



VII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica y I Congreso de Preparaciones Virtuales por Internet

Del 1 al 31 de octubre de 2005



Comportamiento de las variables morfométricas en el hígado de ratas macho alcohólicas adolescentes inoculadas con Heber-biovac HB.

Jacqueline T Malherbe Pérez*, Aleida Herrera Batista*, Giselle Puldon Seguí*

* ICBP "Victoria de Giron" CUBA

Resumen

RESUMEN: El presente trabajo pretendió determinar los posibles cambios producidos por la ingestión crónica de etanol a partir de la adolescencia en las variables morfométricas, área del núcleo (AN), área del citoplasma (AC) y relación área núcleo-área citoplasma (AN/AC) de los hepatocitos de las zonas peri portal, intermedia y peri venosa del lobulillo hepático. Se utilizaron 60 ratas, se conformaron tres grupos, uno experimental (etanol y vacuna) y dos controles (agua y vacuna), (agua y solución salina) y se trataron durante uno y dos meses. Para el estudio morfométrico se utilizó el sistema cubano MADIP. Las comparaciones binarias realizadas resultaron significativas para el área del citoplasma en la zona peri venosa entre los animales tratados con agua y vacuna, y los tratados con etanol y vacuna durante un mes. A los dos meses de tratamiento se encontraron diferencias entre estos dos grupos, pero en este caso la variable afectada fue el área del núcleo en los hepatocitos del área peri portal. Estos hallazgos señalan que el etanol provocó cambios en los hepatocitos del área peri portal aun cuando fue suministrado a dosis bajas y por un tiempo no muy prolongado. Palabras Claves: alcoholismo, adolescencia, hígado, morfometría, etanol, hepatocitos, ratas

Introducción

El alcoholismo es la toxicomanía más importante por ser la más universal y por sus complicaciones¹⁻³. El consumo de alcohol ha ido aumentando de forma indiscriminada y alarmante⁴. En Cuba consumen bebidas alcohólicas el 45,2% de los sujetos mayores de 15 años⁵⁻⁷. En los últimos años se ha producido un aumento progresivo del consumo de bebidas alcohólicas entre los adolescentes, siendo cada vez más frecuente el número de alcohólicos crónicos en estas edades^{4,5,7}. Pequeñas dosis de alcohol que en los adultos no causarían problemas podrían resultar muy peligrosas en los adolescentes. Estos están en una etapa de mayores requerimientos nutritivos, poseen menos peso corporal y poca experiencia como bebedores⁸. El hígado es el principal órgano diana del alcoholismo. El exceso de bebidas alcohólicas provoca varios efectos sobre éste. No obstante 33% de los grandes bebedores no presentan consecuencias hepáticas, sin que hasta el momento se conozcan las causas^{9,10}. El virus de la Hepatitis B (VHB), es un virus de la familia Hepadnaviridae¹¹. La infección por él tiene gran repercusión socio sanitaria. Existen entre 300 y 500 millones de personas portadoras de VHB en el mundo y más de 10 millones en América Latina¹². Siendo la enfermedad producida por él, un problema de salud mundial que puede ser controlado con el uso apropiado de vacunas¹³. Estudios previos han revelado que los alcohólicos con enfermedad hepática presentan una exposición aumentada VHB, lo cual se determina por la presencia de anticuerpos contra las proteínas del núcleo y su envoltura (antiHBs y antiHBc). Estos han sido observados con mayor frecuencia en alcohólicos con enfermedad hepática. Esto sugiere que la exposición y la posible adquisición de la infección al VHB puede estar relacionada con el uso de alcohol^{14,15}. Se piensa que la respuesta inmune humoral y celular a las diferentes proteínas del VHB son esenciales para eliminar al mismo, además la respuesta inmune celular juega un papel importante en el desarrollo de hepatitis crónicas y cirrosis^{14,15}. También se plantea que los pacientes alcohólicos son menos sensibles a la vacuna contra la hepatitis B^{15,16}. En este trabajo se pretendió determinar los posibles cambios en las variables morfométricas, área del núcleo (AN), área del citoplasma (AC) y relación núcleo-citoplasma (AN/AC) en los hepatocitos de las zonas peri portal, intermedia y peri venosa del lobulillo hepático.

Material y Métodos

Se emplearon 60 ratas Wistar albinas machos de 30 días de vida postnatal. Se conformaron tres grupos de tratamiento: uno experimental y dos controles. El experimento se diseñó para dos tiempos, un mes y dos meses de tratamiento y en cada uno se incluyeron los tres grupos. A las ratas del grupo experimental se les administró etanol y se les inmunizó con la vacuna Heberbiovac-HB (EV). Los animales de los grupos controles tuvieron tratamientos diferentes, a un grupo se le administró agua y se inoculó solución salina (ASS), control negativo, y al otro se le administró agua y se le inmunizó con la vacuna Heberbiovac-HB (AV), control positivo. Se utilizó etanol al 40% diluido en agua, a razón de tres gramos por kilogramo de peso corporal, en dosis única diaria. La vía de administración fue oral y se empleó una cánula intraesofágica¹⁸. A las ratas no tratadas con etanol se les administró agua a la misma dosis y en el mismo horario, utilizando el procedimiento anterior. Se empleó la vacuna cubana Heberbiovac-Hb, contra el antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (HBsAg). La dosis empleada fue 0.1 ml por vía intramuscular en el cuadriceps derecho del animal. El esquema de inmunización fue de tres dosis en ambos grupos y una dosis de refuerzo para los animales tratados durante dos meses. Los animales tratados por un mes fueron inoculados a los 30, 37 y 51 días de nacidos, y los tratados durante dos meses los 30, 37, 51 y 65 días de nacidos. Al concluir el experimento y después de la extracción de sangre a los animales fueron anestesiados en atmósfera de éter con auxilio de una campana. Se extrajo el hígado, se tomaron fragmentos y se procesaron las muestras para realizar el estudio morfométrico del hígado y se utilizó la técnica de inclusión en parafina, se obtuvieron cortes histológicos, se colorearon por el método de hematoxilina y eosina. Las láminas fueron observadas, se digitalizaron las imágenes y se procedió a realizar mediciones sobre ellas utilizando el sistema cubano para morfometría de imágenes MADIP^{19,20}. Se estudiaron los hepatocitos de las tres zonas del lobulillo hepático de Rappaport: peri portal, intermedia y perivenosa. Se midieron 10 células por cada zona y se analizaron las variables morfométricas área núcleo (AN), área citoplasma (AC) y relación área núcleo/área citoplasma (AN/AC). La medición se realizó contorneando manualmente los núcleos y las membranas citoplasmáticas. Las células a medir fueron escogidas al azar y se tomaron aquellas en las que se observaron bien los nucléolos. La digitalización para este caso se realizó con el objetivo 40x, previa selección de la zona con el objetivo 25x, para ello se buscaron marcadores biológicos en el tejido que permitieron delimitar el área a estudiar. Para realizar el análisis de los datos se empleó el paquete estadístico SPSS versión 9.0. Como primer procedimiento se realizó un análisis de varianza multivariado (MANOVA) para ver el efecto de las variables grupo y tiempo sobre las variables del estudio. El MANOVA mostró el estadístico (la F de Wilks con su correspondiente significación) para cada efecto grupo, tiempo y grupo*tiempo y para las variables dependientes en su conjunto. Luego se realizó un ANOVA para cada una de las variables que arroja tres estadísticos (uno correspondiente a cada variable dependiente). Luego el SPSS realizó las pruebas a posteriori (post-hoc tests) cuando el efecto grupo fue significativo, para ver cuáles eran los grupos que diferían entre sí. Se realizaron comparaciones binarias dos a dos entre los diferentes grupos para todas las variables del estudio y para cada tiempo de tratamiento.

Resultados

Al comparar las variables morfométricas AC, AN y relación AN/AC de los hepatocitos en cada zona del lobulillo hepático, al mes de tratamiento se observaron los siguientes resultados. **Tabla 1.** En la zona peri portal la media de la variable AC es menor en el grupo tratado con etanol y vacuna que en el resto de los grupos. En cambio, la variable AN está aumentada en el grupo tratado con agua y vacuna. La media de la relación AN/AC está aumentada en el grupo tratado con agua y vacuna. En la zona intermedia, el área del citoplasma tiene un comportamiento igual al caso anterior. Sin embargo, el área del núcleo y relación la AN/AC están aumentadas en el grupo tratado con agua y vacuna, con un comportamiento similar a la zona anterior. En la zona peri venosa el comportamiento fue diferente. Aquí los valores medios mayores corresponden tanto en AC como en el AN y los presentó el grupo tratado con agua y vacuna. Mientras que la relación AN/AC está aumentada en el grupo tratado con etanol y vacuna. Al realizar un análisis similar al anterior para comparar las variables morfométricas AC, AN y relación AN/AC a los 2 meses de tratamiento y en cada una de las zonas del lobulillo hepático se observaron los siguientes resultados. **Tabla 2.** En los hepatocitos de la zona peri portal, las medias de las tres áreas en el grupo etanol y vacuna se encuentran aumentadas con respecto a los demás grupos estudiados.

En los de la zona intermedia, al analizarlas AC y las AN se encontró que los valores medios mayores están en el grupo etanol y vacuna, y en el caso de la relación AN/AC el valor medio menor se encuentra en el grupo tratado con agua y vacuna.

En la zona peri venosa, el comportamiento es diferente para cada área y cada grupo. Las medias del AC tienen valores mayores para el grupo de agua y solución salina. En esta zona el valor de la media del AN es menor en el grupo tratado con agua y vacuna. En el caso de la relación AN/AC encontramos el valor mayor en el grupo tratado con etanol y vacuna.

Al analizar los resultados de las pruebas de significación mediante análisis de la varianza multi y univariado, para el efecto grupo, tiempo e interacción grupo/tiempo, se obtuvieron resultados de χ^2 de Wilks y significación, correspondientes con las tablas anteriores. Tabla 3.

Al analizar los efectos grupo y tiempo en las zonas del lobulillo hepático para el mes de tratamiento, se comprobó que la prueba multivariada es significativa en las zonas peri venosa y peri portal.

Cuando se compararon estos resultados con los obtenidos a los dos meses no se obtuvieron diferencias significativas. En las comparaciones múltiples realizadas entre los grupos de animales, se encontró que cada una de las variables tiene un comportamiento diferente. Al mes de tratamiento y en la zona peri portal, las variables AN y AC no presentaron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones binarias realizadas. En cambio, la relación AN/AC mostró diferencias significativas al comparar los grupos agua y solución salina y agua y vacuna ($p < 0.05$). La zona intermedia no mostró diferencias significativas.

En la zona peri venosa sólo mostró diferencias significativas la variable área del citoplasma al comparar los grupos agua y vacuna contra etanol y vacuna ($p < 0.05$). Este mismo análisis se realizó a los dos meses de tratamiento y sólo se observó significación en la zona de la triada, en el área del núcleo en la comparación entre el grupo tratado con agua y vacuna, y el tratado con etanol y vacuna ($p = .013$).

ZONA	ÁREAS	AS	AV	EV
PERIPORTAL	AC	X=199.56* S=16.57	X=199.79* S=56.20	X=179.35 S=16.38
	AN	X=30.42 S=2.14	X=34.08* S=10.21*	X=28.68 S=2.29
	AN/AC	X=.153 S=.012	X=.172* S=.023*	X=.160 S=.010
INTERMEDIA	AC	X=197.67* S=23.68*	X=198.55* S=53.32*	X=180.73 S=27.34
	AN	X=32.83 S=6.24	X=33.84* S=12.70*	X=28.99 S=6.20
	AN/AC	X=.166 S=0.21	X=.169* S=.033*	X=.159 S=.022
PERIVENOSA	AC	X=221.96 S=31.12	X=240.73* S=72.96*	X=175.14 S=25.23
	AN	X=32.65 S=3.33	X=38.55* S=14.51*	X=29.75 S=8.17
	AN/AC	X=.148 S=.016	X=.159 S=.026	X=.169* S=.032*

TABLA No 1. Estadísticas descriptivas de las variables morfo métricas en las tres zonas del lobulillo hepático al mes de tratamiento.

ZONA	ÁREAS	AS	AV	EV
PERIORTAL	AC	X=199.65 S=18.43	X=194.01 S=28.17	X=214.26* S=16.18*
	AN	X=30.33 S=1.87	X=27.31 S=6.75	X=34.11* S=3.24*
	AN/AC	X=.153 S=.012	X=.143 S=.023	X=.160* S=.018*
INTERMEDIA	AC	X=198.73 S=23.79	X=189.25 S=26.09	X=211.66* S=34.42*
	AN	X=33.84 S=5.48	X=29.36 S=6.84	X=35.56* S=7.80*
	AN/AC	X=.170 S=.017	X=.154* S=.026*	X=.170 S=.040
PERIVENOSA	AC	X=221.14* S=33.24*	X=207.76 S=31.45	X=208.43 S=47.64
	AN	X=32.65 S=3.68	X=29.34* S=6.51*	X=32.72 S=3.61
	AN/AC	X=.149 S=0.15	X=.143 S=.032	X=.163* S=.035*

TABLA No2 Estadísticas descriptivas de las variables morfométricas en las tres zonas del lobulillo hepático a los dos meses de tratamiento.

GRUPO/ TIEMPO		PERIORTAL			INTERMEDIA			PERIVENOSA		
		AC	AN	AN/AC	AC	AN	AN/AC	AC	AN	AN/AC
1 MES	F	1.105	1.943	3.535	.706	.780	.351	4.693	2.031	1.692
	p	.346	.164	.044	.503	.490	.707	.018	.151	.204
		λ.599 p.047			λ.920 p.912			λ.572 p.030		
2 MESES	F	2.316	4.913	2.191	1.732	2.195	.900	.360	1.570	1.287
	p	.119	.015	.132	.197	.132	.419	.701	.227	.293
		λ.616 p.059			λ.758 p.330			λ.792 p.443		

TABLA No3 Análisis de los efectos grupo y tiempo para las zonas del lobulillo hepático.

Discusión

Los resultados obtenidos en el estudio morfométrico revelaron que las tres zonas del lobulillo hepático no mostraron grandes variaciones con relación a las variables morfométricas estudiadas para ninguno de los grupos de animales. Otros autores señalan que las tres zonas del lobulillo hepático presentan diferencias funcionales, metabólicas, en la respuesta xenobiótica y en las características morfológicas²⁰⁻²².

Las comparaciones binarias realizadas resultaron significativas para el área del citoplasma en la zona peri venosa entre los animales tratados con agua y vacuna, y los tratados con etanol y vacuna durante un mes. A los dos meses de tratamiento también se encontraron diferencias entre estos dos grupos, pero en este caso la variable afectada fue el área del núcleo en los hepatocitos del área peri portal. Estos hallazgos señalan que el etanol provocó cambios en los hepatocitos del área peri portal aun cuando fue suministrado a dosis bajas y por un tiempo no muy prolongado.

La presente investigación lleva a pensar que el daño hepático está presente desde una etapa muy temprana en el bebedor.

En este trabajo se concluye que los resultados obtenidos en el estudio de las variables morfométricas no mostraron grandes diferencias entre las tres zonas del lobulillo hepático en ninguno de los grupos de animales.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en el estudio de las variables morfométricas no mostraron grandes diferencias entre las tres zonas del lobulillo hepático en ninguno de los grupos de animales.

Bibliografía

Referencias Bibliográficas

- 1.- National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. Alcohol and coronary heart disease. Alcohol Alert 1999; 45. Disponible en URL: <http://silkn.k.n.h.gov/silk/niaal/publication/aa45.htm>
- 2.- Peruga A. El consumo de sustancias adictivas en las Américas. Adicciones 2002; 14(2): 227-238.
- 3.- Lévy P. Alcohol et pancréas. Pathol Biol 2001; 49: 753-8.
- 4.- Valdés P E, García C R. Prevalencia del alcoholismo en un consultorio de Médico de la Familia. Rev Cub MGI 1994; 10 (4): 344-50.
- 5.- España uno de los 8 países europeos donde se bebe más alcohol. Jano On-line y agencias 13/09/2001 10:39. Disponible en URL: <http://db.doymaes/cgi.bin/wdbcgi.exe/doyma/press.plantilla?ident=25973>
- 6.- Chang M, Cañizares M, Sandoval JE, Bonet M, González R. Características del consumo de bebidas alcohólicas en la población cubana. Rev del Hosp Psiquiátr Hab 1998; 49(3): 257-63.
- 7.- González R, Miqueo T, Cisneros A. El cuestionario MAST en sus variantes de 25,13 y diez preguntas. Capacidad para diferenciar dependientes alcohólicos de bebedores normales según un fuentes de información utilizada. Rev del Hosp Psiquiátr Hab 1994; 32 (2): 529-537.
- 8.- Ron DH, Ellickson P. What is adolescent alcohol misuse in the United State according to the expert? Alcohol and alcoholism 1996; 31(3) 297-303.
- 9.- Sherlock S. Alcoholic liver disease. Lancet 1995; 345: 227-229.
- 10.- Takeda Y, Arji S, Kaido T, Imamura M. The impairment of hepatocytes and sinusoidal endothelial cells during cold preservation in rat fatty liver induced by alcohol and the beneficial effect hepatocyte growth factor. Transp. Int 2003; 16(4): 241-9.
- 11.- Alter MJ, Coleman PJ, Alexander WJ et al. The importance of heterosexual activity in the transmission of hepatitis B and non-A, non-B hepatitis in the United States. JAMA 1989; 262: 201-10.
- 12.- González V, García E, González G, Ramírez V, Alerm A; Vingut J et al. Respuesta inmune celular y humoral al año en estudiantes de medicina y enfermería vacunados por 1ra vez en Cuba con vacuna anti hepatitis B. Generalización mediante introducción al programa nacional contra la Hepatitis B. Trabajo presentado en el Forum Nacional de Ciencia y Técnica. Ciudad de la Habana. ICBP "Victoria de Giron"1997.
- 13.- OMS. Avances en la lucha contra la hepatitis B. Revista Panamericana Salud Publica 1997; 1: 333-4.
- 14.- WHO. Prospect for control of hepatitis. Post Med J 1987 vol 63.
- 15.- Ramírez V, González A. Seguridad e inmunogenicidad de la vacuna cubana recombinante anti-hepatitis B Heberbiovac HB en poblaciones de América, Europa, Asia y África. Heberbiovac HB. Características generales 1995; 1: 43-49.
- 16.- Rosman AS, Basu P, Galvin K, Liever CS. Efficacy of a high and accelerated dose of hepatitis B vaccine in alcoholic patients: a randomized clinical trial. Am J Med 1997; 103: 217-222.
- 17.- Mendenhall C, Roselle GA, Lybeck LA. Hepatitis B vaccination. Response of alcoholic with and without injury. Dis Dis SCI 1988; 33: 263-269.
- 18.- Tsukamoto, H; French S. W; Beaso N. Severe and progressive steatosis and focal necrosis in rat liver induced by continuous intragastric infusion of ethanol and low fat diet. Hepatology 1985; 5: 224-232. Rodríguez R, Alarcón T.E, Sánchez L: MADIP un novedoso método. Rev de Información Científica y tecnológica 2002; 7 (1) 1023-172: 31-34.
- 19.- Rodríguez R, Alarcón T.E, Sánchez L "MADIP: Morfometrical análisis by Digital Proceeding of the IX Spanish Symposium on Pattern Recognition and Image Analysis, Vol.I pp291-298, ISBN 84-8021-349-3, 2001, Spain.
- 20.- Jungerman K. Zonation of metabolism and gene expression in liver. Histochemistry 1995; 103: 81-91.
- 21.- Feldmann G. Functional hepatocellular heterogeneity for the production of plasma proteins. Karger, SA.G. Basel. Enzyme 46 Switzerland Colombo Bern 1992: pp 139-154.
- 22.- Katz N, K Jungerman: Metabolic heterogeneity of the liver in Tavalani hepatic Transport and Bile Secretion Physiology and Pathophysiology. Chapter 4 New York Raven Pres Ltd, 1993. pp 55-70.