

# Repercusiones de los fenómenos regenerativos sobre la microcirculación hepática. Estudio anatomopatológico, microangiográfico y por el método de transparencia de Spalteholz

Aznar Aznar, A. \*

Sánchez Cañizares, T. \*\*

Bentura Remacha, M. L. \*\*\*

## RESUMEN

Se hace un estudio en 130 ratas a las que se practica una hepatectomía del 70% en 110 (Grupo experimental). Los estudios morfológicos (microscopía óptica, microrradiografía y método de transparencia de Spalteholz), ponen en evidencia que la neogénesis vascular se origina a partir de la cápsula de Glisson a partir del tercer día de postoperatorio alcanzando su máxima expresión a los 7 días y como durante los primeros días que siguen a la hepatectomía, se altera la proporción parénquima hepático/trama vascular, a favor del primero; hecho que tiene su máximo exponente a los 4 días, para tender a la normalización hacia los 10 días. Igualmente se demuestra la existencia de gran número de ductus neoformados en contacto directo con el tejido de granulación, especialmente a los 7 días de la intervención (Hiperplasia ductal e hiperplasia vascular capilar).

**PALABRAS CLAVE:** Hepatectomía. Regeneración hepática. Microcirculación hepática.

## SUMMARY

A study is made of 130 rats on which a 70% hepatectomy was carried out on 110 (experimental group). The morphological studies (optical microscopics, microradiography and Spalteholz transparency method) showed that the vascular regeneration originated from the Glisson capsule starting on the third post-operative day, reaching its maximum expression after 7 days and how, during the first days following the hepatectomy the parenchyma hepatic/vascular link proportion altered in favour of the former; this fact reached a maximum after 4 days and tended towards normalization within 10 days. It was also shown that a great number of newly formed ductus existed operation (Ductal hyperplasia and vascular papillar hyperplasia).

**KEY WORDS:** Hepatectomy hepatic regeneration. Hepatic microcirculation.

## INTRODUCCION

La microcirculación marginal del hí-

gado ha sido objeto de numerosos estudios en los últimos años tanto en situaciones de normalidad, Koo y Liang, 1979 (1), como desde del punto de vista de las alteraciones que se producen ante alteraciones funcionales, tales como el shock hemorrágico, Koo y Liang, 1977 (2) o bien como respuesta a alteraciones farmacológicas (3, 4, 5).

Uno de los procesos estudiados desde

este punto de vista ha sido el de la regeneración hepática, así Furtado, 1965 (6) ha podido comprobar cómo se producen alteraciones en el flujo local de la microcirculación hepática, hecho que ha sido atribuido por otros autores a los cambios metabólicos y estructurales que se dan en el hígado en regeneración, Ungvarg, 1977 (7).

Basándonos en estos hechos nos

\* TCol. de San. (Medicina). Jefe del Servicio de Cirugía Infantil. H.M.C. "Gómez Ulla", Madrid.

\*\* Cte. de San. (Medicina). Servicio de Anatomía Patológica. H.M.C. "Gómez Ulla", Madrid.

\*\*\* Médico Civil. Instituto Cajal. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid.

proponemos estudiar algunas de las alteraciones funcionales que se producen en el hígado después de una hepatectomía del 70% según la técnica de Higgins y Anderson, 1931 (8), y paralelamente tratar de demostrar las alteraciones morfológicas y estructurales que se producen a nivel de la vascularización hepática.

## MATERIAL Y METODO

Se utilizaron para el estudio 130 ratas machos de raza Wistar, de unos tres meses de edad y con pesos comprendidos entre 290 y 360 gr, con una media de  $314 \pm 18$  gr. Todas las ratas se mantuvieron desde su nacimiento en condiciones ambientales preestablecidas, con temperatura ambiente de 20-23°C y fotoperíodo de 12 horas.

**GRUPO TESTIGO.**—Se utilizaron 20 ratas, a las que se sometía a laparotomía media u operación simulada. Más tarde se sometían a una segunda intervención a los 1, 5, 10 y 20 días en grupos de 5 ratas cada uno.

En la segunda intervención, todas las ratas una vez anestesiadas con éter se pesaban. A continuación en 2 ratas de cada serie se extirpaba el hígado para estudio anatomopatológico y en las tres restantes se procedía del siguiente modo:

Se canalizaba la vena porta con un catéter Quik-Cath y tras fijarle con una ligadura de seda 4/0 se lavaba el lecho vascular hepático con suero fisiológico heparinizado. A continuación se canalizaba la arteria hepática a través de la aorta y se completaba el lavado vascular hasta que el hígado tomaba una coloración rosada, indicativo de que se había eliminado todo el contenido hemático. Finalmente se inyectaba por ambos catéteres micropaque o colourpaque hasta rellenar todo el árbol vascular suprahepático, y se extirpaba el hígado. Todas las piezas obtenidas se incluían en formol al 10% para su estudio por microscopía óptica y método de transparencia de Spalteholz (9).

**GRUPO EXPERIMENTAL.**—Se utilizaron 110 ratas, distribuidas en 11 series de 10 ratas cada una.

A todos los animales de este grupo una vez anestesiados con éter se les sometía a una hepatectomía del 70%

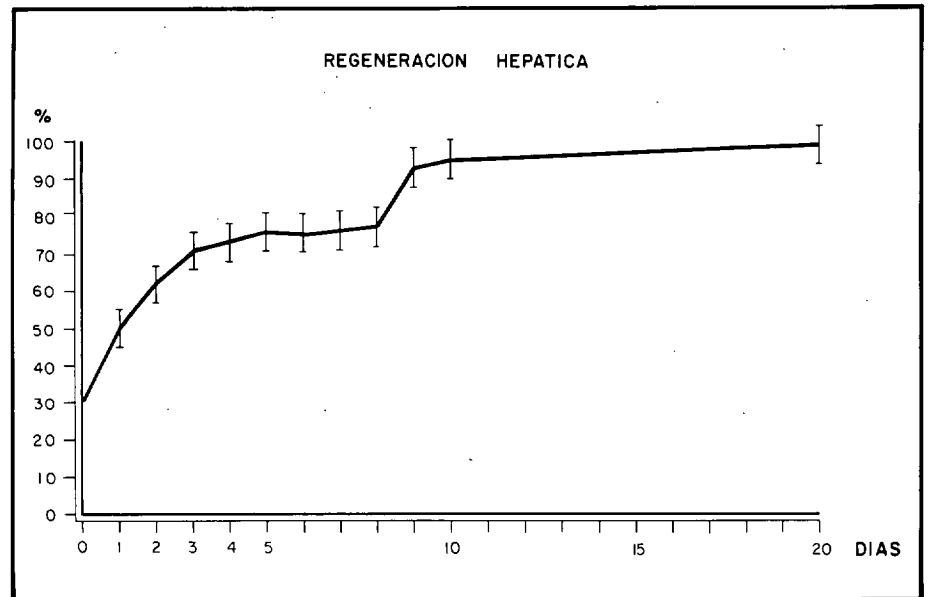


Figura 1.—Ganancias de peso del hígado en regeneración expresadas en tanto por ciento. Obsérvese cómo existen dos fases en las que el poder regenerativo es mayor: una durante primeros días y otra a los 8-10 días de la hepatectomía.

según la técnica de Higgins y Anderson (8). Posteriormente, se iban sacrificando por lotes a los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 20 días respectivamente.

En el momento del sacrificio, una vez anestesiadas las ratas con éter, se pesaban y se procedía del siguiente modo: En 6 ratas se obtenía el 30% de hígado conservado y tras pesarle, se fijaba en formol al 10% para estudio anatomopatológico. En las 4 restantes se procedía al relleno del árbol vascular hepático con micropaque o colourpaque, según la técnica descrita para el grupo testigo.

Todas las ratas se pesaban al principio y final de la experiencia, lo mismo que las piezas de hígado obtenidas en la necropsia.

**ESTUDIOS ANATOMOPATOLOGICOS.**—Con las muestras de hígado una vez fijadas con formol al 10%, se practicaban cortes de 3 micras de espesor y se teñían con hemtoxilina-eosina, tricrómico de Masson, Wilder, Pearls y Giemsa.

**ESTUDIOS RADIOLOGICOS Y METODO DE TRANSPARENCIA DE SPALTEHOLZ.** En los hígados a los que se había practicado el relleno del árbol vascular hepático con micropaque o colourpaque, se practicaban microrradiografías con rayo blando y posteriormente se sometían al método de transparencia de Spalteholz según la siguiente técnica:

Una vez fijada la pieza en formol durante unos 4 días se sumerge en ácido nítrico al 5% durante 20 días. A continuación se somete a blanqueamiento con agua oxigenada durante 3-4 días. Después se procede a la deshidratación de la pieza, primero con

alcohol de 70° y después con alcohol absoluto. Posteriormente, se incluye en benzol durante 4 días, para hacer luego la transferencia de benzol a benzyl-benzoato. Finalmente se pasa la muestra a una mezcla a partes iguales de benzyl-benzoato y metil-salicilato (aceite de Winter-Green).

## RESULTADOS

De los 130 animales utilizados murieron 14, 12 del grupo experimental (10,9%) y 2 del grupo testigo (10%).

La pérdida de peso alcanzó hasta un 25% en la serie experimental, con un máximo a los 4 días después de la hepatectomía. Después los animales empezaban a recuperarse, para alcanzar el peso original entre los 15-20 días de postoperatorio. En la serie testigo la pérdida de peso fue menor, alcanzando sólo hasta un 3,27%, y su recuperación fue más rápida y precoz que en la serie experimental.

Las ganancias de peso del 30% de hígado conservado han sido expresadas en tantos por ciento y con ellas se ha elaborado la gráfica de la figura 1. En ella se aprecia como la ganancia de peso del hígado en regeneración cursa en dos ondas o fases en las cuales el poder regenerativo es mayor: una durante los 3 primeros días y otra a los 8-10 días. A los 10 días se ha alcanzado prácticamente el peso inicial del hígado.

## RESULTADOS MORFOLOGICOS

**ASPECTOS MACROSCOPICOS.**—En el grupo experimental los animales



sacrificados a intervalos más cortos 1-2 días, presentan en torno a la zona de ligadura y sección quirúrgica, depósitos de fibrina y material hemático coagulado, posteriormente esta área se va tornando amarillenta y después blanquecina, para alcanzar la característica dureza del tejido fibroso a los 15-20 días.

En cuanto al parénquima hepático

distal va aumentando de peso tal como decíamos con anterioridad para alcanzar prácticamente el peso inicial a los 10 días. Su aspecto es pálido y sonrosado y en ocasiones con una tonalidad amarillenta. Paralelamente su consistencia está disminuida, características que se van haciendo menos patentes a medida que nos alejamos de la primera intervención.

**ASPECTOS MICROSCOPICOS.**—En los animales sacrificados a las 24 horas de la hepatectomía, nos encontramos una clara delimitación entre el parénquima hepático conservado y el parénquima afectado por el daño quirúrgico. Este aparece más pálido, con marcados fenómenos de necrosis celular, homogeneización y eosinofilia de los citoplasmas, así como picnosis nuclear y signos de congestión vascular (fig. 2).

El hígado próximo a la zona de ligadura participa también de la lesión

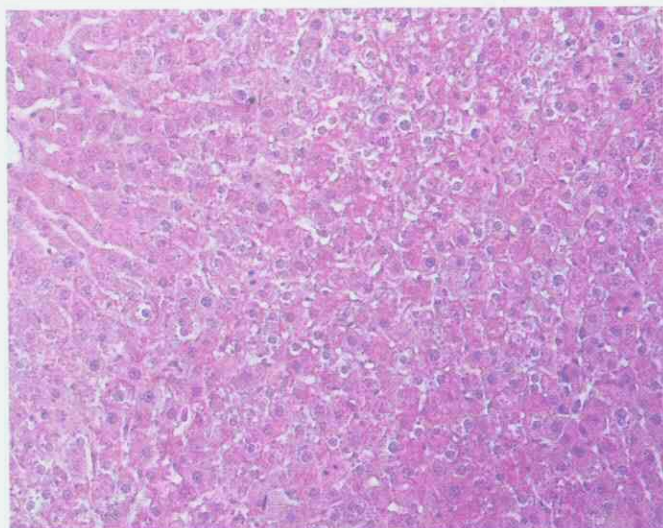
pero presentando al mismo tiempo fenómenos regenerativos, tales como aumento del cromatismo celular e incremento del número de mitosis. En otras áreas puede observarse pleomorfismo nuclear con distribución irregular del glucógeno junto con algunas mitosis aflorando elementos inflamatorios.

A distancia del punto de ligadura y sección los hepatocitos presentan en su mayoría el aspecto habitual con sus núcleos de cromatina laxa, pero es evidente un aumento de los núcleos poliploides, así como de la población de hepatocitos binucleados y una intensa producción de mitosis. Los hepatocitos binucleados se localizan preferentemente en torno a los espacios porta.

A este nivel, en las regiones hepáticas centrales las venas centrolobulillares son de contorno discretamente más pequeño y exangüe. Los espacios porta no presentan reacción mesenquimal, siendo relativamente grandes. En la



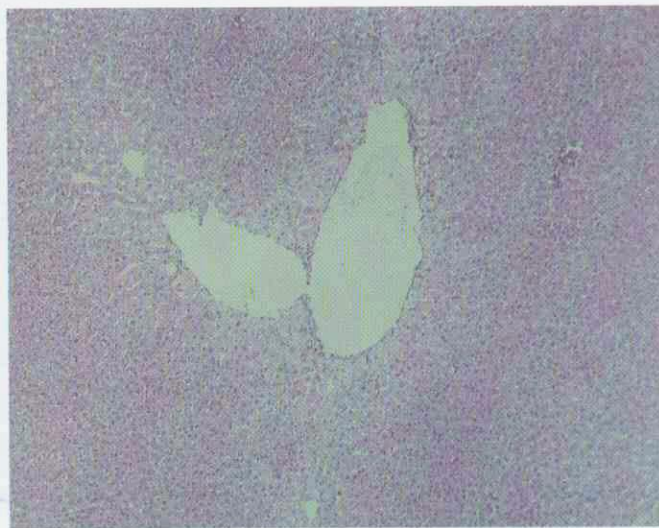
**Figura 2.**—Regeneración hepática a las 24 horas de la hepatectomía. Véase la clara delimitación entre el parénquima hepático conservado (ángulo inferior dcho.) y el parénquima afectado por el daño quirúrgico. (H. E.  $\times$  100).



**Figura 3.**—Polo distal, Parénquima hepático con aumento del número de mitosis e incremento de hepatocitos binucleados. (H. E.  $\times$  400).



**Figura 4.**—Regeneración hepática a los 3 días de la intervención. Polo distal. Trama reticulínica conservada. (Wilder  $\times$  200).



**Figura 5.**—Regeneración hepática a los 3 días de la hepatectomía. Venas centrolobulillar dilataadas y exangües. Congestión sinusoidal. (H. E.  $\times$  40).



periferia en cambio los espacios porta son muy pequeños y las venas centrolobulillares aparecen dilatadas y repletas de hematíes.

A los dos días se aprecia cómo se va delimitando la zona lesionada del parenquima hepático normal, al mismo tiempo se hacen evidentes los signos de metamorfosis grasa en los hepatocitos próximos a la misma. Es muy evidente el aumento de figuras de mitosis y de proporción de hepatocitos binucleados que alcanzan su mayor exponente a las 48 horas (figura 3).

En la zona lesional el parenquima hepático aparece conservado en torno a los espacios porta con sus características tincoriales normales, mientras que el resto muestra signos de necrosis en la proximidad y necrobiosis distal (figura 3).

La infiltración inflamatoria de las áreas necrosadas es progresiva entremezclándose en ella los propios leucocitos con detritus celulares y glóbulos rojos extravasados.

A distancia de la zona de ligadura y sección, se ven las venas centrolobulillares dilatadas, tanto en las zonas centrales como en la periferia del hígado. Esto se acompaña de éstasis sinusoidal centrolobulillar con dilatación de los sinusoides especialmente en las zonas vecinas a la vena centrolobulillar y menos a distancia de esta. También están dilatadas las ramas portales que discurren por los espacios porta.

A los tres días de la hepatectomía las técnicas de demostración de fibras de reticulina ponen en evidencia la marcada desestructuración del parenquima hepático necrosado mientras que a distancia de este se conserva el armazón reticulínico (figura 4).

Próximamente a la zona de ligadura se observan fenómenos regenerativos muy evidentes con gran número de mitosis y núcleos hipercromáticos. Hay pérdida de la arquitectura trabecular habitual y hace su aparición neogénesis vascular. Lejos de esta zona se aprecia su dilatación marcada de todas las venas portales y de las venas centrolobulillares (figura 5).

A partir del 4° día y progresivamente con mayor abundancia, hacen su aparición en la zona de infiltración inflamatoria, células redondas de tipo linfo-



Figura 6.—Imágenes de neogénesis vascular a partir de la cápsula de Glisson. (H. E. × 200).



Figura 7.—Técnica de transparencia de Spalteholz. Hígado de rata testigo.



Figura 8.—Aspecto del hígado a los 3 días de la intervención con la técnica de transparencia de Spalteholz.

citario, así como proliferación fibroblástica y neogénesis vascular, constituyendo un verdadero tejido de granulación que poco a poco sustituye a las zonas hepáticas necrosadas. La neogénesis vascular parece ser que se origina a partir de la cápsula de Glisson que participa de este modo en los fenómenos regenerativos (figura 6).

Lejos de la zona lesional son manifiestos los signos congestivos con dilatación tanto de la vena portal como central, destacando de forma evidente la gran dilatación sinusoidal de predominio centrolobulillar paralelamente van disminuyendo las figuras de mitosis y los fenómenos de esteatosis son menos manifiestos.

En los días sucesivos asistimos a una normalización paulatina de la arquitectura hepática mientras los fenómenos de congestión vascular siguen manifestándose, aunque van decreciendo paulatinamente. Llama la atención a los 7 días la gran neogénesis vascular a partir de la cápsula de Glisson y la presencia de gran número de ductos neoformados en contacto directo con el tejido de granulación (hiperplasia ductal e hiperplasia vascular capilar).

A partir de los 10 días la zona de neogénesis vascular es menos aparente y los fenómenos de remoción son más patentes. El hígado va restableciendo gradualmente su arquitectura mientras todavía persiste una cierta congestión vascular.

**MICRO-RADIOGRAFICA.**—Las micro-radiográficas obtenidas de los hígados sometidos a relleno del árbol vascular con micropaque o colourpaque, ponen de manifiesto unas alteraciones que se van sucediendo rítmicamente a lo largo del proceso regenerativo. Durante los primeros días se altera la proporción parenquima hepático/trama vascular, a favor del primer elemento. Esta alteración es progresiva alcanzando su máxima expresión a los 4 días de postoperatorio. Posteriormente se va normalizando, apareciendo todavía muy alterada a los 6 días y va acercándose a la normalidad a partir de los 10 días.

**TECNICA DE TRANSPARENCIA DE SPALTEHOLZ.**—Los hígados tratados con técnica de transparencia de Spalteholz ponen de manifiesto el árbol vascular hepático con mayor nitidez que la micro-radiografía. Los hígados

hechos transparentes después del relleno del árbol vascular con micropaque o colourpaque, muestran una alteración paralela a la descrita anteriormente de la proporción parenquima hepático/trama vascular, a favor del primero. Esta va en aumento hasta los 4 días en que se aprecia una disminución relativa de las mismas. Posteriormente asistimos a un aumento de las ramificaciones del árbol vascular con disminución de la masa de parenquima hepático que hace la separación entre los vasos (figuras 7 y 8).

## DISCUSION

La mortalidad ligeramente mayor en el grupo experimental es el reflejo de la mayor agresividad de la intervención, unida al incremento del efecto tóxico de los anestésicos para un animal privado del 70% de su hígado (9), hecho que ha sido comprobado por numerosos autores con anterioridad (10, 11).

La regeneración hepática puesta de manifiesto por el incremento de peso del 30% del hígado respetado, se mantiene en la línea de los resultados obtenidos por Higgins y Anderson, 1931 (8), Weinbren, 1959 (12), Sigel, 1967 (13)... etc. y presentando el comportamiento bifásico ya descrito con anterioridad (10, 14).

El proceso regenerativo hepático provoca alteraciones funcionales y metabólicas intensas que han sido descritas también en clínica humana y que se suelen normalizar a las 6 semanas de la hepatectomía (15, 16, 17). En la rata estas alteraciones se traducen por una pérdida de peso que oscila entre el 15% (10) y el 25%, Beckcer, 1963 (18).

Paralelamente se producen alteraciones de las proteínas plasmáticas, fundamentalmente de la seroalbúmina con aumento relativo de las globulinas beta y gamma, de la bilirrubina, y aumento de la fosfatasa alcalina, LDH y CPK, hechos que han sido motivo de un estudio anterior (19). Algo parecido ocurre con algunos factores de coagulación que también se alteran siguiendo ondas o fases de mayor afectación (20).

Como ya se apuntaba en la introducción son varios los autores que han dedicado su atención hacia las alteraciones vasculares que se presentan en el hígado ante las más variadas circunstancias. Ya sea ante diversas situaciones funcionales, tales como el shock hemorrágico, Koo y Liang, 1977 (1), bien por alteraciones farmacológicas o determinadas por la actuación de determinadas hormonas (3, 4, 21).

Se han invocado una serie de factores como condicionantes o desencadenantes de la regeneración hepática entre los que parece ser que destacan la

insulina y glucagón (21, 22, 23). Richardson, 1977 (24), describe cómo el glucagón inhibe la respuesta de la estimulación nerviosa sobre las arteriolas hepáticas. Furtado, 1965 (6) encuentra alteraciones en la microcirculación hepática provocadas por la acción de aminas vasoactivas. Ungvarv, 1977 (7) los atribuye a cambios metabólicos y estructurales del hígado en regeneración. El interés por las alteraciones vasculares que se producen durante la regeneración hepática parece indudable.

En nuestro estudio vemos cómo a nivel del polo de ligadura y sección, después de la delimitación entre parenquima hepático conservado y parenquima afectado por el daño quirúrgico, se inician los fenómenos inflamatorios que desembocarán en la formación de un tejido de granulación ricamente vascularizado. El hecho de que el parénquima hepático aparezca conservado durante más tiempo en torno a los espacios porta, podría tener su explicación por el mayor aporte sanguíneo a este nivel.

A los tres días se aprecia a nivel del polo de ligadura y sección, gran desestructuración del armazón reticulínico en el parenquima lesionado. Paralelamente se inicia la neogénesis vascular en la zona dañada por el trauma quirúrgico, expresamente a partir de la cápsula de Glisson. La demostración del incremento de núcleos poliploides y mitosis a este nivel, coincidiendo con fenómenos alterativos, ponen una vez más en evidencia el enorme poder regenerativo del hígado, que se manifiesta incluso ante las circunstancias más adversas.

En cuanto a los resultados obtenidos en los estudios por micro-radiografía y método de transparencia de Spalteholz la inversión de la relación parenquima hepático/trama vascular, es fácilmente explicable por la hipertrofia e hiperplasia de los hepatocitos.

En una primera fase, el aumento de volumen de los hepatocitos, junto con el incremento proporcional del número de hepatocitos binucleados, provocaría un aumento de separación entre las distintas estructuras vasculares.

Posteriormente predominaría la hiperplasia y neogénesis vascular, con lo que el árbol vascular demostrado por micro-radiografía y método de transparencia se asemejaría más al de los animales testigo.

Otra cosa que queremos resaltar es el hecho de que las alteraciones vasculares durante la regeneración hepática dan la impresión de que evolucionan de modo cíclico, con dos fases sucesivas de mayor afectación, fases que estarían en consonancia con las alteraciones funcionales detectadas (19, 20). Todo esto hace aconsejable su estudio con analizador de imagen para poder valorar su verdadera significación.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.—KOO A, LIANG IYS: "Microvascular filling pattern in rat liver sinusoids during vagal stimulation". J. PHYSIOL (LONDON). 295: 1979.
- 2.—KOO A, LIANG IYS: "Blood flow in hepatic sinusoids in experimental hemorrhagic shock in the rat". MICROVASC. RES. 13: 315. 1977.
- 3.—KOO A, LIANG IYS, CHENG KK: "Adrenergic mechanisms in the hepatic microcirculation in the rat".
- 4.—KOO A, LIANG IYS: "Parasympathetic cholinergic vasodilator mechanism in the terminal liver microcirculation in rats". Q. J. EXP. PHYSIOL. 64:149. 1979.
- 5.—MILLER DL, ZANCOLLI CS, GUMUCIO JJ: "Quantitative morphology of the sinusoids of the hepatic acinus. Quantitative analysis of rat liver". GASTROENTEROLOGY. 76:965. 1979.
- 6.—LINARES FURTADO A: "La circulation du foie dans la regeneration hepatique experimentale". ARCH. PORT. SC. BIOL. 15:5. 1965/6.
- 7.—UNVARV G, VARGA B, POLIG G: "Effects of catecholamines on local blood flow in the regenerating rat liver". ACTA PHYSIOL. ACAD. SCI. HUNG. 50:45. 1977.
- 8.—HIGGINS GM, ANDERSON RM: "Experimental pathology of the liver: Restoration of the white rat following partial surgical removal". ARCH. PATH. 12:186. 1931.
- 9.—COOPERMAN LH, WOLLMAN H, MARSH ML: "Efectos de la anestesia en el higado". SURG. CLIN. N. AM. 57:421. 1977.
- 10.—AZNAR A, LLANES F, LOPEZ ALONSO A, MARTINEZ T, BENTURA ML: "Aplicación de la histofotometria al estudio de la Regeneración Hepática". REV. QUIR. ESP. 10:321 1983.
- 11.—AZNAR A, LLANES F, LOPEZ ALONSO A, MARTINEZ T, MADERA JC: "Alteraciones ultraestructurales en la regeneración hepática experimental". MEDICINA MILITAR. 39:17. 1983.
- 12.—WEINBREN K, BILLING BH: "Hepatic clearance of bilirubin as an index of cellular function in the regenerating rat liver". BRIT. J. PTH. 37: 199. 19956.
- 13.—SIGEL B, BALDIA LB, DUNN MR, MENDUKE H: "Humoral control of liver regeneration". SURG. GYN. COL. OBSTET. 124:1023. 1967.
- 14.—AZNAR A, LLANES F, LOPEZ ALONSO A, DOÑATE G, MARTINEZ T: "Regeneración Hepática. Estudio experimental en la rata". REV. QUIR. ESP. 10:263. 1983.
- 15.—ARONSEN KF, ERICSON B, PILHL B: "Metabolic changes following mayor hepatic resection". ANN. SURG. 169:102. 1969.
- 16.—LIN TY, CHEN CC: "Metabolic function and regeneration of cirrhotic and non-cirrhotic liver after hepatic lobectomy in man". ANN. SURG. 162:959. 1965.
- 17.—MODERMOTT WV, GREENBERG NJ, ISSELBACHER KJ, WEBER AL: "Major hepatic resection: Diagnostic, techniques and metabolic problems". SURGERY. 54:56. 1963.
- 18.—BECKER F: "Restoration of liver mass following partial hepatectomy: Surgical hepatotrophy. I. Influence of blood flow". AM. J. PATH. 43:597. 1963.
- 19.—AZNAR A, MARTINEZ T, GUTIERREZ C, GONZALEZ ALVAREZ J: "Alteraciones funcionales en la regeneración hepática experimental". MEDICINA MILITAR. 41:137. 1985.
- 20.—AZNAR A, LLANES F, LOPEZ ALONSO A, DOÑATE, LLANO BENEYTO R: "Regeneración hepática y alteraciones de la coagulación sanguínea. Estudio experimental en la rata". REV. QUIR. ESP. 11:33. 1984.
- 21.—PRICE JB Jr: "Insulin and glucagon as modifier of DNA synthesis in the regenerating rat liver". METABOLISM. 25:1427 Spp. 1976.
- 22.—STARZL TE, PORTER KA, PUTNAN CW: "Insulin, glucagon and the control of the hepatic structure, function and capacity for regeneration". METABOLISM. 25:1429. suppl. 1976.
- 23.—BUCHER NLR, SWAFIELD MN: "Regulation of hepatic regeneration in rats by synergistic action of insulin and glucagon". PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 72:1157. 1975.
- 24.—RICHARDSON PDI, WITHRINGTON PG: "Glucagon inhibition of hepatic arterial responses to hepatic nerve stimulation". PHYSIOL. HEART. CIR. PHYSIOL. 2:647. 1977.