

Efectos del trasplante hepatocelular intraesplénico sobre la actividad regenerativa del hígado

I. García-Alonso*, P. Barceló**, I. López de Tejada*, V. Portugal***, J. Bilbao**** y J. Méndez*****

* Profesor Titular. ** Investigador colaborador. *** MIR. **** Médico Adjunto. ***** Catedrático.

Servicio de Cirugía General "B" (Dr. J. Méndez Martín). Laboratorio de Cirugía Experimental. Universidad del País Vasco.

Resumen

El objetivo de este trabajo consiste en valorar la influencia que la inoculación de hepatocitos en el bazo pudiera tener sobre la actividad regenerativa del hígado. Para ello, se ha sometido a un hígado normal a estímulos regenerativos mediante hepatectomía parcial y/o ciclosporina A, y se ha comparado la regeneración hepática con la que se produce en animales sometidos a los mismos estímulos regenerativos, pero en los que previamente se ha realizado un trasplante hepatocelular en bazo. La intensidad de la respuesta se ha valorado en función del porcentaje de hepatocitos con un contenido de ADN mayor que los controles. El trasplante hepatocelular ha aumentado la actividad regenerativa basal del hígado, pero ha disminuido su respuesta a la hepatectomía parcial. En los animales sometidos a trasplante hepatocelular la ciclosporina A ha inducido una respuesta regenerativa importante pero que no se ha visto potenciada por la asociación de hepatectomía parcial.

Palabras clave: *Regeneración hepática. Trasplante hepatocelular. Ciclosporina A. Rata.*

Introducción

Es conocida la competencia que se establece entre el hígado del huésped y el auxiliar en trasplantes heterotópicos, lo que termina condicionando la atrofia del injerto^{1,2}. Por otra parte, el implante de células hepáticas aisladas en el interior del bazo ha resultado beneficioso para superar episodios de fracaso hepático agudo (FHA)³. En un primer momento, se sugirió la posibilidad

Correspondencia: Dr. I. García-Alonso.
Laboratorio de Cirugía Experimental.
Facultad de Medicina. 48940 Lejona.

Aceptado para su publicación el 12 de enero de 1992.

EFFECTS OF INTRASPLENIC HEPATOCELLULAR TRANSPLANTATION ON THE REGENERATIVE ACTIVITY OF THE LIVER

The aim of this study was to evaluate the influence which hepatocyte inoculation in the spleen may have on the regenerative activity of the liver. A normal liver was submitted to regenerative stimulation by means of partial hepatectomy and/or cyclosporine A and the hepatic regeneration was compared to that produced in animals which had previously received hepatocellular transplantation in spleen submitted to the same regenerative stimulation. The intensity of response was evaluated with regard to the percentage of hepatocytes with DNA content greater than the controls. Hepatocellular transplantation increased the basal regenerative activity of the liver but diminished their response to the partial hepatectomy. In the animals submitted to hepatocellular transplantation cyclosporine A induced an important regenerative response which was not seen to be augmented by the association of partial hepatectomy.

Key words: *Hepatic regeneration. Hepatocellular transplantation. Cyclosporine A. Rats.*

de que el efecto beneficioso del implante pueda deberse a una potenciación de la capacidad del hígado para regenerar, más que a una verdadera suplencia funcional^{4,5}. Sin embargo, los estudios sobre la funcionalidad de los hepatocitos implantados⁶⁻⁹ llevaron a aceptar su papel de suplentes, por lo que se desecharon otras hipótesis sin que hubiese evidencias experimentales en las que fundamentar dicho abandono. La indicación más barajada para el trasplante hepatocelular son las enzimopatías congénitas, en las que una pequeña masa de hepatocitos foráneos puede compensar el déficit de los nativos¹⁰. Pero también se ha contemplado la posibilidad de utilizar el THC para descargar temporalmente al hígado de su actividad metabólica¹¹, favoreciendo de este modo su recuperación por la vía de la regeneración hepatocitaria.

El objetivo de este estudio es valorar la influencia del THC sobre la actividad regenerativa del hígado.

Material y métodos

Como donantes y 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 al 0,05 % siguiendo el método descrito por Seglen¹², valorándose su viabilidad mediante el test de exclusión con azul tripán. Para realizar los implantes se extrajo el bazo a través de una incisión subcostal, inyectando a través de su polo inferior 1 ml de solución EMEM que contenía 22×10^6 hepatocitos viables. En los dos primeros grupos de animales, utilizados como controles del THC y de la hepatectomía, respectivamente, se simuló la operación inyectando sólo medio de cultivo EMEM sin células. La hepatectomía parcial del 70 % se ha practicado siguiendo el método de Higgins¹³, 24 horas después de la inoculación.

Se han considerado seis series experimentales de 7 animales cada una. La primera, utilizada como control del THC, estaba formada por animales en los que se inoculó medio EMEM en el bazo. La segunda serie correspondía a animales con inoculación del medio EMEM a los que se sometió 24 horas después a una hepatectomía del 70 %. La tercera serie correspondía a animales con THC. La cuarta y quinta series correspondían a animales con THC sometidos a hepatectomía parcial del 70 % o tratamiento con ciclosporina A (CsA), respectivamente. La CsA se ha administrado en dosis diarias de 20 mg/kg i.p. desde la víspera del THC. En la sexta serie se asociaron los tres procedimientos: THC, hepatectomía y CsA. Todos los animales se han sacrificado 48 horas después de la inoculación esplénica, obteniéndose fragmentos de hígado que se incluyeron en parafina. El ADN se ha cuantificado por microespectrofotometría en secciones histológicas de 5 μ , teñidas con Schiff (reacción de Feulgen-Rossenbeck). De esta manera se ha obtenido el contenido en ADN de cada núcleo, agrupándose los resultados de cada serie en histogramas de frecuencia. Usando una modificación del método de Bartels¹⁴, y a partir de dichos histogramas, se obtuvieron una serie de curvas gaussianas que agruparon poblaciones celulares en función de sus distintos 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 podemos obtener el porcentaje de hepatocitos regenerantes (PHR).

El análisis estadístico de los resultados se ha realizado con un test no paramétrico (test de la suma de rangos), aceptándose como significativas las diferencias con una $p < 0,05$.

Resultados

En cuanto al aislamiento de hepatocitos, la técnica utilizada ha permitido obtener de cada animal una media de $248 \pm 56 \times 10^6$ células, con una viabilidad media del 94 %.

Tras la cuantificación citofotométrica del ADN nuclear de 100 hepatocitos de hígado de cada animal, se ha calculado el contenido medio de los mismos (los resultados se detallan en la tabla 1). El análisis estadístico realizado con el test de Kruskal-Wallis demuestra la existencia de diferencias significativas entre las series experimentales en su conjunto ($p < 0,001$). Sin embargo, no es prudente aventurar mediante dicho test que los tratamientos ensayados modifiquen el contenido en ADN de las células hepáticas, ya que la cifofotometría sólo permite comparar las mediciones realizadas dentro de una misma preparación histológica.

En cambio, el análisis de los niveles de ploidía en cada uno de los animales de las series experimentales (fig. 1) permite obtener un parámetro útil para hacer realizar comparaciones entre muestras histológicas diferentes. En la tabla 2 se detalla el porcentaje de hepatocitos con un contenido en ADN superior a 2C. Así, el grupo control de animales sometidos a la inoculación del medio de suspensión de los hepatocitos, el PHR ha sido del 1,04 %. En los animales en los que se asoció una hepatectomía parcial a la inoculación de EMEM, este índice alcanzó un valor máximo de 61,27 % ($p < 0,001$ frente a cada una de las otras cinco series experimentales). La inoculación de hepatocitos en el bazo ha dado lugar a que el PHR se eleve hasta 7,34 % ($p < 0,005$). Las otras tres series de animales sometidos a inoculación de hepatocitos en bazo han experimentado un incremento todavía mayor de su PHR (hepatectomía: 33,91 %, CsA: 20,8 %, hepatectomía+CsA: 29,78 %); ahora bien, este aumento sólo ha alcanzado significación estadística en la primera y tercera series ($p < 0,005$), mientras que en el caso de los animales tratados con CsA el test de la suma de rangos ha proporcionado una $p = 0,0504$.

Por último, ninguna de las dos series experimentales en las que se asoció inoculación esplénica de hepatocitos con una hepatectomía parcial alcanzó valores similares a los de la serie de hepatectomía más inoculación de medio EMEM ($p < 0,005$).

Discusión

Son muchos los autores que ven en la capacidad de suplencia de los hepatocitos implantados en el bazo un futuro tratamiento para enzimopatías congénitas^{6, 15-17}, hepatopatías crónicas^{9, 18},

TABLA 1. Contenido nuclear medio en ADN de los hepatocitos de cada serie experimental

Ratas	Inoculación medio		Inoculación hepatocitos			
	Sin tratamiento	Hepatectomía 70 %	Sin tratamiento	Hepatectomía 70 %	CsA	CsA+Hepatectomía 70 %
1	11,12	15,8	14,49	15,67	18,46	12,40
2	12,53	15,19	19,51	18,94	19,73	13,80
3	10,60	15,77	18,29	17,18	18,93	7,98
4	12,88	15,43	14,63	9,39	13,58	11,29
5	9,41	15,72	14,44	11,73	12,01	12,42
6	10,06	16,88	18,60	10,64	16,61	10,57
7	11,66	14,86	13,94	18,51	14,13	9,32
Media	11,18	15,66	16,27	14,57	16,21	11,11
DE	1,26	0,63	2,40	3,93	2,99	1,99

así como en situaciones agudas en las que se precisa un soporte temporal urgente mientras el hígado se recupera o puede practicarse un trasplante. Las primeras observaciones en este sentido se realizaron en modelos de fracaso hepático agudo (FHA) inducido de forma química. La disminución observada en la mortalidad tras el THC fue atribuida inicialmente al efecto detoxificante del implante, sin que se aceptara una auténtica capacidad de soporte para los hepatocitos ectópicos. Con el fin de probar esta hipótesis se desecharon los modelos de FHA inducido tóxicamente (D-galactosamina^{19,20}, dimetilnitrosourea³, etc.), y se repitieron las experiencias en modelos quirúrgicos de FHA²¹⁻²⁵, confirmando el efecto beneficioso del THC en situaciones de insuficiencia hepática aguda. Las primeras explicaciones tomaron en consideración dos posibilidades: inducción de la regeneración hepática o suplencia funcional. Los estudios posteriores, diseñados para valorar de forma directa la actividad funcional de estos implantes de hepatocitos, confirmaron que estas células, a pesar de su localización ectópica, conservan sus actividades hepatospecíficas.

Sin poner en duda la funcionalidad de los hepatocitos implantados en otro órgano, creemos que es necesario estudiar el efecto que pudiera tener el THC sobre la regeneración del hígado autóctono. Es importante saber si se establece una competitividad, como ocurre en el trasplante hepático heterotópico, o si por el contrario, el THC estimula la regeneración, acelerando la recuperación del hígado nativo.

En nuestra experiencia, los hígados de animales inoculados con medio de cultivo acelular, mostraron tan sólo un 1,05 % de hepatocitos en regeneración; cifra que se corresponde perfectamente con un hígado joven que se encuentra en crecimiento. Con respecto a la hepatectomía practicada en estos mismos animales, se observa una respuesta típica, con algo más del 60 % de la población hepatocitaria en regeneración. Por tanto, parece permitido concluir que la inoculación del medio de cultivo no ejerce influencias en el proceso de regeneración, por lo que las diferencias encontradas tras el THC se deberán a los hepatocitos inoculados y no al vehículo utilizado para su implante.

En efecto, la primera observación que llama la atención en la tercera serie es la presencia de un 7,35 % de hepatocitos regenerantes en el hígado tras el THC. Este hecho nos hace pensar que la alteración del equilibrio masa parenquimal/tamaño corporal²⁶ no sería el único mecanismo de control de la regeneración, como se ha postulado, ya que en nuestro caso, el aumento de masa hepática se sigue de una respuesta regenerativa, lo que concuerda con lo sugerido por algunos autores acerca del papel estimulador de las fracciones citosólicas hepatocitarias en la regeneración hepática²⁷. Sería ese pequeño porcentaje de hepatocitos no viables presentes en nuestras suspensiones el responsable de este efecto. Aunque también podría pensarse que en el proceso del aislamiento o inoculación se producen roturas de hepatocitos cuyos elementos disgregados penetran en el bazo, estimulando así la regeneración. En cualquier caso, ésta es una cuestión todavía no explicada con claridad.

Si observamos el efecto provocado por la hepatectomía parcial en animales sometidos a THC (cuarta serie), parece —en un principio— que los resultados concuerdan con lo esperado: un claro aumento de la actividad regenerativa hepatocitaria que multiplica por cinco el porcentaje de hepatocitos en regeneración (34 % de PHR). El problema surge al compararlo con los animales hepatectomizados sin THC, cuyo porcentaje de hepatocitos regenerantes casi duplica al de los animales trasplantados. A primera vista esto resulta extraño, pues al sumar dos

estímulos cabría esperar un aumento en vez de una disminución en la intensidad de la respuesta. La explicación a este fenómeno podría encontrarse en el hecho de que los hepatocitos inoculados en el bazo constituyen un hígado ectópico funcionante que aumentaría de esta forma la masa hepática total. O lo que es lo mismo, rebajaría el porcentaje de masa hepática eliminado en la hepatectomía. Sin embargo, esta explicación —en principio atractiva— se topa con un problema numérico: sobre el total estimado de hepatocitos contenidos en el hígado (aproximadamente unos 800×10^6) los 22×10^6 inoculados no llegan a suponer un 3 %. Por tanto, podríamos decir que el THC tan sólo ha supuesto bajar del 70 al 67 % en la hepatectomía parcial, cifra que en principio no justifica una disminución del 50 % en la respuesta. Otra posible explicación de la cuestión que nos ocupa se podría encontrar en el hecho conocido de que la velocidad de la regeneración guarda proporción con la amplitud de la hepatectomía²⁸. La disminución en la amplitud de la hepatectomía no sólo disminuiría ligeramente el porcentaje de hepatocitos que han de regenerar, sino que también retrasaría el momento en que se observa el pico de máxima síntesis de ADN. Así, al no haber modificado el momento de estudio (24 horas después de la hepatectomía), se observaría una respuesta disminuida.

La administración de CsA en animales con THC (quinta serie), ha triplicado el porcentaje de hepatocitos en regeneración, lo que coincide con las observaciones ya publicadas sobre el efecto regenerativo de la CsA en animales no trasplantados²⁸⁻³², así como en hígados sometidos a isquemia caliente³³. El problema se plantea en la asociación de la CsA y hepatectomía parcial en animales trasplantados (sexta serie). En los trabajos referidos con anterioridad, la CsA potenció la respuesta regenerativa del hígado hepatectomizado, mientras que en el presente la CsA no ha modificado los resultados obtenidos tras hepatectomía ($p > 0,05$). Es difícil discutir estos resultados, ya que todavía se desconoce el mecanismo de acción a través del cual la CsA interviene en la regeneración hepática. De todas formas, la potenciación de la regeneración hepática tras hepatectomía por parte de la CsA se ha establecido en un modelo de hepatectomía parcial del 40 %, mientras que en este caso se trata del 70 %. Se podría pensar que la suma de efectos observada en aquel modelo queda enmascarada o anulada al aumentar de forma notable la intensidad de uno de los estímulos (hepatectomía del 70 %). En cualquier caso, lo que puede afirmarse es que el perfil de respuesta a los estímulos regenerativos en el hígado de animales sometidos a THC se mantiene dentro de los límites de lo normal, aunque con una intensidad disminuida. Y para explicar esta disminución deberán diseñarse nuevos estudios. Entre tanto, la cuestión planteada al inicio permanece abierta, ya que el THC mejora la regeneración en animales normales y la disminuye en hepatectomizados.

Bibliografía

1. Starzi TE, Marchioro TL, Huntley RT et al. Experimental and clinical homotransplantation of the liver. *Ann NY Acad Sci* 1964; 120:739-745.
2. Fotner JG, Yeh S, Kim D, Shiu MH, Kinne DW. The case for and the technique for heterotopic liver grafting. *Transplant Proc* 1979; 11:269-275.
3. Sutherland DER, Numata M, Matas AJ, Simmons RL, Najarian JS. Hepatocellular transplantation in acute liver failure. *Surgery* 1977; 81:124-132.

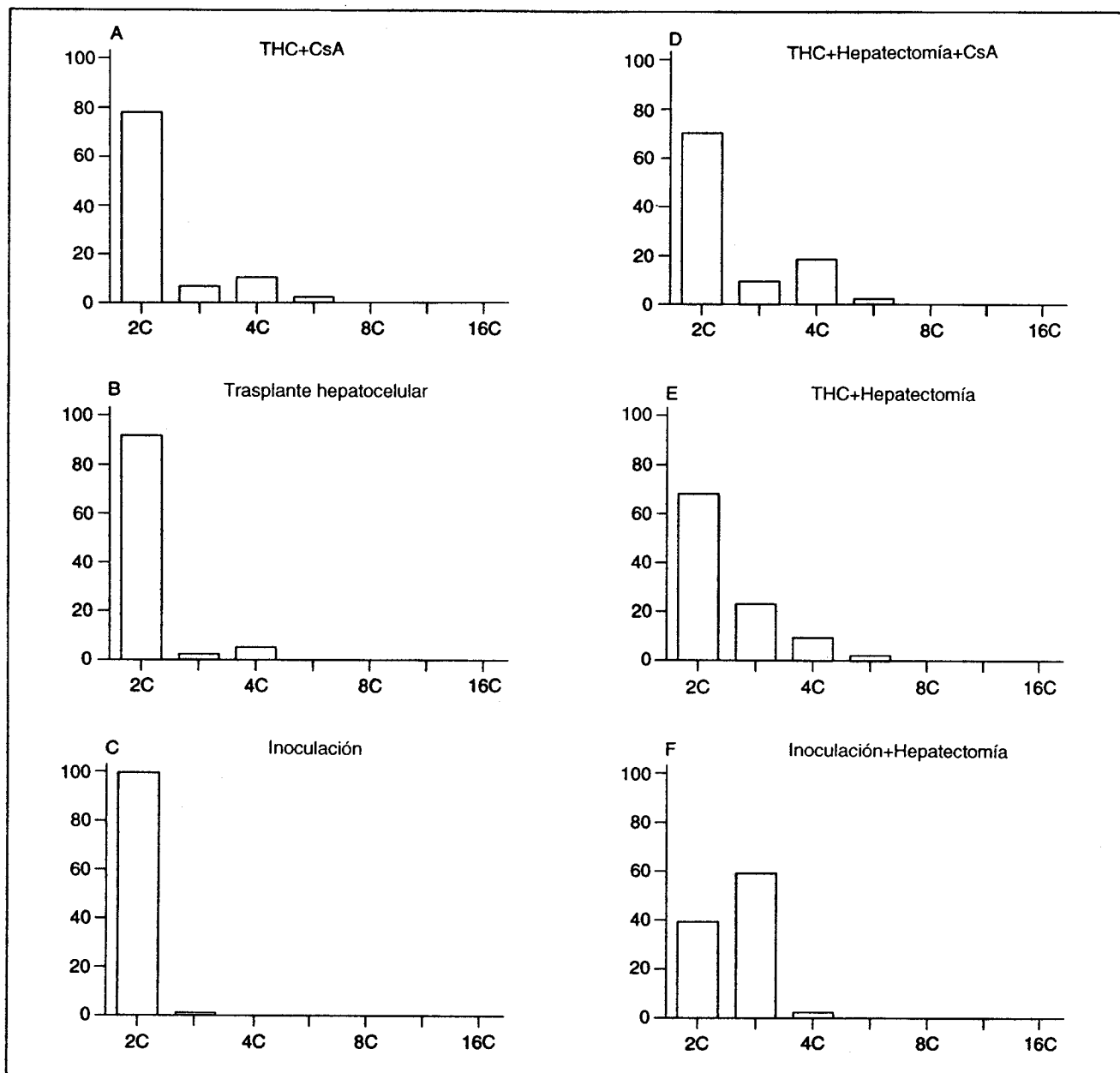


Fig. 1. Distribución de la población hepatocitaria hepática en función de sus niveles de ploidía en cada una de las series experimentales. En el eje horizontal se representan los diferentes niveles de ploidía (niveles euploides -2C, 4C, 8C, 16C- y niveles intermedios). En el eje vertical se expresa el porcentaje de células.

TABLA 2. Porcentaje de hepatocitos en regeneración en cada una de las series experimentales

Ratas	Inoculación medio		Inoculación hepatocitos			
	Sin tratamiento	Hepatectomía 70 %	Sin tratamiento	Hepatectomía 70 %	CsA	CsA+Hepatectomía 70 %
1	1,86	58,32	2,87	35,24	32,34	24,67
2	-	57,45	8,77	20,63	27,83	31,75
3	-	62,06	13,44	36,34	26,86	14,25
4	-	53,61	1,97	32,84	2,57	38,24
5	5,02	62,70	9,61	44,51	13,82	40,19
6	0,44	67,11	7,00	28,30	37,94	27,51
7	-	67,70	7,77	39,56	4,27	31,87
Media	1,04	61,27	7,34	33,91	20,80	29,78
DE	1,87	5,16	3,94	7,75	13,94	8,76

4. Makowka L, Falk RE, Rotstein LE et al. Reversal of experimental acute hepatic failure in the rat. *J Surg Res* 1980; 29:479-487.
5. Cienfuegos JA, Maganto P, Eroles G et al. Nuevas perspectivas de soporte metabólico en fallo hepático: trasplante de hepatocitos criopreservados. Congreso de la SEIQ. Santander, 1986.
6. Vroemen JPAM, Balnckaert N, Buurman WA, Kooststra G, Heirwegh KPM. Treatment of enzyme deficiency by hepatocellular transplantation. *Eur Sur Res* 1983;15:26-27.
7. Woods RJ, Fuller BJ, Attenburrow VD, Nutt LH, Hobbs KEF. Functional assessment of hepatocytes after transplantation into rat spleen. *Transplantation* 1982; 33:123-126.
8. Maganto PA, Cienfuegos J, Santamaria L et al. Auxiliary liver transplanted frozen-thawed hepatocytes. *J Surg Res* 1990; 48:24-32.
9. Eroles G, Maganto P, Cienfuegos JA et al. Eficacia del trasplante hepatocelular en un modelo experimental de cirrosis. *Cir Esp* 1985; 39:689-699.
10. Schulze C, Keller H. Metabolic activity of liver cells after intraperitoneal transplantation during severe liver insufficiency in the rat. *Eur Surg Res* 1991; 23:417.
11. Bumgardner GL, Fasola C, Sutherland DER. Prospects for hepatocyte transplantation. *Hepatology* 1988; 8:1.158-1.161.
12. Seglen PO. Preparation of rat liver cells. III. Enzymatic requirements for tissue dispersion. *Exp Cell Res* 1973; 82:391-398.
13. Higgins GM, Anderson RM. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Path* 1931; 12:186-202.
14. Bartels PH. Numerical evaluation of cytologic data. I. Description of profiles. *Anal Cytology* 1979; 4:20-28.
15. Matas AJ, Sutherland DER, Steffes MW et al. Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: Decrease of plasma bilirubin in Gunn rats. *Science* 1976; 192:892-894.
16. Groth CG, Arborgh B, Bjorken C et al. Correction of hyperbilirubinemia in the glucuronyltransferase-deficient rat by intraportal hepatocyte transplantation. *Transplant Proc* 1977; 9:313-316.
17. Mocioni AD, Roy-Chowdhury J, Barbour R et al. Human liver cell transplantation. Prolonged function in athymic-gunn and athymic-analbuminemic hybrid rats. *Gastroenterology* 1989; 96:1.546-1.551.
18. Eroles G, Maganto P, Cienfuegos JA, Castillo-Olivares JL, Segovia JM. Successful liver cell transplantation in an experimental model of cirrhosis. *Transpl Proc* 1988; 20 (supl. 1):703-705.
19. Makowka L, Falk RE, Rotstein LE et al. Reversal of experimental acute hepatic failure in the rat. *J Surg Res* 1980; 29:479-487.
20. Kajahn PT, Grundmann R. Treatment of galactosamine induced acute hepatic failure by transplantation of hepatocytes. *Eur Surg Res* 1983; 15:25-26.
21. Minato M, Houssin D, Demma I et al. Transplantation of hepatocytes for treatment of surgically induced acute hepatic failure in rat. *Eur Surg Res* 1984; 16:162-169.
22. Cuevas-Mons V, Cienfuegos JA, Maganto P et al. Time-related efficacy of liver cells isografts in fulminant hepatic failure. *Transplantation* 1984; 38:23-25.
23. Demma I, Houssin D, Capron M et al. Therapeutic efficacy of transplantation of isolated hepatocytes in rats surgically induced acute hepatic failure: A study of the mechanisms. *Eur Surg Res* 1986; 18:12-18.
24. Asano T, Enomoto K, Ohtsuka M et al. Beneficial effects of transplantation of liver tissue fragments on acute ischemic liver injury dogs. *Transpl Proc* 1987; 19:995-997.
25. Sommer BG, Sutherland QER, Simmons RL, Najarian JS. Hepatocellular transplantation for experimental ischemic acute liver failure in dogs. *J Surg Res* 1980; 29:319-325.
26. Francavilla A, Ove P, Polimeno L et al. Regulation of liver size after regeneration: Importance in liver transplantation. *Transpl Proc* 1988; 20 (supl. 1):494-497.
27. Makowka L, Falk RE, Rotstein LE et al. Cellular transplantation in the treatment of experimental hepatic failure. *Science* 1980; 210:901-903.
28. García-Alonso I. Efectos de la ciclosporina sobre el funcionamiento hepático y su capacidad regenerativa. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco. Lejona, 1986.
29. García-Alonso I, Méndez JJ, Barberá E. Cyclosporin modifies liver regeneration following partial hepatectomy. *Surg Res Comm* 1988; 6:43-49.
30. García-Alonso I, Méndez JJ, Barberá E. Changes in succinate dehydrogenase zonation following cyclosporin-treatment in normal regenerating rat liver. *Cell Mol Biol* 1988; 34:605-614.
31. Yang I, Kim YL, Salvini P, Auxilia F, 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.
32. Mazzaferro V, Porter KA, Scotti-Foglieni CL et al. The hepato-protective influence of cyclosporine. *Surgery* 1990; 107:533-539.
33. García-Alonso I, Portugal V, Ortiz J, Barceló P, Iturburu I, Méndez J. Hepatic regeneration in ischemic liver: Effect of cyclosporin. *Eur Surg Res* 1990; 22 (supl. 1):74.