

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

Estudio de la acción hepatotrófica de la ciclosporina A en un modelo de isquemia hepática en la rata

Portugal, V.; García-Alonso, I.; Bilbao, J.; Barceló, P.; Múgica, P., y Méndez, J.

SUMMARY

Liver ischemia is a common surgical situation. In this study the effect of 15 minutes of warm ischemia on liver regeneration in the rat is assessed. From hepatocytic DNA content (cytophotometrically measured), the Percentage of Regenerating Hepatocytes (PRH) and the Regenerative Gradient (RG) are calculated in normal livers and following different regenerative stimuli: partial hepatectomy (70%) and cyclosporine (20 mg/kg i.p.). In resting livers (both controls and CsA-treated) the PRH and the RG were not modified by ischemia. However, liver regeneration following partial hepatectomy was significantly decreased by ischemia. In the other hand, CsA has increased the PRH and the RG in the four situations analyzed: resting and regenerating liver, both normoperfused or following 15 minutes liver ischemia. It is concluded that the hepatotrophic effect of CsA is not nullified by warm liver ischemia.

KEY WORDS: Hepatic regeneration, liver, ischemia, cyclosporine, DNA.

Portugal, V.; García-Alonso, I.; Bilbao, J.; Barceló, P.; Múgica, P., y Méndez, J. Hepatotrophic effect of cyclosporin A on ischemic rat liver. *Rev Esp Enf Digest*, 1993, 83, 255-259.

RESUMEN

La isquemia hepática supone una agresión inevitable en numerosos procedimientos quirúrgicos. En este estudio se analiza la repercusión de la isquemia hepática normotérmica de 15 minutos de duración sobre la regeneración hepatocitaria en la rata (porcentaje de hepatocitos en regeneración —%HR— y gradiente regenerativo —GR— establecidos mediante cuantificación citofotométrica del DNA nuclear hepatocitario). Dicho efecto se ha valorado en condiciones normales y tras diferentes estímulos regenerativos: hepatectomía parcial (70%) y ciclosporina (20 mg/kg i.p.) solas o asociadas. En los controles normales y en los animales tratados únicamente con ciclosporina, la isquemia no ha modificado sensiblemente el %HR. En cambio, la regeneración inducida por la hepatectomía parcial se ha visto claramente frenada por la isquemia. Por otra parte, en las cuatro situaciones estudiadas, la ciclosporina ha mejorado significativamente el %HR y el GR, probando así que su efecto hepatotrófico persiste tras la agresión

isquémica.

PALABRAS CLAVE: Regeneración hepática, hígado, isquemia, ciclosporina, DNA.

INTRODUCCION

En los últimos años, el trasplante hepático se ha aceptado como una razonable opción terapéutica para aquellos pacientes con una enfermedad hepática irreversible (1). Sin embargo, el órgano a trasplantar está sujeto a numerosas agresiones que condicionan la función precoz postimplante del órgano (2). Si obviamos los problemas inmunológicos, el daño isquémico que se produce durante la extracción y preservación del hígado es la principal causa del fracaso postimplante (3). La capacidad del hígado para tolerar y compensar estas agresiones determinará su funcionalismo final. A esto se añade, en el caso de los trasplantes segmentarios, la necesidad de que los hepatocitos del hígado trasplantado proliferen para adecuar la masa hepática funcionando al tamaño del receptor (4). Por todo ello, resulta interesante investigar sustancias que aumenten la resistencia del hígado al daño por preservación y que potencien su capacidad regenerativa.

En anteriores experiencias hemos comprobado el efecto hepatotrófico de la CsA (5, 6), inmunosupresor de elección en el trasplante hepático, así como su efecto beneficioso en un modelo de isquemia intestinal en ratas (7). En un intento de clarificar este efecto de la CsA y de probar su hipotética eficacia terapéutica, se ha diseñado el presente estudio en ratas. En este trabajo, analizaremos el efecto de este fármaco sobre la regeneración hepatocitaria en situaciones de isquemia normotérmica asociada o no a un estímulo regenerativo (hepatectomía parcial).

MATERIAL Y METODOS

En el estudio se han utilizado ratas Sprague-Dawley, machos de 250 g de peso (Estabulario de la Facultad de Medicina y Odontología, UPV/EHU). Todas las experiencias se han

TABLA I
Series experimentales

I.	Control.
II.	Isquemia hepática.
III.	Ciclosporina A (20 mg/kg).
IV.	Isquemia hepática+Ciclosporina A.
V.	Hepatectomía 70%.
VI.	Isquemia hepática+Hepatectomía 70%.
VII.	Hepatectomía 70%+Ciclosporina A.
VIII.	Isquemia hepática+Hepatectomía 70%+Ciclosporina A.

realizado entre las 9 a.m. y 11 a.m. y los animales han tenido libre acceso a la comida (A-04, Panlab) y agua, hasta el momento e inmediatamente después de las intervenciones.

Bajo anestesia con éter y a través de una laparotomía media, se clampó el hilio hepático, mediante clips para aneurismas cerebrales de Yasargil, durante 15 minutos. Para evitar la subsiguiente congestión esplácnica se realizó un clampaje del tronco celíaco y de la arteria mesentérica superior a su salida de la aorta. Tras lo cual se cerró el abdomen. Una vez finalizado el período de isquemia, se procedió a la reapertura de la laparotomía, retirándose los diferentes clips vasculares. La recuperación del flujo sanguíneo se comprobó mediante la objetivación del latido de la a. hepática y de las arterias rectas del intestino.

Cuando fue necesaria la realización de una hepatectomía del 70%, ésta se realizó mediante la técnica descrita por Higgins (8), inmediatamente después de la reperusión o como procedimiento aislado. La administración de Ciclosporina A (CsA, Sandimun; Sandoz) se ha realizado a dosis de 20 mg/kg, 24 horas y 2 horas antes de las intervenciones, por vía i.p. La experiencia consta de ocho series de 10 animales cada una (tabla I).

Los animales fueron sacrificados a las 24 horas, extrayéndose un fragmento de hígado, que se incluyó en parafina. Sobre secciones histológicas de 5 μ de espesor, teñidas con reactivo de Schiff mediante la reacción de Feulgen-Rossenbeck, se cuantificó el DNA nuclear hepatocitario mediante un microespectrofotómetro ($\lambda=560$ nm). Así se obtuvo el contenido de DNA en unidades arbitrarias de 100 núcleos hepatocitarios de cada animal. Estos valores se distribuyeron en un histograma de frecuencias, lo que permitió, mediante el método descrito por Bartel, calcular diferentes curvas gaussianas ajustadas sobre los distintos niveles de ploidía. Esto nos ha permitido estimar el porcentaje de hepatocitos en regeneración (%HR) y el gradiente regenerativo (GR); entendido este último como el cociente del contenido medio en DNA de los hepatocitos regenerantes y el contenido medio en DNA de los hepatocitos estáticos.

Una vez obtenidos los datos correspondientes a cada animal, se calcularon los valores medios de cada serie. La comparación de resultados se realizó, dada la distribución no normal de los mismos, mediante el test de la suma de rangos, considerándose como significativos aquellos valores que mostraron una $p < 0,05$.

Todos los experimentos se han llevado a cabo siguiendo la normativa vigente sobre protección de los animales utiliza-

dos para experimentación y otros fines científicos (R. D. 223/1988 del 14 de marzo y la Orden de 13 de octubre de 1989).

RESULTADOS

El estado de reposo del hígado no implica una tasa regenerativa nula, encontrándose en los animales control un %HR del 1,21% (tabla II). Esta se ha considerado como la tasa regenerativa basal, con un GR de 2,15.

A continuación, analizamos los resultados obtenidos en animales sometidos a isquemia hepática normotérmica. Cuando la isquemia se realizó sobre un hígado normal se observa un leve descenso del %HR, si bien las diferencias no son significativas (fig. 1). Por el contrario, cuando la isquemia se asocia a un estímulo regenerativo probado (hepatectomía del 70%) se observa que la isquemia afecta negativamente a la regeneración hepática. El %HR desciende hasta 8,85% ($p < 0,005$), mientras que el GR no se modifica.

Si analizamos los resultados logrados tras el tratamiento con CsA (cf. fig. 1), observamos que la administración de ciclosporina ha inducido regeneración hepatocitaria en el hígado estático (4,01% vs 1,21%, $p < 0,001$) y tras 15 minutos de isquemia hepática absoluta (3,43% vs 0,76%, $p < 0,005$). Asimismo, ha incrementado el %HR tras hepatectomía del 70%, tanto en animales normoperfundidos (44,46% vs 22,29%, $p < 0,001$) como en aquéllos sometidos a isquemia hepática (13,16% vs 8,85%, $p < 0,05$).

Además, la CsA ha aumentado el ritmo regenerativo (GR) en todos los supuestos considerados, a excepción del grupo sometido a isquemia y tratado con CsA (fig. 2).

DISCUSION

La regeneración hepatocitaria es el principal mecanismo compensador tras una agresión hepática que suponga pérdida de volumen del órgano (10). Del mismo modo, este proceso biológico es fundamental para recuperar el correcto funcionalismo del órgano tras un trasplante hepático parcial (11). Si a esto añadimos que todo órgano a trasplantar sufre

TABLA II
Porcentaje de hepatocitos en regeneración (%HR) y gradiente regenerativo (GR) en las distintas series experimentales

Serie	% HR	GR
Control	1,21 \pm 1,17	2,15 \pm 0,24
Isquemia hepática	0,76 \pm 1,48	2,16 \pm 0,38
Ciclosporina A	4,01 \pm 3,25	2,38 \pm 0,48
Isquemia hepática+CsA	3,43 \pm 2,37	1,93 \pm 0,41
Hepatectomía 70%	22,29 \pm 9,7	1,61 \pm 0,12
Isquemia hepática+ hepatectomía 70%	8,85 \pm 9,38	1,66 \pm 0,39
Hepatectomía 70%+CsA	44,46 \pm 12,56	1,89 \pm 0,15
Isquemia hepática+ hepatectomía 70%+CsA	13,16 \pm 5,54	2,29 \pm 0,37

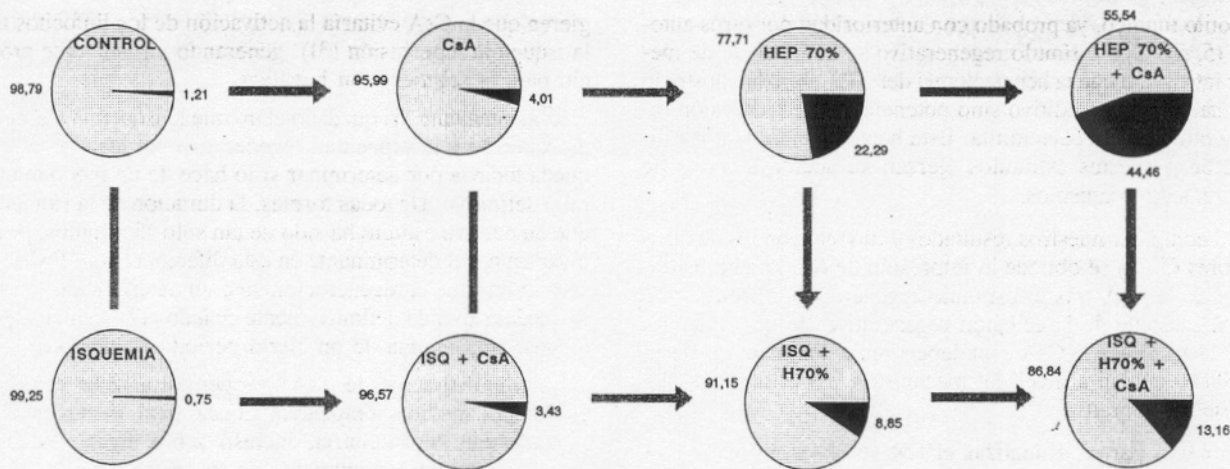


FIG. 1.—Modificaciones inducidas por la hepatectomía del 70% y la ciclosporina A sobre la regeneración hepatocitaria en el hígado isquémico y normoperfundido (%HR). Las diferencias significativas entre las series experimentales se señalan mediante flechas.

una agresión isquémica (extracción y preservación) y de revascularización (postimplante) será necesario un adecuado conocimiento de la respuesta regenerativa hepatocitaria tras isquemia hepática para posibilitar su regulación y manipulación terapéutica.

En nuestro modelo experimental se ha realizado una cuantificación del DNA hepatocitario en diferentes situaciones, todas ellas tras una isquemia hepática de 15 minutos que no se asocia a mortalidad alguna (12).

El análisis del %HR basal, correspondiente al hígado estático, nos muestra unas cifras coincidentes con las observadas por otros autores (13). Del mismo modo, la asociación de una hepatectomía del 70% ha producido una clara eclosión regenerativa, validando nuestro modelo de cuantificación de la respuesta regenerativa.

La asociación de una isquemia hepática de 15 minutos no ha afectado los parámetros regenerativos cuando se realiza sobre un hígado estático. Sin embargo, la isquemia hepática asociada a un estímulo regenerativo probado (hepatectomía del 70%) afecta negativamente al proceso regenerativo: disminuye significativamente el %HR, manteniéndose constante el GR. Es decir, ha disminuido la intensidad, pero no la velocidad de la regeneración hepatocitaria: tras la isquemia hepática de 15 minutos regenera un número menor de hepatocitos, pero los que lo hacen mantienen un ritmo normal. Esta observación podría justificarse desde un punto de vista metabólico, dado que la isquemia daña metabólicamente al hepatocito, lesionando las mitocondrias y depleccionando las reservas del ATP (14): elementos imprescindibles para la adecuación del hepatocito y posterior síntesis de DNA. Además, durante la reperfusión, la generación de radicales libres del oxígeno (RLO) produciría lesiones a nivel de los sistemas de membranas y del DNA (15).

Desde un punto de vista histológico, la hipoxia afecta heterogéneamente a los hepatocitos, dado que los centrolobulillares son más sensibles a la hipoxia (16), afectándose con mayor intensidad que los periportales. Esta heterogeneidad explicaría porqué algunos hepatocitos siguen regenerando y

lo hacen a un ritmo normal, y otros, sin embargo, no regenerarían.

Además, los hepatocitos podrían dañarse en diferente intensidad, sin llegar necesariamente a la irreversibilidad y muerte celular (17). Si estos hepatocitos pudieran recuperar su funcionalismo, como lo demuestra la progresiva normalización de las enzimas hepáticas tras la isquemia-reperfusión hepática (18), podrían regenerar. Se trataría, por tanto, de un retardo en la regeneración.

Por otra parte, la participación del sistema inmune como elemento regulador de la regeneración hepatocitaria ha sido propuesta por diferentes autores (19). Asimismo, diferentes estirpes de células inmunocompetentes han sido involucradas en la fisiopatología del síndrome de isquemia y reperfusión (20). De aquí la importancia del estudio de un inmunosupresor ampliamente utilizado en la clínica humana como la Ciclosporina A (CsA), en nuestro modelo experimental.

Los resultados obtenidos tras el tratamiento con CsA sobre hígado estático corroboran el efecto hepatotrófico de este me-

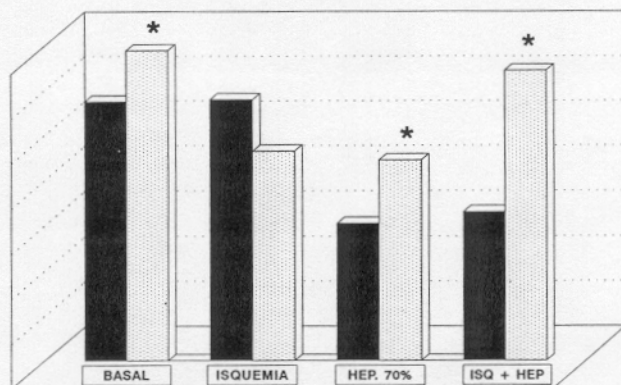


FIG. 2.—Efecto de la administración de ciclosporina A (20 mg/kg/día, i.p.) sobre el gradiente regenerativo. Las columnas punteadas representan los valores de los animales tratados con ciclosporina A. En tres de las series, la ciclosporina ha aumentado significativamente el GR (señaladas con asterisco).

tabolito fúngico, ya probado con anterioridad por otros autores (5, 6). Este estímulo regenerativo se ha revelado de menor intensidad que la hepatectomía del 70%, pero ha mostrado un efecto no sólo aditivo sino potenciador de la eclosión regenerativa posthepatectomía. Este hecho sugiere la posibilidad de que estos estímulos ejerzan su acción a través de diferentes mecanismos.

Al comparar nuestros resultados y modelo con los de otros autores (5, 21) se obtiene la impresión de que la administración de la CsA tras el estímulo regenerativo quirúrgico no es la causante de la eclosión regenerativa; lo que indicaría que la acción de la CsA es independiente del mismo, o desarrolla su acción a nivel del mecanismo iniciador de la respuesta regenerativa.

Por otra parte, al analizar el GR se observa que la CsA aumenta este parámetro en todas las series; es decir, disminuye el tiempo requerido para la duplicación del DNA. Esto llama la atención, sobre todo si se tiene en cuenta que numerosos estudios previos habían concluido que la CsA no afectaba a las etapas del ciclo celular (22). Una posible explicación sería que el aumento del GR en vez de reflejar una mayor velocidad global de síntesis, lo que expresa es una activación más precoz de los hepatocitos tras el estímulo. Desde otro punto de vista se podría considerar, que con la administración de CsA la regeneración hepatocitaria se produciría de un modo más difuso, afectando de un modo general a hepatocitos tanto periportales como centrolobulillares. En este sentido, se acepta que los hepatocitos centrolobulillares poseen un mayor contenido en DNA como consecuencia de su crecimiento o mayor edad. Además, la regeneración se inicia a nivel periportal, desplazándose hacia la periferia del acino hepático (23). La Ciclosporina A podría inducir la existencia de un ambiente favorable a la regeneración hepatocitaria más difuso, del mismo modo que se produce una redistribución zonal de la SDH durante la regeneración hepática tras tratamiento con CsA (24).

En cualquier caso, no es posible a partir de nuestros datos esclarecer el mecanismo de acción de la CsA a nivel de la regeneración hepática; y existen opiniones tanto a favor (25) como en contra (26) de que en dicho mecanismo esté implicado el sistema inmunitario. Así, algunos autores consideran que los receptores citosólicos de la CsA y de otros inmunomoduladores como el FK506 (27), con probada actividad enzimática (28), jugarían un importante papel en la iniciación de la respuesta regenerativa. Otros, en cambio, considerando que el sistema monocitomacrófago es el regulador de este proceso (29) y que las células de dicho sistema son sensibles al tratamiento con CsA, concluyen que es a través de ellas como la CsA influye en la regeneración hepática.

Centrémonos ahora sólo en el efecto protector de la CsA frente a la isquemia (figs. 1 y 2): ha normalizado la regeneración hepática basal y ha aumentado significativamente el %HR del grupo con hepatectomía del 70% + isquemia de 15 minutos. Esto concuerda con el hecho de que algunos autores como Hayashi y cols. (30), han demostrado un efecto beneficioso de la CsA en la isquemia hepática, postulando como mecanismo de acción un efecto estabilizante sobre las membranas. En cambio, los resultados de otros autores (31), su-

gieren que la CsA evitaría la activación de los linfocitos tras la isquemia reperfusión (31), generando un ambiente propicio para la regeneración hepática.

Evidentemente, ha quedado claro que la isquemia afecta negativamente a la capacidad regenerativa del hígado, aunque queda todavía por determinar si lo hace de un modo temporal o definitivo. De todas formas, la duración de la isquemia, que en nuestro estudio ha sido de tan sólo 15 minutos, puede jugar un papel determinante en esta diferenciación. Podría tal vez ocurrir que la regeneración ante un determinado estímulo quedara abolida definitivamente cuando la isquemia se prolongase por encima de un cierto período de tiempo.

La administración de CsA preoperatoria se ha mostrado como una medida terapéutica eficaz para incrementar la regeneración hepatocitaria, incluso sobre hígado isquémico, aunque el desconocimiento de su mecanismo intrínseco de acción a este nivel, hace necesarias nuevas investigaciones.

AGRADECIMIENTOS

La ciclosporina A ha sido gentilmente suministrada por Laboratorios Sandoz. Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el Gobierno Vasco, a través del Plan de Formación de Personal Investigador.

Correspondencia:

Vicente Portugal Porras
Laboratorio de Cirugía Experimental
Facultad de Medicina y Odontología
48940 Lejona (Vizcaya)

BIBLIOGRAFIA

1. Starzl TE, Iwatsuki S y Van Thiel DH. Evolution of liver transplantation. *Hepatology* 1982; 2: 614-636.
2. Blankensteijn JD y Terpstra OT. Liver preservation: the past and the future. *Hepatology* 1991; 13 (6): 1235-1250.
3. Karwinski W, Drange A, Farstad M, Ulvik R y Soreide O. 60 min normothermic liver ischemia in rats: allopurinol improves energy status and bile flow during reperfusion. *Eur Sur Res* 1990; 22: 27-33.
4. 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. *Transplant Proc* 1988; 20 (I, sup 1): 494-497.
5. Makowka L, Svanas G, Esquivel C, Ventakaramanan R, Todo S, Iwatsuki S, Van Thiel D y Starzl E. Effect of Cyclosporin on hepatic regeneration. *Surgical Forum* 1986; 37: 352-354.
6. García-Alonso I, Méndez JJ y Barbera E. Cyclosporin modifies liver regeneration following partial hepatectomy. *Sur Res Commun* 1989; 6: 43-49.
7. Bilbao J, García-Alonso I, Portugal V, Barceló P, Ortiz J y Méndez J. Utilidad terapéutica de fármacos antioxidantes en el síndrome de reperfusión intestinal experimental. *Rev Esp Enf Digest* 1991; 80: 237-241.

8. Higgins GM y Anderson RM. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Path* 1931; 12: 186-202.
9. Bartel PH. Numerical evaluation of the cytologic data. I. Description of profiles. *Analytical Quantitative Cytology* 1979; 4: 20-28.
10. Bucher NRL. Regeneration of mammalian liver. *Int Rev Cytol* 1963; 245-300.
11. Herrera N, Pereira F, Herrera J, Díaz del Río M, Matey P, Maganto P, Tendillo FJ y Castillo-Olivares JL. Regeneration study in liver transplantation. Experimental model in pigs. *Eur Surg Res* 1992; 24 (S2): 20.
12. García-Alonso I, Portugal V, Iturburu I, L de Tejada I y Méndez J. Modifications induced by cyclosporin A on ischemic liver regeneration. *Surg Res Commun* 1990; 9: 227-233.
13. Leffert L, Koch KS, Lad PJ, Skelly H y Hemptine B. Hepatocyte growth factors. In: Zakim D y Boyer TD (ed). *Hepatology: a textbook of liver disease* 1982; 64-75.
14. Murphy E, Gabel SA, Funk A y London RE. NMR observability of ATP: preferential depletion of cytosolic ATP during ischemia in perfused rat liver. *Biochemistry* 1988; 27: 526-528.
15. Miquel J. Radicales del oxígeno y envejecimiento celular. Simposium Internacional de Radicales Libres. Madrid 1990.
16. Lemasters JJ, Stemkowski CJ y Ji S. Cell surface changes and enzyme release during hypoxia and reoxygenation in the isolated, perfused rat liver. *J Cell Biol* 1983; 97: 778-786.
17. Rodríguez A, LaMorte W, Hanrahan LM, Hophins SR, O'Keane JC, Cachecho R e Hirsch EF. Liver viability after ischemia-reperfusion. *Arch Surg* 1991; 126: 767-771.
18. Huguet C, Gavelli A, Chieco PA, Bona S, Harb J, Joseph JM, Jobard J, Gramaglia M y Lasserre M. Liver ischemia for hepatic resection: where is the limit? *Surgery* 1992; 111 (3): 251-259.
19. Rakhmievich AL y Sidorenko ON. Stimulation and supresion of cellular immunity in mice during liver regeneration. *Biull Eksp Biol Med* 1986; 101 (5): 591-594.
20. Ortiz-Lacorzana J, García-Alonso I, Apecechea A, Bilbao JE, Barbera E y Méndez J. Role of the immune system in small bowel reperfusion injury in the rat. *Research in Surgery* 1990; 2 (2): 62-67.
21. Grant D, Black R, Zhong R, Wall W, Stiller C y Duff J. The effect of cyclosporine on liver regeneration. *Transplant Proc* 1988; 20 (3): 877-879.
22. Borel JF y Lafferty KJ. Cyclosporin: speculation about its mechanism of action. *Transplant Proc* 1983; 15 (3): 1881-1885.
23. Schwartz-Arad D, Zajicek G y Bartfeld E. The streaming liver IV. DNA content of the hepatocyte increases with its age. *Liver* 1989; 9: 93-99, I.
24. 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.
25. Kim YI, Nakashima K, Kawano K y Kobayashi M. Evidence that cyclosporin is hepatotoxic and hepatotrophic in 70% hepatectomized rats and mice. *Eur Surg Res* 22: 231-237.
26. Francavilla A, Starzl TE, Barone M, Zeng Q, Porter KA, Zeevi A, Markus PM, Van Den Brink MRM y Todo S. Studies on mechanisms of augmentation of liver regeneration by Cyclosporine and FK506. *Hepatology* 1991; 14 (1): 140-143.
27. Schreiber SL. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* 1991; 251: 283-287.
28. Siekierka JJ, Hung SHY, Poe M, Lin CS y Sigal NH. A cytosolic binding protein for the immunosuppressant KF506 has peptidylprolil isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* 1989; 341: 755-757.
29. Kwon AH, Inada Y, Uetsuji S, Yamamura M, Hioki K y Yamamoto M. Response of fibronectin to liver regeneration after hepatectomy. *Hepatology* 1990; 11 (4): 593-598.
30. Hayashi T, Nagasue N, Kohno H, Chang Y y Nakamura T. Beneficial effect of cyclosporine pretreatment in preventing ischemic damage to the liver in dogs. *Transplantation* 1988; 46 (6): 923-924.
31. Yamanoi A, Nagasue N, Kohno H, Chang YCh, Hayashi T y Nakamura T. Attenuation of ischemia-reperfusion injury of the liver in dogs by cyclosporine. *Transplantation* 1991; 52 (1): 27-30.