

Estudio Morfométrico del Hígado de Ratas Wistar en un Modelo Experimental de Hiperlipidemia.

Autores:

Dra. Maylid Bárbara Hernández Medina¹, MSc. Marisabel García Gutiérrez²
MSc. Pedro Monteagudo Valdivia³, MSc. Alfredo Santana Machado⁴

1 Profesora Instructora, Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Santa Clara, Cuba.

2 Profesora Auxiliar, Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Santa Clara, Cuba.

3 Profesor Asistente, Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Santa Clara, Cuba.

4 Profesor Auxiliar, Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, Santa Clara, Cuba.

pedro.monteagudo@infomed.sld.cu

RESUMEN

Se realizó un estudio analítico con el objetivo de caracterizar y comparar aspectos morfométricos del hígado a partir de un modelo experimental de hiperlipidemia realizado en la Unidad de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, durante el período comprendido de enero de 2010 a junio de 2011. Se utilizaron ratas machos de la especie *Rattus rattus*, cepa Wistar de 100 a 150g de peso corporal. Se formaron aleatoriamente tres grupos experimentales con 6 animales cada uno. En el grupo I (control) se utilizó una dieta estándar, en el grupo II se utilizó una dieta estándar suplementada con 20% de caseína y 20% de grasa de cerdo; y el grupo III dieta estándar suplementada únicamente con grasa de cerdo al 20%. Se estudiaron los hepatocitos de las tres zonas del ácino hepático de Rappaport: peri portal, intermedia y perivenosa. Se observaron las preparaciones histológicas, escogiendo zonas alrededor del espacio porta, en la zona intermedia de la vena central, de esa forma se seleccionaron dos espacios porta, dos venas centrales y dos zonas medias de cada biopsia. Los resultados obtenidos demostraron valores elevados para las variables área nuclear, volumen nuclear y área citoplasmática en el grupo II, y existe diferencia significativa entre los valores medios de estas variables cuando las comparamos con los dos grupos restantes, Los parámetros morfométricos observados en el grupo II se comportaron de manera uniforme en las tres zonas del ácino hepático, lo que sugiere un daño celular

PALABRAS CLAVE: Morfometría, Hepatocito, Área Nuclear, Volumen Nuclear.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas no transmisibles ocupan un lugar importante entre los daños a la salud que más repercuten en la atención médica del proceso salud enfermedad. Estudios pronósticos de la Organización Mundial de la Salud estiman que de los 64 millones de personas que fallecerán en 2015, 41 millones lo harán de enfermedades crónicas, a menos que se tomen medidas urgentes, y 388 millones de personas morirán en los próximos 10 años de una enfermedad crónica.^{1,2}

En Cuba, al cierre del año 2010 la situación de salud del país se caracterizó por un incremento en la mortalidad y morbilidad por enfermedades crónicas no transmisibles.³

Entre las enfermedades crónicas no transmisibles más estudiadas se encuentran la Cardiopatía Isquémica Aterosclerótica, la Hipertensión Arterial, la Diabetes Mellitus y las Enfermedades Cerebrovasculares; todas ellas convergiendo en un factor de riesgo común: la Hipercolesterolemia.

Cada año, como mínimo, 4.4 millones de personas mueren como resultado de los niveles de colesterol total elevados. La Hipercolesterolemia, a diferencia de otros factores de riesgo, es modificable, siendo posible prevenir, retardar o incluso revertir el proceso patológico que este provoca.

Se ha calculado que en el año 2020 la Aterosclerosis será la primera causa de mortalidad en todo el mundo. A ello contribuirán de forma determinante dos factores que facilitan su desarrollo: de un lado, el progresivo envejecimiento de la población mundial y, de otro lado, los hábitos de vida occidentales (principalmente, la alimentación excesivamente rica en grasas y calorías, y la vida desordenada y estresada que comporta el ejercicio profesional y laboral).

La prevalencia de aterosclerosis está aumentando rápidamente en los países en desarrollo y como las personas en los países desarrollados viven más tiempo, la incidencia aumentará.⁶

En Cuba, donde las infecciones no constituyen las primeras causas de morbilidad y mortalidad, la aterosclerosis ocupa un lugar principal, incluyendo sus manifestaciones más importantes; la cardiopatía isquémica y la enfermedad cerebrovascular.

En las proyecciones actuales de la Salud Pública Cubana, los esfuerzos están encaminados a prolongar la esperanza de vida al nacer, a partir de que lo esencial, es el ser humano. La pirámide poblacional actual se mantiene con un patrón estacionario, la aspiración es la prolongación de la vida; lo que trae aparejado un incremento de las enfermedades crónicas no transmisibles y otros daños a la salud que prevalecen de forma creciente y sostenida en la morbilidad y mortalidad, lo que hace necesario el desarrollo de enfoques preventivos.⁷

Los hábitos nutricionales inadecuados, fundamentalmente cuando hay un consumo elevado de grasas, especialmente las que contienen ácidos grasos saturados de origen animal, provocan un aumento de lípidos en la sangre y este exceso de lípidos produce una acumulación de ácidos grasos y triglicéridos en las células hepáticas (hepatocitos), ya que es precisamente el hígado el órgano principal que participa en el metabolismo de las grasas.

El hígado graso no alcohólico simple tiene una prevalencia de un 20 a 23 %, esta prevalencia va en aumento y las causas primarias son la obesidad, dislipoproteinemia, la Diabetes Mellitus tipo 2 y el síndrome de insulinoresistencia.^{8,9,10}

El hígado funciona como un ecosistema, en el cual, los diversos componentes de su unidad estructural están funcionalmente interrelacionados y responden en forma unitaria a la agresión.

El ácido hepático es una interpretación funcional de la estructura del hígado, y los hepatocitos se describen dispuestos en tres zonas elípticas las cuales tienen gran importancia en la descripción y la interpretación de los modelos de degeneración, regeneración y efectos tóxicos específicos del parénquima hepático en relación con el grado o la calidad de la perfusión vascular de los hepatocitos. A causa del flujo

sanguíneo sinusoidal, en las tres zonas varían el gradiente de oxígeno, la actividad metabólica de los hepatocitos y el predominio de las enzimas hepáticas. La distribución de las lesiones hepáticas por isquemia y exposición a sustancias tóxicas puede explicarse mediante el uso de esta interpretación en zonas.¹¹

Cuando se observa una lesión al microscopio de luz o al microscopio electrónico, la respuesta tisular hay que entenderla en términos biológicos profundos, que nos indiquen lo que está sucediendo a nivel celular o molecular. Así, la interpretación del proceso patológico será más real, las clasificaciones que actualmente se hacen de las enfermedades serán menos rígidas y la práctica de la medicina tendrá un sentido más lógico.¹²

Con el advenimiento y el desarrollo de la computación y las nuevas técnicas de información, ha surgido la posibilidad de digitalizar las imágenes, con lo que se ha ganado en rapidez, productividad y abaratamiento de los costos. A pesar de que muchos programas de computación son sofisticados, existen propuestas de programas que con un mínimo de recursos son capaces de determinar los parámetros fundamentales como complemento del diagnóstico cualitativo básico.

Los parámetros morfométricos son una herramienta que permite la mejor comprensión de las relaciones entre los procesos de desarrollo-forma y estructura-función, así como procesos patológicos como son la inflamación-reparación, las atrofas, las hipertrofias y las hiperplasias, entre otros.¹³

La morfometría es una técnica poco costosa que permite obtener indicadores cuantitativos de los componentes celulares y tisulares.¹⁴

Los estudios morfométricos a nivel del hepatocito permiten evaluar los cambios morfológicos ante diversas situaciones patológicas.

En 1949, Horlick y Katz, realizaron estudios de arteriosclerosis experimental en pollos y comprobaron que el daño tisular en vasos sanguíneos aumentó mientras se incrementaba la dosis de colesterol ingerida, pero no estudiaron el hígado.¹⁵

En Cuba, entre los años 1987 y 1996, se hizo un estudio meta analítico que integró 5 estudios experimentales en los que se registraron los cambios producidos en el volumen nuclear de los hepatocitos como resultado de situaciones de estrés inducido por fármacos y hepatectomía.¹⁶

En el hospital provincial Vladimir Ilich Lenin de la provincia Holguín, se han realizado varias investigaciones morfométricas en casos de Hepatitis Viral que demostraron cambios en el volumen nuclear entre diferentes zonas del ácino hepático.^{17, 18}

En la Universidad de Ciencias Médicas de La Habana, se estudiaron las variables morfométricas: área nuclear y área citoplasmática, en hepatocitos de ratas albinas expuestas a la ingestión crónica de alcohol.¹⁹

Otro estudio realizado en 2008 en la Universidad de Murcia, valora el efecto de la dieta y el tratamiento medicamentoso sobre la Enfermedad Grasa del Hígado no Alcohólico inducida en pollos mediante una dieta hiperlipémica. Se realizó una valoración morfométrica cuantitativa utilizando un equipo de análisis de imágenes para precisar con mayor exactitud el depósito graso, constatándose que el mismo era homogéneo.²⁰

Todos estos estudios anteriores expresan un interés de la comunidad científica por estudiar, mediante la morfometría, la respuesta hepatocelular ante situaciones de daño inducido utilizando alcohol y fármacos, y como parte de los procesos patológicos desencadenados por la Hepatitis Viral; sin embargo, en Cuba no se han constatado evidencias de estudios, que en su diseño experimental, provoquen un estado de hiperlipidemia inducida como situación de estrés para determinar cuantificaciones morfométricas en hepatocitos.

Objetivos

Determinar los resultados de los valores medios de las variables morfométricas estudiadas.

Comparar las variables morfométricas estudiadas en las zonas del ácino hepático dentro de cada grupo.

Comparar el resultado de las variables morfométricas estudiadas, entre los grupos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo responde a un proyecto de investigación en las ciencias básicas biomédicas, cuyo objeto es el análisis de parámetros morfométricos en ratas Wistar sometidas a un modelo experimental de hiperlipidemia, que permitió la realización de un estudio analítico con enfoque cuantitativo considerando un sistema de métodos morfométricos y estereológicos. El mismo fue realizado en la Unidad de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, durante el período comprendido de enero de 2010 a junio de 2011.

Muestra

La muestra utilizada en la investigación proviene de un experimento realizado durante 30 días, a partir de un modelo experimental de hiperlipidemia, a través de la combinación de grasa de cerdo al 20% y caseína al 20%. Se utilizaron ratas machos de la especie *Rattus rattus*, cepa Wistar de 100 a 150g de peso corporal. Se formaron aleatoriamente tres grupos experimentales con 6 animales cada uno.

En el grupo I (control) se utilizó una dieta estándar, en el grupo II se utilizó una dieta estándar suplementada con 20% de caseína y 20% de grasa de cerdo; y el grupo III dieta estándar suplementada únicamente con grasa de cerdo al 20%.

Técnicas y procedimientos:

El estudio morfométrico del hígado se realizó a partir de las muestras de hígado fijadas en formol neutro al 10% y procesadas por la técnica clásica de inclusión en parafina procedente de dicho estudio. Se realizaron cortes transversales de 5 micrómetros de grosor y se prepararon láminas que se colorearon con hematoxilina y eosina bajo control de pH.

Se procedió a la realización del examen morfométrico de las láminas. El proceso se inició con la clasificación, separación y ordenamiento de las láminas.

Para efectuar las mediciones se utilizó el sistema morfométrico SCOPE PHOTO 3.0 para Windows, con licencia propietaria incluida en una solución tecnológica adquirida por Cuba.

La digitalización de las imágenes fue realizada con una cámara digital DCM500, acoplada a un microscopio binocular Olympus (Japón 1985, objetivos 20x y 40X). La digitalización se realizó con el objetivo 40x, previa selección de la zona con el objetivo 20x, para ello se buscaron marcadores biológicos en el tejido, que permitieron delimitar el área a estudiar.

Se estudiaron los hepatocitos de las tres zonas del ácino hepático de Rappaport: peri portal, intermedia y perivenosa. Se observaron las preparaciones histológicas, escogiendo zonas alrededor del espacio porta, en la zona intermedia de la vena central, de esa forma se seleccionaron dos espacios porta, dos venas centrales y

dos zonas medias de cada biopsia.

Fueron observadas 20 células por cada zona, seleccionando aquellas en las que se observaron bien los nucléolos y que se delimitaba bien su contorno y excluyendo las células binucleadas.

La medición se llevó a cabo contorneando los núcleos celulares y las membranas citoplasmáticas, así como trazando rectas entre puntos para obtener el diámetro.

La densidad de los sinusoides hepáticos se obtuvo mediante el conteo de todos los sinusoides que aparecieron en la imagen digitalizada, tantas veces como la imagen lo permitió.

Todas las imágenes obtenidas fueron respaldadas con sus trazos y anotaciones para consultas posteriores. Los datos obtenidos mediante la medición, se captaron almacenaron en una base de datos de Microsoft Access, diseñada específicamente para esta investigación, pero que permite ser reutilizada en procesos similares.

Todo el proceso de digitalización, mensuración, almacenamiento y procesamiento de los datos fue realizado en una computadora portátil bajo ambiente Windows, configurada para establecer interfaz con el microscopio digital.

Los datos fueron resguardados en medios externos de almacenamiento.

Métodos de investigación

Para la realización del presente estudio, se consideró un sistema de métodos formado por métodos teóricos, empíricos, estadísticos y particulares.

Los métodos *teóricos* como el hipotético-deductivo, el histórico-lógico y el análisis y síntesis permitieron la construcción y desarrollo de la teoría científica, la interpretación de la bibliografía consultada, la discusión y el análisis de los resultados, etc.

Los métodos *empíricos* contribuyeron a la obtención de la información, ya sea mediante la observación directa, así como mediante el diseño de un formulario para la captura primaria de los datos en las diferentes etapas de la investigación.

Los métodos *estadísticos* permitieron la operacionalización de variables, construcción de escalas, uso de medidas de resumen, así como la representación de las mismas en cuadros estadísticos.

Se trianguló la información, teniendo en cuenta la revisión bibliográfica exhaustiva que se realizó del tema, los datos recolectados en la investigación y los criterios propios del autor, se pudo resumir la información, expresándose en tablas; y finalmente llegar a conclusiones y recomendaciones.

Se utilizó la fórmula de Palkovits I para el cálculo del volumen nuclear del hepatocito según se expresa a continuación:

$$V=1.04\pi (ab)\sqrt{ab}$$

Donde:

V: Volumen nuclear

a: Diámetro mayor

b: Diámetro menor

n: Constante $\pi=3.14$

El Diámetro Nuclear se obtuvo midiendo el segmento que une a dos puntos del núcleo y pasando por el centro de este, como el núcleo no es una circunferencia exacta se generó un diámetro mayor y uno menor. La unidad de medida se expresó en micrómetros.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el análisis de varianza de un factor (ANOVA) a partir del planteamiento del contraste de los siguientes niveles:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$$

Donde H_0 asume que no existe diferencia significativa con relación al comportamiento del volumen nuclear, el área nuclear, el área citoplasmática, la relación área del núcleo/área del citoplasma, la cantidad de sinusoides; como parte de la medición morfométrica realizada entre las zonas para cada grupo. Por otra parte H_1 asume que existe diferencia significativa con relación al comportamiento del volumen nuclear, el área nuclear, el área citoplasmática, la relación área del núcleo/área del citoplasma, la cantidad de sinusoides; como parte de la medición morfométrica realizada entre las zonas para cada grupo.

Se tomó un nivel de significación $p=0.05$, para rechazar H_0 en valores de p inferiores a este.

El procesamiento de los datos se realizó mediante el paquete SPSS versión 11.0 y a través del mismo se reflejaron tablas y gráficos que posibilitaron la adecuada interpretación de la información acopiada. La frecuencia de los intervalos de confianza con el 95%, fueron utilizados para inferir el comportamiento puntual y poblacional de la media, la desviación estándar y la varianza.

Se emplearon además métodos propios de ciencias particulares como la Histología, que permitieron el corte, la preparación y la fijación histológica de los tejidos; así como herramientas informáticas que posibilitaron la digitalización y la segmentación de los tejidos.

Aspectos éticos

El empleo de animales de laboratorio fue respaldado por el aval del comité de ética de la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara. No se realizaron procedimientos que pudiesen afectar la seguridad de seres humanos.

El estudio fue conducido teniendo en cuenta las BPL de Toxicología Experimental. Todas las actividades fueron llevadas a cabo según las normas establecidas por los Procedimientos Normativos Operacionales (PNO) y fueron sujetas a las inspecciones de la UGC (PNO/ASC/0004). Se cumplieron las normas de Bioseguridad y Bioética establecidas para este tipo de ensayo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las células son unidades funcionales básicas de los organismos complejos y están

divididas en dos compartimientos principales el núcleo y el citoplasma.

El núcleo es la organela de mayor tamaño en la célula, está situado en la parte central de la misma y suele tener forma redondeada u ovalada. Es un archivo o registro de la célula, el repositorio de su material genético.²¹

La tabla 1 muestra la distribución de los diferentes diámetros nucleares obtenidos en el procedimiento de morfometría para cada grupo. Obsérvese que el grupo II evidencia los valores más elevados para las tres modalidades de diámetros nucleares obtenidas, siendo 7.78 μm para el diámetro mayor, 6.91 μm para el diámetro menor y 6.79 μm el diámetro medio.

Estudios realizados por Carlos y Bélgica para describir el hígado de cobayo mediante la determinación del diámetro medio del hepatocito y del núcleo celular, demostraron que los mismos poseen tamaños y formas variables, pero que no fueron significativos. Así, el diámetro medio del hepatocito fue de 17,25 μm y osciló entre 10,8 μm como mínimo y 27,0 μm como máximo. El diámetro medio del núcleo hepático fue de 7,31 μm , siendo el diámetro mínimo de 5,94 μm y el máximo de 10,8 μm .²²

Los resultados del presente trabajo en relación al diámetro menor y mayor del hepatocito son similares a los descritos anteriormente, aunque de manera general en los tres grupos estudiados se encontró un intervalo más pequeño entre el diámetro menor y mayor, lo que se debe a que se están estudiando diferentes tipos de roedores.

La tabla 2 muestra la distribución de la variable área nuclear en las zonas periportal, intermedia y perivenosa para los tres grupos estudiados (I, II, III).

Se puede apreciar que el mayor valor del área nuclear media se observa en el grupo II (42.72 μm^2) específicamente en la zona perivenosa (43.33 μm^2), no existiendo diferencia significativa entre las tres zonas de este grupo ($p > 0.05$). En el caso de los grupos I y III coincide el mayor valor de la media en la zona intermedia, observándose diferencia significativa entre los valores del área nuclear para las tres zonas de estos grupos ($p < 0.05$).

Olhan y cols. estudiaron en el 2006 las alteraciones morfológicas del tejido hepático de ratón, durante la fase aguda de la infección por *Trypanosoma cruzi* y constataron que los núcleos de los hepatocitos se presentaron semejantes, tanto en el grupo control, como en el infectado, a nivel de las regiones intermedias y centrolobulillar. En la región alrededor del espacio porta, los núcleos se presentaron mayores, confirmado por los valores aumentados para los diámetros mayor, menor y medio, volumen, área, perímetro y relación volumen/área, no observándose alteraciones de forma en los núcleos de los hepatocitos, en las tres regiones.²³

Estos resultados se corresponden con el presente estudio, en relación al área y volumen nuclear, ya que ambos parámetros están aumentados en el grupo II, pero con la diferencia de que en este caso, el incremento mayor se observa en la zona perivenosa, lo que se debe a la distribución enzimática que presentan los hepatocitos en relación al gradiente de oxígeno establecido a lo largo del sinusoides, diversos autores describen que los hepatocitos localizados en la zona perivenosa tienen un predominio de las enzimas implicadas en el metabolismo de los lípidos (enzimas encargadas de la síntesis del colesterol y del componente lipídico de las lipoproteínas).

En la tabla 3 se muestra el comportamiento del volumen nuclear en las tres zonas del ácino hepático por cada grupo estudiado.

El mayor valor del volumen nuclear se observa en el grupo II con un valor medio de $1317.44 \mu\text{m}^3$. En este grupo se constata que no existe diferencia significativa entre los valores de la media para las tres zonas estudiadas ($p > 0.05$), a diferencia de los grupos I y III en los que sí existe diferencia significativa entre las tres zonas, siendo la zona intermedia en la que se evidencian los mayores valores (1188.1 y $1109.9 \mu\text{m}^3$ respectivamente).

El volumen del núcleo de los hepatocitos puede modificarse según el estadio celular, cada núcleo somático tiene un tamaño que depende del contenido de ADN y proteínas, y se relaciona con la actividad funcional que posee en la interfase.^{2, 24}

Se ha demostrado que el volumen nuclear puede depender de dos aspectos importantes: el primero de ellos es la suma del contenido de ADN, proteínas y jugo nuclear, y el segundo el aumento exclusivo de proteínas y jugo nuclear, esto traduce dos estadios importantes que pueden definirse como la etapa en la cual el núcleo se prepara para la división celular y la etapa en que el núcleo dirige una intensa actividad metabólica celular respectivamente.¹⁶

En Cuba, en el período 1987 – 1996, fue realizado un estudio meta-analítico que incluyó cinco estudios experimentales realizados sobre los efectos que la inducción de estrés (fármaco y hepatectomía) provoca sobre el volumen nuclear de los hepatocitos. Los resultados mostraron que la zona más sensible a los efectos del estrés es la zona intermedia del lobulillo, el efecto consistió en una disminución del volumen nuclear de los hepatocitos.¹⁶

Los resultados de la presente investigación coinciden en que la zona intermedia es la más sensible a los efectos del estrés, ya que tanto en el grupo control como en el grupo III, es en ésta zona donde se obtienen los valores medios más altos del volumen nuclear, pero se difiere de los trabajos citados anteriormente en cuanto al efecto que produce el estrés en los hepatocitos, ya que en este caso al influir sobre los hepatocitos un estrés lipídico, el resultado observado consiste en un aumento del volumen nuclear.

Se plantea que existe una relación directa entre el volumen nuclear y la actividad celular, lo que se asocia con un aumento en la síntesis proteica, esto se relaciona con la síntesis de los complejos enzimáticos involucrados en el metabolismo de las grasas.

Existen estudios que consideran que los hepatocitos se desplazan en su ciclo de vida hacia la vena central y al acercarse al final de su vida sufren hipertrofia e hiperplasia celular, lo que naturalmente incluye al núcleo y justifica también la presencia de los valores altos del volumen nuclear a este nivel.⁶

Ríos Hidalgo et al, en una serie de casos de hepatitis crónica, al estudiar el volumen nuclear de los hepatocitos, determinó que el mayor volumen nuclear se encuentra en la zona perivenosa.¹⁷

Estos resultados coinciden con los encontrados en la presente investigación, donde el aumento del volumen nuclear fue más evidente en el grupo II (dieta estándar más grasa de cerdo y caseína), no encontrándose diferencias significativas entre las tres zonas del ácido, lo que sugiere que el estrés fue suficiente tanto en cantidad como en duración para producir un efecto uniforme en las tres zonas. Es válido señalar que a pesar de no encontrarse diferencias significativas entre las tres zonas del ácido en éste grupo, el mayor volumen nuclear se encuentra en la zona perivenosa.

En el año 2001, en la provincia de Holguín, se realizó un estudio sobre las hepatitis

virales aguda y crónica, en el que se observaron los mayores valores del volumen nuclear en la zona intermedia, en la hepatitis viral aguda y en la zona central, en la hepatitis crónica, y existieron diferencias altamente significativas al comparar los valores de las variables estudiadas a nivel de la zona intermedia y central en ambas enfermedades. En la hepatitis viral aguda, la mayor actividad metabólica se pudo localizar en la zona intermedia, mientras que en la hepatitis crónica, los valores se desplazaron hacia la vena central.¹⁸

En la tabla 4 se observa la distribución de la variable: área citoplasmática, en las tres zonas estudiadas para cada grupo.

El área citoplasmática mayor se observa en el grupo II con un valor medio de $293.35 \mu\text{m}^2$, seguido del grupo III con un valor de $224.66 \mu\text{m}^2$. En el análisis de las zonas, en los grupos I y II se constata que no existe diferencia significativa entre estas, sin embargo en el grupo III se evidencia diferencia significativa entre las tres zonas, siendo mayor el valor medio del área citoplasmática en la zona intermedia.

Una de las manifestaciones celulares de los trastornos metabólicos es la acumulación de sustancias en su interior. La sustancia se puede acumular en el núcleo o en el citoplasma. Cuando la sustancia es de naturaleza lipídica se acumula en el citoplasma y su abundancia varía en dependencia del grado de actividad celular.^{6, 24}

En el año 2003, en el Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón", se realizó un trabajo donde se describen las alteraciones morfométricas de los hepatocitos de ratas albinas que ingieren alcohol desde la adolescencia. Al comparar las 3 zonas no encontraron heterogeneidad zonal en relación con las variables morfométricas estudiadas, ni en animales controles ni en alcohólicos, además, las variables área nuclear y la relación núcleo/citoplasma, presentaron diferencias significativas entre las ratas alcohólicas y controles (las ratas alcohólicas presentaron valores mayores que los de las ratas controles), no así las áreas citoplasmáticas, que no variaron entre los hepatocitos de las ratas controles y alcohólicas.¹⁹

A diferencia de estos resultados, en el estudio que se defiende, se obtuvieron diferencias significativas entre las medias para los tres grupos en cuanto a la variable área citoplasmática, siendo mayor en el grupo sometido al estrés lipídico (grasa de cerdo y caseína) y específicamente en la zona intermedia. Estos resultados se justifican por la acumulación de grasa en el citoplasma del hepatocito, como resultado de un desequilibrio entre el suministro, formación, consumo y oxidación hepática de ácidos grasos.

En un estudio realizado en la universidad de Murcia en el año 2008, sobre el efecto de la atorvastatina sobre la Enfermedad Grasa del Hígado No Alcohólica (EGHNA) inducida en pollos mediante una dieta hiperlipémica, se utilizó un equipo de análisis de imagen, que permitió valorar el depósito graso a nivel centrolobulillar (zona 3) y las zonas 1 y 2 del lobulillo y por este método se encontraron diferencias significativas entre todos los grupos estudiados. En el grupo control no se apreciaron depósitos grasos y en los grupos no tratados con el medicamento, los valores del depósito graso fueron casi el doble con respecto a los tratados con el medicamento. El depósito graso fue homogéneo, es decir, no se encontraron diferencias entre la zona centrolobulillar y el resto del lobulillo.²⁰

Coincidiendo con los resultados anteriores, no se encontraron en el presente estudio diferencias significativas en el depósito graso en el caso del grupo II, lo que sugiere que el depósito graso se extendió a las tres zonas del ácino hepático como fue explicado anteriormente, no siendo así para el grupo III donde predominó en la

zona intermedia. En cuanto a este criterio, se asume que se debe a la heterogeneidad funcional y metabólica de los hepatocitos, según su localización dentro del ácino, se describe a la zona intermedia como una zona metabólicamente activa.

El comportamiento de la relación área nuclear/área citoplasmática se muestra en la tabla 5.

Como puede observarse, la relación área nuclear/área citoplasmática es mayor en el grupo I con un valor de 0.197 seguido del grupo III y del grupo II. La zona intermedia evidencia un valor mayor para el grupo I (0.247), sin embargo para el resto de los grupos dicha zona muestra los valores inferiores, siendo menor el del grupo II (0.148). El grupo I es el único que muestra diferencia significativa entre los valores de media para las tres zonas ($p < 0.05$).

El núcleo y el citoplasma tienen funciones distintas pero actúan en conjunto para mantener la viabilidad celular.¹¹

La relación núcleo/citoplasma expresa una relación metabólica funcional, cargas de elementos citoplasmáticos en relación con los elementos nucleares. Ambos con sus respectivas funciones. Debe existir una correspondencia en cuanto al tamaño del núcleo y el citoplasma, o sea, núcleos grandes con citoplasmas grandes, aunque se pueden encontrar núcleos pequeños con citoplasma grande y traduce signos de muerte celular.

En un estudio realizado en ratas macho alcohólicas adolescentes inoculadas con Heber-biovac HB, se analizaron diferentes variables morfométricas como área nuclear, área citoplasmática y relación núcleo/citoplasma. 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.⁵⁶ En el presente trabajo se encontró una relación núcleo/citoplasma muy baja en el grupo II, no existe diferencia significativa entre las tres zonas, pero es la zona intermedia donde se obtienen los valores más bajos, a diferencia del grupo control que presentó el valor más elevado de la relación núcleo/citoplasma y es en la zona intermedia donde esta relación obtuvo valores más elevados. Se infiere que estos resultados son debido a la presencia de abundantes inclusiones lipídicas residuales acumuladas en el citoplasma del hepatocito en el grupo II y a la elevada actividad metabólica de la zona intermedia. Se observa el mayor valor en el grupo control (12.41) seguido del grupo II y III con un valor medio de 9.13 y 8.05 respectivamente. En el análisis de las diferentes zonas estudiadas en los grupos, se comprobaron diferencias significativas en la distribución de los sinusoides para todos los grupos, en el grupo control el valor medio mayor se encuentra en la zona perivenosa (13.58), a diferencia de los grupos II y III donde el mayor valor se encuentra en la zona periportal con 9.83 y 8.16 respectivamente.

Los sinusoides están en íntimo contacto con los hepatocitos, reciben el aporte sanguíneo de la vena porta y de la arteria hepática y drenan en la vena centrolobulillar, son importantes para el intercambio de sustancias entre la sangre y las células hepáticas, función que es facilitada por la ausencia de lámina basal en algunos animales, como la rata, no existiendo una barrera importante para este intercambio.²¹

En un estudio realizado en el Hospital Provincial "V. I. Lenin" de Holguín en el año 2000 fueron analizados una serie de casos de hepatitis crónica y se encontró que el mayor valor lo incluye la densidad de los sinusoides alrededor de la zona porta y no existieron diferencias significativas en la distribución de la densidad de

sinusoides en las tres zonas estudiadas.¹⁷

Estos resultados son similares a los encontrados en la presente investigación ya que el valor medio mayor de sinusoides se obtuvo en la zona periportal en el caso de los grupos II y III, a diferencia del grupo control, en el cual se obtuvieron los valores mayores en la zona perivenosa. Se señala que sí existió diferencia significativa entre las tres zonas en todos los grupos de estudio.

En la literatura consultada no se encontraron otros trabajos donde se analizara la densidad de sinusoides para comparar con los resultados obtenidos en esta investigación.

La Tabla 7 resume los resultados de las variables morfométricas estudiadas y se comparan los resultados obtenidos entre los tres grupos. Se observa que para las variables área nuclear, volumen nuclear y área citoplasmática, el grupo II muestra los valores más elevados con valores medios de $42.72 \mu\text{m}^2$, $1317.44 \mu\text{m}^3$ y $293.35 \mu\text{m}^2$ respectivamente, y existe diferencia significativa entre los valores medios de estas variables cuando las comparamos con los dos grupos restantes, el grupo control y el grupo III ($p < 0.05$).

El grupo III presenta los valores menores para las variables área nuclear y volumen nuclear con valores medios de $36.44 \mu\text{m}^2$ y $1041.55 \mu\text{m}^3$ respectivamente. La variable área citoplasmática sí se encuentra aumentada, en este grupo, con relación al grupo control y presenta un valor medio de $267.473 \mu\text{m}^2$ pero es menor que el valor medio obtenido en el grupo II para esta variable.

En el caso de la relación núcleo/citoplasma, el valor menor se observa en el grupo II, con un valor de 0.152, seguido del grupo III con 0.17 y por último el grupo I en donde se obtuvo el mayor valor medio para esta variable, 0.197. Se demostró que también existen diferencias significativas entre los tres grupos ($p < 0.05$).

En cuanto a la densidad de sinusoides, los valores medios mayores fueron encontrados en el grupo control, que presentó un valor medio de 12.41, seguido del grupo II con un valor de 9,13 y el valor medio más bajo se detectó en el grupo III con un valor de 8,05. Para esta variable también se pudo demostrar que existen diferencias significativas entre los valores medios para todos los grupos.

Experimentos realizados por Kudchodkar y Lee con ratas diabéticas, demostraron que una dieta enriquecida con caseína produce una acumulación anormal de colesterol y una menor tasa fraccional de la esterificación del colesterol plasmático.²⁵

Esta demostración coincide con los resultados del presente trabajo. Al analizar los resultados entre el grupo II (sometido a dieta estándar, grasa de cerdo y caseína) con los resultados del grupo III (sometido a dieta estándar y grasa de cerdo), se puede apreciar claramente que en el grupo II, todas las variables morfométricas que implican al núcleo (área y volumen nuclear) están aumentadas, así como el área citoplasmática. Anexo 5.

Este aumento fue uniforme, ya que implicó a todas las zonas del ácido como se ha explicado con anterioridad, situación que se debe a la asociación entre la caseína y grasas saturadas en el grupo II, lo cual tiene un efecto hipercolesterolémico importante que propicia el incremento del depósito de grasa en el hepatocito.

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los valores medios de las variables morfométricas estudiadas,

el grupo más afectado es el grupo II.

Los parámetros morfométricos observados en el grupo II se comportaron de manera uniforme en las tres zonas del ácino hepático, lo que nos sugiere que se produjo un daño celular.

La respuesta del hígado ante el estrés lipídico es más evidente en la zona intermedia del ácino hepático.

El modelo experimental de hiperlipidemia empleando una combinación de grasas saturadas y caseína en la dieta de ratas Wistar es más eficiente para incrementar los depósitos grasos en el hepatocito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud [Internet]. Enfermedades Crónicas y Promoción de la Salud [citado 20 Oct 2011]. Disponible en: http://www.who.int/chp/chronic_disease_report/part1/es/index4.html
2. Caballero Uribe CV, Alonso Palacio LM. Enfermedades crónicas no transmisibles. Es tiempo de pensar en ellas. Salud Uninorte [Internet]. 2010 [citado 20 Oct 2011]; 26(2):[aprox. 2 p.]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=81719006001>.
3. Ministerio de Salud Pública, Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas en Salud. Anuario Estadístico de Salud 2010. La Habana (Cuba); 2010.
4. Suarez Loaiza J. Fisiopatología de la aterosclerosis, primera parte. Rev. costarric. cardiol [Internet]. 2001 Ago [citado 14 Nov 2011]; 3(2): [aprox. 9 p.]. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-41422001000200009&lng=es.
5. García Barreto D, García Fernández R, García Pérez-Velazco J, Concepción Milian A, Peix González A. Diagnóstico preclínico de la aterosclerosis: Función endotelial. Rev. Cubana Med 2003; 42 (1): 58-63.
6. Robbins SL, Cotran RS. Patología Estructural y Funcional. 6ª ed. Mc Graw-Hill Interamericana: España; 2000.
7. Ministerio de Salud Pública. Proyecciones de la Salud Pública en Cuba para el año 2015. La Habana (Cuba): Editorial Ciencias Médicas; 2006.
8. Calderín Bouza RO, Domínguez Álvarez C, Velbes Marquetti PE, Pérez Blanco LA, Cabrera Rode E, Orlandi González N. Insulinorresistencia e hígado graso no alcohólico, ¿existe relación causa-efecto entre ambas condiciones?. Rev Cubana Endocrinol [Internet]. 2009 Abr [citado 14 Nov 2011] ; 20(1):[aprox. 4 p.]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-29532009000100008&lng=es.
9. Gaemers IC, Stallen JM, Kunne C, Wallner C, Van Werven J, Nederveen A, Lamers W. Lipotoxicity and steatohepatitis in an overfed mouse model for non-alcoholic fatty liver disease. Biochimica et Biophysica Acta [Internet]. 2011. [citado 11 Oct 2011];[aprox. 4 p.]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443911000044>.
10. Adorna Carmenate Z. Esteatohepatitis no alcohólica: Fisiopatogenia y modelos experimentales. Rev Cubana Invest Bioméd [Internet]. 2007 Mar [citado 3 Jul 2011]; 26(1): [aprox. 5 p.]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002007000100007&lng=es.

11. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Histología. Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular. 4ªed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2005.
12. Llosa Tejada R. Hepatitis Alcohólica. Rev Med Hered [Internet]. 1991[citado 3 Jul 2011]; 2(1):[aprox. 14 p.]. Disponible en: <http://www.upch.edu.pe/famed/rmh/2-1/v2n1tr1.htm>
13. Sanz Pupo NJ, Ríos Hidalgo N, Seguí Sánchez M, Díaz Rojas PA, Fernández Sarabia PA. La digitalización de imágenes aplicadas a la anatomía patológica: Experiencias en la provincia Holguín, Cuba. Rev Cubana Invest Bioméd [Internet]. 2006 Dic [citado 26 sep 2011]; 25(4): [aprox. 4 p.]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002006000400001&lng=es
14. Díaz Rojas PA, Sánchez Meca J. El área nuclear como indicador diagnóstico en el carcinoma ductal de la mama: un estudio meta-analítico. Rev Cubana Invest Biomed. 2004;23(3):150-5.
15. Ayala I, García Pérez B, Doménech G, Montes AM, Ortega N, Ortega JV, et al. Uso del pollo como biomodelo experimental en arterioesclerosis. An Vet (Murcia). 2003; 19: 99-108.
16. Díaz Rojas PA, Sánchez Meca J. Meta-análisis del volumen nuclear de hepatocitos sometidos a diferentes condiciones de estrés. Correo Científico Médico de Holguín [Internet]. 2003 [citado 16 sep 2010]; 7(3): [aprox. 4 p.]. Disponible en: <http://www.cocmed.sld.cu/no73/n73ori8.htm>
17. Ríos Hidalgo N, Leiva Sánchez E, Torres Batista M. Indicadores morfométricos en una serie de casos de hepatitis crónica. Hospital Provincial "V. I. Lenin", 2000. Correo Científico Médico de Holguín [Internet]. 2001 [citado 16 sep 2010]; 5(4): [aprox. 4 p.]. Disponible en: <http://www.cocmed.sld.cu/no54/n54ori3.htm>
18. Leiva Sánchez E, Ríos Hidalgo N, Rodríguez Ramírez L, Díaz Rojas PA. Comportamiento del volumen nuclear y del infiltrado inflamatorio en las hepatitis virales aguda y crónica. Hospital "V. I. Lenin". Holguín. 2001. [Internet]. 2003 [citado 16 sep 2010]; 7(3): [aprox. 4 p.]. Disponible en: <http://www.cocmed.sld.cu/no73/n73ori4.htm>
19. González Bravo M, Herrera Batista A, Coro Antich RM, Puldón Seguí G. Alteraciones morfométricas de los Hepatocitos de ratas albinas que ingieren alcohol desde la adolescencia. Rev Cubana Invest Biomed. 2003;22(2):117-22.
20. Martín Castillo A. Efecto de la atorvastatina sobre la enfermedad grasa del hígado inducida en pollos mediante una dieta aterogénica [Tesis]. Universidad de Murcia; 2008.
21. Fawcett, D. W. Hígado y Vesícula Biliar. En: Fawcett DW. Tratado de Histología. 12 ed. Madrid: Editorial Interamericana-Mc Graw Hill; 1995. P. 713-48.
22. Rosas C, Vásquez PB, del Sol M. Descripción Histológica e Histoquímica del Hígado de Cobayo (*Cavia porcellus*). Int J Morpho [Internet]. 2010 Mar [citado 16 nov 2011]; 28(1): [aprox. 6 p.] Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022010000100021&lng=es
23. Olhan Ragonha LH, Carraro Abrahão AA, Sala MA, Lopes RA, Domingues R, Ribeiro do Prado JC et al. Estudio Morfométrico del Hígado de Ratón en la Enfermedad de Chagas Experimental. Int J Morphol [Internet]. 2006 [citado

20 Oct 2011]; 24(3): [aprox. 8 p.]. Disponible en:
http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-95022006000400015&script=sci_arttext

24. Hib J. Núcleo Interfásico. En: de Robertis ED. Biología Celular y Molecular. Buenos Aires: Editorial El Ateneo; 2008. P.293-306.

25. Kudchodkar BJ, Lee MJ, Lee NM, DiMarco NM, Lacko AG. Effect of dietary protein on cholesterol homeostasis in diabetic rats. Journal of Lipid Research [Internet].1988 [cited 2011 Oct 20]; 29: [about 7 p.]. Available from: <http://www.jlr.org/content/29/10/1272.short>.

ANEXOS

Tabla 1. Distribución del diámetro nuclear por grupos.

Grupos	Diámetro mayor	Diámetro menor	Diámetro medio
I	7.31	6.55	6.93
II	7.78	6.91	7.34
III	7.31	6.28	6.79

Tabla 2. Comportamiento del área nuclear por grupos y zonas.

Grupos	media del grupo n=360	zonas						ANOVA (F)	Significación (p)
		Periportal n=120		Intermedia n=120		Perivenosa n=120			
		media	desv.	media	desv.	media	desv.		
I	37.74	37.03	7.58	39.54	5.12	36.66	7.62	6.231	0.002
II	42.72	42.08	6.82	42.76	6.8	43.33	8.73	0.838	0.433
III	36.44	34.37	5.86	38.36	6.68	36.6	7.7	10.386	0.000

Tabla 3. Comportamiento del volumen nuclear por grupos y zonas.

Grupos	media del grupo n=360	zonas						ANOVA (F)	Significación (p)
		Periportal n=120		Intermedia n=120		Perivenosa n=120			
		media	desv.	media	desv.	media	desv.		
I	1111.12	1087.5	336.9	1188.1	256.4	1057.8	328.4	5.843	0.003
II	1317.44	1291.9	323.8	1304.9	327.3	1356.1	433.1	1.037	0.356
III	1041.55	964.24	241.6	1109.9	300.9	1050.5	315.8	7.769	0.000

Tabla 4. Comportamiento del área citoplasmática por grupos y zonas.

Grupos	media del grupo n=360	zonas						ANOVA (F)	Significación (p)
		Periportal n=120		Intermedia n=120		Perivenosa n=120			
		media	desv.	media	desv.	media	desv.		
I	198.53	202.67	42.77	198.24	42.83	194.68	43.74	1.033	0.357
II	293.35	296.67	77.29	299.8	71.61	283.58	62.76	1.771	0.172
III	224.66	212.15	50.21	241.3	58.72	220.53	44.62	10.181	0.000

Tabla 5. Comportamiento de la relación área nuclear/área citoplasmática por grupos y zonas.

Grupos	media del grupo n=360	zonas						ANOVA (F)	Significación (p)
		Periportal n=120		Intermedia n=120		Perivenosa n=120			
		media	desv.	media	desv.	media	desv.		
I	0.197	0.188	0.044	0.207	0.047	0.195	0.05	5.156	0.006
II	0.152	0.15	0.041	0.148	0.034	0.158	0.039	2.044	0.131
III	0.17	0.172	0.052	0.167	0.047	0.171	0.042	0.304	0.738

Tabla 6. Distribución de la densidad de sinusoides según grupos y zonas

variables	Media entre los grupos			ANOVA (F)	Significación (p)
	I	II	III		
Área nuclear (μm^2)	37.74	42.72	36.44	77.242	0.000
Volumen nuclear (μm^3)	1111.72	1317.44	1041.55	70.131	0.000
Área citoplasmática (μm^2)	198.53	293.35	224.66	267.473	0.000
Relación núcleo/citoplasma	0.197	0.152	0.17	89.769	0.000
Densidad de sinusoides	12.41	9.13	8.05	930.06	0.000

Tabla 7. Comparación de las variables morfométricas estudiadas entre los grupos.

Grupos	media del grupo n=360	zonas						ANOVA (F)	Significación (p)
		Periportal n=120		Intermedia n=120		Perivenosa n=120			
		media	desv.	media	desv.	media	desv.		
I	12.41	13	1.71	10.66	1.18	13.58	1.2	147.7	0.000
II	9.13	9.83	1.46	8.16	0.94	9.41	1.1	63.5	0.000
III	8.05	8.16	0.85	7.91	0.88	8.08	0.34	3.56	0.029

Fig. 1

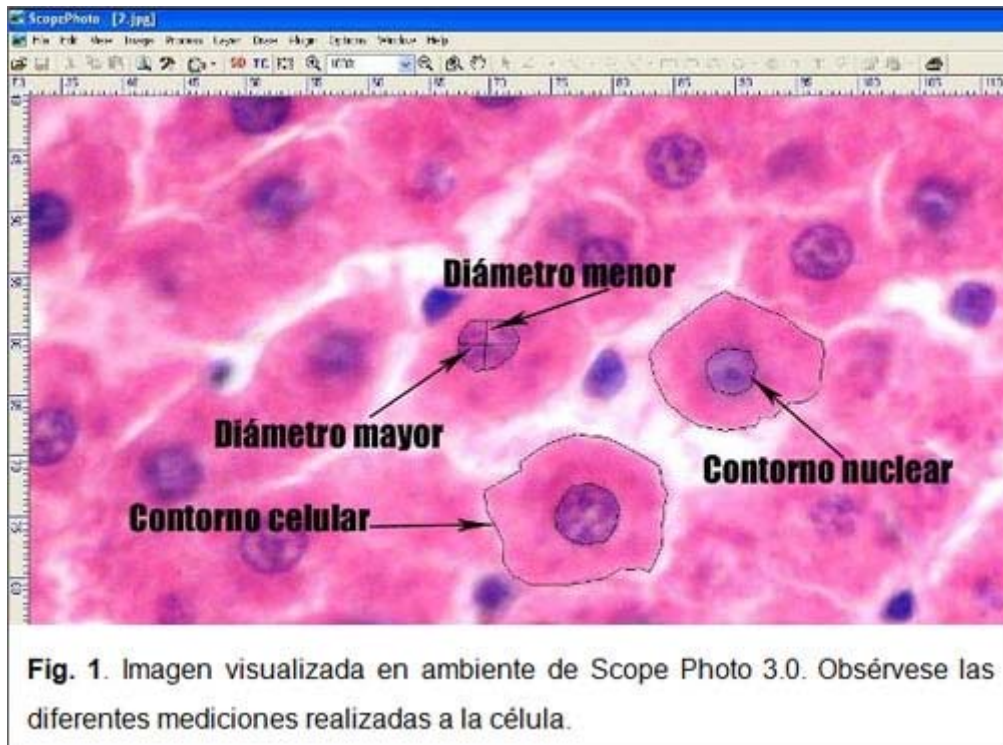


Fig.2

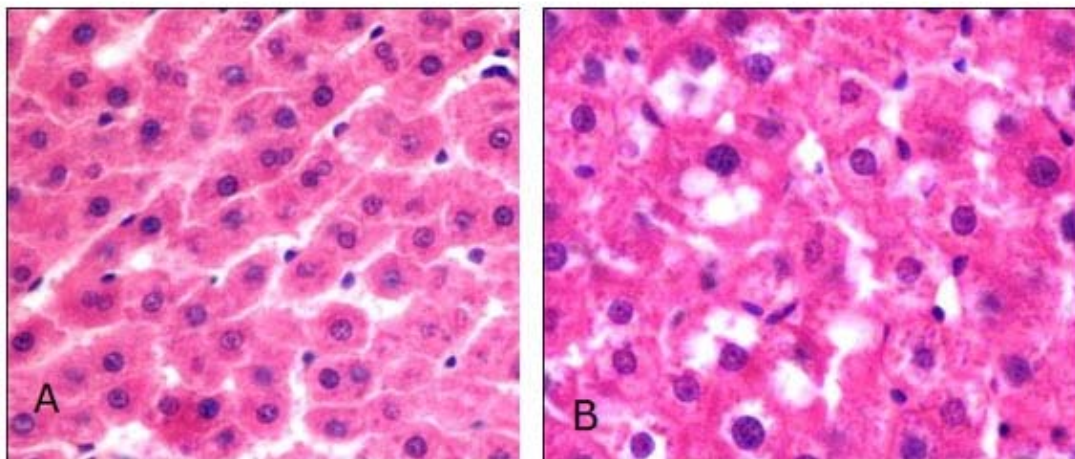


Fig. 2. Fotomicrografías de un preparado de hígado de ratas Wistar teñido con hematoxilina y eosina (20X).
A: Hígado normal. B: Hígado con depósitos grasos.