

DENSIDAD SUPERFICIAL DE HEPATOCITOS DE HÍGADOS SOMETIDOS A UN FACTOR ESTIMULANTE HUMORAL EN RATONES ISOGÉNICOS LÍNEA IOR.

Marielin Concepción Osorio¹, Pedro A. Díaz Rojas², Tania Rodríguez Amador³.

1 Especialista de I Grado en MGI y Especialista de I Grado en Histología. Instructor. Facultad de Ciencias Médicas "Mariana Grajales Coello". Universidad de Ciencias Médicas de Holguín. Holguín. Cuba. Dirección: Calle Frexes # 324 e/. Victoria y Mendieta. Holguín. Telf: 472036.

2 Especialista de II Grado en Histología. Profesor Titular. Máster en Educación Médica. Universidad de Ciencias Médicas de Holguín. Holguín. Cuba. Ave. Lenin # 3. Edificio 12 plantas. Apto 1106. Holguín. 462650.

3. Licenciada en enfermería. Especialista de I Grado en Histología. Profesor Asistente. Facultad de Ciencias Médicas "Mariana Grajales Coello". Universidad de Ciencias Médicas de Holguín. Holguín. Cuba. Dirección: Calle 27 no 17 e/ 20 y Pepito Tey. Nuevo Llano. Holguín.

RESUMEN

Se estudió el comportamiento de la densidad superficial de los hepatocitos en 14 muestras del lóbulo medio de hígados de ratones isogénicos IOR que fueron sometidos a tres dosis de citosol de hígado regenerativo al inicio del experimento. Las muestras fueron tomadas durante ocho días con frecuencia de doce horas. El corte se dividió en zonas proximal, medial y distal al hilio. Se aplicó el método morfométrico para la determinación de la densidad superficial de hepatocitos en un área predeterminada del lobulillo hepático. Los resultados mostraron que en las tres zonas del lóbulo el comportamiento de la densidad superficial ocurre de similar manera, con un sentido al incremento luego del momento final del experimento, lo que se corroboró con la aplicación de la prueba de t de Student. Los incrementos más significativos ocurrieron en la zona proximal y distal, aunque en todas las zonas existen diferencias significativas entre los valores obtenidos en la primera mitad de tiempo del experimento respecto a la parte final.

Palabras clave: densidad superficial, hepatocitos, regeneración hepática.

INTRODUCCIÓN

El hígado es capaz de regular su crecimiento en función de sus necesidades, por lo que puede proliferar o sufrir apoptosis, lo que depende de la situación a la que se enfrente. La capacidad

de regeneración hepática es extraordinaria, ya que es capaz de recuperar su tamaño óptimo tras hepatectomías parciales.

La regeneración hepática es la respuesta fundamental del hígado frente al daño tisular. Es un **proceso multifactorial inducido y controlado por estímulos específicos, tanto endógenos como exógenos**, que originan cambios secuenciales en la expresión génica y en la estructura de las células hepáticas. Su duración es relativamente corta, tanto en animales de experimentación como en humanos.¹

Los eventos celulares que ocurren en este proceso no sólo están en relación con los hepatocitos y las células madres, también desempeñan un papel importante las células no parenquimatosas, como las células de Kupffer, las células endoteliales y las células estrelladas o estelares; las que proporcionan las citoquinas y los factores de crecimiento como son el hepático, el transformante beta, y el epidérmico de unión a la heparina, necesarios para la replicación de los hepatocitos mediante un proceso perfectamente sincronizado.^{2,3}

La investigación en este campo ha experimentado un gran avance en los últimos años, basado fundamentalmente en el desarrollo de modelos animales y debido al gran interés que suscita la posibilidad de su aplicación a la clínica.⁴

Se han realizado varias investigaciones con métodos morfométricos en animales de experimentación. Estos estudios se fundamentan en el análisis de los datos obtenidos en las zonas del lobulillo hepático clásico.⁵

No encontramos estudios que analicen los resultados de indicadores morfométricos nucleares desde la perspectiva estructural de un lóbulo hepático dividido en zonas en relación a la cercanía al hilio del órgano.

Por lo antes expuesto nos proponemos como objetivo analizar el comportamiento de la densidad superficial de los núcleos de los hepatocitos según la posición que ocupan en las zonas proximal, medial y distal del lóbulo hepático medio de ratones isogénicos línea IOR sometidos a citosol regenerativo.

MÉTODOS

Se realizó un estudio experimental donde se utilizaron 66 ratones blancos isogénicos línea IOR certificados, machos con un peso aproximado entre 25 y 35 gramos.

Previo al experimento fueron sometidos a un periodo de adaptación de tres semanas en **condiciones de laboratorio, con régimen día/noche normal, comida y agua "at libitum"** y temperatura ambiente controlada entre 21 y 24 grados Celsius en un local preparado para este fin.

Se estableció un grupo de 20 ratones para la obtención de un macerado hepático de hígados en fase regenerativa post hepatectomía parcial.

Una vez obtenido el citosol por el autor del experimento se procedió a su inoculación en un grupo experimental de 46 ratones, en una dosis diaria de 1,5 ml por vía transperitoneal durante tres días. La inoculación se realizó siempre a partir de las 10:00 pm.

Veinticuatro horas después del último día de inoculación se procedió a la toma de muestra durante ocho días con un intervalo de doce horas, provocando la muerte por decapitación y se disecó el lóbulo medio del hígado.

El fragmento de lóbulo hepático medio se fijó en mezcla de formalina, alcohol y ácido acético y se incluyó con la técnica clásica de la parafina.

Los cortes de aproximadamente de seis a ocho micrómetros de espesor fueron teñidos con hematoxilina y eosina bajo control de pH.

Se capturaron cinco imágenes por cada preparación histológica de las zonas proximal, medial y distal respecto a la cercanía al hilio hepático, con una cámara digital marca Canon de ocho Mpx con un lente óptico de 3X, acoplada a un microscopio JENAMED 2 con lente objetivo 40X y lente ocular de 10X para un aumento total de 1200X.

Para realizar el cálculo de la densidad superficial de los hepatocitos, se utilizó el software ImageJ del National Institutes of Health calibrado con un objetivo micrométrico de la Karl Zeits.

La densidad superficial se midió a través de una rejilla cuadrículada de 70 x 76,56 µm de lados, para un área total de 6737,28 µm². Se superpuso sobre la imagen y se procedió a contar los núcleos de hepatocitos sobre los cuales cayeron los puntos de los interceptos de los segmentos de la rejilla.

El valor de la densidad superficial se obtuvo por la formula:

$$D_n = \frac{\sum n}{N} \times A$$

Donde corresponde a los puntos que inciden en los núcleos, N los puntos totales de la rejilla cuadrículada y A el área total de la rejilla.

Los datos se procesaron con la versión 12 del programa MyStat para Windows. Se comprobó la normalidad de los datos lo que permitió el cálculo de la media y desviación estándar, el comportamiento de las tres zonas se determina por el análisis de varianza, la comparación de los datos de la fase inicial y la fase final del experimento mediante la prueba de diferencias de medias de t de Student, se ilustra en gráficos de plexograma.

RESULTADOS

La densidad superficial es un indicador estereológico que representa la cantidad de núcleos de hepatocitos que se encuentran en un área determinada, es una medida adicional que esta dada por la fracción de puntos de un testaje que caen sobre los núcleos dividido por el total de puntos que posee el test respecto al área total de la rejilla utilizada para el conteo.

Se observa en la figura 1 un ejemplo de la manera en que se realiza el conteo de núcleos de hepatocitos con la superposición de la rejilla cuadriculada.

En el cuadro 5 se observan los resultados de la densidad superficial nuclear de los hepatocitos en cada una de las zonas estudiadas según el tiempo de la toma de la muestra. El valor promedio y su desviación estándar en la zona proximal fue de $701,23 \pm 135,83 (\mu\text{m}^2 \cdot 10^3)$, en la zona medial $707,48 \pm 46,87 (\mu\text{m}^2 \cdot 10^3)$ y en la zona distal $682,48 \pm 125,21 (\mu\text{m}^2 \cdot 10^3)$ (cuadro 1).

El coeficiente de variación en las tres zonas se encontró por debajo de 0,20, lo que permite inferir la poca variabilidad de indicar medido (cuadro 2).

Al observar el comportamiento de la densidad superficial de núcleos de los hepatocitos según el tiempo se puede apreciar en el gráfico 1 donde se superponen las tres zonas, que los resultados son los siguientes:

En la zona proximal (gráfico 1) la densidad superficial oscila alrededor del valor de $600 \mu\text{m}^2 \cdot 10^3$ hasta las 84 horas aproximadamente, a partir de la cual comenzó a ascender y mantiene esa tendencia hasta el final del experimento.

En el caso de la zona medial los valores se comportan entre los $600 \mu\text{m}^2 \cdot 10^3$ y $700 \mu\text{m}^2 \cdot 10^3$ y oscilan entre estos valores hasta las 96 horas aproximadamente, a partir de aquí se observa una ligera tendencia a su elevación y se acercó a los $800 \mu\text{m}^2 \cdot 10^3$ al final del experimento.

La zona distal la densidad superficial de núcleos de hepatocitos presenta valores por debajo de los $600 \mu\text{m}^2 \cdot 10^3$ en las primeras 72 horas, luego se observó una evidente tendencia a elevar los valores por encima de esta cifra hasta concluir el experimento.

Al comparar los resultados mediante el análisis de varianza se aprecia que no existen diferencias en el comportamiento de los valores promedios en las tres zonas, lo que puede interpretarse como un proceso de respuesta general uniforme de la población de hepatocitos, independientemente que exista una ligera tendencia al aumento de la densidad superficial luego de concluido el período de estudio.

Sin embargo al comparar la fase inicial con la fase final del experimento y comparar su medias se aprecia diferencias significativas en la misma zona, con un predominio evidente de la zona proximal y distal en cuanto al desenlace final como se aprecia en el cuadro 3.

DISCUSIÓN

La regeneración hepática es la respuesta fundamental del hígado frente al daño tisular. Es un proceso multifactorial inducido y controlado por estímulos específicos, tanto endógenos como exógenos, que originan cambios secuenciales en la expresión génica y en la estructura de las células hepáticas.⁸

En nuestro medio se han realizado métodos de estudios para potenciar la regeneración hepática en animales de experimentación, se destacan entre ellos la hepatectomía parcial y la acción de citosol de hígado regenerativo, este último como portador de factores estimulantes de este proceso.⁷

Diversos estudios morfométricos e inmunohistoquímicos se han empleado para la determinación de diferentes parámetros relacionados con la regeneración hepática. Los indicadores más utilizados se corresponden con el volumen nuclear de los hepatocitos, su relación núcleo citoplasma y la densidad superficial nuclear, como elementos que permiten inferir dos procesos de vital importancia en la célula.^{8, 9}

El primero es el incremento de la demanda metabólica y el segundo la tendencia a la proliferación de los hepatocitos que induce a la organización cromosomal para su entrada en el ciclo de mitosis, ambos se fundamentan en la replicación del material genético.¹⁰

Muchos de los hepatocitos inducidos a dividirse duplican el ADN nuclear y llegan a ser tetraploides y poliploides, al detener el proceso de división sin causa conocida y duplicar el material genético dentro del mismo núcleo. También puede ocurrir que el núcleo se divide y no se produce la división del citoplasma dando lugar a la presencia de células binucleadas en el tejido hepático, lo que se conoce como amitosis.¹⁰

Entre los modelos descritos por **Cascales**¹¹ se encuentran el de Higgins y Anderson en 1931, basado en la eliminación por cirugía de dos tercios del hígado y el hígado remanente crece hasta que se restaura la masa hepática original. Otro muy utilizado en investigaciones farmacológicas es la pérdida de células hepáticas debido a la administración de fármacos hepatotóxicos necrogénicos como el paracetamol, el CCl₄ y la tioacetamida.

Un modelo descrito por este mismo autor que presenta gran interés por su aplicación a la clínica, es el que se origina por embolización o ligadura de la vena porta, lo que permite eliminar el riego sanguíneo portal en la porción del hígado que se va a extirpar, proporciona mayor flujo hemodinámico a la porción restante, con la consiguiente inducción de la proliferación hepatocelular, tiene su aplicación en caso de cirrosis, tumores y también en trasplantes de hígado de pequeño tamaño.

En todos los casos, el factor de estimulación de la regeneración se hace presente en el torrente circulatorio y comienza a ser efectivo en las regiones hepáticas mejor nutridas, estudios sobre isquemia realizados por **Vizzoto**¹² muestran las alteraciones que se producen al realizar los trasplantes hepáticos que guardan relación con la respuesta vascular del órgano.

La mayoría de los estudios morfométrico basan su análisis en las zonas del lobulillo hepático clásico y no toman en consideración la cercanía o lejanía de las zonas estudiadas al hilio hepático. Nuestra experiencia, favorece la comprensión del proceso a nivel macroscópico

tomando en consideración el principio planteado anteriormente. Estudios como el de *Hoyos*¹³ sobre regeneración hepática post-transplante expresan el comportamiento de éste órgano. En nuestro caso los factores humorales presentes en el citosol administrado vía intraperitoneal son absorbidos por el sistema porto cava circulando a través del parénquima hepático donde actúan.

El análisis del comportamiento de la densidad superficial de núcleos de hepatocitos muestra valores bajos al inicio con una tendencia a subir hasta el final del experimento.

La densidad superficial de núcleos de los hepatocitos en la zona medial fue la que presentó una respuesta tardía e irregular respecto al resto de las zonas estudiadas.

Este comportamiento general del lóbulo medio se explica por el hecho de que a medida que avanza el tiempo el estímulo decrece y ello se debe a que los posibles factores estimulantes de la regeneración existentes en el citosol que se inocularon antes del experimento son metabolizados por los propios hepatocitos y por ello hay una tendencia a disminuir su concentración en sangre, lo que es corroborado por los valores de la correlación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Flores Moreno S. Efectos de los factores de crecimiento tisular tras la resección mayor del hígado. Informes, Estudios e Investigación, 2006. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía. 8
2. Andrini LB. Expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) durante la regeneración hepática. Tesis Doctoral Méd. Vet. Argentina: Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Medicina; 2010. [citado 25 de junio de 2011] Disponible en: <http://www.postgradofcm.edu.ar/ProduccionCientifica/Tesis-Doctorales/17.pdf> 11
3. García Cardona A. Biología, Patobiología, Bioclínica y Fármaco-terapéutica Humana del Factor de Crecimiento Hepático (HGF). Salud UIS 2007; 39: 30-42. 53
4. Díez Fernández, MC. Estudio bioquímico y estructural del modelo experimental de regeneración hepática postnecrótica inducida por tioacetamina. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. 2002, [citado 25 de junio de 2011] Disponible en: <http://eprints.ucm.es/tesis/19911996/D/1/D1005901.pdf>
5. Tuñón MJ, Álvarez M, Culebras JM, González-Gallego J. Modelos animales de fallo hepático fulminante. Nutr Hosp. 2007; 22(2): 199-209.
6. Aguilar JC. Función inmunológica del hígado desde la perspectiva de la vacunación terapéutica. Biotecnología Aplicada. 2009; 26: 1-9. 23
7. Díaz Rojas PA, Sánchez Meca J. Meta-análisis del volumen nuclear de hepatocitos sometidos a diferentes condiciones de estrés. Correo Científico Médico de Holguín [serie en Internet]. 2003 [citado 25 de junio de 2011]; 7(3): [aprox. 4 p.] Disponible en: <http://www.cocmed.sld.cu/no73/n73ori8.htm> 14

8. Leyva Sánchez E, Ríos Hidalgo N, Rodríguez Ramírez L, Díaz Rojas P. Comportamiento del volumen nuclear y del infiltrado inflamatorio en las hepatitis virales aguda y crónica. Hospital "V. I. Lenin". Holguín. 2001. Correo Científico Médico de Holguín [serie en Internet]. 2003 [citado 25 de junio de 2011];7(3):[aprox. 4 p.] Disponible en: <http://www.cocmed.sld.cu/no73/n73ori4.htm> 22
9. Cornejo Uribe R, et col. Análisis morfométrico del efecto de estimulaciones de láser infrarrojo sobre núcleos de hepatocitos de rata. Int. J. Morphol. 2010;28(3): 771-775.
10. Moreno Gomes E, da Silveira V, Ribeiro Filho J. Anatomía y fisiología hepática. Brasil: Atheneu; 2006. p. 13-36. 9
11. Cascales Angosto M. Señales que regulan la expresión de genes en la regeneración hepática. Madrid: Real Academia Nacional de Farmacia; 2009 [citado 25 de junio de 2011]. Disponible en: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/819/789>. 17
12. Vizzotto L, Vertemati M, Degna CT, Aseni P. Liver transplantation in man: morphometric analysis of the parenchymal alterations following cold ischaemia and warm ischaemia/reperfusion. J. Anat. 2001;198:603-610.
13. Hoyos SI. Regeneración hepática posterior al trasplante. Rev. Colomb. Cir. 2008;23(3): 156-161.

ANEXOS

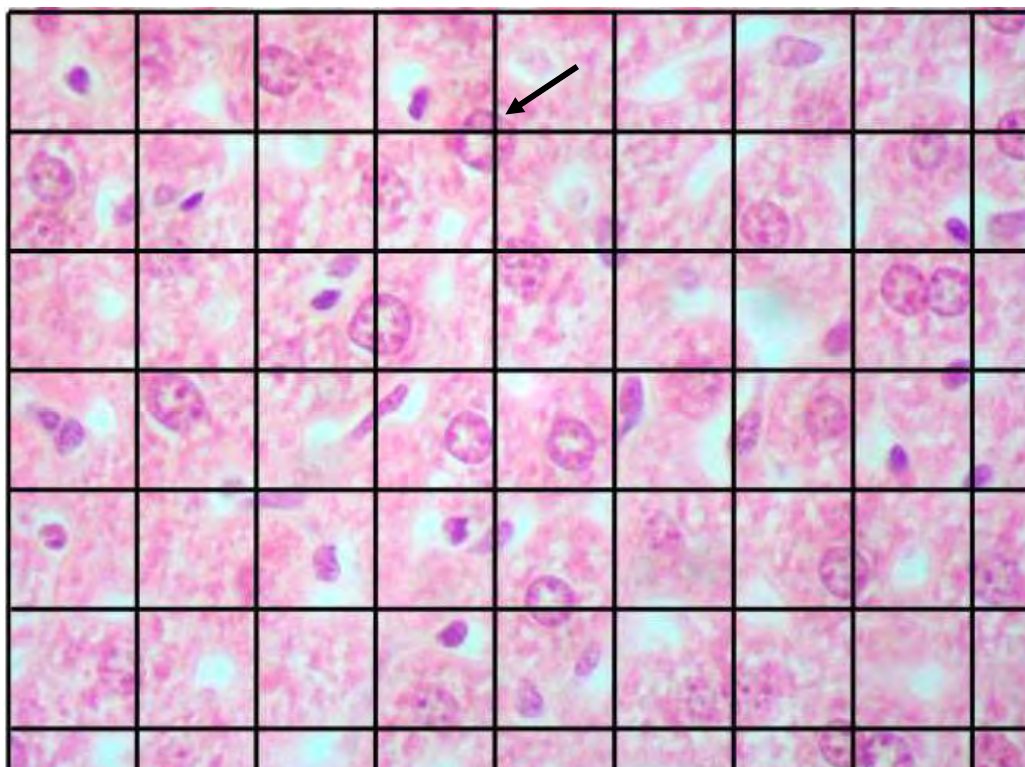


Figura 1. Microfotografía a 100 x de corte histológico de hígado de ratones isogénicos línea IOR sometidos a citosol regenerativo. Se observa la superposición de la rejilla cuadriculada para el estudio estereológico. Se señala con una flecha un punto que incide sobre un núcleo de hepatocitos. Tinción Hematoxilina y Eosina.

Cuadro 1. Densidad superficial de núcleos ($\mu\text{m}^2 \cdot 10^3$) de los hepatocitos de ratones isogénicos sometidos a citosol regenerativo según zonas del lóbulo medio y tiempo del experimento.

Tiempo en horas	Áreas del lóbulo hepático medio		
	Proximal	Medial	Distal
12	559,98	612,48	600,81
24	600,81	659,15	559,98
36	565,81	635,81	542,48
48	571,65	711,64	495,82
60	600,81	699,98	542,48
72	612,48	699,98	635,81
84	618,31	711,35	682,48
96	705,81	699,98	670,81
108	682,48	717,48	711,64

120	769,97	734,98	758,31
132	793,31	729,14	804,97
144	881,10	741,10	845,81
168	898,30	769,97	839,97
192	956,34	781,64	863,31

Fuente: Datos primarios.

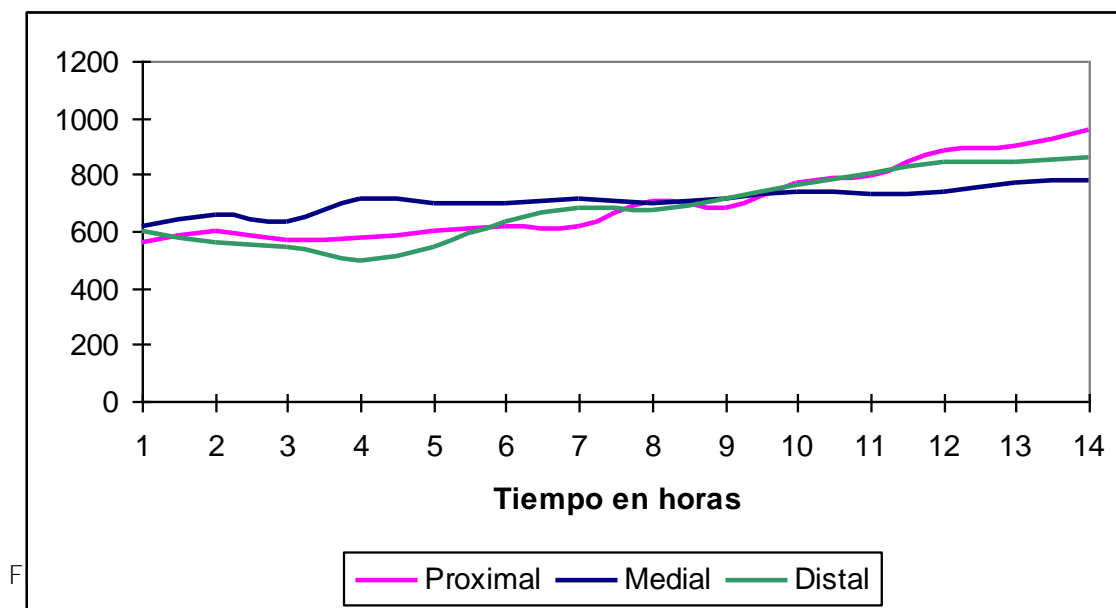
Cuadro 2. Resultados del promedio y su desviación estándar de la densidad superficial de núcleos ($\mu\text{m}^2 \cdot 10^3$) y el coeficiente de variación en los hepatocitos de ratones isogénicos sometidos a citosol regenerativo según zonas del lóbulo medio.

Estadísticos	Zonas del lóbulo medio		
	Proximal	Medial	Distal
Promedio	701,23	707,48	682,48
Desviación estándar	135,83	46,87	125,21
Coeficiente de variación	0,19	0,07	0,18

Fuente: Procesamiento estadístico. $F = 0,195$ $p \leq 0,8$

GRÁFICO 1

Comportamiento de la densidad superficial de núcleos ($\mu\text{m}^2 \cdot 10^3$) de los hepatocitos en la zona proximal del lóbulo medio de ratones isogénicos sometidos a citosol regenerativo según duración del experimento.



Cuadro 3. Resultados del promedio y su desviación estándar de la densidad superficial de núcleos ($\mu\text{m}^2 \cdot 10^3$) y el valor de t de Student al comparar el momento inicial del experimento con su momento final en la misma zonas del lóbulo medio.

Zonas del lóbulo	Momento del experimento		
	Inicio	Final	t de Student
	$\bar{X} \pm s$	$\bar{X} \pm s$	t y (p)
Proximal	600, 81 \pm 23,67	812,47 \pm 102,65	5,36 (\leq 0,001)
Medial	675,77 \pm 40,07	739,18 \pm 28,52	3,48 (\leq 0,005)
Distal	579,98 \pm 63,70	784,97 \pm 73,41	5,62 (\leq 0,001)

Fuente: Datos del autor.