

Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón"
Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana
Escuela Latinoamericana de Medicina

ALTERACIONES MORFOMÉTRICAS DE LOS HEPATOCITOS DE RATAS ALBINAS QUE INGIEREN ALCOHOL DESDE LA ADOLESCENCIA

Dra. Maritza González Bravo, Dra. Aleida Herrera Batista, Dra. Rosa María Coro Antich y Dra. Giselle Puldón Seguí

RESUMEN

Se estudió el hígado, se midieron las variables: área núcleo, área citoplasma, y relación núcleo citoplasma de los hepatocitos de las zonas periportal, intermedia y perivenosa. Se utilizaron 40 ratas de uno y otro sexos, conformándose 2 grupos: alcohólicas y controles. A las alcohólicas se le suministró etanol 40 % diluido en agua desde los 28 hasta los 90 d de nacidas, por vía oral y mediante una cánula intraesofágica. Las variables morfométricas área núcleo y la relación núcleo citoplasma resultaron estadísticamente diferentes y mayores en las ratas alcohólicas.

DeCS: ALALCOHOLISMO/complicaciones; HEPATOPATÍAS/patología; ADOLESCENTE; RATAS.

El alcoholismo constituye un grave problema médico y social. El abuso en el consumo de alcohol aumenta el riesgo de padecer enfermedad hepática^{1,2} hipertensión arterial, aterosclerosis,^{3,4} enfermedades gastrointestinales,⁵ además, provoca alteraciones en el comportamiento social del individuo.⁶

En las últimas décadas se ha producido un incremento progresivo y peligroso en el abuso de la ingestión de bebidas alcohólicas por parte de menores de edad, tanto de niños como adolescentes.⁷ En los primeros reportes se señalaba que los varones consumían más alcohol y con mayor

frecuencia que las hembras, sin embargo, en la última década el consumo de bebidas alcohólicas ha ido incrementándose en la población femenina de estas edades.⁸ Esto resulta alarmante, pues se plantea que el sexo femenino es más sensible al daño hepático por etanol que el masculino.^{5,9}

En la rata, la adolescencia se define como la fase peripuberal de maduración sexual que comienza aproximadamente a los 28 d y culmina alrededor de los 50 en la hembra y a los 63 d en el macho.¹⁰ Durante esta etapa el comportamiento y la respuesta farmacológica difieren de aquellos más jóvenes o más viejos.^{11,12}

La literatura recoge un gran cúmulo de trabajos que abordan los efectos nefastos del alcoholismo sobre el individuo en los períodos prenatal o perinatal, y en la adultez.¹⁰⁻¹² Sin embargo, los efectos del alcoholismo entre el destete y la adultez han recibido poca atención.

Durante la adolescencia se producen cambios dramáticos en el organismo, debido a variaciones en los niveles hormonales, como una consecuencia de la puesta en marcha de la pubertad; transformaciones fundamentalmente en los sistemas nervioso y endocrino.¹³

Teniendo en cuenta todos los cambios que se producen en la adolescencia, cabría esperar que las respuestas del organismo a los efectos del alcohol en esa etapa de la vida difieran de los individuos adultos o recién nacidos.

El hígado es una glándula voluminosa que realiza importantes funciones, se considera el órgano central del metabolismo y de la defensa xenobiótica. Se ha planteado que el lobulillo hepático presenta heterogeneidad zonal, describiéndose 3 regiones: perivenosa, intermedia y periportal.¹⁴ Se acepta en general que estas zonas difieren en su comportamiento metabólico, en el contenido de sus enzimas e incluso en sus estructuras subcelulares.¹⁵ Es por eso que resulta interesante estudiar por separado las características morfológicas de los hepatocitos de estas 3 zonas del lobulillo hepático.

El presente trabajo tiene como finalidad analizar las posibles alteraciones morfométricas de los hepatocitos de las zonas periportal, intermedia y perivenosa en ratas que ingieren el tóxico desde el comienzo de la adolescencia.

MÉTODOS

Se utilizaron 40 ratas albinas (*Rattus norvegicus*) escogidas al azar mediante una

tabla de números aleatorios. Se conformaron 2 grupos: experimental (A) y control (B), con 20 ratas cada uno (10 hembras y 10 machos). Al grupo experimental se le suministró etanol a razón de 6 g por kilogramo de peso corporal, dividido en 2 dosis diarias, con un intervalo de 4 h entre una y otra. Se utilizó la vía oral (cánula intraesofágica). El alcohol se diluyó a 40 % en agua. A las ratas controles se les suministró igual volumen de agua, también mediante una cánula intraesofágica. El tratamiento se extendió desde los 28 d de nacidas hasta los 3 meses de vida.

Las ratas fueron colocadas en jaulas individuales con agua y comida para ratas *ad libitum*, manteniéndose en iguales condiciones ambientales e higiénicas. Al finalizar la experiencia las ratas fueron sacrificadas. Se les extrajo el hígado y se tomaron fragmentos de un centímetro cúbico, los cuales se fijaron en formalina neutra tamponada y se incluyeron en parafina. Se obtuvieron cortes histológicos a 4 micras y se colorearon con la técnica de hematoxilina-eosina.

Para estudio morfométrico se utilizó el sistema cubano para morfometría de imágenes Digipat.¹⁶ El sistema consta de una microcomputadora 486, una tarjeta digitalizadora de video, una cámara de televisión de alta definición acoplada al microscopio, y una video impresora. Una vez digitalizadas las imágenes, se procedió a segmentarlas, definiendo en ellas los objetos de interés: el núcleo y la membrana citoplasmática de los hepatocitos. Dadas las características de poco contraste de estas estructuras con respecto al resto del tejido, se realizó la segmentación contorneando manualmente los núcleos y las membranas citoplasmáticas. Para medir las imágenes se programó un macro como tarea de medición, empleando las variables morfométricas siguientes: área de objetos (automática), como área

citoplasmática; área de huecos (automática), como área nuclear; área de huecos dividida entre área de objetos, para la relación núcleo/citoplasma.

De cada animal se midieron 30 hepatocitos: 10 de la zona periportal, 10 de la perivenosa y 10 de la intermedia. Para delimitar estas 3 zonas se digitalizó una imagen a pequeño aumento (objetivo 20x) y se tomó una foto que abarcara toda el área que se iba a medir. Se trazó una línea recta entre la zona portal y la vena centrolobulillar; se midió una distancia de 100 micras desde el espacio porta y otro segmento igual desde la vena, la zona que quedaba en el medio de estas 2 se consideró como la intermedia. Se buscaron marcadores morfológicos en el tejido, que ayudaron a delimitar esas zonas. Luego, sin mover la platina del centro del campo, se digitalizó otra imagen con el objetivo de 40x, para efectuar las mediciones sobre los hepatocitos. Se trabajó auxiliándose de la video impresión tomada a menor aumento, para no salir de la zona que se estaba midiendo.

Los ficheros con los resultados de las mediciones se exportaron al paquete estadístico SPSS (versión 6 sobre Windows), donde

se construyó un fichero total con todos los datos. Se aplicaron las pruebas estadísticas siguientes: para comparar los sexos dentro de cada grupo, t de Student; para comparar las 3 zonas dentro de cada grupo, análisis de varianza de una vía y para comparar cada una de las 3 variables morfométricas entre los 2 grupos, t de Student.

RESULTADOS

Al comparar las variables morfométricas *área núcleo, área citoplasma* y relación *área núcleo/área citoplasma*, entre los hepatocitos de las ratas hembras y machos, de los grupos A y B, no se obtuvieron diferencias significativas (tabla 1).

Al comparar las variables morfométricas antes citadas, entre las zonas periportales, intermedia y perivenosa, tanto en el grupo A (ratas alcohólicas) como en el grupo B (ratas controles) no se comprobaron diferencias significativas (tabla 2).

Al analizar las variables morfométricas en los hepatocitos de las ratas de los grupos A en relación con las del grupo B se obtuvieron los resultados siguientes: el área

TABLA 1. Comparación de sexos

Grupo	N Animales	n Células	AC	AN	NC
Alcohólicas hembras	10	300	176,85 + 55,84	44,59 + 14,90	0,26 + 0,89
Alcohólicas machos	10	300	183,94 + 53,89	43,56 + 12,85	0,25 + 0,89
Controles hembras	10	300	178,16 + 47,76	41,82 + 12,95	0,24 + 0,73
Controles machos	10	300	177,43 + 46,69	41,59 + 11,85	0,24 + 0,82

TABLA 2. Comparación de zonas

Grupo	Variable	Zona intermedia	Zona periportal	Zona perivenosa
Alcohólicos	AC	177,15 + 53,02	177,68 + 59,61	86,38 + 51,662
10 hembras	AN	43,80 + 3,71	43,39 + 13,07	45,06 + 14,91
10 machos	NC	0,26 + 0,08	0,26 + 0,10	0,26 + 0,09
Controles	AC	173,86 + 41,82	173,84 + 52,92	185,71 + 45,40
10 hembras	AN	41,53 + 12,73	40,31 + 11,94	43,29 + 12,42
10 machos	NC	0,25 + 0,07	0,24 + 0,08	0,24 + 0,08

TABLA 3. Comparación de variables morfométricas entre alcohólicas y controles

Grupo	N males	Ani- n males	Cé- lulas	AC	AN	NC
Alcohó- licos	20	600	180,40 + 54,94	44,08 + 13,91*	0,25 + 0,89*	
Contro- les	20	600	177,80 + 47,19	41,71 + 12,41*	0,24 + 0,77*	

del citoplasma no difiere significativamente entre ambos grupos; en tanto que las variables área núcleo y la relación área núcleo/área citoplasma mostró variaciones estadísticamente significativas entre los hepatocitos de las ratas alcohólicas y controles, para una $p < 0,05$ (tabla 3). En este último caso los valores de estas variables en las ratas alcohólicas fueron superiores a los presentados por las ratas controles.

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo mostraron que no hubo diferencias significativas entre hembras y machos para las variables área núcleo, área citoplasmática y relación núcleo/citoplasma en los hepatocitos de las ratas alcohólicas ni en los controles. Esto evidenció que no existe dimorfismo sexual con respecto a estos parámetros en el hígado de la rata en esta etapa del desarrollo.

En estudios experimentales realizados en animales de laboratorio (ratas y ratones adultos) se ha encontrado que las hembras padecen hepatitis alcohólica y cirrosis hepática en etapas más tempranas del desarrollo que los machos.¹⁷ Se ha planteado que los niveles elevados de estrógeno y progesterona en las ratas hembras pudieran explicar la mayor susceptibilidad del sexo femenino al etanol.¹⁷

La deshidrogenasa alcohólica es una enzima del citosol que cataliza la conversión de etanol en acetaldehído.¹⁸ Se ha comprobado que la expresión de esta enzima se encuentra bajo el control de un conjunto de hormonas como son los andrógenos, estrógenos y hormona del crecimiento. Se ha reportado que la testosterona incrementa la actividad hepática de la deshidrogenasa alcohólica, confiriéndole al macho un determinado nivel de protección al alcohol en relación con la hembra.¹⁷ Las ratas de este estudio comenzaron el tratamiento a los

28 d, finalizándolo a los 3 meses, cuando aún no han alcanzado la adultez plena; por lo tanto, no poseen los niveles de hormonas masculinas y femeninas que caracterizan la etapa adulta. Este argumento pudiera explicar por qué no se encontraron diferencias ligadas al sexo en el presente trabajo.

Al comparar las 3 zonas no se encontró heterogeneidad zonal en relación con las variables morfométricas estudiadas, ni en animales controles ni en alcohólicos. Otros autores han encontrado diferencias funcionales y metabólicas entre las zonas del lobulillo hepático.^{15,19} Los resultados morfométricos obtenidos en este trabajo hacen pensar que en la heterogeneidad del

lobulillo hepático prevalezca más el aspecto funcional, en cuanto a las variables estudiadas.

Las variables morfométricas AN y la relación NC presentaron diferencias significativas entre las ratas alcohólicas y controles. En este caso los hepatocitos de las ratas alcohólicas presentaron valores mayores que los de las ratas controles. Las áreas citoplasmáticas (AC) no variaron entre los hepatocitos de las ratas controles y alcohólicas, lo cual contradice los resultados de otros investigadores que señalan que la célula hepática se hincha, aumentando en talla, hecho que algunos atribuyen a un incremento en el contenido de lípidos, agua y proteínas.^{18,20}

SUMMARY

The liver was studied, and the following variables were measured: nucleus area, cytoplasm area, and nucleus cytoplasm relation of the hepatocytes of the periportal, intermediate and perivenous zone. 40 rats of both sexes were used to have 2 groups: alcoholics and controls. The alcoholic between 28 and 90 days old were administered ethanol 40 % diluted in water by oral route by an intraesophageal cannula. The morphometric variables such as nucleus area and the relation nucleus cytoplasm proved to be statistically different and higher among alcoholic rats.

Subject headings: ALCOHOLISM/ complications; LIVER DISEASES/pathology; ADOLESCENT; RATS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zesman D A, Strieter RM, Kunkel SL, Tsai WC, Welkowsky JM, Bucknell KA, et al. Ethanol feeding impairs innate immunity and alters the expression of Th-1 and Th-2 phenotype cytokines in murine Klebsiella pneumonia. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22(3): 621-627.
2. Stoltz DA, Nelson S, Kolls JK, Zhang P, Bohm RP, Murphey M, et al. In vitro ethanol suppresses alveolar macrophage TNF-alfa during simian immunodeficiency virus infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 135-140.
3. Santonastaso M, Zanatta N, Cioffi A, Garbelotto R, Cechetti E. Alcohol- related liver diseases in the aged. *Recenti Prog Med* 2000; 91:113-5.
4. Leksowski W, Kawalaski H, Czuba Z, Krol W, Gorczvcar P, Dworniczak S, et al. Immunological parameters in-patients suffering from alcohol- dependence. *Syndrome. Immunopharmacology* 2000; 4:65-70.
5. Giancola P R, Zeichner A. Alcohol-Related aggression in males and females: Effects of blood alcohol concentration, subjective intoxication, personality and provocation. *Alcohol Clin Exp Res* 1995;19 (1):130-4.
6. Camatta C D, Nagoshi CT. Stress, depression, irrational beliefs and alcohol use and problems in a college student sample. *Alcohol Clin Exp Res* 1995;19:142-6.
7. Hays R D, Phyllis LE. What is adolescent alcohol misuse in the Unites States? according to the experts. *Alcohol Alcoholism* 1996;31:297-303.

8. Wit E D. Mechanisms of alcohol abuse and alcoholism in adolescents. A case for developing animal models. *Behav Neural Biol* 1994;62:168-77.
9. Menendez R G. Comportamiento del consumo de bebidas alcohólicas en estudiantes de medicina. *Rev Cubana Salud Pública* 1995;21:95-100.
10. Odell WD. Sexual maturation in the rat. En: Grumbach MM, Sizonenko PC, Aubert ML. *Control of the Onset of Puberty*. Baltimore: Williams and Wilkins;1990:p.183-210.
11. Spear LT, Brake SC. Periadolescence: Age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in the rat. *Develop Psychobiol* 1983;16:83-109.
12. Salmiov J. Effects of ethanol consumption by adolescent alcohol- Preferring P. rat on subsequent behavioral performance in the cross-maze and slip funnel rats. *Alcohol* 1995;13:297-300.
13. Chugani HT, Phelps ME, Mazziotta JC. Positron emission tomography study of human brain functional development. *Ann Neurol* 1987;22:483-93.
14. Jungerman K. Zonal liver cell heterogeneity. En Karger S, Baser AG. *Enzyme 46*. Switzerland:Colombo Bern;1992:p.5-7.
15. Jungerman K. Zonation of metabolism and gene expression in liver. *Histochemistry* 1995;103:81-91.
16. Coro Antich RM; Borrajero I. Digipat, un sistema cubano para morfometría de imágenes. *Rev Latinoam Patol* 1996;34(1):9-10.
17. Thomasson HR: Gender differences in alcoholic metabolism: Physiological. Response to ethanol. En: Galanter M. *Women and Alcoholism* New York: Plenum Press; 1995;12:163-79.
18. Lieber CS. Metabolism and metabolic. Effect of alcohol. *Med Clin North Am* 1994;68(1):3-31.
19. Katz N, Jungerman K. Metabolic heterogeneity of the liver. En: Tavalani N, Berk PD. *Hepatic transport and Bile Secretion Physiology and Pathophysiology*. Chapter 4 New York:Raven Pres Ltd; 1993:p.55-70.
20. Farbizewski R. Branched- chain amino and enriched diet given simultaneously withethanol partially prevents morphological and biochemical changes in the liver. *Pat Pol* 1990;41:183-6.

Recibido: 3 de septiembre de 2002. Aprobado: 18 de febrero de 2003.

Dra. *Maritza González Bravo*. Avenida 61 No. 9806 e/ 98 y 100, municipio Marianao, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf: 260 46 64.