

Modificaciones inducidas por la ciclosporina A sobre la respuesta regenerativa del hígado isquémico en la rata

I. García-Alonso Montoya*, V. Portugal Porras**, P. Barceló Galínder***, J. Díaz Aguirregoitia****, I. Iturburu Belmonte***** y J. Méndez Martín*****

Laboratorio de Cirugía Experimental. Facultad de Medicina y Odontología. Universidad del País Vasco (Dr. J. Méndez Martín).

Resumen

La ciclosporina A mejora la respuesta regenerativa del hígado sometido a hepatectomía parcial e induce una cierta regeneración en hígado normal. El propósito de este trabajo ha sido determinar si estas propiedades de la CsA pueden ser de utilidad en la recuperación del hígado isquémico. La isquemia se ha inducido en ratas Sprague Dawley mediante clampaje del pedículo hepático, el tronco celiaco y la arteria mesentérica superior durante quince minutos. La hepatectomía parcial del 70 % se ha realizado nada más instaurar la isquemia. Se ha medido el contenido nuclear en DNA de los hepatocitos a las veinticuatro horas de la intervención, calculándose el porcentaje de hepatocitos en fase S (%HFS) y el «gradiente regenerativo» (GR). La isquemia ha producido un descenso del % HFS (5,71 frente a 21,51) conservando normal el GR (1,61 frente a 1,48). La CsA (20 mg/kg i.p.) ha provocado una recuperación parcial del %HFS (12,19) a la vez que ha elevado el GR (2,29) por encima de los controles. Se discuten las posibles explicaciones de estos resultados, concluyéndose que las acciones de la CsA sobre la población linfocitaria pueden ser la clave del problema.

Palabras clave: Hígado. Regeneración. Isquemia. Ciclosporina. DNA.

Abstract

Cyclosporin A improves the regenerative response of the liver when subjected to partial hepatectomy, and induces a certain re-generation in normal livers. The purpose of this study

* Profesor titular interino. ** Becario. *** Alumno de tercer ciclo. **** Profesor titular interino. ***** Profesor titular. ***** Catedrático.

Recibido: 11/90.

Correspondencia: Dr. D. I. García-Alonso.
Laboratorio de Cirugía Experimental.
Facultad de Medicina y Odontología.
B. Sarriena, s/n.
48940 Lejona (Vizcaya).

is to determine whether these properties of CsA may be of use in the recovery of the ischaemic liver. Ischaemia was induced in Sprague Dawley rats by clamping the hepatic pedicle, celiac trunk and superior mesenteric artery for 15 minutes, 70% partial hepatectomy was performed as soon as the ischaemia set in. Nuclear content in DNA of hepatocytes was measured 24 h after the operation, and the percentage of Phase S hepatocytes (%HFS) and «regenerative gradient» (GR) were calculated. The ischaemic generated a decrease in %HFS (5,71 compared to 21,51), with normal GR (1,61 compared to 1,48). The CsA (20 mg/kg i.p.) provoked a partial recovery of the %HFS (12,19) and at the same time, raised GR (2,29) above control levels. Discussion of the possible explanations for these results, concluding that the action of CsA on the lymphocyte population may be the answer to the problem.

Key words: Liver. Regeneration. Ischaemia. Cyclosporin. DNA.

Introducción

El trasplante hepático constituye ya una modalidad terapéutica bien asentada. Sin embargo, la escasez de donantes pediátricos está suponiendo un serio inconveniente en aquellos casos en los que esta técnica quirúrgica ofrece mejores perspectivas. Por este motivo, cada vez se contempla con más interés el implante de lóbulos hepáticos extraídos de familiares adultos como alternativa al donante-cadáver. Son bastante numerosos los estudios realizados en torno a los problemas técnicos derivados del trasplante hepático segmentario, fundamentalmente la obtención de pedículos adecuados y el control de la hemorragia en la superficie cruenta del hígado¹.

Sin embargo, quizás no se haya hecho suficiente hincapié en la importancia que tiene la posterior adaptación del tamaño del injerto a las necesidades del huésped. Si bien no se conoce el mecanismo responsable,

en el organismo existe un equilibrio constante entre el volumen hepático y el tamaño corporal. Cuando este equilibrio se desplaza, las células hepáticas entran en división hasta restablecerlo². También es sabido que la isquemia afecta a la capacidad regenerativa del hígado. Por eso sería muy oportuno encontrar medios o técnicas que permitan manipular este fenómeno tras un trasplante hepático segmentario. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la CsA es capaz de potenciar la actividad regenerativa del hígado inducida mediante hepatectomía parcial³.

En este trabajo se estudia la influencia de la CsA —inmunosupresor de elección en el trasplante hepático— sobre la regeneración del hígado sometido a breves periodos de isquemia.

Material y métodos

El estudio se ha llevado a cabo en ratas Sprague-Dawley machos (280-300 g de peso) suministradas por el estabulario de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad del País Vasco. Los animales han estado sometidos a condiciones constantes de temperatura, ritmo luz/oscuridad y libre acceso al agua y a la comida (A04 de Panlab, S. L.).

Para descartar las posibles variaciones debidas a los ritmos biológicos de los animales, las experiencias se han realizado siempre a hora fija. Bajo anestesia con éter y a través de una laparotomía media se clampó el pedículo hepático con clips para aneurismas cerebrales de Yassargil. Con el fin de evitar las complicaciones derivadas de la hipertensión portal subsecuente, se añadió el clampaje del tronco celiaco y de la arteria mesentérica superior a su salida de la aorta. La hepatectomía del 70 % se realizó según la técnica de Higgins, inmediatamente después de los clampajes vasculares. Transcurrido el periodo de isquemia, se retiraron los clips y se investigó la recuperación de los latidos en el territorio mesentérico. La herida laparotómica se cerró con puntos sueltos de seda 2/0.

La primera parte del trabajo se ha ocupado de establecer un modelo quirúrgico útil para estudiar la capacidad regenerativa del hígado tras la agresión isquémica. Para ello se ha valorado la tasa de supervivencia a la isquemia hepática en dos grupos experimentales. El primero, dividido en cuatro lotes de cinco animales cada uno, fue sometido a distintos periodos de isquemia (diez, quince, veinte y veinticinco minutos, respectivamente). El segundo grupo experimental se organizó de igual manera que el primero, pero asociando una hepatectomía parcial del 70 % a la isquemia hepática.

La segunda experiencia se centró en el estudio del efecto de la CsA sobre la regeneración hepática. Para ello se han utilizado otros tres grupos de nueve animales cada uno: grupo III, sometido a hepatectomía del 70 %; grupo IV, en el que se asociaron la hepatectomía

del 70 % con una isquemia hepática de quince minutos; y el grupo V, de animales tratados con ciclosporina A (Sandoz) y sometidos a hepatectomía parcial del 70 % asociada a isquemia hepática. La CsA se ha administrado intraperitonealmente veinticuatro horas y dos horas antes de la intervención (20 mg/kg), utilizando como emulsionantes alcohol 90° e intralipid 10 % en dilución 1/10.

Los animales se sacrificaron veinticuatro horas después de la hepatectomía y se tomaron muestras de tejido hepático que se incluyeron en parafina. El contenido nuclear en DNA se ha cuantificado microespectrofotométricamente sobre cortes histológicos teñidos con reactivo de Schiff, mediante la reacción de Feulgen. La citometría ha proporcionado una cuantificación (en unidades arbitrarias) del contenido en DNA de cada núcleo. Estos datos se han agrupado en histogramas de frecuencias sobre los que, mediante un programa informático diseñado en nuestro laboratorio, se han ajustado una serie de gaussianas correspondientes a los distintos contenidos en DNA de los núcleos de los hepatocitos (fig. 1). Esto nos ha permitido estimar el porcentaje de hepatocitos en fase S y el *gradiente regenerativo* (cociente de los valores medios de DNA en los hepatocitos regenerativos y en los estáticos).

La comparación de los resultados se ha realizado mediante el Rank Sum Test, expresando la significación de la misma según el coeficiente *p* de Pearson. Se han considerado significativos los valores de *p* inferiores a 0,05.

Resultados

La isquemia hepática normotérmica durante periodos de cinco a veinte minutos ha sido bien tolerada por los animales (tabla I). Sin embargo, al ser prolongada a veinticinco minutos, la supervivencia ha descendido al 40 %. Este tiempo límite de tolerancia a la exclusión vascular completa del hígado ha disminuido en cinco minutos al asociarse al clampaje del pedículo hepático una resección parcial del hígado (hepatectomía del 70 %). Los animales que han fallecido lo han hecho dentro de las primeras veinticuatro horas. De acuerdo con estos resultados, se ha optado por utilizar periodos de quince minutos para estudiar la regeneración hepática tras isquemia.

Tras la cuantificación del DNA, la descomposición en gaussianas de los histogramas de frecuencias ha permitido comprobar que, después de quince minutos de isquemia normotérmica, el porcentaje de hepatocitos que responde a la hepatectomía decrece sensiblemente ($p < 0,01$). La CsA, administrada según las pautas anteriormente descritas, revierte en parte este fenómeno (tabla II), aumentando el porcentaje de hepatocitos en fase S ($p < 0,05$) aunque sin llegar a normalizarlo ($p < 0,05$).

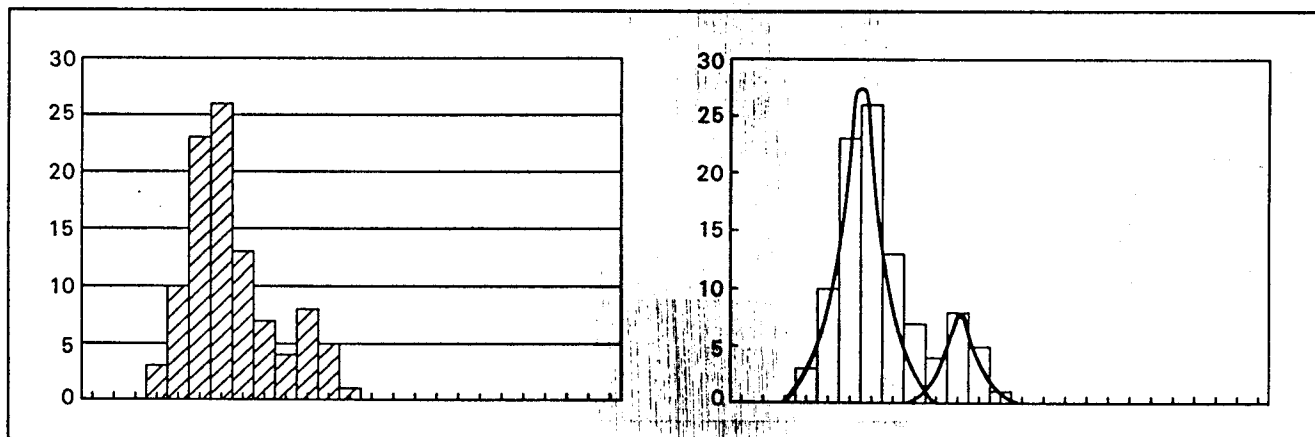


Fig. 1.—Histograma correspondiente a un hígado en regeneración tras hepatectomía del 70 %. En la gráfica segunda se ha dibujado la descomposición en dos curvas de Gauss que corresponden a hepatocitos normales (izquierda) y en fase de síntesis de DNA (derecha).

Tabla I

Porcentaje de supervivencia tras diversos períodos de isquemia hepática

Grupo I (control)			Grupo II (hepatectomía 70 %)		
T. isquemia	n	% superv.	T. isquemia	n	% superv.
10'	5	100	10'	5	100
15'	5	100	15'	5	100
20'	5	100	20'	5	40
25'	5	40	25'	5	20

Tabla II

Porcentaje de hepatocitos en fase S

	Media	DS
Hepatectomía 70 %	21,51	10,05
Isquemia + hepatectomía	5,71	4,44
CsA + isquemia + hepatectomía	12,19	4,29

También se ha podido comprobar que, en este modelo experimental, la isquemia hepática no modifica el gradiente regenerativo (tabla III), mientras que el tratamiento con CsA lo incrementa en cifras próximas al 50 % ($p < 0,01$).

Discusión

Los estudios experimentales sobre isquemia hepática *in vivo* deben evitar las complicaciones intestinales derivadas de la interrupción del flujo portal. Muchos autores han solventado este problema recurriendo a derivaciones portosistémicas (principalmente la anasto-

Tabla III

Gradiente regenerativo (calculado como el cociente de los valores medios de DNA en los hepatocitos regenerativos y en los estáticos)

	Media	DS
Hepatectomía 70 %	1.613	0,142
Isquemia + hepatectomía	1.482	0,867
CsA + isquemia + hepatectomía	2.299	0,353

mosis portocava laterolateral). Estas técnicas tienen la desventaja de que al desclampar el pedículo hepático no se recupera la normalidad hemodinámica, comprometiendo la capacidad regenerativa del hígado. Un modelo experimental más adecuado es el propuesto por Asakawa y cols.⁴ en el que se excluye de la isquemia a un lóbulo hepático, cuyo sistema vascular se utiliza para derivar el flujo portal. El problema de esta técnica deriva de la permanencia de un lóbulo no isquémico que presumiblemente interferirá con los mecanismos sistémicos (humorales o nerviosos) que regulan el funcionamiento hepatocitario. Buscando una técnica plenamente reversible que permita una isquemia hepática completa hemos asociado al clampaje del pedículo hepático una interrupción casi total del flujo esplácnico.

El tiempo de isquemia empleado en nuestro trabajo es muy breve si lo comparamos con los sesenta a cien minutos de otros autores^{5,6}. Es probable que el hecho de no existir ningún remanente hepático perfundido sea la causa de una menor tolerancia en nuestro modelo. En cambio, no parece que pueda responsabilizarse de ello a la isquemia mesentérica; sobre todo si tenemos en cuenta que la hepatectomía parcial (mucho más agresiva) tan sólo ha supuesto una reducción de cinco minutos en el tiempo de isquemia tolerable. De hecho, en otras experiencias hemos comprobado que son necesarios períodos superiores a los sesenta minu-

tos de isquemia mesentérica para que aparezca una mínima mortalidad⁷.

Los dos parámetros evaluados ofrecen informaciones complementarias sobre la síntesis hepatocitaria de DNA. El porcentaje de hepatocitos en fase de síntesis (% HFS) informa sobre la *intensidad* del fenómeno regenerativo; en general, a mayor estímulo, mayor respuesta. Esto se ve claramente comparando el %HFS obtenido tras hepatectomías del 40 % y del 70 %^{3,8}. Con todo, parece que la relación estímulo-respuesta no sigue una relación lineal, sino que se ajusta a una curva asintótica; y a partir de cierto límite (situado en torno a la hepatectomía del 80 %) la *intensidad* de la respuesta no se aumenta perceptiblemente^{9,10}.

El *gradiente regenerativo* informa indirectamente de la *velocidad* del proceso regenerativo. Habitualmente la duplicación hepatocitaria sigue un patrón sincrónico, al menos durante las primeras dos o tres mitosis¹¹. Así, mientras el primer pico regenerativo ocurre a las veinticuatro horas tras una hepatectomía del 70 %¹², se retrasa a las cuarenta horas tras una del 40 %¹³. Teniendo en cuenta que en animales jóvenes la mayoría de los hepatocitos poseen núcleos 2C¹⁴, los hepatocitos en fase S tendrán un contenido en DNA que variará entre 2C y 4C, en dependencia del momento en que se haga el estudio. Cuanto mayor sea ese contenido en DNA —tras un tiempo fijo— con mayor celeridad se estará produciendo la respuesta regenerativa.

Los resultados de este trabajo indican que tras la isquemia ha disminuido la *intensidad*, pero no la *velocidad* de la regeneración hepatocitaria. O lo que es lo mismo: menos hepatocitos han entrado en fase S, pero los que lo han hecho han seguido un ritmo de síntesis normal. Esto es compatible con un daño isquémico no uniforme, que afecte a los hepatocitos más alejados de los ejes vasculares, respetando a los de la zona periportal, que serían los que entran en síntesis. En cambio, los hepatocitos centrolobulillares habrían de renunciar a las funciones hepatocitarias específicas (y con más razón a la duplicación del DNA) y reconvertir toda su actividad metabólica para hacer frente a sus necesidades vitales básicas en una situación altamente desfavorable¹⁵. De hecho, quince minutos de isquemia son insuficientes para provocar la muerte de los hepatocitos⁶, y tras un tiempo variable recuperan su funcionalismo¹⁶.

Además del factor(es) desencadenante¹⁷ y de los factores reguladores de la regeneración hepática^{18,19}, es sabido que los hepatocitos necesitan que exista una determinada proporción insulina/glucagón en sangre portal para poder regenerar²⁰. Es más que probable que la isquemia mesentérica asociada haya producido alguna alteración pancreática transitoria y que por tanto esté condicionando de alguna manera el proceso. También las alteraciones hidroelectrolíticas habituales tras un período de isquemia orgánica pueden ser responsables de una cierta dificultad para regenerar²¹. Por tanto, es lógico pensar que tras ese primer pico de síntesis

de DNA sigan otros que sean más intensos a medida que los hepatocitos afectados por la isquemia y las condiciones humorales vuelven a la normalidad. De hecho, Mackenzie y cols. no encontraron diferencias significativas en el peso del hígado siete días después de la hepatectomía entre los perros controles y los sometidos a isquemia hepática²².

A la luz de estas consideraciones cobran especial interés los resultados obtenidos con la CsA: aumento de la intensidad (sin normalizarla) y de la velocidad de la respuesta regenerativa. Es decir, aumentó el número de hepatocitos que fueron capaces de responder al estímulo regenerativo y además lo hicieron más rápido que los controles. La mejoría experimentada en la *intensidad* de la respuesta podría explicarse por una acción protectora frente a la isquemia que conservaría un mayor número de hepatocitos normofuncionantes. A favor de esta hipótesis están los resultados obtenidos en estudios de isquemia intestinal: la CsA ha mejorado la supervivencia y disminuido las lesiones mucosas^{23,24}. Sin embargo, el mecanismo protector propuesto en el intestino (inhibición del ataque linfocitario sobre las células dañadas) no parece tener fundamento en este modelo. También se ha publicado la capacidad de la CsA para mejorar la respuesta regenerativa tras hepatectomía parcial del 40 %¹³ y del 70 %²⁵. Esta propiedad de la CsA permite explicar la aceleración del proceso si, como hemos sugerido antes, aceptamos que a mayor estímulo, mayor velocidad. Sin embargo, si la causa de la menor intensidad de la respuesta regenerativa estriba en una disfunción hepatocitaria o en alteraciones sistémicas (v.gr.: proporción insulina/glucagón) —es decir, en una incapacidad de parte de la población hepatocitaria— entonces la mayor intensidad del estímulo no justificaría nuestros resultados.

De todas formas, cada vez hay más evidencias de la relación existente entre los linfocitos y la regeneración hepática²⁶⁻²⁸, por lo que no debe extrañar que la CsA modifique en algún sentido este fenómeno.

Bibliografía

1. Tokunaga Y, Zaima M, Tanaka K y cols.: Orthotopic partial liver transplantation in dogs can be performed without cold perfusion of the donor liver. *Eur Surg Res*, 1989, 21:137-144.
2. Kam I, Lynch S, Svanas G y cols.: Evidence that host size determines liver size: Studies in dogs receiving orthotopic liver transplants. *Hepatology*, 1987, 7(2):362-366.
3. García-Alonso I, López de Tejada I, Iturburu I y Méndez J: Modificaciones en la síntesis de DNA provocadas por la ciclosporina A sobre la regeneración hepática inducida quirúrgicamente. *Cir Esp*, 1988, 63(5):683-688.
4. Asakawa H, Jeppsson B, Mack P, Hultberg B, Hägerstrand I y Bengmark S: Acute ischemic liver failure in the rat: a reproducible model not requiring portal decompression. *Eur Surg Res*, 1989, 21:42-48.
5. Romani F, Vertemati M, Frangi M, Monti R, Codeghini A y Belli L: Effect of superoxide dismutase on liver ischemia-reperfusion injury in the rat: biochemical monitoring. *Eur Surg Res*, 1988, 20:335-340.

6. Wang WY, Taki Y, Morimoto T, Nishihira T, Yokoo N, Jikko A, Nishikawa K, Tanaka J, Kamiyama Y y Ozawa K: Effects of partial ischemia and reflow on mitochondrial metabolism in rat liver. *Eur Surg Res*, 1988, 20:181-189.
7. García-Alonso I, Ortiz J, Basáñez A, Portugal V y Méndez J: Cuantificación de lesiones en el síndrome de revascularización intestinal de la rata: método morfométrico. *Gastroenterol Hepatol* (en prensa).
8. Bucher NLR y Swaffield MN: The rate of incorporation of labeled thymidine into desoxyribonucleic acid of regenerating rat liver in relation to the amount of liver excised. *Cancer Res*, 1964, 24:1611-1625.
9. Kahn D, Hickman R, Terblanche J y Von Sommoggy ST: Partial hepatectomy and liver regeneration in pigs. The response to different resection sizes. *J Surg Res*, 1988, 45:176-180.
10. Zieve L y Anderson RW: Course of hepatic regeneration after 80-90 percent resection of normal rat liver. Comparison with 67-78 percent hepatectomy. *Gastroenterol*, 1985, 86 (5):1348.
11. Molina LM, De Diego JA, Simon P y cols.: Incorporación de timidina tritiada al DNA nuclear en el hígado de rata en regeneración. *Rev Esp Enf Ap Digest*, 1982, 62(4):273-278.
12. Barbiroli B y Potter Van R: DNA synthesis and interaction between controlled feeding schedules and partial hepatectomy in rats. *Science*, 1971, 172:738-741.
13. García-Alonso I, Méndez J y Barberá E: Cyclosporin A modifies liver regeneration following partial hepatectomy. *Sur Res Comm*, 1989, 6:43-49.
14. James J, Frederiks WM, Noorden CJF y Tas J: Detection of metabolic changes in hepatocytes by quantitative cytochemistry. *Histochemistry*, 1986, 84:308-316.
15. Noguchi M, Tanaka A, Taki I, Shimahara Y, Kamiyama Y y Ozawa K: Acute responses of blood ketone body ratio following devascularization and revascularization of rabbit liver. *Eur Sur Res*, 1987, 19:290-297.
16. O'Donohoe MK, Blake A, Waldrom RP, Dervan P y Fitzpatrick JM: Pathophysiological sequelae of hepatic artery ligation: an experimental study. *Eur Surg Res*, 1988, 20:330-334.
17. Francavilla A, Ove P, Polimeno L, Coetzee M, Makowka L, Barone M, Van Thiel DH y Starzl TE: Regulation of liver size and regeneration: importance in liver transplantation. *Transp Proc*, 1988, XX (1) Supl. 1:494-497.
18. Baker AL: Hepatotrophic factors: basic concepts and clinical implications. *Acta Med Scand*, 1986, 703:201-208.
19. Cruise JL, Knechtle SJ, Bollinger RR, Kuhn C y Michalopoulos G: Alpha-adrenergic effects and liver regeneration. *Hepatology*, 1987, 7 (6):1189-1194.
20. Rozga J, Jeppsson B y Bengmark S: The effect of pancreatic and intestinal venous blood on hepatic atrophy and compensatory hyperplasia in the rat. *Acta Physiol Pol*, 1988, 39 (5-6):460-474.
21. Alexander RW, Saydjari R, MacLellan DG, Townsend CM y Thompson JC: Calmodulin antagonist trifluoperazine inhibits polyamine biosynthesis and liver regeneration. *Br J Surg*, 1988, 75:1160-1162.
22. Mackenzie RJ, Furnival CM, O'Keane MAO y Blumgart LH: The effect of hepatic ischaemia on liver function and the restoration of liver mass after 70 percent partial hepatectomy in the dog. *Br J Surg*, 1975, 62:431-437.
23. Ortiz J, García-Alonso I, Basáñez A, López de Tejada I, Barberá E y Méndez J: Modificaciones lesionales en la revascularización intestinal experimental mediante inmunomodulación. *Cir Esp* (en prensa).
24. Ortiz J, García-Alonso I, Basáñez A, Apecechea A, Iturburu I y Méndez J: Afectos de la ciclosporina A, alopurinol y radiación corporal total sobre la isquemia aguda intestinal experimental. *Arch Fac Med*, Zaragoza, 1988, 28(3):178-179.
25. Yang IK, Salvini P, Auxilia F y Calne RY: Effect of CsA on hepatocyte proliferation after partial hepatectomy in rats: Comparison with standard immunosuppressive agents. *Am J Surg*, 1988, 155:245-249.
26. Sobotka L, Simek J, Dvorackova I y Nouza K: Influence of antithymocytic serum on the regenerating activity of the liver after partial hepatectomy in mice. *Czech Med*, 1980, 3 (4):271-279.
27. Yasuda K, Muranyi M y Lie TS: Immunological aspects of hepatic regeneration. *Eur Sur Res*, 1986, 18 (S1):105.
28. Lie TS, Preiainger HK, Yoshimura S y Hong GS: Suppressor cell activity in hepatic regeneration. *Eur Sur Res*, 1988, 20 (S1):167-168.