

Alteraciones ultraestructurales en la regeneración hepática experimental

A. Aznar Aznar*, F. Llanes Menéndez**, A. López Alonso**, T. Martínez López***, J. C. Madera González*

RESUMEN

Se hace un estudio de las alteraciones ultraestructurales que aparecen en el hígado durante el proceso de regeneración hepática. Para ello se utilizan 100 ratas machos, a las que se practica una hepatectomía del 70%.

Las alteraciones observadas son mucho más intensas a nivel de la zona de manipulación quirúrgica que a nivel del área distal a la misma, hecho que se interpreta como debido a la coexistencia en este punto de procesos alterativos, junto con los fenómenos regenerativos. Se pone en evidencia un gran número de autofagosomas posiblemente relacionados con los fenómenos de desdiferenciación celular y su posterior división. Asimismo se observa en los hepatocitos en regeneración una mayor prominencia, tanto del retículo endoplásmico liso como del rugoso, con incremento del número de ribosomas, hecho que se interpreta como la expresión morfológica de una hiperactividad funcional a este nivel.

Palabras clave: Regeneración hepática. Hepatectomía parcial. Microscopía electrónica. Autofagosomas. Retículo endoplásmico.

INTRODUCCION

Si se le corta una pata a la salamandra se regenera por completo un nuevo miembro.

En los animales superiores también asistimos a fenómenos regenerativos, y así nos encontramos con tejidos como la piel o la pared intestinal, que se encuentran en constante regeneración fisiológica. Las células basales de la piel, las células del tercio inferior de las criptas de Lieberkühn en el duodeno, etcétera, se están dividiendo continuamente y dan lugar cada vez a una célula que permanece indiferenciada y otra que empieza a diferenciarse y se transforma en célula postmitótica (15).

El hígado, en cambio, está formado por una población celular muy diferenciada, pero ante un estímulo específico, como es la destrucción de parte del parénquima hepático con tetracloruro de carbono, o una hepatectomía parcial..., se produce una desdiferenciación de las células hepáticas, recuperando éstas su capacidad de división e iniciándose un proceso de auténtica regeneración hepática (3).

Cuando la masa perdida se ha regenerado se produce una nueva diferenciación celular, con reaparición de las estructuras celulares específicas.

Hoy en día, con la práctica de amplias resecciones hepáticas y los trasplantes de hígado, esta víscera y su

enorme poder regenerativo y de recuperación funcional alcanza cada vez mayor relevancia ante el cirujano pediátrico (13).

Del mismo modo, los estudios de los factores de regeneración hepática a nivel celular y de los mecanismos íntimos de este proceso abren horizontes de esperanza que hacen vislumbrar posibilidades insospechadas y nos estimulan a tratar de profundizar en el conocimiento de este fenómeno (1).

MATERIAL Y METODO

Se utilizan 100 ratas machos pertenecientes a la tercera generación filial del cruce entre ratas blancas de raza Wistar y ratas albinas de raza Sprague-Dawley. La edad aproximada era de 80-90 días y el peso entre 280-360 g., con un grupo moda de 310-320 g.

Desde su nacimiento se mantuvieron en unas condiciones ambientales preestablecidas, con una temperatura alrededor de los 20° C, un fotoperíodo de 12 horas y una alimentación standard compuesta por un 60% de carbohidratos, un 18% de proteína bruta y un 3% de grasas, además de un 5% de fibra bruta y un 5% de sustancias minerales.

Se distribuyeron en 10 series de 10 ratas cada una. Las ratas de la serie número 1, considerada como serie testigo, fueron sometidas a una laparotomía

* Hospital Militar «Gómez Ulla».

** Hospital Clínico de San Carlos.

*** Capitán Veterinario. Departamento de Cirugía Experimental. Hospital Militar «Gómez Ulla».

mía media bajo anestesia con clorhidrato de ketamina (Ketolar) y éter (3).

Los animales de las restantes series fueron sometidos a una hepatectomía del 70%, según técnica de Higgins y Anderson (9) bajo el mismo tipo de anestesia ya citado y procurando que la duración de la intervención fuese siempre la misma, tanto para las ratas de la serie testigo como para las de las series experimentales.

Los animales de las series experimentales fueron sacrificados por sobredosificación anestésica a las 16 horas (serie número 2), 1 día (serie número 3), 2, 3, 4, 8, 10, 15 y 20 días, respectivamente. Se obtenían muestras del hígado en regeneración y se incluían en glutaraldehído para su estudio con el microscopio electrónico.

Las ratas de la serie número 1 se sacrificaron a los 20 días y se obtuvieron muestras similares de hígado para su inclusión en glutaraldehído y posterior estudio al microscopio electrónico como testigos.

RESULTADOS

Ante la observación general de las preparaciones, nos encontramos con dos tipos de lesiones bien diferenciadas. En el polo de sección y ligadura quirúrgica asistimos a una intensa alteración tisular con desestructuración de los hepatocitos, mientras que en el polo distal la ultraestructura general está bien conservada.

Así, en las preparaciones correspondientes a las 16 y 24 horas, a nivel del parénquima hepático proximal al área de ligadura y sección quirúrgica, nos encontramos con extensas áreas de material celular necrosado, en su mayoría amorfo, aunque aún pueden sorprenderse algunos restos de retículo endoplásmico, mitocondrias muy artefactadas o restos nucleares. Ocasionalmente, entre estas masas de detritus se encuentran leucocitos bien conservados, de los que destacan los neutrófilos, con su típico núcleo polilobulado.

En la vecindad de estas zonas de restos necróticos las células hepáticas

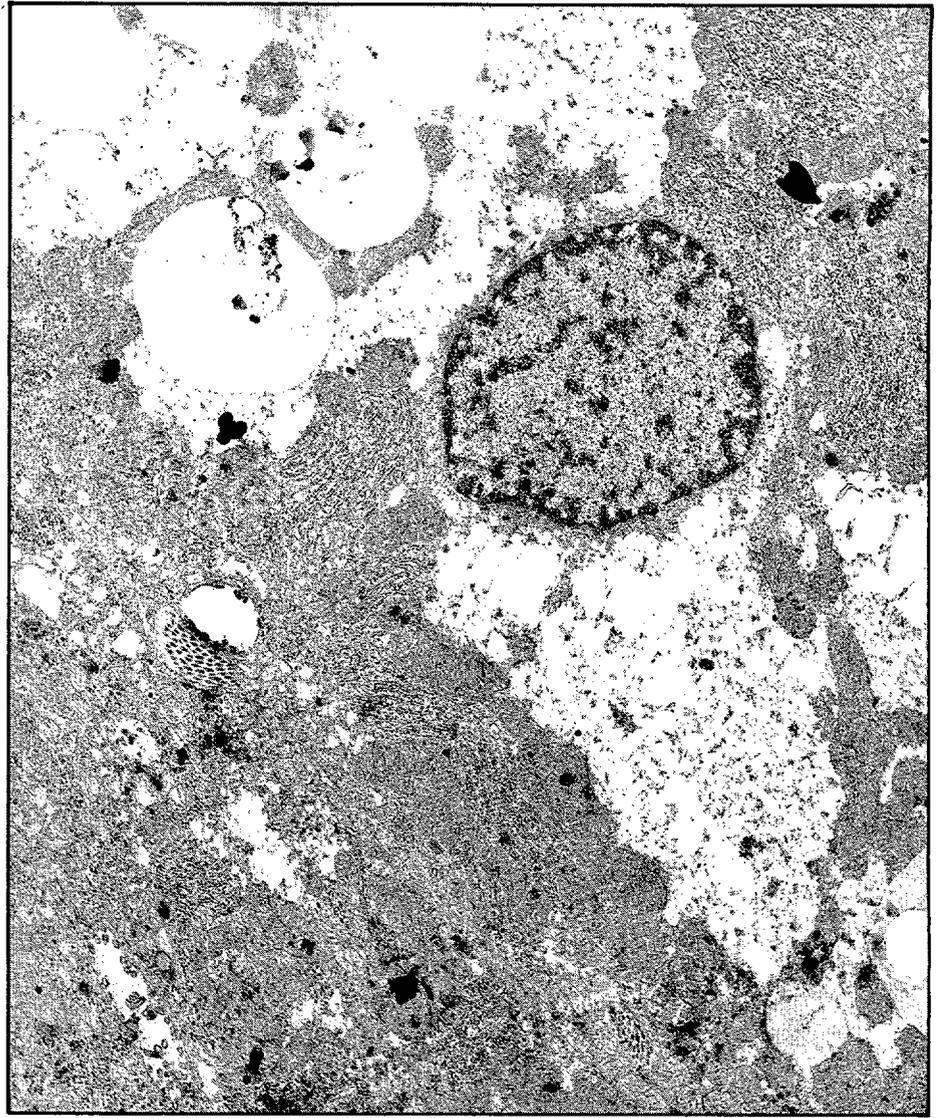


Figura 1.—Hepatocito proximal al área de ligadura y sección quirúrgica. Aumento del contenido líquido de la matriz citoplasmática e intensa vacuolización de la misma. En el ángulo superior izquierdo, varias vacuolas grasas. $\times 8.000$, aproximadamente.

presentan manifiestas alteraciones ultraestructurales que afectan al núcleo y a las organelas citoplasmáticas. La matriz citoplasmática fundamental está alterada con gran aumento de líquido intracelular y prominente vacuolización de la misma (Fig. 1). Las mitocondrias aparecen tumefactas con pérdida o disminución pronunciada de sus crestas transversales y el retículo endoplásmico rugoso queda desgranado, a la vez que sus túbulos se fragmentan y distorsionan.

El aumento del contenido líquido de la matriz citoplasmática es patente y da lugar a la producción de vacuolas acuosas de tamaño variable. Asimismo se observan abundantes vacuolas de contenido graso (Fig. 2).

En los núcleos es visualizable una dispersión de la cromatina por aumento del jugo nuclear, que provoca consecuentemente un aumento del volumen del núcleo.

En las muestras de animales sacrificados a tiempos posteriores asistimos a un acrecentamiento de estos datos morfológicos indicativos de la degradación celular, así como a la remoción de los detritus en vacuolas de fagocitosis y con posterioridad se evidencia la sustitución por fibroblastos y yemas capilares.

El parénquima hepático no adyacente a la zona de manipulación quirúrgica presenta su ultraestructura general bien conservada con algunas modificaciones que pasamos a describir.

A nivel nuclear, tanto la heterocromatina como la eucromatina presentan aspectos habituales. En la carioteca no se ven alteraciones ni tampoco en el nucleolo. No observamos aumento de la cantidad de líquido nuclear, siendo los poros nucleares de tamaño y disposición normal. En el citoplasma es patente el reforzamiento del retículo endoplásmico rugoso (Fig. 3) con

prominentes ribosomas. En la matriz citoplasmática son también fácilmente visualizables polirribosomas.

Por otra parte, el retículo endoplásmico liso es también prominente, visualizándose sus túbulos dilatados, así como expansión de sus cisternas (Fig. 4). Estas observaciones son permanentes en todas las muestras correspondientes a los animales sacrificados a tiempos más largos.

Una observación ocasional que aparece en los cortes de algunas muestras, pero que se repite, no obstante, con cierta frecuencia, especialmente en los animales sacrificados a los 8, 10, 15 y 20 días es la presencia de estructuras esferoideas laminares que interpretamos como cuerpos residuales (Fig. 5). Paralelamente podemos observar en estos animales sacrificados a tiempos más prolongados, aunque no exclusivamente en ellos, la presencia intracitoplasmática de formaciones esferoideas revestidas por una membrana. Estas formaciones contienen una matriz amorfa, electrodensa, semejante a la lisosomal, entre la cual se descubren estructuras diversas, pudiendo identificarse restos mitocondriales de retículo endoplásmico y en general fragmentos diversos de orgánulos o restos de membranas trilaminares (Fig. 6). Morfológicamente hemos interpretado estas estructuras como fagolisosomas, resultando identificados de esta suerte los corpúsculos esferoideos y PAS positivos visualizados con la microscopía óptica (3).

DISCUSION

Bucher (1976) (5), Davis (1962) (6) y Lane y Becker (1967) (12), entre otros, han descrito en la regeneración hepática una serie de alteraciones que conducen a una desdiferenciación celular. Así, el retículo endoplásmico da lugar a la formación de vacuolas, las mitocondrias disminuyen en número y se alteran y se pierden las conexiones intercelulares, al mismo tiempo que hay un alisamiento de las microvellosidades.

En cambio, Grisham y colaboradores (1975) (8) desmienten estos hechos y demuestran sólo mínimas alteraciones estructurales en la superficie sinusoidal y el retículo endoplásmico de los hepatocitos en regeneración. Tampoco ven el alisamiento de las microvellosidades descrito por Lane y Becker (12).

En los estudios realizados por nosotros nos llama la atención el hecho de que las alteraciones son distintas a nivel del polo de sección a las observadas a distancia del mismo.

Así, a nivel del polo de ligadura y manipulación quirúrgica nos encontramos con que los hepatocitos presentan

profundas alteraciones ultraestructurales, dando lugar a extensas áreas de material necrosado, en especial en las preparaciones correspondientes a las 16 y 24 horas.

Los hepatocitos conservados presentan una alteración de la matriz citoplasmática fundamental, con aumento del contenido líquido y formación de vacuolas de contenido graso, dando en conjunto un aspecto heterogéneo a esta matriz citoplasmática fundamental. Al mismo tiempo, el retículo endoplásmico rugoso está desgranado y sus túbulos se fragmentan y distorsionan, dando lugar a la formación de vacuolas y las mitocondrias aparecen como

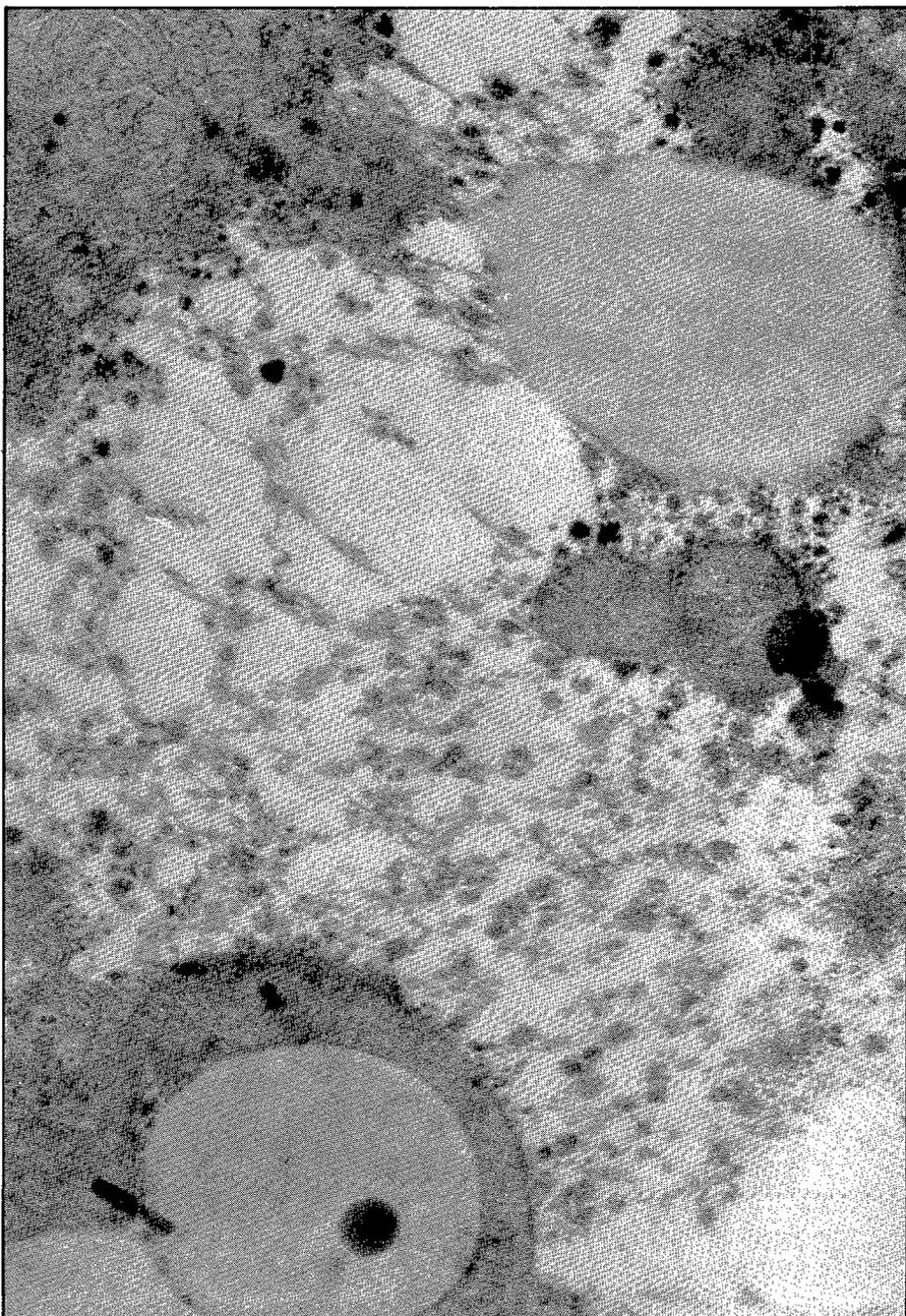


Figura 2.—Hepatocito en el área próxima a la ligadura y sección quirúrgica, en el que se observa una prominente vacuolización citoplasmática, así como tumefacción mitocondrial. $\times 12.000$.

hepatocito presenta una ultraestructura por lo general bien conservada. El retículo endoplásmico liso aparece también prominente con dilatación de sus túbulos y aumento del tamaño de sus cisternas. Las mitocondrias prácticamente no están afectadas.

A la vista de estos resultados podrían conciliarse los dos tipos de resultados, tan dispares citados al principio de la discusión.

En las zonas alejadas al polo de ligadura y sección quirúrgica los hepatocitos estarían sujetos únicamente al estímulo regenerativo y entonces las alteraciones ultraestructurales serían

tumefactas con disminución o pérdida de sus crestas transversales.

En cambio, en las zonas alejadas de este polo de sección, el citoplasma del

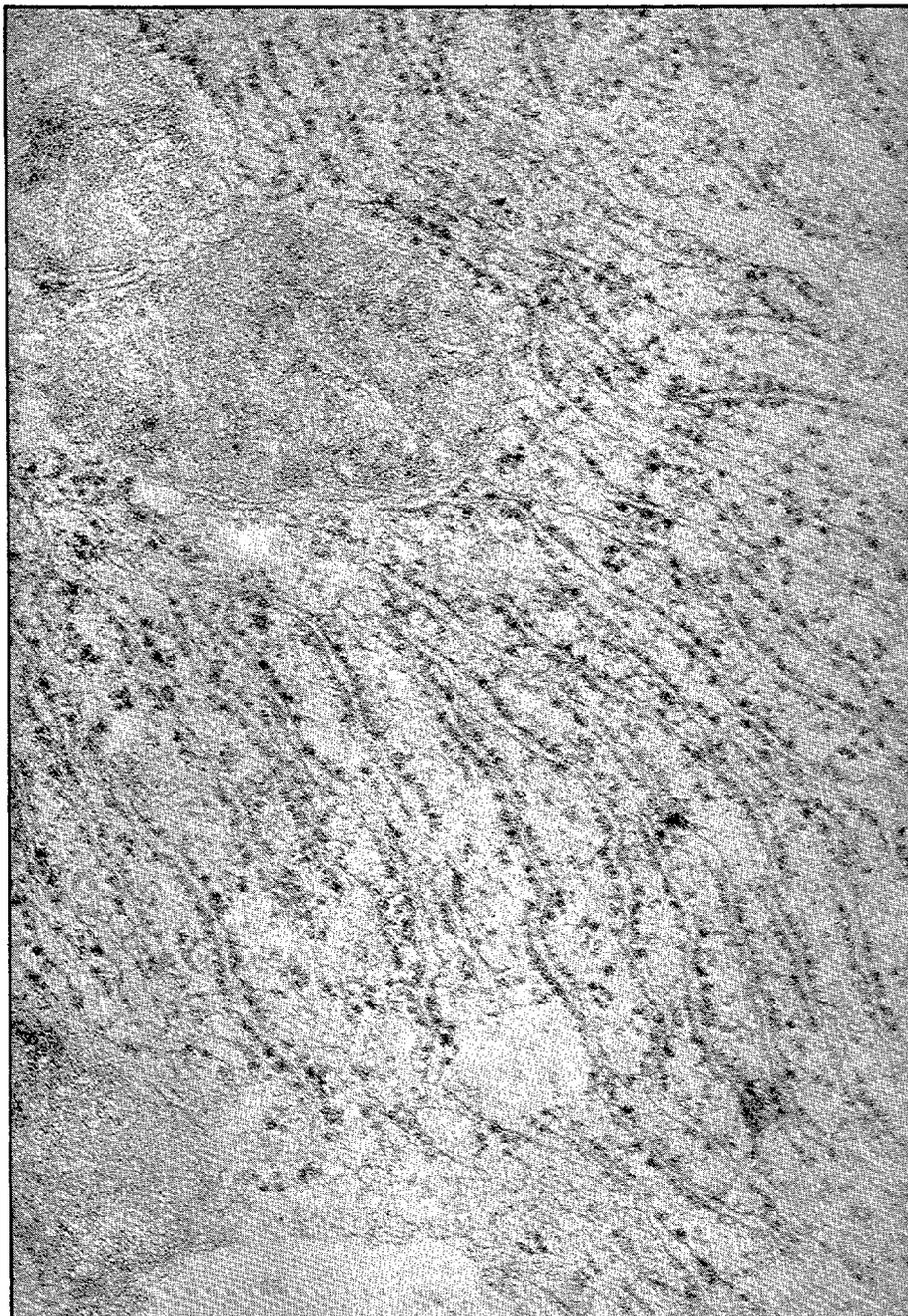


Figura 3.—Citoplasma de hepatocito del área distal a la zona de manipulación quirúrgica. Retículo endoplásmico rugoso prominente. $\times 16.000$.

mínimas, de acuerdo con los resultados obtenidos por Grisham y cols. (8).

En cambio, en la zona donde se practica la manipulación quirúrgica se asocian los fenómenos regenerativos con los procesos alterativos provocados por el trauma quirúrgico. Podría pensarse que a este nivel tienen lugar únicamente fenómenos alterativos y de necrosis celular, pero la demostración de la presencia de células en mitosis a este nivel (3) va en contra de esta hipótesis y apoya la afirmación formulada con anterioridad.

Las alteraciones observadas a nivel de la zona de manipulación quirúrgica son mucho más llamativas que las que se ven a distancia. Esto puede explicar el hecho de que algunos autores (5, 6, 12) centraran su atención sobre las mismas e interpretaran como un fenómeno general lo que solamente es un fenómeno local y que podría ser debido a la confluencia de estímulos alterativos y regenerativos sobre una misma célula.

Otro hecho que llama la atención es la presencia de un retículo endoplásmico liso prominente con dilatación de sus túbulos y aumentos de sus cisternas (Fig. 4), así como un reforzamiento del retículo endoplásmico rugoso con prominencia de sus ribosomas (Fig. 3). Estas alteraciones muy bien pueden ser la manifestación morfológica de una hiperactividad a nivel de las citadas organelas, como ya ha sido apuntado por algunos autores (2, 14).

Scornik (14) describe un aumento de los ribosomas del 30% y una mayor prominencia del retículo endoplásmico rugoso, hecho que interpreta como la expresión morfológica de un aumento de la síntesis proteica.

Este hecho anatómico que comentamos también podría estar en relación con la síntesis de la protrombina, hecho que, según algunos autores, como Hill y cols. (10) y Goswami y Munro (7), se localiza a nivel de los microsomas.

En los estudios de microscopía óptica (3) pudimos comprobar, tal como señalaron Becker y Lane (4, 12), la presencia de múltiples corpúsculos redondeados o esferoides de 2-4 micras de diámetro, que se tiñen de coloración rojiza por la eosina y son PAS positivos y que se interpretan como fagolisosomas. El estudio con microscopía electrónica demuestra la presencia dentro de los mismos de gránulos de glucógeno y restos de las distintas organelas: mitocondrias, retículo endoplásmico, restos de membranas trilaminares, etcétera.

Como es sabido, los lisosomas son vesículas membranosas que están repletos de enzimas hidrolíticas. Estos están implicados en la digestión de una serie de sustancias que la célula no puede utilizar directamente, dando lugar a la formación de fagosomas. Becker y Lane (4) defienden que este poder de digestión puede alcanzar a elementos de la propia célula y de sus organelas citoplasmáticas, por lo que estos orgánulos serían la expresión de una verdadera «autofagia celular», fenómeno que no es exclusivo de la regeneración hepática y que se observa también en algunos tejidos sometidos a anoxia u otro tipo de daño celular. Estos autores los interpretan como lisosomas autofagocíticos, que tienen una menor actividad de la fosfatasa ácida y que corresponden a los estadios finales de los lisosomas.

La presencia de restos de las distintas organelas dentro de la vesícula membranosas, observado por nosotros en el estudio de la microscopía electrónica, habla en favor de esta interpretación, según la cual el «autofagosoma» estaría encargado de la destrucción de la mayoría de las organelas citoplasmáticas para preparar a la célula para una mayor actividad sintética que se seguiría de la consiguiente división celular.

Kotoulas y Phillips, en un estudio en ratas recién nacidas a las que se administra glucagón (11), demuestran cómo éste provoca una movilización del glucógeno hepático tisular con disminución del mismo y aumento de los «autofagosomas», que se localizan preferentemente en aquellas zonas en que existe mayor cantidad de glucógeno citoplasmático.

Los resultados obtenidos por nosotros están en consonancia con estos hechos, lo que parece sugerir, tal como anunciase Kotoulas, que los lisosomas intervienen en cierto modo en la descomposición del glucógeno hepático, hecho que según éste estaría favorecido por la administración de glucagón.

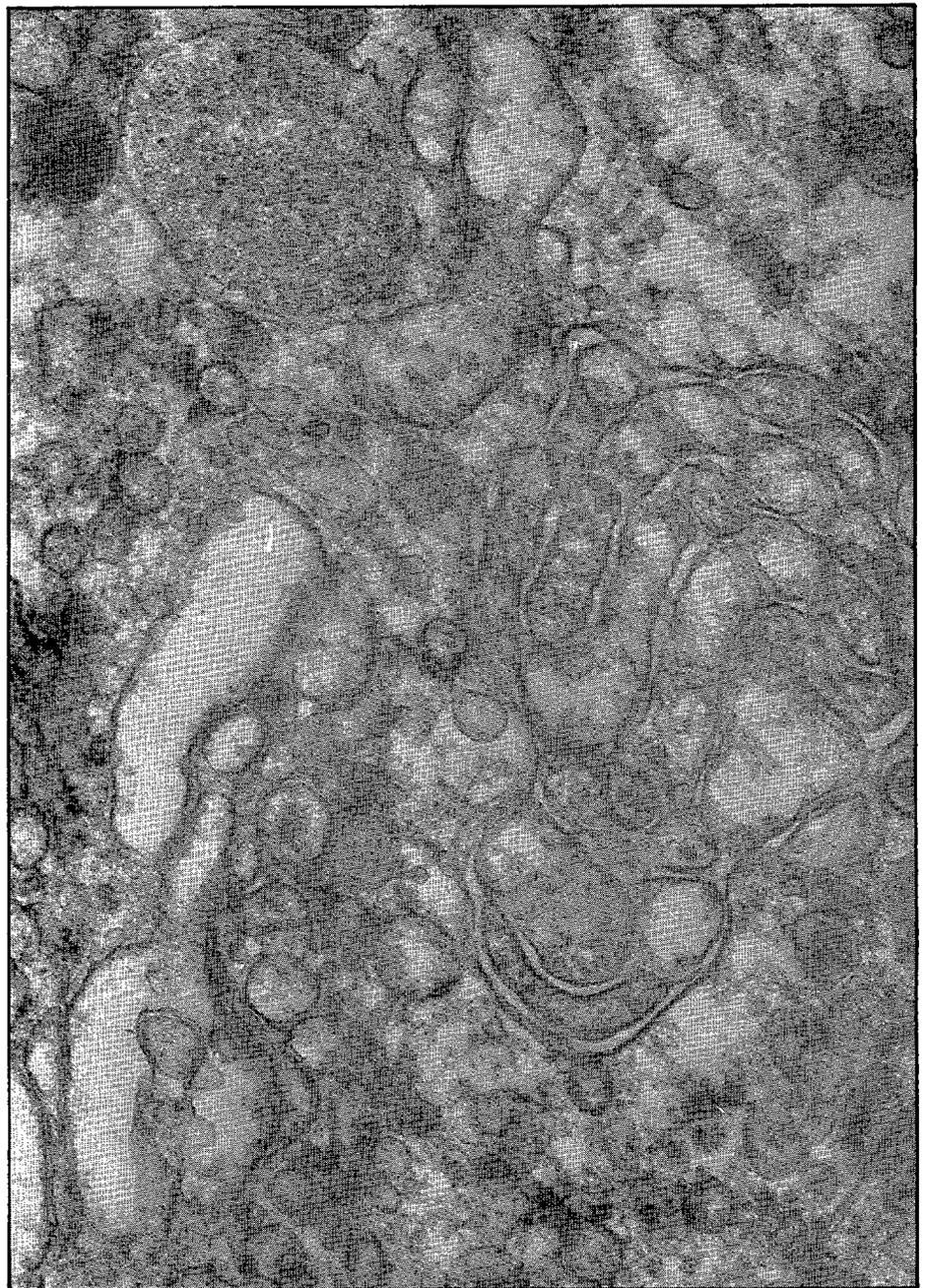


Figura 4.—Retículo endoplásmico liso prominente. Dilatación de sus túbulos y cisternas. Hepatocito del área distal. $\times 16.000$, aproximadamente.

La expresión final de la actividad autofagosómica viene representada por los cuerpos residuales que hemos observado con relativa frecuencia en el proceso regenerativo (Fig. 5).

En lo que se refiere al núcleo, las alteraciones ultraestructurales también fueron mucho más intensas en la zona de ligadura y sección quirúrgica (dispersión de la cromatina por aumento del jugo nuclear, con mayor aumento del volumen global) que en las zonas situadas a distancia de la misma en que su aspecto era más cercano a la normalidad.

Estas diferencias pueden deberse a la sumación de fenómenos alterativos junto con los estímulos regenerativos

en el polo de sección y ligadura, tal como decíamos para el citoplasma y que defendemos por la observación de figuras de mitosis en esta zona.

CONCLUSIONES

1. Después de una hepatectomía parcial los hepatocitos del polo distal están sujetos únicamente al estímulo regenerativo y, por tanto, presentan sólo alteraciones ultraestructurales mínimas. En cambio, los hepatocitos del polo de ligadura y sección están sujetos a procesos alterativos, junto con los fenómenos regenerativos, por lo que las alteraciones ultraestructurales son mucho más manifiestas con altera-

ción del retículo endoplásmico y formación de vacuolas.

2. En los hepatocitos en regeneración se observa una mayor prominencia tanto del retículo endoplásmico liso como del rugoso, con incremento del número de ribosomas. Este hecho se interpreta como la expresión morfológica de una hiperactividad funcional a este nivel.

3. En la regeneración hepática se observan múltiples «autofagosomas» que estarían encargados de la destrucción de diversas organelas citoplasmáticas cuyos restos se observan en su interior y que intervienen además en el metabolismo del glucógeno hepático.

BIBLIOGRAFIA

1. ADSON, M. A., y BEART, R. W.: «Resecciones hepáticas de elección». SURG. CLIN. N. AM., 57: 339, 1977.
2. ANDERSON, W. M.; GRUNDHOLM, A.; SELLS, B. H.: «Modification of ribosomal proteins during liver regeneration». BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 62: 669, 1975.
3. AZNAR AZNAR, A.; LLANES MENENDEZ, F.; LOPEZ ALONSO, A.; DOÑATE GIMENO, G.: «Regeneración hepática. Estudio experimental en la rata». REV. QUIR. ESPAÑOLA EN PRENSA.
4. BECKER, F. F.; LANE, B. P.: «Regeneration of the mammalian liver. I. Autophagocytosis during dedifferentiation of the liver cell in preparation for cell division». AM. J. PATH., 47: 483, 1965.
5. BUCHER, N. L. R.: «Experimental aspects of hepatic regeneration». NEW ENGL. J. MED., 277: 686, 1967.
6. DAVIS, J. M. G.: «Ultrastructure of rat liver cell cytoplasm during the process of regeneration after partial hepatectomy». ACTA. RADIOL., 58: 17, 1962.
7. GOSWAMI, P.; MUNRO, H. N.: «The role of ribonucleic acid in the formation of prothrombin activity by rat-liver microsomes». BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA., 55: 408, 1962.
8. GRISHAM, J. W.; TILLMAN, R. L.; NAGEL, A. E. H., y COMPAGNO, J.: «Ultrastructure of the proliferating hepatocyte: sinusoidal surfaces and endoplasmic reticulum». III WORKSHOP ON EXPERIMENTAL LIVER INJURY. Freiburg. October, 6, 1973.
9. HIGGINS, G. M.; ANDERSON, R. M.: «Experimental pathology of the liver: Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal». ARCH. PATH., 12: 186, 1931.
10. HILL; GAETANI, R. B.; PAULUCCI, S.; RAMA RAO, A. M.; D. B. ALDEN, R.; RANHOTRA, G. S.; SHAH, D. V., y JOHNSON, B. C.: «Vitamin K and biosynthesis of protein and prothrombin». J. BIOL. CHEM., 243: 3930, 1968.
11. KOTOULAS, O. B.; PHILLIPS, M. J.: «Fine structural aspects of the mobilization of hepatic glucogen». AM. J. PATH., 63: 1, 1971.
12. LANE, B. P.; BECKER, F. F.: «Regeneration of mammalian liver. V. Mitotic division in cytologically differentiated liver». AM. J. PATH., 50: 435, 1967.
13. McDERMOTT, W. V., Jr.; GREENBERG, N. J.; ISSELBACHER, K. J.; WEBER, A. L.: «Major hepatic resection: Diagnostic techniques and metabolic problems». SURGERY., 54: 56, 1963.
14. SCORNIK, O. A.: «In vivo rate of translation by ribosomes of normal and regenerating liver». J. BIOL. CHEM., 249: 3876, 1974.
15. ZOLLINGER, H. U.: «Anatomía patológica». SALVAT EDITORES. Barcelona, 1977.



Figura 5.—Citoplasma de hepatocito del área distal de un animal sacrificado a los 10 días de la hepatectomía parcial. Cuerpos residuales laminares. $\times 14.000$, aproximadamente.



Figura 6.—Fagolisosoma observable en hepatocito del área distal a la zona de manipulación quirúrgica. $\times 46.000$, aproximadamente.