

Estudi morfomètric del compartiment citoplasmàtic de l'hepatòcit regenerant fixat per perfusió.

J. Serratosa, O. Bachs, M^a J. Coll, C. Enrich i J. Domingo.

Departament d'Histologia i Biologia cel·lular, Facultat de Medicina Universitat de Barcelona, Casanova 143, 08036 Barcelona.

Abstract

Morphometric study of the regenerating hepatocyte cytoplasmic compartment by perfused fixation.

Structural and ultrastructural changes in rat hepatocytes during the first 48 hours following partial hepatectomy (p.h.) were studied. The weight of the remaining liver at various times after 2/3 p.h. was determined as a percentage of its weight at the time of operation calculated from the known weight and the percentage of removed liver. Liver weight increase immediately after surgery and at 48 hours p.h., 24% of the removed hepatic mass was restored.

For the microscopic and morphometric studies, livers were perfused with gluteraldehyde. In these conditions no evident changes at the ultrastructural level were observed. Livers were studied using electron microscopic morphometry. Changes in the total mitochondrial volume and in the number of mitochondria per hepatocyte were observed. Likewise we have detected modifications in the average hepatocyte volume, in the total lysosome volume and a massive accumulation of lipids in the form of lipid droplets. These changes appear to be secondary effects associated with the stimulation for, but not necessary to, cell division.

Introducció

El fetge regenerant, després d'una hepatectomia parcial, és un model molt emprat per l'estudi del creixament controlat in vivo i un sistema per l'estudi comparatiu dels mecanismes de carcinogènesi o de creixement incontrolat (Bresnick, 1971). Encara que el fetge regenerant ha sigut molt estudiat (veure la revisió de Bucher i Malt, 1971), els mecanismes bàsics que dirigeixen la iniciació i la regulació de la regeneració no es coneixen amb precisió.

Hi han molts estudis estructurals i ultraestructurals fets durant la regeneració hepàtica al fetge de rata (Aterman, 1961; Bernhard i Rouiller, 1956; Fawcett, 1955; Takahashi, 1960; Jordan, 1964; Virágh i Bartók, 1966; Stenger i Confer, 1966; Becker i Lane, 1965; Lane i Becker 1966a; 1966b; 1967; Bartel et al., 1977). No obstant hi ha pocs estudis quantitius dels canvis ultraestructurals que es donen als estadis inicials després de la hepatectomia parcial. Un d'ells (probablement el més complet), és el de Rohr et al. (1970) i més recentment, el de Murray et al. (1981). En el primer d'aquests dos treballs les mostres són agafades a diferents hores del dia i després de practicar

repetides biòpsies i la recollida de mostres es molt espaiada. El segon treball presenta unes condicions més estandaritzades i un control més rigurós a l'establiment dels animals, però utilitzen rates de diferent soca (Wistar) i sexe (femelles) a les emprades per nosaltres. Totes aquestes variacions són susceptibles de donar resultats diferents quan es valora la resposta regenerativa i quan es volen fer estudis quantitius ja sigui morfomètrics o emprant altres metodologies. Malgrat això probablement l'aspecte més important del nostre estudi que, per realitzar-se utilitzant diferents condicions i soca de rata, les dades obtingudes ja podrien presentar un aspecte novedós, resideix en que l'estudi s'ha fet fixant el fetge dels animals per perfusió del gluteraldehid. Aquest aspecte és important per que després dels estudis de Fahimi (1967) a fetge normal i d'alguns resultats concrets presentats per Grisham et al. (1975) en regeneració hepàtica, es demostra que la no fixació per perfusió del fetge comporta l'aparició d'artefactes que afecten fonamentalment al compartiment lisosòmic (aparició de molts autofagosomes quan es fixa per immersió) i al compartiment mitocondrial (inflament i baixa electrodensitat dels mitocondris dels hepatòcits fixats per immersió). En les condicions emprades per nosaltres l'aspecte d'aquests compartiments no difereix del que presenten en els hepatòcits normals i això ens fa pensar que a l'hora de quantificar morfomètricament els diferents compartiments, els resultats puguin ser més precisos donada l'absència d'artefactes de fixació.

L'any passat varem presentar els nostres resultats obtinguts en aquestes condicions al compartiment nucleal, nucléolal i de condensació de la cromatina (Serratosa et al. 1984). Enguany presentem els obtinguts a diferents compartiments citoplasmàtics amb el propòsit d'oferir un estudi morfomètric més complet de l'hepatòcit regenerant fixat en les millors condicions i realitzat amb el mateix tipus d'animals (edat, sexe, establiment, etc.) de manera que els resultats siguin el més autoconsistents possible.

Material i mètodes

Animals: s'han utilitzat rates Sprague Dawley de 220-250 gr. de pes i de 8-10 setmanes d'edat. Els animals han estat sotmesos durant tota la seva vida a períodes diaris de llum foscor alternatius de 12 hores. S'han alimentat amb menjar de manteniment per rata-ratolí a base de pinso premsat (Panlab, S.A.). L'aigua de beguda s'ha administrat a vo-

luntat.

L'hepatectomia parcial s'ha realitzat segons el mètode de Higgins i Anderson (1931), previa anestèsia dels animals amb Ketolar (Parke-Davis, S.A.) a una dosi de 150 mgr. per Kgr. de pes corporal. Les operacions s'han fet sempre entre les 8 i 10 hores A.M.

Restaurament de la massa hepàtica: el pes del fetge remanent dels animals al moment de l'hepatectomia parcial s'ha determinat a partir de la relació estimada entre el pes del fetge i el pes corporal (a partir d'animals control) i restant al pes total de fetge estimat, el pes de fetge tret durant l'operació. La diferència entre aquest valor i el pes del fetge dels animals al moment del sacrifici (es a dir a una hora determinada de la regeneració) ens ha permès valorar el % de massa hepàtica restaurada, a les diferents hores. El nombre d'animals emprat per valorar aquest paràmetre per cada punt de regeneració ha oscil·lat entre 6 i 16.

Preparació del teixit: la fixació dels fetges s'ha realitzat segons el mètode descrit per Fahimi (1967). El fixador utilitzat ha sigut glutaralhid al 1.5% amb tampó cacodilat sòdic 0.15 M, pH=7.4 ajustat a una osmolaritat de 340 miliosmols amb sucrosa. El fluxe de perfusió ha sigut constant i de 7 ml/min. Després s'ha postfixat amb tetròxid d'osmi al 1% amb el mateix tampó durant 1 hora, deshidratat gradualment amb alcohol i incluint amb resina DURCUPAN. Les seccions ultrafines, daurades-platejades (aproximadament 80 nm.de gruix) s'han montat en reixetes de coure de 200 mesh i contrastades amb citrat de plom. Durant la deshidratació s'ha fet un contrast previ amb acetat d'uranil segons descriuen Farquar i Palade (1965).

Morfometria: el volum cel·lular mitjà dels hepatòcits ha sigut determinat a partir de talls semifins de gran superfície i valorant, per microscòpia òptica la densitat de volum nucleal, respecte al volum de l'hepatòcit i el volum nucleal absolut (Serratosa et al. 1984). El nombre d'animals per interval de temps, ha sigut de 3.

L'estudi morfomètric s'ha realitzat seguint essencialment la metodologia descrita per Weibel et al. (1969): s'han utilitzat 3 animals per punt. De cadascun s'han tallat 2 blocs i de cada bloc s'han realitzat 15 fotografies. Es a dir, 30 fotografies per animal i 90 per cada interval de temps. L'augment microscòpic ha sigut de 5000 i la magnificació total de 20.000. La calibració dels augments microscòpics s'ha fet amb una reixeta que presenta una xarxa de 2160 línies/mm i que s'ha

posat al moment de fer cada grup de fotografies. L'augment fotogràfic total s'ha calibrat posant a l'ampliadora els negatius corresponents a les reixetes de calibració per cada grup.

Resultats

A la figura 1 es presenten els resultats obtinguts de la taxa de restaurament de la massa hepàtica: durant el període que compren les primeres 24 hores aquest paràmetre augmenta de forma linial (un 2.3% cada 6 hores). Entre les 24-30 hores hi ha un fort increment (un 6.36% en 6 hores). Entre les 30 i 42 hores l'augment és també linial i del mateix ordre de magnitud que el trobat durant les primeres 24 hores. Finalment, entre les 42 i 48 hores del procés es torna a produir un increment més gran que arriba a ésser d'un 4.34% en 6 hores per tornar a baixar entre les 48-54 hores del procés. Aquest comportament cíclic de l'increment de la massa hepàtica coincideix amb les dues ones d'entrada a la síntesi de DNA i a la mitòsi que caracteritzen el procés regeneratiu.

A la figura 2 es mostra l'evolució del volum cel.lular mitjà dels hepatòcits durant les 48 primeres hores que segueixen a l'hepatectomia parcial. Aquest paràmetre augmenta ràpidament per arribar a ésser 1.5 vegades els valors control a les 12 hores. A les 24, pràcticament s'ha duplicat (1.92 vegades) i a les 28, es troba un màxim que és de l'ordre de 1.4 cops els valors normals. A les 48, quan ja s'han completat els 2 primers cicles de divisió dels hepatòcits que es produeixen en aquest interval de temps, el volum cel.lular mitjà continua augmentat respecte als valors control de manera que és més semblant al que trobem a les 12 hores.

A la figura 3 (a) es presenten els resultats de l'estimació morfomètrica de la densitat de volum mitocondrial dels hepatòcits referida al volum d'aquestes cèl.lules. Durant les 8 primeres hores no hi han variacions significatives d'aquest volum (el compartiment mitocondrial representa gairebé un 22% del volum de l'hepatòcit). A partir de les 12 hores (16% del volum de l'hepatòcit), va baixant aquest valor de manera gradual fins a constituir tant sols un 9% a les 48 hores. A la figura 3 (b) presentem el volum mitocondrial mitjà en micres cúbiques. Durant les primeres 24 hores hi han oscil.lacions que són poc significatives però a partir d'aquest moment es produeix un augment que a les 28 hores és significativament més alt. Entre les 34 i 48 hores el volum

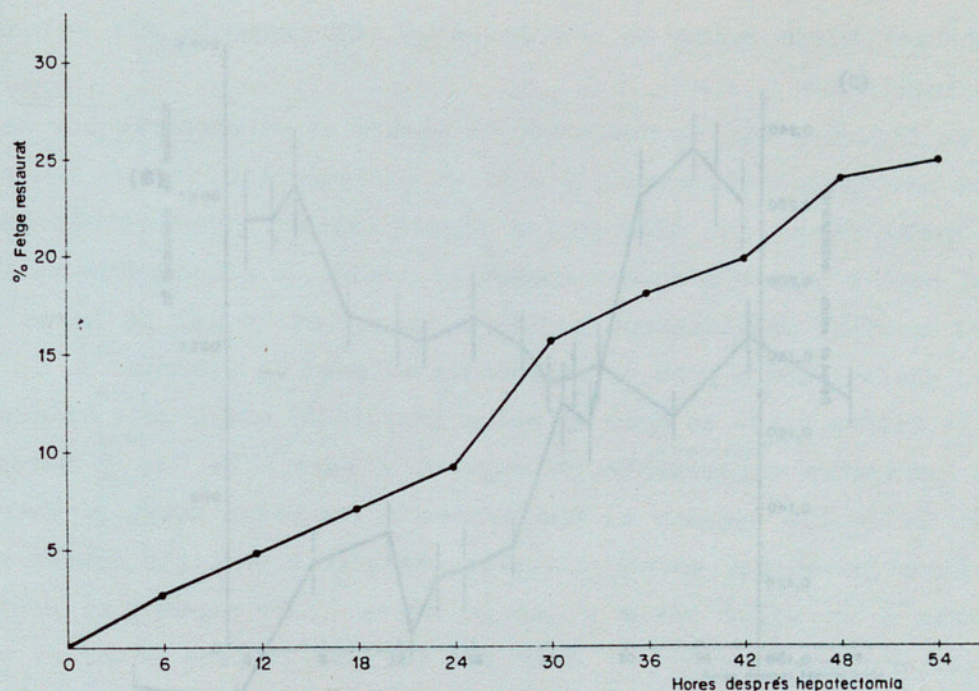


Figura 1. Taxa de restaurament de la massa hepàtica durant el procés regeneratiu. El nombre d'animals per promitjar cada punt ha oscil·lat entre 6 i 12.

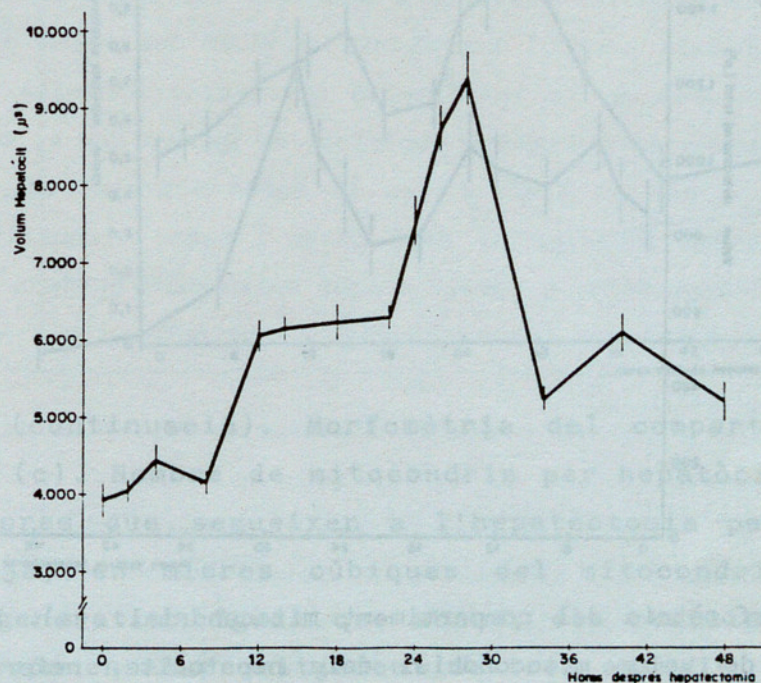


Figura 2. Estimació morfomètrica del volum mitjà, en micres cúbiques, dels hepatòcits a les diferents hores després de l'hepatectomia parcial, a l'abscisa. Cada punt es el resultat de promitjar els valors corresponents aa 3 rates.

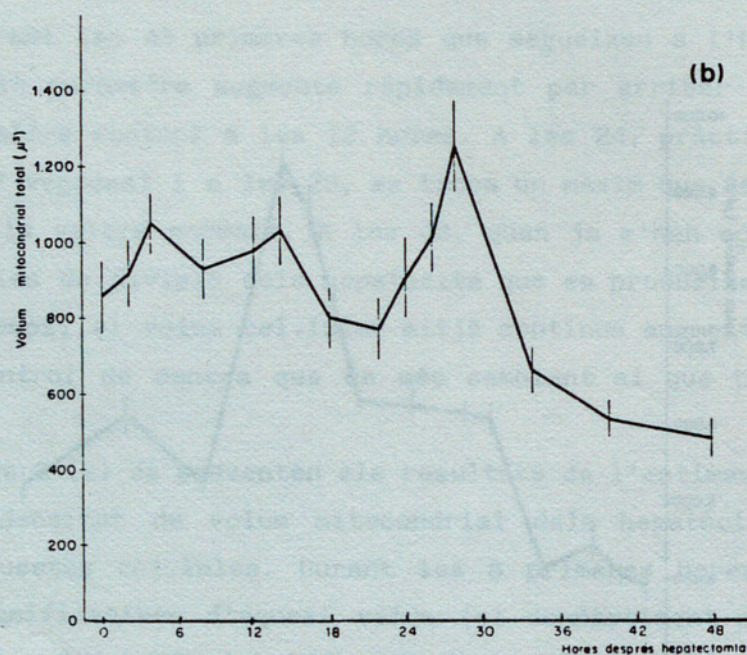
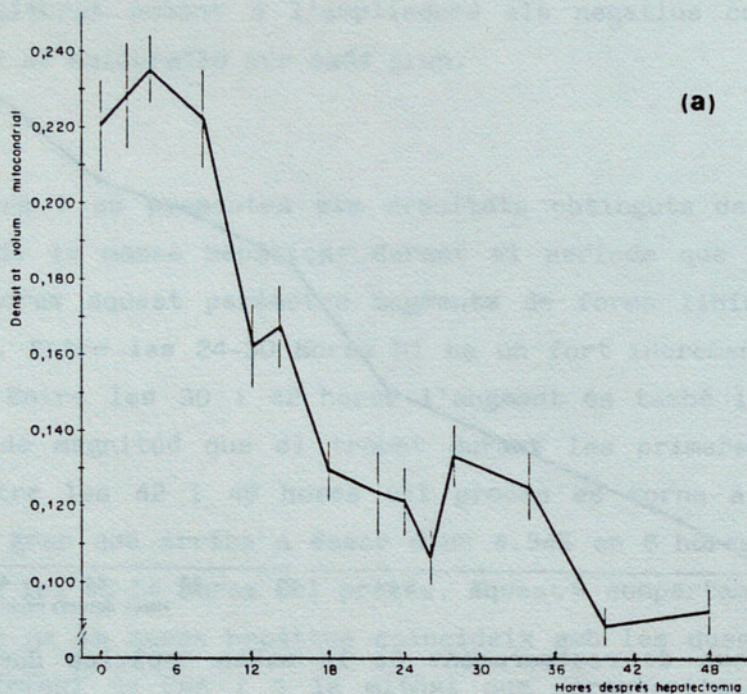


Figura 3. Morfomètria del compartiment mitocondrial: (a). Estimació de la densitat de volum mitocondrial dels hepatocits, referit al volum dels mateixos. (b). càlcul del volum mitjà del compartiment mitocondrial. Aquest paràmetre s'ha estimat a partir del volum mitjà dels hepatocits (Figura 2) i de la densitat de volum mitocondrial (a). El resultat es dona en micres cúbiques i correspon al valor mitjà de tres animals per punt.

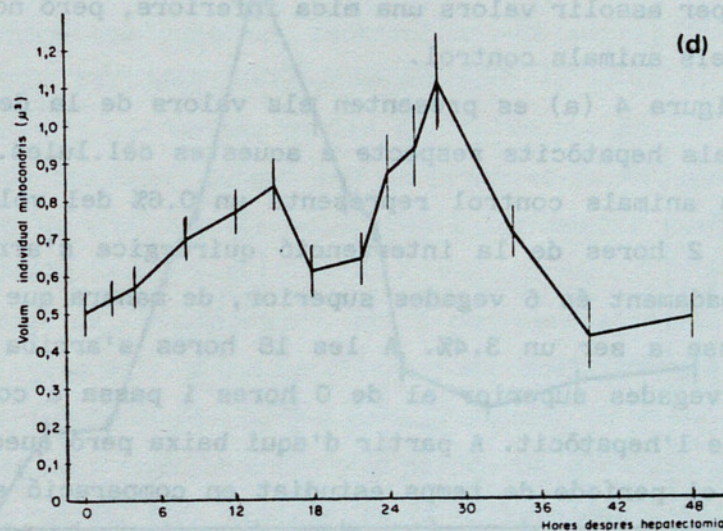
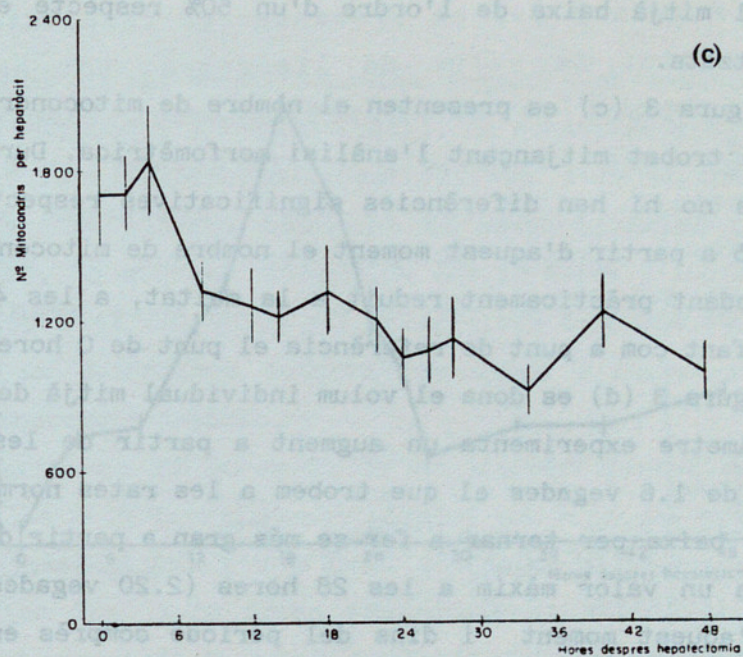


Figura 3 (continuació). Morfomètria del compartiment mitocondrial: (c). Nombre de mitocondris per hepatòcit a les diferents hores que segueixen a l'hepatectomia parcial. (d). Volum mitjà, en micres cúbiques del mitocondri durant el procés regeneratiu. Igual que abans, els resultats per cada punt corresponen al promitjament de tres animals.

mitochondrial mitjà baixa de l'ordre d'un 50% respecte els animals no hepatectomitzats.

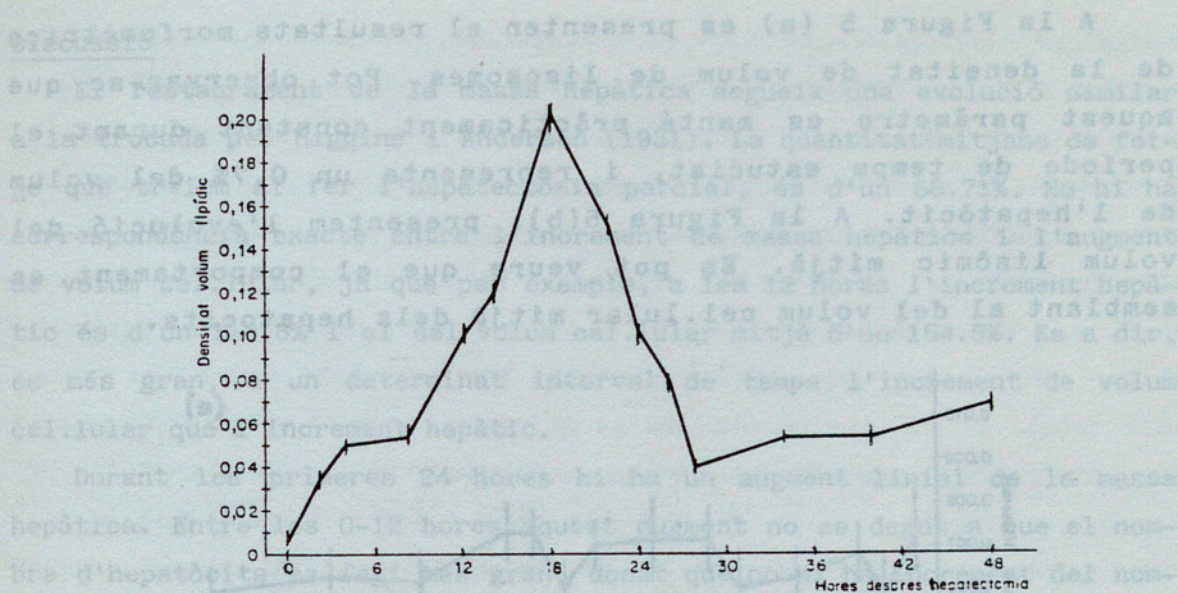
A la figura 3 (c) es presenten el nombre de mitocondris per hepatòcit que hem trobat mitjançant l'anàlisi morfològica. Durant les primeres 4 hores no hi han diferències significatives respecte als animals control però a partir d'aquest moment el nombre de mitocondris va disminuint i quedant pràcticament reduït a la meitat, a les 48 hores i com sempre, agafant com a punt de referència el punt de 0 hores.

A la figura 3 (d) es dona el volum individual mitjà dels mitocondris. Aquest paràmetre experimenta un augment a partir de les 8 hores i a les 14, és de 1.6 vegades el que trobem a les rates normals. Entre les 18-22 hores baixa per tornar a fer-se més gran a partir d'aquest moment i arribar a un valor màxim a les 28 hores (2.20 vegades el control). A partir d'aquest moment i dins del període comprès entre el primer cicle de divisió i fins que ja s'ha completat el segon (a les 48 hores de l'hepatectomia parcial), el volum individual mitjà dels mitocondris disminueix per assolir valors una mica inferiors, però no significativament, als dels animals control.

A la figura 4 (a) es presenten els valors de la densitat de volum de lípids als hepatòcits respecte a aquestes cèl.lules. El compartiment lipídic als animals control representa un 0.6% del volum de l'hepatòcit. A les 2 hores de la intervenció quirúrgica s'arriba a un valor que aproximadament és 6 vegades superior, de manera que el compartiment lipídic passa a ser un 3.4%. A les 18 hores s'arriba al valor màxim que és 33 vegades superior al de 0 hores i passa a constituir un 20% del volum de l'hepatòcit. A partir d'aquí baixa però quedant molt elevat durant tot el període de temps estudiat en comparació als animals control.

A la figura 4 (b) es presenta l'evolució del volum lipídic mitjà en micres cúbiques. A les 18 hores, quan es troba el valor més alt, ha augmentat 52 vegades, de manera que es pot dir que creix de forma desproporcionadament més alta el volum lipídic que el volum cel.lular mitjà. El cicle d'augment de volum cel.lular mitjà i disminució del mateix (veure la figura 2), com a conseqüència del pas dels hepatòcits per la divisió cel.lular no coincideix amb el cicle d'augment-disminució del volum mitjà lipídic durant el mateix període de temps.

(a)



(b)

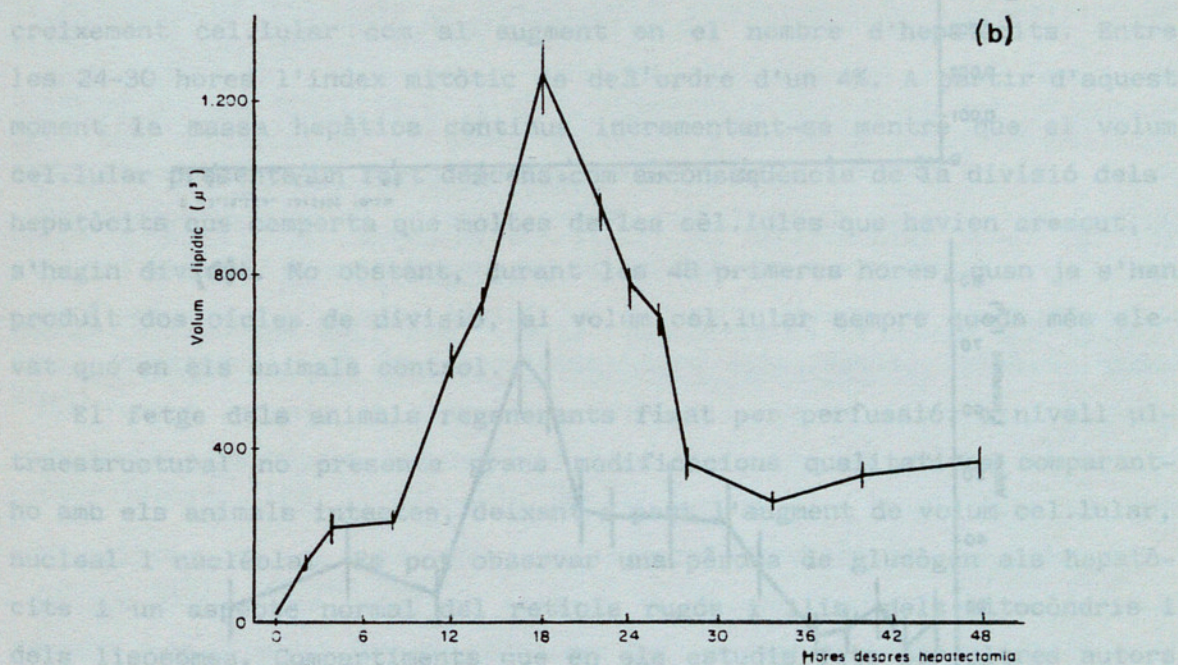


Figura 4. Morfomètria del compartiment lipídic. Estimació de la densitat de volum de lípids respecte al volum dels hepatòcits (a) i del volum mitjà absolut d'aquest compartiment a les diferents hores que segueixen a l'hepatectomia parcial (b). Aquest paràmetre s'ha estimat considerant, el volum mitjà absolut dels hepatòcits (Figura 2) i també la densitat de volum lipídic (a). Cada valor és el promitjament de tres animals.

A la Figura 5 (a) es presenten els resultats morfomètrics de la densitat de volum de lisosomes. Pot observar-se que aquest paràmetre es manté pràcticament constant durant el període de temps estudiat, i representa un 0,7% del volum de l'hepatòcit. A la Figura 5(b), presentem l'evolució del volum lisòmic mitjà. Es pot veure que el comportament es semblant al del volum cel·lular mitjà dels hepatocits.

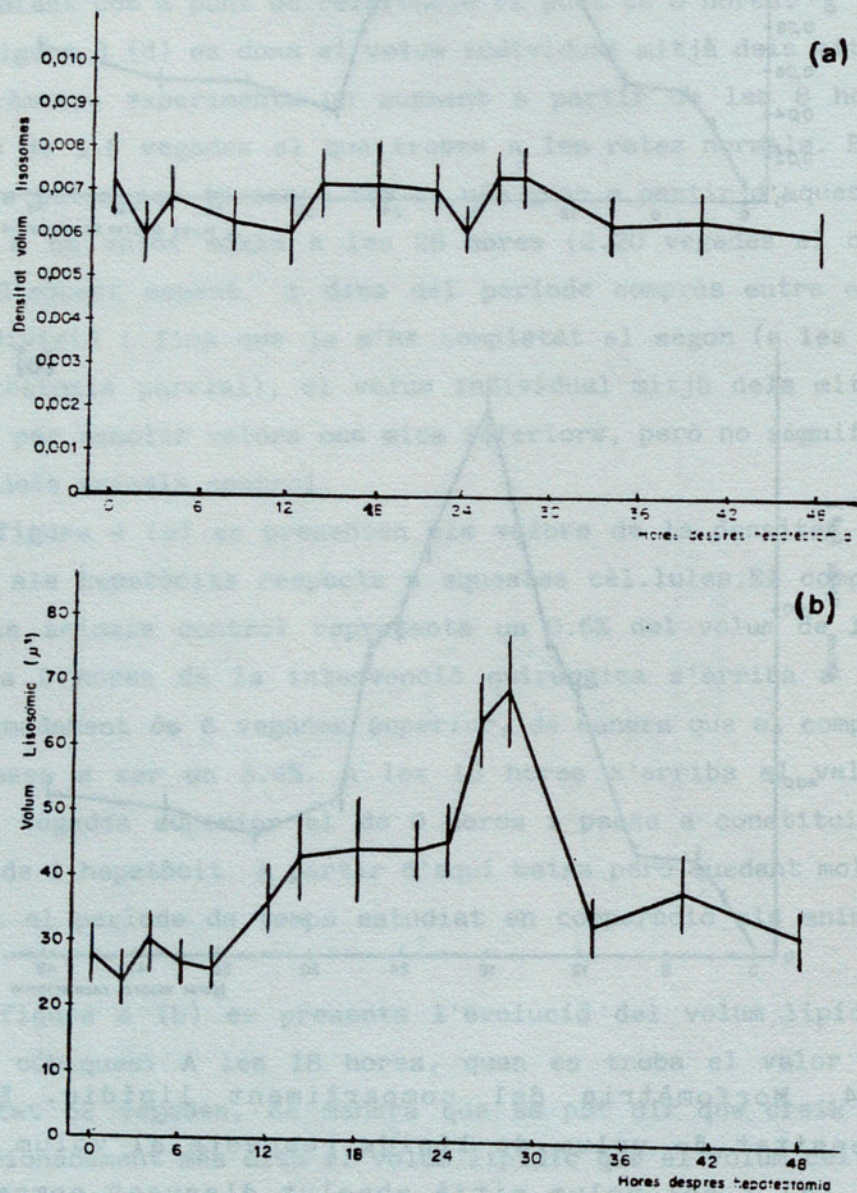


Figura 5. Morfometria del compartiment lisosòmic. (a) Càlcul de la densitat de volum dels lisosomes, respecte al volum dels hepatòcits. (b). Volum mitjà del compartiment lisosòmic, en micres cúbiques, a les diferents hores, després de l'hepatectomia parcial. El nombre d'animals per elaborar cada punt, ha sigut de tres.

Discussió

El restaurament de la massa hepàtica segueix una evolució similar a la trobada per Higgins i Anderson (1931). La quantitat mitjana de fetge que treiem al fer l'hepatectomia parcial, és d'un 66.71%. No hi ha correspondència exacte entre l'increment de massa hepàtica i l'augment de volum cel.lular, ja que per exemple, a les 12 hores l'increment hepàtic és d'un 114.8% i el del volum cel.lular mitjà d'un 154.5%. Es a dir, es més gran, a un determinat interval de temps l'increment de volum cel.lular que l'increment hepàtic.

Durant les primeres 24 hores hi ha un augment linial de la massa hepàtica. Entre les 0-12 hores aquest augment no es degut a que el nombre d'hepatòcits es fagi més gran, donat que no hi ha increment del nombre de mitòsi fins les 18-20 hores (Serratosa et al, 1984). Entre les 18 i 24 hores l'increment de massa hepàtica te d'ésser degut tant al creixement cel.lular com al augment en el nombre d'hepatòcits. Entre les 24-30 hores l'index mitòtic és de l'ordre d'un 4%. A partir d'aquest moment la massa hepàtica continua incrementant-se mentre que el volum cel.lular presenta un fort descens com a conseqüència de la divisió dels hepatòcits que comporta que moltes de les cèl.lules que havien crescut, s'hagin dividit. No obstant, durant les 48 primeres hores, quan ja s'han produït dos cicles de divisió, el volum cel.lular sempre queda més elevat que en els animals control.

El fetge dels animals regenerants fixat per perfussió, a nivell ultraestructural no presenta grans modificacions qualitatives comparant-ho amb els animals intactes, deixant a part l'augment de volum cel.lular, nucleal i nucléolal. Es pot observar una pèrdua de glucògen als hepatòcits i un aspecte normal del reticle rugós i llis, dels mitocondris i dels lisosomes. Compartiments que en els estudis fets per altres autors fixant el fetge per immersió queden altament modificats, especialment el nombre i tamany dels lisosomes i l'augment de tamany dels mitocondris així com la seva electrodensitat que relaten que es fà més baixa que en el cas dels hepatòcits control. Sembla doncs, que aquestes modificacions es poden atribuir a artefactes de fixació. El canvi més espectacular i que es presenta sigui quina sigui la manera en que s'hagi fixat el fetge, és la gran acumulació lipídica que es produeix desde el primer moment dins dels hepatòcits regenerants.

Respecte als resultats morfomètrics, en el cas dels animals control, els nostres resultats són comparables als obtinguts per altres autors

(Weibel et al., 1969). Això ens indica que la manera en que hem emprat la metodologia morfomètrica és adequada. En el cas del compartiment mitocondrial trobem que durant el període replicatiu avançat, el volum mitocondrial mitjà experimenta un augment per arribar a un màxim a les 28 hores i a partir d'aquest moment, quan els hepatòcits passen per la divisió cel.lular, es produeix una disminució d'aquest volum. En el nostre estudi no trobem modificacions de l'aspecte dels mitocondris però sí del seu tamany individual, del seu nombre per hepatòcit i del seu volum mitjà total. El fet que durant les 14 primeres hores el volum individual dels mitocondris augmenti per tornar a disminuir significativament poques hores després, podria indicar que s'ha produït divisió dels mitocondris. D'altra banda la disminució del volum mitocondrial que es produeix a partir de les 28 hores pot indicar una evolució paral·lela a la de la divisió cel.lular dels hepatòcits.

Els resultats trobats al compartiment lipídic indiquen un gran augment durant el procés restaurador hepàtic. Nogensmenys el cicle d'augment-disminució del volum cel.lular al llarg del temps, no coincideix amb el cicle d'augment-disminució del volum lipídic. Estudis realitzats sobre el metabolisme dels lípids (Bucher i Malt, 1971) suggereixen que després de l'hepatectomia parcial hi ha una important mobilització hormono dependent de la grassa a partir del teixit adipós. L'accumulació de lípids al fetge probablement està relacionada amb la gluconeogènesi a partir del glicerol ja que l'infusió continuada de glucosa durant les 20 primeres hores de la regeneració, inhibeix l'accumulació lipídica sense que això afecti a la síntesi de DNA (Simek et al., 1968).

Respecte al compartiment lisosòmic es pot veure que la densitat de volum es manté constant durant el període de temps estudiat i que el volum mitjà lisosòmic segueix una evolució paral·lela a la del volum mitjà dels hepatòcits. No hi ha per tant una acumulació de lisosomes en forma d'autofagosomes, tal com suggerien els estudis fets per altres autors (veure introducció) al fetge regenerant fixat per immersió. En un treball recent (Terayama i Miyamoto-Morioki, 1984) es demostra que l'alliberació dels enzims lisosòmics Catepsines D i L, queda molt augmentada després de l'hepatectomia parcial i quan s'injecten aquestes catepsines a rates i ratolins intactes, es provoca l'iniciació de la síntesi de DNA i de la divisió cel.lular específicament al fetge. Els autors argumenten una implicació dels lisosomes a la resposta proliferativa durant la regeneració hepàtica.

De qualsevol manera no sembla que aquests compartiments citoplasmàtics estudiats puguin tenir una implicació directe en el pas de l'activació dels hepatòcits de l'estat quiescent al de adquisició de competència proliferativa i malgrat que en el nostre estudi morfomètric trobem canvis significatius, seria aventurat intentar biscar a partir d'ells implicacions en la resposta proliferativa de l'hepatòcit durant el procés regeneratiu.

Bibliografia

- ATERMAN, K. (1961). Electron microscopy of the rat liver cell after partial hepatectomy. J. Pathol. Bacteriol. 82, 367-369.
- BARTEL, H., ORKISZ, S. and KMIEK, B. (1977). Ultrastructure of hepatocyte in regenerating rat liver. Folia Morphol. (Warsz) 4, 367-372.
- BECKER, F.F. and LANE, B.P. (1966). Regeneration of mammalian liver. IV. Evidence of the role of cytoplasmic alterations in preparation for mitosis. Am. J. Pathol. 49, 227-237.
- BERNHARD W. and ROUILLER C. (1956). Close relationship between mitochondria and ergastoplasm of liver cells in a definite phase of cellular activity. J. Biophys. Biochem. cytol., 2, suppl. 73-78.
- BRESNICK E. (1971). Regenerating liver: an experimental model for the study of growth. Meth. Cancer Res. 6, 347-397.
- BUCHER N.L.R. and MALT R.A. (1971). Regeneration of liver and kidney. In New England Journal of Medicine Medical progress series. Boston, little Brown.
- FAHIMI H.D. (1967). Perfusion and immersion fixation of rat liver with gluteraldehyde. Lab. Invest. 16, 736-750.
- RARQUHAR M.G. and PALADE G.E. (1965). Cell junctions in amphibian skin. J. Cell. Biol. 26, 263-291.
- FAWCETT D.W. (1955). Observations on the cytology and electron microscopy of hepatic cells. J. Natl. Cancer Inst. 15 suppl., 1475-1502.
- GRISHAM J. W., TILLMAN M.S., NAGEL A.E.H. and COMPAGNO M.D. (1975). Ultrastructure of the proliferating hepatocyte: sinusoidal and endoplasmic reticulum. In Liver Regeneration After experimental Injury. Lesch and Reutter Eds. Stratton Intercontinental Medical Book Corporation. New York, 6-25.
- HIGGINS G.M. and ANDERSON M.R. (1931). Experimental pathology of the liver I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. Arch. Path. 12, 186-202.
- JORDAN S.W. (1964). Electron microscopy of hepatic regeneration. Experimental and molecular pathology 3, 183-200.

LANE B.P. and BECKER F.F. (1966 a). Regeneration of the mammalian liver II Surface alterations during differentiation of the liver cell in preparation for cell division. Am. J. Pathol. 48, 183-196.

LANE B.P. and BECKER F.F. (1967). Regeneration of the mammalian liver. V. Mitotic division in cytologically differentiated liver cells. Am. J. Pathol. 50, 435-445.

MURRAY A.B., STRECKER W. and SILZ S. (1981). Ultrastructural changes in rat hepatocytes after partial hepatectomy and comparison with biochemical results. J. Cell Sci. 50, 433-448.

ROHR H.P., STREBEL J. and BIANCHI L. (1970) Ultrastructural morphometric study on rat liver cells in the early regenerative phase after partial hepatectomy. Beitr. Pathol. 141,52-74.

SERRATOSA J., ROS D., ESTADELLA M^aD., PUJOL M^a J., RIUS E. i DOMINGO J. (1984). Morfomètria del nucli cel.lular durant la regeneració hepàtica Biologia del Desenvolupament 2, 109-117.

SIMEK J., HUSÁKOVÁ A., ERBENOBA Z and KANTA J. (1968). Role of adrenals in changes of liver triglycerides content after partial hepatectomy in rats of different ages. Physiol. Bohemoslov 17, 563-567.

STENGER R.J. AND CONFER D.B. (1966). Hepatocellular ultrastructure during liver regeneration after subtotal hepatectomy. Experimental and molecular Pathology. 5, 455-457.

TAKAHASHI T. (1960). An electron microscopic study of regenerating rat induced by partial hepatectomy. Sapporo Igaku Zasshi 18, 27-42.

TERAYAMA H. and MIYAMOTO-MORIOKA M. Calciferin and certain cathepsins in the initiation of liver cell proliferation in vivo. In Abstracts of the papers presented at the third International Congress in Cell Biology. Tokio, pp. 193, 1984.

VIRAGH S. and BARTOK I. (1966). An electron microscopic study of the regeneration of the liver following partial hepatectomy. Am. J. Pathol 49, 825-839.

WEIBEL E.R., STAUBLI W., GNAGI H.R. and HESS F.A. (1969). Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods and normal morphometric data for rat liver. J. Cell. Biol. 42, 69-91.