

Efecto de Estimulaciones Infrarrojas sobre Hepatoesteatosis Microvesicular Alcohólica de Ratas

Infrared Laser Effect on Alcoholic Rat Hepatic Microvesicular Steatosis

R. Cornejo*; F. Matamala*; H. Silva*; O. Garrido**; R. Jaramillo**; L. Sáez*; S. Painemil* & E. Loncoñanco*

CORNEJO, R.; MATAMALA, F.; SILVA, H.; GARRIDO, O.; JARAMILLO, R.; SÁEZ, L.; PAINEMIL, S. & LONCOÑANCO, E. Efecto de estimulaciones infrarrojas sobre hepatoesteatosis microvesicular alcohólica de ratas. *Int. J. Morphol.*, 31(1):307-311, 2013.

RESUMEN: 24 ratas hembras de 4 meses de vida con peso aproximado de 250 gramos fueron divididas en dos grupos de animales, A y B. Ambos grupos se mantuvieron con pellet y solución de alcohol 40% durante 60 días generándose una hepatoesteatosis microvesicular. Los hígados de los animales pertenecientes al grupo B fueron estimulados con láser infrarrojo 6 J/cm² durante 15 días consecutivos. Posteriormente, las ratas fueron sacrificadas y se extrajeron muestras de hígado y luego procesadas para microscopía electrónica de transmisión. De ambos tipos celulares se obtuvieron microfotografías electrónicas de transmisión con aumentos finales de 8.500 X, las cuales fueron sometidas a estudios morfométricos para determinar fracciones volumétricas de los siguientes componentes celulares: Retículo endoplasmático rugoso (RER), mitocondrias, inclusiones lipídicas y de glicógeno, eu y heterocromatina. De igual manera se cuantificaron las áreas celulares y nucleares. Del análisis de los resultados entre hepatocitos esteatóticos e irradiados se visualiza que existen diferencias en todos los componentes celulares cuantificados y se concluye que los efectos de la estimulación infrarroja con dosis de 6 J/cm² provoca en los hepatocitos con esteatosis microvesicular transformación en su ultraestructura y en su morfología, fundamentalmente en la disminución acentuada de las infiltraciones lipídicas hasta en un 80% situación que se traduciría, en una variación funcional, representando de esta manera un efecto evidente que estas inducciones infrarrojas generan.

PALABRAS CLAVE: Esteatosis; Láser; Morfometría; Hepatocito.

INTRODUCCIÓN

La patología referida como hígado graso es la más frecuente de las afecciones conocidas como esteatosis, caracterizada por la deposición anormal de lípidos tanto en los espacios intersticiales del hígado, como en los citoplasmas de los hepatocitos, revelando anormalidad en los procesos de síntesis y eliminación de triglicéridos (Ishak *et al.*, 1991).

Dichos lípidos se acumulan formando vesículas que cuando son de mayor tamaño rodean al núcleo desplazándolo hacia la periferia celular pegado a la membrana plasmática, generando así la denominada esteatosis macrovesicular. Por el contrario, si el lípido se estructura en pequeñas gotas ocupando distintas áreas del citoplasma se produce la esteatosis microvesicular (Arakawa *et al.*, 1985).

Se ha demostrado que la etiología de la esteatosis se relaciona con componentes metabólicos y nutricionales

(Alpers & Isselbacher 1975), farmacológicos generalmente provocado por antibióticos (Hautekekte 1995) y mayoritariamente con un consumo exacerbado de toxinas como etanol y tetracloruro de carbono (Day & Yeaman 1994), existiendo también diversos factores de riesgo asociado a la afección tales como diabetes mellitus (Araya *et al.*, 2006), mal nutrición proteica (Conde *et al.*, 1993), hipertensión (Brokes & Cooper 2007), obesidad (Saadeh 2007) y anoxia (Cotran *et al.*, 1998). De igual manera Day *et al.*, (1993) sugieren intervención de factores genéticos en el desarrollo de esta patología.

Así mismo, la expresión alterada en los hepatocitos de proteínas/enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos así como de las constitutivas de peroxisomas, se traduciría en la acumulación de triglicéridos hepáticos (Rehmark *et al.*, 1998). Por otra parte, modificaciones en

* Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.

** Instituto de Ciencias Marinas y Limnológicas, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
Proyecto DIUFRO 10-102.

la morfología tanto de la matriz como el aumento en los diámetros de la membrana interna mitocondrial, sugieren disminución en los mecanismos de beta oxidación de ácidos grasos y generación de esteatosis microvesicular (Santer *et al.*, 1990).

Por otro lado, recientemente se ha demostrado que la estimulación con láser infrarrojo con dosis de 6 J/cm² es capaz de generar un notable aumento en la funcionalidad de hepatocitos (Cornejo *et al.*, 2011). Así, el objetivo de este trabajo consistió en visualizar el efecto de estimulaciones infrarrojas sobre hepatocitos esteatósicos, además de determinar las diferencias morfológicas, que se puedan establecer mediante la microscopía electrónica de transmisión y técnicas morfométricas.

MATERIAL Y MÉTODO

Un total de 20 ratas hembras, de 4 meses de vida con un peso de aproximadamente 250 gramos fueron divididas en dos grupos de 12 animales cada uno rotulados como A y B. Ambos grupos recibieron pellet y una solución de alcohol 40% manteniéndose en estas condiciones por 60 días con la finalidad de provocar esteatosis microvesicular. El grupo B fue estimulado con dosis de láser infrarrojo 6 J/cm². Luego las ratas fueron sacrificadas y se extrajeron muestras de hígado esteatósico y estimulado con inducciones infrarrojas. Posteriormente, las muestras fueron procesadas para microscopía electrónica de transmisión. A las muestras se les adicionó una solución de glutaraldehído al 2% en tampón fosfato 0,15 M, pH 7,2 y se mantuvieron a temperatura ambiente por 2 horas. Luego, fueron sometidas a un lavado en solución de 6 g de NaCl y 73 g de sacarosa, disuelto en 1 litro de agua destilada.

La post-fijación se realizó con tetróxido de osmio 1% disuelto en la solución descrita, durante una hora a 40° C y acetato de uranilo 0,5% por 18 horas. Luego de lavado el material fue deshidratado en concentraciones crecientes de acetona (30 a 100%) e incluido en Araldita 6005. Se obtuvieron cortes ultrafinos de aproximadamente 70 nm de grosor los que fueron tratados con acetato de uranilo 2% durante 40 minutos y citrato de plomo 0,5% por 10 minutos.

Las muestras fueron finalmente estudiadas y microfotografiadas en un microscopio electrónico Phillips EM 300.

Análisis estadístico. Para la evaluación de las fracciones volumétricas de los componentes celulares, fue sobrepuesto un retículo de puntos sobre las microfotografías electrónicas

y se procedió al conteo diferencial de los puntos que incidían sobre los perfiles de los componentes, calculándose la fracción volumétrica que ellos ocupan, mediante la siguiente ecuación: (Weibel 1969).

$$FV = \frac{P_i}{P_t}$$

Donde:

Fv = Fracción volumétrica del componente celular.

Pi = Puntos incidentes sobre el componente en estudio.

Pt = Puntos totales incidentes en la célula estudiada.

Todos los datos cuantitativos obtenidos fueron sometidos a la prueba de Wilcoxon mediante el paquete estadístico SPSS versión 15 para Windows (Chicago, USA) para muestras no paramétricas estableciendo diferencias con un valor de Z=2,023 y un p= 0,043.

RESULTADOS

La microscopía electrónica de transmisión utilizada mostró la morfología de hepatocitos afectados con esteatosis microvesicular y los estimulados con láser infrarrojo 6 J/cm², (Figs 1 y 2). Los datos morfométricos se expresan en la Figura 3.

El porcentaje de las fracciones volumétricas correspondientes a heterocromatina evaluadas en hepatocitos esteatósicos y esteatósicos tratados con láser infrarrojo 6 J/cm² fue de 8% y 27%, respectivamente y la eucromatina de 92% y 73%, respectivamente.

Las áreas celulares expresadas en μ² pertenecientes a hepatocitos esteatósicos y esteatósicos estimulados con láser infrarrojo fueron de 536 y 434 μ², respectivamente. Las áreas nucleares fueron de 43 y 55 μ², respectivamente.

Las fracciones volumétricas cuantificada perteneciente al hepatocito esteatósico activado con láser infrarrojo de 6 J/cm² evidenció una reducción en el porcentaje de inclusiones lipídicas, disminuyendo desde un 18% a un 3,5%.

Las fracciones volumétricas correspondientes al RER, presentaron una leve disminución del porcentaje correspondiente al hepatocito estimulado con inducciones infrarrojas en comparación a su contrapartida esteatósica. El porcentaje de mitocondrias experimentó un ligero aumento en el hepatocito estimulado.



Fig 1. Microfotografía electrónica de transmisión perteneciente a hepatocito de rata esteatótico (8.500 X)

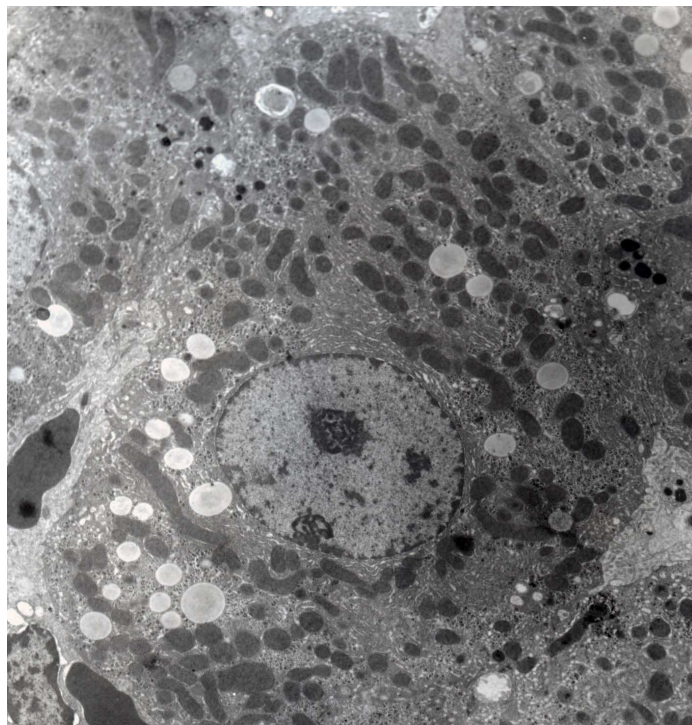


Fig 2. Microfotografía electrónica de transmisión perteneciente a hepatocito esteatótico de rata estimulado con láser infrarrojo 6 J/cm². 9.500 X.

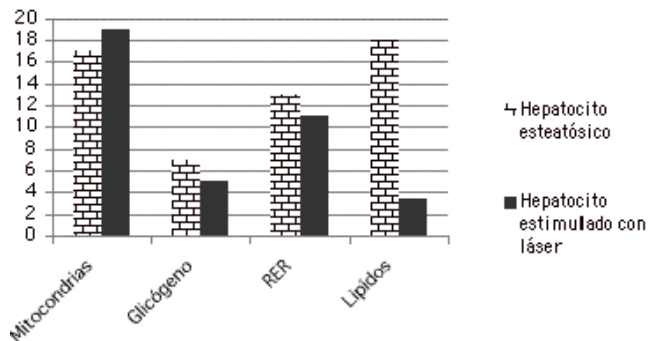


Fig 3. Fracciones volumétricas expresadas en porcentaje correspondiente a componentes celulares pertenecientes tanto a hepatocitos esteatóticos como a esteatóticos estimulados con láser infrarrojo.

Disminuyó el volumen de inclusiones de glucógeno en 2 % en los hepatocitos estimulados con láser infrarrojo. Por otra parte, aumentó el volumen nuclear del hepatocito estimulado con láser infrarrojo, en comparación con el hepatocito esteatótico.

Las fracciones volumétricas pertenecientes a la eucromatina redujeron su porcentaje en comparación con el hepatocito esteatótico, indicando una expresión génica disminuida.

El área celular cuantificada para el hepatocito irradiado presentó una notable disminución con respecto al esteatótico que alcanzó hasta 100 u².

DISCUSIÓN

En la presente investigación propusimos determinar los efectos ultraestructurales generados por las emisiones del láser infrarrojo sobre hepatocitos con grandes infiltraciones lipídicas que desembocaron en una esteatosis microvesicular experimental.

En este contexto Baibekov *et al.*, (1991) describieron los cambios ultraestructurales provocados por emisiones del láser infrarrojo sobre hepatocitos cirróticos, patología provocada experimentalmente por un exagerado consumo de alcohol.

Se demostró que la fracción volumétrica correspondiente a infiltraciones lipídicas alcanzó al 18 % del volumen celular, mientras que estas infiltraciones decrecieron a un volumen equivalente a 3.5 % en aquellas células estimuladas con emisiones infrarrojas.

Un aspecto a destacar se refiere a la notable disminución en las infiltraciones lipídicas en el citoplasma de los hepatocitos esteatósicos estimulados con láser infrarrojo (Fig. 2), disminución que alcanzó al 80% en relación a los hepatocitos esteatósicos (Fig. 1). Este hecho es concordante con lo observado por Baibekov *et al.* quienes demostraron similar nivel de disminución de dichas infiltraciones provenientes de esta afección hepática.

Por otra parte, se ha observado, en hepatocitos irradiados, un aumento importante en el volumen de mitocondrias, organelos en los cuales se realiza un activo metabolismo de los compuestos lipídicos.

Los resultados de este estudio coinciden con los de Baibekov al existir un ligero aumento en las fracciones volumétricas pertenecientes tanto a las estructuras destinadas a la mantención de los procesos energéticos como a las mitocondrias y una disminución de inclusiones de glicógeno, indicando una constante degradación a glucosas citosólicas para realizar procesos de glicolisis y posterior síntesis de ATP mitocondrial y satisfacer las necesidades energéticas de esta célula (Junqueira & Salles 1975).

Por otra parte, a nivel nuclear existe concordancia con los resultados reportados por Baibekov *et al.*, quienes relataron un aumento de hasta 30 % de heterocromatina en

los hepatocitos esteatósicos irradiados, situación que se traduce en una notable disminución en la expresión génica. En directa relación con este resultado, demostramos una baja notable de los volúmenes del retículo endoplasmático rugoso, (hasta en un 16%) situación que podría provocar una baja sustantiva en la síntesis proteica de este hepatocito esteatósico estimulado con inducciones infrarroja.

Existe similitud de resultados con Baibekov *et al.*, respecto al aumento de volumen nuclear evaluado en los hepatocitos estimulados con inducciones infrarrojas, situación que se explica por una creciente generación de poros nucleares que conlleva a incrementar procesos de permeabilidad hacia el interior del nucleoplasma.

Finalmente, en relación al área celular cuantificada se observó una gran disminución (hasta 100 μ^2) correspondiente al hepatocito estimulado con láser infrarrojo. Esta disminución se podría explicar por un activo metabolismo lipídico, preferentemente mitocondrial, el cual metaboliza las infiltraciones lipídicas hasta en un 80%.

En conclusión el láser infrarrojo posee un efecto estimulador de variadas enzimas mitocondriales, responsables de dicha disminución lipídica Cieslar *et al.*, (1995); Kao & Sheen, (2003), generando notable actividad de lipasas hepáticas (Rehmark *et al.* 1998).

CORNEJO, R.; MATAMALA, F.; SILVA, H.; GARRIDO, O.; JARAMILLO, R.; SÁEZ, L.; PAINEMIL, S. & LONCOÑANCO, E. Infrared laser effect on alcoholic rat hepatic microvesicular steatosis. *Int. J. Morphol.*, 31(1):307-311, 2013.

SUMMARY: 24 four-month-old female rats weighing approximately 250 grams were divided into two groups labeled A and B. Both groups were fed pellets and a 40% alcohol solution for 60 days, which caused a microvesicular hepatic steatosis. The livers of the animals in Group B were stimulated with 6 J/cm² of infrared laser for 15 consecutive days. The rats were then sacrificed and samples of both steatotic liver and liver stimulated with infrared inductions were extracted for immediate processing via transmission electron microscopy. From both cell types transmission electron microphotographs were obtained at magnifications of 9500 X; these were subjected to morphometric studies to determine volumetric fractions of the following cell components: rough endoplasmic reticulum (RER), mitochondria, lipid and glycogen inclusions, euchromatin and heterochromatin. Likewise, cell and nuclear areas were quantified. Analysis of the results between steatotic and radiated hepatocytes revealed notable differences in all the cell components quantified. It is concluded that the effects of infrared stimulation with a dose of 6 J/cm² brings about in the steatotic hepatocytes a microvesicular transformation in their ultrastructure and morphology, fundamentally in the considerable decrease in lipid infiltrations to 80%, which ultimately translates into a functional variation, thus representing an obvious impact produced by these infrared inductions.

KEY WORDS: Steatosis; Laser; Morphometry; Hepatocyte.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alpers, N. & Isselbacher, K. *Fatty liver: biochemical and clinical aspects.* In Shiff. L (ed). Diseases of the liver. Lippincott Company Philadelphia, 1975. pp. 815-32.

Arakawa, M.; Taketomi, S. & Furuno, K. Metabolic studies on the development of ethanol - induced fatty liver in KK-A mice. *J. Nutr.*, 105:1500-8, 1985.

- Araya, Q.; Valera, M.; Contreras B.; Csendes, J.; Burdiles, P.; Rojas, C.; Maluenda, G.; Smok, S. & Poniachi, T. Glucose tolerance alternations and frequency of metabolic syndrome among patients with alcoholic fatty liver disease. *Rev. Med. Chile.* 134(9):10-98, 2006.
- Bai'bekov, I.; Vorozhei'kin, V. & Artykov, S. Effects of low intensity infra-red laser irradiation on ultrastructure and proliferation of liver cells in experimental hepatitis and cirrhosis. *Lab. Pathol. Anatomy*, 113(9):424-427, 1991.
- Brookes, M. & Cooper, B. Hypertension and fatty liver: Guilty by association. *Gastroenterology Unit, City Hospital, Birmingham, UK.* 21(4):264-70, 2007.
- Cieslar, G.; Adamek, M.; Sieron, A. & Kaminski, M. Influence of low-power laser radiation on the activity of some membraneous and mitochondrial enzymes of hepatocytes in rats. *Proc. SPIE*, 2323:546-50, 1995.
- Conde, A.; González, E.; Santolaria, F.; Castro, V.; Marchena, J.; Martínez, A. Liver changes in protein malnutrition. An experimental study in rats. *Nutr. Hosp.*, 8(6):358-63, 1993.
- Cornejo, R.; Matamala, F.; Silva, H.; Garrido, O.; Abarzua, Y. & Balboa, N. Morphometric study of effect 16 J/cm² infrared laser in rat hepatocytes. *Int. J. Morphol.*, 29(2):650-5, 2011.
- Cotran, R.; Kumar, V. & Robbins, S. *Patología Estructural e Funcional*. 4ª Ed. Río de Janeiro, Guanabara-Kogan, 1991. pp 150-9.
- Day, C.; James, O.; Brown, A.; Bennett, M.; Fleming, I. & Yeaman, S. The activity of the metabolic form of hepatic phosphatidate phosphohydrolase correlates with the severity of alcoholic fatty liver in human beings. *Hepatology*, 18:832- 8, 1993.
- Day, C.; Yeaman, S. The biochemistry of alcohol – induced fatty liver. *Biochim, Biophys. Acta*, 1215:33-48. 1994.
- Hautekeete, M. Hepatotoxicity of antibiotics. *Acta Gastroenterol. Belg.*, 58:290-6, 1995.
- Ishak, K. Alcoholic liver disease: Pathologic, pathogenetic and clinical aspects. *Alcoholism (N.Y.)*, 15:45, 1991.
- Junqueira, L.; Salles, L. *Ultra-estrutura e função celular*. 1ª Ed. Río de Janeiro, Editorial Guanabara Kogan. Pp 104. 1975.
- Kao, M. & Sheen, L. effects of infrared and low-power laser irradiation on cell viability, glutathione and glutathione-related enzyme activities in primary rat hepatocytes. *J. Formos. Med. Assoc.*, 102(7):486-91, 2003.
- Rehmark, S.; Giometti, C.; Slavin, B.; Doolittle, M.; Reue, K. The fatty liver dystrophy mutant mouse: Microvesicular steatosis associated with altered expression levels of peroxisome proliferator - regulated proteins. *J. Lipid Res.* 39:2209-17, 1998.
- Saadah, S. Nonalcoholic. Fatty liver disease and obesity. *Nutr. Clin. Pract.*, 22(1):1-10, 2007.
- Santer, R.; Schmidt-Sommerfeld, E.; Leung, Y.; Fischer, J. & Lebenthal, E. Medium - chain acyl CoA dehydrogenase deficiency: Electron microscopic differentiation from Reye syndrome. *Eur. J. Pediatr.* 150:111-4, 1990.
- Weibel, E. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int. Rev. Cytol.*, 26:235-302, 1969.

Dirección para correspondencia:

Dr. Ricardo Cornejo

Facultad de Medicina

Universidad de La Frontera

Casilla 54-D

Temuco

CHILE

Email: ricardo.cornejo@ufrontera.cl

Recibido : 03-08-2012

Aceptado: 28-12-2012