

## Diferencias microestructurales del hígado utilizando técnicas histoquímicas

### 2) Resumen:

### 3) Introducción:

Anatómicamente se encuentra ubicado a la derecha del plano medio de la región anterior del abdomen. Su cara parietal contacta con el diafragma y la visceral presenta impresiones producidas por los órganos contiguos: librillo, bonete y cuajar. En la parte dorsal se encuentra a un costado del lóbulo caudal la impresión del riñón derecho.

Histológicamente la unidad tradicional es el lobulillo hepático que consiste en una agrupación ordenada de hepatocitos demarcada por un delicado marco de tejido conjuntivo por el que se distribuyen las circulaciones portal, hepática y biliar. En corte transversal tiene una forma hexagonal y muestra una disposición radial de células parenquimatosas que formando columnas unicelulares (columna de Remark) confluyen hacia el centro en una vena centrolobulillar. Desde el punto de vista tridimensional se encuentran anastomosadas entre ellas formando placas cribiformes. Las columnas están separadas entre si por unos capilares modificados, los sinusoides hepáticos que unen la capilarización de la circulación venosa portal y de la circulación arterial hepática con la vena del centro del lobulillo. Esta es el origen de la vena hepática que abandona el órgano para unirse a la vena cava posterior. Los sinusoides son capilares con un recubrimiento endotelial y de lámina basal discontinuo lo que los hace aptos para la rápida transferencia de productos entre el medio interno celular parenquimatoso y el medio interno sanguíneo. Como parte de los sinusoides se encuentra una población de macrófagos fijos, las células de Kupffer, verdaderos basureros que fagocitan y digieren hematíes envejecidos y los múltiples antígenos que transporta la impura sangre portal. Como todo miembro del sistema monocítico macrofágico derivan de los monocitos circulantes.

Entre la célula parenquimatoso y la pared del sinusoide existe un espacio real, el espacio de Disse, a donde protuyen las microvelocidades hapatocitarias que amplían la superficie de contacto del parénquima con el lecho vascular. En este espacio se encuentran células de origen mesenquimal denominadas lipocitos o células de Ito, se cree desempeñan algún papel en el transporte de lípidos, en el almacenamiento de vitamina A y en actividades de tipo endócrino. En los estados patológicos pareciera que sufren una metaplasia hacia la diferenciación fibrinosa, encontrándose las responsables del desarrollo del tejido conjuntivo intralobullar especialmente en las estasis crónicas de origen cardíaco o en diversos procesos debido a sustancias tóxicas.

El sistema biliar se inicia en un espacio de sección capilar formado por la invaginación de la membrana citoplasmática de dos hepatocitos contiguos (el colangiolo), en este punto la membrana celular contiene microfilamentos de actina y miosina que desempeñan funciones contráctiles e impulsan la producción biliar. Aprovechando la disposición anastomótica de las placas hepatocitarias estos canalículos convergen hacia la periferia del lobulillo formando los canales intermedios de Hering los que desaguan en los conductos biliares extralobulillares en el espacio porta

En el punto de contacto de tres lobulillos contiguos existe un espacio ocupado por una condensación mayor de tejido conjuntivo por el que circulan las ramificaciones de la vena porta, de la arteria hepática y del conducto biliar extralobulillar: el espacio porta.

Tanto desde el punto de vista fisiológico como patológico el concepto micromorfológico actual es el del acido hepático (tras la efímera vigencia del denominado lobulillo de Rappaport de los años sesenta). Esta unidad fisiohistológica privilegia el modelo circulatorio portal y hepático a la par que

tiene en cuenta la forma como transita la producción biliar desde los espacios colangiales intralobulillares hasta dar origen al conducto biliar portal.

Esta forma de interpretar el diseño hepático favorece la interpretación de los cambios histológicos que se presentan durante el funcionamiento normal y patológico del órgano.

El acino es concebido como un área en forma de huso cuyos extremos unen dos espacios porta contiguos. Los arcos laterales del huso alcanzan las venas centrolobulillares de dos hepatocitos contiguos demarcando el parénquima que recibe sangre desde el espacio interlobulillar de las mismas arborizaciones capilares de la vena porta y de la arteria hepática. Del mismo modo la circulación biliar de los dos hepatocitos considerados terminan en los mismos canalículos de los espacios porta.

Las placas de hepatocitos comprendidas dentro del huso se dividen imaginariamente en tres sectores: uno interno que comprende el fino tejido conjuntivo interlobulillar y la denominada placa limitante, otro sector medio que llega hasta la mitad del recorrido de un cordón hepatocitario y un último externo que comprende los hepatocitos que se encuentran en torno a la vena centrolobulillar.

Si bien morfológicamente los hepatocitos parecen todos iguales su posición dentro del acino los hace diferentes frente a la agresión y a la forma de reaccionar fisiológicamente. Los hepatocitos de la placa limitante son los que reciben en primer lugar a la mezcla de sangre arterio-venosa y son lo menos lesionados en el caso de producirse hipoxia o anoxia; contrariamente son los más afectados cuando esa sangre transporta productos tóxicos. Se considera que las diferencias metabólicas en hepatocitos dispuestos en zonas distintas dentro del acino son más bien de tipo cuantitativo que no cualitativo, con todos los hepatocitos periacinares son especialmente vulnerables a la hipoxia o anoxia dada la alta carga de oxidasas de acción mixta que poseen.

No es parte del propósito de este trabajo el extendernos en las numerosas e importantes funciones que cumple el hígado; baste al menos el enumerar las más relevantes: formación de bilis, almacenamiento y liberación de carbohidratos, formación de urea, producción de proteínas plasmáticas, funciones varias en el metabolismo de los lípidos, inactivación de hormonas polipeptídicas, reducción y conjugación de hormonas esteroideas, síntesis de 25-hidroxicolecalciferol y acciones de detoxicación para sustancias residuales del medio interno o sustancias tóxicas exógenas.

En la práctica diagnóstica el hígado es tal vez el órgano que rara vez está ausente en el muestreo durante las necropsias.

La delimitación desde el punto de vista micromorfológico entre lo normal y anormal es a menudo difícil. La posición circulatoria del órgano y su relación con un medio tan antigénicamente complejo como es el tubo digestivo lo transforma en un blanco importante de impactos nosológicos. Debe tenerse en cuenta que más del setenta por ciento de la sangre que circula por el hígado es venosa y tiene su origen en el expuesto tubo digestivo.

Durante nuestro estudio y a partir de las evidencias que nos aportaban las muestras nos vimos obligados a considerar el enfoque de los denominados "cambios mínimos" y correlacionarlos con los hallazgos encontrados en el abomaso y en los intestinos delgado y grueso en cada animal estudiado.

Los cambios mínimos son la frontera que permite separar lo normal de lo patológico con cierto grado de racionalidad y permite dar explicación a las diferencias de rendimiento en la producción de carne o leche cuando clínicamente no hay evidencias de una clara disfunción hepática.

Entre el fallo o colapso hepático (por necrosis hemorrágica periacinar o por necrosis masiva con compromiso de la placa de hepatocitos centroacinares de lobulillos contiguos) y los cambios mínimos (tumefacciones y degeneraciones celulares, hiperplasia del sistema monocítico macrofágico, colangioectasia colangial o desordenamiento trabecular con afectación de la red de reticulina sinusoidal) hay un abanico de grados lesionales prácticamente infinito.

Todo órgano tiene modelos estereotipados para responder a la agresión; los mismos dependen fundamentalmente del tipo de célula parenquimatosa, de las características de la matriz extracelular y del diseño de su distribución circulatoria sanguínea y linfática.

El hepatocito es una célula altamente compleja y especializada en funciones diversas; con todo, posee un alto potencial mitótico que le permite reemplazar a las unidades envejecidas en la normalidad o disparar desde su reservorio en período celular Go una andanada proliferativa para repoblar el parénquima lesionado con una velocidad poco usual para modelos celulares tan

especializados fisiológicamente. Desde este punto de vista se lo clasifica como una célula de tipo lábil.

Dado que su aparato enzimático es abundante y complejo es comprensiblemente frágil a los estados de hipoxia o anoxia. El modo de manifestarse la caída de la recuperación energética que debe aportar el ATP es la inactivación de la bomba de sodio con la consiguiente retención de agua intracitoplasmática (tumefacción celular aguda). La progresión de la lesión en aparato energético se completa con la acumulación de agua en las cavidades circunscriptas por los sistemas de membranas formando vacuolas hídricas (degeneración microvacuolar o hidrópica). El último cambio de esta serie y sobre todo cuando la hipoxia o anoxia es provocada por bloqueo tóxico es la imposibilidad de movilizar los lípidos citoplasmáticos (degeneración grasa). Dado que el marco conjuntivo del lobulillo, aunque muy delicado en el bovino, es poco extensible. Al producirse un aumento en el volumen celular por el secuestro de agua o lípidos se produce un estrechamiento de los sinusoides y una pérdida de la regularidad radial de las columnas hepáticas que tratan de acomodar a sus células haciéndose tortuosas.

El otro parámetro patológico del hígado es tendencia a la fibroplasia cuando es agredido. Este hecho aparece en varios procesos patológicos graves tales como la congestión pasiva crónica con esclerosis de la vena centrolobulillar, la cicatrización posnecrótica o la fibrosis hepática difusa inter e intralobulillar producida por los alcaloides pirrolizidínicos, la nitrosamina o las aflotoxinas.

En los hígados de bovinos jóvenes el tejido conjuntivo es prácticamente inaparente entre lobulillos contiguos, encontrándose apenas concentrado; pero con un grado de maduración colágena muy baja, en los espacios porta. En animales adultos es común encontrar un aumento del conectivo perilobulillar y una colagenización importante en los espacios porta. Su presencia solo está denunciando la acumulación de agresiones leves y repetidas pero que no tiene un correlato clínico evidente. La patología hepática tiene sus reglas que derivan de su enorme potencial de reserva como parénquima; cuando hay cuadro clínico detectable por signología o por evaluación enzimática sérica es porque se está a las puertas de un fallo o colapso del órgano.

La infiltración de células proveniente de exudados en los espacios porta o en los límites conjuntivos del lobulillo es el signo histopatológico que denota un proceso inflamatorio mas o menos agudo. Con todo otro signo importante como parte del cuadro inflamatorio es el encharcamiento y ampliación de los sinusoides que se los ve conteniendo gran cantidad de PMN adheridos al endotelio vascular. La ampliación de los sinusoides por la plétora generalmente se hace a expensas de una atrofia de las células parenquimatosas.

El otro cambio marcador de lesión hepática es la proliferación de los canalículos biliares. En la enfermedad biliar primaria, sobre todo la obstructiva los nuevos conductos se forman a partir de los conductos interlobulares; en cambio en la enfermedad hepatocelular crónica (tóxica o inflamatoria) la proliferación canalicular deriva de los colangilos intralobulares preexistentes. Este modelo reaccional tan frecuente está por ahora incompletamente explicado, lo que si se reconoce que su presentación es a veces independiente del grado de lesión parenquimatosa y según el proceso actuante sería una respuesta a determinados mediadores químicos de la inflamación.

La necrosis hepática es el modo como el hígado responde a la anoxia - hipoxia o a la toxemia endógena o exógena. Excepto etiologías particulares (bacterias piógenas, bacilo TBC) el modelo es predominantemente coagulativo. Las posibilidades regenerativas del parénquima dependen del volumen de parénquima comprometido y especialmente del mantenimiento del andamiaje de la red de reticulina que soporta a las columnas y sinusoides. Sin esta guía puede darse cierto grado de regeneración en volumen, pero la funcionalidad de lo regenerado es mínima por la proliferación de tejido conjuntivo en el espacio de Disse y por faltar las correctas conexiones para la evacuación biliar. Este hecho patológico es regularmente no medido en la rutina diagnóstica pues requiere de la utilización de técnicas de impregnación argéntica que marque la reticulina.

En la literatura se insiste en cierta diferencia en el modelo reaccional del hígado según el parénquima esté a la izquierda o derecha de la masa orgánica. Esto ha sido comprobado en la rata y posiblemente en el perro. Se basa en el concepto del flujo portal continuo que lleva a que la porción izquierda reciba sangre procedente del bazo y del colon, mientras que la porción derecha recibe sangre proveniente del intestino delgado. Desde hace mucho tiempo en nuestro laboratorio los muestreos de hígado se hacen por separado siendo hasta ahora el resultado poco relevante en el bovino.

**4) Materiales y métodos:**

El diseño del ensayo que utilizó 37 terneros en estaca de una misma guachera y origen durante los 49 días que duró la experiencia fue el siguiente:

- a) Los animales calostraron durante los cinco primeros días de vida.
- b) Al sexto día se sacrificaron tres animales identificados como “testigos lactantes”, y se dividieron los restantes en dos lotes identificados como “testigos con sustituto lácteo” (18 animales) y “terneros Ruter®” (16 animales).
- c) Los testigos con sustituto fueron alimentados con el producto comercial de ACA según sus propias instrucciones (1), y los terneros Ruter® se alimentaron siguiendo las instrucciones del fabricante (2).
- d) El muestreo se efectuó en seis períodos y el plan de necropsias programado es el que se muestra en el siguiente cuadro:

Etapa	Día de ensayo	Testigos lactantes	Testigos con sustituto lácteo	Terneros Ruter®
1º	5º	3	0	0
2º	18º	0	3	5
3º	26º	0	2	4
4º	34º	0	3	3
5º	39º	0	3	4
6º	49º	0	7	0
<b>Animales estudiados</b>	<b>Total</b>	<b>3</b>	<b>18</b>	<b>16</b>

- e) El muestreo estuvo constituido por piezas de 2 x 2 centímetros del lado derecho e izquierdo del órgano que se colocaron separadamente en Formol al 10%. Las muestras se entregaron al Laboratorio dentro de las 24 horas de su obtención.

El proceso de laboratorio consistió en reducción de tres piezas por muestra, refijación por 24 horas en Formol al 10% y proceso conducente a la obtención de bloques incluidos en parafina. Se seleccionó un taco y se obtuvieron tres cortes de 3 micrones con 100 micrones de separación entre uno y otro, se montaron en portaobjetos silenizados dobles para someterlos a las coloraciones de Hematoxilina de Mayer – Eosina, Tricrómico de Van Gieson, Ácido Peródico de Schiff (PAS) e Impregnación Argéntica de Del Río Hortega con reducción con Formol al 1%. Los cortes se observaron en un microscopio trinocular Olympus CX 40 y las imágenes se levantaron con la utilización una cámara digital Olympus C-3000 montada sobre sus adaptadores y se procesaron en el programa Microsoft Photo Editor archivándose bajo formato JPEG. Para efectuar las mediciones se incorporó un retículo micrométrico en uno de los oculares del microscopio.

**5) Desarrollo:**

Como ha sido una constante en toda la experiencia, hemos analizado la información mediante dos procedimientos básicos: primeramente una observación microscópica ordenada y general de los cortes histológicos y luego la selección y medición de marcadores tisulares y celulares que hemos seleccionado como importantes según el órgano considerado.

Los datos relevados por la segunda metodología fueron luego sometidos a tratamiento estadístico para comprobar su grado de significancia.

En el cuadro siguiente se detallan los correspondientes indicadores para el hígado derecho e izquierdo evaluados separadamente.

Número	Indicador	Parámetro, aumento de observación y técnica utilizada
(I)	Hepatocitos SLA	1) Presencia 2) Ausencia

		Objetivo x 4 Hematoxilina de Mayer – Eosina
(II)	Hepatocitos con degeneración microvacuolar	1) Presencia 2) Ausencia Objetivo x 40 Hematoxilina de Mayer – Eosina
(III)	Hepatocitos con degeneración grasa	1) Presencia 2) Ausencia Objetivo x 40 Hematoxilina de Mayer – Eosina
(IV)	Infiltración inflamatoria periportal o intrasinusoidal	1) Presencia 2) Ausencia Objetivo x 40 Hematoxilina de Mayer – Eosina
(V)	Desarrollo y maduración del tejido conjuntivo perilobulillar y centrolobulillar	1) Poco aparente y no colagenizado 2) Grosero y colagenizado Objetivo x 40 Tricrómico de Van Gieson
(VI)	Ordenamiento de las columnas de Remark y aspecto citoplasmático de los hepatocitos	1) Lineales, radiales con hepatocitos SLA 2) Tortuosas, no regularmente radiales con hepatocitos con TCA o degeneración microvacuolar. Objetivo x 40 Tricrómico de Van Gieson
(VII)	Desarrollo del tejido reticular intralobulillar y del sistema macrofágico de Kuffer	1) Fibras delicadas y lineales con células de Kuffer de núcleo fusiforme y distribución regular. 2) Fibras grumosas y discontinuas con células de Kuffer de núcleos groseros, polilobulados con distribución irregular. Objetivo x 40 Impregnación Argéntica de Del Río Hortega con reducción.
(VIII)	Ordenamiento de las columnas de Remark y aspecto citoplasmático de los hepatocitos	1) Lineales, radiales con hepatocitos con delicada granulación citoplasmática. 2) No lineales, no regularmente radiales y con hepatocitos con grosera granulación citoplasmática Objetivo x 40 Impregnación Argéntica de Del Río Hortega con reducción.
(IX)	Distribución de los gránulos de glucógeno de los	1) Uniformemente

	hepatocitos respecto al lobulillo hepático.	2) distribuidos en el lobulillo. No uniformemente distribuidos con disposición perilobulillar o centrolobulillar  Objetivo x 40 Ácido Peródico de Schiff.
(X)	Modelo de granulación glucogénica intracitoplasmática	1) Intensa, delicadamente pulverulenta y en todos los hepatocitos del lobulillo. 2) Poco intensa y groseramente granular presentándose hepatocitos con escasa o nula carga glucogénica.  Objetivo x 40 Ácido Peródico de Schiff.

Los resultados obtenidos se muestran en el siguiente cuadro:

Hígado derecho e izquierdo:

Nota. Se informan de modo conjunto aunque las observaciones fueron realizadas separadamente pues no se encontró diferencias entre las lecturas.

Indicador	Etapa										
	1º Lactante	2º		3º		4º		5º		6º	
		SL	R	SL	R	SL	R	SL	R	SL	R
(I)	1 (1)	1 (1)	1	1 (1)	1	1	1	2 (1)	1	2	
(II)	2 (1)	2 (1)	2	2 (1)	2	1	2	1 (1)	2	1	
(III)	2	2 (1)	2	2	2	2	2	2	2	2	
(IV)	2	2	2	2	2	2	2	2 (1)	2	1 (2)	
(V)	1	2 (1)	1	2	1	2	1	2 (1)	1	2 (3)	
(VI)	1	1 (1)	1	2	1	2	1	2	1	2	
(VII)	1	1 (1)	1	2	1	2	1	2	1	2	
(VIII)	1	1 (1)	1	2	1	2	1	2	1	2	
(IX)	2	1 (1)	1	2	1	2	1	2	1	2	
(X)	2	1 (1)	1	2	1	2	1	2	1	2	

(1) En dos de tres muestras

(2) En cuatro de siete muestras

(3) En seis de siete muestras

Debe consignarse que el estudio de este órgano se efectuó en dos etapas: la primera con la coloración de rutina y dado que fueron poco reveladores los indicadores que se pudieron evaluar con su aplicación (Indicadores de I a IV) se pasó a un segundo estudio utilizando técnicas histoquímicas que realmente marcaron diferencias (Indicadores de V a X) que permiten interpretar las comprobaciones clínicas en lo que hace a ganancia de peso y estado del pelo entre las dos poblaciones.

## 6) **Discusión y conclusiones:**

Con la técnica de rutina (H-E) los cambios encontrados son sugestivamente mínimos.

Correlacionando estos hallazgos con las observaciones hechas en abomaso e intestinos delgado y grueso presumíamos que se iban a encontrar diferencias mayores.

Desde el punto de vista de lesión parenquimatosa solo puede asegurarse una más constante presencia de procesos de tipo degenerativo en los animales que se alimentaron con sustituto lácteo, pero sin llegar al grado de la necrosis aunque más no sea unicelular.

Signos histológicos de reacción inflamatoria con encharcamiento sinusoidal e infiltrados nodulares periportales compuestos por mononucleares solo se encontraron en la etapa 6<sup>o</sup> en estos animales. Tampoco en este caso los cambios regresivos parenquimatosos fueron espectaculares.

El signo histológico de proliferación de los canalículos biliares estuvo ausente durante toda la prueba en cualquiera de las poblaciones.

La aplicación sobre el mismo material de otras técnicas puso en evidencia la presencia de algunos cambios que diferencian el estado morfológico y seguramente funcional.

El Tricrómico de Van Gieson mostró que el tejido conjuntivo perilobulillar y el que rodea a la vena centrolobulillar era más abundante y maduro en los animales que se alimentaron con sustituto lácteo. Este cambio, indicativo de agresión sobre el parénquima hepático no fue visto en los que se trataron con Ruter®. Se debe consignar que con todo este hecho no se extendía al interior del lobulillo a lo largo de la basal sinusoidal y que en ningún caso se observaron fenómenos deseudolobulillación.

Con esta técnica y con la técnica argéntica fue notoria diferencia de disposición de los hepatocitos en sus columnas. La tumefacción celular del grupo que consumió sustituto lácteo obligó a disponer los hepatocitos en columnas tortuosas. Con la técnica argéntica la granulación citoplasmática se observó más grosera, signo microscópico que habla de un proceso de apoptosis de restos membranosos.

La misma técnica argéntica mostró un sistema de Kupffer mas exigido en los animales que se alimentaron con sustituto lácteo, seguramente por un mayor aporte antigénico derivado de las circulaciones de la región tubular que habían sido también estudiadas y que mostraban cambios de tipo inflamatorio de leve a moderado a nivel del abomaso y del duodeno y yeyuno.

La confrontación hecha en batería de la cantidad de glucógeno hepatocitario presente por reacción colorimétrica demostró que los animales que fueron tratados con Ruter® poseían en todas las etapas hepatocitos con mayor y mejor distribuida carga de reserva energética.

El último indicador a consignar no es de relevancia menor: las posibilidades de una regeneración hepática, no solo en masa sino funcional, está atada a la permanencia de una red de reticulina.

Los animales tratados con Ruter® mostraron que la red de reticulina que soporta a las columnas de hepatocitos y a los sinusoides estaba íntegra, de fibras gruesas y bien teñidas por la plata.

En cambio en el otro grupo, en casi todas las etapas, la red se mostraba con fibras discontinuas, de trazado irregular y de aspecto grumoso o granular, evidencia de una apetencia disminuida a al plata reducida.

En síntesis comparando las dos poblaciones se puede concluir que los animales tratados con Ruter® terminaron su etapa de prerumiante con un hígado con un parénquima mejor conservado tanto citológica como histológicamente, con un sistema mononuclear macrofágico no exigido antigénicamente, con una armazón conjuntiva no madura o hialinizada, con un esqueleto reticular crítico mejor conformado y con una reserva glicogénica mayor. Todo esto hace prever al menos en el comienzo de la etapa de rumiante un mejor desenvolvimiento fisiológico del órgano y una predisposición fuerte frente a descargas nosológicas.

#### Autores:

Dres. Alejandro Lis (Coordinador) y Fernando Barra (Prueba a campo y necropsias) – Profesionales de la Asociación de Cooperativas Argentinas – San Nicolás (Pcia. de Buenos Aires)

Ing. Ago. Félix Beltramino (Tratamiento estadístico) – Cátedra de Genética y Mejoramiento Animal – Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral – Esperanza (Pcia. de santa Fe)

MV Carlos J. Peralta y Vet. Paula Rejf (Estudio histológico) – Laboratorio de Cito e Histopatología - Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral – Esperanza (Pcia. de santa Fe)

Esperanza, 21 de marzo de 2003.