

Modificación de la distribución zonal de la succinato-deshidrogenasa en el hígado normal y regenerativo de la rata tras tratamiento con ciclosporina A

I. García-Alonso, I. López de Tejada, I. Iturburu y J.J. Méndez

Cátedra de Patología y Clínica Quirúrgica.
Facultad de Medicina. Universidad del País Vasco.

RESUMEN

Considerada la importancia adquirida por la ciclosporina A (CsA) en el trasplante hepático y su capacidad de inducir y potenciar la regeneración hepatocitaria, nos hemos planteado estudiar los efectos de este fármaco sobre otros aspectos del funcionalismo hepático. Hemos empleado ratas Sprague-Dawley tratadas con CsA y sometidas a hepatectomía parcial en las que hemos valorado citofotométricamente la actividad succinato-deshidrogenasa (SDH). La típica diferenciación del parénquima hepático en dos zonas con distinta actividad SDH disminuye con la hepatectomía parcial y se hace casi imperceptible tras el tratamiento con CsA. Los efectos reductores de la zona enzimáticamente más activa del lobulillo hepático provocados por el tratamiento con CsA y por la hepatectomía parcial se suman. Esto hace sospechar que los mecanismos inductores de la regeneración sean distintos en estos dos procesos.

MODIFICATION OF THE ZONAL DISTRIBUTION OF SUCCINATE-DEHYDROGENASE IN THE NORMAL AND REGENERATING LIVER OF THE RAT AFTER TREATMENT WITH CYCLOSPORIN A

Taking into account the importance given to cyclosporin A (CsA) in liver transplantation and its capacity to induce and increase hepatocyte regeneration, we proposed to study the

effects of this drug on other aspects of hepatic function. We used Sprague-Dawley rats, which we treated with cyclosporin A and then underwent partial hepatectomy and in which the succinate-dehydrogenase (SDH) activity was measured by means of cytophotometry. The typical differentiation of the hepatic parenchyma into two zones with a distinct succinate-dehydrogenase activity decreased following partial hepatectomy and became almost undiscernible after treatment with cyclosporin A. A summation took place of the reducing effects in the more enzymatically active zone of the hepatic lobule, which were induced by the treatment with cyclosporin A and by the partial hepatectomy. This finding raises the suspicion that the mechanisms which induce regeneration are different in either of the two processes.

La ciclosporina A (CsA) es un metabolito fúngico de naturaleza polipeptídica con una gran actividad inmunosupresora en el hombre. Se debe a Calne et al¹ la introducción de este fármaco en la clínica del trasplante hepático, pero fueron Starzl et al² quienes empezaron a usarla asociada a bajas dosis de corticoides con resultados espectaculares: la supervivencia al año del trasplante subió del 33 % al 66 %³.

Sin embargo, ya en 1978, Calne et al⁴ refirieron una cierta hepatotoxicidad en enfermos sometidos a trasplante renal y tratados con CsA. Thomson et al⁵ demostraron, en un estudio de toxicidad en ratas, una discreta disfunción hepática debida a la CsA. Otros autores han referido hallazgos similares y los atribuyen a una disfunción hepatocitaria reversible y dosis dependiente⁶⁻⁹. La superación de

Correspondencia: Dr. D. Ignacio García-Alonso Montoya.
M^o Díaz de Haro, 7-2^o izq. 48013 Bilbao.

Recibido: 16-11-1987; aceptado para su publicación: 1-VI-1987.

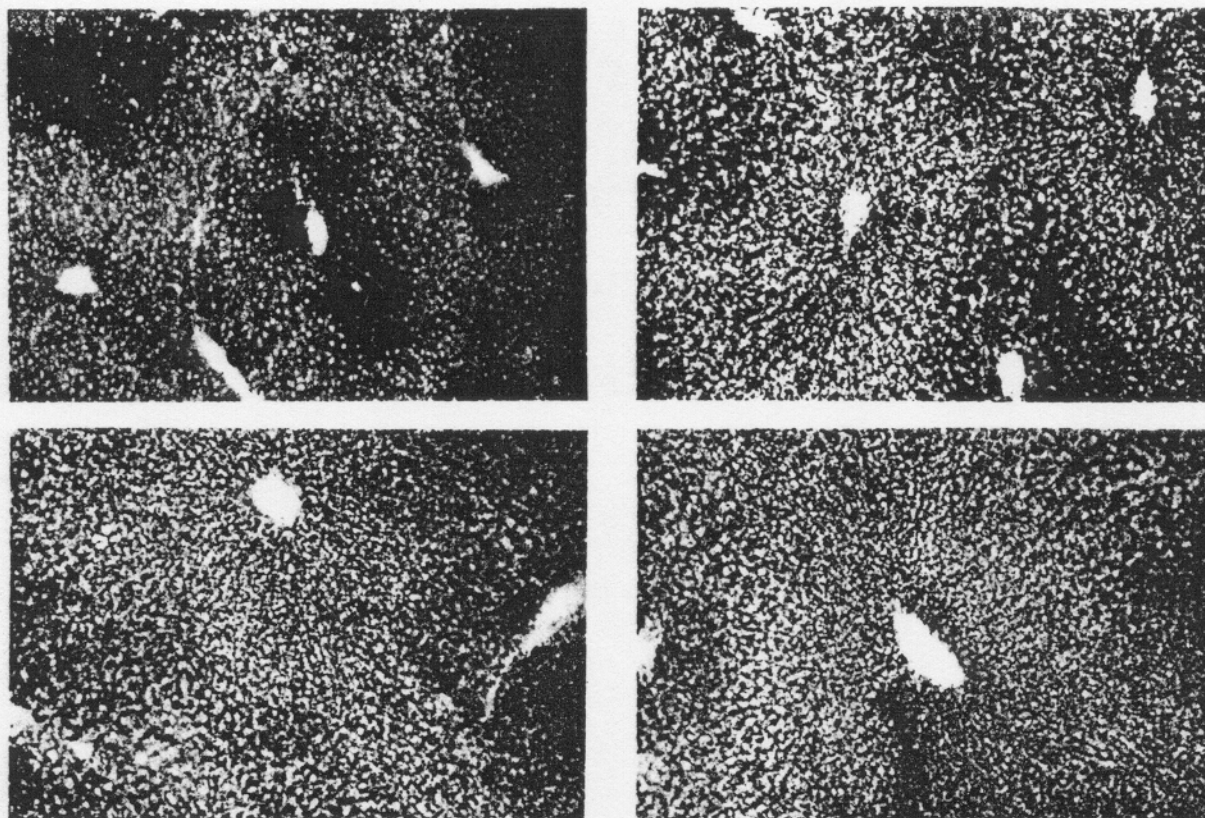


Fig. 1a-d. Distribución de la succinato-deshidrogenasa en el parénquima hepático de la rata: a) animales normales; b) sometidos a hepatectomía parcial; c) tratados con CsA; y d) tratados con CsA y sometidos a hepatectomía parcial. Se aprecia el cambio de una distribución preferentemente periportal a otra más difusa por todo el parénquima.

esta situación de lesión hepática puede deberse a dos mecanismos diferentes: recuperación de los hepatocitos afectados o sustitución de los mismos por medio de un mecanismo de regeneración hepatocitaria.

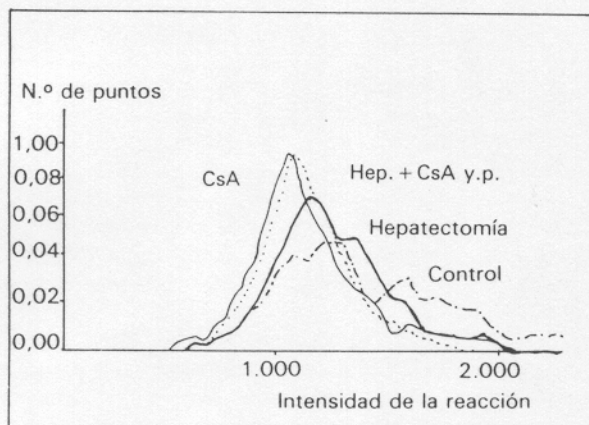


Fig. 2. Al superponer las cuatro gráficas se aprecia un desplazamiento hacia la izquierda de las curvas respecto a la de los animales control, más acusado en los animales tratados con CsA que en los simplemente hepatectomizados. En los animales sometidos a ambos tratamientos, esta disminución del segundo pico de la curva (zona B) se acentúa hasta el extremo de no ser perceptible.

La capacidad del hígado para reemplazar los hepatocitos dañados fue demostrada por Higgins et al¹⁰ en 1944. Desde entonces se han sucedido numerosos trabajos encaminados a aclarar el mecanismo de este proceso regenerativo.

Apoyándonos en estos estudios, podemos suponer que las lesiones y muertes celulares que acontecen durante la preservación del hígado en el trasplante hepático se compensan mediante este mecanismo regenerativo.

A la vista de la importancia de la regeneración hepática y de la CsA en el trasplante hepático ortotópico, hemos investigado los posibles efectos de la CsA sobre el funcionalismo hepático y sobre su capacidad regenerativa. Hemos escogido para este estudio la actividad de succinato-deshidrogenasa (SDH) debido a que esta enzima ha sido aceptada como un buen marcador de la actividad metabólica de los hepatocitos¹¹, y a que su típica distribución zonal se modifica de manera característica tras la hepatectomía parcial¹².

MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo se ha realizado con ratas Sprague-Dawley hembras (200-220 g). Se han considerado cuatro grupos de 10 animales: controles, hepatectomía, ciclosporina A y hepatectomía + ciclosporina A.

TABLA I. Intensidad media de la reacción de SDH en las diversas series experimentales

	Zona A	Zona B
Control	965 (10)	1546 (196)
Hepatectomía	968 (25)	1328 (19)
CsA	908 (25)	1338 (37)
Hep. + CsA	933 (15)	1297 (34)

Entre paréntesis la desviación estándar.

La hepatectomía parcial (40 % ± 3) se practicó resecaando el lóbulo lateral izquierdo, previa anestesia con pentobarbital sódico (30 mg/kg ip).

La CsA se ha administrado por vía intraperitoneal, disuelta al 1 % en una mezcla de etanol anhidro e Intralipid-10 % (proporción 1/10). La dosis empleada ha sido de 20 mg/kg/día, durante tres días. En el grupo de hepatectomía + CsA, la CsA se comenzó a administrar la víspera de la intervención.

Los animales se sacrificaron 40 horas después de realizada la hepatectomía o al tercer día de tratamiento con CsA. Previa anestesia con pentobarbital sódico (35 mg/kg), se extrajo rápidamente el hígado, de cuyo lóbulo central se obtuvieron dos bloques de aproximadamente 1 cm de lado. Tras lavar estas muestras mediante agitación suave en suero fisiológico y congelarlas en nitrógeno líquido, se obtuvieron cortes histológicos de 8 µm de espesor en un criostato «Leitz».

La actividad de la SDH se ha puesto de manifiesto utilizando succinato sódico y p-nitrobluetetrazolium como sustrato¹³. Los cortes histológicos se han incubado en este medio a 37 °C durante 45 minutos, deteniéndose la reacción mediante lavado y fijación con vapores de formol. Se han sometido a la reacción 10 cortes histológicos de cada animal, montados en portas de dos en dos. Para cuantificar la intensidad de la reacción SDH hemos empleado el método microespectrofotométrico de la «doble área», descrito por Mariano García¹⁴. Este método consiste, básicamente, en la medición consecutiva de dos áreas concéntricas, la menor de las cuales debe abarcar una zona en la que el cromóforo se encuentre homogéneamente distribuido. Las mediciones se han realizado con un microespectrofotómetro Zeiss controlado mediante un ordenador Olivetti M-20.

De cada animal se han escogido tres portas al azar, valorándose en cada uno la preparación que presentaba mayor calidad. Se ha cuantificado la reacción en seis puntos equidistantes alrededor de cada vaso encontrado en la preparación, calculándose a continuación los histogramas de frecuencias de los valores obtenidos. Los estudios estadísticos de los datos obtenidos se han realizado con un microprocesador Olivetti M-24.

Utilizando una modificación del método descrito por Bartels¹⁵ los histogramas se ajustaron a dos gaussianas, y se procedió a su estandarización adjudicando al pico de la primera un valor arbitrario de 1.000 (reajustando a continuación cada uno de los valores del histograma). Esto ha permitido sumar los datos de todas las muestras de cada animal y de todos los animales de cada serie experimental, obteniéndose así 10 histogramas de frecuencias en cada serie experimental; y cuatro histogramas acumulados, uno por serie. Cada nuevo histograma fue ajustado a dos gaussianas.

En cada uno de los diez «histogramas controles» se midió el punto de intersección de las dos gaussianas. Al valor promedio de dicho punto se le denominó «valor frontera», y se ha empleado para establecer el límite entre las dos zonas del parénquima hepático: zona oscura (funcionalmente más activa, denominada zona B) y zona clara (funcionalmente menos activa, denominada zona A).

En cada serie experimental se ha calculado el porcentaje de puntos y el valor medio de cada zona, así como la relación existente entre ambas zonas.

Hemos representado los histogramas acumulados de cada serie en una gráfica lineal (eje horizontal: intensidad de la reacción; eje vertical: frecuencia relativa de los puntos con una intensidad dada). Esto ha facilitado la superposición de los datos con fines comparativos.

TABLA II. Porcentaje de puntos pertenecientes a cada zona y proporción A/B

	% A	% B	A/B
Control	56,62 (7,4)	43,38 (7,4)	1,30
Hepatectomía	73,76 (4,6)	26,24 (4,6)	2,81
CsA	86,44 (5,5)	13,56 (5,5)	6,37
Hep. + CsA	88,20 (4,0)	11,80 (4,0)	7,47

Para valorar la significación estadística de las diferencias halladas hemos utilizado el test de la "F" de Snedecor para comprobar la igualdad de las varianzas, y el test de la t de Student para comprobar la igualdad o no de las medias (tomada de A. Gullon, «Introducción a la estadística aplicada»; Edit. Alambra, Madrid, 1970). El nivel de significación establecido en nuestro trabajo ha sido del 5 %.

RESULTADOS

La heterogeneidad zonal es clara en las muestras de los grupos control. En ellas se distinguen claramente dos tipos de vasos: unos rodeados de una zona de parénquima clara (zona A), y otros de una oscura (zona B, funcionalmente más activa). Las zonas oscuras corresponden al área periportal o zona 1 de Rappaport; y las claras al área centrolobulillar o zona 3 de Rappaport. Esta diferencia de intensidad entre las dos zonas del lobulillo hepático disminuye tras la hepatectomía; y esta disminución es todavía mayor tras el tratamiento con CsA (fig. 1).

En las gráficas lineales que representan los «histogramas acumulados» de cada serie experimental (fig. 2) se aprecia la misma bipolaridad en la actividad SDH del parénquima hepático que se observaba en los cortes histológicos. Así, el grupo control presenta un histograma con dos picos claramente diferenciados. El primero se corresponde con los puntos situados en áreas claras o centrolobulillares, y está situado, al igual que en los demás grupos experimentales, en torno al valor estándar de 1.000. La intensidad media de la reacción SDH, siempre en unidades arbitrarias, ha sido 965 UA (tabla I). A esta zona corresponde el 56,62 % del total de puntos medidos (tabla II). El segundo pico (puntos correspondientes a la zona periportal) se sitúa en torno a 1.600 UA, abarca el 43,38 % de los puntos y la intensidad media de la reacción ha sido de 1.546 UA.

En el grupo de animales sometidos a hepatectomía el primer pico del histograma, situado en torno a 1.000, comprende el 73,76 % de los puntos con una intensidad media de 968. El segundo pico se sitúa en torno a 1.380, sus puntos son el 26,24 % del total y su intensidad media es de 1.328 UA.

El histograma de los animales tratados con CsA presenta un primer pico que abarca el 86,44 % de los puntos, con una intensidad media de 908 UA. El segundo pico se sitúa en torno a 1.300 y es difícil de distinguir del primero, comprende el 13,56 % de los puntos, con una intensidad media de 1.338 UA. El grupo tratado con CsA y sometido a hepatecto-

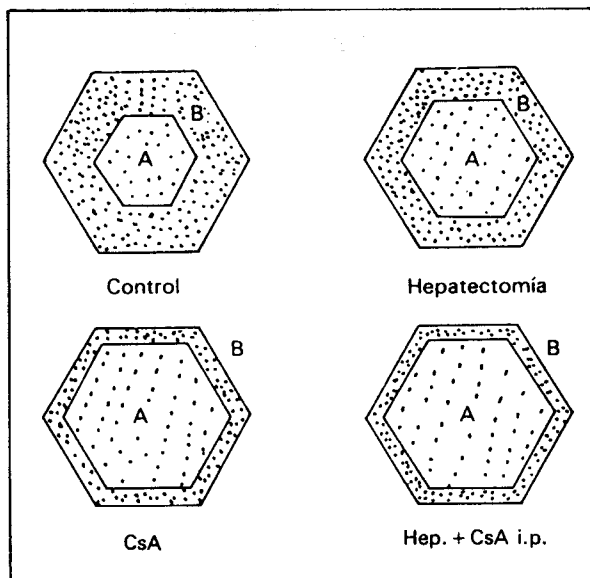


Fig. 3. Representación gráfica de los porcentajes de las zonas A y B (de mayor actividad SDH). Se aprecia una franca reducción de la zona B en las tres series experimentales frente a los animales control. El porcentaje de zona B es significativamente menor en los animales tratados con CsA y sometidos a hepatectomía que en los que únicamente han recibido el tratamiento con CsA.

mía parcial presenta un primer pico en su histograma que comprende el 88,2 % de los puntos medidos, con una intensidad media de 933 UA. El segundo pico se confunde con el primero en el histograma: está situado en torno a 1.250, comprende 11,8 % de los puntos, con una intensidad media de 1.277 UA.

Al superponer las cuatro gráficas (fig. 2) se aprecia un desplazamiento hacia la izquierda de las curvas respecto a la de los animales control, más acusado en los animales tratados con CsA que en los simplemente hepatectomizados. Además, en estos últimos se aprecia una disminución del segundo pico de la curva (correspondiente a la zona B), que se acentúa hasta el extremo de no ser perceptible en los animales tratados con CsA.

El porcentaje de puntos correspondientes al segundo pico del histograma (43,38 %) disminuyó en un 39,5 % con la hepatectomía (26,24 %). Los animales hepatectomizados y tratados con CsA presentaron un porcentaje de zona oscura mucho menor (11,8 %), lo que, comparado con los controles, significa una disminución del 72,8 %. El simple tratamiento con CsA ha inducido una reducción del 68,8 % de la zona B (13,56 %) (fig. 3).

La intensidad de la reacción en la zona B ha disminuido en un 14-17 % en las tres series experimentales (1.546 versus 1.316 ± 22). Esta disminución, estadísticamente significativa ($p < 0,005$), es similar en los animales tratados con CsA y en los hepatectomizados, pero es significativamente mayor ($p < 0,05$) en los animales sometidos simultáneamente a ambos tratamientos.

DISCUSION

La población hepatocitaria del hígado presenta un carácter heterogéneo¹⁶, lo que se ha justificado por la diferente irrigación que reciben los hepatocitos según su localización respecto al espacio porta más próximo¹⁷. Esto ha llevado a que la clásica división del hígado en lobulillos anatómicos esté siendo sustituida por las divisiones basadas en consideraciones funcionales¹⁸. Así, Rappaport¹⁹ propuso la división del parénquima hepático en ácinos situados en torno a las ramas terminales del árbol portal, y que permite distinguir tres zonas funcionales en base a su mayor o menor irrigación. La distinción entre zona periportal y centrolobulillar sigue el mismo concepto.

La heterogeneidad hepatocitaria se pone de manifiesto cuando se aíslan los hepatocitos por su densidad de flotación^{20,21}. Igualmente, puede ponerse de manifiesto *in situ* por el diferente nivel de actividad enzimática que presentan los distintos hepatocitos²². La SDH resulta especialmente útil para este propósito por la marcada diferencia que existe entre las zonas periportal (de muy alta actividad) y centrolobulillar¹². Por tanto, puede considerarse que la SDH es un marcador diferencial de los dos tipos de hepatocitos.

Los hepatocitos de las zonas periportal y centrolobulillar, además de ser diferentes respecto a su contenido enzimático²², presentan diferencias ultraestructurales²³. Así, se ha acuñado el concepto de *metabolic zonation* que propone diferentes funciones para las dos zonas: la gluconeogénesis primaria en el área periportal, y la glucólisis en la centrolobulillar¹². Esta heterogeneidad zonal es más dinámica que estática, y sufre modificaciones por desarrollo fetal y posnatal²⁴, hambre, cirrosis experimental y regeneración¹².

Nuestros resultados con la SDH en hígado normal y sometido a hepatectomía coinciden con los de Andersen et al¹²: «la típica localización periportal cambia a una distribución más difusa entre las 8 horas y el séptimo día». Son numerosos los trabajos que hacen referencia a esta redistribución zonal^{12,22,23,25}, pero en ellos no se aclaran los mecanismos biológicos o funcionales responsables. La discusión se centra en una posible asociación de esta redistribución zonal con cambios funcionales hepatocitarios ligados bien al estímulo inductor de la regeneración, o bien a los cambios ambientales inducidos por la propia regeneración.

Sólo existen unos datos que aclaran algo sobre la instauración de la función hepática y la redistribución zonal en relación con otros componentes de la estructura hepática²⁴. Así, la delimitación zonal de los hepatocitos se instaura en la rata después de la primera semana de vida extrauterina, siguiendo la diferenciación de las células endoteliales. Estas muestran ya desde las últimas fases del desarrollo embrionario unos patrones morfológicos diferen-

ciales entre las dos zonas funcionales. Se sugiere así un papel inductor de las células endoteliales en la delimitación regional del lobulillo hepático. Aceptando esta sugerencia, podríamos extrapolar de nuestros resultados una posible acción de la CsA sobre las células endoteliales: serían ellas quienes transmitirían a los hepatocitos del parénquima unos estímulos que se traducirían en los cambios funcionales definidos.

El aspecto más llamativo de nuestros resultados lo constituye el hecho de que la CsA induzca una desdiferenciación zonal similar a la inducida por la hepatectomía, pero en un grado mucho más intenso. No hemos encontrado en la literatura ninguna referencia respecto a fenómenos similares provocados por otros tratamientos farmacológicos.

Habida cuenta de que la diferenciación zonal parece deberse a diferencias ambientales dentro del territorio hepático²³, puede concluirse que la CsA, de alguna manera, está disminuyendo ese efecto diferenciador. Ahora bien, caben, a nivel teórico, dos posibles mecanismos: una disminución de las diferencias ambientales mediada por la CsA, o una cierta disminución de la sensibilidad del hepatocito frente a esas diferencias.

Teniendo en cuenta que la CsA induce la regeneración hepática y exalta la regeneración inducida por la hepatectomía²⁶, y que la regeneración hepática se acompaña de un cierto grado de desdiferenciación zonal, cabría suponer que nuestro hallazgo no es más que la consecuencia lógica de la regeneración inducida por la CsA. Sin embargo, la intensidad de la regeneración inducida por la CsA no guarda proporción con el grado de desdiferenciación que produce²⁶. Por ello, y por el hecho de que el efecto desdiferenciador de la hepatectomía y de la CsA sea aditivo, nos inclinamos a pensar en la coexistencia de dos mecanismos responsables de esta desdiferenciación: la regeneración inducida por la CsA, y un efecto metabólico propio de la CsA sobre el hepatocito.

BIBLIOGRAFIA

1. Calne RY, Rolles K, White DJG et al. Cyclosporin A as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. *Lancet* 1979; 2: 1.033-1.036.
2. Starzl TE, Klintmalm GBG, Porter KA, Iwatsuki S, Schröter PJ. Liver transplantation with use of cyclosporin A and prednisone. *N Engl J Med* 1981; 305: 265-269.
3. Starzl TE, Iwatsuki S, Van Thiel DH et al. Report of Colorado-Pittsburgh liver transplantation studies. *Transplant Proc* 1984; 15: 2.582-2.585.

4. Calne RY, White DJG, Thiru S et al. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 1978; 2: 1.323-1.327.
5. Thomson AW, Whiting PH, Cameron ID, Lessels SE, Simpson JG. A toxicological study in rats receiving immunotherapeutic dose of cyclosporin A. *Transplantation* 1981; 31: 121-129.
6. Williams JW, Peters TG, Haggitt R et al. Cyclosporin A in orthotopic canine hepatic transplants. *J Surg Res* 1982; 32: 576-585.
7. Ota B, Bradley M. Side effects of cyclosporin in 100 renal allograft recipients. *Transplant Proc* 1983; 15: 3.150-3.155.
8. Magreiter R, Kramar R, Huber C et al. Trasplante renal y hepático combinado. *Lancet (Ed. esp.)* 1984; 5: 221-222.
9. Nogueira HJ, Cutler RE. Cyclosporine: (part II), nephrotoxicity and other adverse effects. *D&T Today* 1985; 15: 585-586.
10. Higgins GM, Anderson RM. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Path* 1944; 12: 196-202.
11. James J, Frederiks WM, Van Noorden CJF, Tas J. Detection of metabolic changes in hepatocytes by quantitative cytochemistry. *Histochemistry* 1986; 84: 308-316.
12. Andersen B, Zierz S, Jungermann K. Alteration in zonation of succinate dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxylase and glucose-6-phosphatase in regenerating rat liver. *Histochemistry* 1984; 80: 97-101.
13. Lodja Z, Gossrau R, Schiebler TH. *Enzym-histochemische Methoden*. Springer, Berlin, 1976; 231.
14. García AM. A one-wavelength, two area method in cytophotometry for cells in smears or prints. En: Wied GL, ed. *Introduction to quantitative cytochemistry*. Nueva York, Academic Press, 1966. 239-245.
15. Bartels PH. Numerical evaluation of cytologic data. I. Description of profiles. *Analytical and Quantitative Cytology* 1979; 1: 20-28.
16. Popper H. Correlation of hepatic function and structure based on liver biopsy studies. En: *Trans. of 9th Conf on Liver Injury*. New York, Macy, 1950; 9-17.
17. Elias H. A re-examination of the structure of the mammalian liver. II. Hepatic lobule and its relation to vascular and biliary systems. *Am J Anat* 1949; 85: 379-385.
18. Mall FP. A study of the structural unit of the liver. *Am J Anat* 1906; 5: 227-241.
19. Rappaport AM, Borowy ZJ, Loughheed WM, Lotto WN. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology. *Anat Rec* 1954; 119: 11-14.
20. Kiessling K, Smith-Kielland A, Morland J. Partial separation and biochemical characteristics of periportal and perivenous hepatocytes from rat liver. *Eur J Biochem* 1981; 118: 591-597.
21. Sumner IG, Fredman RB, Lodola A. Characterisation of hepatocyte sub-populations generated by centrifugal elutriation. *Eur J Biochem* 1983; 124: 334-345.
22. Jungermann K, Katz N. Functional hepatocellular heterogeneity. *Hepatology* 1982; 2: 385-395.
23. Vidal-Banaclocha F, Barbera-Guillem E. Fenestration patterns in endothelial cells of rat liver sinusoids. *J Ultrastruc Res* 1985; 90: 115-123.
24. Barbera-Guillem E, Vidal-Banaclocha F. New discoveries and technologies in developmental biology (Structural and functional interrelationships between hepatocytes and sinusoidal endothelium in the maturing process of rat liver). Alan R Liss. Nueva York (en prensa).
25. Gurmucio JJ, Miller DL. Functional implications in liver heterogeneity. *Gastroenterology* 1981; 80: 393-403.
26. García-Alonso I, Tejada IL, Iturburu I, Méndez J. Efectos de la ciclosporina A sobre el funcionalismo hepático y su capacidad regenerativa. *Cirugía Española* (en prensa).