

Hospital de Basurto.
Laboratorio de Cirugía Experimental.
Departamento de Cirugía, Universidad del País Vasco.
Servicio de Cirugía General «B».

Estudio de la respuesta regenerativa de hepatocitos implantados en el bazo

García-Alonso, I.; Barceló, P.; Portugal, V.; Bilbao, J.; De Tejada, I. L., y Méndez, J.

SUMMARY

Regenerative activity of syngenic hepatocytes inoculated into the spleen has been assessed. Partial hepatectomy and cyclosporine were used as regenerative stimuli. Nuclear DNA has been quantified by means of a cytophotometric method, and the intensity of the response has been defined as the Mean Percentage of Regenerating Hepatocytes (MPRH). Both hepatectomy and cyclosporine (alone or associated) have significantly increased splenic MPRH.

KEY WORDS: Hepatocellular transplantation, regeneration, hepatocytes, cyclosporine.

García-Alonso, I.; Barceló, P.; Portugal, V.; Bilbao, J.; De Tejada, I. L., y Méndez, J. Regenerative response of hepatocytes inoculated into the spleen. *Rev Esp Enf Digest*, 1991, 80, 247-251.

RESUMEN

Se estudia la capacidad regenerativa de hepatocitos inoculados en el bazo de ratas singénicas. Como estímulos regenerativos se han utilizado la hepatectomía parcial y la ciclosporina A. La intensidad de la respuesta se ha valorado en función del porcentaje de hepatocitos con un contenido en DNA mayor que los controles. La hepatectomía parcial y la ciclosporina A (solas y asociadas) han aumentado significativamente el porcentaje de hepatocitos regenerantes en el bazo.

PALABRAS CLAVE: Trasplante hepatocelular, regeneración, hepatocito, ciclosporina A.

INTRODUCCION

El trasplante hepatocelular (THC) es una técnica quirúrgica experimental que ha despertado interés como posible alternativa o complemento al trasplante hepático ortotópico. Diversos estudios han comprobado que los hepatocitos

inoculados en el bazo sobreviven largo tiempo si se controla la reacción de rechazo (1). Igualmente se ha verificado que estas células conservan sus funciones metabólicas específicas a pesar de su ubicación ectópica (2-4).

Sin embargo, para que el THC pueda convertirse en una opción terapéutica falta por constatar si los hepatocitos afincados en el bazo son capaces de dividirse para compensar las pérdidas celulares por envejecimiento o agresiones, así como para adecuar su volumen a los requerimientos del organismo (crecimiento, pérdida de masa hepática ortotópica funcionante, etcétera). Una manera de estudiar este aspecto es valorar la respuesta de estos hepatocitos ante los estímulos regenerativos, siendo el objetivo específico del presente trabajo.

MATERIAL Y METODOS

Como donantes y como receptoras se han utilizado ratas singénicas hembras (FISHER, F344) de 200 g de peso. Todos los procedimientos quirúrgicos se han realizado bajo anestesia superficial con éter. El aislamiento de los hepatocitos se ha llevado a cabo mediante perfusión continua con colagenasa 0,05%, siguiendo el método descrito por SEGLEN (5). Para realizar los implantes se extrajo el bazo a través de una incisión subcostal inyectando a través de su polo inferior 1 cc de solución EMEM, conteniendo 22×10^6 hepatocitos viables. Con el fin de evitar hemorragias tras retirar la aguja se ligó el polo inferior del bazo, englobando en la ligadura un fragmento de malla de fibrina (espongostán). La hepatectomía parcial del 70% se ha practicado siguiendo el método de HIGGINS (6), veinticuatro horas después de la inoculación.

Se han considerado cuatro series experimentales de siete animales cada una. La primera utilizada como control, está formada por animales con implante esplénico de hepatocitos (THC). La segunda y la tercera series corresponden a animales con THC y sometidos a hepatectomía parcial del 70% o tratamiento con CsA, respectivamente. La CsA se ha administrado en dosis diarias de 20 mg/kg i.p., desde la víspera del THC. En la cuarta serie se han asociado los tres procedimientos: THC, hepatectomía y CsA. Todos los ani-

males se han sacrificado cuarenta y ocho horas después del implante, obteniéndose fragmentos de bazo que se fijaron en parafina. El DNA se ha cuantificado por microespectrofotometría en secciones histológicas de cinco micras, teñidas con Schiff (reacción de Feulgen-Rossenbeck). De esta manera se ha obtenido el contenido en DNA de cada núcleo agrupándose los resultados de cada serie en histogramas de frecuencias. Usando una modificación del método de BARTELS (7), se obtuvieron a partir de dichos histogramas una serie de curvas gaussianas que agrupan poblaciones celulares en función de sus niveles de ploidía. La primera curva corresponde a los hepatocitos 2C y las siguientes a los sucesivos niveles de ploidía. En los hígados regenerantes se observan hepatocitos en los niveles intermedios, así como un aumento de la poliploidía hepatocitaria. De esta manera se puede obtener el porcentaje de hepatocitos en regeneración (PHR).

El análisis estadístico de los resultados se ha llevado a cabo mediante un test no paramétrico (Rank Sum Test), aceptándose como significativas aquellas diferencias con una $p < 0,05$.

RESULTADOS

En cuanto al aislamiento de hepatocitos se ha obtenido una media de $248 \pm 56 \times 10^6$, con una viabilidad media del 94%. La cuantificación citofotométrica del DNA nuclear hepatocitario y de las células controles (linfocitos) ha proporcionado los resultados que se muestran en la tabla I.

El análisis de los niveles de ploidía en cada uno de los animales de las series experimentales (fig. 1) ha permitido calcular un porcentaje de hepatocitos en regeneración del 5,4% en los animales no tratados, un 37,4% para los sometidos a hepatectomía parcial, un 22,64% para los tratados con CsA y un 26,63% para aquellos sometidos al triple tratamiento. Estos valores del PHR en cada serie experimental pueden considerarse diferentes entre sí para una $p < 0,05$ (tabla II).

DISCUSION

Son muy numerosos los autores que consideran que los hepatocitos inoculados en el bazo constituyen un auténtico

hígado ectópico. Sin embargo, no existe acuerdo en torno a la capacidad de duplicación de estas células, siendo la proliferación de los hepatocitos trasplantados un tema controvertido hasta la fecha. Y así, mientras unos autores afirman que el número de hepatocitos tras el implante permanece estable (8), otros piensan que estas células son capaces de responder a los estímulos regenerativos de igual forma que lo hace un hepatocito normal (9). De ser esto así, supondría un mecanismo de regulación de la regeneración hepática distinto a lo conocido hasta el momento, al menos en algunos aspectos.

Si los hepatocitos afinados en el bazo siguieran siendo capaces de reproducirse, sería posible que su número aumentara tras el implante, adecuando así la masa hepática ectópica a las necesidades concretas del huésped. Esto prestaría una mayor utilidad al THC en las hepatopatías crónicas de progresión lenta, así como en la clínica pediátrica, evitando repetir periódicamente el THC para sustituir los hepatocitos envejecidos o para aumentar su número de acuerdo con el crecimiento ponderal del paciente.

Hasta hace pocos años los métodos más empleados para medir la actividad regenerativa del hígado eran el marcaje isotópico y el recuento de figuras mitóticas. Este último plantea serios inconvenientes, sobre todo si se tiene en cuenta que dentro del ciclo de división celular, el período de tiempo que corresponde a la mitosis apenas supera el 1%. Así, no es de extrañar que no se hayan descrito figuras mitóticas en los hepatocitos inoculados en el bazo. El marcaje con timidina tritiada u otros radioisótopos tampoco está exento de problemas. Por una parte, el DNA no es una molécula estática, estando sujeta a continuos procesos de reparación, existiendo, por tanto, una incorporación de timidina tritiada al núcleo celular. Pero, además, la timidina tritiada se une a ciertas proteínas celulares artefactando las mediciones de síntesis de DNA (10).

En los últimos años se ha concedido más valor a los métodos de cuantificación directa mediante citofotometría o citometría de flujo. Ambas técnicas se fundamentan en la cuantificación de una sustancia que reacciona estequiométricamente con el DNA. Además, ambas permiten seleccio-

TABLA I
Contenido nuclear medio en DNA de los hepatocitos (H) y células control (L) de cada serie experimental

	THC		HEPATEC.		CsA		HEP + CsA	
	H	L	H	L	H	L	H	L
1	14,68	6,35	12,05	4,77	12,54	7,88	10,63	4,32
2	13,77	6,32	14,16	5,60	9,82	5,27	12,91	5,62
3	15,42	6,39	15,62	7,40	9,91	3,89	8,87	3,58
4	11,87	6,35	10,35	4,38	10,34	3,75	10,96	3,99
5	—	—	—	—	2,76	—	10,26	4,40
6	—	—	10,73	6,23	2,96	—	8,59	4,05
7	—	—	15,37	5,43	8,58	3,52	6,15	2,94
Media	13,94	6,35	13,04	5,54	8,13	4,86	9,77	4,13
DS	1,53	0,03	2,32	1,34	3,79	1,82	2,14	0,82

	THC	HEP.	CsA	HEP+ CsA
1	8,89	48,06	11,47	18,96
2	3,64	41,99	26,12	29,60
3	4,54	28,90	7,70	38,96
4	4,82	30,81	16,36	35,47
5	—	—	7,23	17,56
6	—	35,23	27,29	23,94
7	—	39,65	62,34	21,90
Media	5,47	37,44	22,64	26,63
DS	2,33	7,21	19,30	8,26

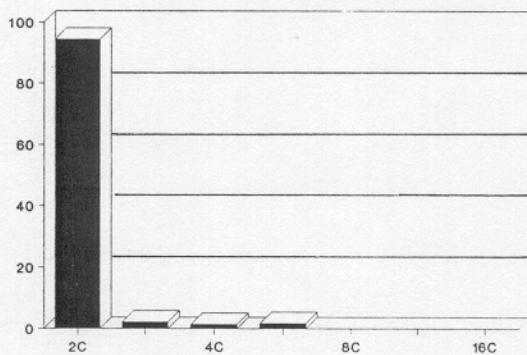
nar las células sobre las que se realiza la medida. En nuestro trabajo hemos optado por la citofotometría debido a que exige menos manipulaciones técnicas que la citometría de flujo. Sin embargo, esta técnica tampoco es una panacea, y presenta algunas dificultades, siendo las más importantes las derivadas de las variaciones en la intensidad de tinción. Las principales variables que afectan a este parámetro son: el tiempo de hidrólisis ácida, la temperatura de la misma, la antigüedad del reactivo de Schiff y el tiempo de tinción. En este trabajo se ha tenido especial precaución por minimizar estos riesgos. De todas formas estos inconvenientes han que-

dado solventados al utilizar la técnica de procesamiento de los datos descrita anteriormente (11). Así, en vez de comparar cifras absolutas de contenido en DNA, se han comparado porcentajes de células en los distintos niveles de ploidía de cada muestra, lo que ha permitido soslayar de una manera definitiva las diferencias producidas por el método de tinción.

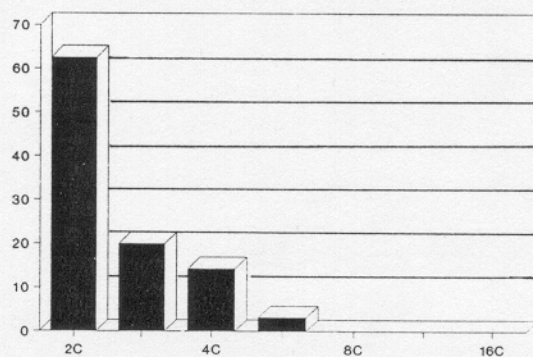
La elaboración de un correcto diseño experimental es fundamental para el estudio de la regeneración debido a las peculiaridades de este fenómeno. Los hepatocitos muestran el pico máximo de síntesis de DNA a las veinticuatro horas de producido el estímulo, retrasándose este pico hacia las cuarenta y ocho horas conforme menor sea el estímulo. Debido a esto, en las series que incluían una hepatectomía del 70% hemos realizado la medición de la regeneración a las veinticuatro horas de realizada ésta. El trasplante de hepatocitos se llevó a cabo veinticuatro horas antes de la hepatectomía para que pudieran adaptarse al nuevo microambiente, estando en condiciones de poder responder ante un estímulo regenerativo.

En este trabajo se ha podido comprobar que en el THC existe una mayor proporción de hepatocitos regenerantes ($5,4 \pm 2,3$) que en poblaciones hepatocitarias normales. Este hallazgo contrasta con las observaciones publicadas por otros autores en el sentido de que no existe regeneración en los hepatocitos trasplantados (8). De todas formas esta con-

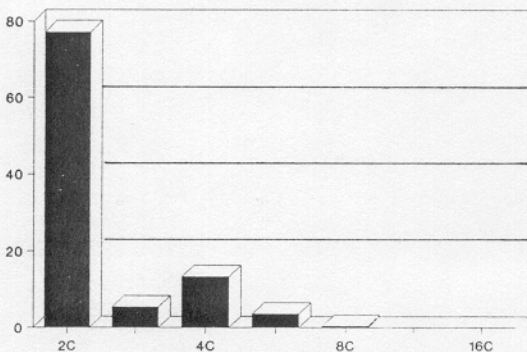
TRASPLANTE HEPATOCELULAR



THC + HEPATECTOMIA



THC + CICLOSPORINA A



THC + HEPATECTOMIA + CsA

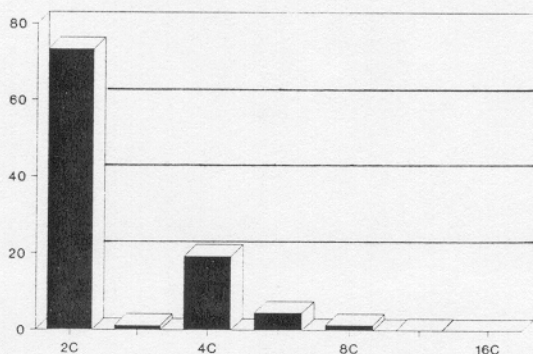


FIG. 1.—Distribución de la población hepatocitaria esplénica en función de sus niveles de ploidía.

tradicción no es sorprendente, pues hay que tener en cuenta que esas observaciones se limitaron a la búsqueda de figuras mitóticas, o, en algunos pocos casos, el marcaje con timidina tritiada. Estos métodos, si bien son eficaces en el estudio de una regeneración masiva como la que tiene lugar tras la hepatectomía parcial, no tienen una sensibilidad suficiente para un caso como el presente. Por otra parte, el momento elegido por estos autores para realizar sus observaciones tampoco era el más adecuado, pues lo hacían días o semanas después del THC. Únicamente VROEMEN y cols. (9) utilizando la bromodeoxiuridina tritiada como marcador radiativo, han observado una cierta actividad regenerativa basal en los hepatocitos inoculados. Estos autores encuentran de manera constante a lo largo de dos meses tras el THC un 3% de células marcadas. En cambio, NORDLINGER y cols. (12), utilizando timidina tritiada, tan sólo han podido encontrar leves indicios (1-2%) entre el tercer y séptimo día, desapareciendo posteriormente toda traza de síntesis de DNA en el bazo.

Respecto a las series de animales tratados mediante hepatectomía, NORDLINGER y cols. (13) han observado que la proporción de hepatocitos marcados aumenta en el bazo de animales hepatectomizados. Sin embargo, este aumento es mínimo (3,67%) y no se manifiesta hasta el tercer día. Probablemente estos autores han obtenido resultados tan pobres por realizar simultáneamente el THC y la hepatectomía. Los hepatocitos, como toda célula, requieren un cierto tiempo para adaptar sus sistemas metabólicos al nuevo ambiente. Al producir el estímulo regenerativo en esos primeros momentos, los hepatocitos no están en condiciones de responder a la señal. En cambio, VROEMEN y cols. (9) que practicaron la hepatectomía en animales con un THC de doce a veinticuatro semanas de evolución, obtuvieron una respuesta regenerativa mayor (11% al segundo día). Además, el perfil de esta respuesta se ajusta al habitual, con un rápido descenso en el tercer y cuarto días.

La menor actividad regenerativa registrada por estos autores (11% vs. 37% en nuestras series) tiene dos explicaciones lógicas. En primer lugar, que ellos obtienen su primer registro a las cuarenta y ocho horas, con lo que podrían perder el pico máximo que suele observarse a las veinticuatro horas. Otra explicación podría hallarse en las diferencias en el método de cuantificación utilizado.

Con respecto a la serie de THC tratado con CsA, observamos cómo los hepatocitos trasplantados responden al estímulo regenerativo que supone la administración de CsA. Esto concuerda con lo referido por otros autores en torno a los efectos de la CsA sobre la regeneración de los hepatocitos de un hígado normal (14-17), sometidos a hepatectomía del 40% (14-16, 18, 19), o tras isquemia caliente (11), en los que la CsA indujo la entrada en fase de síntesis de un elevado porcentaje de hepatocitos. Por último, la hepatectomía parcial practicada en animales trasplantados y tratados con CsA no ha logrado aumentar significativamente el PHR. Con los conocimientos actuales acerca de los mecanismos que controlan la regeneración hepatocitaria no es posible justificar los resultados obtenidos. Incluso hay que tener en cuenta que la asociación de ambos estímulos en animales normales potencia la respuesta regenerativa (14, 15).

De hecho si la CsA actuara a través del mismo mecanismo que la hepatectomía parcial, debiera de potenciar la actividad regenerativa, ya que está establecido que a mayor intensidad del estímulo mayor respuesta (20), lo que no ocurre en nuestro caso. Sería conveniente estudiar simultáneamente la regeneración hepatocitaria en hígado y bazo para comprobar si esta respuesta atípica observada en el bazo ocurre también en el hígado.

AGRADECIMIENTOS

La ciclosporina A ha sido gentilmente suministrada por Laboratorios Sandoz. Este trabajo ha sido financiado con cargo al Proyecto 327.05-28/86 de la UPV/EHU.

Correspondencia:

Ignacio García-Alonso.
Laboratorio de Cirugía Experimental.
Facultad de Medicina y Odontología.
48940 Lejona (Vizcaya).

BIBLIOGRAFIA

1. Kusano M y Mito M. Observations of the fine structure of long-survived isolated hepatocytes inoculated into rat spleen. *Gastroenterology* 1982; 82: 616-628.
2. Nieto JA, Cantón T, Cao G, Muñoz G, De la Morena L, González-Quintela A y Cuervas-Mons V. Efecto de las dosis de hepatocitos trasplantados en la reducción de los niveles de bilirrubina en ratas deficitarias de UDP-glucuroniltransferasa. *Gastroenterología y Hepatología* 1988; 11 (5): 224.
3. Woods RJ, Fuller BJ, Attenburrow VD, Nutt LH y Hobbs KEF. Functional assessment of hepatocytes after transplantation into rat spleen. *Transplantation* 1982, 33 (2): 123-126.
4. Eroles G, Maganto P, Cienfuegos JA, Castillo-Olivares JL y Segovia JM. Successful liver cell transplantation in an experimental model of cirrhosis. *Transplant Proc* 1988; 20 (1), supl. 1: 703-705.
5. Seglen PO. Preparation of rat liver cells. III. Enzymatic requirements for tissue dispersion. *Exp Cell Res* 1973; 82: 391-398.
6. Higgins GM y Anderson RM. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Path* 1931; 12: 186-202.
7. Bartels PH. Numerical evaluation of cytologic data. I. Description of profiles. *Analytical Quantitative Cytology* 1979; 4: 20-28.
8. Cuervas-Mons V, Cienfuegos JA, Maganto P, Rodríguez V, Eroles G, Pinedo I, Santamaría L, Ramos J, Ortiz JL, Castillo-Olivares JL y Segovia JM. Long-term evaluation of isolated syngenic hepatocytes transplanted into the normal rat spleen by tc-99m-hida scintigraphy. *Transplantation* 1985; 39 (1): 87-89.
9. Vroemen JPAM, Buurman WA, Schutte B, Maessen JG, Van Der Linden CJ y Kootstra G. The cytokinetic behavior of donor hepatocytes after syngenic hepatocyte transplantation into the spleen. *Transplantation* 1988; 45 (3): 600-607.
10. Morley CGD y Kingdon HS. Use of 3H-thymidine for measurement of DNA synthesis in rat liver: a warning. *Analytical Biochem* 1972; 45: 298-305.
11. García-Alonso I, Portugal V, Iturburu I, López de Tejada I y Méndez J. Modifications induced by cyclosporine A on ischemic liver regeneration. *Surg Res Comm* 1990; 9: 227-233.

12. Nordlinger B, Wang SR, Bouma ME, Verthier N, Hillan K, Delelo R e Infante R. Can hepatocytes regenerate when transplanted in the spleen? *Eur Sur Res* 1986, 18 (S1): 104.
13. Nordlinger B, Wang SR, Bouma ME, Verthier N, Hillan K, Delelo R e Infante R. Can hepatocytes proliferate when transplanted into the spleen? *Eur Sur Res* 1987; 19: 381-387.
14. García-Alonso I, Méndez JJ, Barbera E. Cyclosporin modifies liver regeneration following partial hepatectomy. *Sur Res Comm* 1989; 6: 43-49.
15. García-Alonso I, Méndez JJ y Barbera E. Changes in succinate dehydrogenase zonation following cyclosporin-treatment in normal and regenerating rat liver. *Cell Mol Biol* 1988; 34 (6): 605-614.
16. Yang I, Kim YL, Salvini P, Auxilia F y Calne RY. Effect of CsA on hepatocyte proliferation after partial hepatectomy in rats: Comparison with standar immunosuppressive agents. *Am J Surg* 1988; 155: 245-249.
17. Mazzaferro V, Porter KA, Scotti-Foglieni CL, Venkataraman R, Makowka L, Rossaro L, Francavilla A, Todo S, Van Thiel y Starlz TE. The hepatotrophic influence of cyclosporine. *Surgery* 1900; 107 (5): 533-539.
18. Makowka L, Esquivel C, Todo S, Van Thiel D y Starlz TE. Effect of cyclosporin on hepatic regeneration. *Surg Forum* 1986; 37: 352-354.
19. Kahn D, Lai HS, Romovacek H, Makowka L, Van Thiel D, Starlz TE. Cyclosporin A augments the regenerative response after partial hepatectomy in the rat. *Transplant Proc* 1988; 10 (S3): 850-852.
20. Kahn D, Hichman R, Terblanche J y Sommoggy Von ST. Partial hepatectomy and liver regeneration in pigs-The response to different resection sizes. *J Surg Res* 1988; 45: 176-180.