

## **Volumen nuclear de hepatocitos de hígados sometidos a un factor estimulante humoral en ratones isogénicos línea IOR**

### **Nuclear volume of hepatocytes in livers subjected to a humoral stimulating factor in isogenic rats, IOR line**

**Dra. Marielin Concepción Osorio, Dr. Pedro A. Díaz Rojas**

Universidad de Ciencias Médicas de Holguín. Holguín, Cuba.

---

#### **RESUMEN**

Se estudió el comportamiento del volumen nuclear 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 del volumen nuclear de los hepatocitos a partir de su diámetro mayor y menor. Los resultados mostraron que los valores más altos del volumen nuclear están en la zona proximal al hilio, 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, con marcada orientación a decrecer lo que puede ser debido a la presencia de factores humorales estimulantes en el citosol regenerativo.

**Palabras clave:** volumen nuclear, hepatocitos, regeneración hepática.

---

#### **ABSTRACT**

We studied the behavior of the nuclear volume of hepatocytes in 14 samples of the middle lobe of isogenic rats liver IOR that were subjected to three doses of regenerating liver cytosol at the beginning of the experiment. Samples were taken during eight days with a frequency of twelve hours. The incision was divided into the proximal, medial and distal to the ileum zones. The Morphometric method was applied to determine the nuclear volume of hepatocytes from its major and minor diameter.

The results showed that the highest values of the nuclear volume are located in the proximal zone to the ileum, although in all zones there are significant differences between the values obtained in the first half of the experiment in relation to the final part, with marked orientation to decrease what can be due to the presence of stimulant humoral factors in the regenerative cytosol.

**Key word:** nuclear volume, hepatocytes, liver regeneration.

---

## 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.<sup>1</sup>

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.<sup>2,3</sup>

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.<sup>4</sup>

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.<sup>5</sup>

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 del volumen nuclear 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 del volumen nuclear de los hepatocitos, se utilizó el software ImageJ del National Institutes of Health calibrado con un objetivo micrométrico de la Karl Zeiss. Se midieron los diámetros mayores y menores de los núcleos en cada una de las imágenes capturadas y se obtuvo el volumen nuclear por la fórmula de Palkovics, con la ayuda del editor de hoja de cálculo Microsoft Excel:

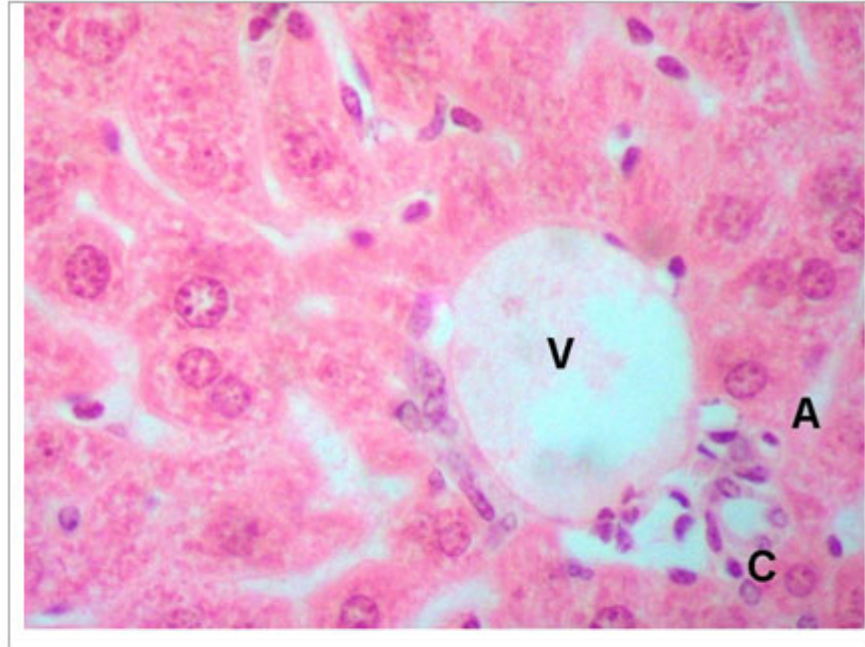
$$V = 1,04 \frac{\pi}{6} (A^2 B) \quad v(A^*B)$$

donde A es el diámetro mayor y B el diámetro menor.

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, 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 aplicó la correlación de Pearson para determinar la relación entre los valores de los volúmenes y el tiempo del experimento y el comportamiento del volumen nuclear de hepatocitos se ilustra en gráficos de plexograma.

## RESULTADOS

Se observa en la figura 1 la organización de cordones de hepatocitos dispuestos hacia el espacio porta, los componentes de este y los espacios sinusoidales con las células propias de la pared y células del torrente sanguíneo.

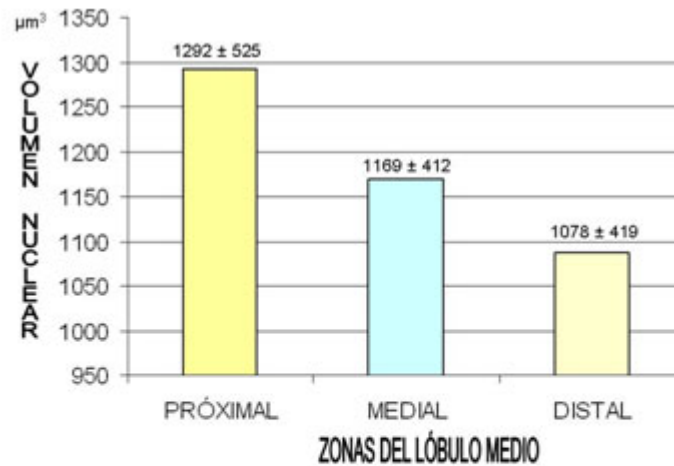


**Fig. 1.** Microfotografía a 400x de corte histológico de hígado de ratones isogénicos línea IOR sometidos a citosol regenerativo. Con las letras A se señala la arteriola, con V la vena y con C el conducto biliar del espacio porta. Tinción Hematoxilina y Eosina.

La población de hepatocitos muestra núcleos de diferentes tamaños con más de un nucleolo en su mayoría en posición central. Además se aprecian hepatocitos binucleados y otros con grandes núcleos prominentes que traducen ploidía celular.

Estas características son similares en las tres zonas estudiadas, proximal, medial y distal del lóbulo medio.

El volumen nuclear muestra una tendencia a decrecer a medida que nos alejamos del hilio, con el valor más alto en la zona proximal respecto a las restantes zonas (figura 2).

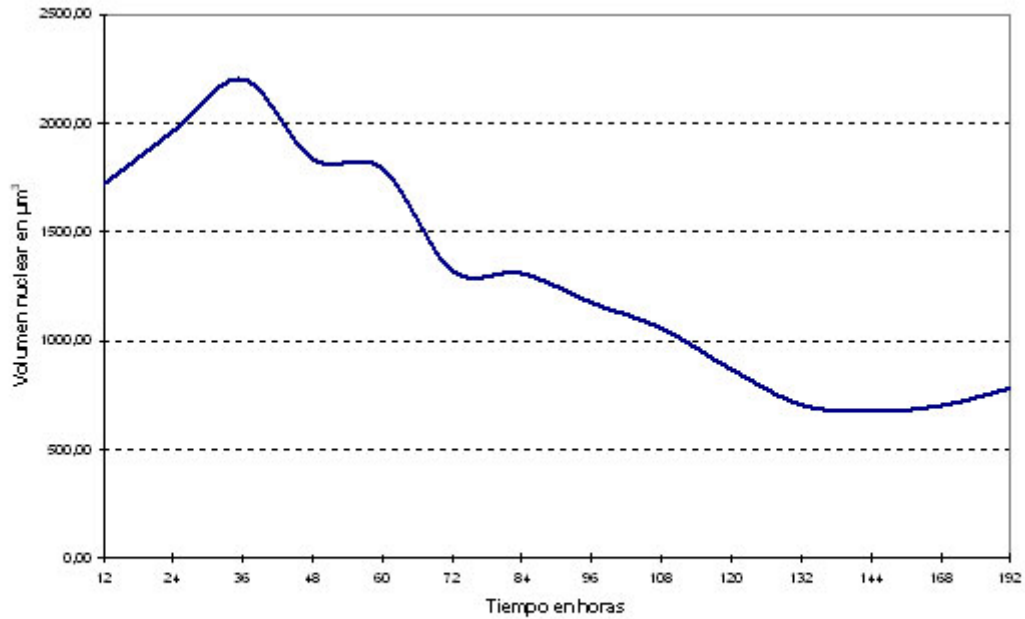


**Fig. 2.** Variaciones del promedio y su desviación estándar de los volúmenes nucleares ( $\mu\text{m}^3$ ) en los hepatocitos de ratones isogénicos sometidos a citosol regenerativo según zonas del lóbulo medio.

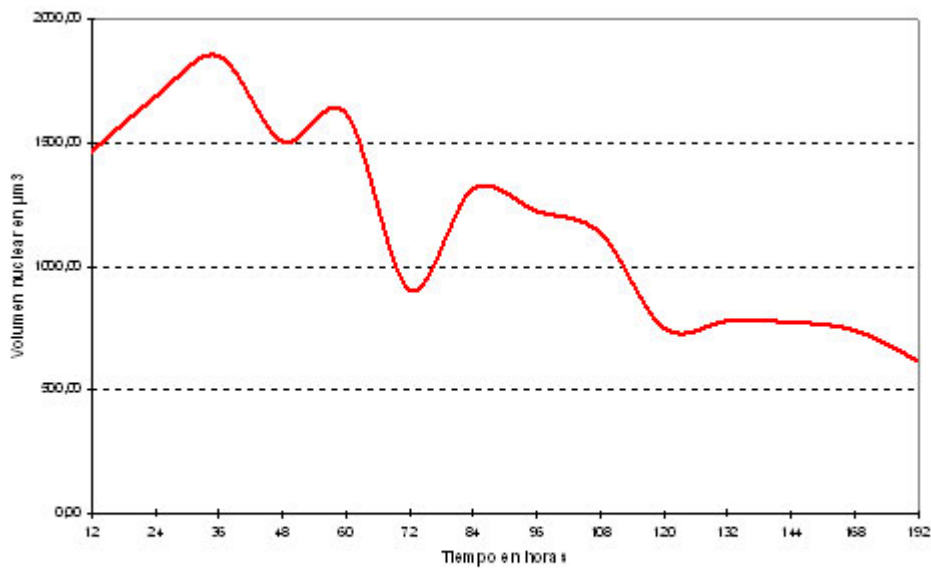
El coeficiente de variación con resultados de 0,41, 0,35 y 0,39 para las zonas proximal, medial y distal respectivamente muestra valores muy similares, lo que refleja la poca variabilidad en la realización de las mediciones.

El comportamiento del volumen nuclear de los hepatocitos en relación con el tiempo en el zona proximal al hilio (figura 3) muestra valores elevados que rebasan los  $1500 \mu\text{m}^3$  hasta aproximadamente las primeras 60 horas a continuación se produce una tendencia a la disminución hasta alcanzar valores por debajo de los  $800 \mu\text{m}^3$ .

En la figura 4 se muestra este indicador en la zona medial donde se aprecia un comportamiento similar en las primeras 60 horas, luego se produce un descenso brusco por debajo de  $1000 \mu\text{m}^3$  a las 72 horas y continua la tendencia a disminuir hasta alcanzar valores por debajo de  $800 \mu\text{m}^3$ .

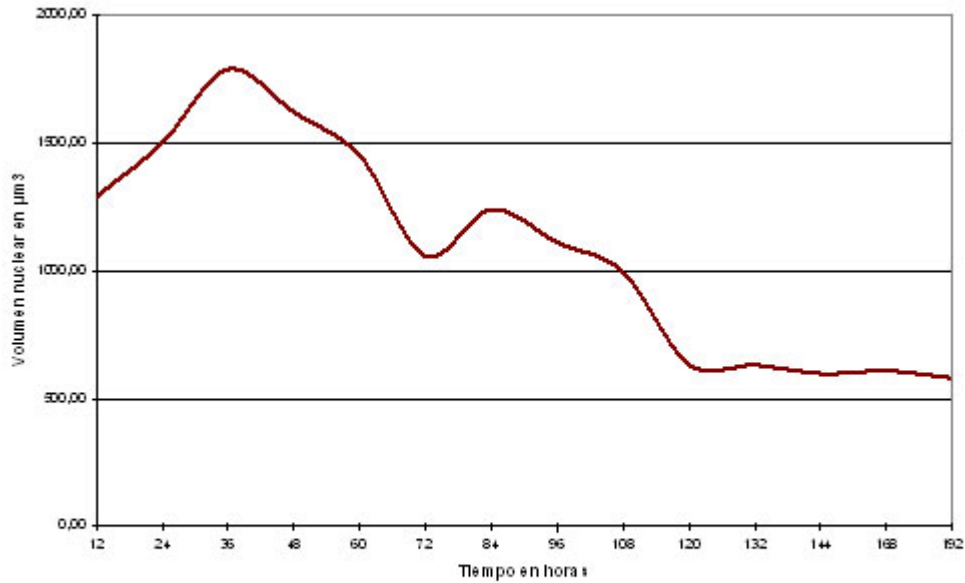


**Fig. 3.** Comportamiento del volumen nuclear de los hepatocitos en la zona proximal del lóbulo medio de ratones isogénicos sometidos a citosol regenerativo según duración del experimento.



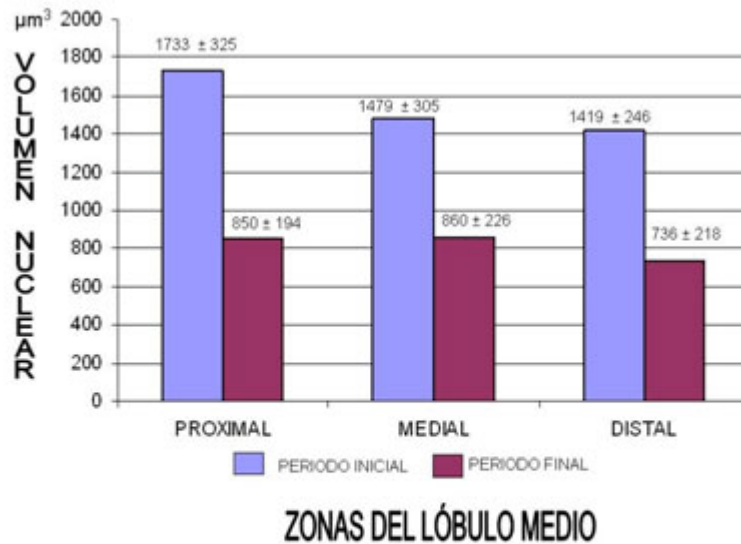
**Fig. 4.** Comportamiento del volumen nuclear de los hepatocitos en la zona medial del lóbulo medio de ratones isogénicos sometidos a citosol regenerativo según duración del experimento.

En relación a la zona distal (figura 5), el volumen nuclear de los hepatocitos muestra valores elevados que rebasan los  $1500 \text{ im}^3$  hasta aproximadamente las primeras 48 horas a continuación se produce una tendencia a la disminución y los valores oscilan entre  $1500 \text{ im}^3$  y  $1000 \text{ im}^3$  hasta aproximadamente las 108 horas donde la tendencia es a disminuir hasta el final del experimento con valores por debajo de los  $800 \text{ im}^3$ .



**Fig. 5.** Comportamiento del volumen nuclear de los hepatocitos en la zona distal del lóbulo medio de ratones isogénicos sometidos a citosol regenerativo según duración del experimento.

La comparación entre la fase inicial y final del experimento mostró en todos los casos diferencias significativas ( $p = 0,001$ ) entre el volumen nuclear de ambas fases en todas las zonas a favor de valores altos al inicio del experimento (figura 6), lo que refuerza el criterio de un estímulo inicial que mueve la actividad nuclear con vistas a desarrollar los procesos metabólicos necesarios para elevar su función y entrar en el ciclo de la división celular.



**Fig. 6.** Resultados de la prueba de hipótesis para diferencias de medias del volumen nuclear ( $\mu\text{m}^3$ ) de los hepatocitos de ratones isogénicos sometidos a citosol regenerativo entre los grupos de muestras de la fase inicial y la fase final de las zonas del experimento.

Los valores de correlación de Pearson obtenidos fueron de -0,91, -0,88 y -0,89 para las zonas proximal, medial y distal respectivamente, lo que traduce que a medida que avanza el tiempo el volumen nuclear decrece.

## DISCUSIÓN

La regeneración hepática es un proceso molecular complejo que implica un correcto funcionamiento del órgano, la coordinación de la expresión de genes y una adecuada interacción entre cada una de sus vías.<sup>6</sup>

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.<sup>7</sup>

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 nuclear, como elementos que permiten inferir dos procesos de vital importancia en la célula.<sup>8,9</sup>

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.<sup>10</sup>

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.<sup>10</sup>

Entre los modelos descritos por *Cascales*<sup>11</sup> 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 CCl<sub>4</sub> 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*<sup>12</sup> 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 morfométricos 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*<sup>13</sup> 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 parenquima hepático donde actúan.

El análisis del comportamiento del volumen nuclear de los hepatocitos muestra valores elevados al inicio del experimento, la zona proximal aporta los más altos, ya que representa la primera en recibir los factores estimulantes presentes en el citosol regenerativo del torrente vascular.

A medida que los factores se agotan, debido a que el estímulo estuvo presente solo antes de la fase inicial del experimento, los valores del volumen nuclear comienzan a decrecer a partir de las 48 horas en las tres zonas y tienden a estabilizarse alrededor de las 84 horas.

Este resultado se hace evidente también al comparar las fases iniciales y finales del experimento en cada una de las zonas.

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.
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>
3. García Cardona A. Biología, Patobiología, Bioclínica y Fármaco-terapéutica Humana del Factor de Crecimiento Hepático (HGF). Salud UIS 2007; 39: 30-42.
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. *Biología Aplicada*. 2009;26:1-9.
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>.
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>.
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.
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>.
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.

Recibido: 5/1/2012.

Aprobado el 20/01/2012.

**Dr. Pedro A. Díaz Rojas**

Universidad de Ciencias Médicas de Holguín. Holguín. Cuba. Ave. Lenin # 3. Edificio 12 plantas. Apto 1106. Holguín. 462650. Correo: [pdiaz@infomed.sld.cu](mailto:pdiaz@infomed.sld.cu)