los resultados del área lobulillar cómo el número de linfocitos + en 10 campos de 40x.

Cuando se evaluó la frecuencia de cada población linfocitaria según se trate de casos con esteatosis simple (ES), *borderline* o EHNA no se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos etarios.

Asimismo, cuando se comparan las frecuencias de las poblaciones linfocitarias entre pacientes pediátricos y adultos con diagnóstico de EHNA se observaron los mismos perfiles de frecuencias y diferencias descritas para el grupo completo de pacientes con EHGNA (Figura 9).

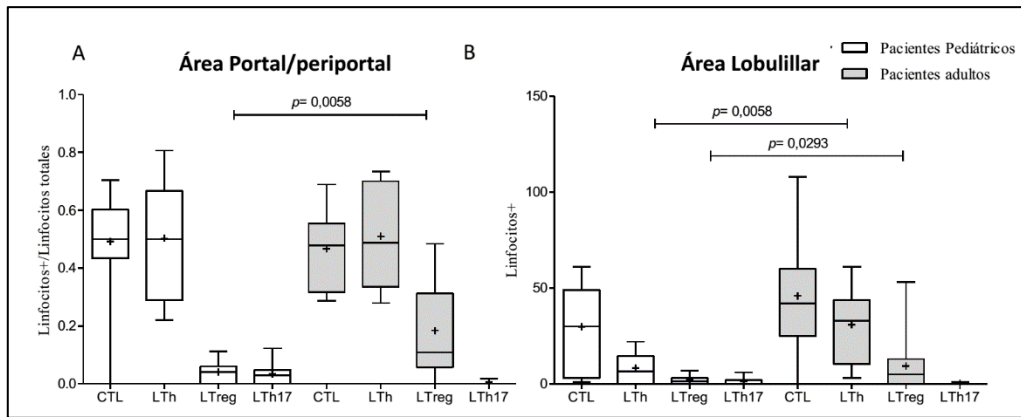


Figura 9. Poblaciones linfocitarias del infiltrado inflamatorio hepático presentes en pacientes pediátricos y adultos con EHNA. A) Área portal/periportal, B) área lobulillar. Los resultados se representan en diagramas de cajas. La línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana. Las líneas horizontales por fuera de las cajas representan los percentiles 5 y 95. La media se indica como +. Los resultados de recuentos del área Portal/Periportal se expresan número de linfocitos+/ número de linfocitos totales por espacio porta y los resultados del área lobulillar cómo el número de linfocitos + en 10 campos de 40x.

4.3 Evaluación de poblaciones linfocitarias en relación a la severidad del daño hepático

Para evaluar el posible rol de las poblaciones linfocitarias en el contexto de la patogenia de la EHGNA, cada población se analizó con respecto al grado de inflamación, severidad de la esteatosis y estadio de fibrosis. Dicho análisis mostró resultados diferentes en cada grupo etario.

En pacientes pediátricos los LTh, LTreg y LTh17 no demostraron relación con ninguno de los parámetros evaluados; sin embargo, los CTL presentaron un perfil similar tanto a nivel portal como lobulillar con menor presencia en los casos con mayor severidad de inflamación (Figura 10), aunque con diferencia estadísticamente significativa solo en el área portal (portal $p=0,006$, lobulillar tendencia $p=0,06$). Asimismo, dicha población portal demostró asociación significativa con la severidad de la fibrosis (Figura 11); los casos con estadios menores de daño presentaron mayor frecuencia celular ($p=0,02$). En vista de estos resultados y conociendo el rol de los LTreg sobre la actividad de los CTL, se evaluó la relación CTL/LTreg con respecto a la severidad de la inflamación y fibrosis; sin embargo, no se observaron diferencias significativas.

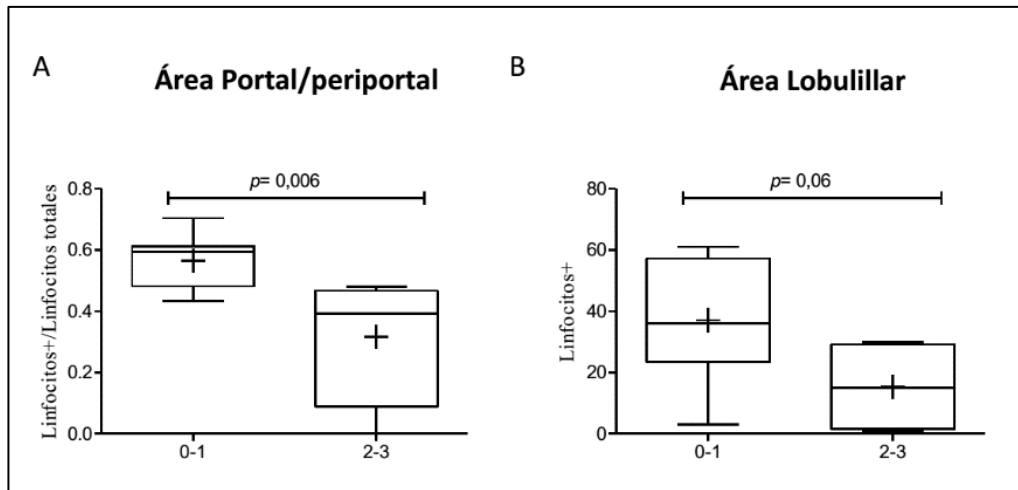


Figura 10. CTL presentes en el infiltrado inflamatorio de pacientes pediátricos con respecto a la severidad de la inflamación. A) Área portal/periportal, B) área lobulillar. Los resultados se representan en diagramas de cajas. La línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana. Las líneas horizontales por fuera de las cajas representan los percentilos 5 y 95. La media se indica como +. Los resultados de recuentos del área Portal/Periportal se expresan número de linfocitos+/ número de linfocitos totales por espacio porta y los resultados del área lobulillar cómo el número de linfocitos + en 10 campos de 40x

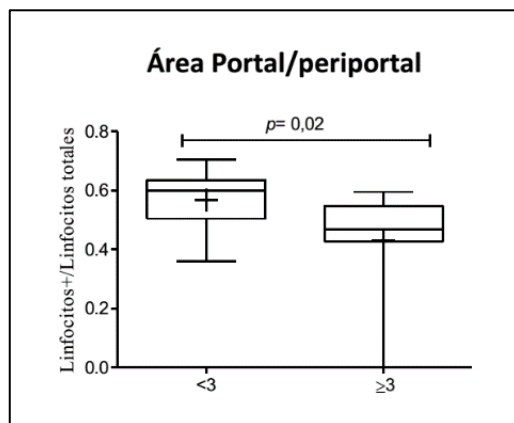


Figura 11. CTL del área portal presentes en el infiltrado inflamatorio de pacientes pediátricos con respecto a la severidad de la fibrosis. Los resultados se representan en diagramas de cajas. La línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana. Las líneas horizontales por fuera de las cajas representan los percentilos 5 y 95. La media se indica como +. Los resultados de recuentos del área portal/periportal se expresan número de linfocitos+/ número de linfocitos totales por espacio porta.

En el caso de los pacientes adultos, si bien los LTh y los LTh17 no mostraron asociación con ninguno de los parámetros de daño hepático, los CTL y LTreg demostraron perfiles interesantes con respecto a la severidad de la fibrosis y de la esteatosis. Como muestra la figura 12, los CTL presentes a nivel portal mostraron frecuencias similares con respecto a la severidad de la fibrosis; sin embargo, los LTreg portales demostraron una tendencia de asociación con menores frecuencias en los casos de mayor severidad. Por su parte, la relación CTL/LTreg portal mostró un aumento significativo ($p= 0,01$) a mayor severidad de la fibrosis (Figura 12 C).

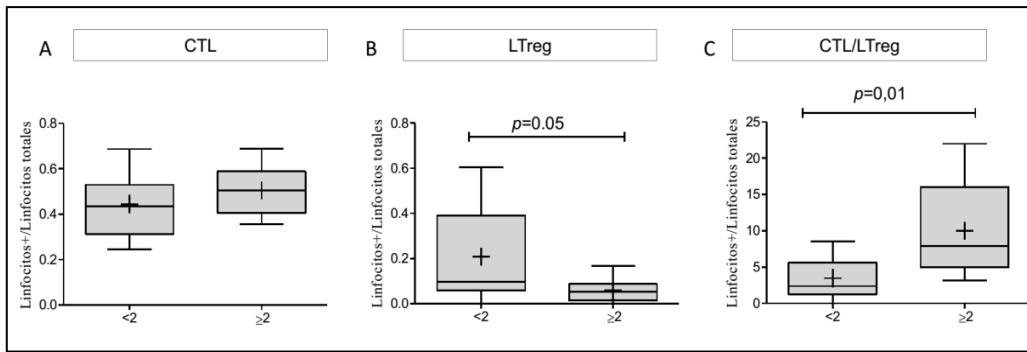


Figura 12. CTL, LTreg y CTL/LTreg portales en pacientes adultos con respecto a la severidad de la fibrosis. A) CTL, B) LTreg y C) relación CTL/LTreg. Los resultados se representan en diagramas de cajas. La línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana. Las líneas horizontales por fuera de las cajas representan los percentilos 5 y 95. La media se indica como +. Los resultados de recuentos del área Portal/Periportal se expresan número de linfocitos+ / número de linfocitos totales por espacio porta.

Con respecto a la severidad de la esteatosis, a nivel portal, no se observaron diferencias en los CTL; sin embargo, al analizar la frecuencia de LTreg, se vio que ésta era significativamente mayor ($p<0,05$) en los pacientes con grado de esteatosis 2. En consecuencia, la relación CTL/LTreg también mostró diferencias significativas (Figura 13).

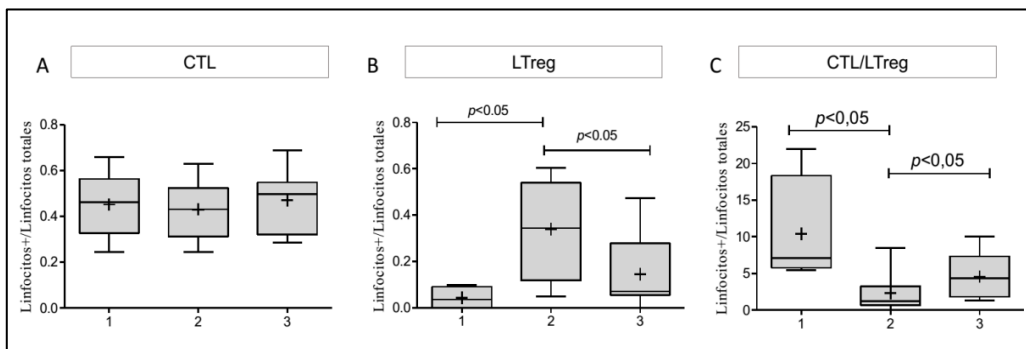


Figura 13. CTL, LTreg y CTL/LTreg portales en pacientes adultos con respecto a la severidad de la esteatosis. A) CTL, B) LTreg y C) relación CTL/LTreg. Los resultados se representan en diagramas de cajas. La línea horizontal dentro de cada caja indica la mediana. Las líneas horizontales por fuera de las cajas representan los percentilos 5 y 95. La media se indica como +. Los resultados de recuentos del área Portal/Periportal se expresan número de linfocitos+ / número de linfocitos totales por espacio porta.

Finalmente, es importante destacar que tanto en los pacientes pediátricos como adultos los perfiles de frecuencias observados en relación a la severidad de la fibrosis se mantienen cuando se analizan sólo los casos con EHNA. Por su parte, con respecto a la esteatosis, el análisis mostrado en la figura 13 no pudo realizarse dado que todos los pacientes adultos con EHNA presentan esteatosis severa (grado 3).

5. Conclusiones

En el presente trabajo se analizaron las poblaciones linfocitarias de CTL, LTh, LTreg y LTh17 todas ellas presentes, en mayor o menor medida, en el infiltrado inflamatorio hepático de los pacientes con EHGNA.

Del estudio realizado surge que la frecuencia de cada una de las poblaciones linfocitarias es diferente en los dos grupos etarios. A su vez, la distribución de las mismas no es homogénea entre las distintas localizaciones intrahepáticas.

A través del análisis integrado de los resultados, podemos concluir que las poblaciones de CTL y LTreg serían las más involucradas en la patogenia de EHGNA, ya que son las que presentan diferencias significativas cuando son analizadas en relación a los cambios histológicos evaluados. La interrelación entre ambas poblaciones linfocitarias podría ser la que module de manera directa o indirecta a través de otras poblaciones celulares el perfil del daño y explique las diferencias entre ambos grupos etarios.

En la población pediátrica, se observa una menor frecuencia de CTL en los casos con mayor severidad de daño (inflamación y fibrosis), sin cambios evidentes en la frecuencia de las poblaciones LTh17 y LTreg y la relación CTL/LTreg. Esto podría indicar que no es la frecuencia de CTL lo que determina el daño producido sino el grado de activación de los mismos, o bien, sugeriría la participación de otras poblaciones no evaluadas en este trabajo como actores importantes involucrados en el desarrollo de daño.

Por otro lado, en los pacientes adultos, se observó una relación directa entre la fibrosis y la relación CTL/LTreg, pudiendo suponer un efecto directo del proceso de fibrogénesis por estas dos poblaciones. La disminución en la frecuencia de LTreg quizás no sea solo relativa al influjo de otras poblaciones linfocitarias, sino también como consecuencia de su susceptibilidad a la muerte por el daño oxidativo del ambiente hepático. De esta manera, menores frecuencias de LTreg indicarían una menor regulación sobre la actividad de los CTL y de otras células del ambiente hepático como células de Kupffer y células NK, que participan en la activación del proceso de fibrogénesis.

Si se considera que la esteatosis es el primer evento y la inflamación el segundo en el proceso de daño, la elevada frecuencia de LTreg en pacientes adultos en estadios moderados de esteatosis (estadio 2) podría indicar el intento de dicha población por regular ambos eventos sin llegar a ser efectiva.

En conclusión, si bien este estudio mostró que no hay una clara diferencia cuantitativa en las poblaciones linfocitarias evaluadas entre las distintas condiciones de la EHGNA (esteatosis simple, borderline y EHNA), sí existen diferencias en sus frecuencias entre ambos grupos etarios y, en consecuencia, una posible participación diferencial en el daño.

El estudio de un mayor número de casos permitirá confirmar estos resultados y, a su vez, el análisis de otras poblaciones linfocitarias permitirá una mejor caracterización de la participación del sistema inmune en la patogenia.

6. Perspectivas a futuro

En este trabajo se analizaron los resultados disponibles hasta el momento; sin embargo, se realizaron inmunomarcaciones que aún están en etapa de cuantificación, por lo tanto, se plantea reanalizar los datos completos y presentar los resultados en el Congreso Argentino de Hepatología XX/19 (junio del 2019).

Dada la elevada frecuencia de LTh pero la baja frecuencia de LTreg y LTh17 observada, se plantea estudiar también la presencia y participación de los LTh1 en el contexto de la patogenia. Sumado a esto también es interesante estudiar la participación de otras poblaciones celulares como NKT y NK.

7. Referencias

- ¹Lavine, J. &Schwimmer, J. in Clin Liver Dis Vol. 8 549-558 (2004).
- ²Roberts, E. Non-alcoholic Steatohepatitis in Children. Clin Liver Dis 11, 155-172 (2007)
- ³European Association for the Study of the Liver. EASLEASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the management of non-alcoholic fatty. J Hepatol 64, 1388-1402 (2016).
- ⁴Arora, A. & Sharma, P. Non-invasive Diagnosis of Fibrosis in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. Journal of clinical and experimental hepatology 2, 145-155 (2012).
- ⁵Bedossa, P. Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. Liver Int 37 Suppl 1, 85-89 (2017).
- ⁶Kleiner, D. et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Hepatology. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. 41, 1313-1321 (2005).
- ⁷Carter-Kent, C. et al. Nonalcoholic steatohepatitis in children: a multicenter clinicopathological study. Hepatology.50, 1113-1120 (2009).
- ⁸Loomba, R, Sirlin, C, Schwimmer, J. & Lavine, J. Advances in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology 50, 1282-1293 (2009).
- ⁹ <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- ¹⁰Williams, C, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholicsteatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liverbiopsy: a prospective study. Gastroenterology 140, 124-131, (2011).
- ¹¹Bays HE et al. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. Expert Rev Cardiovasc Ther 6, 343-368 (2008).
- ¹²El-Zayadi, A. Hepatic steatosis: a benign disease or a silent killer. World J Gastroenterol 14, 4120-4126 (2008).
- ¹³Saito T, Misawa K & S., K. Fatty liver and non-alcoholic steatohepatitis. . Intern Med. 46, 101-103 (2007).
- ¹⁴Alkhour, N. & McCullough, A. J. Noninvasive Diagnosis of NASH and Liver FibrosisWithin the Spectrum of NAFLD. Gastroenterology &hepatology 8, 661-668 (2012).
- ¹⁵Robinson, M. W., Harmon, C. &O'Farrelly, C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cell Mol Immunol*13, 267-276, (2016).
- ¹⁶Bogdanos, D. P., Gao, B. & Gershwin, M. E. Liver immunology. Comprehensive Physiology3, 567-598, (2013).
- ¹⁷Heymann, F. &Tacke, F. Immunology in the liver from homeostasis to disease. Nature reviews. Gastroenterology & hepatology13, 88-110 (2016).