

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Biología Celular



*EFECTOS DE LOS ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE LA DIETA EN
CIRROSIS HEPATICA EXPERIMENTAL*

TESIS DOCTORAL

M^a Isabel Fernández Martínez

1995

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Biología Celular

PROV. T-15/94 T
15
34

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 20-10-95
ENTRADA NUM. 2466



*EFFECTOS DE LOS ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE LA DIETA EN
CIRROSIS HEPATICA EXPERIMENTAL*

TESIS DOCTORAL

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 4967679
Nº Copia 21218948

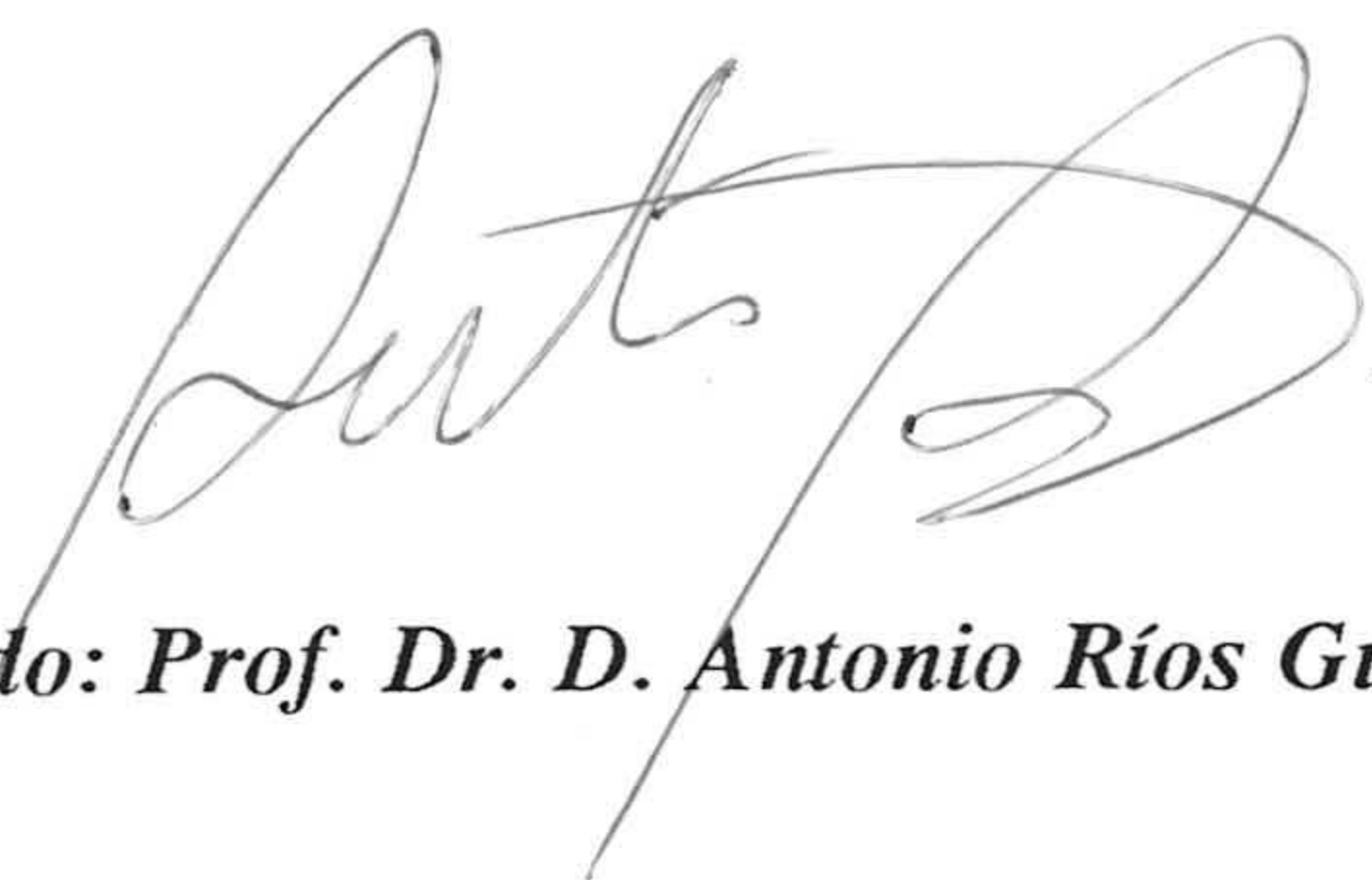
*M^a Isabel Fernández Martínez
1995*

UNIVERSIDAD DE GRANADA
10 OCT. 1995
COMISION DE DOCTORADO

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
Departamento de Biología Celular

**EFFECTOS DE LOS ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE LA DIETA EN
CIRROSIS HEPATICA EXPERIMENTAL**

*Memoria presentada por la Licenciada M^a Isabel Fernández Martínez para optar al grado
de Doctor en Ciencias Biológicas*



Fdo: Prof. Dr. D. Antonio Ríos Guadix



Fdo: Prof. Dr. D. Angel Gil Hernández



Fdo: Prof. Dr. Dña M^a Isabel Torres López



Fdo: M^a Isabel Fernández Martínez

Prof. Dr. D. Antonio Ríos Guadix, Catedrático y Director del Departamento de Biología Celular de La Universidad de Granada.

Prof. Dr. D. Angel Gil Hernández, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Granada y Director del Departamento I+D de ABBOTT Laboratorios.

Prof. Dr. D. M^a Isabel Torres López, Profesor Asociado del Departamento de Biología Experimental y Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén.

CERTIFICAN que el trabajo que se expone en la memoria de Tesis Doctoral Efectos de los ácidos grasos poliinsaturados de la dieta en cirrosis hepática experimental ha sido realizado en el Departamento de Biología Celular de la Universidad de Granada, correspondiendo fielmente a los resultados obtenidos.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendiendo el presente en Granada, a 9 de Octubre de mil novecientos noventa y cinco.



*Este trabajo ha sido subvencionado por la CICYT
(Proyecto SAL90-0615) y por PULEVA S.A.*

Agradecimientos

Quiero agradecer al Prof. Dr. Antonio Ríos Guadix el darme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación, poniendo a mi disposición todo lo necesario para llevarlo a cabo, y por la confianza depositada en mí.

Así mismo, quiero agradecer al Prof. Dr. Angel Gil Hernández su gran ayuda y atención durante la realización de este trabajo.

La Prof. Dra. M^a Isabel Torres López me ha enseñado casi todo lo que se de este trabajo. Su ayuda y su apoyo en la realización de esta tesis han sido indispensables.

El Dr. José M^a Gómez Reyes, además de otras muchas cosas, me enseñó algo indispensable para mí, querer a la Biología y al trabajo.

Agradezco a la Dr. Elianne Moreira y al Dr. Luís Fontana la realización de los estudios bioquímicos.

Al resto de mis compañeros del Departamento de Biología Celular, sobre todo a la Dra. M^a Asunción Abaurrea, Dra. M^a del Valle Ostos y al Dr. Miguel Angel Cuadros.

Por último, quiero agradecerle a mi familia todo el apoyo que siempre me han dado y que ha sido más importante de lo que ellos se pueden imaginar. En ellos incluyo a mis buenos amigos Maribel, Marina y Julio.

A mis Padres

A Almudena

INDICE

INTRODUCCION	1
Objetivos	2
Hígado	4
<i>Organización histológica</i>	5
<i>Hepatocitos</i>	8
<i>Sinusoides hepáticos</i>	9
<i>Células endoteliales</i>	9
<i>Células de Kupffer</i>	10
<i>Células estrelladas</i>	10
<i>Células Pit</i>	11
<i>Células ovals</i>	12
<i>Matriz extracelular</i>	12
Cirrosis Hepática	13
<i>Necrosis e inflamación</i>	16
<i>Regeneración</i>	17
<i>Fibrosis</i>	19
Hepatopatía Experimental. Cirrosis Hepática Inducida por Tioacetamida	23
Malnutrición y Cirrosis	28
Cirrosis y Acidos Grasos Poliinsaturados	31
<i>Metabolismo hepático de los ácidos grasos poliinsaturados</i>	31
<i>Alteraciones metabólicas de los AGPI en la cirrosis</i>	34
<i>Papel terapéutico de las dietas suplementadas con AGPI</i>	36

MATERIALES Y METODOS.....37

Animales de Experimentación.....38

Diseño Experimental.....38

Toma de Muestras.....42

Microscopía Óptica.....42

Fijación.....42

Inclusión.....43

Corte.....43

Tinción.....43

Soluciones colorantes.....45

Estudios morfométricos.....46

Microscopía Electrónica.....48

Fijación.....48

Deshidratación.....49

Inclusión.....49

Cortes.....50

Estudios morfométricos.....50

Análisis Estadístico.....52

RESULTADOS.....53

Ingesta de Agua y Dieta.....54

Pesos de los Animales y Pesos Hepáticos.....54

<i>Microscopía Óptica y Electrónica.....</i>	<i>57</i>
<i>Fibrosis.....</i>	<i>78</i>
<i>Esteatosis.....</i>	<i>80</i>
<i>Binuclearidad.....</i>	<i>82</i>
<i>Morfometría.....</i>	<i>84</i>
<i>DISCUSION.....</i>	<i>90</i>
<i>CONCLUSIONES.....</i>	<i>104</i>
<i>BIBLIOGRAFIA.....</i>	<i>107</i>

INTRODUCCION

El hígado es la mayor glándula del cuerpo y posee una gran capacidad funcional con un papel primordial en el metabolismo, en la transformación y almacenamiento de productos absorbidos en la digestión, en la ejecución de los procesos bioquímicos para la metabolización de nutrientes y otras sustancias químicas, en la degradación de sustancias tóxicas, etc. Por ello, no es extraño que las enfermedades crónicas del hígado tengan gran impacto metabólico. Por otra parte, el aumento de hepatopatías por el abuso del alcohol y el uso de tóxicos o fármacos ha desencadenado un gran interés en su estudio.

El conocimiento detallado de la etiología de las enfermedades crónicas a nivel tisular y celular es importante para poder analizar los procesos patológicos. La cirrosis hepática es una de las principales causas de muerte en muchos países. Se han desarrollado varios modelos experimentales para el estudio de esta enfermedad. Numerosos autores han utilizado la tioacetamida (TAA) como droga modelo para el estudio de disfunciones hepáticas, hepatocarcinogénesis y respuesta celular al daño inducido por dicho agente. Una sola dosis de TAA administrada por vía intraperitoneal es capaz de producir necrosis hepática, mientras que la administración crónica por diferentes vías, incluida la oral, conduce a cirrosis y hepatocarcinoma. El modelo de cirrosis hepática experimental producido por TAA es comparable a la enfermedad en humanos y genera un proceso de malnutrición asociado a la enfermedad.

Con gran frecuencia los pacientes cirróticos presentan procesos de malnutrición proteico-energética asociados a la enfermedad hepática. La estructura y función de las células hepáticas se ven seriamente afectadas por este proceso. Es por ello, que muchos autores sostienen que un aporte nutricional adecuado para el tratamiento de la cirrosis está indicado tanto para corregir la malnutrición, como para evitar la pérdida de la inmunocompetencia y el aumento de infección y mortalidad relacionadas con la malnutrición en la cirrosis.

En la cirrosis hepática, como consecuencia de las alteraciones celulares y del anormal funcionamiento de varias vías metabólicas así como del estado de malnutrición asociado a la enfermedad, existen alteraciones en la composición lipídica del hígado y del plasma, entre las que encontramos cambios en el perfil de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la serie n-3 y de la serie n-6.

La esencialidad de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) en determinadas circunstancias fisiológicas y patológicas es un tema de gran interés. Estos ácidos grasos son importantes, no sólo por su valor nutricional, sino también por ser componentes importantes de las membranas celulares y precursores de los eicosanoides.

Debido a las alteraciones presentes en la cirrosis y al estado de malnutrición asociado a la enfermedad hepática, la suplementación de estos ácidos grasos, tanto de la serie n-3 como de la serie n-6, debe puede tener significación clínica derivada de la importancia nutricional y celular de éstos y del efecto de estos nutrientes sobre la regeneración hepática.

El objetivo de este estudio ha sido, por tanto, el análisis a nivel histológico de la influencia de la suplementación de ácidos grasos poliinsaturados a la dieta, sobre las alteraciones hepáticas producidas por la cirrosis inducida por la tioacetamida. Para ello, tomamos muestras de hígado de todos los animales que se analizaron a microscopía óptica y electrónica. Además, considerando las alteraciones observadas tras la administración del hepatotóxico, analizamos la influencia de la suplementación de los AGPI sobre la hepatomegalia, el grado de fibrosis, la binuclearidad, la esteatosis y sobre parámetros de morfometría del hepatocito.

HIGADO

El hígado es la mayor glándula del cuerpo. Funciona como glándula exocrina segregando bilis a través de los conductos biliares hasta el duodeno y como endocrina sintetizando y secretando sustancias directamente al torrente circulatorio^{60,156}.

Por un lado, el hígado recibe un gran volumen de sangre venosa proveniente del tubo digestivo, páncreas y bazo a través de la vena porta y por otro, recibe un menor volumen de sangre arterial por medio de la arteria hepática. Su sangre es evacuada por las venas hepáticas hacia la vena cava inferior. De este modo, el hígado está interpuesto entre el tubo intestinal y la circulación general.

Los productos absorbidos en la digestión, son captados y metabolizados en el hígado, o son transportados a él y devueltos a la sangre para su almacenamiento o su uso en otros tejidos. El hígado ejerce un control sobre el metabolismo general. Es capaz de sintetizar y liberar proteínas, de almacenar hidratos de carbono en forma de glucógeno, de liberar glucosa en sangre para mantener su concentración normal y de formar urea a partir del ión amonio.

El hígado es uno de los primeros órganos expuestos a los productos tóxicos ingeridos y es capaz de degradarlos mediante oxidación o hidroxilación, o de detoxicarlos por medio de la conjugación. Los correspondientes productos de degradación o de conjugación, ya inocuos, son vertidos a la bilis. Sin embargo, esta capacidad puede ser sobrepasada de manera que los compuestos tóxicos pueden llegar a lesionarlo.

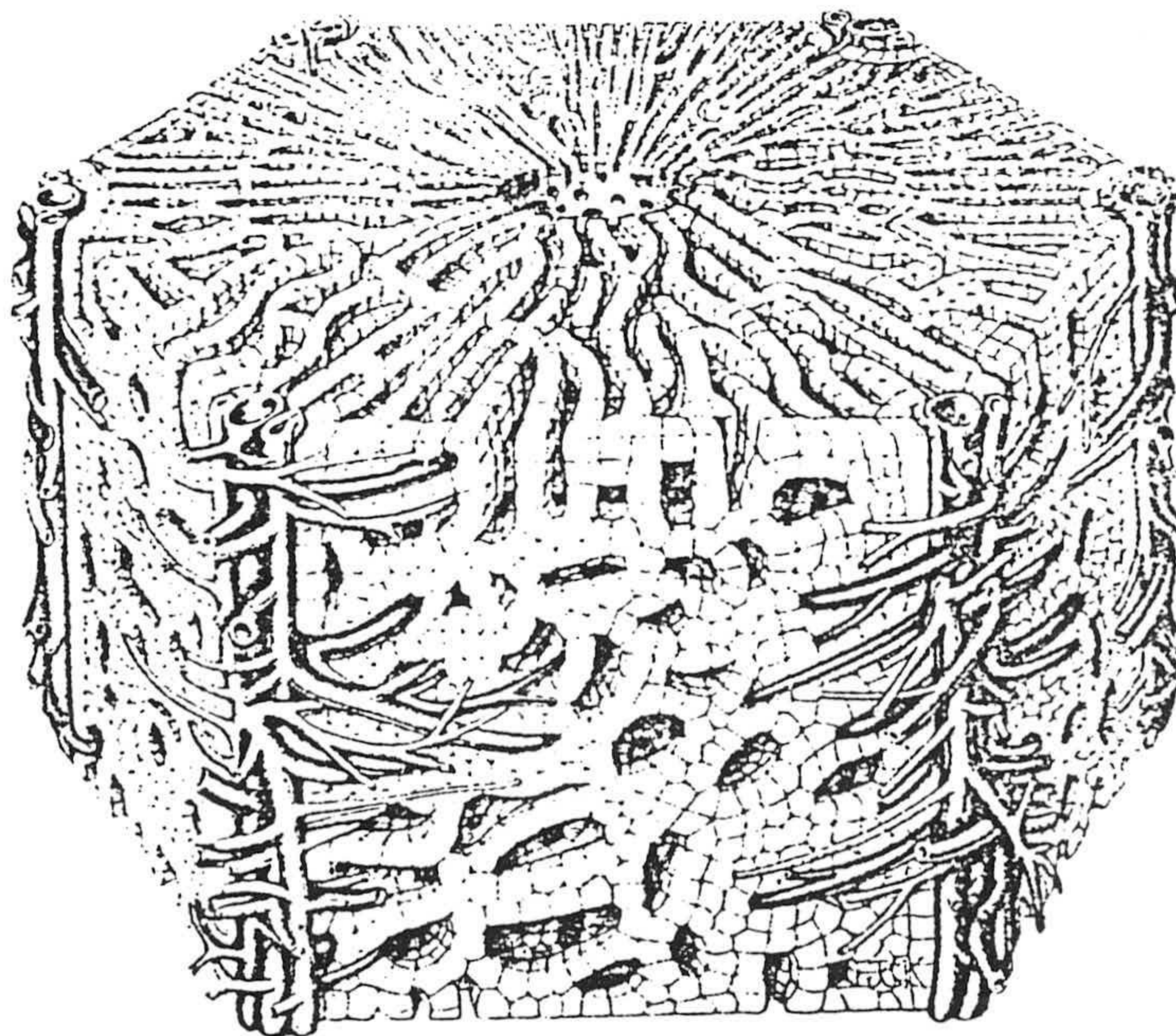
Debido al importante papel de este órgano en la producción y utilización de nutrientes y otras sustancias y en la detoxificación de xenobióticos, las enfermedades crónicas del hígado tienen un gran impacto metabólico^{5,109,133}.

Organización Histológica

El hígado está dividido en cuatro lóbulos. La sangre entra a este órgano a través de la vena porta y la arteria hepática. Esta última es la encargada del transporte de nutrientes a los hepatocitos y la vena porta supone la vía de entrada de los nutrientes absorbidos en el tracto intestinal, así como la entrada de células reticuloendoteliales y toxinas hacia los hepatocitos.

La unidad estructural clásica del hígado es el lobulillo hepático, de forma hexagonal, en cuyos vértices se localizan los espacios portales que comprenden una rama pequeña de la vena porta, una rama de la arteria hepática y un conductillo biliar, englobados por una envoltura de tejido conjuntivo. En el centro del lobulillo se encuentra la vena central.

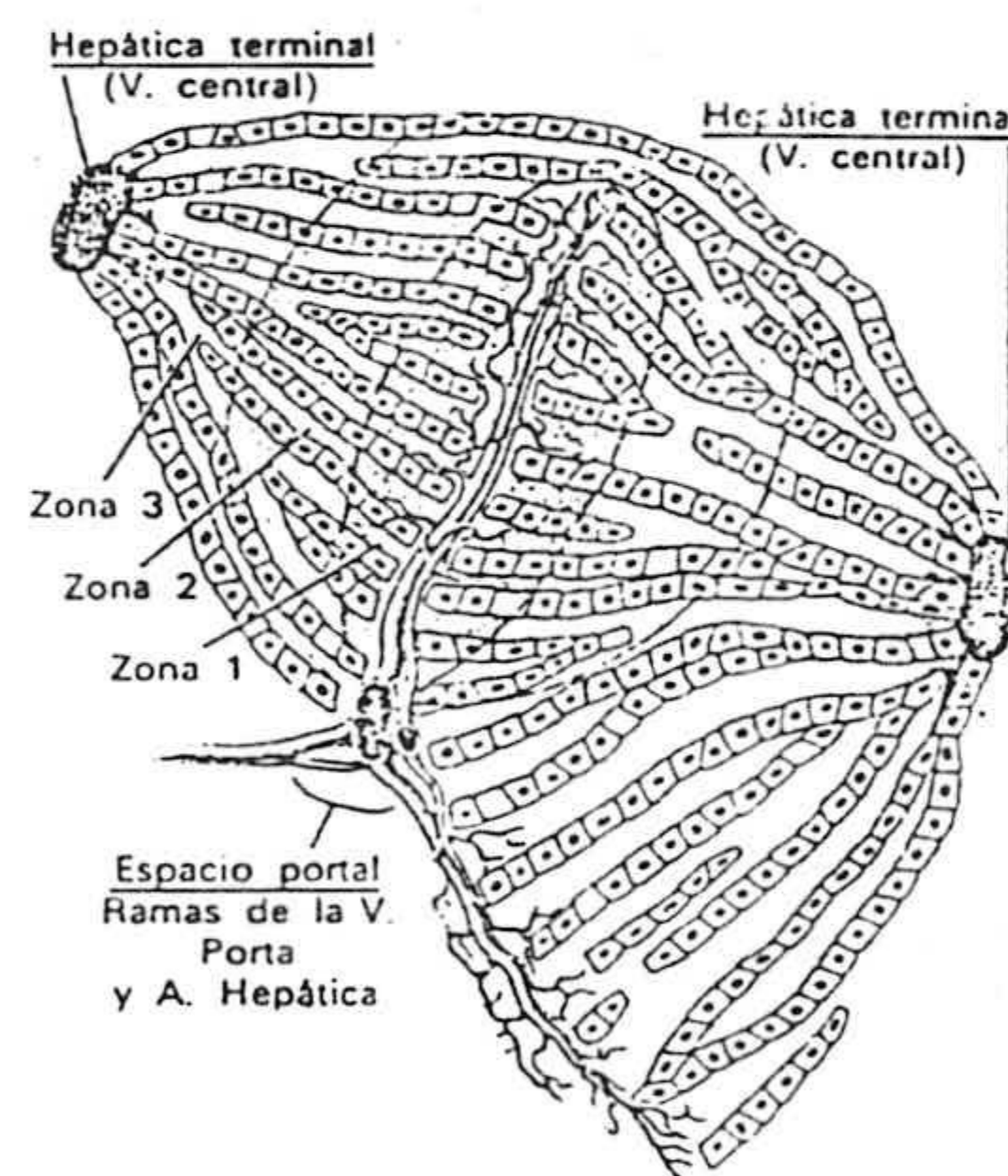
Los hepatocitos se ordenan en placas o láminas dispuestas radialmente desde la vena central hacia la periferia del lobulillo. Las láminas se separan por los sinusoides hepáticos a través de los que fluye la sangre arterial y venosa de los espacios porta hasta la vena central ^{60,156}.



Las sustancias absorbidas intestinalmente y conducidas hasta el hígado por la vena porta, junto a los productos secretados por las células hepáticas, son transportados atravesando el espacio de Disse (espacio perisinusoidal) desde y hacia los sinusoides, gracias a las discontinuidades presentes en las paredes de dicho espacio. De allí llegan hasta la vena central. Las venas centrales se reúnen en las venas suprahepáticas que abandonan el hígado hacia la vena cava superior.

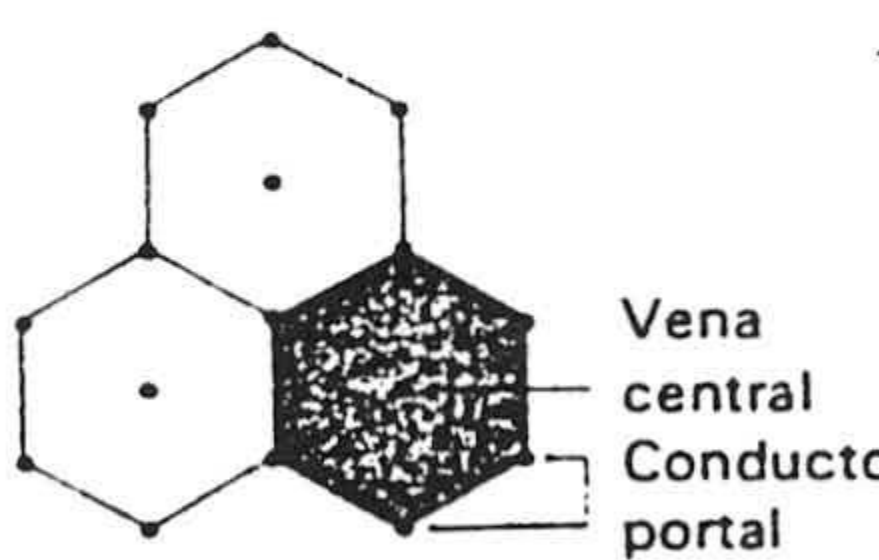
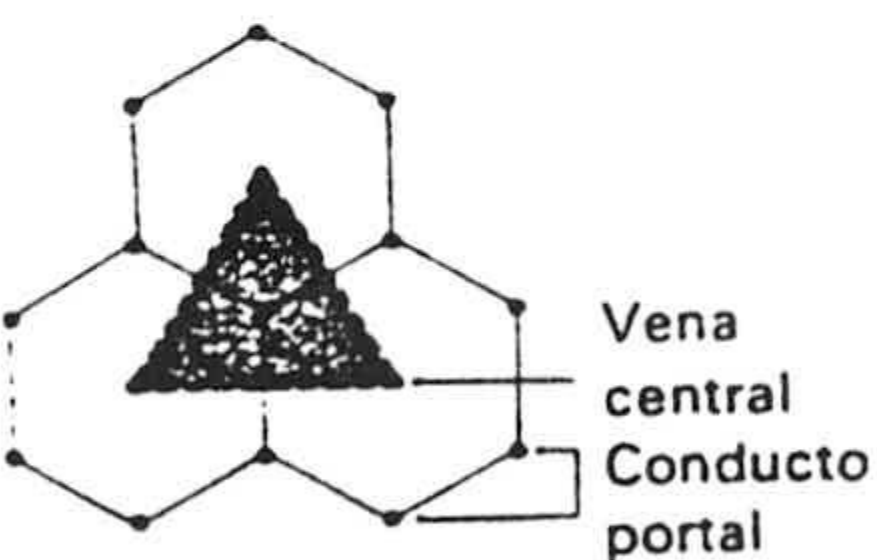
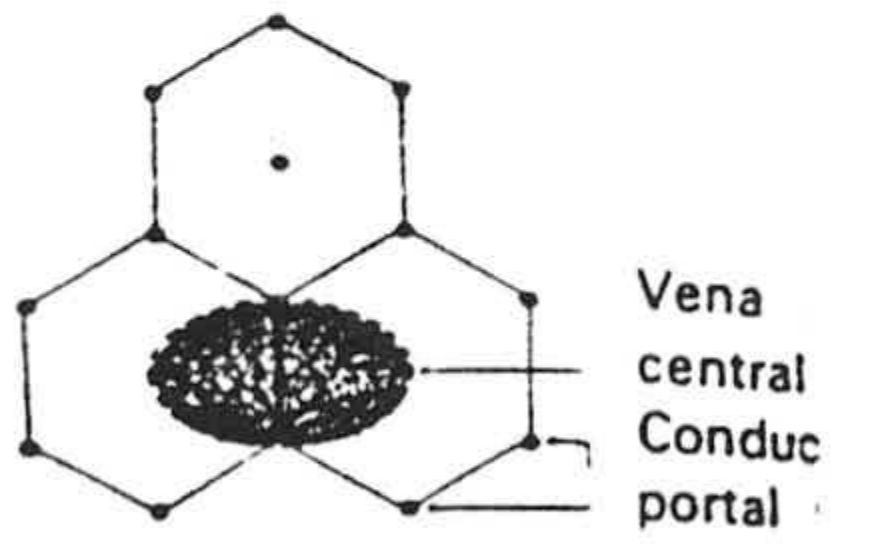
Los canalículos biliares recorren las láminas de hepatocitos transportando la bilis hasta los conductillos biliares. Estos comunican con los conductos biliares en los espacios porta. Desde allí, se reúnen en el conducto hepático común, abandonando el hígado y desembocando en el intestino; una rama del conducto hepático se desvía y conecta con la vesícula biliar.

Rappaport y otros autores proponen otro concepto de organización basado en el acino hepático como unidad funcional del hígado ⁶⁰.



El acino hepático queda definido como el tejido irrigado por ramas terminales de la vena porta y la arteria hepática y drenado por una rama terminal del conducto biliar. Los límites no están determinados anatómicamente sino en base a la irrigación. Este concepto ha resultado útil para entender algunos aspectos de la fisiología del hígado y explicar algunas manifestaciones patológicas, como por ejemplo la progresión de la cirrosis hepática.

Por último, existe una interpretación en la que la unidad es el lobulillo portal, cuyo centro morfológico es el canal portal ^{60,156}.

	<i>Lobulillo clásico</i>	<i>Lobulillo portal</i>	<i>Acino hepático</i>
<p>Aspecto de los tres tipos de unidades hepáticas en corte transversal. Los lobulillos clásicos (hexágonos) se representan en todos los esquemas. Las regiones sombreadas corresponden a la cantidad de tejido comprendida en cada unidad y su relación con el lobulillo clásico.</p>			
Forma	Poligonal o hexagonal.	Aproximadamente triangular o cuneiforme.	Irregular, a veces oval o prismática.
Eje morfológico	Vena central.	Area portal, especialmente conducto biliar interlobulillar.	Ramas terminales de la tríada portal, que se encuentran en los bordes de dos lobulillos clásicos adyacentes.
Límites periféricos	~ 6 áreas portales.	3 (o más) venas centrales.	2 (o más) venas centrales.
Relación con el lobulillo clásico		Comprenden aquellas porciones que envían bilis a un mismo conducto interlobulillar.	Pequeños sectores de dos lobulillos clásicos adyacentes.
Dirección del flujo sanguíneo	De la periferia (área portal) al centro (vena central).	Del centro (área portal) a la periferia (vena central).	Del centro (área portal y bordes de dos lobulillos clásicos adyacentes) a la periferia.
Dirección del flujo biliar	Del centro a la periferia.	De la periferia al centro.	De la periferia al centro.
Ventajas del concepto	<ol style="list-style-type: none"> 1. Destaca la función endocrina del hígado. 2. Util para comprender los cambios histológicos de la necrosis centrolobulillar (ej., por intoxicación con CCl₄). 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Destaca la función exocrina (secreción biliar). 2. Permite comparar el lobulillo hepático con los de las glándulas exocrinas. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Explica mejor el gradiente de actividad metabólica del hígado, es decir, la correlación entre irrigación y metabolismo. 2. Ayuda a explicar el proceso de regeneración. 3. Util para entender el desarrollo de la cirrosis.
Principales autores que desarrollaron el concepto	Wepfer, Malpighi, Mascagni, Kiernan y Müller.	Theile, Brissaud y Sabourin, Mall y Arey.	Rappaport y col., Novikoff y Essner.

Características importantes de los conceptos de lobulación hepática.

Hepatocitos

Los hepatocitos totalizan hasta el 80% de la población celular del hígado. La mayoría de las funciones hepáticas dependen de este tipo celular, por lo que éstos poseen una gran diversidad funcional. Son responsables de la síntesis, degradación y almacenamiento de numerosas sustancias.

Los hepatocitos forman poblaciones celulares heterogéneas que expresan un fenotipo variable dependiendo de su localización en el acino hepático. Mientras que los hepatocitos periportales principalmente producen glucosa y forman urea, los de regiones perivenulares participan en la captación de glucosa, en la síntesis de glutatión y contienen más actividad enzimática dependiente del citocromo P₄₅₀. Puede ser que esa heterogeneidad se relacione con procesos de maduración. La organización de los hepatocitos les facilita el intercambio de sustancias con la sangre y la excreción de la bilis.

En general, el núcleo del hepatocito es esférico y central. La mayoría de las células son mononucleadas, pero hasta un 25% pueden ser binucleadas. También pueden presentar uno o más nucleolos.

El aspecto del citoplasma varía dependiendo de varios factores, por ejemplo del estado nutricional. En general, los hepatocitos contienen unas pocas inclusiones lipídicas, pero éstas aumentan tras la ingestión de ciertas sustancias tóxicas^{60,156}.

Sinusoides hepáticos

En el sinusoides podemos diferenciar cuatro tipos celulares: células endoteliales, células de Kupffer, células estrelladas y células "Pit". Cada tipo posee características morfológicas y funcionales propias, incluyendo una aparente capacidad autoproliferativa. No se han observado estados transicionales entre tipos distintos ¹⁹³.

En los sinusoides hepáticos no existe una membrana basal continua, lo que facilita el transporte de determinadas sustancias a su través. Las células sinusoidales junto al espacio de Disse y la superficie de las microvellosidades de hepatocitos, forman una unidad histológica y funcional ⁶⁶.

Células endoteliales

Forman el revestimiento discontinuo de los sinusoides. Son las encargadas de filtrar los fluidos que se intercambian entre el lumen sinusoidal y el espacio de Disse. La presencia de fenestraciones permite este intercambio ⁴⁶.

Las fenestraciones varían, con un menor diámetro y mayor frecuencia en las zonas centrales del lobulillo. Como resultado se establece un incremento de la porosidad a lo largo del gradiente portal-central⁶⁰. Este gradiente tiene importancia en la funcionalidad del hígado tanto en condiciones normales como en condiciones patológicas ⁶⁶.

Las células endoteliales intervienen en una serie de procesos importantes como la regulación de los niveles sanguíneos de colesterol, transporte de vitamina A y secreción de VLDL sintetizadas por las células parenquimáticas y participan en el desarrollo de hígado graso en ciertas patologías. También poseen mecanismos especializados de endocitosis para todo tipo de moléculas y pequeñas partículas, así como receptores específicos para varias sustancias ¹⁹³.

Células de Kupffer

Las células de Kupffer se localizan en el interior de los sinusoides, sobre el endotelio, con prolongaciones que se extienden entre células endoteliales subyacentes⁴⁶. Pertenecen al sistema fagocítico reticuloendotelial y derivan de monocitos. Preferentemente se localizan en áreas periportales del lobulillo. Mediante procesos de endocitosis, captan células viejas de la sangre, restos celulares, parásitos y bacterias¹⁹³.

Estas células se caracterizan por su forma estrellada, contornos irregulares, sus vesículas intracitoplasmáticas, vacuolas y cuerpos densos.

En respuesta a determinados estímulos, pueden proliferar y se activan produciendo sustancias de fuertes efectos biológicos, como radicales de oxígeno, factor de necrosis tumoral (TNF), interleuquinas 1 y 6 y diversos eicosanoides. Estos productos pueden ser tóxicos para el parénquima hepático e incluso conducir a necrosis y disminución y bloqueo de procesos bioquímicos^{46,56,70}.

Células estrelladas

Las células estrelladas, también llamadas de Ito, "fat-storing", lipocitos, perisinusoidales, etc, se localizan en el espacio de Disse y están separadas del sinusoides por las células endoteliales. Extienden largas prolongaciones que se ponen en contacto con el endotelio y mediante las cuales regulan el flujo sanguíneo lobular¹⁹³.

Las células estrelladas se caracterizan por contener numerosas gotas lipídicas en las que almacenan vitamina A. También las podemos diferenciar de los otros tipos por su contenido en desmina^{60,156}.

Estas células son las principales productoras de componentes de tejido conectivo, tanto en condiciones normales como patológicas. Sintetizan colágeno I, II y IV, fibronectina, laminina, condroitín sulfato, dermatán sulfato y ácido hialurónico.

En condiciones patológicas, las células estrelladas son estimuladas por productos de las células de Kupffer y otros macrófagos, de tal forma que proliferan y se transforman en células tipo miofibroblasto. Para ello, pierden sus gotas de grasa y su contenido en vitamina A. Tanto las células estrelladas como los miofibroblastos, durante la fibrogénesis se acumulan en los septos fibrosos produciendo grandes cantidades de colágeno y componentes de la matriz extracelular ^{79,151}.

Células Pit

Se localizan o están embebidas en la lámina endotelial. Se caracterizan por poseer gránulos localizados a un lado del núcleo. Se han sugerido similitudes entre estas células y los linfocitos granulares.

Median efectos citolíticos espontáneos y por tanto no precisan ser activados por un fuerte estímulo como las células de Kupffer. Las células "Pit" forman una población heterogénea, con diferencias en el número y tamaño de sus gránulos ¹⁹³.

Células ovals

Las células ovals, caracterizadas por su núcleo oval, forman una población minoritaria de células hepáticas que, normalmente, se localizan en regiones donde los conductos biliares contactan con el parénquima. Presentan una morfología intermedia entre hepatocitos y células de los conductos biliares y se piensa que pueden ser precursores de ambos tipos celulares. Su origen es materia de controversia, pero se ha observado que una serie de agentes tóxicos y carcinogénicos pueden inducir su proliferación ^{12,16,59,73}.

Matriz extracelular

Se compone de macromoléculas (colágenos, glucoproteínas no colágenas y proteoglicanos), electrolitos, agua y pequeñas cantidades de plasma.

Los componentes de la matriz son producidos por las células hepáticas. La síntesis y degradación de componentes del tejido conectivo se controla por interacciones entre las células. Por tanto, las alteraciones de alguno de estos tipos conduce a cambios en la matriz extracelular. Este hecho sucede en numerosas enfermedades crónicas, como es el caso de la fibrosis y cirrosis.

El exceso de la deposición de materiales de la matriz se acompaña de alteraciones en la estructura normal del hígado y de alteraciones hemodinámicas ¹⁵¹.

La matriz no se debe considerar simplemente como una estructura pasiva de soporte. Por el contrario, se ha considerado su importancia en procesos específicos, como diferenciación celular, movimiento, expresión fenotípica y procesos de reparación tisular ¹²⁰.

CIRROSIS HEPATICA

La cirrosis hepática es considerada en muchos casos, como el estado terminal de una variedad de enfermedades hepáticas crónicas de diferentes etiologías: alcohólica, hepatitis, inducida químicamente, obstrucción biliar, nutricional, hereditaria e incluso de etiología desconocida (criptogénica, biliar primaria, colangiopatía infantil, etc) ^{76,151,154}.

Se ha definido como un proceso difuso caracterizado por fibrosis y pérdida de la estructura normal del hígado¹³. Independientemente de su etiología, la cirrosis se caracteriza por un parénquima nodular y una fibrosis extensa, acompañada en la mayoría de los casos por necrosis hepatocelular. Ha sido descrita como el resultado de una reconstrucción anormal de la arquitectura lobular del hígado ¹⁵¹.

En el proceso de cirrosis siempre existe un mecanismo estimulador de la producción en exceso de tejido conectivo, con un aumento de fibras de colágeno y proliferación de conductos biliares. Se ha destacado un aumento del volumen citoplasmático, nuclear, así como un incremento del número de células estrelladas, asociándose estos cambios a la deposición de fibras de colágeno ¹⁶⁰.

Por otro lado, Belyaev et al (1992).¹³ han sugerido que los hepatocitos también intervienen en la inducción de la proliferación conectiva. Para estos autores, la cirrosis es más una consecuencia del daño al hepatocito a nivel funcional, que de la necrosis parenquimática.

Las células de Kupffer se movilizan e incrementan en número y migran desde el lumen sinusoidal al espacio de Disse o al espacio intercelular entre hepatocitos. En ocasiones entre los dos tipos celulares se establece una relación estrecha y un contacto estructural que se ha relacionado con la degeneración de los hepatocitos. Las células de Kupffer producen y liberan radicales de oxígeno activos, citoquinas y enzimas proteolíticas. Estos productos citotóxicos pueden causar daños celulares. Por tanto, las células Kupffer activadas pueden dañar o incluso provocar la muerte celular de los hepatocitos, amplificar la respuesta inflamatoria y modular el daño hepatocelular ^{55,56,70}.

Debido a las alteraciones estructurales en el lóbulo hepático como consecuencia del desarrollo de la cirrosis, a nivel funcional aparece por un lado hipertensión portal y por otro lado alteraciones hemodinámicas ^{8,11,17,98}.

La circulación intrahepática se debilita. El bloqueo circulatorio y la hipertensión portal se producen por varias razones ¹⁵¹:

- 1-Compresión de la vena hepática debido a la transformación nodular o a la fibrosis.*
- 2- Fibrosis perisinusoidal.*
- 3- Anastomosis arteriovenosa en los septos fibrosos.*
- 4- Traumatismo portal.*
- 5-Esplenomegalia asociada a cirrosis que incrementa el flujo sanguíneo en el hígado.*

Los tres primeros factores elevan la presión intrasinusoidal provocando ascitis e insuficiencia hepática, mientras que los dos últimos ocurren a nivel perisinusoidal.

Las alteraciones hemodinámicas son debidas a tres factores ¹⁵¹:

1- La anastomosis portosistémica extrahepática hace que el flujo sanguíneo en la arteria hepática incremente, provocando su dilatación y que se vuelva sinuosa.

2- Variación de la capacidad sanguínea en el parénquima debido a las anastomosis septales entre los brazos aferentes de la arteria hepática y la vena portal y afluentes eferentes de la vena hepática.

3- Menor eficacia de la microcirculación intralobular causada por la inflamación celular intrasinusoidal, la aparición de membranas basales continuas que rodean a los sinusoides, la fibrosis pericelular y la distorsión lobular.

La consecuencia más importante de las alteraciones hemodinámicas es la necrosis hepatocítica, ya que estas células son muy activas y precisan una total integridad del flujo parenquimatoso para su correcto funcionamiento. Además, el parénquima funcional se reduce, incrementa el flujo linfático, se altera el flujo biliar favoreciéndose la secreción excesiva de bilis de baja concentración (colestasis) y hay un exceso de hierro en los hepatocitos periportales.

Desde el punto de vista anatómico, podemos distinguir varios tipos de cirrosis ¹⁵¹:

- Cirrosis micronodular. Se caracteriza por nódulos pequeños asociados con septos finos.*
- Cirrosis macronodular. Los nódulos varían en tamaño, los septos son irregulares en anchura y se extienden hasta que se unen rodeando varios nódulos y lóbulos.*
- Cirrosis septal incompleta o intermedia. No aparecen nódulos, sólo septos que atraviesan parénquima.*

Dentro de la cirrosis se describen tres estados o etapas de desarrollo ⁹⁸:

- A) Estado inicial. Se caracteriza por necrosis focal, degeneración acidofílica y esteatosis.*
- B) Estado precirrótico. Aparece una marcada fibrosis centrilobular y sinusoidal con finos septos fibrosos que comienzan a dividir el lóbulo hepático.*
- C) Cirrosis establecida. Regeneración hepatocítica formando nódulos rodeados por septos de tejido conectivo y con proliferación de conductos biliares.*

Tanto la fibrosis como la cirrosis van asociadas a degeneración grasa y necrosis de diverso grado.

La patogénesis de la cirrosis puede dividirse en cuatro grandes procesos interrelacionados entre sí: necrosis hepatocelular, inflamación, regeneración y fibrosis.

Necrosis e inflamación

El proceso de necrosis asociado a la enfermedad hepática, es provocado por la acción directa de agentes ofensivos o sus metabolitos, unido normalmente a una reacción inflamatoria. También puede ser consecuencia de un daño hepatocelular inmunológico. Una tercera causa es el daño anóxico causado por las alteraciones hemodinámicas y la fibrosis.

La colestasis también puede provocar degeneración, normalmente localizada en determinadas porciones de un nódulo. Finalmente, algunas deficiencias enzimáticas en recién nacidos pueden conducir a esteatosis o necrosis.

La necrosis puede ser masiva, central, periportal y confluyente. Dentro del acino hepático, la zona 3 es la más susceptible a los procesos necróticos debido a su reducida tensión de oxígeno y a que la formación de metabolitos por el sistema de biotransformación microsomal está más concentrada en esta zona ¹⁵¹.

La inflamación en la cirrosis puede deberse a una reacción contra el daño hepatocítico, a un proceso inmunológico o resultado de la estimulación por agentes ofensivos.

Según su localización, la inflamación se clasifica en portal (característica de la hepatitis crónica persistente), periportal (observada frecuentemente en la hepatitis crónica activa o agresiva) e inflamación con necrosis de tipo confluyente, periportal, central o masiva^{119,151}.

Regeneración

Las alteraciones funcionales y la necrosis asociadas al desarrollo de la hepatopatía estimulan la proliferación de hepatocitos, conductos biliares y células sinusoidales. Los procesos proliferativos se acompañan de formación de nuevos sinusoides. Así, el hígado tiene capacidad de regenerarse de forma rápida como respuesta a un daño hepático ^{151,165}.

El proceso regenerativo normalmente abarca dos periodos sucesivos ⁴⁷:

- 1ª Periodo de hipertrofia celular, determinado por un incremento de la síntesis proteica y de ARN.*
- 2ª Periodo de hiperplasia celular, caracterizado por síntesis de ADN y mitosis.*

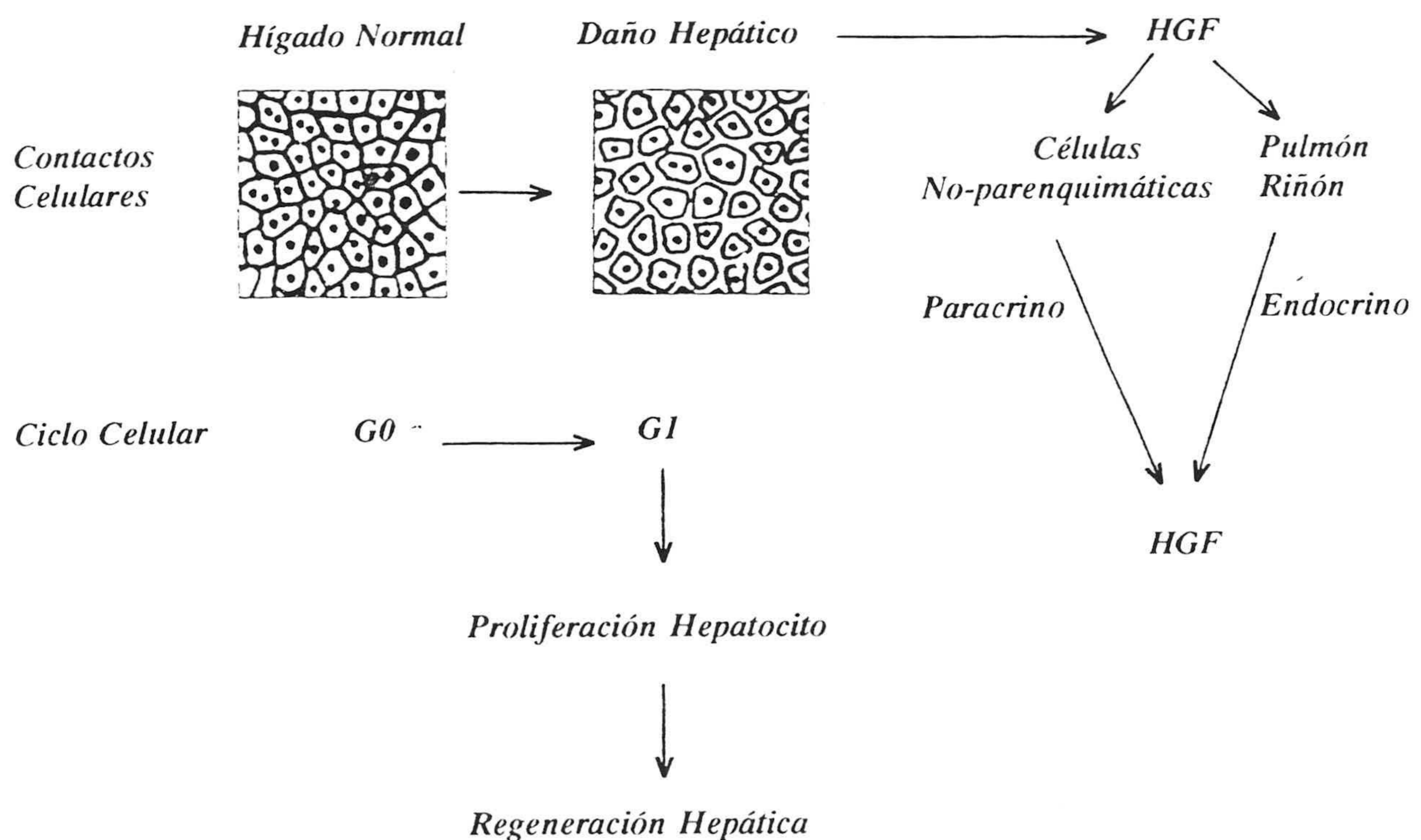
Mediante la regeneración hepatocelular se restaura el parénquima perdido en el desarrollo de la enfermedad; sin embargo, en aquellas porciones parenquimáticas en las que el suministro portal de sangre está dañado o bloqueado, la regeneración se vuelve irregular e hiperplástica, llevándose a cabo de una forma desorganizada. Como resultado se produce la transformación nodular característica del hígado cirrótico ¹²¹.

El mecanismo capaz de iniciar y controlar este proceso es complejo y abarca cooperaciones entre hepatocitos, células de Kupffer, células estrelladas, fibroblastos y células estrelladas transformadas o miofibroblastos⁸⁴. Las células no-parenquimáticas son capaces de sintetizar factores que estimulan o inhiben la síntesis de ADN en el hepatocito. Entre estas se encuentran el factor de crecimiento TGF- α y el factor de crecimiento epitelial (EGF) que estimulan la proliferación y el factor de crecimiento TGF- β que la inhibe ^{15,114,125,126,165}.

Se ha observado que el factor más estimulador de la proliferación es el denominado factor de crecimiento del hepatocito o HGF^{20,122,180}. El ARNm del HGF es producido por las células estrelladas como respuesta a un daño hepático mediada por las células de Kupffer. La capacidad de sintetizar HGF no se ha encontrado en los miofibroblastos ^{84,162}.

Las células estrelladas y las células de Kupffer también intervienen en la síntesis de proteínas matriciales y en la reparación tisular. En conclusión, estos dos tipos celulares parecen ejercer un control paracrino de la proliferación hepatocítica y la reconstitución sinusoidal ⁸⁴.

El crecimiento y diferenciación celular y la reorganización tisular, no sólo son regulados por el control paracrino, sino que también son importantes los contactos celulares. Tras el daño hepático, la pérdida de contactos entre células adyacentes es un prerrequisito para que se produzca la respuesta de los hepatocitos. Matsumoto et al. (1991)¹²², sintetizan el mecanismo de control de la iniciación de regeneración hepática mediante el siguiente esquema:



Fibrosis

La síntesis y deposición excesiva de tejido conectivo provoca la formación de septos, debido tanto al colapso de colágeno ya existente (septos pasivos), como a la formación excesiva de nuevas fibras colágenas (septos activos)^{79,151,154}. Los estudios sobre desarrollo y control de la fibrogénesis son muy numerosos.

Podemos diferenciar tres procesos dentro de la fibrogénesis parenquimática:

A) Varios tipos celulares se trasladan a determinadas zonas hepáticas para formar colágeno y componentes de la matriz. Las células estrelladas, fibroblastos y miofibroblastos son los tipos celulares responsables de esta síntesis de elementos de tejido conectivo. También los hepatocitos pueden producir colágeno (tipo I, II y IV) una vez perdida la arquitectura lobular normal^{38,182}.

B) Deposición y maduración extracelular del colágeno. El proceso aumenta en las zonas donde el intercambio de fluidos está alterado, los hepatocitos dañados, los macrófagos activados y la tensión de oxígeno reducida. Esto explica la deposición preponderante en la zona 3 del acino hepático¹¹⁷.

C) Alteración de procesos de degradación y síntesis de colágeno. Depende de la acción de células mesenquimáticas como las células de Kupffer y los fibroblastos¹¹⁷.

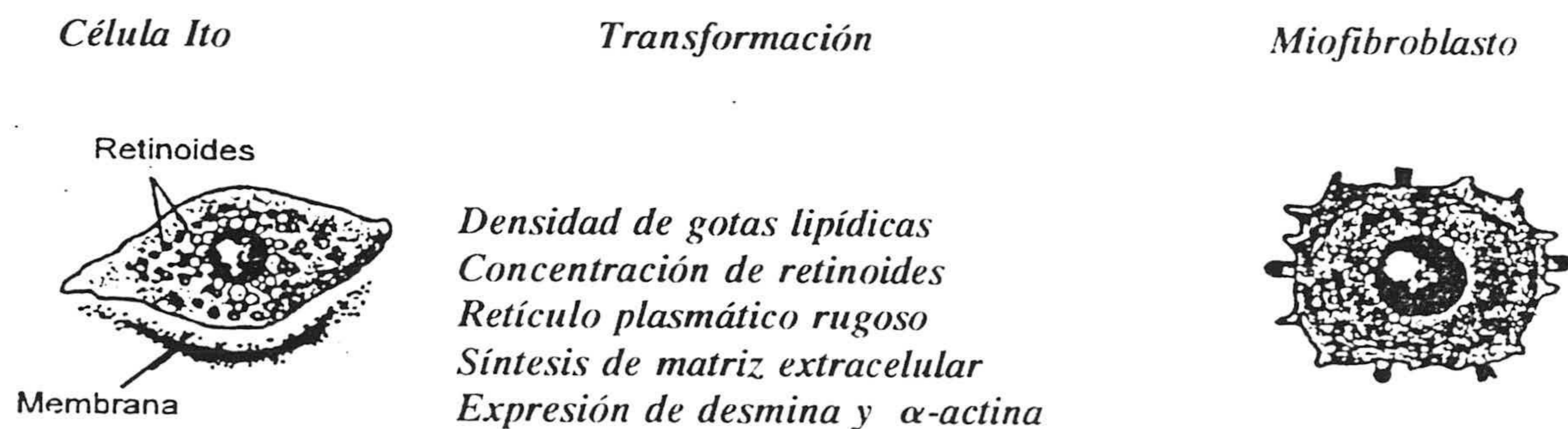
La fibrosis se localiza preferentemente en tractos portales, alrededor de hepatocitos dañados cercanos a tractos portales y septos, rodeando a conductos biliares en proliferación, alrededor de capilares y venas y rodeando a macrófagos.

La progresión de la fibrosis y la cirrosis es dependiente de varios factores. El principal es el daño a nivel de los hepatocitos y los procesos inflamatorios que conducen a fibrogénesis. Los hepatocitos persistentes que sufren procesos necróticos estimulan a su vez el desarrollo de la patología. Todas estas alteraciones están muy relacionadas con la formación de una membrana basal continua alrededor de los hepatocitos y con la

proliferación de conductos, lo que también contribuye a la extensión del proceso inflamatorio. La formación de septos causa cambios circulatorios, contribuyendo a la hipertensión portal y a los procesos colestáticos.

De esta forma, vemos que se crea un círculo vicioso en el que el daño celular junto a la inflamación provocan la fibrosis pericelular que, a su vez, interfiere en la nutrición celular y provoca cambios hemodinámicos en los septos; como consecuencia, de nuevo se induce daño celular, iniciándose todo el proceso ^{76,172}.

Las células estrelladas son el tipo celular de mayor importancia en la producción de colágeno en estados patológicos. Numerosos estudios han demostrado que, bajo un estímulo inflamatorio, éstas proliferan y se transforman en miofibroblastos capaces de sintetizar un amplio espectro de componentes de la matriz extracelular^{65,72,75,76,79,88,118,127}. Alguno de los cambios ocurridos durante la transformación de las células estrelladas se pueden observar en el esquema (Ref: The New England Journal of Medicine. Friedmann):

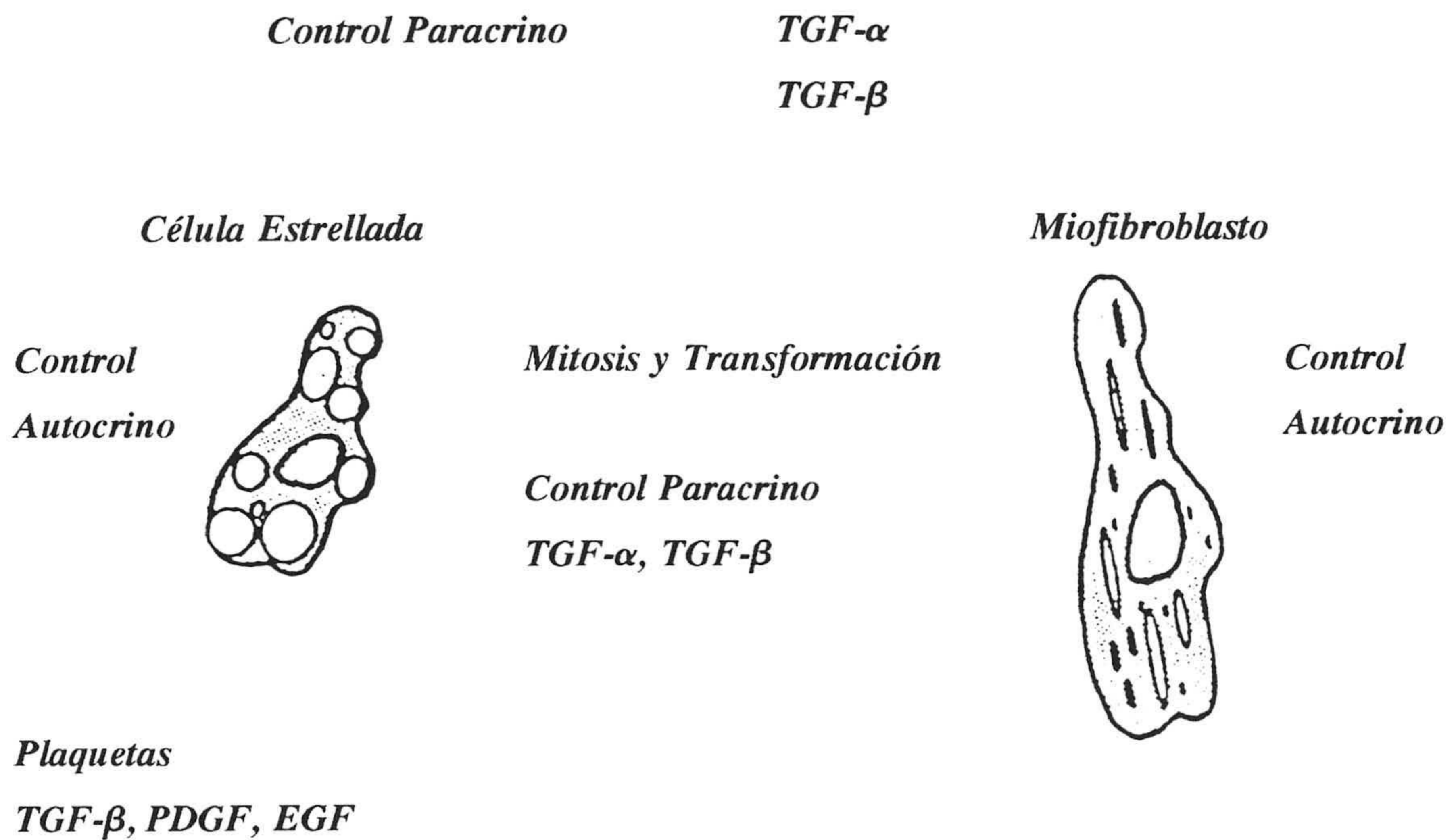


Factores secretados por las Kupffer y otros macrófagos hepáticos activados estimulan las reacciones de las células estrelladas. Entre los mediadores que intervienen en este control paracrino encontramos el TGF- α , TGF- β , EGF, PDGF, etc ^{8,9,68,78,99,123,163,168,169}.

La activación de las células estrelladas se puede esquematizar ⁶⁷:

Daño Celular

Fagocitosis por células Kupffer



Los cambios del espacio perisinusoidal provocan que las células endoteliales hepáticas adquieran características fenotípicas de células endoteliales microvasculares. Además, el número de estas células disminuye y se han observado uniones entre ellas en estados patológicos ^{41,137}.



HEPATOPATIA EXPERIMENTAL. CIRROSIS HEPATICA INDUCIDA POR TIOACETAMIDA.

Uno de los intereses básicos de la patología experimental es el análisis en profundidad de los procesos patológicos. Este análisis tiene como propósito llegar a un conocimiento de las causas del desarrollo de una enfermedad, tanto a nivel celular como tisular. Dicho conocimiento permite la aparición de nuevas hipótesis sobre la etiología y patogenia de diversas enfermedades y abordar estudios más profundos, con aproximaciones a la funcionalidad y estructura celulares. Por ello, se hacen indispensables modelos experimentales que ofrezcan información sobre las posibles causas y mecanismos de los procesos patológicos.

El notable incremento en la incidencia de hepatopatías de distintas etiologías, ha desencadenado un gran interés en la investigación de estas enfermedades, tanto en referencia a sus mecanismos como a los diferentes factores que propician su aparición y desarrollo. Para el estudio de disfunciones hepáticas se ha necesitado el establecimiento de modelos de hepatotoxicidad.

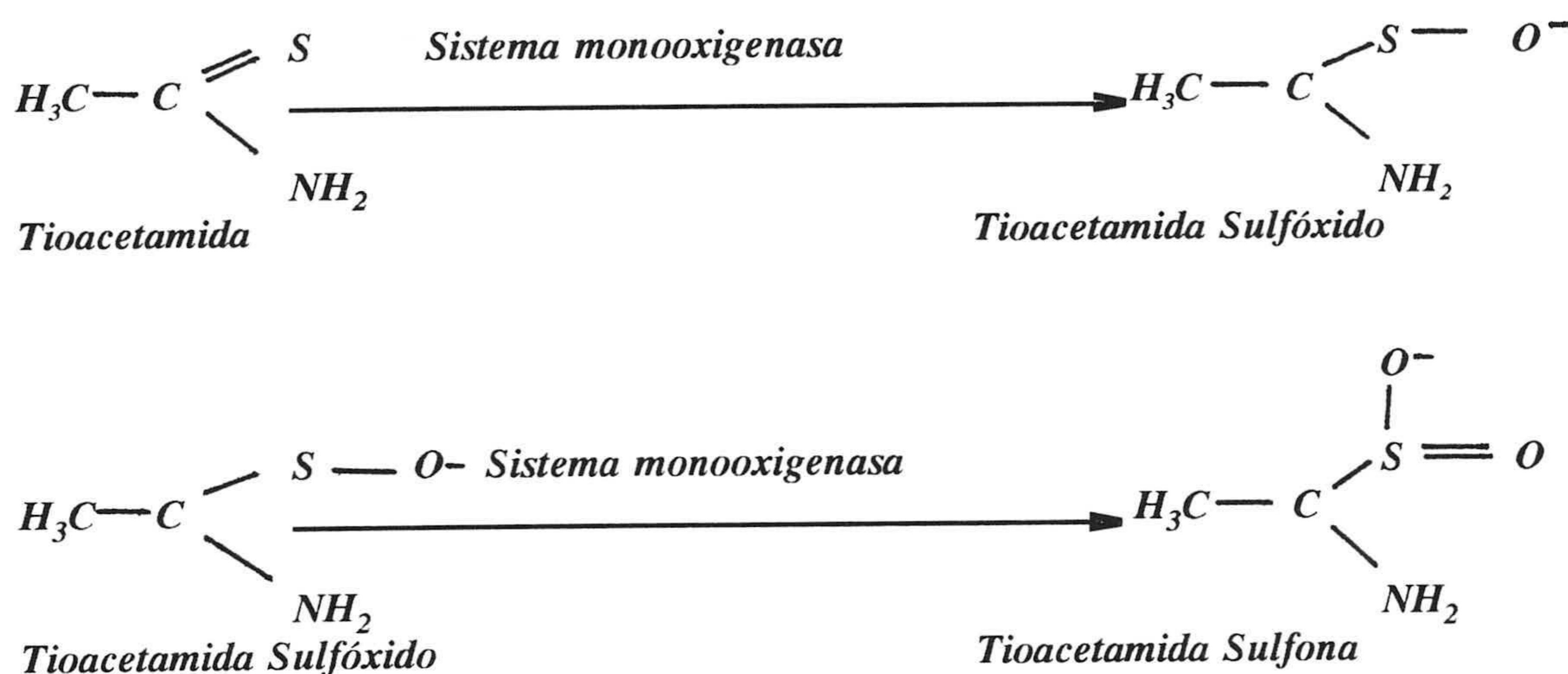
Así, podemos definir la hepatopatía experimental como la producción o inducción de disfunciones hepáticas mediante la administración de determinados agentes hepatotóxicos en animales de laboratorio. Se intenta simular el proceso patológico normal, con variaciones según el tiempo, vías y dosis de administración utilizadas.

Numerosos agentes hepatotóxicos han sido usados en el desarrollo de estos modelos experimentales. La mayoría de ellos son compuestos de estructura sencilla que lesionan el hígado de una manera consistente y fácilmente reproducible.

Uno de los agentes hepatotóxicos ampliamente utilizados es la tioacetamida (TAA). Este compuesto es importante ya que dependiendo de la vía de administración, dosis y tiempo de empleo, conduce a la aparición de diversas disfunciones hepáticas, cirrosis y hepatocarcinogenicidad que sirven como modelo experimental ⁸¹.

Diversos grupos de investigación han descrito que una única dosis de TAA es capaz de producir necrosis hepática centrilobular y que la administración crónica conduce a cirrosis y hepatocarcinoma. La toxicidad depende de la dosis y duración de su administración^{27,147}. Posteriormente, se han definido las características de la lesión aguda y crónica de la TAA y se han demostrado sus propiedades carcinogénicas^{11,44}.

La TAA es un compuesto cristalino, de color blanco, soluble en agua y en alcohol absoluto⁸². Para ejercer su efecto tóxico, la TAA necesita ser activada metabólicamente. Como resultado de su metabolismo microsomal, la TAA se transforma secuencialmente en TAA-sulfóxido y TAA-sulfona. El efecto tóxico es atribuido al metabolito TAA-sulfóxido^{54,184}.



La TAA induce una cirrosis morfológicamente mejor definida y más uniforme y con menor índice de mortalidad que otros modelos, como la ligación de conductos biliares o el Cl_4C ^{201,202}. La facilidad de producir daño hepático por la administración de TAA y la constancia de este daño, hacen que sea un agente útil para el estudio de los cambios bioquímicos e histológicos^{20,71}.

Por otro lado, una de las causas que han aumentado el interés del modelo de este tipo de toxina, es el hecho de que la TAA induce cirrosis más parecida a la cirrosis establecida en humanos que otras formas experimentales. Los cambios histológicos y bioquímicos provocados por la administración de este agente se pueden comparar con la cirrosis alcohólica en humanos^{26,105,200,201}.

De esta forma, las características esenciales de la enfermedad en humanos, como la aparición de nódulos parenquimáticos y la formación de septos, existen en este modelo experimental ⁹¹.

Dosis agudas de TAA producen necrosis hepática centrilobular, resultado de la ruptura de proteínas tisulares e interacciones con la membrana celular y proliferación de conductos biliares ^{54,184}.

La administración crónica causa cirrosis nodular y hepatocarcinoma ^{11,184}. Durante la administración crónica con TAA se produce una transformación nodular del hígado, con propagación de áreas fibróticas y proliferación de conductos biliares, que dividen al hígado en seudolóbulos. Como consecuencia, la vascularización intralobular normal cambia, destruyéndose así la arquitectura del hígado y acompañado de necrosis parenquimal y reacción inflamatoria. Simultáneamente se desarrollan células hepatocelulares y colangiocelulares alrededor de vasos sanguíneos y conductos biliares. Todo esto conduce a una cirrosis nodular portal con nódulos hiperplásticos, fibrosis septal avanzada y proliferación ductal ^{200,201}.

La anormalidad hepática provoca diversas alteraciones en la funcionalidad y ultraestructura de las células hepáticas que llevan a necrosis hepatocelular en la fase aguda de la intoxicación. A nivel celular, y centrándonos en la ultraestructura del hepatocito, la administración de tioacetamida provoca alteraciones a nivel citoplasmático y nuclear, mostrando una hipertrofia generalizada.

El núcleo aparece edematoso, ocupando gran extensión celular. La membrana nuclear aparece electrodensa. Los nucleolos aumentan en número y tamaño, mostrándose electrodensos, granulares y vacualizados. Todas estas alteraciones van unidas a la hipertrofia nuclear y nucleolar ^{3,27,31,37,166,177}.

En el citoplasma, el retículo endoplasmático rugoso está distorsionado y las mitocondrias alteradas y localizadas alrededor del núcleo. En los hepatocitos centrilobulares, los ribosomas y polirribosomas decrecen en número o desaparecen y los que existen, en su mayoría separados del retículo endoplasmático, son de tamaño menor y más variable ⁶.

Según Gallagher et al. (1956)⁷¹, la administración de TAA causa inhibición del metabolismo respiratorio hepático. Para estos autores, uno de los primeros efectos de la TAA en el hígado podría ser la entrada de iones calcio en el hepatocito debido a la alteración en la permeabilidad de la membrana celular. Ya que el Ca⁺⁺ inhibe la fosforilación oxidativa, su entrada en la célula provocaría una interrupción en la producción de energía y por tanto, el mecanismo respiratorio de las células dañadas se ve afectado. Otros autores también han indicado la correlación entre el metabolismo del calcio y el magnesio y las características histológicas del tejido hepático durante diferentes estados de intoxicación con TAA^{4,29}. Por otro lado, el efecto de la TAA se ha asociado con algún tipo de alteración mitocondrial que a su vez provocaría daño celular².

La administración oral de TAA implica profundas alteraciones en la estructura y funcionalidad nuclear. Así, se ha observado un incremento de ARN nuclear en los hepatocitos alterados, mientras que el contenido de ARN en el citoplasma no aumenta.. Esto podría deberse a un descenso del transporte de ARN desde el núcleo, a un incremento en su síntesis y/o a un almacenamiento prolongado del ARN en el núcleo^{3,4,31,171,177}.

Según Adams y Busch (1963)¹ la TAA altera la liberación de ARN nucleolar, sin inhibir su síntesis. El incremento del ARN nucleolar y el del diámetro nuclear, así como el aumento de actividades enzimáticas y los incrementos de diámetros nucleolares, parecen estar estrechamente correlacionados¹⁰⁶.

Respecto al ciclo de la urea, éste es inhibido tras la administración de TAA. Como consecuencia, se acumula amonio intracelularmente y la actividad de enzimas mitocondriales se ve incrementada como mecanismo de protección contra el efecto tóxico del amonio²⁶.

El daño agudo y crónico en la estructura y función del hepatocito también se acompaña con una acumulación intracelular de gotas lipídicas compuestas mayoritariamente por triacilgliceroles^{64,147}.

Franke et al. (1985)⁶⁵, demuestran que, en hígados dañados de forma aguda, la transferencia de triglicéridos hepáticos al suero se reduce casi un 50% en comparación con los hígados de animales controles. El deterioro en el ensamblaje de los constituyentes de las VLDL reduce de forma importante la formación de estas lipoproteínas. La desorganización y/o desaparición del retículo endoplasmático rugoso en los hepatocitos explicaría esta reducción, ya que el transporte de las VLDL nacientes hacia el complejo de Golgi se vería muy afectado^{64,65}. Zimmermann et al. (1986)²⁰⁰, concluyen que la lesión hepática inducida por la administración crónica de TAA, es un modelo válido para el metabolismo lipídico y lipoproteico en cirrosis hepática.

Además, en este modelo de cirrosis crónica, se ha demostrado un efecto inhibitor sobre la síntesis de proteínas hepáticas y una intolerancia a la glucosa. Esto se acompaña de un aumento de la oxidación de ácidos grasos de cadena larga y en la cetogénesis¹⁶⁶.

Para Nozu et al. (1992)¹⁴³, los cambios metabólicos anteriormente descritos podrían reflejar un estado catabólico general y representaría una adaptación para mantener el suplemento energético bajo condiciones de intolerancia a la glucosa y un incremento de la utilización de cuerpos cetónicos en tejidos periféricos.

Recientemente, Moreira et al. (1994)¹²⁹ han demostrado que en la cirrosis experimental provocada por la ingestión oral de tioacetamida, se reproducen las alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados características de la cirrosis humana, aspecto en el que se profundizará más adelante.

MALNUTRICION Y CIRROSIS

La malnutrición y la deficiencia de vitaminas son características comunes de enfermedades hepáticas crónicas, incluyendo la cirrosis y tienen efectos negativos en la función y estructura de las células hepáticas^{105,111,135,141,189}. La malnutrición aparece como consecuencia del incremento de las necesidades nutricionales producido por varias causas^{25,42,49,112}.

- Hipermetabolismo*
- Anorexia y alimentación inadecuada*
- Malabsorción y/o maldigestión*
- Pérdida excesiva de proteínas intestinales*
- Daños en la síntesis hepática de proteínas*
- Desequilibrio en el metabolismo intermedio*

En pacientes y animales de experimentación cirróticos, el metabolismo energético es anormal, contribuyendo al aumento de la morbilidad, infección, agravamiento de la enfermedad y finalmente, al aumento de la mortalidad^{101,103}.

El hígado juega un papel principal en la homeostasis de la glucosa. La intolerancia a la glucosa aparece en las enfermedades crónicas hepáticas, con una menor producción de glucosa y triglicéridos. Esta alteración se acompaña de hiperinsulinemia, resultado de un descenso en el transporte hepático y resistencia a la insulina.

El rápido descenso de la producción de glucosa endógena puede ser explicado por la alteración de la funcionalidad hepática que lleva a una menor capacidad glucogenolítica y/o gluconeogénica a nivel hepático¹⁵⁵. El mecanismo intrínseco de la reducción de glucógeno en el hepatocito, incluiría cambios en la concentración de metabolitos hepáticos reguladores, ruptura de la estructura del acino hepático y retracción portosistémica o vías alternativas de utilización del glucógeno, y no se relaciona con cambios en las enzimas que intervienen en el metabolismo hepático del glucógeno (glucógeno fosforilasa y glucógeno sintetasa)^{103,109}.

Los niveles plasmáticos de glucógeno, amonio y aminoácidos aumentan, mientras que los niveles de proteínas en circulación (albúmina, transferrina,...) disminuyen.

Se puede observar una tendencia a utilizar los ácidos grasos en sustitución de la glucosa, como fuente energética. Así, la concentración de ácidos grasos libres se incrementa. Sin embargo, la capacidad hepática de excreción de triglicéridos está reducida y el paciente se hace intolerable a grandes cantidades de grasa ^{109,155}.

El mecanismo de regulación para almacenar proteínas de reserva no se afecta, mientras que sí el de carbohidratos y grasa. Este desequilibrio conduce a un aumento de las reservas proteicas durante la alimentación y a un aumento de la degradación y conversión de éstas a urea y glucosa durante el ayuno. El resultado neto de estos cambios sería un mayor requerimiento de proteínas para mantener el equilibrio energético. La oxidación de ácidos grasos esenciales sigue regulada, pero la de aminoácidos no esenciales no lo está, por lo que las necesidades de aminoácidos esenciales no incrementan ¹⁰².

Por otro lado, se debe destacar que la utilización excesiva de proteínas lleva a un aumento plasmático de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) y una reducción de aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina y valina). Este hecho implica que una terapia nutricional basada en el aporte de proteínas a pacientes cirróticos, aunque pueda conducir a una mejora en la función hepática, al mismo tiempo puede acelerar y/o provocar la aparición de encefalopatía hepática por el aumento de aminoácidos aromáticos en el cerebro. Esta es la base del empleo de dietas enriquecidas con aminoácidos ramificados ^{35,109,156}.

Otras deficiencias nutricionales que se han correlacionado con la enfermedad hepática, son la de vitaminas A, E, B₁ y B₁₂, ácido nicotínico, ácido fólico y zinc, principalmente en pacientes malnutridos ^{105,111,141}.

El objetivo de una terapia nutricional es aportar las calorías, proteínas y macronutrientes adecuados sin inducir o agravar encefalopatías hepáticas y asegurar la disponibilidad de sustratos energéticos ^{25,61,105,141,145}.

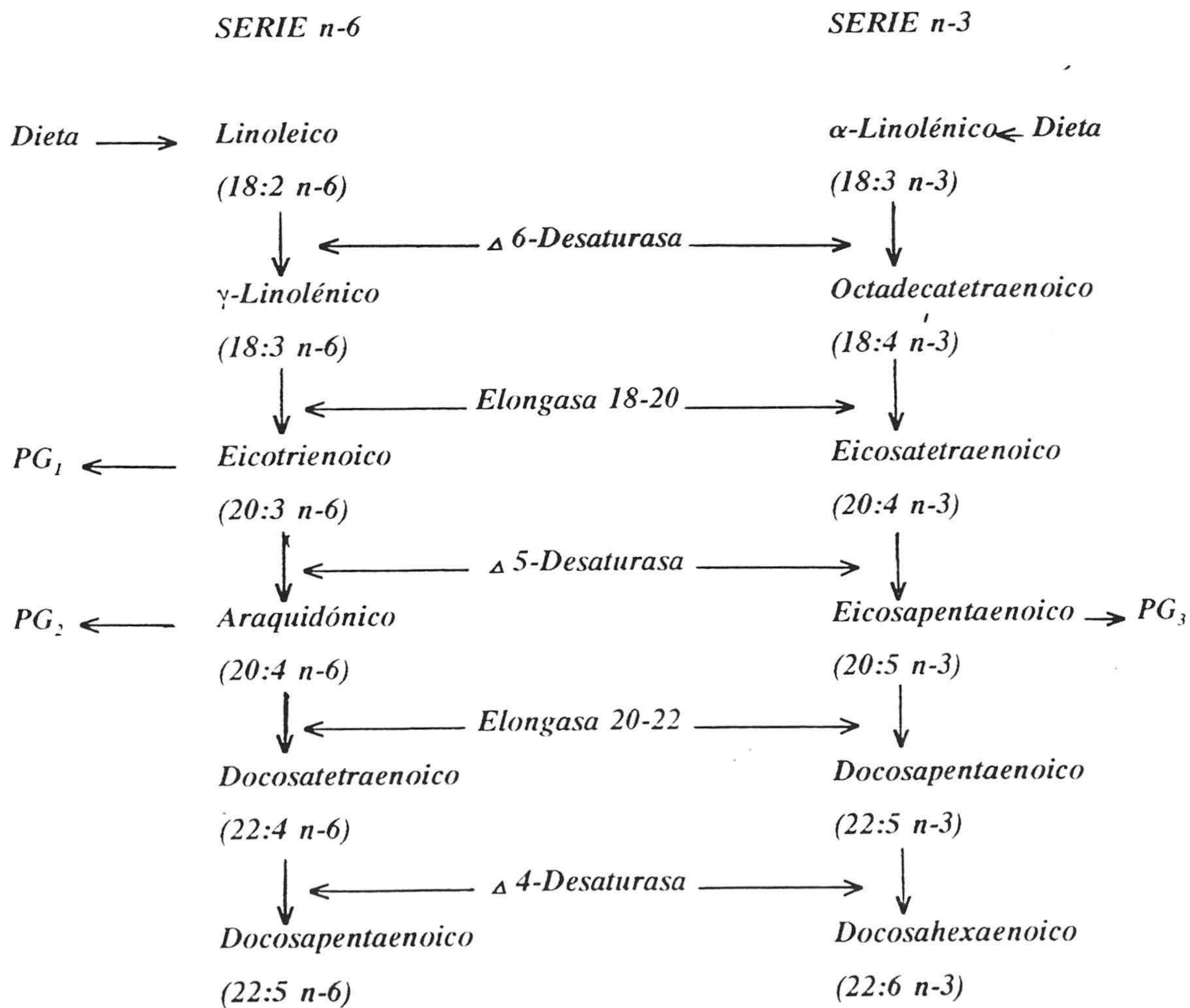
Este objetivo representa un problema debido a las grandes alteraciones metabólicas que dañan la utilización de los nutrientes. Los individuos cirróticos se encuentran muy hipoproteinémicos, reflejo de su menor reserva y síntesis proteica, pero el aporte de proteínas conlleva problemas de malabsorción, hiperamonemia y empeoramiento de encefalopatías^{109,189}. Por otra parte, la incapacidad metabólica de los hepatocitos, conjuntamente con la malnutrición asociada, conducen a la aparición de alteraciones graves en el metabolismo lipídico, particularmente de los ácidos grasos poliinsaturados²²⁻²⁵.

Por tanto, estudios sobre la corrección de estas alteraciones se pueden considerar una de las estrategias terapéuticas más importantes en la mejora de pacientes cirróticos.

CIRROSIS Y ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS

Metabolismo hepático de los ácidos grasos poliinsaturados.

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL) desempeñan un papel fundamental en la estructura de membranas y en el control de la actividad celular^{22-24,143,149}. Se pueden agrupar en dos series según la posición del primer doble enlace a partir del extremo no carboxílico. Así, aparecen las series n-3 y n-6 que derivan respectivamente de los ácidos grasos esenciales linoleico (18:2 n-6) y α -linolénico (18:3 n-3). Mediante un sistema de reacciones de desaturación y elongación, estos ácidos grasos son convertidos en el hígado en sus derivados poliinsaturados de cadena larga, tales como araquidónico (AA 20:4 n-6), eicosapentaenoico (EPA 20:5 n-3) y docosahexaenoico (DHA 22:6 n-3).



En la actualidad se considera que los ácidos grasos 22:5 n-6 y 22:6 n-3 pueden formarse sin la acción de la Δ 4-desaturasa, mediante retroconversión a partir de AGPI-CL de mayor número de átomos de carbono y la acción de la Δ 6-desaturasa¹⁷⁶.

El ácido linoleico es muy abundante en tejidos vegetales, mientras que el α -linolénico se encuentra especialmente en el fitoplancton, vegetales acuáticos y peces de agua fría y en algunas semillas de plantas superiores. El ácido α -linolénico puede ser convertido a EPA y DHA, pero esta capacidad parece estar limitada en humanos y roedores. Los AGPI forman parte de todo tipo de membranas como constituyentes de fosfolípidos y esfingolípidos diversos^{149,174}.

Las membranas son esenciales para la funcionalidad celular e intervienen en la iniciación, recepción y traducción de estímulos neuroendocrinos, en el transporte de metabolitos e iones y en la función de enzimas ligadas a las membranas. Posibles variaciones en la composición de membranas modifican su fluidez y por tanto, su funcionamiento. Los AGPI de la dieta influyen en la composición lipídica de las membranas celulares y determinan sus propiedades físico-químicas^{10,36,92,108}.

Además, los AGPI son precursores indispensables para la síntesis de eicosanoides: prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. Estos compuestos tienen una gran actividad biológica y regulan diversas funciones celulares y tisulares^{10,48,174,175}. Entre sus actividades se podrían destacar el control de la temperatura, presión sanguínea, contracción del músculo liso, función renal, secreción hormonal, agregación plaquetaria, inflamación, función endotelial, etc. Los eicosanoides se forman enzimáticamente por la ciclooxigenasa, lipooxigenasa y citocromo P₄₅₀ a partir de ácidos grasos esenciales, siendo los metabolitos oxigenados de los AGPI de 20 átomos de carbono^{43,174,175}.

La esencialidad de los AGPI se puso de manifiesto en 1929 por Burr y Burr²¹ en animales de experimentación y ha sido ampliamente documentada posteriormente. Los ácidos grasos considerados tradicionalmente como esenciales, es decir el linoleico, α -linolénico y araquidónico, han recibido la denominación de "vitágeno F". De ellos, el ácido linoleico se ha considerado el de mayor importancia por varias razones^{57,89}:

a) El organismo humano puede sintetizar ácido araquidónico a partir del linoleico de la dieta.

b) Las cantidades de α -linolénico en la dieta habitual de los países occidentales son muy pequeñas y durante mucho tiempo se dudó de su esencialidad.

c) La aplicación tópica de ácido linoleico puede corregir algunas alteraciones características de la deficiencia en AGPI (eczemas e irritabilidad cutáneos, dificultad en la curación de heridas).

Sin embargo, recientemente se ha constatado que no se puede reducir la esencialidad de los ácidos grasos exclusivamente al ácido linoleico, señalándose condiciones diversas en las que se necesitan derivados de la serie n-6 de mayor número de átomos de carbono, así como AGPI de la serie n-3. Se ha observado que el organismo humano y el de animales superiores, no pueden insertar dobles enlaces en las posiciones n-3 y n-6, por lo que estos ácidos grasos son nutrientes esenciales ^{10,48,148,149}.

Numerosos estudios han demostrado la importancia de los AGPI en el desarrollo tisular, especialmente en el periodo neonatal^{148,190}. El tejido nervioso y el hígado contienen grandes cantidades de AA y DHA, teniendo un papel importante en el desarrollo del cerebro y la retina. Deficiencias en ácidos grasos de la serie n-3, especialmente de DHA, en periodos pre y posnatales llevan a alteraciones en el desarrollo de la visión, retina y corteza cerebral¹⁶⁸. Resultados similares se han obtenido en recién nacidos prematuros de muy bajo peso.

Por otro lado, en cerdos malnutridos durante el periodo neonatal, el grado de recuperación a nivel de peso de mucosa intestinal y contenido de ADN, proteínas, colesterol, fosfolípidos y triglicéridos, así como las actividades segmentales de la mucosa intestinal, es superior cuando estos animales son realimentados con una dieta suplementada con AGPI-CL de ambas series. Esta realimentación normaliza la composición lipídica y el perfil de ácidos grasos de las membranas de los hepatocitos ¹¹⁵.

También, se están desarrollando fórmulas suplementadas con poliinsaturados para la recuperación de diversas enfermedades, como cáncer, SIDA, artritis reumatoide, arteriosclerosis y enfermedades cardiovasculares.

La esencialidad de los AGPI-CL es un tema de interés en la actualidad. La posibilidad de sintetizarlos de los ácidos grasos esenciales de 18 átomos de carbono, no es común a todas las especies, ni es constante a lo largo del desarrollo. Debido a la importancia funcional y estructural de estos ácidos grasos, estudios sobre la influencia de dietas suplementadas en ellos serían importantes, no sólo en periodos de desarrollo, sino también en determinadas circunstancias fisiológicas y patológicas.

Alteraciones metabólicas de los AGPI en la cirrosis

En circunstancias no patológicas, la hidrólisis hepática de glucógeno es la principal forma de obtención de energía en la mayor parte de los tejidos. Cuando las reservas de glucógeno se agotan, la glucosa se puede obtener a partir de las proteínas musculares, pero la mayoría de la energía se obtiene de la grasa. De esta manera, la β -oxidación de ácidos grasos y la síntesis de cuerpos cetónicos aumenta. Estos últimos pueden ser utilizados por los tejidos en sustitución de la glucosa.

De igual forma, durante la cirrosis las reservas de glucógeno disminuyen drásticamente, por lo que la energía se debe obtener mediante la oxidación de ácidos grasos almacenados en el tejido adiposo. Es por ello que los ácidos grasos libres y el glicerol plasmáticos aumentan en los pacientes y el perfil de éstos se asemeja al de los ácidos grasos del tejido adiposo. Por otro lado, la ingesta de ácidos grasos esenciales (linoleico y α -linolénico) de la dieta también es menor en estos pacientes ^{25,134,135}.

Se han puesto de manifiesto anomalías en los lípidos y lipoproteínas en enfermedades hepáticas, sugiriéndose desequilibrios en la síntesis y transporte lipídicos. Los niveles plasmáticos de triglicéridos y VLDL se reducen. Una de las consecuencias de esta alteración es la acumulación grasa observada frecuentemente en los hígados cirróticos ¹¹⁰.

En la cirrosis crónica, los niveles plasmáticos de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de la serie n-6 (especialmente el ácido araquidónico) y de la serie n-3 también disminuyen. Los daños en las células hepáticas junto a la malnutrición, son las principales causas de las alteraciones en los mecanismos de síntesis de AGPI. Otro factor que influye esta alteración es la retracción portosistémica típica de la enfermedad. Las actividades hepáticas de desaturación y elongación de ácidos grasos están afectadas ^{22,23}.

Cabré et al. (1988)²² han descrito una relación directa entre los AGPI y la malnutrición en cirrosis, observando los menores niveles de AGPI en aquellos pacientes cirróticos con malnutrición proteico-energética. Hay que tener en cuenta que estas deficiencias también se han descrito en malnutrición sin enfermedad hepática asociada. La deficiencia en ácidos grasos poliinsaturados repercute negativamente en la función hepática y renal y acelera y/o agrava el proceso de encefalopatía hepática. Alteraciones en el perfil de los AGPI pueden llevar a disminuciones en la fluidez de las membranas, lo que afecta al funcionamiento de diversos tipos celulares, incluyendo hepatocitos, células inmunes y neuronas ²⁵.

French (1993)⁶⁷ ha frenado el desarrollo de cirrosis alcohólica en monos babuinos mediante dietas suplementadas con una mezcla de fosfolípidos poliinsaturados. La acumulación grasa disminuía en los hígados de aquellos animales alimentados con alcohol y aceite de pescado rico en AGPI de la serie n-3, frente a los demás grupos experimentales. Según este autor, los AGPI de la serie n-3 inhibían las enzimas que convertían el ácido araquidónico en metabolitos eicosanoides, los cuales están directamente implicados en la patogénesis de la enfermedad hepática alcohólica.

Para Lieber (1994)¹¹³, la administración de lecitinas poliinsaturadas puede corregir las deficiencias hepáticas de fosfolípidos y fosfatidilcolina producidas por la ingestión de alcohol, e incluso prevenir el desarrollo de fibrosis y cirrosis. El efecto positivo de los fosfolípidos poliinsaturados, no se debería exclusivamente a su contenido en colina, sino también a la alta actividad biológica de éstos y a su incorporación a las membranas celulares.

Por lo tanto, parece apropiado llevar a cabo estudios que permitan valorar los efectos

de la suplementación de ácidos grasos en la dieta en cirrosis.

Papel terapéutico de las dietas suplementadas con AGPI

Se ha demostrado el potencial terapéutico de dietas enriquecidas en AGPI. Pequeñas cantidades de AGPI de ambas series reducen la síntesis de ácidos grasos y de enzimas lipogénicas y tienen efectos hipocolesterolémicos^{40,93,100}.

Los ácidos grasos de la serie n-6 son más eficaces que los ácidos grasos saturados en la reducción de la síntesis de enzimas que intervienen en la biosíntesis de ácidos grasos. Las dietas ricas en AGPI de la serie n-3 son más efectivas que las enriquecidas con AGPI de la serie n-6. Dentro de la serie n-3, el DHA es un inhibidor más potente que el EPA.

Aportes a la dieta de DHA y EPA han sido utilizados para disminuir la concentración de acilgliceroles en plasma y modular el metabolismo de eicosanoides en adultos en varias condiciones, como hipertrigliceridemia y enfermedades inflamatorias y cardiovasculares^{43,190}.

El carácter hipotrigliceridémico de los AGPI es ejercido por la combinación de varios efectos:

1-Supresión de las enzimas necesarias para la síntesis de novo de ácidos grasos^{45,100,192}.

2-Inhibición de la síntesis de triglicéridos probablemente debido a la diacilglicerol aciltransferasa^{159,192}.

3-Disminución de la secreción de triacilglicéridos por la reducción de la formación de VLDL^{40,74,159,190,192}.

Aunque el factor más importante para este efecto de las dietas enriquecidas con AGPI es la supresión de la síntesis y secreción de triacilgliceroles en el hígado, se ha observado que la estimulación de la β -oxidación peroxisomal también contribuye a dicho efecto^{34,43,85,159,174,179}. Además Willumsen (1993)¹⁹² muestra que la administración de EPA estimula la β -oxidación también a nivel mitocondrial.

MATERIALES Y METODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACION

El estudio se ha realizado con ratas hembras de la raza Wistar, suministradas por Interfauna Ibérica, Barcelona.

Los animales se distribuyeron en grupos de seis y se colocaron en jaulas con condiciones apropiadas para permitir una alimentación "ad libitum". Se mantuvieron en una habitación termostaticada entre 22 y 25°C, en condiciones de humedad adecuada y con iluminación en ciclo luz-oscuridad de 12 horas.

Antes de iniciar el periodo de experimentación, los animales estuvieron cuatro días en estas condiciones para su adaptación.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para evaluar el efecto en la regeneración hepática de la suplementación de los ácidos grasos poliinsaturados en la dieta, tras el daño inducido por la administración oral de tioacetamida durante cuatro meses, llevamos a cabo el siguiente diseño experimental.

Dividimos los animales en los siguientes grupos:

- Grupo TAA: animales que recibieron 300 mg/l de TAA en el agua de bebida durante cuatro meses.*
- Grupo Control: animales que recibieron agua sin TAA.*

Todos los animales recibieron agua y dieta "ad libitum". Durante los tres primeros meses, ambos grupos tomaron una dieta estándar y al cuarto mes una dieta semipurificada preparada por el Departamento de Investigación y Desarrollo de la empresa PULEVA (Granada) según ILAR⁹⁶. De acuerdo con los criterios del ILAR, esta dieta se considera rica en grasa, siendo la composición grasa estándar del 5%. La composición de dicha dieta queda

recogida en la tabla 1.

Pasados los cuatro meses y una vez suprimida la administración de TAA, se dejaron tres días para descartar el efecto tóxico agudo, tras los cuales se sacrificaron 7 animales del grupo TAA y 6 del grupo Control con el objeto de confirmar los efectos producidos por la administración crónica de TAA. El resto de los animales se subdividieron en 3 lotes recibiendo 3 dietas diferentes:

Grupo TAA:

- **Grupo TAA-Control.** Estos animales recibieron la dieta semipurificada durante 1 (T1C) y 2 (T2C) semanas.

- **Grupo TAA-AGPI n-3.** Los animales recibieron una dieta suplementada con AGPI de la serie n-3 durante 1 y 2 semanas (T1n-3 y T2n-3, respectivamente).

- **Grupo TAA-AGPI n-3+n-6.** Animales que recibieron dieta suplementada con AGPI de las series n-3 y n-6 durante 1 y 2 semanas (T1n-3+n-6, T2n-3+n-6, respectivamente).

Grupo Control:

- **Grupo Control-Control.** Recibieron la dieta semipurificada durante 1 y 2 semanas (C1C y C2C, respectivamente).

- **Grupo Control-AGPI n-3.** Animales controles que recibieron una dieta suplementada con AGPI de la serie n-3 durante 1 (C1n-3) y 2 (C2n-3) semanas.

- **Grupo Control-AGPI n-3+n-6.** Recibieron una dieta suplementada con AGPI de las series n-3 y n-6 durante 1 (C1n-3+n-6) y 2 (C2n-3+n-6) semanas.

Diseño experimental:

Grupo experimental

		<i>Dieta</i>		<i>Control 1S</i>	<i>2S</i>
<i>Adaptación</i>	<i>Dieta estándar</i>	<i>semipurif.</i>			
<i>4-6 días</i>	<i>3 meses</i>	<i>1 mes</i>	<i>3 días*</i>	<i>AGPI n-3 1S</i>	<i>2S</i>
				<i>AGPI n-3+n-6 1S</i>	<i>2S</i>

Grupo Control

		<i>Dieta</i>		<i>Control 1S</i>	<i>2S</i>
<i>Adaptación</i>	<i>Dieta estándar</i>	<i>semipurif</i>			
<i>4-6 días</i>	<i>3 meses</i>	<i>1 mes</i>	<i>3 días*</i>	<i>AGPI n-3 1S</i>	<i>2S</i>
				<i>AGPI n-3+n-6 1S</i>	<i>2S</i>

Diseño experimental. 1S: 1 semana de recuperación. 2S: 2 semanas de recuperación.: tres días de retirada del tóxico para evitar el efecto agudo de la TAA.*

Tabla 1. Composición de la dieta semipurificada.

<i>Composición</i>	<i>g/kg</i>	<i>Composición química</i>	<i>%</i>
<i>Caseinato cálcico</i>	<i>225,5</i>	<i>Proteínas</i>	<i>20</i>
<i>Celulosa</i>	<i>50</i>	<i>Carbohidratos</i>	<i>67,18</i>
<i>Azúcar</i>	<i>150</i>	<i>Composición grasa</i>	<i>10</i>
<i>Almidón</i>	<i>450,37</i>	<i>Minerales</i>	<i>2,4</i>
<i>Aceites vegetales (VKO)</i>	<i>100</i>	<i>Vitaminas</i>	<i>0,0129</i>
<i>Minerales</i>	<i>24</i>	<i>Dl-metionina</i>	<i>0,3</i>
<i>Vitaminas</i>	<i>0,129</i>	<i>Cloruro de colina</i>	<i>0,11</i>

VKO: mezcla de aceite de oliva (66%), aceite de soja (23%) y triacilglicéridos de cadena media procedentes de aceite de coco (11%). La energía de la dieta era de 1.840 kJ/100 g (440 kcal/100 g).

La dieta suplementada con AGPI n-3 se preparó sustituyendo en la dieta semipurificada un 10% de la materia grasa por aceite de pescado, con un 25% de pureza, suministrado por Danochemo, Dinamarca. El contenido final de la dieta en aceite de pescado fue 1%.

De igual modo, sustituyendo la proporción anterior de materia grasa en la dieta semipurificada por una fuente lipídica rica en ácidos grasos poliinsaturados de las series n-3 y n-6, obtuvimos la dieta AGPI n-3+n-6. Las fuentes de los AGPI de las dos series fueron fosfolípidos purificados obtenidos de vísceras de cerdo.

Ambas dietas se suplementaron con α -tocoferol (0,058 g/Kg dieta) y palmitato de ascorbilo (0,016 g/Kg dieta) para evitar la peroxidación lipídica. La composición relativa en ácidos grasos de las diferentes dietas se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Composición en ácidos grasos de las distintas dietas.

Acidos grasos	Control	AGPI n-3	AGPI n-3+n-6
16:0	12,77	14,17	12,02
16:1n-7	n.d.	0,95	0,47
18:0	3,72	4,25	4,04
18:1n-9	51,36	51,10	50,29
18:2n-6	23,64	24,13	25,70
18:3n-3	2,02	2,08	2,38
20:1n-9	1,15	n.d.	0,30
20:2n-6	n.d.	n.d.	0,23
20:3n-6	0,82	n.d.	0,05
20:4n-6	n.d.	n.d.	0,30
22:1n-9	0,48	n.d.	n.d.
20:5n-3	n.d.	1,69	0,05
22:6n-3	n.d.	0,89	0,33

La composición se expresa en porcentajes relativos sobre el total de ácidos grasos.
n.d.: no detectado.

TOMA DE MUESTRAS

Los animales se sacrificaron en condiciones de ayuno. Los hígados de los animales de los diferentes grupos se extrajeron rápidamente para su inmediata fijación, siendo posteriormente procesados para microscopía óptica y electrónica. Todas las muestras de hígado para los estudios histológicos se tomaron del lóbulo hepático izquierdo.

MICROSCOPIA OPTICA

Fijación

Las muestras de hígado fueron fijadas en paraformaldehído durante 3 días. La solución fijadora se preparó por disolución del paraformaldehído en PBS a una concentración del 4% .

El PBS fue preparado mediante el siguiente protocolo para 1000 ml:

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ _____	1,9 g
- KH_2PO_4 _____	0,43 g
- NaCl _____	7,22 g
- H_2O destilada _____	1000 ml

El pH de la solución estaba comprendido entre 7,2-7,3. El paraformaldehído se disolvió en PBS a 60°C, añadiendo NaOH hasta que la solución se presentaba totalmente transparente.

Inclusión

Las muestras se incluyeron en parafina. Para ello, tras la fijación se procedió al lavado de las mismas en agua destilada consiguiéndose la eliminación de los restos del fijador en el tejido. Después, las muestras se deshidrataron con alcoholes en concentraciones crecientes hasta alcohol absoluto. Finalizada la deshidratación, las piezas se trataron con xilol (2 pasos) eliminando los restos de alcohol para una mejor penetración de la parafina. Por último, las muestras se sometieron a infiltración en parafina mediante 3 pasos sucesivos y se hicieron los bloques de parafina para la obtención posterior de los cortes.

Corte

Los bloques de parafina se pegaron a tacos de madera y se tallaron formando una pirámide. De esta manera, se obtuvieron cortes de 5 μm de grosor utilizando un microtomo de parafina. Para conseguir un óptimo estiramiento de los cortes, éstos se fueron depositando ordenadamente en un baño de agua destilada a 40°C. Se recogían con ayuda de un pincel en un portaobjetos previamente recubierto con una fina capa de albúmina glicerada para la adhesión de los cortes al portaobjetos.

Tinción

Los cortes se desparafinaron en tres pasos sucesivos de xilol antes de proceder a la tinción. Realizamos dos tinciones: la reacción ácido peryódico-reactivo de Schiff (PAS) y la tinción de Ollet.

El reactivo de Schiff permite demostrar la presencia de polisacáridos. El glucógeno hepático es teñido de rojo intenso y las fibras colágenas también son Schiff-positivas. El ácido peryódico oxida y permite que aparezcan grupos aldehídos revelables por el reactivo de Schiff. La hematoxilina es utilizada para contrastar, tiñiendo los núcleos de violeta.

La tinción de Ollet permite diferenciar tejidos normales y patológicos. El colágeno se tiñe de color magenta, los núcleos rosados, la lámina propia de los vasos sanguíneos de rojo, los eritrocitos se tiñen de verde y las células septales de rojo.

El proceso seguido en cada uno de los tipos se detalla a continuación.

PAS

- *Hidratación de cortes desparafinados (serie de alcoholes en concentraciones decrecientes)*
- *Inmersión de los cortes en ácido peryódico durante 2 minutos*
- *Lavado en agua corriente*
- *Tinción con el reactivo de Schiff de 8 a 10 minutos*
- *Lavado con agua destilada 5 minutos*
- *Contrastado con hematoxilina de Harris 3 minutos*
- *Lavado en agua corriente*
- *Deshidratación (alcoholes en concentraciones crecientes)*
- *Aclarado con xilol (mínimo 2 cambios)*
- *Montaje (Eukit)*

Tincion de Ollet

- *Hidratación de cortes desparafinados con alcoholes en concentraciones decrecientes*
- *Inmersión en ácido fosfotúngstico (solución A) de 2 a 3 minutos*
- *Lavado rápido en agua destilada*
- *Tinción con la solución B durante 2 ó 3 minutos*
- *Lavado en agua destilada*
- *Deshidratación (alcoholes en concentraciones crecientes)*
- *Aclarado con xilol (al menos 2 cambios)*
- *Montaje (Eukit)*

Soluciones colorantes

Reacción ácido peryódico-reactivo de Schiff

Solución A:

- *Acido peryódico al 0,5% disuelto en agua destilada.*

Solución B: Reactivo de Schiff

- *Fuchsina básica (Merck) _____ 0,5 g*
- *Acido clorhídrico _____ 10 ml*
- *Metabisulfito potásico _____ 0,5 g*

La fuchsina básica se disuelve en agua destilada hirviendo. Se mezcla enérgicamente y se deja enfriar hasta 50°C. Posteriormente, se filtra la solución añadiendo el ácido clorhídrico. Una vez filtrada, se añade el metabisulfito potásico y se deja en la oscuridad durante 24 horas. Tras este tiempo, se añade carbón activo agitándolo varios minutos y filtrándolo. El filtrado es el reactivo de Schiff. Este se guarda a 4°C, dejándolo a temperatura ambiente antes de usarlo.

Solución C: Hemalumbre de Harris

- *Hematoxilina al 1% disuelta en alcohol absoluto*
- *20 g de alumbre potásico disueltos en 200 ml de agua destilada*

Tras 24 de haber preparado las dos soluciones, se mezclan añadiendo 0,5 g de óxido mercúrico. La solución se calienta para que se mezcle totalmente. Se deja enfriar y se filtra.

Tinción de Ollet

Solución A:

- *Acido fosfotúngstico al 1% en agua destilada*

Solución B:

- *Rojo Neutro al 1% en agua destilada*
- *Fast-green al 1% en agua destilada*

Se mezclan 100 ml de cada una de las dos soluciones. La mezcla se deja reposar al menos 4 horas. Se filtra y se seca el precipitado en el papel de filtro a no más de 40°C. Se disuelven 0,5 g del precipitado seco en alcohol de 50°.

Estudios Morfométricos

Se seleccionaron cortes de parafina teñidos con PAS para obtener dibujos con los que llevar a cabo determinaciones de las áreas ocupadas por fibrosis y aquellos septos fibrosos que se extendían de tal forma que llegaban a invadir zonas del parénquima. De esta manera, conseguíamos una estimación del grado de fibrosis en los distintos grupos TAA-experimentales. Para obtener las zonas de estudio, seleccionamos 25 cortes de cada animal, separados entre sí por 10 μ^{191} . Los dibujos se realizaron con la ayuda de una cámara clara y bajo el objetivo de 2,5x. Sólo se consideró y dibujó la porción de corte incluida dentro del campo del objetivo utilizado y en este área se delimitaron las zonas fibróticas y los septos.

Posteriormente y con la ayuda de un Scanner, se obtuvieron imágenes de los dibujos y se calcularon los siguientes parámetros: área del corte, área de fibrosis y área de fibrosis+septos fibrosos. Mediante el análisis estadístico de estos valores, pudimos comparar el grado de fibrosis en los grupos TAA-experimentales. Los resultados se expresaron como proporciones de dichas áreas.

Por otro lado, también se estimó la abundancia de gotas lipídicas dentro de los hepatocitos y la proporción de hepatocitos mono y binucleados para todos los grupos. Para ello, consideramos 10 cortes de 1 μ de grosor teñidos con azul de toluidina de cada animal y separados entre sí 10 μ . Los recuentos se realizaron con la ayuda de una retícula ocular (6.400 μ^2 de área) y con el objetivo de 63x. En cada corte consideramos 2 ó 3 retículas colocadas al azar. En el caso de hígados cirróticos, las zonas de fibrosis y los septos fibrosos se excluyeron de los cuenteos. Sólo se consideraron los hepatocitos cuyo núcleo era visible en el plano de sección y sólo se contaron los lípidos contenidos en estos hepatocitos.

Respecto a los lípidos, los resultados se expresaron como número total de gotas lipídicas por 100 hepatocitos y como número total de gotas lipídicas por área de retícula.

Para estimar la abundancia de hepatocitos mono y binucleados, se calcularon las proporciones relativas de cada tipo (hepatocitos mononucleares/hepatocitos totales x 100 y hepatocitos binucleados/hepatocitos totales x 100) .

MICROSCOPIA ELECTRONICA

Se tomaron muestras de hígado de un grosor de 1 mm³ para su procesamiento a microscopía electrónica de transmisión.

Fijación

Nada más obtener las muestras de hígado, se fijaron en glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato (pH 7,4; 0,1 M) durante 4 horas a 4°C. Después las muestras se lavaron una noche a 4°C para eliminar los restos del fijador.

La solución fijadora se preparó por dilución del glutaraldehído al 25% en tampón cacodilato.

Tampón cacodilato:

- Cacodilato sódico _____	21,402 g
- Cloruro cálcico _____	0,5 g
- Sacarosa _____	18 g
- Agua destilada _____	1.000 ml

Una vez lavadas, se postfijaron en tetróxido de osmio al 1,5% en tampón cacodilato (pH 7,4; 0,1 M) durante 2 horas a 4°C. Después se lavaron 2 horas en tampón cacodilato a temperatura ambiente, dando cambios de tampón cada 15 minutos la primera hora y cada 30 minutos la segunda hora.

Deshidratación

Fue realizada a temperatura ambiente en concentraciones crecientes de acetona:

- 30 minutos en acetona de 50%*
- 30 minutos en acetona de 70%*
- 30 minutos en acetona de 70%+acetato de uranilo a saturación*
- 30 minutos en acetona de 90%*
- 30 minutos en acetona de 100%*
- 30 minutos en acetona de 100%+sulfato anhidro a saturación*

Inclusión

Las muestras se pasaron a óxido de propileno durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se llevó a cabo la infiltración de la resina EPON 812, empleada como material de inclusión.

Infiltración:

Resina-óxido de propileno

- 1:3 _____ 1 hora a temperatura ambiente*
- 1:1 _____ 1 hora a temperatura ambiente*
- 3:1 _____ 1 hora a temperatura ambiente*

Resina pura:

- toda la noche a 4°C*

Por último, se hicieron los bloques y se dejaron polimerizar en una estufa a 60°C durante 1 día.

Cortes

Con la ayuda de un piramitomo se procedió al tallaje de las muestras incluídas para obtener la pirámide. Empleando un ultramicrotomo Rutchner se realizaron cortes semifinos de 1 μ de grosor, que se tiñeron con azul de toluidina. Los cortes se recogían con un pincel fino, depositándolos en una serie de gotas de agua destilada ordenadas sobre un portaobjetos. Se secaron en una estufa a 37°C y se tiñeron con azul de toluidina durante 1 minuto a la misma temperatura; tras lavar el exceso de colorante con agua destilada, se deshidrataron con alcoholes y se montaron en eukit.

Para microscopía, se obtuvieron cortes ultrafinos de 50nm con el ultramicrotomo. Se depositaron en rejillas (300 de malla) y los teñimos con acetato de uranilo y citrato de plomo¹⁵³. Una vez contrastados, se observaron en un microscopio de transmisión Zeiss 902.

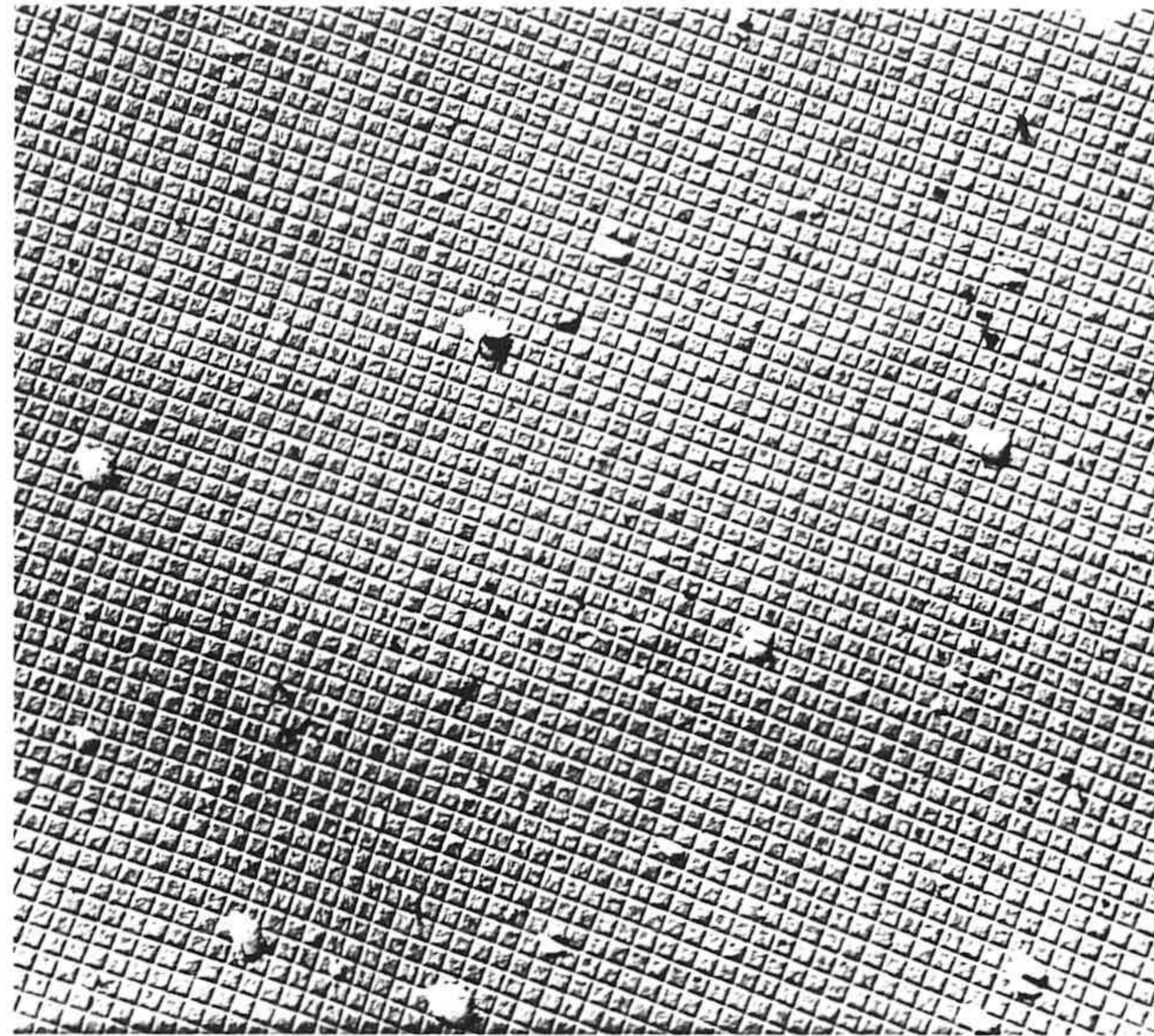
Estudios Morfométricos

Para comparar las alteraciones ultraestructurales de los hepatocitos de los animales en los distintos grupos se llevó a cabo el análisis de los siguientes parámetros morfométricos¹⁹¹:

- Area celular*
- Area nuclear*
- Area nucleolar*
- Relación área nuclear/área celular*

Este análisis se realizó sobre 10 microfotografías electrónicas de cada animal, a 1.100x de aumento. En cada uno de los negativos utilizados aparecían de 4 a 5 hepatocitos completos. Para conseguir un muestreo al azar, los negativos se obtuvieron de 3 rejillas

diferentes de cada uno de los animales y separadas entre sí por 100 μ , evitando de esta forma muestrear más de una vez la misma célula. Por último, de cada rejilla se fotografiaron 3 ó 4 zonas elegidas al azar. Las condiciones de exposición, iluminación y magnificación siempre fueron las mismas. Además, en todas las ocasiones se utilizó la rejilla de calibración.



Fueron considerados hepatocitos completos sólo los que aparecían ellos y sus núcleos enteros en la imagen elegida. Una vez obtenidos los negativos, mediante un scanner grabamos las imágenes de éstos en el ordenador. En el scanner se mantuvieron siempre las mismas condiciones para no incidir en los valores de las medidas a realizar (965K). Las imágenes grabadas se transportaron a un programa de análisis de imagen VISILOG versión 4.1.1., perteneciente a la red informática de la Universidad de Granada.

ANALISIS ESTADISTICO

Todos los datos obtenidos en este estudio se almacenaron mediante el empleo de una hoja de cálculo QUATRO PRO versión 1.0. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa BMDP New System⁵².

Las diferencias debidas a un sólo factor se detectaron mediante un análisis de varianza parámétrico (ANOVA) de una vía: diferencias entre el grupo TAA y el grupo Control, diferencias entre el grupo TAA y los grupos TAA-experimentales tras la recuperación y diferencias entre el grupo Control y los controles tras el periodo de recuperación.

Para evaluar los efectos combinados de dos factores y establecer las diferencias entre los grupos tras la recuperación, realizamos análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. Así por una parte, consideramos como factores la administración del agente hepatotóxico y el tipo de dieta aportada durante la recuperación y comprobamos la existencia o no de interacción entre ambos; y por otra, si la dieta recibida, o el tiempo de recuperación o ambos afectaban significativamente a la recuperación de los animales de grupos previamente tratados con TAA y la posible interacción entre ambos factores. De igual manera comparamos los grupos controles.

Previamente a cada análisis, se llevaron a cabo tests de Levenne para la homogeneidad de las varianzas. Cuando fue necesario y para ajustarnos mejor a los requerimientos de los análisis estadísticos paramétricos, las variables se transformaron. En caso de variables continuas la transformación fue logarítmica, para variables expresadas como proporciones según el arcoseno de la raíz cuadrada y para variables de muestras con distribución de Poisson según la raíz cuadrada^{53,173,198}.

En los casos en los que las varianzas de las variables transformadas seguían siendo heterogéneas, se analizaron con tests no paramétricos de Kruskal-Wallis.

Si aparecían diferencias significativas entre los grupos las comparaciones de medias se efectuaron mediante tests "a posteriori" de Bonferroni.

RESULTADOS

INGESTA DE AGUA Y DIETA

El control de ingesta de agua revela que las ratas del grupo TAA tomaron una cantidad significativamente menor que el grupo control ($12,92 \pm 0,33$ ml/día vs $29,52 \pm 0,82$ ml/día, respectivamente).

La dieta semipurificada (3^{er} mes) fue ligeramente inferior en el grupo TAA que en el grupo control ($18,60 \pm 0,40$ vs $20,21 \pm 0,53$ g/día, respectivamente). Durante la 1^a semana de recuperación, los animales tratados con TAA que recibieron dieta suplementada con AGPI de la serie n-3+n-6, presentaron una ingesta mayor que su respectivo control ($24,45 \pm 0,43$ vs $16,86 \pm 0,07$ g/día, respectivamente). En la 2^a semana, la ingesta fue significativamente mayor en el grupo TC ($21,27 \pm 1,48$) frente a su grupo control CC ($16,77 \pm 0,44$). No se apreciaron diferencias significativas en el resto de los grupos.

PESOS DE LOS ANIMALES Y PESOS HEPATICOS

El grado de hipertrofia hepática producida por la administración oral de TAA durante 4 meses se evaluó analizando los pesos de los animales, pesos de los hígados y la relación peso del hígado/ peso del animal.

Tras la administración de TAA, encontramos signos claros de hipertrofia hepática con un menor peso corporal de los animales y un valor significativamente mayor (casi el doble) de la relación peso hepático/peso corporal en el grupo TAA frente a los animales controles (Tabla 3).

Tras la recuperación, los animales de todos los grupos ganaron peso de una forma importante; sin embargo, hay que destacar que los animales que tomaron dietas suplementadas con AGPI tras la administración de TAA, tanto a la 1^a como a la 2^a semana de recuperación, presentaron pesos hepáticos muy elevados. Por esta razón, las relaciones entre los pesos hepáticos y corporales en estos animales continúan significativamente altas.

Sólo los grupos TAA-experimentales que tomaron la dieta control semipurificada (T1C y T2C), si bien no normalizaron totalmente el valor de dicha relación, presentaron pesos hepáticos cercanos a los de los grupos controles.

Tabla 3: Pesos corporales, pesos hepáticos y relación peso hepático/peso corporal en el grupo tratado con TAA durante 4 meses y grupo control y en los grupos TAA-experimentales y sus respectivos controles, tras 1 y 2 semanas de recuperación.

Grupo	Peso Corporal		Peso Hígado		Peso hepático/peso corporal x 1000	
TAA	212,4±14,9 ^{a1}		8,6±0,4 ^{a2}		42,2±4,5 ^{a1}	
C	304,3±12,0		6,8±0,5		22,1±1,1	
Grupos Experimentales						
	1S	2S	1S	2S	1S	2S
TC	237,9±10,3 ^{c1}	255,4±7,0 ^{b2,c1}	7,8±0,4	8,7±0,7	33,1±2,24	34,1±3,0
Tn-3+6	262,1±6,9 ^{b2,c1}	258,8±11,9 ^{b2,c1}	11,2±0,9 ^{b3,d2}	10,3±0,7	42,7±3,5 ^{c2,d3}	40,0±2,5 ^{c2}
Tn-3	245,1±8,6 ^{b3,c1}	264,9±4,9 ^{b1,c1}	10,5±1,1 ^{c3,d2}	10,7±1,2 ^{b3}	44,2±5,9 ^{c2,d3}	40,5±4,7 ^{c2}
CC	335,0±12,8 ^{c1}	357,3±18,5	8,0±0,3	9,5±0,8	23,9±0,8	26,2±1,2
Cn-3+6	364,5±13,7	341,3±10,6	9,9±0,6	8,9±0,3	27,0±1,3	26,3±0,9
CP3	311,3±9,0	357,4±16,7	7,9±0,2	9,0±0,6	25,5±1,0	25,2±1,6

Los resultados se expresan como media aritmética±SEM. TAA: grupo tratado con tioacetamida durante 4 meses; C: grupo control; TC: grupo TAA-experimentales que recibieron dieta control semipurificada durante el tiempo de recuperación; TP36 y TP3: grupos TAA-experimentales que recibieron dietas suplementadas con AGPI de las series n-3 y n-6 y AGPI de la serie n-3, respectivamente; CC: grupo control que tomó dieta control semipurificada durante la recuperación; CP36 y CP3: grupos que recibieron durante la recuperación dietas suplementadas con AGPI de las series n-3 y n-6 y de la serie n-3, respectivamente. 1S: 1ª semana de recuperación; 2S: 2ª semana. ^a:significación vs grupo control; ^b:significación vs grupo TAA; ^c:significación entre grupos TAA-experimentales y sus controles; ^d:significación vs grupo TC. 1:P<0,001; 2:P<0,01; 3:P<0,05.

Las diferencias entre el peso hepático de los grupos TAA-experimentales que recibieron dieta con AGPI y dieta control semipurificada se reflejan en la tabla 4. En ella se observa que las diferencias encontradas se deben al factor dieta, sin que exista interacción con el periodo de recuperación.

Por tanto, la hepatomegalia continua presente en los animales con suplementación de AGPI tras la administración del agente hepatotóxico, sobre todo en la 1ª semana de recuperación, con independencia de la fuente de AGPI recibida.

Tabla 4: Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías del peso hepático, teniendo en cuenta la dieta recibida (A) y el tiempo de recuperación (B) en los grupos TAA-experimentales tras el periodo de recuperación.

	<i>gl</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F-test</i>	<i>P</i>
<i>Dieta (A)</i>	2	0,113	0,056	4,81	<0,05
<i>Tiempo (B)</i>	1	0,000	0,000	0,00	<i>ns</i>
<i>AxB (Interacción)</i>	2	0,011	0,006	0,47	<i>ns</i>

Se muestran los grados de libertad (*gl*), la suma de cuadrados (*SS*), la media de cuadrados (*MS*) y el valor de *F* y el de *P* para cada uno de los factores y de la interacción entre ellos.

MICROSCOPIA OPTICA Y ELECTRONICA

A nivel macroscópico, tras cuatro meses de tratamiento con TAA, el hígado apareció hipertrófico, de superficie nodular, textura resistente y color amarillento, características típicas de la cirrosis nodular.

La observación a microscopía óptica mostró como la estructura normal del lobulillo hepático desaparecía, siendo reemplazada por nódulos parenquimáticos regenerativos, irregulares y delimitados por septos de tejido fibroso (Fig 1 y 2). La formación de estos septos se acompaña de cambios en el patrón vascular. Los septos se agrupaban en áreas periportales y posteriormente se extendían a zonas centrales. De esta forma, iban invadiendo y reduciendo progresivamente el parénquima hepático. Este efecto se manifiesta morfológicamente en extensas áreas de fibrosis y septos que ocupan el parénquima y rodean nódulos de hepatocitos.

En el interior de los nódulos regenerativos, pudimos observar hepatocitos dañados, hipertróficos, con grandes núcleos y nucleolos, localizados preferentemente cerca de los septos fibrosos (Fig 1). Junto a éstos, vimos hepatocitos cuya apariencia era normal.

En el tejido fibroso que rodea a los nódulos proliferan conductos biliares de aspecto dilatado y delimitados por células de gran tamaño con grandes núcleos (Fig 2). Se puede apreciar un aumento de células infiltradas, macrófagos, fibroblastos y células estrelladas. Las células estrelladas se caracterizan por su contenido lipídico y son muy numerosas sobre todo en los septos que separan los nódulos parenquimáticos (Fig 1).

A microscopía electrónica vimos de nuevo la pérdida de organización lobulillar de hígados normales, con un incremento de componentes de tejido conectivo, fibroblastos, células estrelladas y macrófagos y reducción de zonas de parénquima (Fig 7 y 8). Los canalículos biliares eran numerosos, aparecían dilatados y perdían microvellosidades. También se observaron vesículas que contienen gotas de grasa y restos celulares en zonas de necrosis que aparecían en el parénquima por el efecto hepatotóxico de la tioacetamida (Fig 8).

Se pueden ver células estrelladas transformadas o miofibroblastos, las cuales adquieren algunas características de fibroblastos y pierden gran parte de su contenido lipídico. Estas se encuentran asociadas a componentes de la matriz extracelular depositados en los septos, localizándose frecuentemente junto a acúmulos de fibras de colágeno (Fig 10).

A nivel ultraestructural, los espacios intercelulares entre los hepatocitos también se encontraban dilatados. Los hepatocitos mostraron núcleos lobulados, de gran tamaño y que ocupaban gran parte del área celular, características típicas de la hipertrofia (Fig 8B). Los nucleolos eran prominentes y vacuolizados. El citoplasma contenía abundantes gotas lipídicas, retículo endoplasmático rugoso desorganizado con sus cisternas dispersas de longitud variable y numerosos lisosomas. Las mitocondrias se mostraban densas, en ocasiones de aspecto alargado y dispuestas alrededor del núcleo (Fig 9).

Tras el periodo de recuperación, macroscópicamente los hígados de animales tratados con TAA y alimentados con las dietas enriquecidas con ácidos grasos poliinsaturados, mostraron el aspecto típico de los hígados del grupo TAA, con superficie nodular. Sin embargo, los que tomaron la dieta control semipurificada durante 2 semanas (grupo T2C) presentaron una menor superficie nodular.

Los grupos Tn-3 y Tn-3+n-6 a microscopía óptica, conservaban los nódulos y los septos fibrosos. Encontramos pocos signos de recuperación tanto a la 1ª (Fig 3) como a la 2ª semana (Fig 4). Los septos seguían invadiendo zonas del parénquima y, por tanto, pudimos apreciar de nuevo las áreas fibrosas y los nódulos que aparecían tras la administración del hepatotóxico. También vimos la infiltración linfocitaria, células estrelladas y fibroblastos y proliferación de conductos biliares.

En el interior de los nódulos se diferenciaban hepatocitos hipertróficos junto a otros sin daño aparente. En los hepatocitos dañados los núcleos tenían gran tamaño, los nucleolos eran prominentes y la acumulación lipídica muy evidente (Fig 3 y 4).

Sin embargo, en los animales que recibieron la dieta control semipurificada (TC), la recuperación histológica se empezó a apreciar a la 2ª semana (Fig 5). Hay que destacar que en este grupo el grado de recuperación mostró una gran variabilidad individual, encontrando algunos muy recuperados junto a otros con poca recuperación. Aún así, en todos los casos encontramos una reducción de las zonas de fibrosis, pero los septos fibrosos siempre aparecían y ninguno de los animales del grupo T2C presentó una recuperación total de la arquitectura lobular.

Por otro lado, en los hígados de animales de los grupos controles que recibieron dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados (Cn-3 y Cn-3+n-6), los hepatocitos contenían numerosas gotas lipídicas, a veces de gran tamaño. Podemos apreciar como esta acumulación no fue homogénea en todo el lóbulo hepático, encontrando zonas del parénquima con hepatocitos muy cargados de gotas lipídicas y otras zonas sin tanta acumulación (Fig 6).

Tampoco a nivel ultraestructural se apreció un grado importante de recuperación en los grupos TAA-experimentales con dietas suplementadas con AGPI (Tn-3 y Tn-3+n-6). Las alteraciones características del grupo TAA siguieron apareciendo en estos animales (Fig 11), sobre todo una vez finalizada la 1ª semana de recuperación. A la 2ª semana, las áreas fibrosas en el grupo TAGPI n-3 estaban disminuídas, con menos zonas de necrosis y células infiltradas y mayor presencia de hepatocitos en el parénquima.

Tanto a la 1ª como a la 2ª semana, en estos grupos en las zonas fibrosas se observó la proliferación de conductos biliares dilatados y con pocas microvellosidades. También destaca el incremento de fibroblastos, células estrelladas y miofibroblastos. La matriz extracelular continuó incrementada (Fig 11). Pudimos observar cuerpos vesiculares con lípidos y restos de necrosis (Fig 12A) y acumulaciones de fibras colágenas cercanas a los miofibroblastos (Fig 12B).

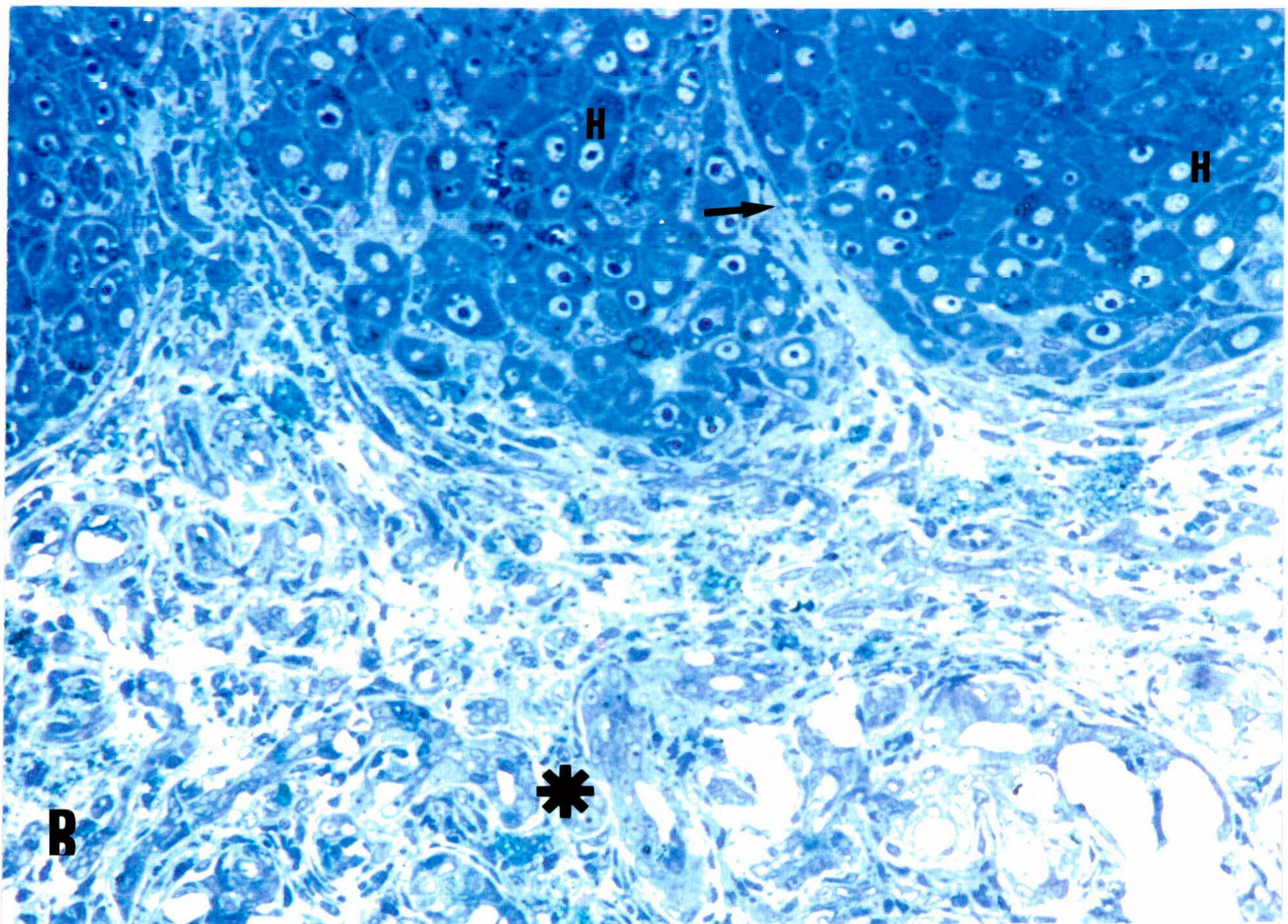
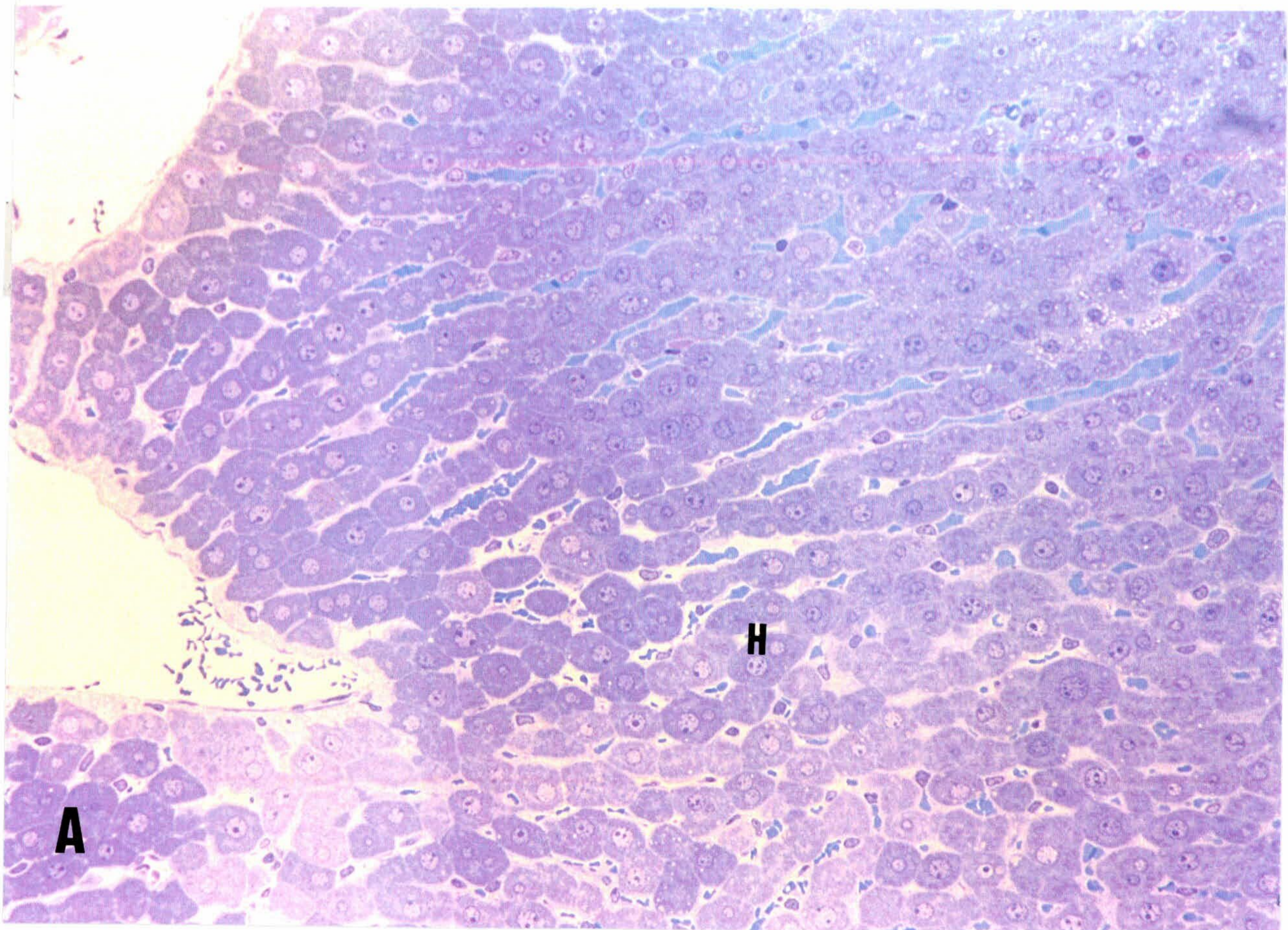
Los hepatocitos se mostraron hipertróficos con sus núcleos grandes, lobulados y nucleolos vacuolizados. Su citoplasma contiene retículo endoplasmático rugoso más organizado que en el grupo TAA ya que las cisternas no estaban tan dispersas por el citoplasma (Fig 13).

Una de las observaciones más llamativas en estos grupos fue la acumulación lipídica, con gotas de tamaño variable. Así, vimos hepatocitos que contienen gran cantidad de gotas de pequeño tamaño y otros con una o escasas gotas muy grandes que podían llegar a ocupar casi todo el citoplasma desplazando al núcleo hacia la periferia de la célula (Fig 14).

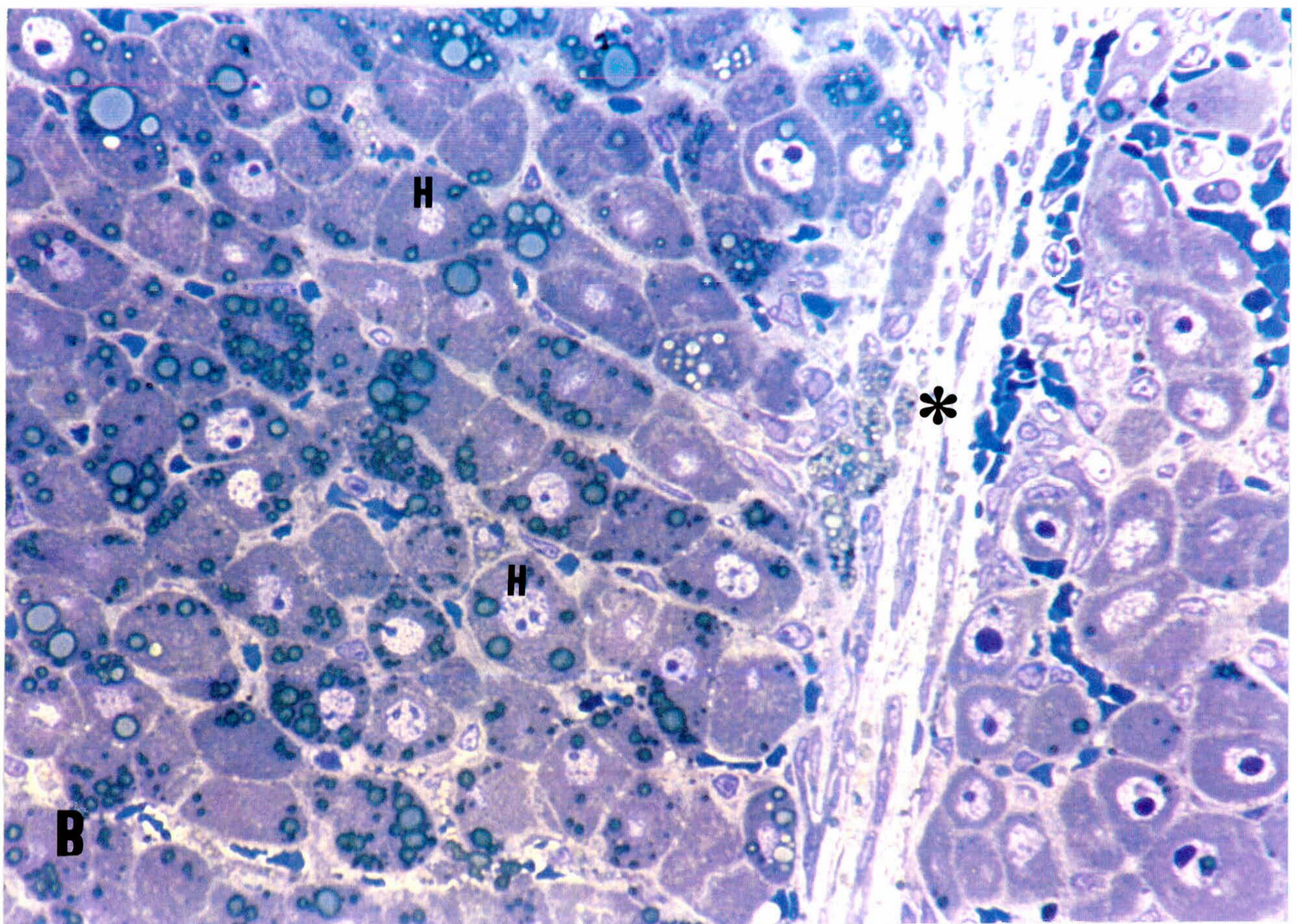
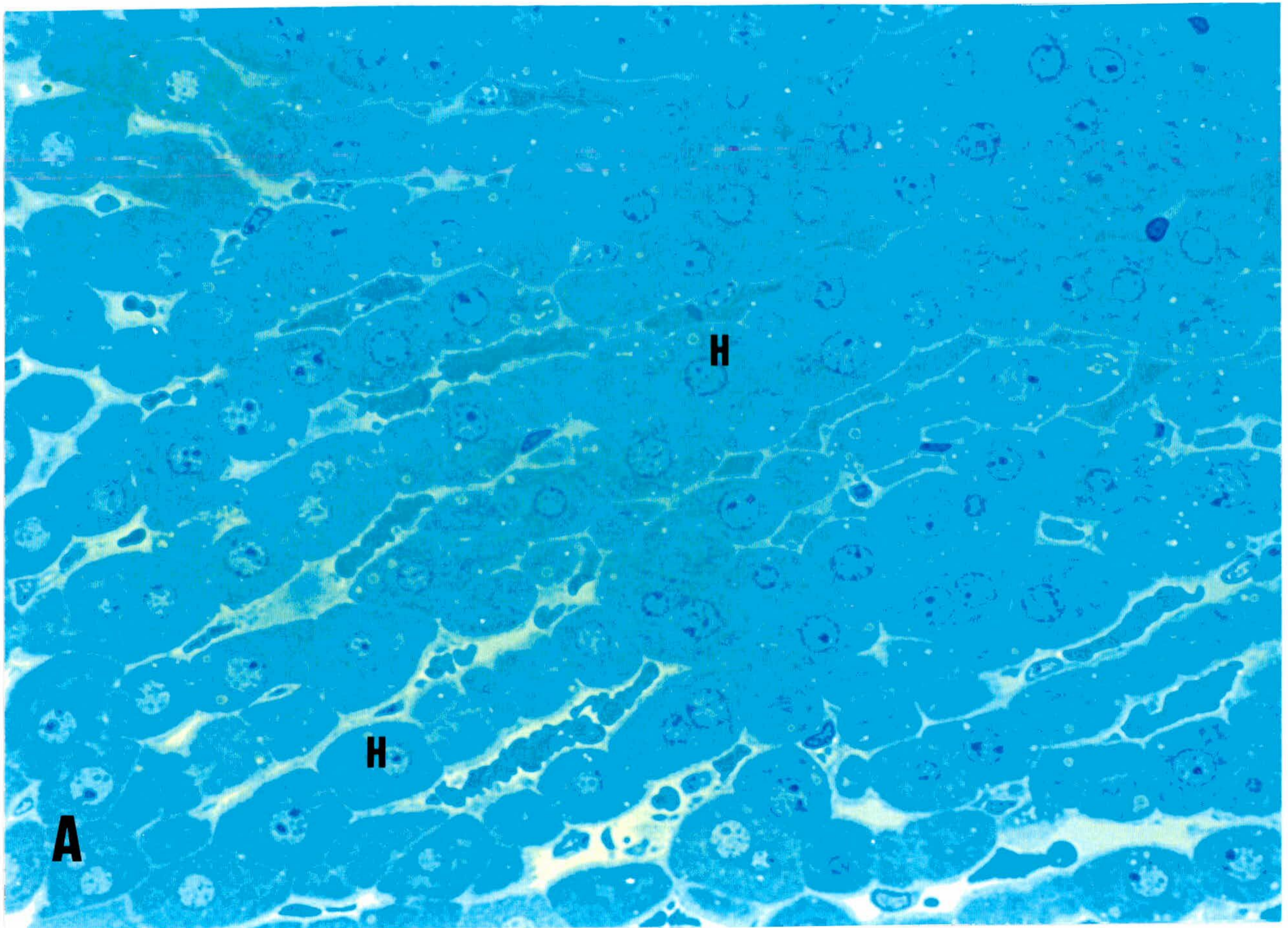
El acúmulo graso también fue destacable en los grupo controles que recibieron las dietas enriquecidas con estos ácidos grasos poliinsaturados (Fig15). En los controles con dieta rica en AGPI de la serie n-3 (C2n-3) durante 2 semanas, diferenciamos hepatocitos con numerosas y grandes gotas lipídicas en su citoplasma, (Fig 16A y 16B), otros presentaban acumulación grasa no diferenciada en gotas lipídicas y por último, hepatocitos cuyo citoplasma contenía retículo endoplasmático desarrollado con numerosas cisternas muy empaquetadas y mitocondrias abundantes, normalmente estos últimos suelen ser los que presentan menor acumulación de lípidos (Fig 16C y 16D).

Al igual que a microscopía óptica, ultraestructuralmente en el grupo TC sí se observó cierto grado de recuperación tras 2 semanas de retirada del tóxico (Fig 17). Por otro lado, no observamos la acumulación grasa anteriormente descrito en los grupos TAGPI. Los grupos C1C y C2C no presentaron ninguna diferencia con el grupo control.

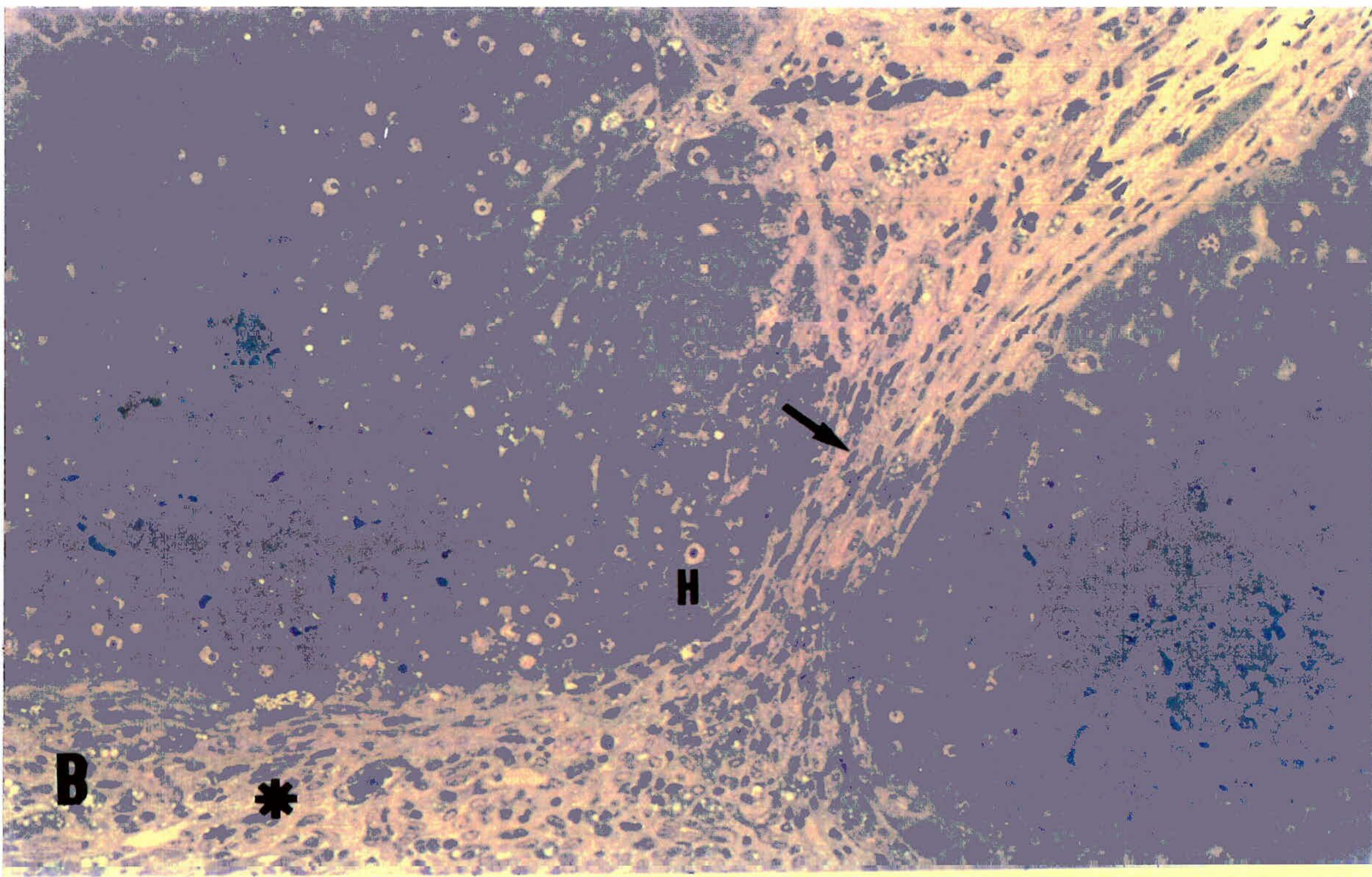
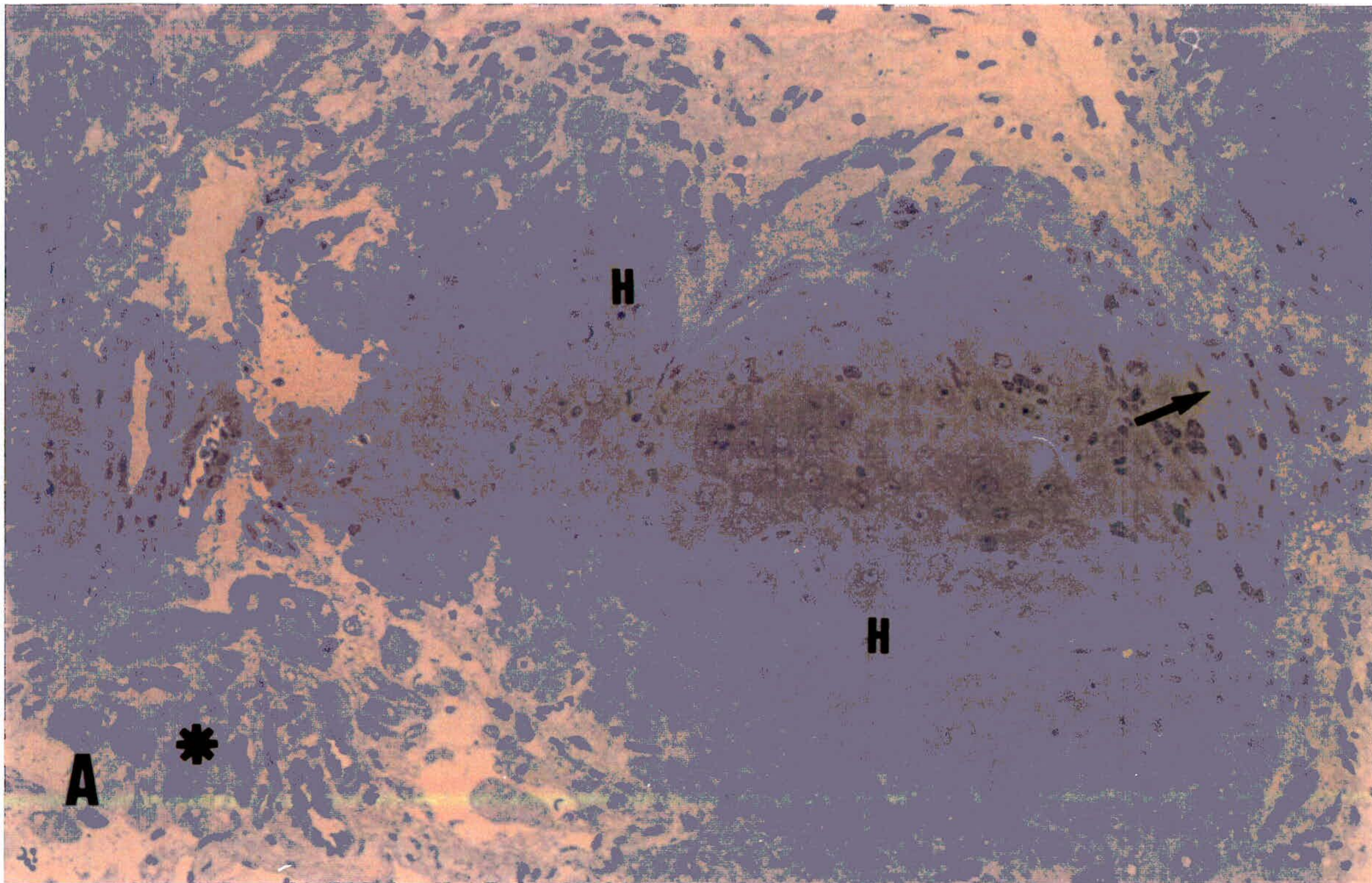
Con el propósito de comparar y diferenciar la intensidad de estas lesiones morfológicas del hígado y cuantificar las diferencias entre los distintos grupos, estimamos distintos parámetros histológicos mediante estudios semicuantitativos a microscopía óptica y morfométricos a nivel morfológico y ultraestructural.



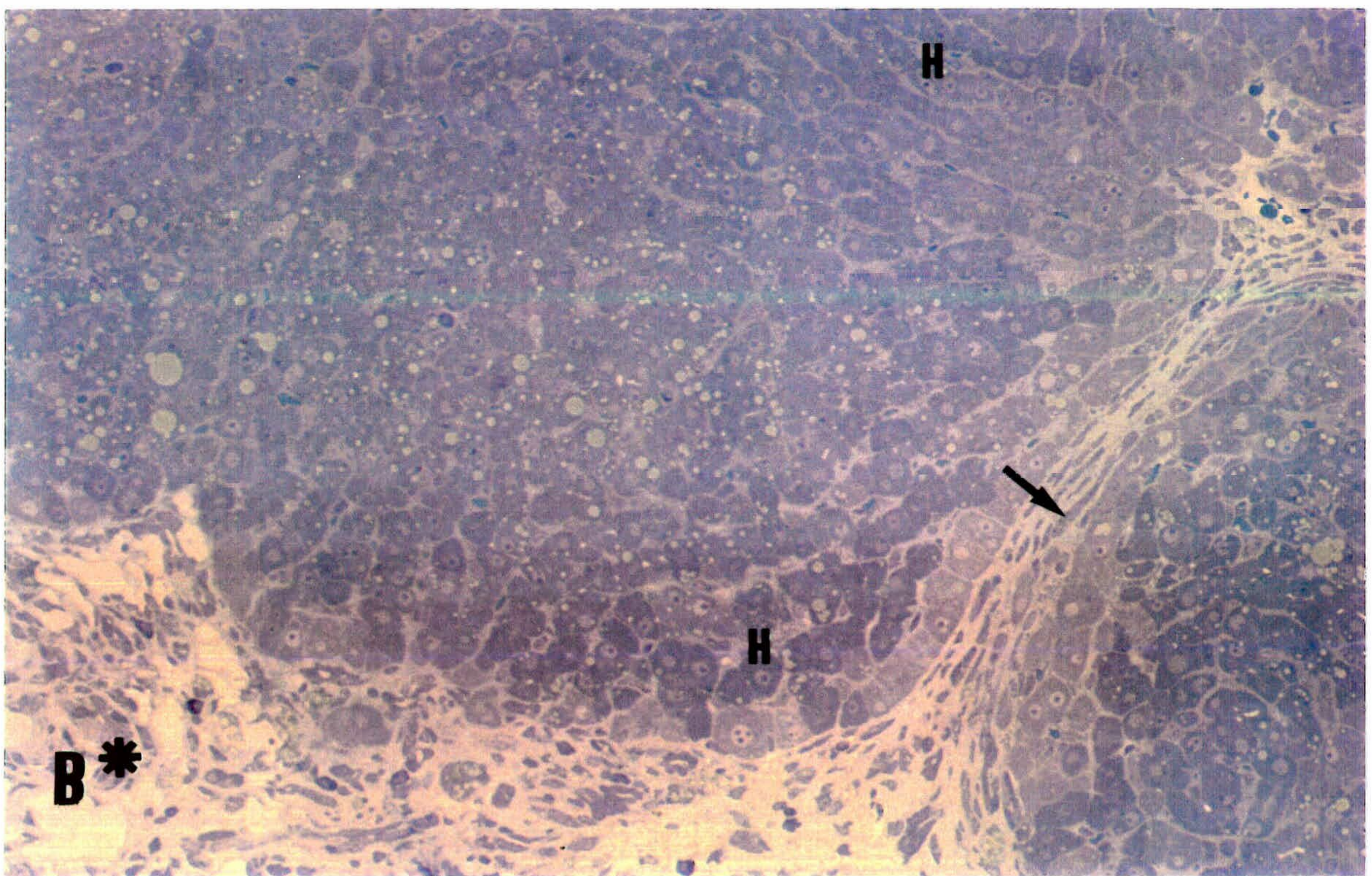
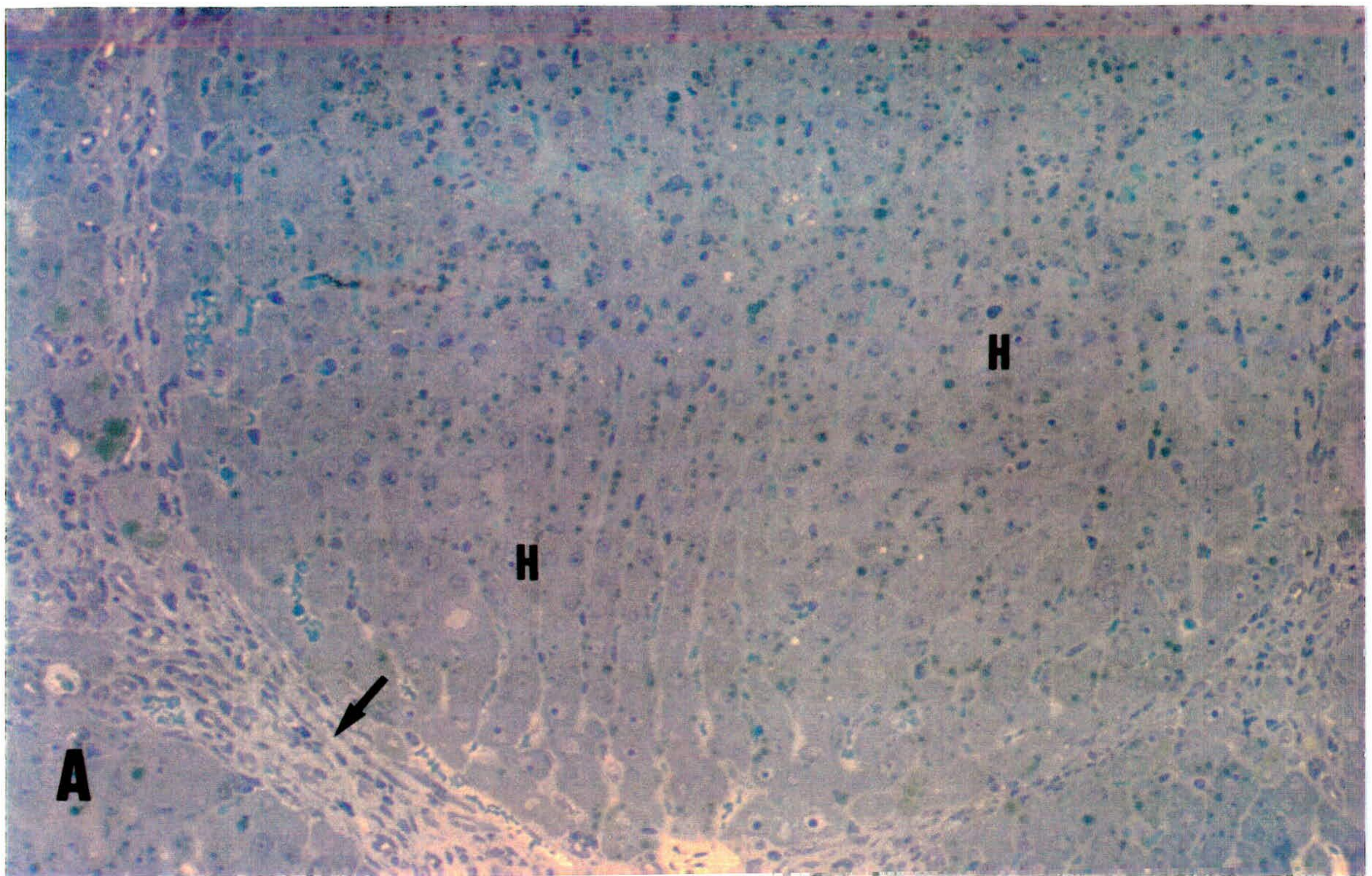
*Fig 1: Imagen a microscopía óptica de hígado de rata: A) grupo control; B) grupo al que se le administró TAA durante 4 meses. H: hepatocito; * = zona de fibrosis; ↑ = septo fibroso. (Azul de toluidina, cortes de 1 μ) (x20).*



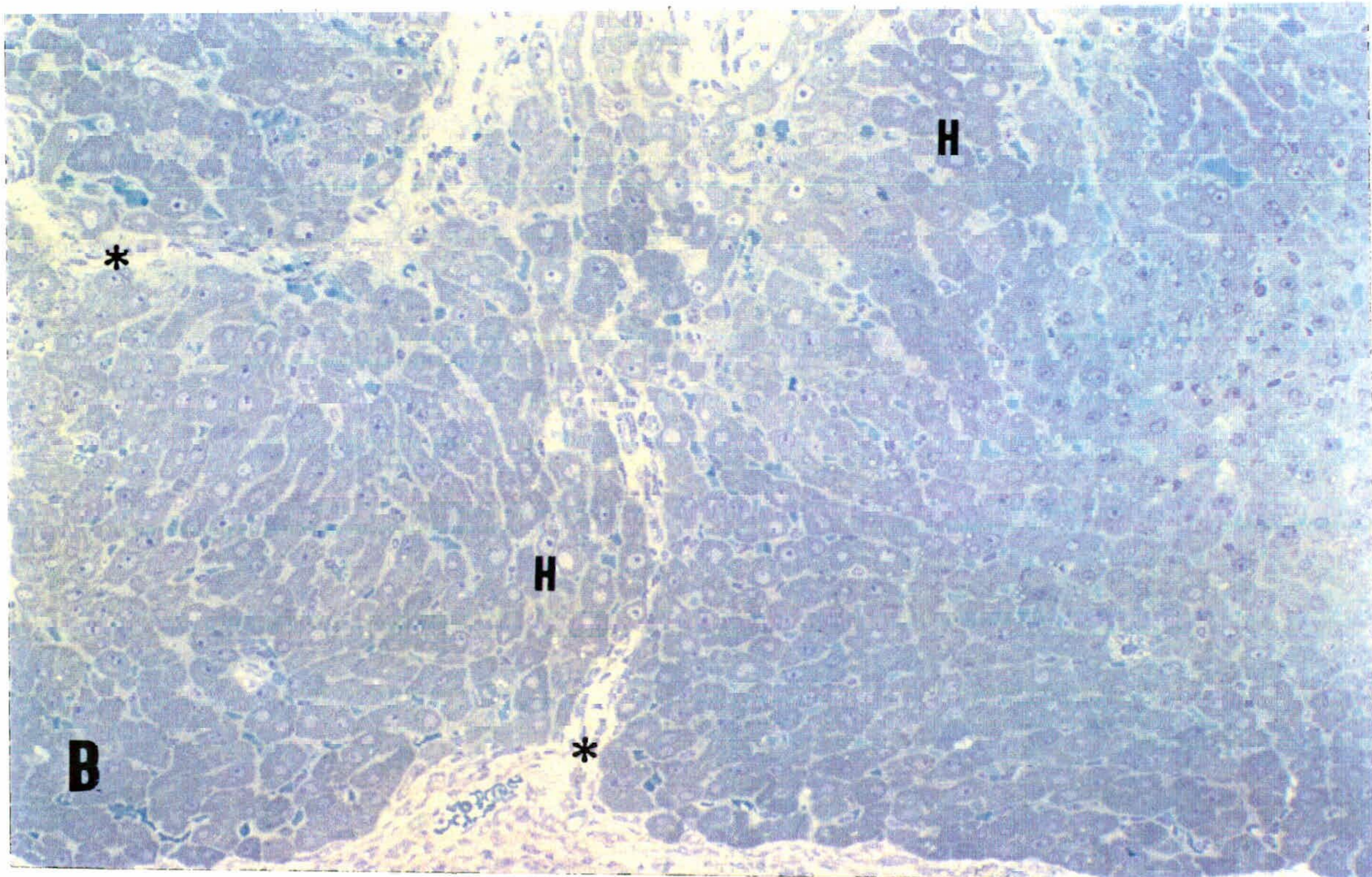
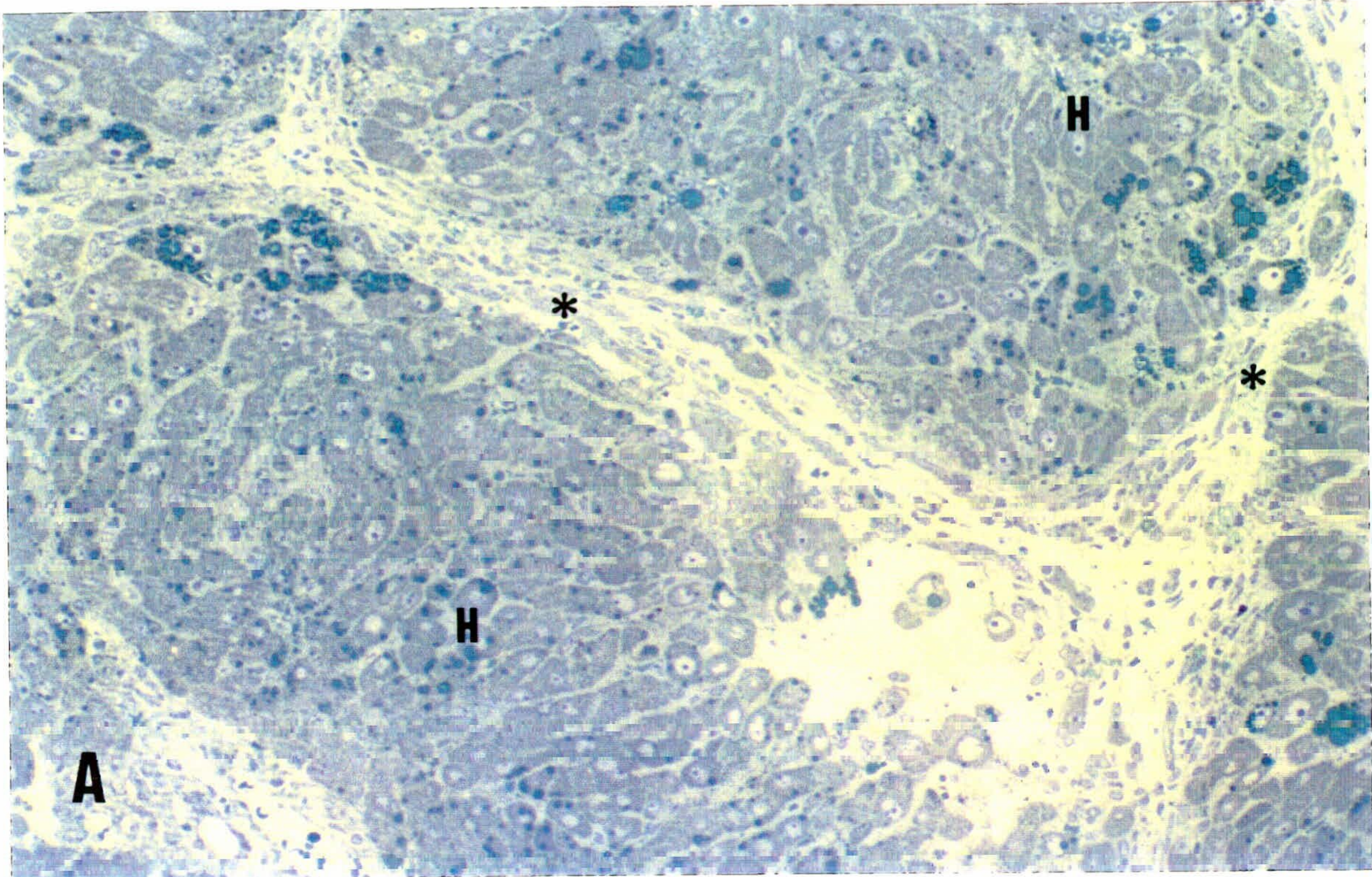
*Fig 2: Imagen a microscopía óptica de hígado de rata: A) grupo control; B) grupo al que se le administró TAA durante 4 meses. H= hepatocito; * = septo fibroso. (Azul de toluidina, cortes de 1 μ) (x40).*



*Fig 3: Imagen a microscopía óptica de hígado de rata del grupo TAA-experimental que recibió dieta con AGPI de la serie n-3 (A) y de las series n-3 y n-6 (B), durante 1 semana. H= hepatocito; * = zona de fibrosis; ↑ = septo fibroso. (Azul de toluidina, cortes de 1 μ) (x20).*



*Fig 4: Imagen a microscopía óptica de hígado de rata : grupo TAA-experimental que recibió dieta con AGPI de la serie n-3 (A) y de las series n-3 y n-6 (B), durante 2 semanas. H= hepatocito; * = zona de fibrosis; ↑ = septo fibroso. (Azul de toluidina, cortes de 1 μ) (x20).*



*Fig 5: Imagen a microscopía óptica de hígado de rata del grupo TAA-experimental que recibió dieta control semipurificada durante 1 semana (A) y 2 semanas (B). H= hepatocito; * = septo fibroso. (Azul de toluidina, cortes de 1 μ) (x20).*

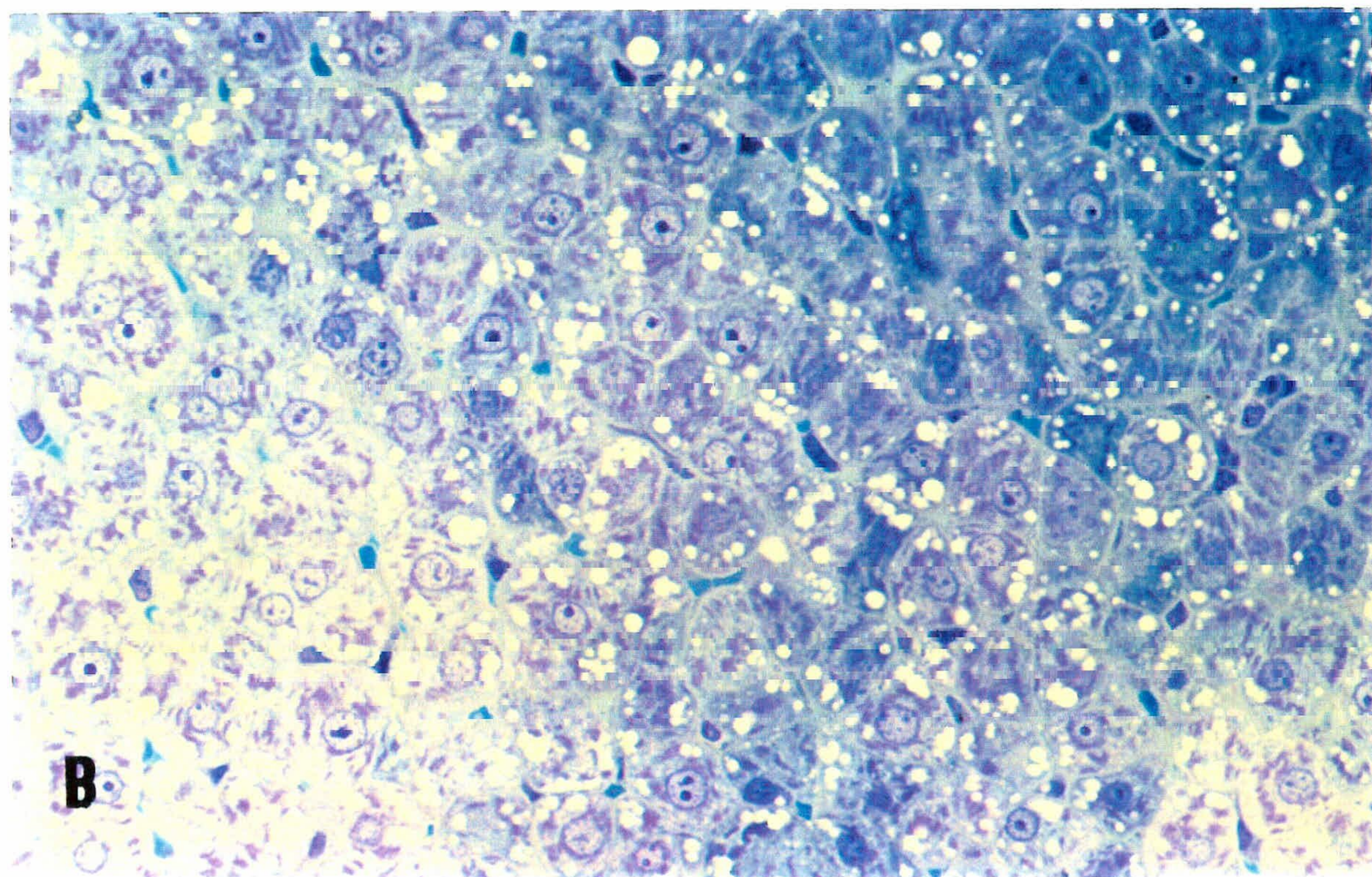
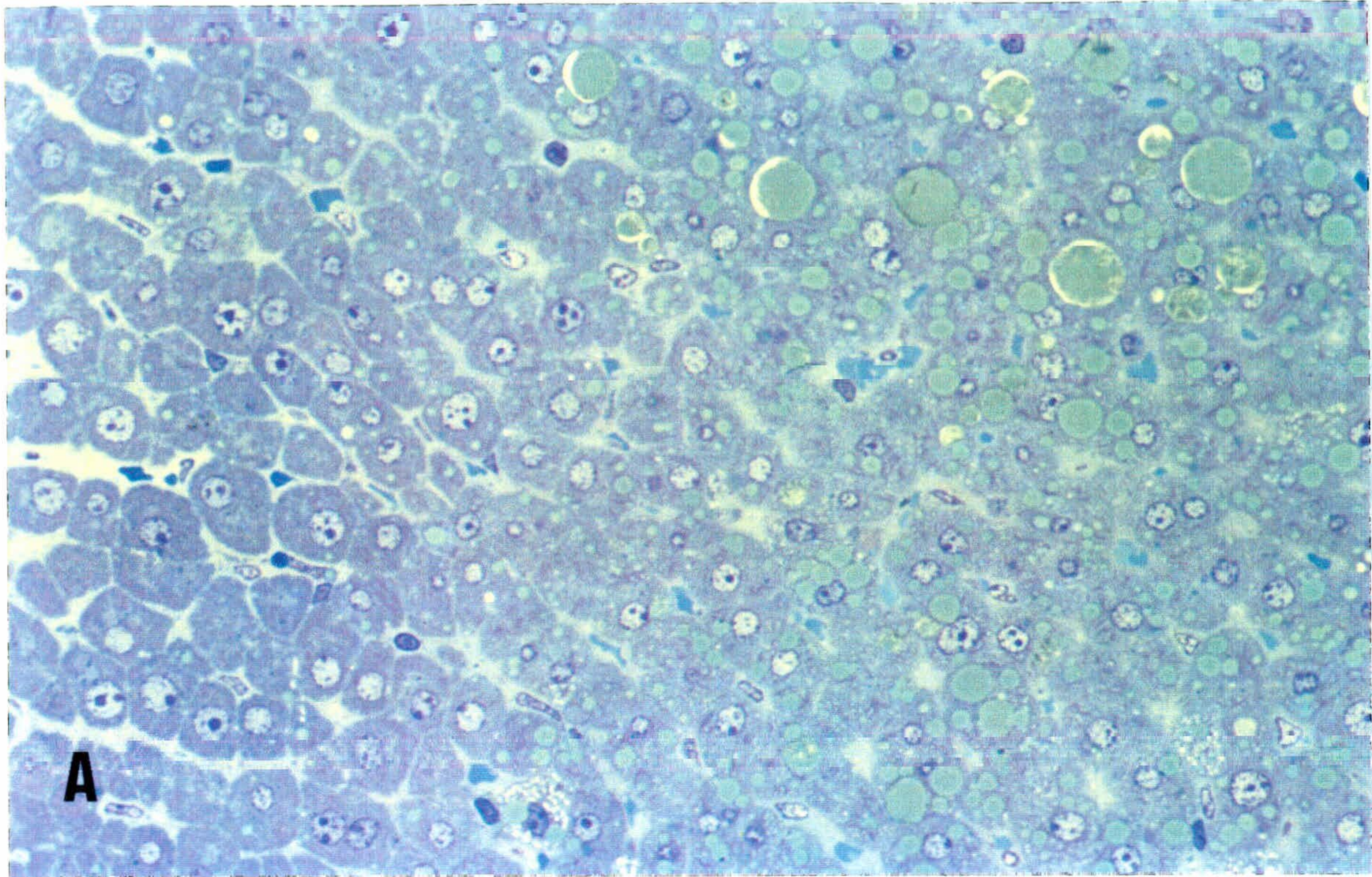
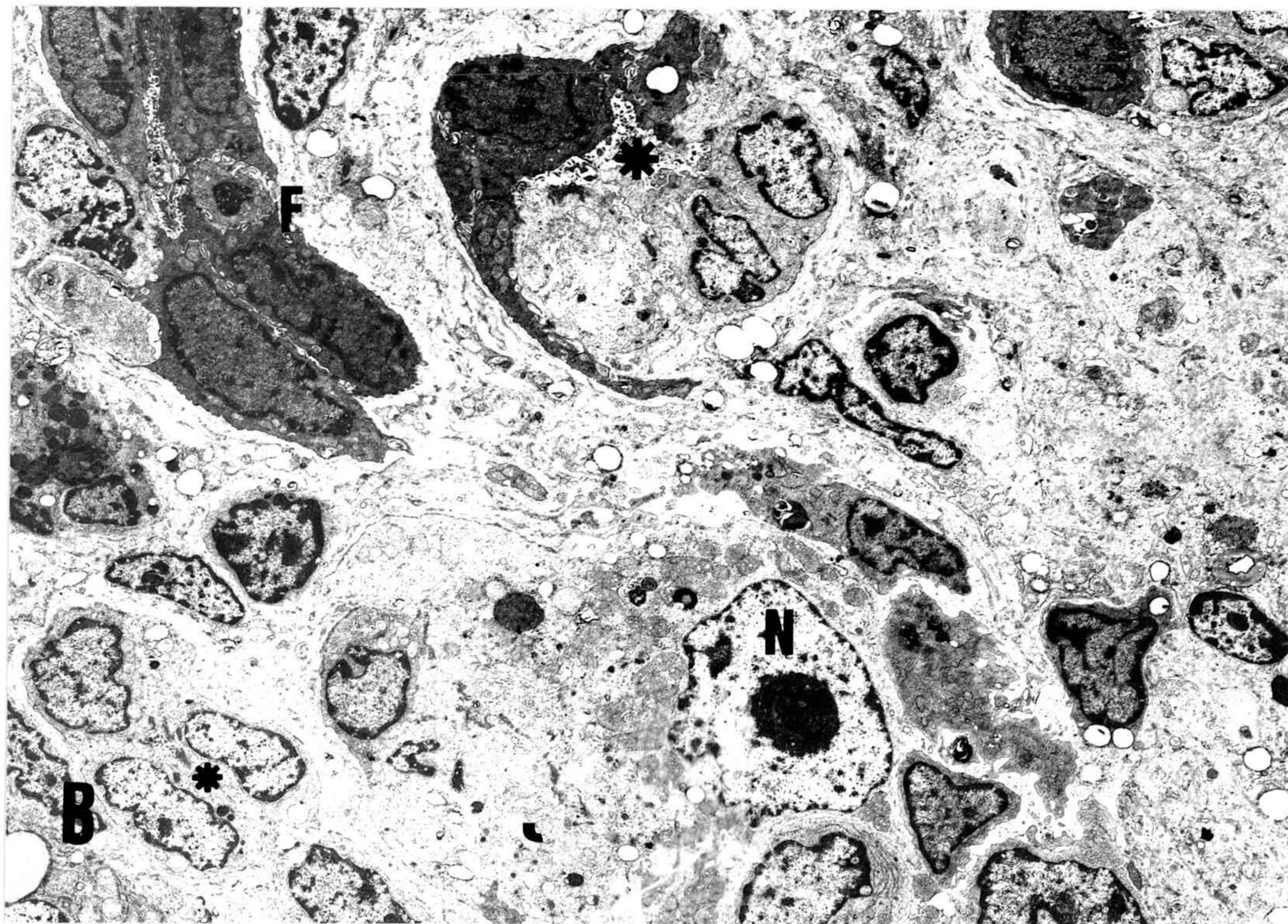
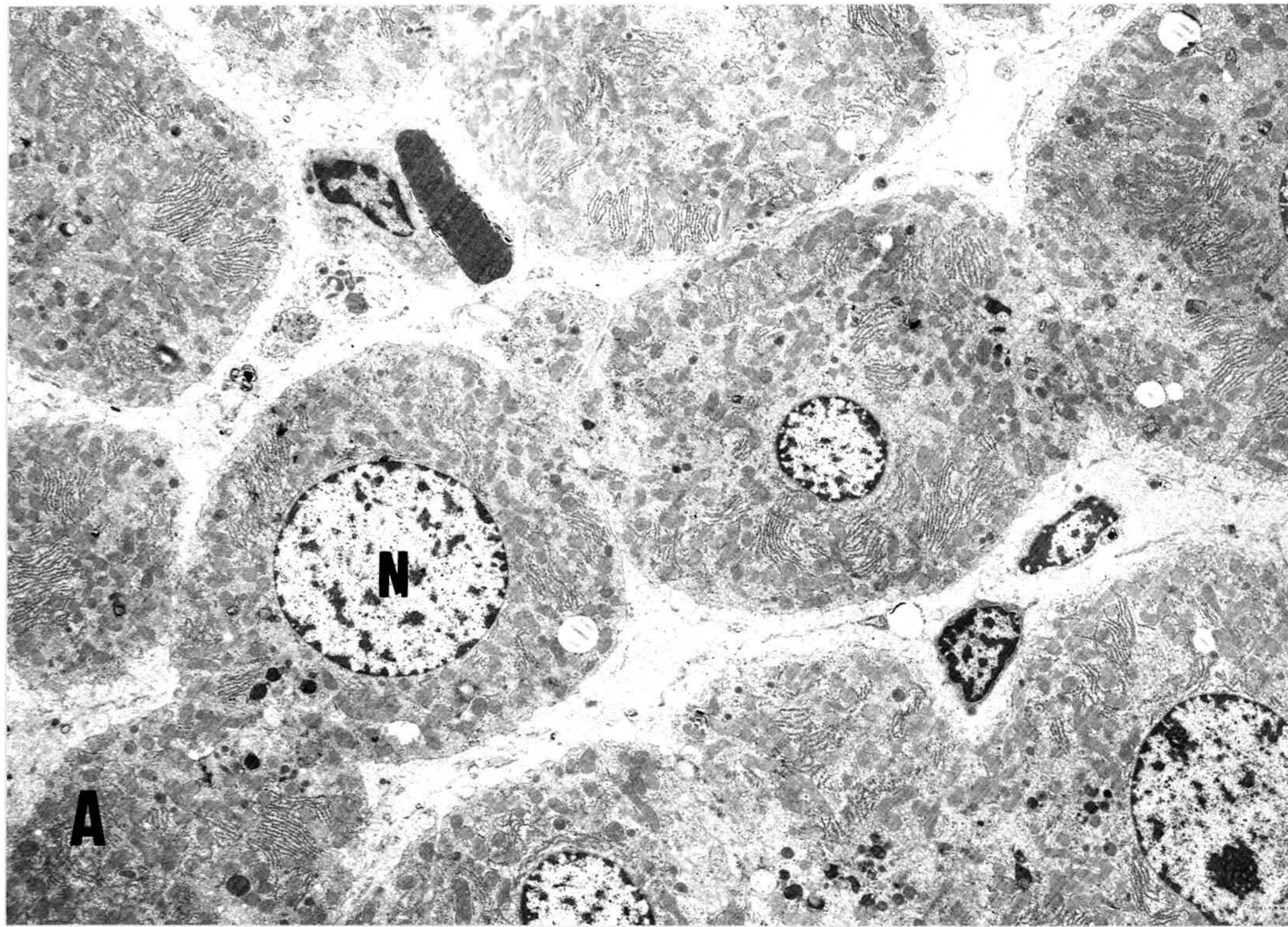
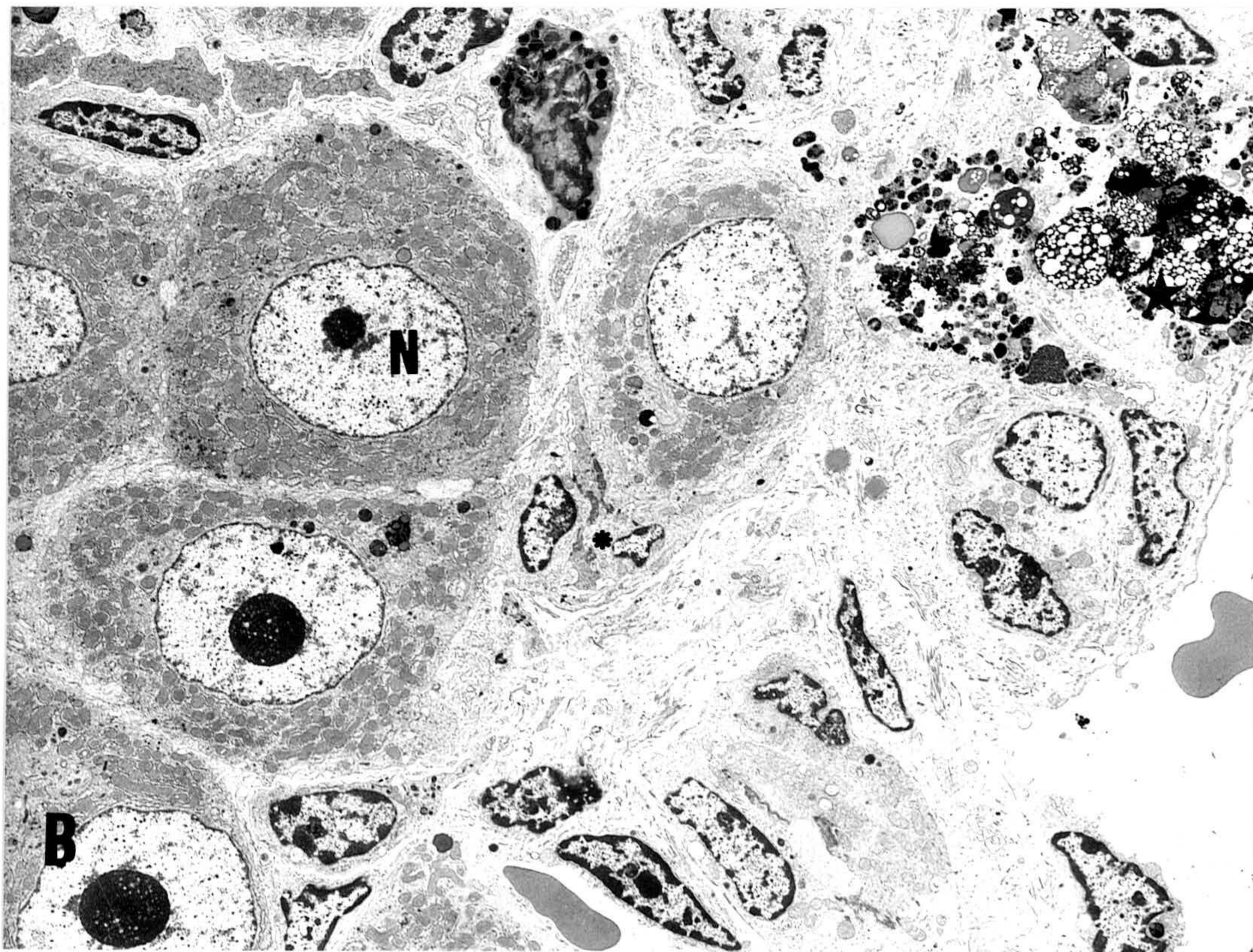
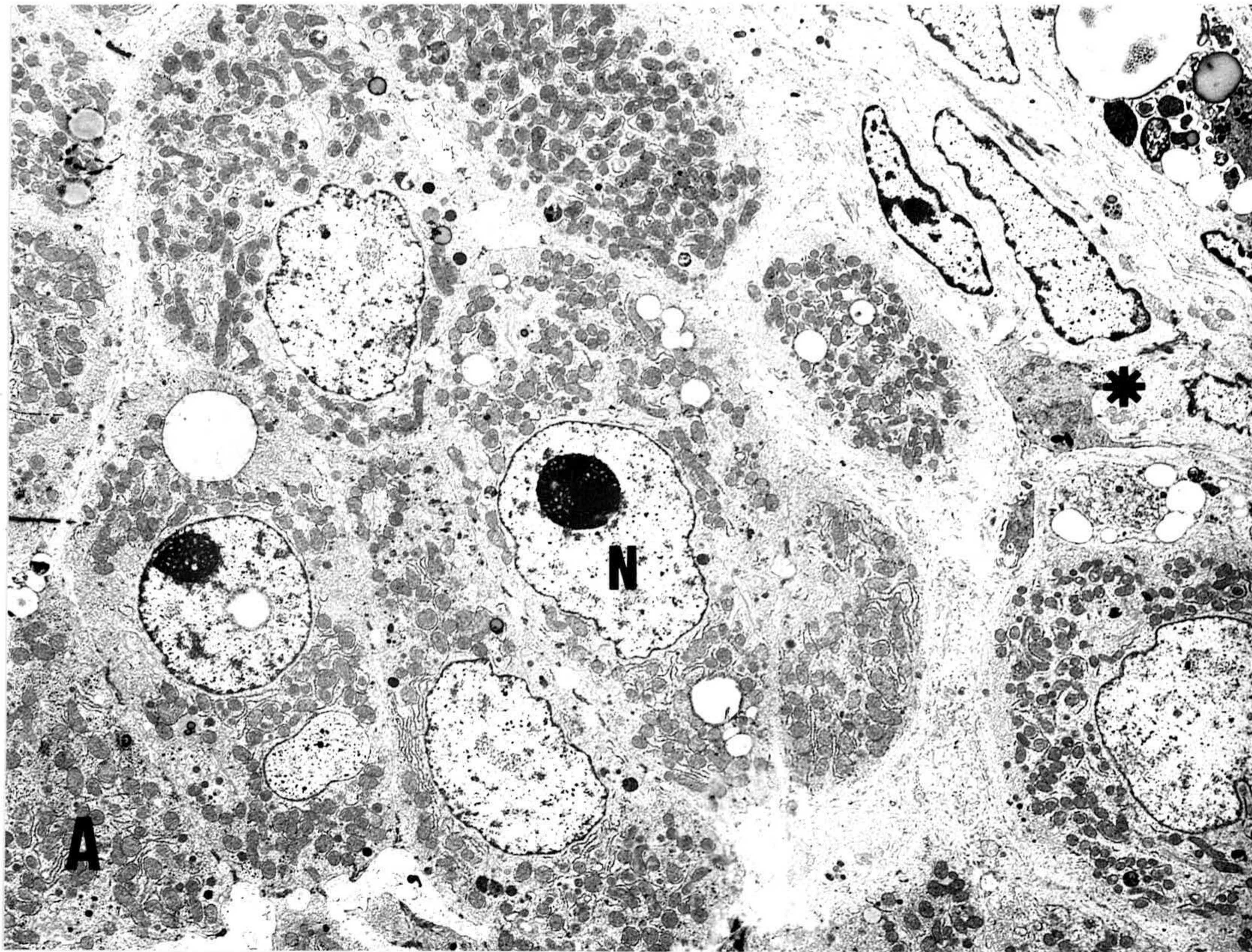


Fig 6: Imagen a microscopía óptica de hígado de rata del grupo control que recibió dieta con AGPI de la serie n-3 (A) y de las series n-3 y n-6 (B). Se observa la acumulación lipídica. (Azul de toluidina, cortes de 1 μ) (x40).



*Fig 7: Imagen a microscopía electrónica de hígado de rata del grupo control (A) y del que recibió TAA durante 4 meses (B). N = núcleo hepatocito; F = fibroblasto; * = conducto biliar. (x 2.200).*



*Fig 8: Imágenes a microscopía electrónica de hígados de ratas que recibieron TAA durante 4 meses. N = núcleo hepatocito; * = conducto biliar; ★ = vesículas almacenadoras de grasa y restos celulares. (x 2.200).*



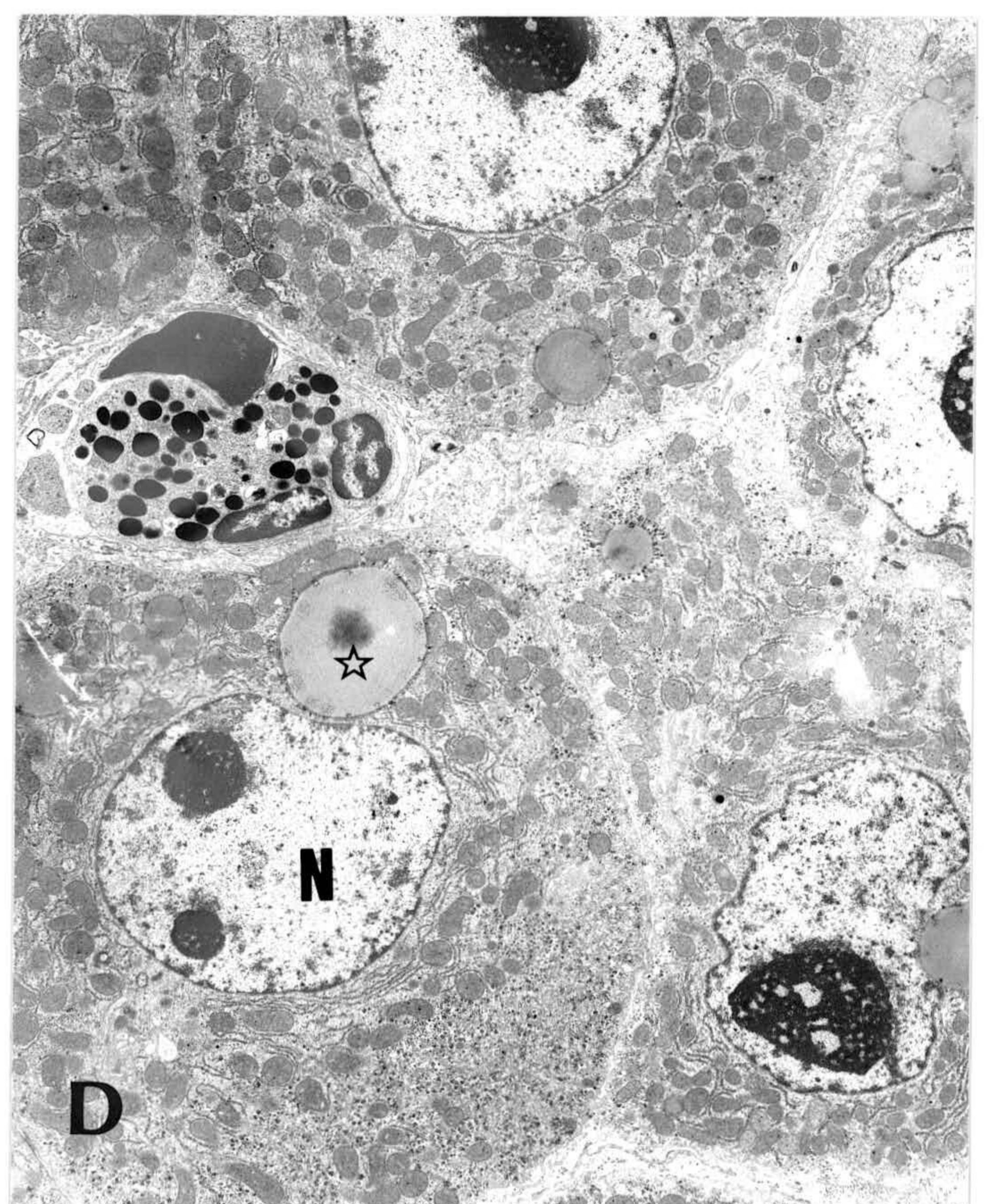
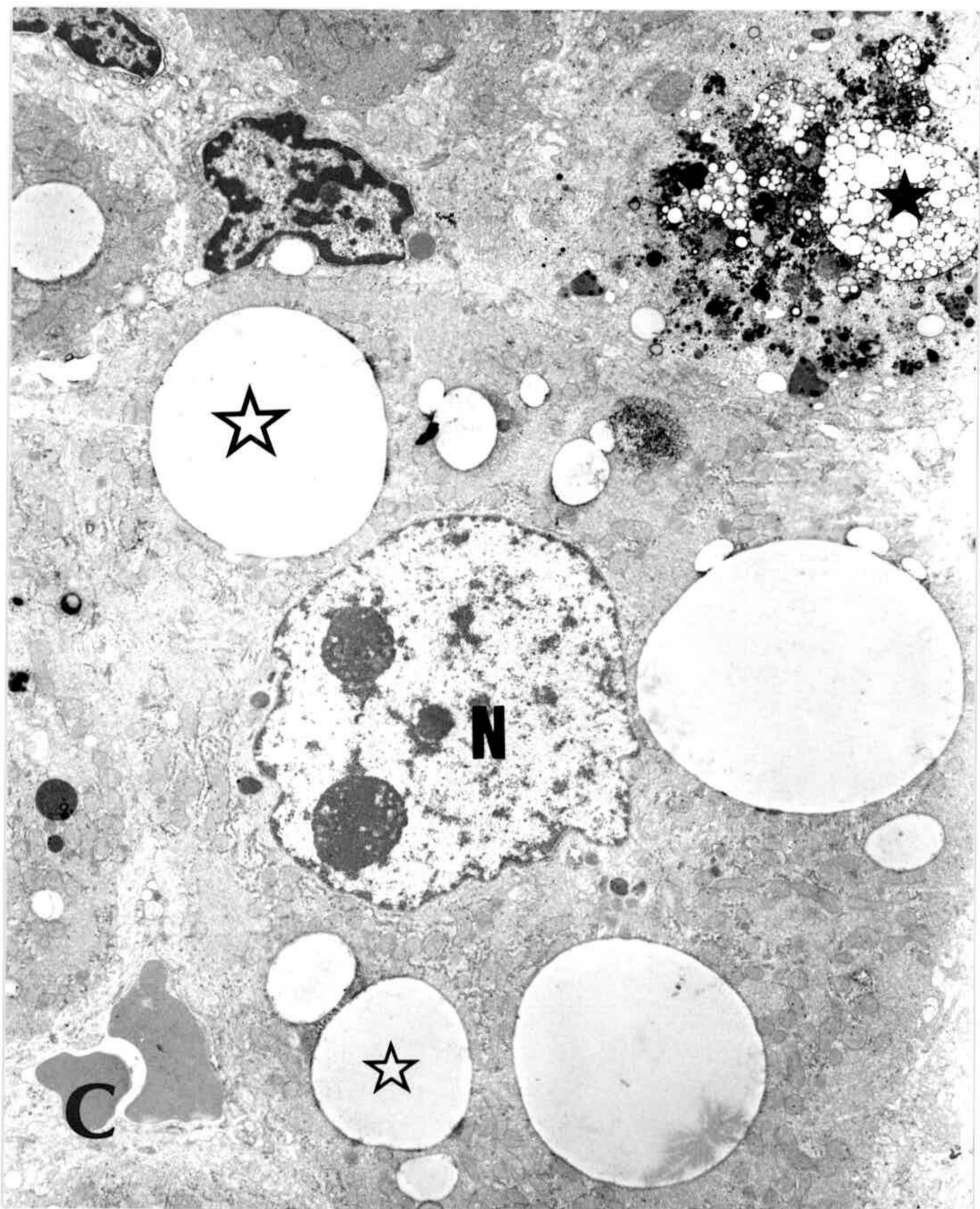
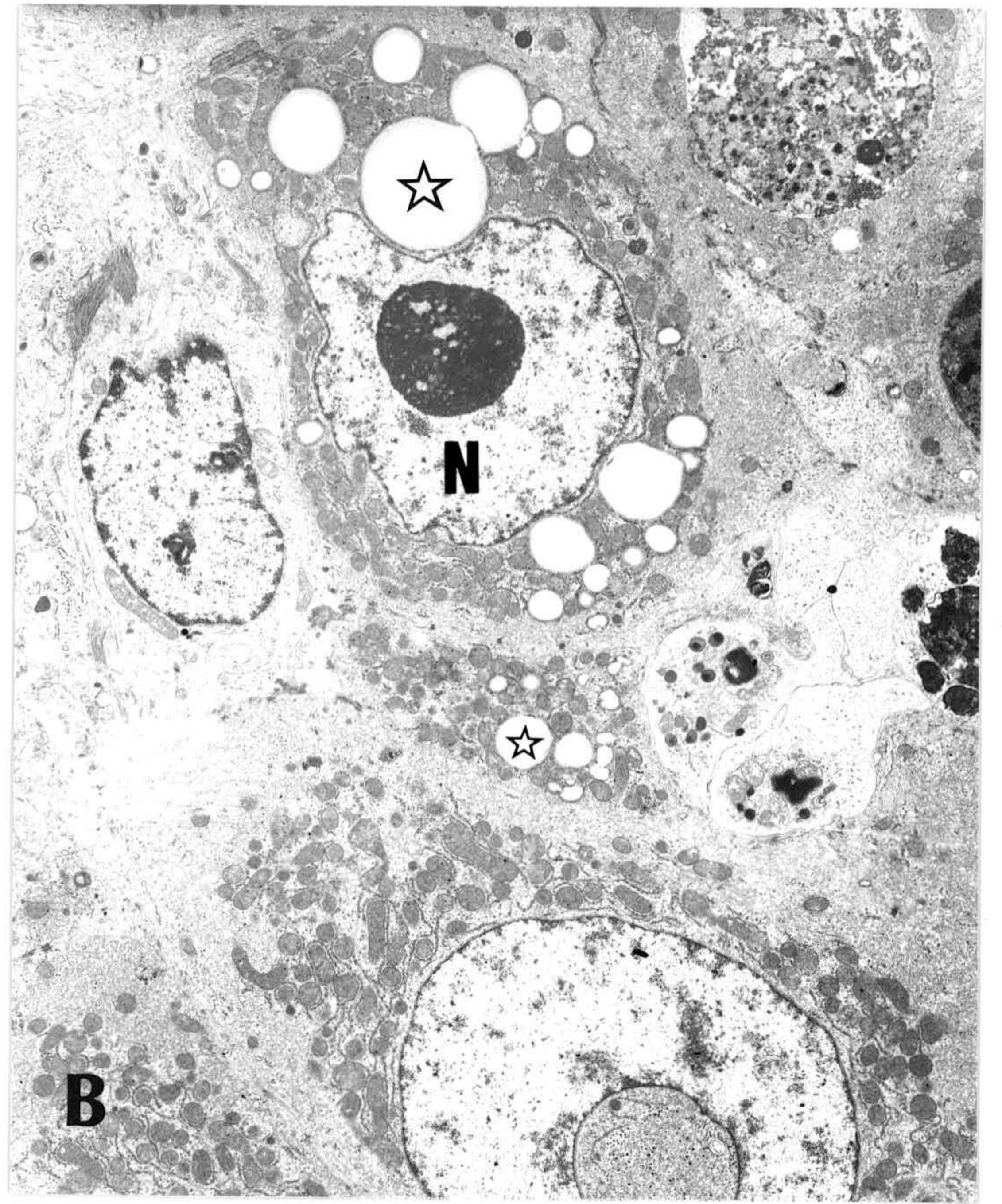
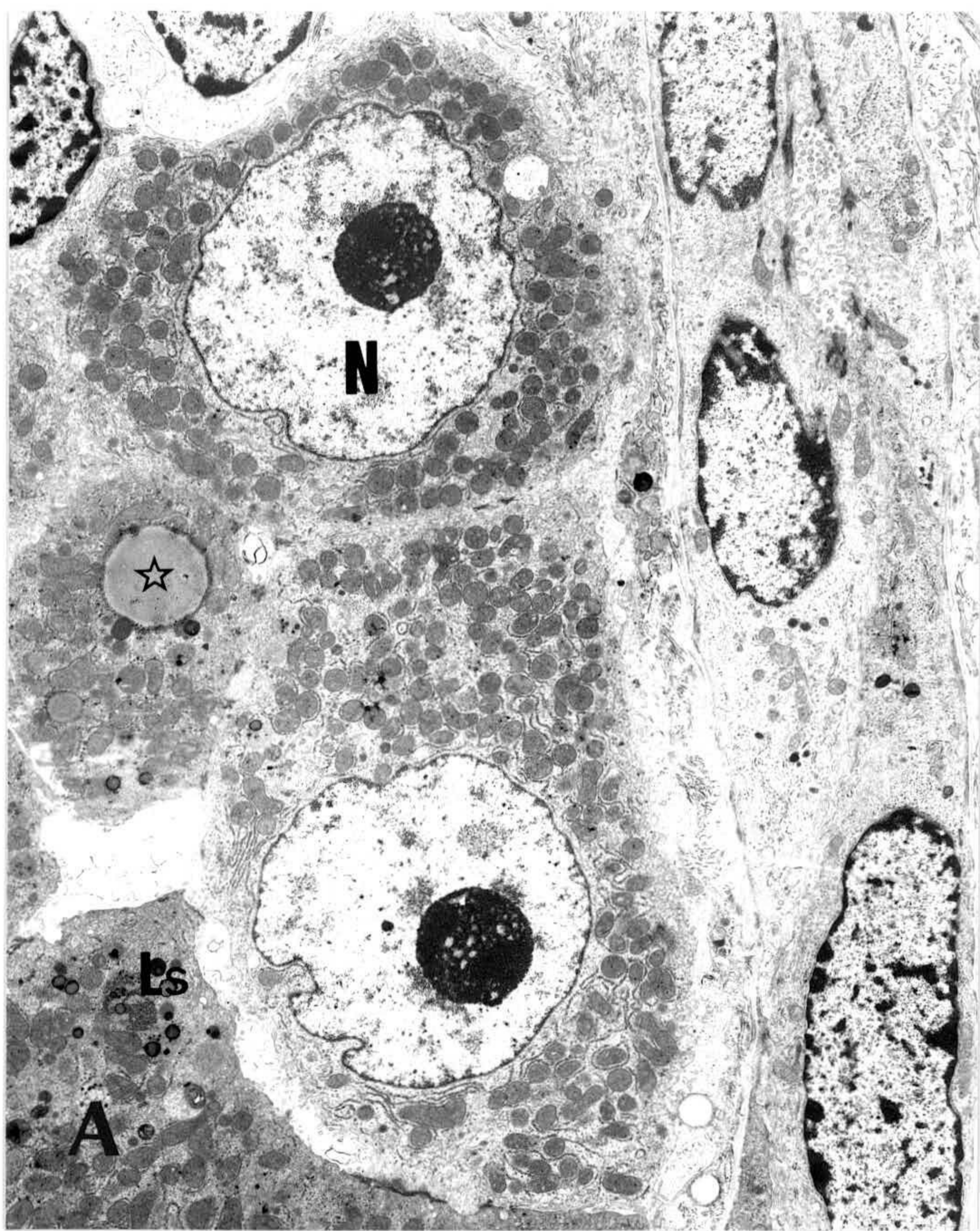


Fig 9: Imágenes a microscopía electrónica de hígados de animales tratados con TAA durante 4 meses. Se observan los hepatocitos con nucleolo prominente, lisosomas y gran acumulación lipídica. N = núcleo hepatocito; Ls = lisosomas; ☆ = gotas lipídicas; ★ = vesículas con grasa y restos celulares. (x 4.400).

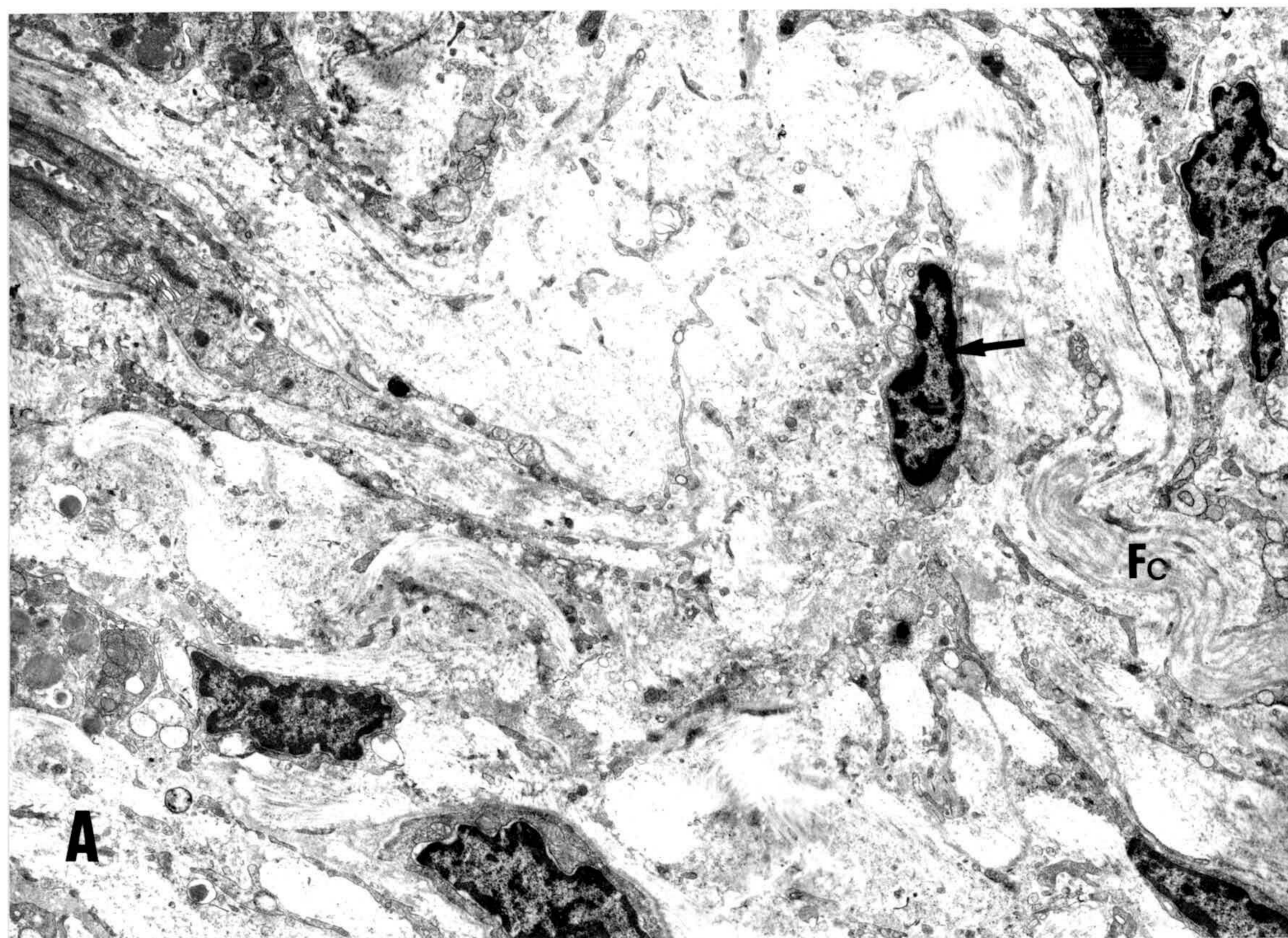


Fig 10: Imágenes a microscopía electrónica de hígados de animales tratados con TAA durante 4 meses. Se puede apreciar la acumulación de fibras de colágeno y los miofibroblastos asociados a dichas fibras. Fc = fibras de colágeno; ↑= miofibroblasto. (x 5.250).

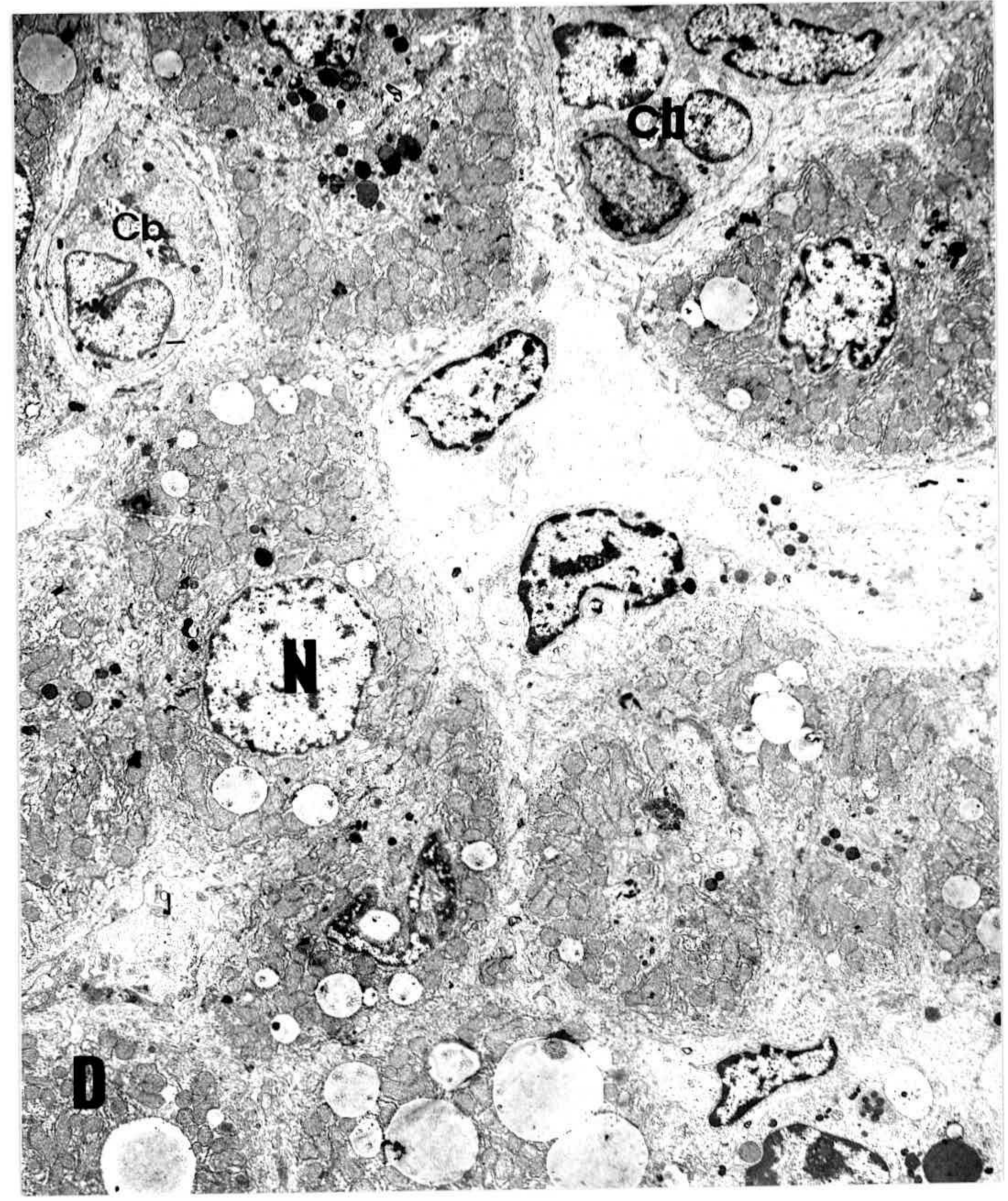
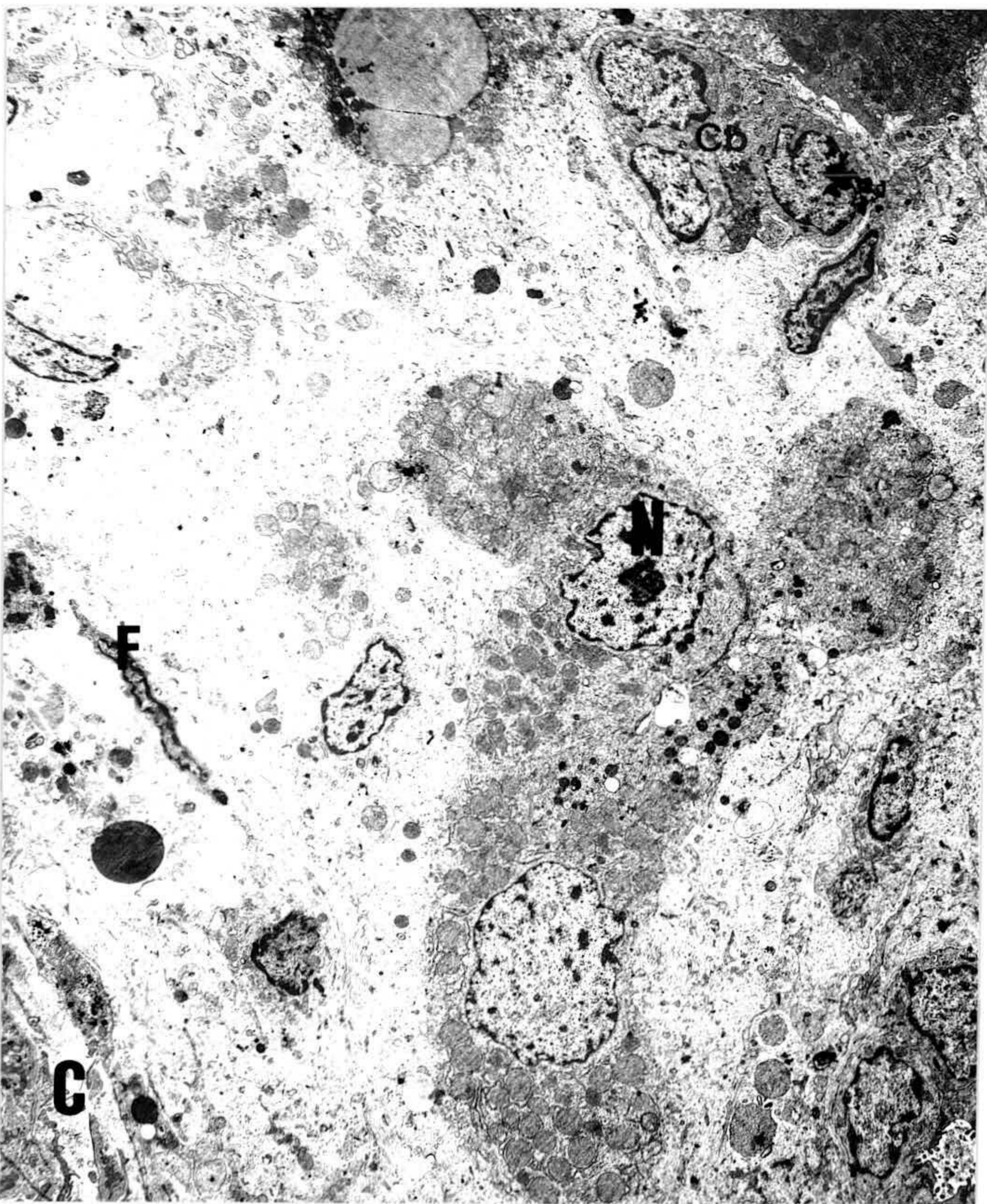
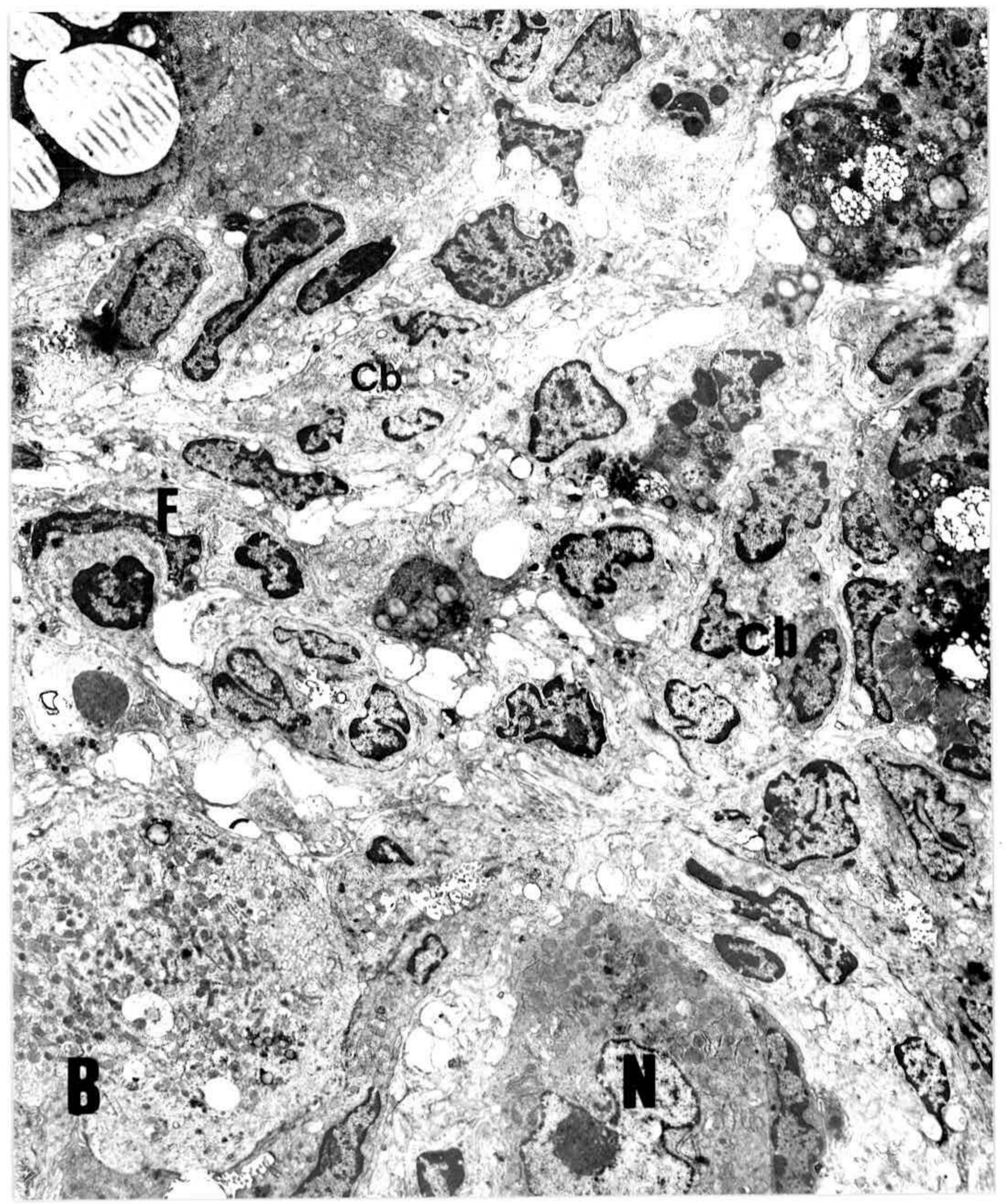


Fig 11: Imagen a microscopía electrónica de hígado de animales tratados con TAA durante 4 meses y recuperados A) con dieta enriquecida con AGPI de las series n-3 y n-6 durante 1 semana (TAGPI n-3+n-6-1), B) con dieta enriquecida con AGPI de la serie n-3 durante 1 semana (TAGPI n-3-1), C) con dieta enriquecida con AGPI de las dos series durante 2 semanas (TAGPI n-3+n-6-2) y D) con dieta enriquecida con AGPI de la serie n-3 durante 2 semanas (TAGPI n-3-2). N= núcleo hepatocito; F= fibroblasto; Cb= conducto biliar. (x 2.000).

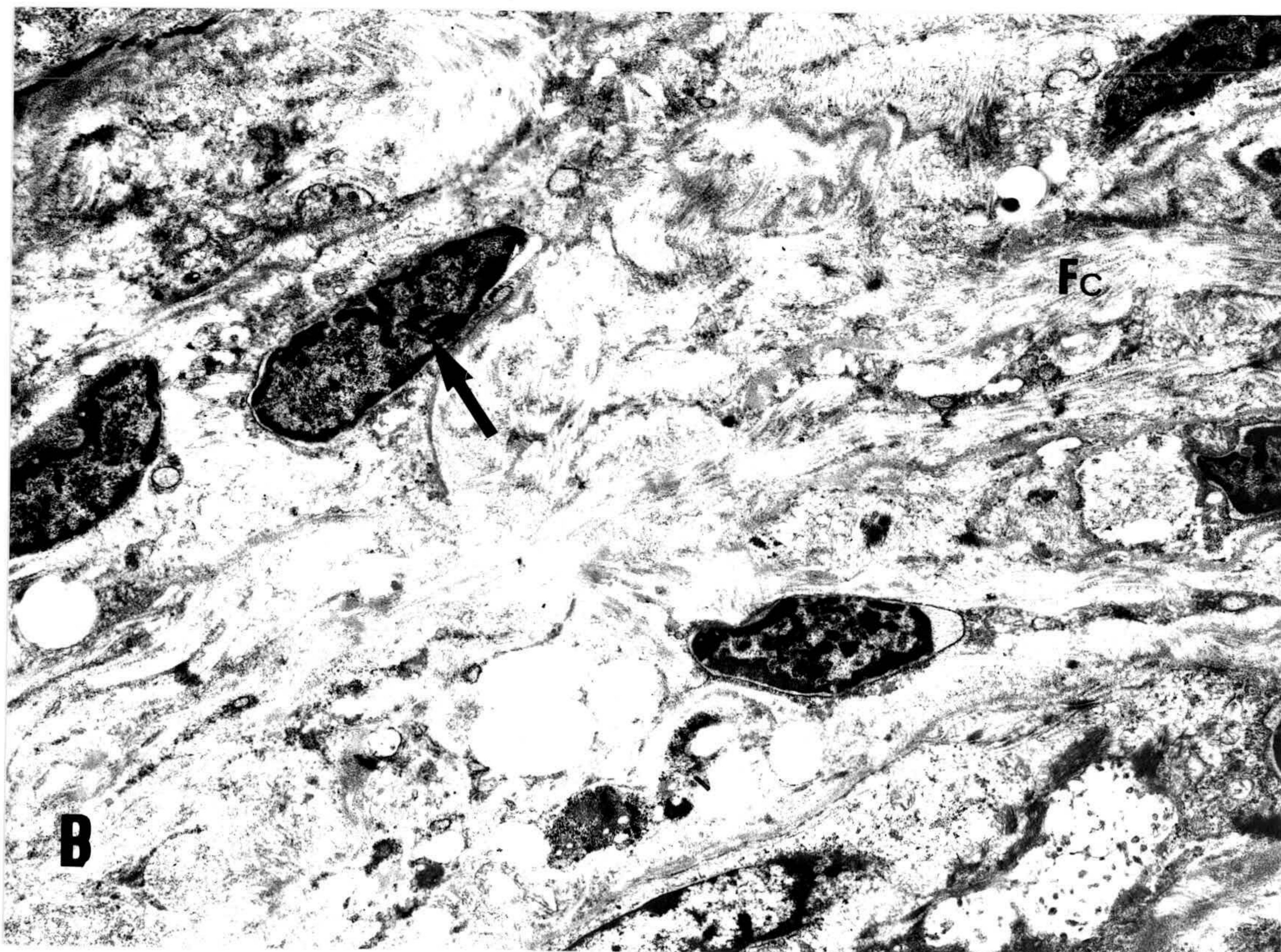
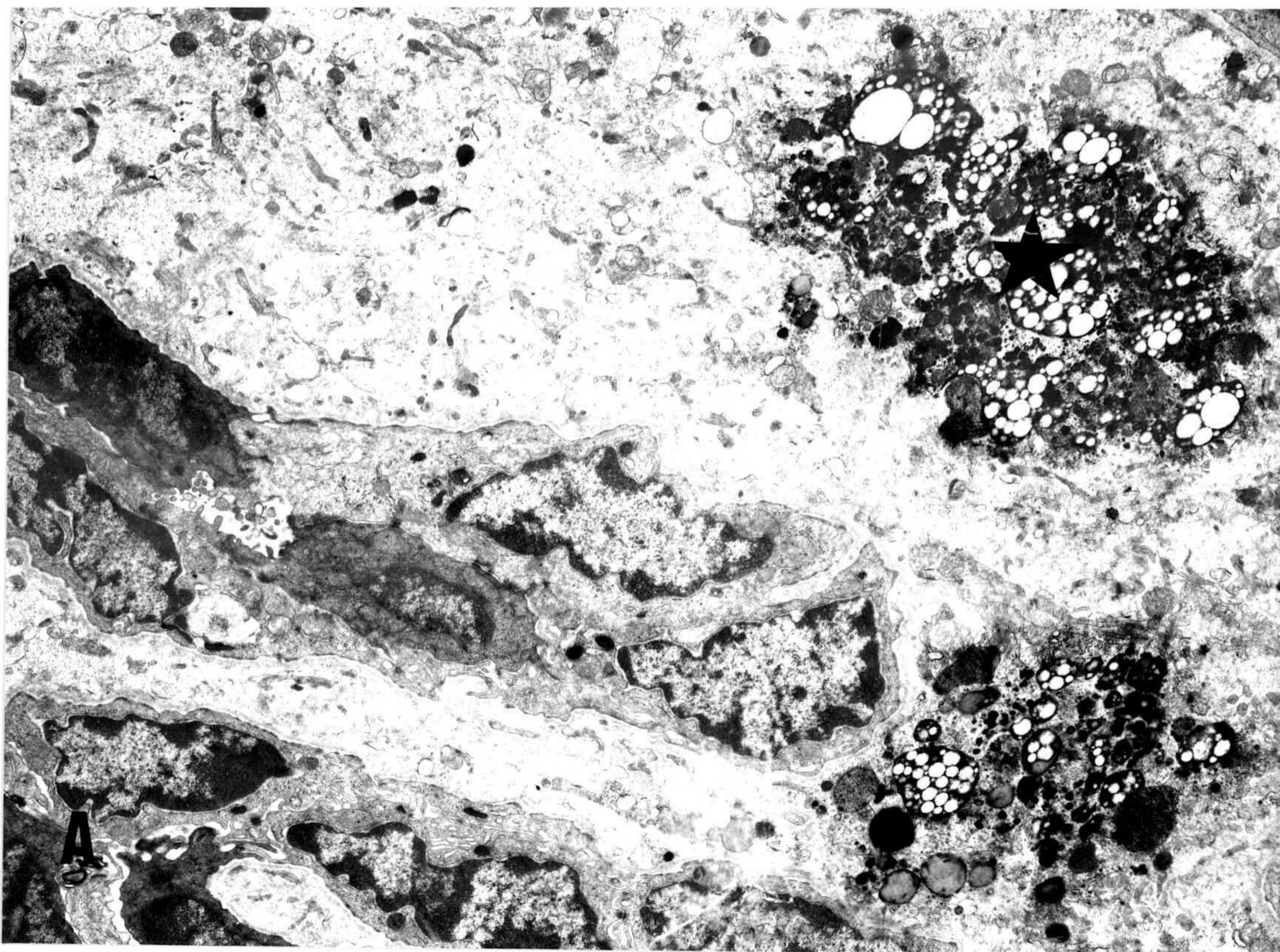


Fig 12: Imagen a microscopía electrónica de hígado de animales TAA-experimentales que tomaron dieta enriquecida con AGPI. A) se observan vesículas con lípidos y restos celulares (★), B) se observan fibras de colágeno asociadas a miofibroblastos. Fc = fibras de colágeno; † = miofibroblasto. (x 5.250).

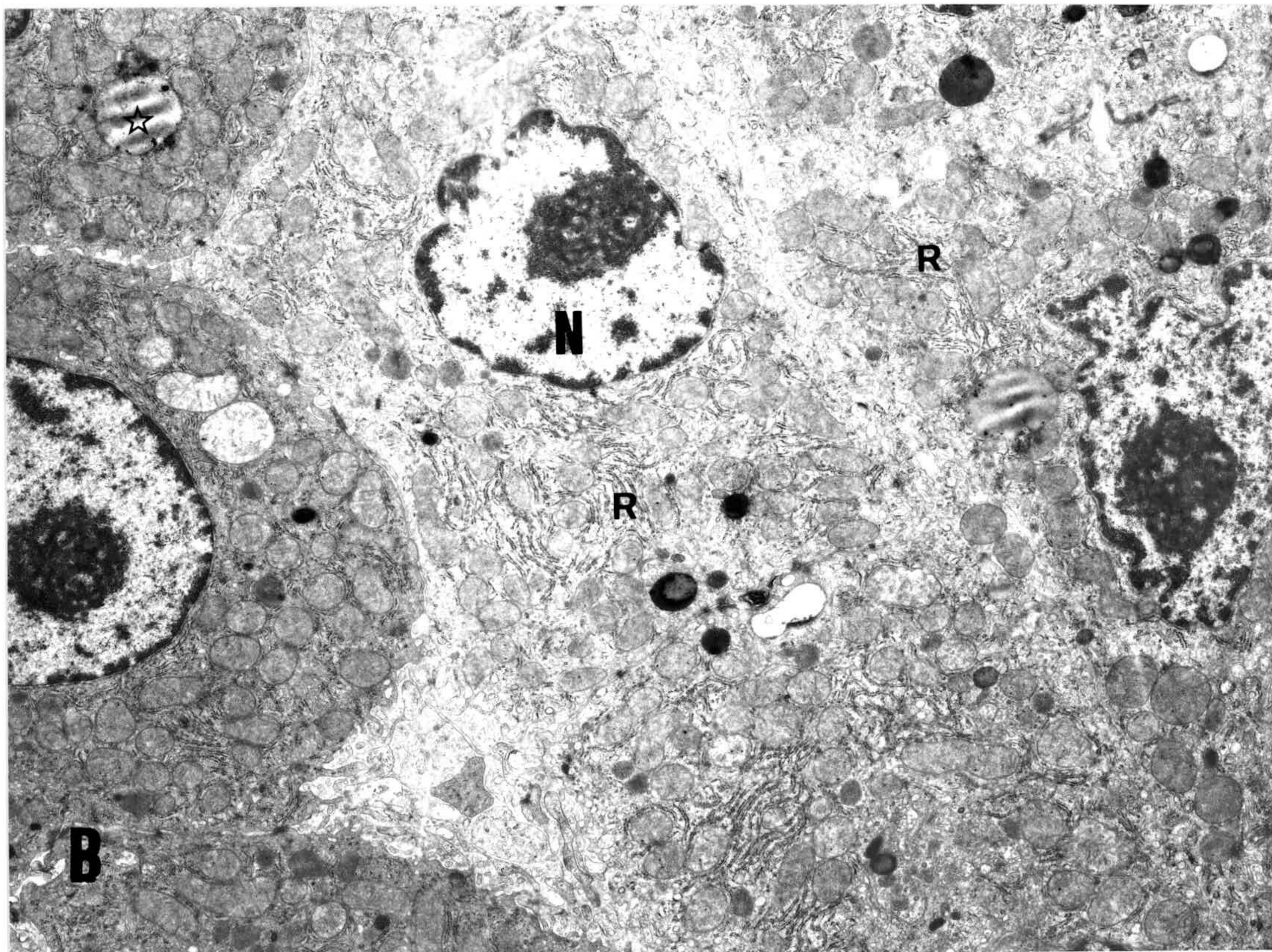
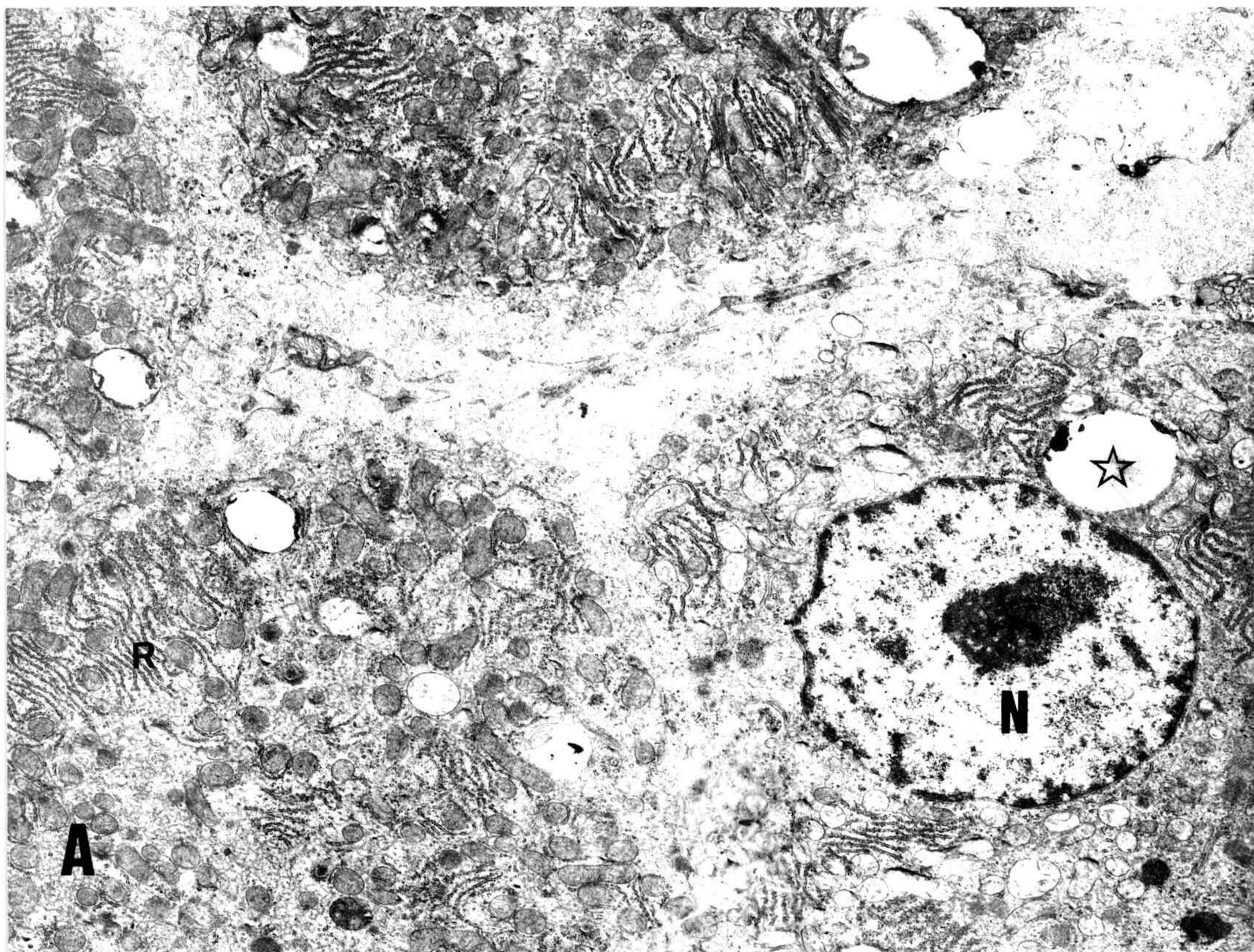


Fig 13: Imágenes a microscopía electrónica de hígados de animales TAA-experimentales que tomaron dietas ricas en AGPI. N = núcleo hepatocito; R= retículo endoplasmático rugoso; ☆= gota lipídica. (x 5.250).

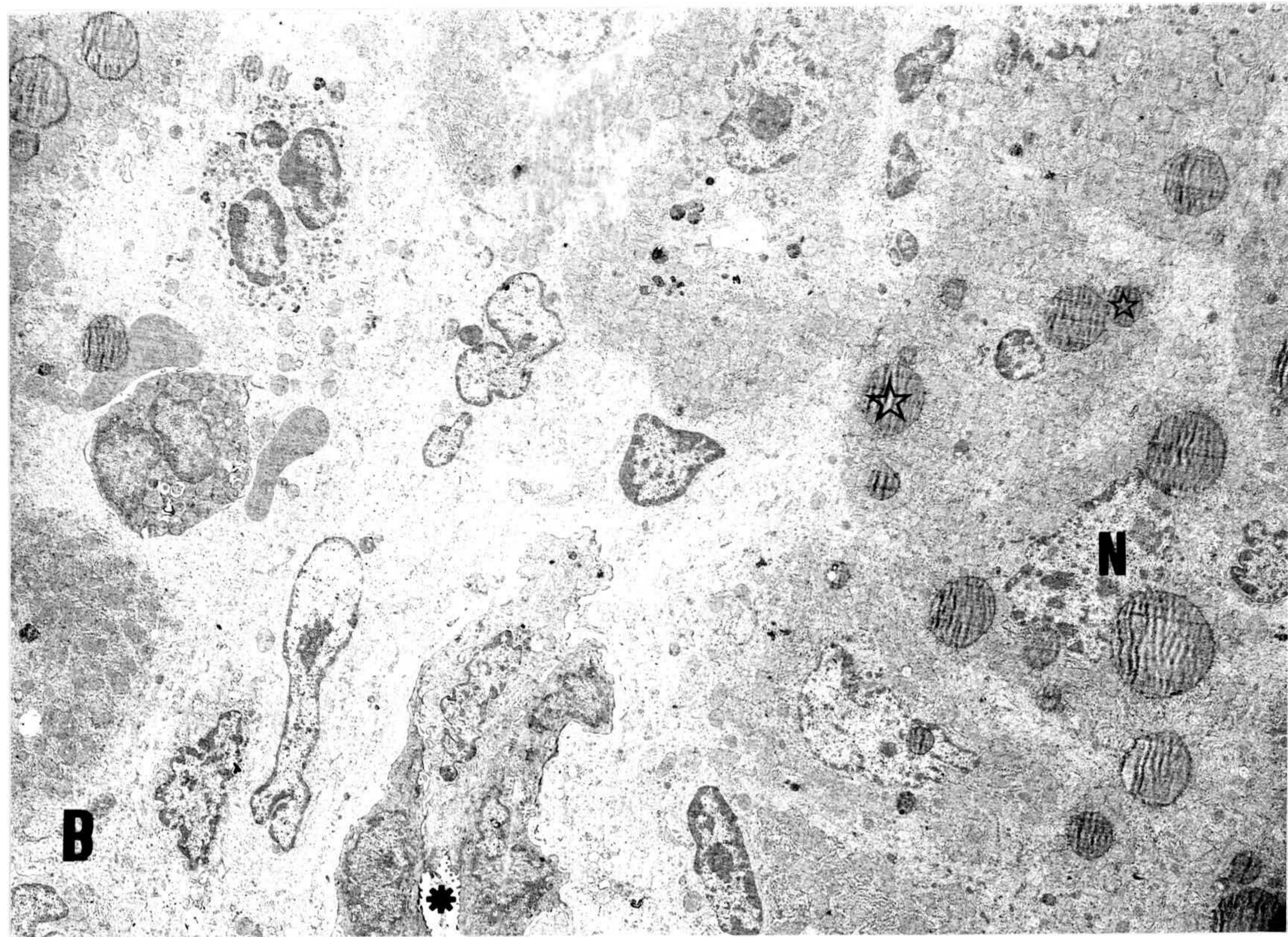
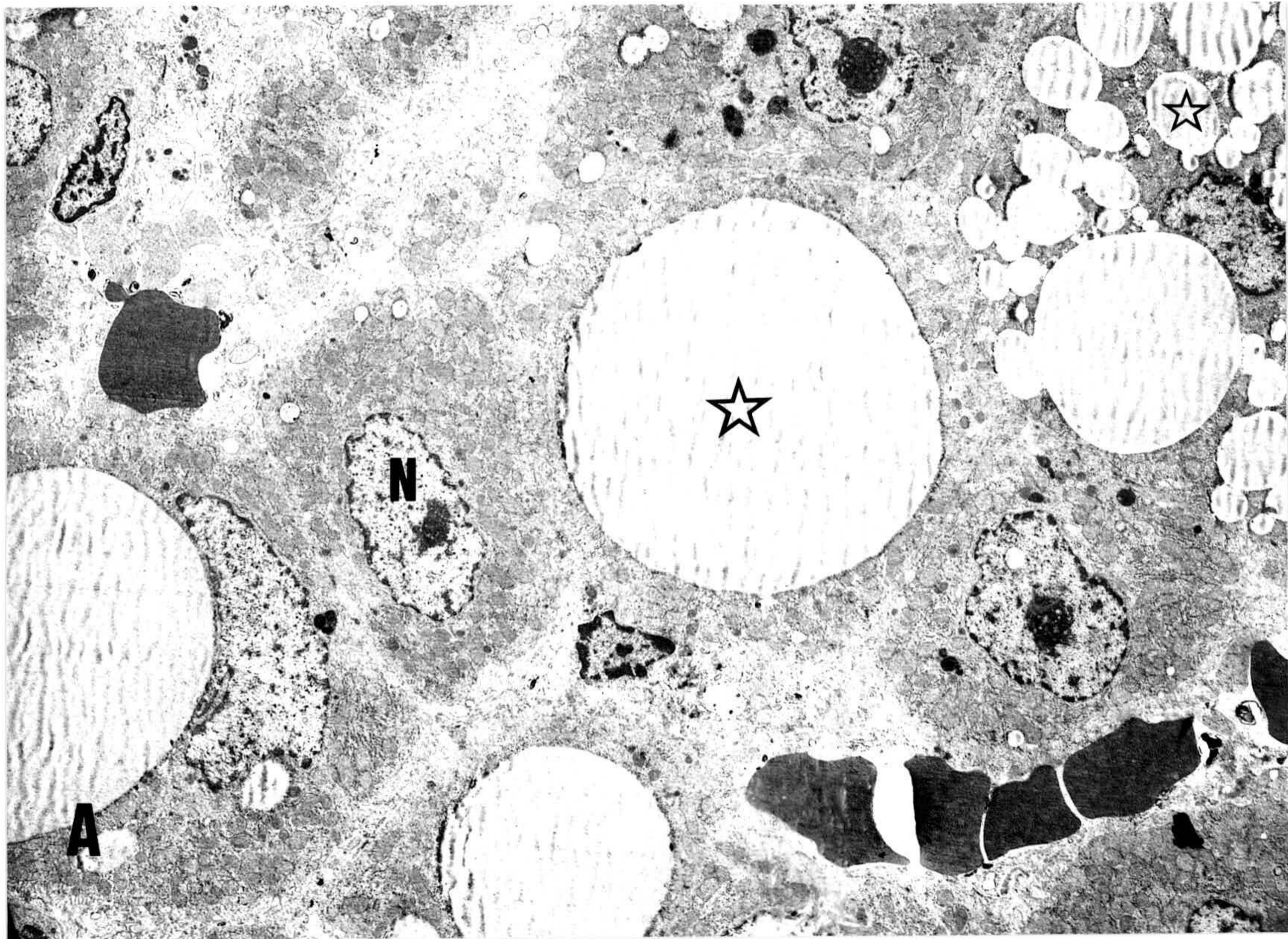


Fig 14: Imagen a microscopía electrónica de hígado de animales TAA-experimentales que tomaron dietas ricas en AGPI. Se observan hepatocitos que contienen grandes gotas lipídicas (A) y otros con gotas más pequeñas (B). N = núcleo hepatocito; ☆= gota lipídica; ✱= canalículo biliar. (x 2.200).

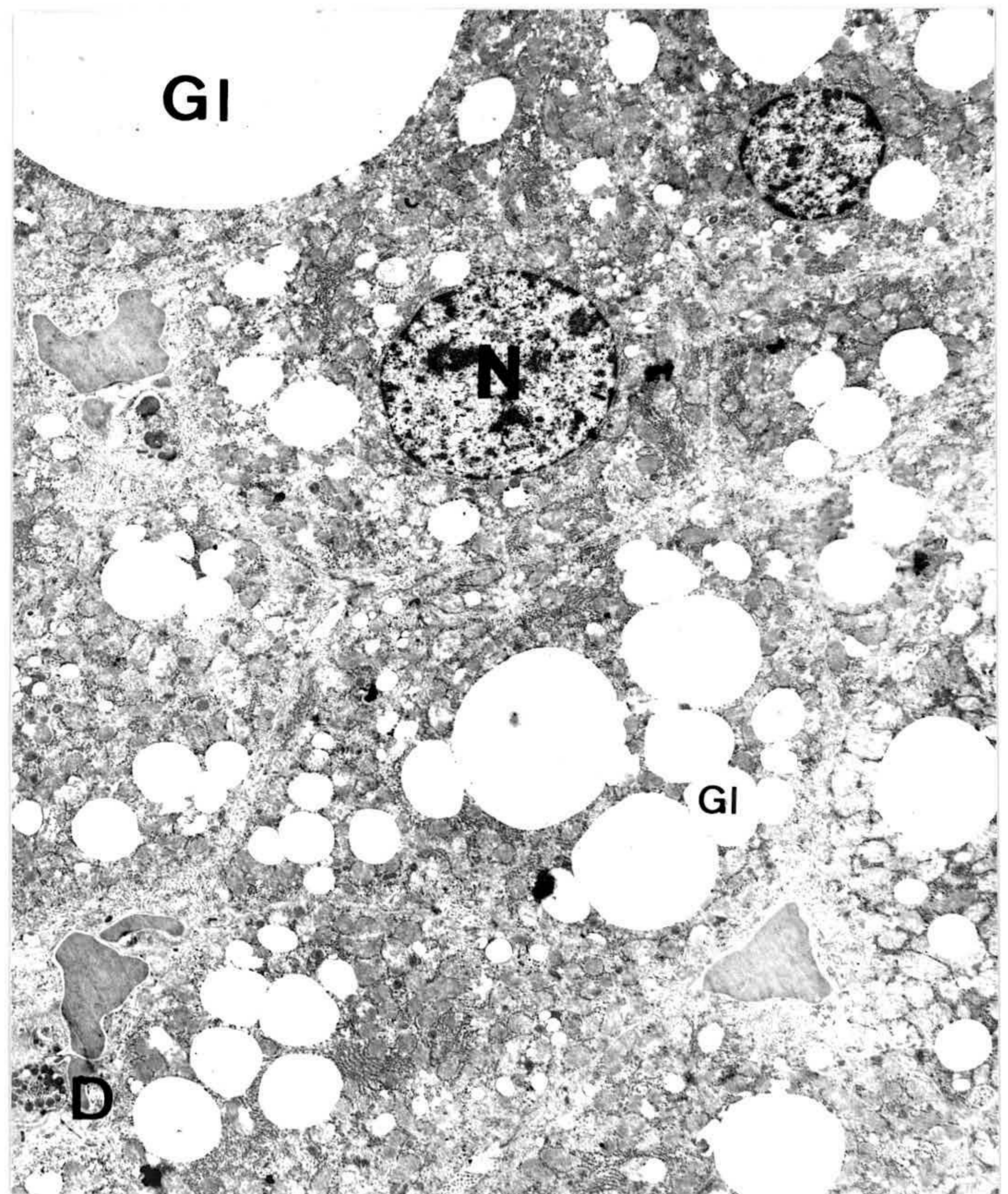
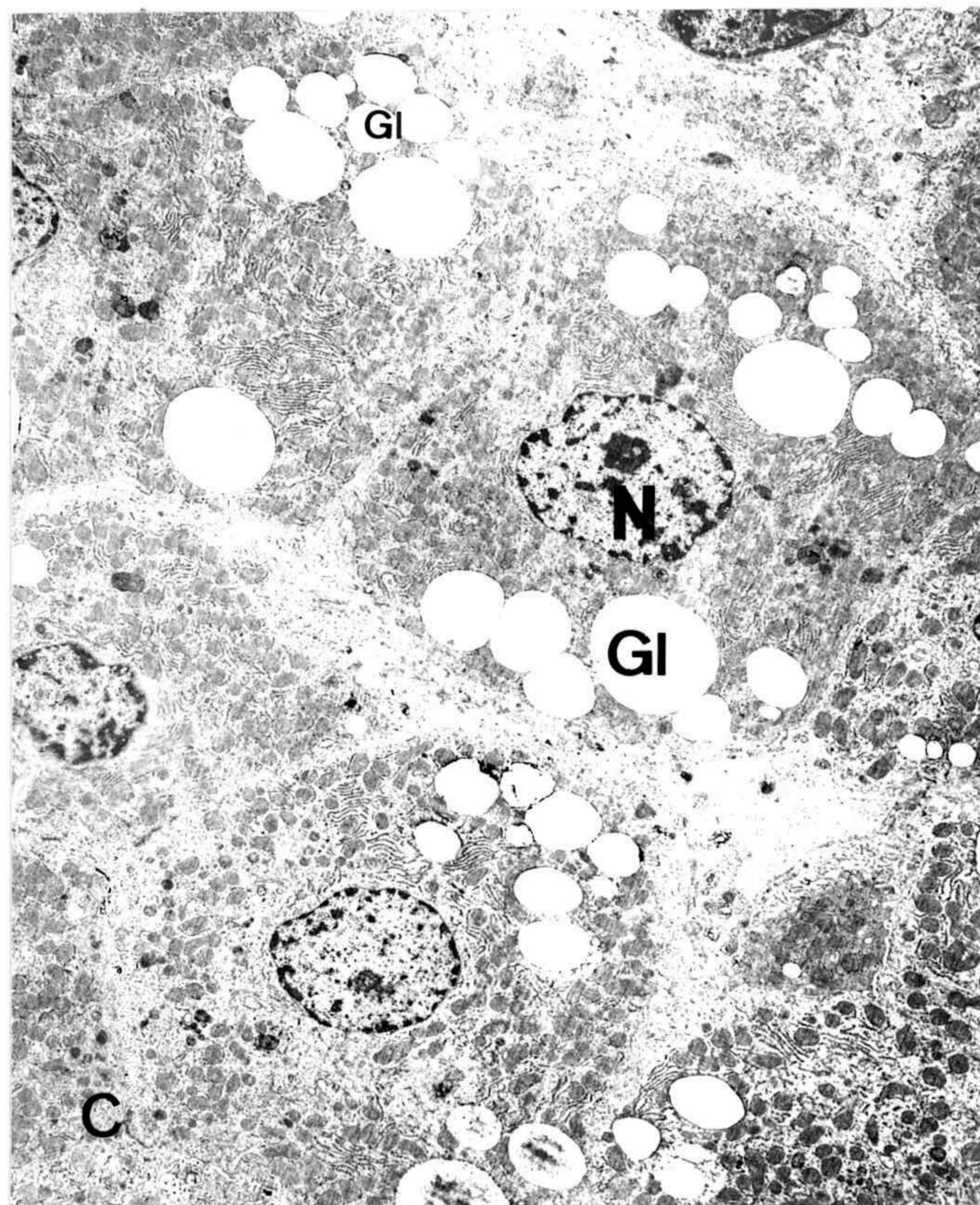
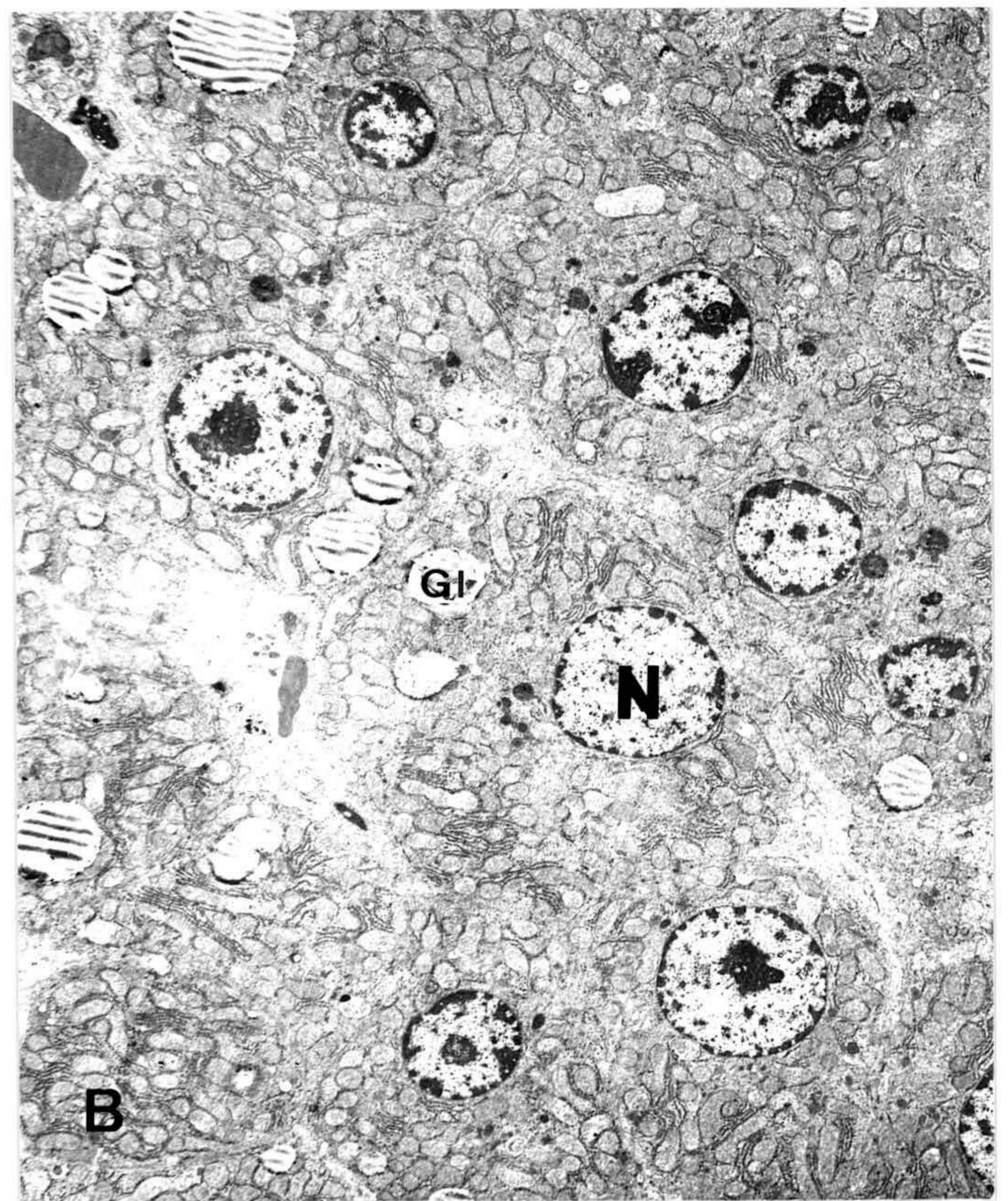
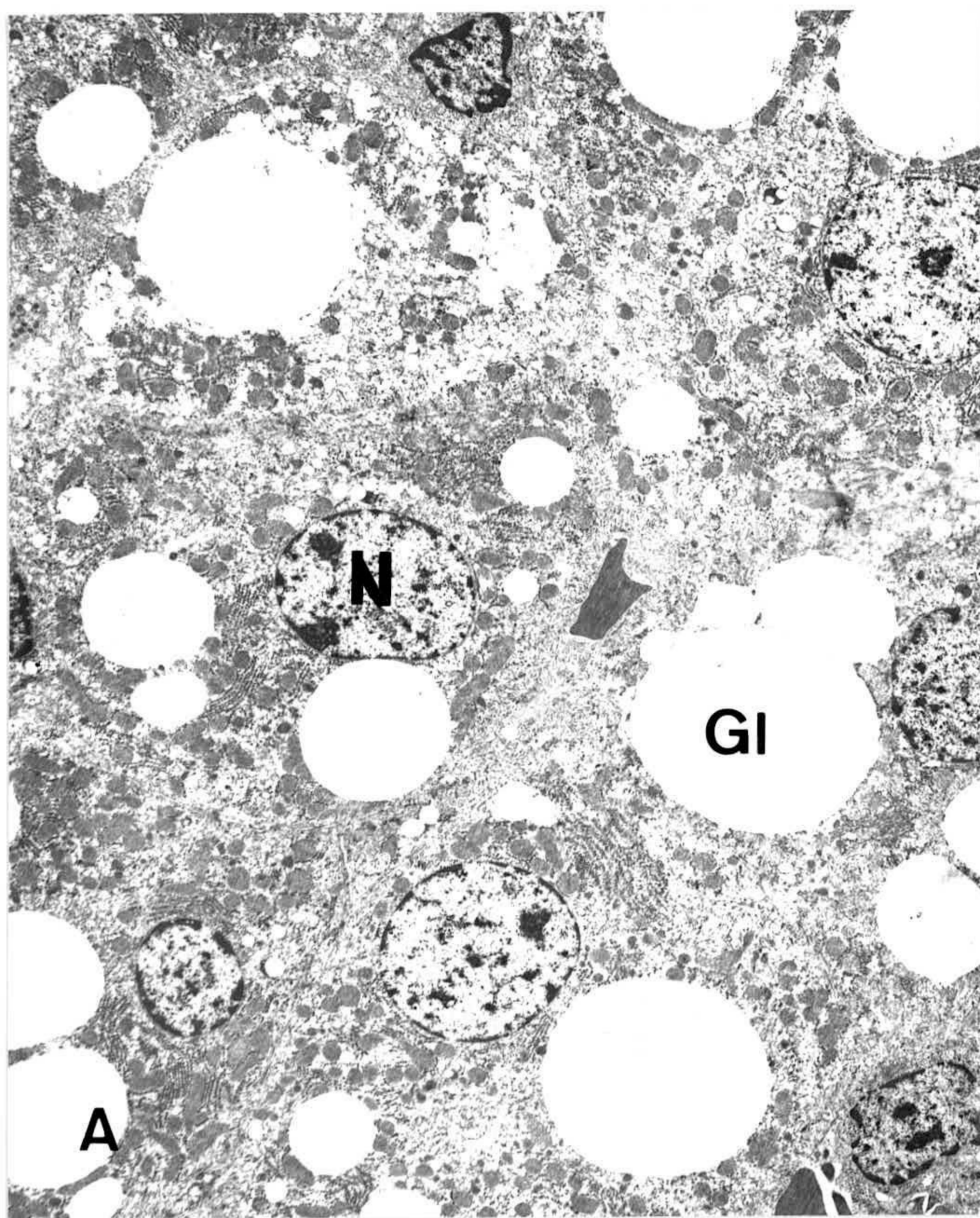


Fig 15: Imagen a microscopía electrónica de hígado de animales controles que recibieron dieta enriquecida con AGPI de las series n-3 y n-6 durante 1 (A: CAGPI n-3+n-6-1) y 2 (C: CAGPI n-3+n-6-2) semanas y dieta enriquecida con AGPI de la serie n-3 durante 1 (B: CAGPI n-3-1) y 2 (D: CAGPI n-3-2) semanas. N= núcleo hepatocito; Gl= gotas lipídicas. (x 2.000).

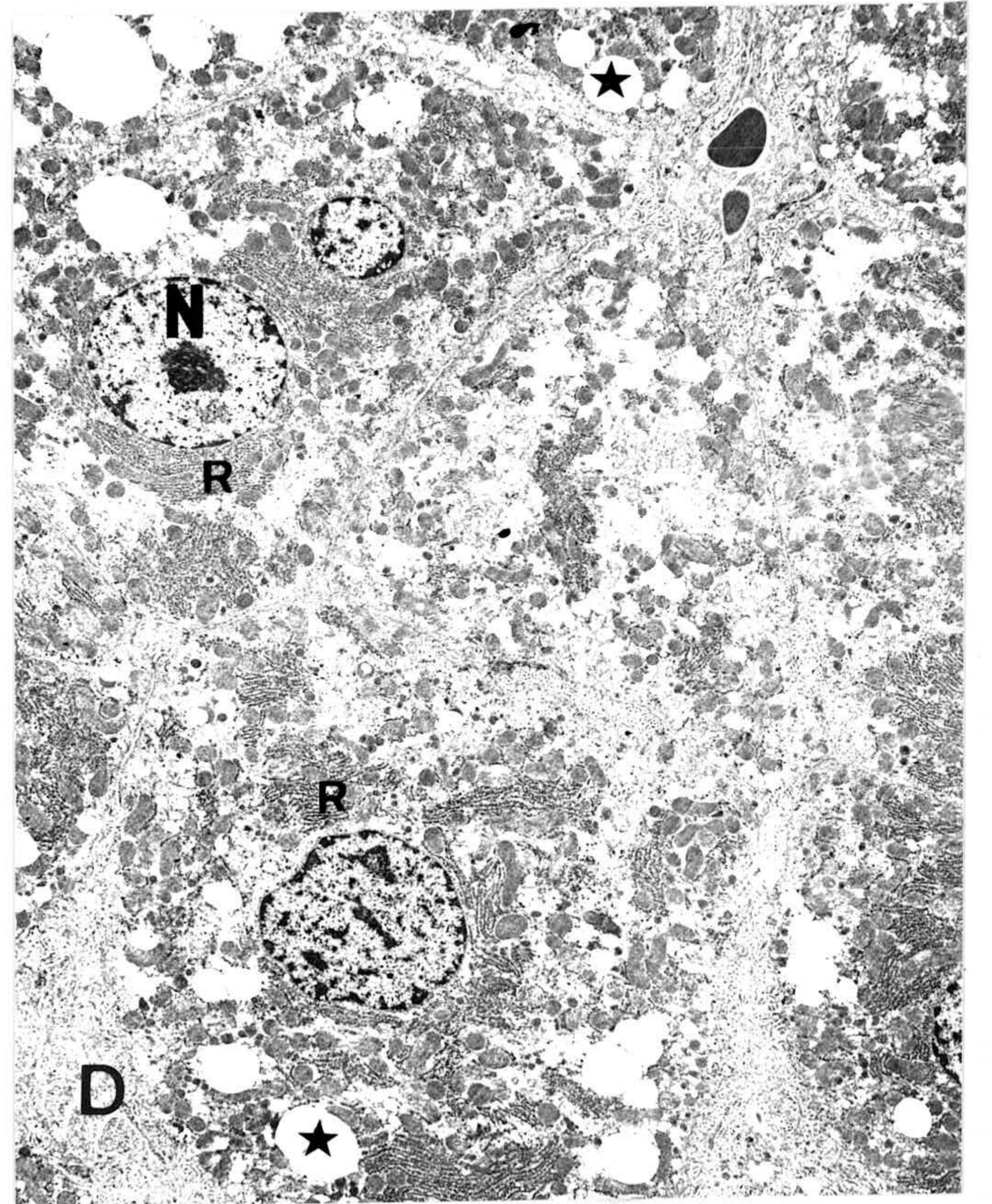
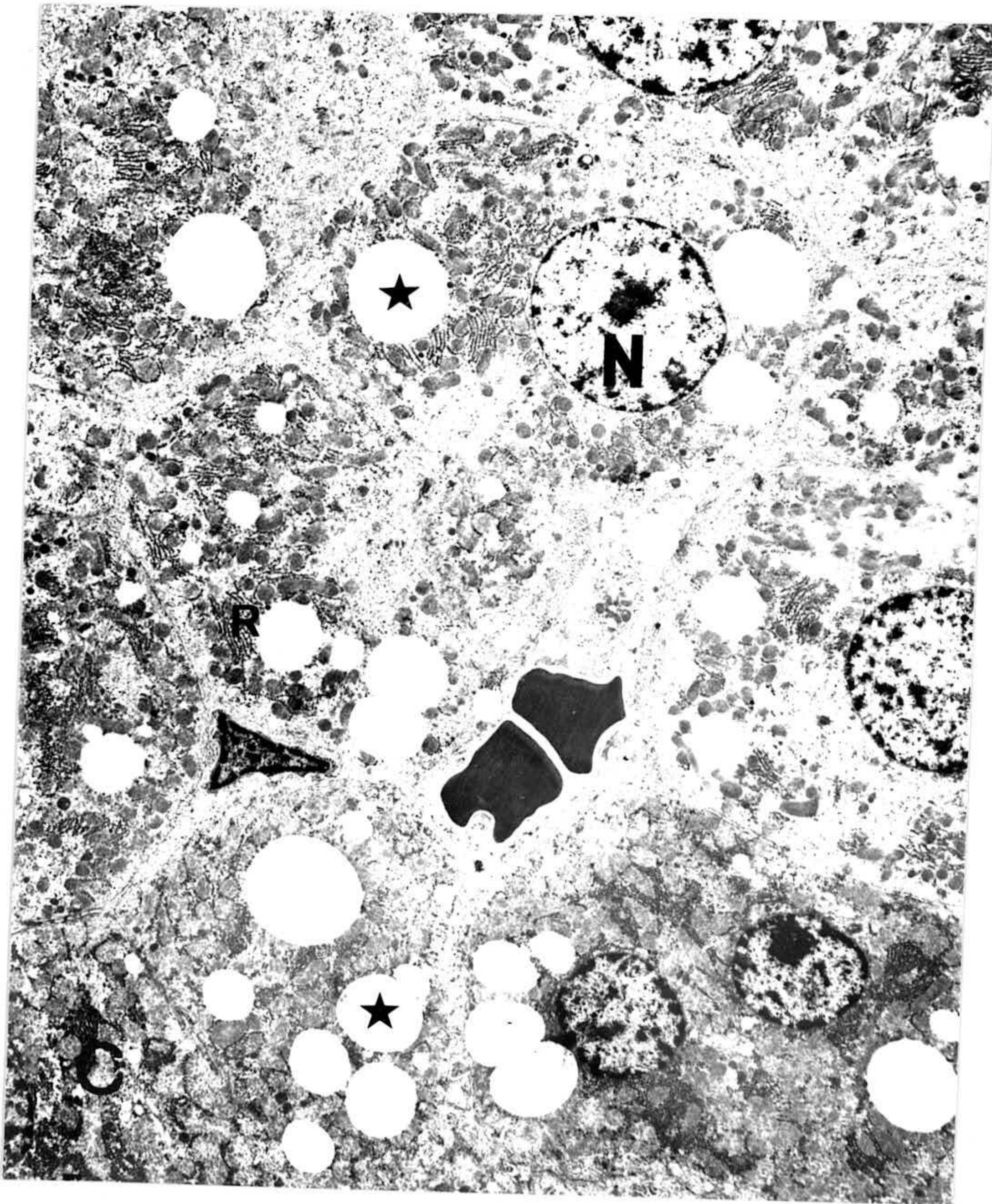
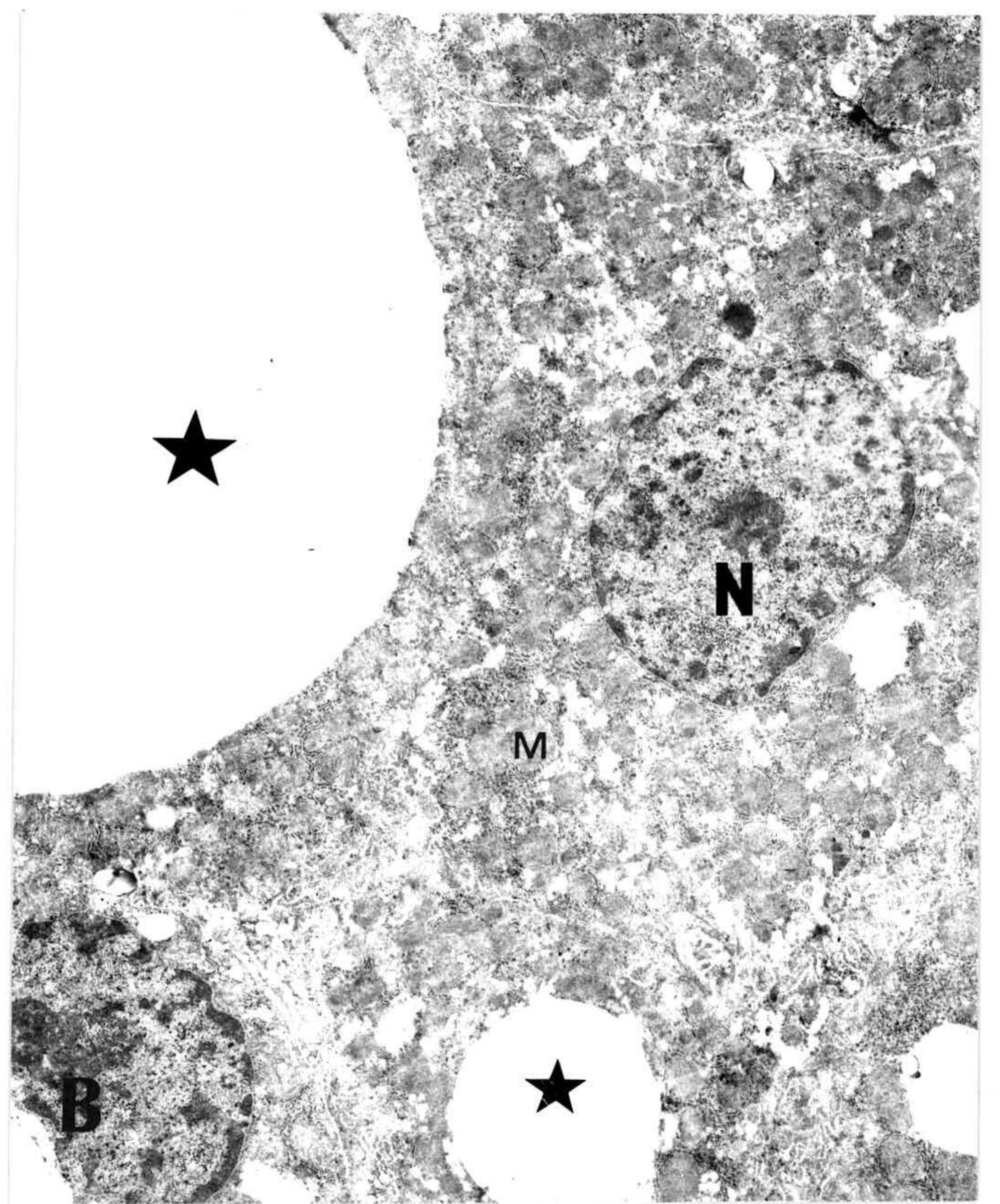
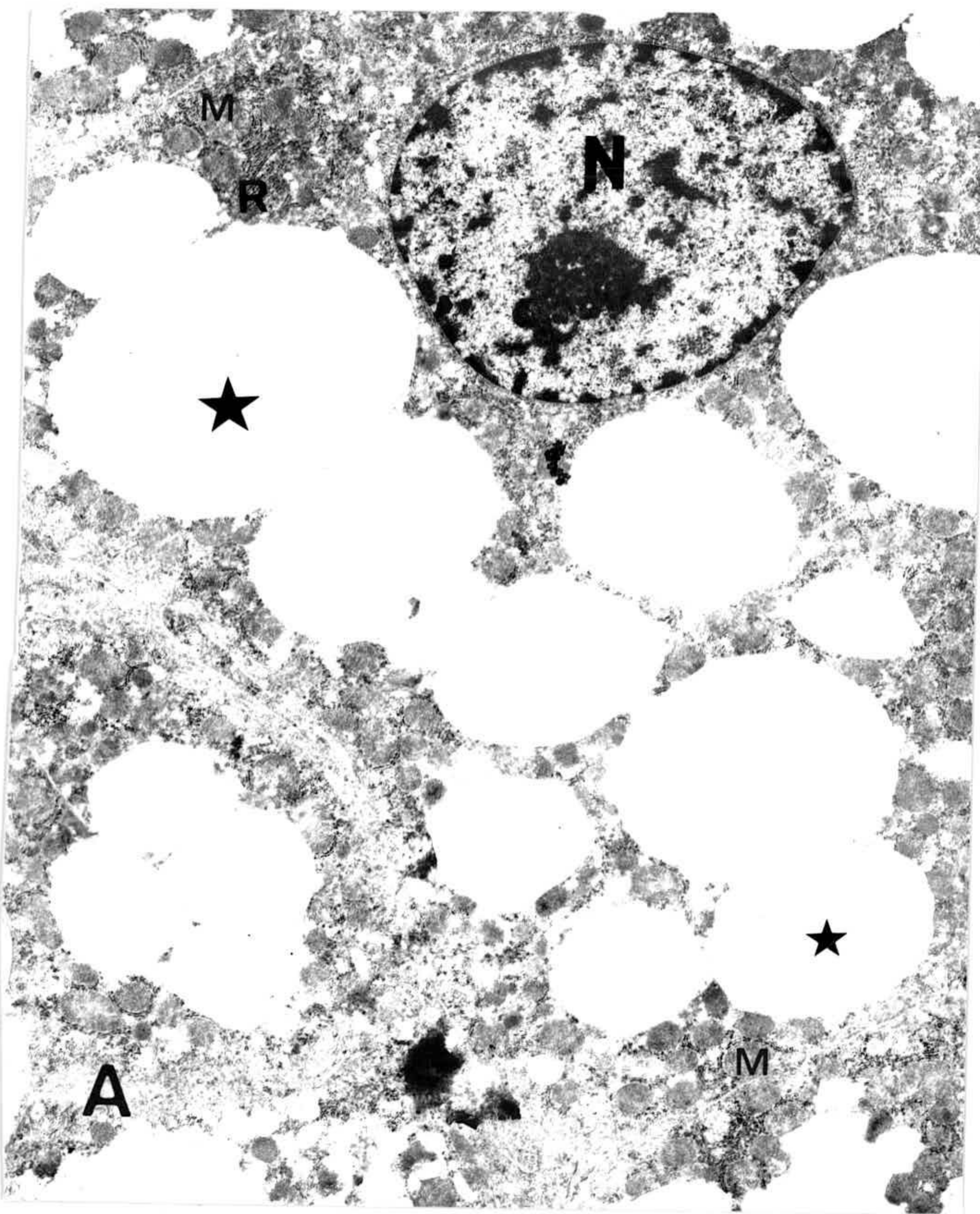
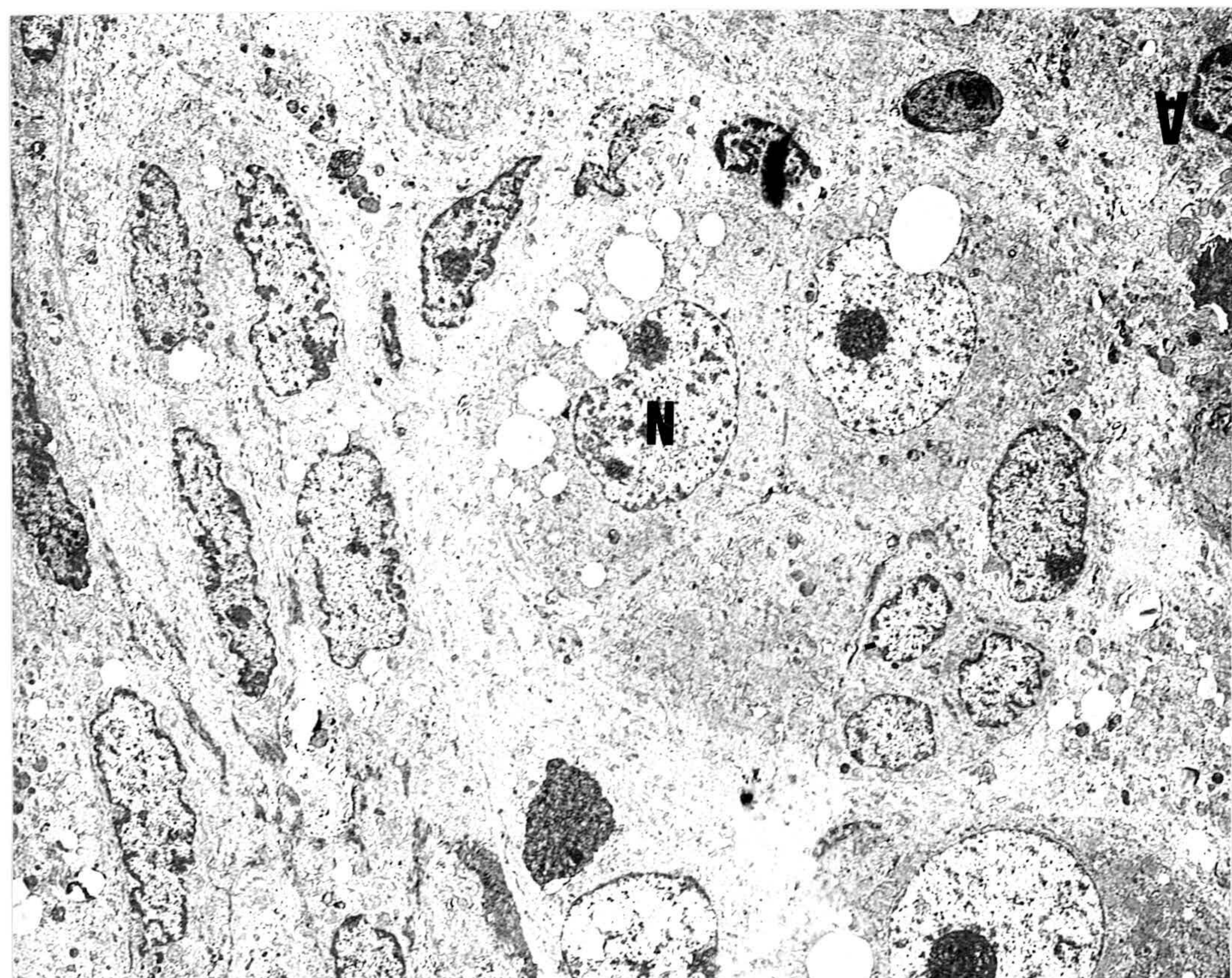
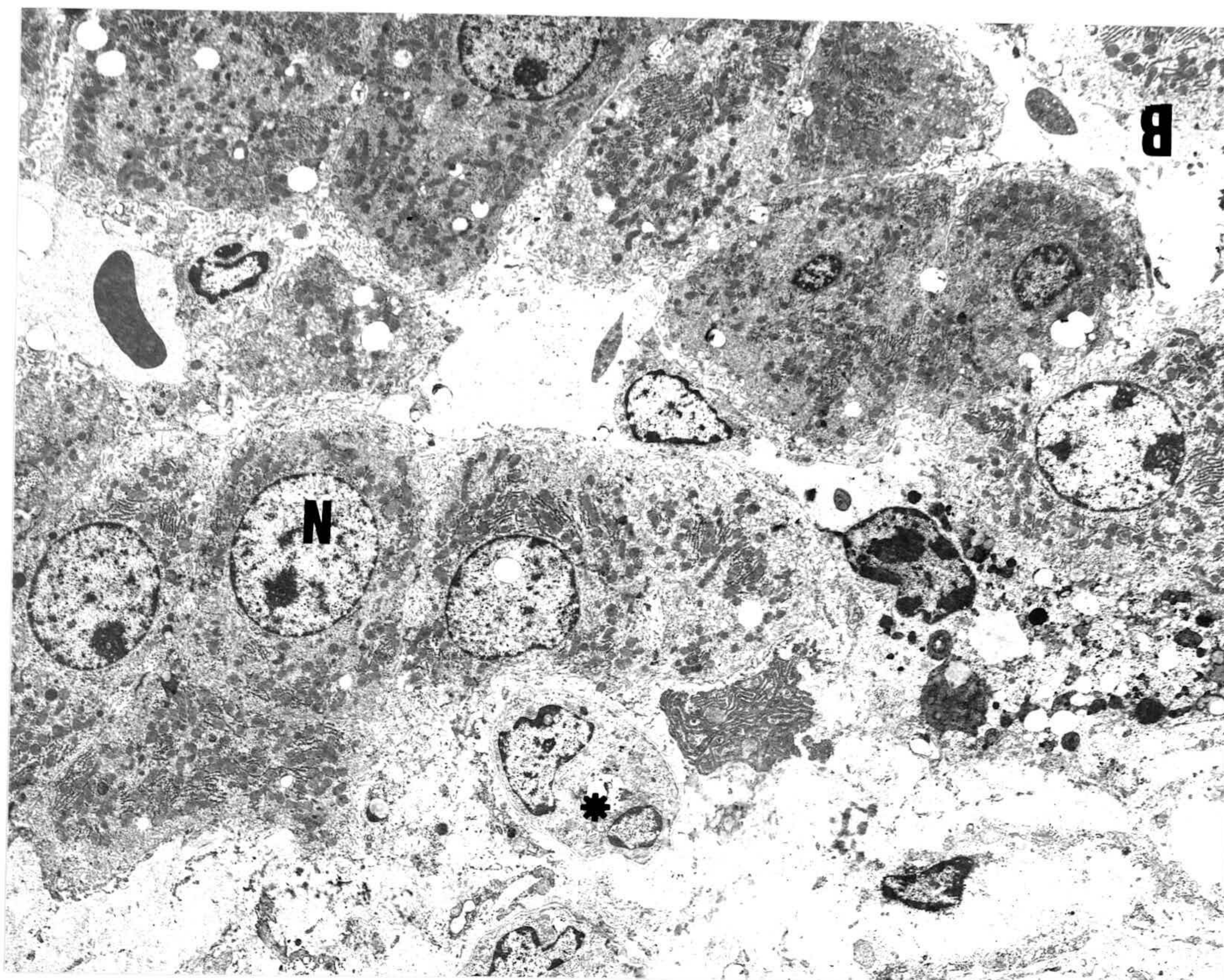


Fig 16: Imágenes a microscopía electrónica de hígado de animales controles que recibieron la dieta rica en AGPI de la serie n-3 durante 2 semanas (CAGPI n-3-2). Obsérvese la variabilidad en el número y tamaño de las gotas lipídicas en los hepatocitos. N= núcleo hepatocito; ★= gotas lipídicas; R= retículo endoplasmático rugoso; M= mitocondria. (A y B: x4.500), (C y D: x2.000).

Fig 17: Imagen a microscopía electrónica de animales del grupo TIC (A) y T2C (B).
N = núcleo hepatocito; * = canalículo biliar. (x 2.200).



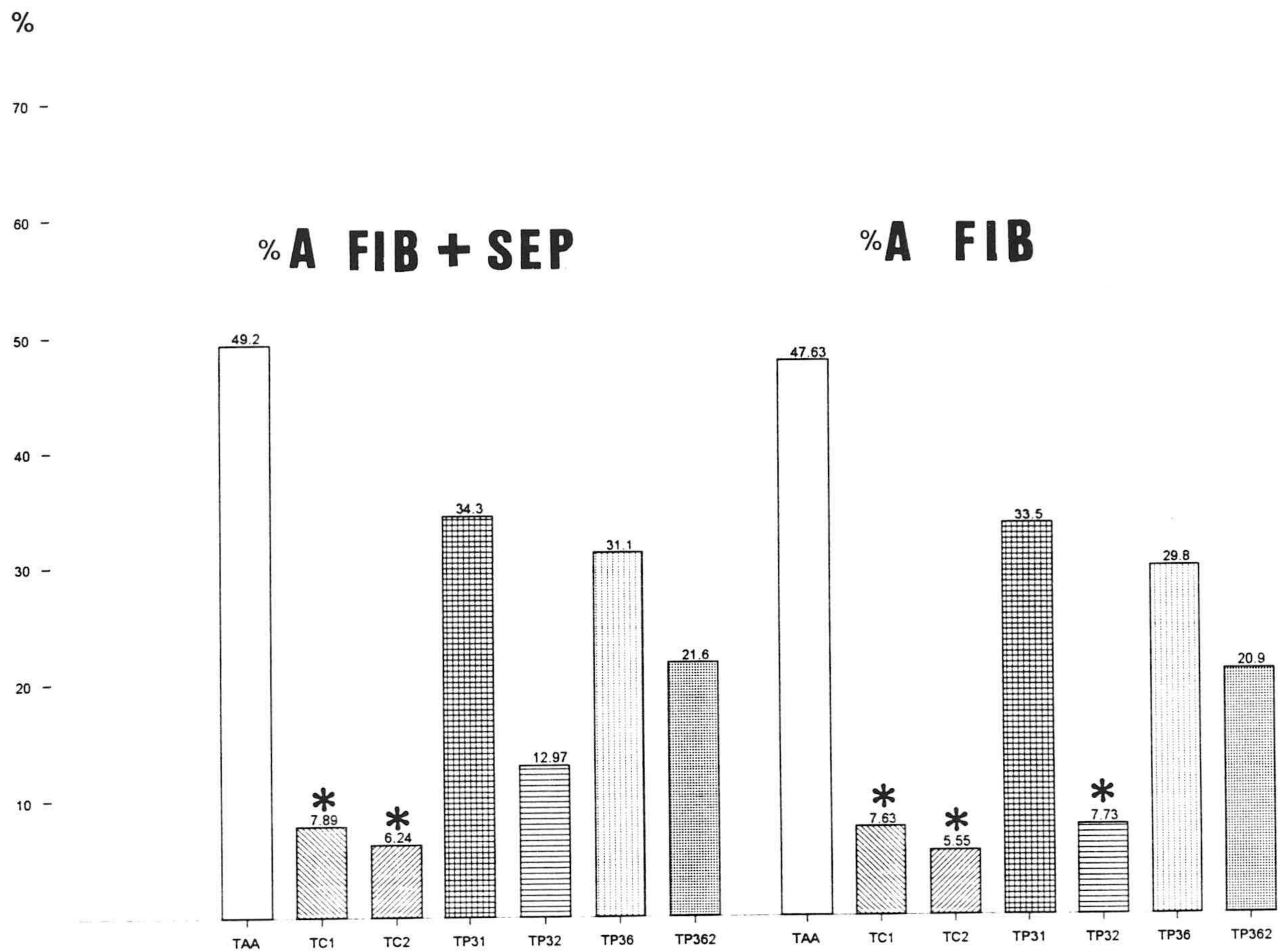
FIBROSIS

Como consecuencia de la administración de TAA el hígado sufre una transformación nodular, por lo que pierde su arquitectura normal. Aparecen así, nodulos de hepatocitos rodeados por septos de tejido conectivo con gran proliferación de conductos biliares. De esta forma, el hígado queda dividido enseudolóbulos. En algunas zonas, los septos fibrosos se extienden y llegan a invadir parte del parénquima, apareciendo áreas fibrosas.

Como medida de la extensión de estas zonas, calculamos la proporción de áreas fibrosas en los distintos grupos TAA y TC, TC, Tn-3, Tn-3+n-6 tras la 1ª y 2ª semana de recuperación. En muchos casos los septos fibrosos, si bien no llegaron a invadir el parénquima, si fueron del suficiente tamaño como para ser considerados, por lo que también calculamos las áreas ocupadas por estos septos (Fig 18).

Finalizada la administración de TAA, observamos la disminución de zonas fibróticas y de septos en todos los grupos, tanto a la 1ª como a la 2ª semana de recuperación. Cabe destacar que los animales que tomaron la dieta control semipurificada durante 1 y 2 semanas (T1C y T2C, respectivamente), presentaron reducciones significativas frente al grupo TAA. Sin embargo, esta mejora de la arquitectura hepática no fue tan patente en los animales que recibieron AGPI en la dieta. Sólo el grupo al que se le suplementó AGPI de la serie n-3 durante 2 semanas, se recuperó respecto a las zonas fibrosas. A pesar de esto, cuando se consideraron también las áreas ocupadas por septos, el valor del parámetro aumentó y la mejora dejó de ser significativa.

Figura 18: Proporciones relativas de áreas fibróticas y áreas ocupadas por septos en el grupo tratado con TAA durante 4 meses y los grupos TAA-experimentales posteriormente recuperados durante 1 y 2 semanas.



Los resultados se expresan la media aritmética (%) + SEM. TAA: grupo tratado con tioacetamida durante 4 meses; TC: grupo TAA-experimental que tomó dieta control semipurificada durante la recuperación; TP3: grupo TAA-experimental que recibió dieta suplementada con AGPI de la serie n-3 durante la recuperación; TP3+6: grupo TAA-experimental que recibió dieta suplementada con AGPI de las series n-3 y n-6. *:significación vs grupo TAA. $P < 0,05$.

ESTEATOSIS

Con el objeto de evaluar el grado de esteatosis, en cortes semifinos (1μ) teñidos con azul de toluidina, estimamos el número de gotas lipídicas contenidas en hepatocitos y en el área de una retícula ocular. Los resultados se expresan como n° de gotas/hepatocito $\times 100$ y n° de gotas/área de retícula (Tabla 5).

Tabla 5: Estimación de la esteatosis en el grupo tioacetamida, grupo control, grupos TAA-experimentales tras 1 y 2 semanas de recuperación y sus respectivos grupos controles.

Grupo	N°GL/Hepatocito $\times 100$		N°GL/área retícula	
TAA	505,6 \pm 81,88 ^{a3}		63,4 \pm 10,59 ^{a3}	
C	271,0 \pm 26,04		32,4 \pm 1,35	
Grupos Experimentales				
	1S	2S	1S	2S
TC	304,2 \pm 26,43	364,0 \pm 102,74	42,1 \pm 5,15	50,5 \pm 12,51 ^{cl}
Tn-3	498,8 \pm 37,13	519,4 \pm 84,31	69,0 \pm 6,86 ^{d3}	62,4 \pm 10,0 ^{cl}
Tn-3+n-6	659,2 \pm 130,65 ^{b2c2d2}	486,6 \pm 59,74	99,9 \pm 10,16 ^{clde3}	68,7 \pm 4,91 ^{cl}
CC	302,2 \pm 42,65	243,8 \pm 28,79	41,2 \pm 5,46	33,9 \pm 4,68
Cn-3	373,7 \pm 48,63	298,6 \pm 99,44	53,4 \pm 8,53	52,9 \pm 4,47
Cn-3+n-6	418,9 \pm 33,3	359,7 \pm 29,30	50,4 \pm 4,13	52,9 \pm 4,47

Los resultados se expresan como media aritmética \pm SEM. TAA: grupo tratado con tioacetamida durante 4 meses; TC: grupo TAA-experimental que tomó dieta control semipurificada durante la recuperación; Tn-3: grupo TAA-experimental que recibió dieta suplementada con AGPI de la serie n-3 durante la recuperación; Tn-3+n-6: grupo TAA-experimental que recibió dieta suplementada con AGPI de las series n-3 y n-6; CC: grupo control con dieta semipurificada; Cn-3: grupo control con dieta rica en AGPI de la serie n-3; Cn-3+n-6: grupo control con dieta rica en AGPI de las series n-3 y n-6. ^a: significación vs grupo C; ^b:significación vs grupo TAA; ^c:significación entre grupos TAA-experimentales y sus respectivos grupos controles; ^d:significativo vs grupo TC; ^e:significativo vs grupo Tn-3. 1:P<0.001; 2:P<0,01; 3:P<0,05.

Debido a las alteraciones en el metabolismo lipídico como consecuencia de la administración de TAA durante 4 meses, existió una acumulación significativa de lípidos en los hepatocitos.

Las diferencias en el n° de gotas lipídicas/hepatocito entre los grupos TAA-experimentales se debieron exclusivamente al tipo de dieta ($F=4,54$; $P<0,05$) y no estuvieron influenciadas por el tiempo de administración de éstas ($F=0,21$; $P=0,65$ ns). Igual ocurrió cuando la esteatosis se expresó como n° de gotas/área de retícula (dieta: $F=9,47$, $P<0,001$; tiempo: $F=1,89$, $P=0,18$ ns).

Finalizada la 1ª semana, el grupo TAA que recibió una dieta enriquecida con AGPI de las dos series (TAGPI n-3+n-6) fue el que presenta el mayor grado de esteatosis, incluso más que el grupo TAA al inicio de la recuperación (grupo TAA) y con diferencias frente al grupo TC. El grupo con dieta enriquecida con AGPI de la serie n-3 (TAGPI n-3), también se diferenció significativamente vs al que recibió dieta control semipurificada (TC) cuando la acumulación se expresó como n° de gotas/área reticular. Por otro lado, a la 1ª semana también encontramos diferencias entre los grupo TAA y sus respectivos controles (Tabla 6)

Tabla 6: Resumen del análisis de varianza de dos factores (dieta y tiempo) del grado de esteatosis finalizada la 1ª semana de recuperación.

Factores	N° GL/Hepatocito x100		N° GL/área retícula	
	F	P	F	P
TAA	5,52	<0,05	14,72	<0,001
Dieta	6,86	<0,01	11,48	<0,001
Interacción	1,74	ns	6,27	<0,001

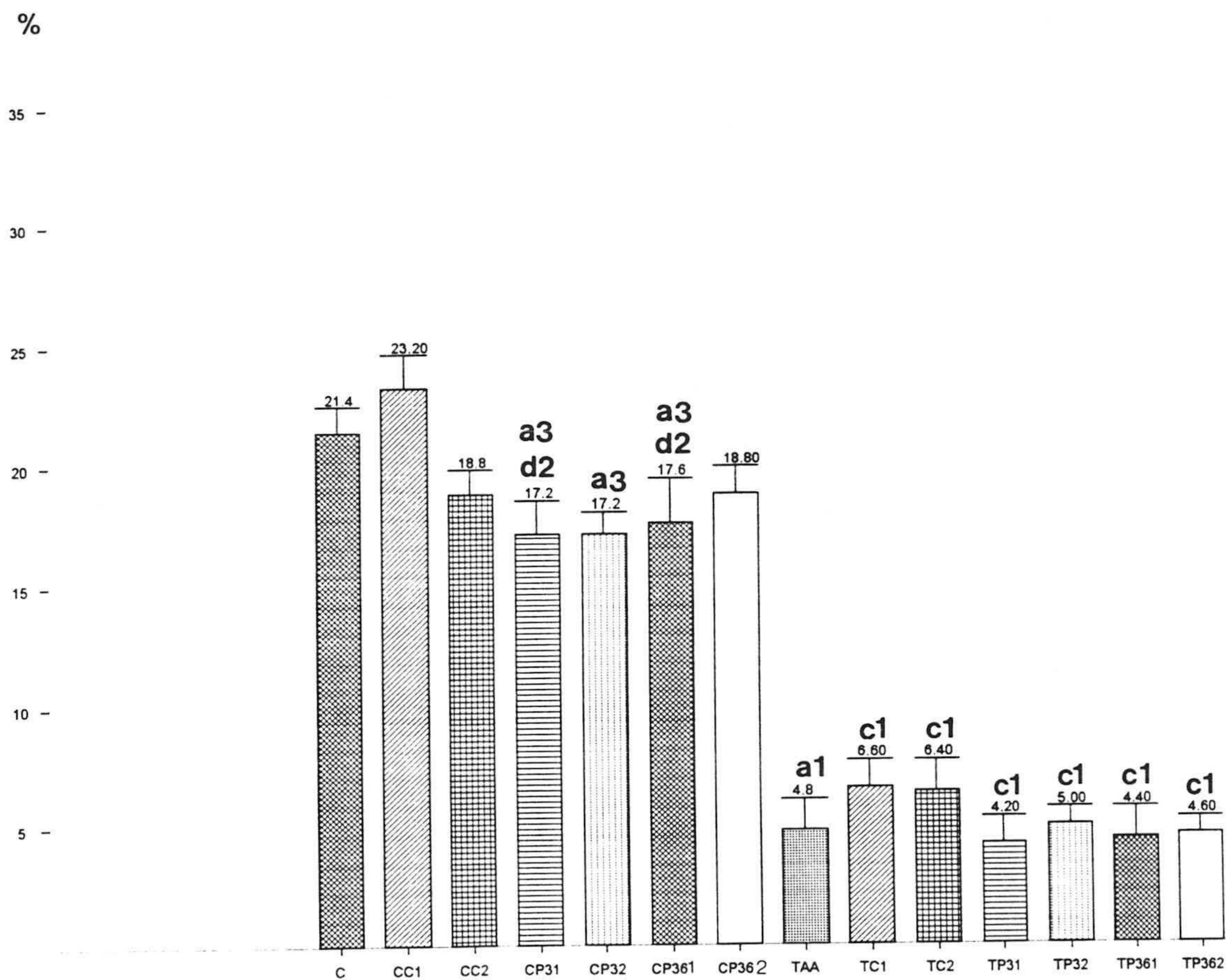
Se expresa el valor de F y P para cada factor y su interacción. N° GL: n° de gotas lipídicas.

Una vez finalizada la 2ª semana de recuperación, todos los grupos TAA-experimentales se diferenciaron frente a sus controles en el n° de gotas por área de retícula, si bien desaparecieron las diferencias debidas al tipo de dieta

BINUCLEARIDAD

Siguiendo la misma metodología que en el grado de esteatosis, analizamos las proporciones de hepatocitos mono y binucleados en los diferentes grupos (Fig 19).

Figura 19: Proporciones relativas de hepatocitos binucleados en el grupo tioacetamida, grupo control y grupos TAA-experimentales y sus controles tras la recuperación.



Se expresa la media aritmética (%). TAA: grupo tratado con tioacetamida durante 4 meses; TC: grupo TAA-experimental con dieta control semipurificada durante la recuperación; Tn-3: grupo TAA-experimental con dieta suplementada con AGPI de la serie n-3 durante la recuperación; Tn-3+n-6: grupo TAA-experimental con dieta suplementada con AGPI de las series n-3 y n-6; C: grupo control; CC: grupo control con dieta control semipurificada; Cn-3: grupo control con dieta rica en AGPI n-3; Cn-3+n-6: grupo control con dieta rica en AGPI de ambas series. ^a: significación vs grupo C; ^b: significación vs grupo TAA; ^c: significación entre grupos TAA-experimentales y sus respectivos grupos controles; ^d: significativo vs grupo TC. 1: P<0.001; 2: P<0,01; 3: P<0,05.

Tras la administración del agente hepatotóxico, la proporción de hepatocitos binucleados se redujo de forma significativa, con el correspondiente aumento de hepatocitos mono nucleados.

Ninguno de los grupos TAA-experimentales presentó valores normales de la proporción de binucleados. Al comparar el grupo control al inicio de la recuperación con los grupos controles a la 1ª semana aparecieron diferencias significativas frente a los 2 grupos con dietas suplementadas con AGPI. Estas diferencias continuaron a las dos semanas en el grupo CAGPI n-3. El análisis de dos factores (dieta y tiempo) realizado en los grupos controles, mostró diferencias entre ellos debidas a la dieta (Tabla 7).

Tabla 7: Análisis de varianza de dos vías de la proporción de hepatocitos binucleados en los grupos controles según el tipo de dieta y el tiempo de administración de éstas.

	Dieta		Tiempo	
	F	P	F	P
%Binucleados	4,54	<0,05	1,00	ns

Se muestran los valores de F y P para cada factor.

Estas diferencias aparecieron a la 1ª semana entre el grupo que tomó dieta control semipurificada (TC) y los que recibieron AGPI en la dieta (Cn-3 y Cn-3+n-6).

MORFOMETRIA

Como parámetros de los cambios ultraestructurales de los hepatocitos, medimos y comparamos el área celular, área nuclear, área nucleolar y relación área nuclear/área celular en todos los grupos (Tabla 8).

Grupo TAA

La administración de TAA provocó una disminución del área celular de los hepatocitos, un aumento de las áreas nuclear y nucleolar, así como un valor mayor de la relación área nuclear/área celular. Todas las diferencias fueron estadísticamente significativas.

Grupos TAA-experimentales

Salvo en el caso del área del nucleolo, tras la retirada del agente hepatotóxico, ninguno de los grupos TAA-experimentales logró mejorar sus valores, los cuales no se alejaron significativamente del grupo TAA.

Además, no aparecieron diferencias significativas entre ninguno de los grupos TAA ni teniendo en cuenta el tipo de dieta que recibían, ni el tiempo que duraba la recuperación (Tabla 9).

Por lo tanto, independientemente del parámetro elegido, ni la retirada del hepatotóxico, ni el tipo de dieta administrada, ni el tiempo de recuperación lograron normalizar totalmente sus valores.

Tabla 8: Valores medios del área celular, nuclear, nucleolar y relación área nuclear/área celular (N/C) en los distintos grupos.

<i>Grupo</i>	<i>Area Celular</i>	<i>Area Nuclear</i>	<i>Area Nucleolar</i>	<i>N/C x10</i>
<i>C</i>	665,91±13,33	99,07±3,50	7,79±0,41	1,49±0,43
<i>TAA</i>	468,63±6,19 ^{a1}	109,80±2,94 ^{a3}	21,78±2,39 ^{a1}	2,34±0,52 ^{a1}
<i>T1C</i>	382,91±8,48 ^{c1}	79,98±2,61	9,26±0,71 ^{b1}	2,11±0,55
<i>T1n-3</i>	406,78±8,11 ^{c1}	76,57±2,09	8,63±0,49 ^{b1}	1,90±0,42 ^{c3}
<i>T1n-3+n-6</i>	380,83±9,16 ^{c1}	78,34±2,63	8,75±0,62 ^{b1}	2,06±0,44
<i>T2C</i>	421,26±4,06	70,10±1,89 ^{c3}	7,95±0,45 ^{b1}	1,66±0,36 ^{c3}
<i>T2n-3</i>	413,10±10,04	78,07±2,64	9,14±0,72 ^{b1}	1,88±0,34 ^{c3}
<i>T2n-3+n-6</i>	352,03±7,52	70,08±1,85 ^{c3}	7,91±0,55 ^{b1}	2,02±0,39 ^{c3}
<i>C1C</i>	694,51±11,60	107,14±4,20	8,44±0,60	1,54±0,54
<i>C1n-3</i>	552,71±10,55 ^{a1d1}	88,03±3,27 ^{a3d1f3}	8,94±0,52	1,56±0,41
<i>C1n-3+n-6</i>	600,18±12,15 ^{a1d1}	103,20±2,82 ^{e1f1}	9,67±0,72	1,79±0,86 ^{a1d2e2}
<i>C2C</i>	665,52±10,52	96,94±14,94	9,09±0,51	1,47±0,44
<i>C2n-3</i>	489,52±9,83 ^{a1d1}	79,64±2,47 ^{a1d2}	7,55±0,49	1,64±0,41 ^{d3}
<i>C2n-3+n-6</i>	506,46±9,66 ^{a1d1}	79,68±2,53 ^{a1d2}	7,40±0,56	1,59±0,44

Los resultados se expresan como media aritmética (μ^2)±SEM. TAA: grupo tratado con tioacetamida durante 4 meses; C: grupo control; TC: grupo TAA-experimental que tomó dieta control semipurificada durante 1 (T1C) y 2 (T2C) semanas; Tn-3: grupo TAA-experimental que recibió dieta suplementada con AGPI de la serie n-3 durante 1 (T1n-3) y 2 (T2n-3) semanas; Tn-3+n-6: grupo TAA-experimental que recibió dieta suplementada con AGPI de las series n-3 y n-6 durante 1 (T1n-3+n-6) y 2 (T2n-3+n-6) semanas; CC: grupo control con dieta semipurificada, 1 (C1C) y 2 (C2C) semanas; Cn-3: grupo control con dieta con AGPI de la serie n-3, 1 (C1n-3) y 2 (C2n-3) semanas; Cn-3+n-6: grupo control con dieta con AGPI de las series n-3 y n-6, 1 (C1n-3+n-6) y 2 (C2n-3+n-6) semanas. ^a: significación vs grupo C; ^b:significación vs grupo TAA; ^c:significación entre grupo TAA-experimentales y sus respectivos grupos controles; ^d:significativo vs grupo CC; ^e:significativo vs grupo Cn-3; ^f: significación entre 1 y 2 semanas del mismo grupo. 1:P<0.001; 2:P<0,01; 3:P<0,05.

Tabla 9: Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de dos vías teniendo en cuenta el tipo de dieta (A) y el tiempo de recuperación (B) de los parámetros en animales TAA-experimentales.

<i>Parámetro</i>	<i>Dieta (A)</i>		<i>Tiempo (B)</i>		<i>Interacción (AxB)</i>	
	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>Area Celular</i>	1,62	ns	1,04	ns	0,90	ns
<i>Area Nuclear</i>	1,19	ns	1,78	ns	0,55	ns
<i>Area Nucleolar</i>	0,42	ns	1,16	ns	1,25	ns
<i>N/C</i>	1,23	ns	2,59	ns	1,26	ns

Se muestran los valores de F-test y P para cada factor y para la interacción entre ellos.

Grupos Controles

Entre los grupos controles encontramos diferencias en las áreas celular y nuclear debidas al tipo de dieta que recibieron y al tiempo durante el cual los animales las tomaron (Tabla 10).

Las diferencias entre la relación área nuclear/área celular, fueron provocadas por la dieta suministrada, no influenciando el periodo de administración de éstas (Tabla 10).

No se apreciaron diferencias en los valores del área del nucleolo independientemente del factor considerado (dieta y tiempo) (Tabla 10).

Tabla 10: Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (A: tipo de dieta y B: tiempo de administración de la dieta) del área celular, área nuclear, área nucleolar y relación área nuclear/área celular (N/C), en animales controles.

Parámetro	Dieta		Tiempo		Interacción (AxB)	
	F	P	F	P	F	P
Area Celular	76,53	<0,001	40,03	<0,001	3,28	<0,05
Area Nuclear	11,33	<0,001	27,75	<0,001	4,31	<0,05
N/C	5,31	<0,01	1,40	ns	3,49	<0,05

Se muestran los valores de F-test y P para cada uno de los factores y para la interacción entre ambos.

El análisis comparativo de éstos parámetros nos muestra la influencia ejercida sobre ellos por la suplementación o no de AGPI en la dieta, por el tipo de serie de AGPI empleada y por el tiempo que se administren estos ácidos grasos.

Por un lado y respecto al área celular, el valor siempre fue menor en los grupos que tomaron AGPI que en los grupos que ingirieron dieta semipurificada, tanto a la 1ª como a la 2ª semana.

El área del núcleo también fue menor que en el grupo CC, salvo en el caso del grupo control con dieta enriquecida con AGPI de las series n-3+n-6 a la 1ª semana (C1n-3+n-6).

La relación área núcleo/área celular fue mayor en el grupo C1n-3+n-6 ya que las células son más pequeñas pero los núcleos no se afectaron. Igualmente, la disminución en el tamaño celular fue más acusada que la del núcleo en el grupo C2n-3

Efecto de la recuperación

Tabla 11: Resumen del análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (A: administración de TAA y B: tipo de dieta) del área celular, área nuclear, área nucleolar y relación área nuclear/área celular, 1) tras 1 semana de recuperación y 2) tras 2 semanas de recuperación.

1) Parámetro	TAA		Dieta		Interacción	
	F	P	F	P	F	P
Area Celular	666,37	<0,001	13,61	<0,001	27,28	<0,001
Area Nuclear	0,05	ns	0,25	ns	1,28	ns
Area Nucleolar	0,01	ns	1,08	ns	1,12	ns
N/C	3,29	ns	0,80	ns	1,14	ns

2) Parámetro	TAA		Dieta		Interacción	
	F	P	F	P	F	P
Area Celular	3,34	ns	1,14	ns	2,16	ns
Area Nuclear	31,14	<0,001	5,23	<0,01	11,56	<0,01
Area Nucleolar	0,34	ns	4,23	<0,05	0,67	ns
N/C	60,44	<0,001	11,95	<0,001	4,77	<0,01

Se muestran los valores de F-test y P para los dos factores analizados y la interacción entre ellos.

A la 1ª semana de recuperación, observamos diferencias significativas en el área celular debidas tanto a la administración o no del hepatotóxico, como al tipo de dieta recibida durante dicho periodo (Tabla 11). Ninguno de los grupos llegó a alcanzar los valores de sus respectivos controles respecto a dicho parámetro (Tabla 8).

Estas diferencias en el área celular desaparecieron una vez finalizada la 2ª semana de recuperación. Sin embargo, en este tiempo encontramos significación en el área nuclear y relación N/C debidas a la TAA y al tipo de dieta (Tabla 11).

En los grupos TAA-experimentales, el área del nucleolo se normalizó siendo significativamente diferente del grupo TAA en los grupos TAA-experimentales.

DISCUSSION

La cirrosis hepática inducida por la administración crónica de tioacetamida se caracteriza por la presencia de necrosis, fibrosis, parénquima nodular y por la desorganización del patrón vascular. La administración de este hepatotóxico en dosis y periodos como los usados en este estudio causa lesiones hepáticas comparables histológica y metabólicamente a la cirrosis de etiología alcohólica en humanos^{105,143,200,201}.

*Aunque un modelo de patología experimental no puede representar de forma exacta la enfermedad en humanos, las características esenciales de la cirrosis hepática humana, es decir la aparición de nódulos parenquimáticos y septos fibrosos, están presentes en los hígados de los animales tratados con tioacetamida*¹⁵¹.

En estudios previos, establecimos que cuatro meses de administración oral de TAA era el periodo más adecuado para conseguir un modelo experimental de cirrosis comparable a la humana, en la que también se generaba un proceso de malnutrición proteico-energética asociado a la enfermedad^{63,128-130,158,159,186,187}. Así, tras este tiempo de administración, el hígado presenta parénquima nodular, necrosis hepatocelular y hepatomegalia^{185,187}. A nivel bioquímico, la actividad plasmática de la aspartato amino transferasa aumenta, los niveles de fosfolípidos y triglicéridos en plasma descienden y los de colesterol total y libre incrementan^{128,129}.

Un menor periodo de tratamiento con TAA (2 meses) no fue suficiente para establecer la transformación nodular y sólo se desarrolló un estado precirrótico, caracterizado por la formación de finos septos fibrosos que comenzaban a dividir los lóbulos, pero sin detectarse formaciones nodulares en el parénquima. Ultraestructuralmente, algunos hepatocitos comenzaron a presentar alteraciones, con núcleos que ocupaban gran extensión celular y nucleolos grandes y vacuolizados. En el citoplasma, aparecían zonas claras con ausencia de estructuras citoplasmáticas, el retículo endoplasmático rugoso solía disponerse con sus cisternas agrupadas y las mitocondrias localizadas alrededor del núcleo^{185,187}.

Tras tiempos de administración más prolongados (6 meses), la desorganización lobular fue prácticamente total, con necrosis y fibrosis intensas y una excesiva reducción del parénquima hepático. Los hígados mostraron una mayor proliferación de conductos biliares y fibras de colágeno. En las pocas zonas parenquimáticas que aún encontrábamos, los hepatocitos estaban muy alterados. Debido al carácter carcinogénico de la TAA, en este periodo las lesiones cirróticas comienzan a degenerar en un cuadro cancerígeno^{185,187}.

Una vez establecidas las condiciones más idóneas de nuestro modelo, pudimos analizar el efecto ejercido sobre la regeneración del hígado dañado por diferentes tipos de nutrientes.

Cuando las lesiones hepáticas están muy avanzadas, la reparación histológica y funcional del hígado es muy difícil. Tras el cese de la administración del agente hepatotóxico, en la rata el hígado puede recuperarse gracias a su gran capacidad de regeneración. La rapidez y el grado de recuperación dependen, además de factores intrínsecos, de otros factores, entre los cuales habría que destacar las condiciones nutricionales. Esto es debido a que normalmente, la cirrosis se presenta asociada a una malnutrición y a una deficiente utilización metabólica de nutrientes, que contribuyen a agravar la enfermedad^{20,22-25,102,141}.

En particular, la composición grasa de la dieta puede jugar un importante papel en esta recuperación, debido a las grandes alteraciones en el metabolismo lipídico que ocurren en la cirrosis hepática. Así, se han descrito dislipoproteinemias, alteraciones de los niveles de carnitina, cambios en los aminoácidos séricos y reducción en la actividad de la lipoproteína-lipasa^{63,64,109,134}. Estos cambios, junto a la reducción en la absorción lipídica causada por la colestasis y la linfangiectasia asociadas, contribuyen a una deficiente utilización de los lípidos exógenos^{109,134,136}.

En pacientes cirróticos, los niveles plasmáticos de fosfolípidos, ésteres de colesterol, triacilglicéridos y ácidos grasos poliinsaturados se reducen^{22-25,64,134,140,200-202}. En nuestro modelo experimental, también encontramos una reducción significativa de triglicéridos y fosfolípidos plasmáticos en los animales tratados con tioacetamida. Los ácidos grasos totales descienden en plasma, con un incremento en los porcentajes de saturados y monoinsaturados

y una caída de poliinsaturados de cadena larga. Además, los porcentajes de ácido araquidónico (AA) y ácido docosahexaenoico (DHA) descienden tanto en los lípidos plasmáticos como en los fosfolípidos de microsomas hepáticos. Estas alteraciones pueden deberse a la reducción en la salida de lipoproteínas VLDL del hígado, que provocaría el descenso de triglicéridos séricos que encontramos en nuestros animales tras la administración del tóxico ^{128,129}.

Los ácidos grasos poliinsaturados son componentes esenciales de las membranas celulares y mantienen la fluidez y función de éstas. Además, son los precursores de los eicosanoides, compuestos de gran importancia biológica^{23,24}. Los AGPI son sintetizados en su mayoría en el hígado a partir de ácidos grasos esenciales. Su biosíntesis precisa un correcto funcionamiento del hígado, un estatus nutricional adecuado y una ingesta suficiente de ácidos grasos esenciales. En nuestro modelo experimental, la síntesis de estos ácidos grasos de las series n-3 y n-6 está severamente afectada, de modo que los porcentajes relativos de éstos disminuyen significativamente en fosfolípidos y ésteres de colesterol en plasma y microsomas hepáticos. Concretamente, el DHA es el que más disminuye tanto en plasma como en los lípidos de las membranas de eritrocitos y en los fosfolípidos de microsomas hepáticos. La actividad de la Δ^6 ácido graso desaturasa podría ser la más afectada por el tratamiento con TAA ¹²⁹.

Debido al importante papel de los ácidos grasos y de sus derivados poliinsaturados de cadena larga y a que estos compuestos están disminuídos en plasma, indicando un estado de deficiencia en cirrosis, analizamos los efectos sobre la enfermedad de dietas enriquecidas con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de las series n-3 y n-6. Con este propósito, estudiamos las alteraciones histológicas y celulares que aparecían en la cirrosis hepática inducida por TAA, así como la hepatomegalia, la fibrosis, la acumulación grasa, la proporción de hepatocitos binucleados y una serie de parámetros morfométricos de los hepatocitos y analizamos el efecto de distintas dietas sobre cada una de estas alteraciones, tras una y dos semanas de retirada del agente hepatotóxico.

Una de las manifestaciones de la toxicidad de la tioacetamida es un menor peso de los animales y un mayor peso hepático, lo que conduce a un aumento significativo de la relación relativa del peso hepático respecto al peso del animal. Este hecho refleja el desarrollo de hipertrofia hepática y hepatomegalia, debido al incremento del tejido no-parenquimático, la mayoría del cual es elementos del tejido conectivo y lumen vascular ¹⁵¹.

En la recuperación, tras el cese de administración del tóxico, los pesos tienden a normalizarse. La recuperación dependería en alguna medida de las condiciones nutricionales. De hecho, mientras que en los animales que recibían una dieta control semipurificada, con un contenido elevado de ácidos grasos monoinsaturados y una relación equilibrada de ácidos grasos esenciales linoleico y α -linolénico, observamos una mejora, sin embargo el suplemento de AGPI condujo a un aumento del peso hepático, reflejada en la permanencia de la hepatomegalia en estos animales. El aumento de grasa que se observa en los hígados de estos grupos junto al aumento ya producido tras la administración de la TAA, explicaría este efecto.

Al igual que en pacientes cirróticos, la hepatomegalía producida por la TAA también queda reflejada en la acumulación de tejido fibroso ocupando gran parte del parénquima hepático. El incremento del volumen específico de tejido no-parenquimático ha sido considerado como la representación morfométrica del desarrollo de fibrosis hepática ¹⁵¹.

El aumento de constituyentes de la matriz extracelular va asociado a la activación y proliferación de las células estrelladas, así como a su transformación en células con características intermedias entre ellas y fibroblastos, denominadas miofibroblastos^{69,118}. En los animales tratados con TAA observamos estos tipos celulares localizados preferentemente en zonas de fibrosis y en los septos fibrosos que rodean a los nódulos parenquimáticos.

El proceso de fibrosis comienza a partir del daño crónico producido en los hepatocitos, seguido de la activación y proliferación de células de Kupffer y otros macrófagos como respuesta al daño celular. Posteriormente, las células estrelladas se activan en un proceso dividido en dos etapas: iniciación, en la que estas células aumentan de tamaño y número respondiendo a factores producidos por las células Kupffer; y perpetuación, durante

la cual continua la respuesta a los factores de iniciación. El proceso conlleva un cambio en el medio extracelular por la progresiva acumulación de tejido fibroso, que a su vez promueve de nuevo la activación celular ⁶⁹.

Como consecuencia del acúmulo de colágeno en el espacio de Disse y en los sinusoides hepáticos, la resistencia vascular aumenta, apareciendo la hipertensión portal y los cambios hemodinámicos característicos de la enfermedad hepática^{91,164}. La arquitectura vascular del hígado se altera y se desarrollan los nódulos regenerativos. La fibrosis impide el rápido y correcto intercambio de sustancias entre el espacio sinusoidal y los hepatocitos. Por tanto, durante todo el proceso, el daño a los hepatocitos es permanente y existen continuas interacciones entre éstos y las células sinusoidales.

En los animales alimentados con dieta control semipurificada tras la administración de TAA, la fuerte disminución en el grado de fibrosis evidencia una mejora estructural de los hígados cirróticos. Sin embargo, esta reparación no es tan patente cuando se suplementan las dietas con AGPI, sobre todo cuando se utilizó una mezcla de ácidos grasos de las series n-3 y n-6⁶². Este resultado podría deberse a la mayor susceptibilidad a la peroxidación en las dietas enriquecidas con AGPI.

El hígado tiene una gran capacidad de regeneración. Los hepatocitos supervivientes al daño son inducidos a dividirse para contrarrestar las pérdidas celulares causadas por la administración de hepatotóxicos^{20,47}. De esta forma, mediante los mecanismos de regeneración se intenta restaurar el número inicial de células y reestablecer la función hepática ^{47,142,172,180}.

En el hígado es posible contabilizar hasta un 25% de hepatocitos binucleados. La proporción de células hepáticas binucleadas depende de la especie, edad, crecimiento, regeneración como respuesta a carcinogénicos genotóxicos o no-genotóxicos y neoplasia. Jack et al.⁹⁷, han descrito la importancia de la hipertrofia de hepatocitos en el desarrollo de lesiones preneoplásticas. Cambios en las proporciones de hepatocitos mono y binucleados pueden reflejar la hipertrofia celular. Una reducción de la binuclearidad influencia la ploidía total nuclear y celular. Estos cambios se relacionan con la regulación del ciclo mitótico y en consecuencia, afectan al crecimiento celular ^{97,124}.

Díez-Fernández et al. (1993)⁵⁰, han demostrado relaciones entre la ploidía y parámetros de daño hepático durante procesos de necrosis y regeneración inducidos por la administración intraperitoneal de TAA. Nuestros resultados confirman una reducción de la binuclearidad tras la administración oral de TAA. Esta disminución puede deberse o bien a una menor formación de hepatocitos binucleados o a la desaparición de los existentes.

Varios autores han descrito que ciertas dietas son capaces de promover o favorecer la regeneración de hígados dañados e incrementar la población de hepatocitos binucleados^{144,186,187}. La cetógenesis hepática es un proceso fisiológico importante para la regeneración hepática. La energía producida en la mitocondria por la oxidación y la cetogénesis utilizando ácidos grasos libres es necesaria para la síntesis de ADN, por lo cual se ha relacionado el debilitamiento de la regeneración en cirrosis con la reducción de ácidos grasos libres y por tanto de la cetogénesis. En nuestro estudio, ninguna de las dietas utilizadas ayudó a reestablecer los valores normales de este parámetro. Por otro lado, en los grupos controles, las dietas enriquecidas con AGPI provocaron una disminución en la proporción de células binucleadas, por lo que podríamos pensar en posibles alteraciones a nivel de la ploidía, ciclo mitótico y por tanto en el crecimiento celular. Slater (1991) describe que la peroxidación lipídica inhibe la síntesis de ADN y ARN y podría considerarse regulador de la división celular. Durante los procesos de mitosis el material genético está más expuesto y es más susceptible al ataque oxidativo.

Otra de las consecuencias de la agresión provocada por la administración de TAA es la alteración cualitativa y cuantitativa de los lípidos tisulares, particularmente del hígado y del plasma. Esta variación viene dada por las alteraciones en el metabolismo de los lípidos y por los daños producidos sobre las estructuras celulares que llevan a cabo la síntesis y secreción de lipoproteínas, así como por la acción sobre las proteínas enzimáticas que intervienen en los mecanismos de transformación plasmática y captación de lipoproteínas por el hígado. Estas alteraciones afectan la lipogénesis, la biosíntesis hepática de fosfolípidos y la composición y funcionalidad de orgánulos celulares. Debido a estas alteraciones, se establece la esteatosis hepática y los hepatocitos presentan una gran acumulación lipídica⁶⁵. La naturaleza lipídica de estas inclusiones se ha relacionado con el incremento de triglicéridos y ésteres de colesterol intrahepáticos detectados en los análisis bioquímicos.

Las dietas enriquecidas con AGPI, especialmente de la serie n-3, disminuyen la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos e incrementan la β -oxidación peroxisomal y mitocondrial en los seres humanos y en animales de experimentación^{85,94,194}. Por otro lado, Lieber et al. (1994)¹¹³, utilizando dietas con fosfatidilcolina ricas en AGPI de las series n-3 y n-6, han descrito que se promueve la movilización de lípidos en cirrosis humana. Sin embargo, las dietas usadas en nuestro estudio enriquecidas con AGPI que suministran el 10% de los lípidos totales de la dieta, equivalente al 2% de la energía total ingerida, no disminuyen la acumulación lipídica en los hepatocitos, sobre todo en las dietas enriquecidas con poliinsaturados de las dos series, a pesar de que la fuente utilizada para la dieta enriquecida con AGPI de ambas series (n-3+n-6) es muy rica en fosfatidilcolina. Este efecto contradictorio puede deberse a la mayor oxidación de estos AGPI.

Para Herzberg (1991)⁸⁵, las dietas ricas en poliinsaturados de la serie n-3 decrecen la síntesis y/o secreción de VLDL. Este último efecto junto con el hecho de que en cirrosis inducida por TAA la formación y liberación de lipoproteínas se altera, podría ser responsable de la acumulación lipídica que observamos en los animales enfermos alimentados con estas dietas⁶².

De hecho, en los animales sanos que tomaron las dietas enriquecidas con ácidos grasos insaturados, aunque la acumulación no alcanza valores tan altos como en los enfermos, sí observamos un aumento de gotas grasas intrahepatocíticas, con una destacada variabilidad zonal. La variabilidad es también grande entre hepatocitos e individuos. Las dietas ricas en poliinsaturados de ambas series aumentaron el número de inclusiones lipídicas en determinadas zonas y hepatocitos y las ricas en AGPI de la serie n-3 incrementaron de forma notable el tamaño de las gotas. Por otro lado, también se debe tener en cuenta que la dieta semipurificada es rica en grasa (10%) y quizás resulte cuantitativamente excesiva para la rata, ya que la dieta habitual para estos animales contiene un 5% de lípidos.

En enfermedades hepáticas crónicas, como es el caso de la cirrosis y en carcinoma hepatocelular el incremento de células poliploídes se acompaña de un aumento del tamaño nuclear. Es conocido a su vez el efecto de la TAA sobre el metabolismo de nucleoproteínas en las células del parénquima hepático. El tamaño de los núcleos y nucleolos en estas células aumenta junto al contenido de ARN. Sin embargo el contenido de ARN citoplasmático o no se altera o incluso disminuye. Así, se ha propuesto que la acumulación de ARN en el núcleo es causado por interferencias en el transporte de éste hacia el citoplasma^{3,4,31,107,171,177}.

Nuestros resultados reflejan un aumento del área nuclear y nucleolar de los hepatocitos de hígados cirróticos, mientras que el citoplasma es menor. Por tanto, la TAA afecta al metabolismo o transporte de nucleoproteínas desde el núcleo al citoplasma de las células parenquimáticas, como anteriormente hemos señalado.

Tras la retirada del agente hepatotóxico, salvo en el caso del nucleolo, ninguno de los grupo TAA-experimentales mostró una recuperación en los valores de los parámetros morfométricos alterados por la administración previa de TAA.

A la vista de nuestros resultados, las dietas enriquecidas con ácidos grasos poliinsaturados no ayudan a la recuperación histológica de las alteraciones producidas en la cirrosis inducida por la administración oral de TAA, sobre todo cuando se utilizan AGPI de cadena larga tanto de la serie n-3 como de la serie n-6.

Ha sido descrita una relación entre la formación de radicales libres y las alteraciones hepáticas en enfermedades de varias etiologías, como es el casos de cirrosis alcohólica e inducida por algunos agentes químicos^{39,58,157,183}.

Tanto el alcohol en concentraciones elevadas como numerosos hepatotóxicos (entre los que se encuentra la tioacetamida) son metabolizados en el hígado por el sistema oxidativo microsomal citocromo P₄₅₀ y lleva a la formación de productos que, a su vez dañan los sistemas de defensa antioxidante o forman radicales libres. Recientemente, se ha señalado una asociación entre la formación de estos productos tóxicos y la fibrogénesis hepática^{39,157,183}. *Maher et al. (1994)*¹¹⁶ *han conseguido activar lipocitos en cultivos celulares y*

aumentar la producción de colágeno mediante el aporte a éstos de aldehídos procedentes del metabolismo del alcohol.

La necrosis celular se define como el daño que causa de forma irreversible pérdida de funciones metabólicas y de la integridad estructural de la membrana plasmática (citólisis) y que ocurren como consecuencia de cambios y/o daños en el microambiente de la célula. Entre los mecanismos que conducen a la necrosis encontramos el estrés oxidativo resultado del desequilibrio entre fuerzas prooxidativas y defensas antioxidantes, favoreciéndose las primeras y también encontramos las disfunciones mitocondriales^{58,157}. Un estrés oxidativo severo conduce a necrosis, mientras que un estrés subletal tiene importantes implicaciones en la función celular y conduce a alteraciones patofisiológicas que incluyen modificaciones del material genético afectando a la transcripción y expresión génica, a la renovación de receptores de membrana y a la expresión y distribución de proteínas de membrana¹⁵⁷.

Las disfunciones a nivel mitocondrial han sido consideradas claves para la necrosis. El daño específico a la membrana interna mitocondrial integra una variedad de mecanismos, entre los que se incluyen la acumulación de ácidos grasos que conlleva la aparición de canales en esta membrana, incrementándose su permeabilidad a compuestos de bajo peso molecular durante estados fisiológicos y patológicos¹⁵⁷.

El daño no-específico a la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial es causado por la peroxidación lipídica. La producción mitocondrial de anión superóxido (O_2^-) incrementa en determinadas condiciones patológicas, como por ejemplo en la enfermedad hepática alcohólica^{39,183} y en situaciones de grandes variaciones en la composición lipídica y/o proteica de las membranas⁵⁸.

Algunos radicales libres reaccionan con los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas y forman compuestos altamente reactivos, como radicales AGPI, hidroperóxidos y peróxidos lipídicos. Estos compuestos a su vez reaccionan con otros AGPI y propagan la formación adicional de nuevos radicales, en un proceso conocido como peroxidación lipídica. De esta forma, el proceso se propaga por toda la célula llevando a la ruptura de lípidos de membrana y en último término a daño celular, fibrosis y necrosis^{39,58,152,157,183}.

Las consecuencias de una sobrecarga en radicales libres o peróxidos varía de un tejido a otro y en función de determinados factores: contenido de AGPI libres o integrados en la membrana, organización del sistema defensivo antioxidante, presión parcial de oxígeno y vitalidad de renovación celular ^{58,152}.

El sistema defensivo antioxidante de la célula (GSH) aumenta por la administración de TAA, pero su transporte desde el citoplasma a la mitocondria está inhibido como consecuencia del estrés oxidativo. Además de este sistema, compuestos de bajo peso molecular actúan como captadores de radicales libres, previniendo la peroxidación y el daño. El α -tocoferol se considera uno de los más importantes, ya que al ser liposoluble puede distribuirse entre los lípidos de membrana y protegerla más eficazmente ^{14,58,152,157}.

Los lípidos de la dieta pueden, por un lado, ser determinantes en el daño hepático y por otro, tener efectos farmacológicos además de ser una fuente de calorías. En los últimos años, se han llevado a cabo estudios sobre las diferencias en la patología hepática con diferentes dietas grasas ^{32,138,139}.

Nanji et al (1995)¹³⁹ observan que las grasas saturadas modulan la severidad de alteraciones hepáticas producidas por el alcohol en ratas e influyen muchos procesos metabólicos, como la síntesis de eicosanoides y por tanto, la inflamación hepática.

Anteriormente, estos autores utilizaron dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados y concluyen que éstos potencian el daño alcohólico y en este caso, los animales desarrollan hígado graso, necrosis, inflamación y fibrosis ¹³⁸.

En nuestro caso, la peroxidación lipídica puede aumentar directamente por la administración de AGPI e indirectamente por la administración de TAA a través de la alteración de los sistemas enzimáticos de defensa antioxidante²⁸, por lo que las defensas antioxidantes están doblemente afectadas.

Así, numerosos autores han indicado la necesidad de incrementar el aporte de antioxidantes en el caso de utilizar dietas suplementadas con AGPI^{33,58,131,138,139,161}. Por otro lado, actualmente se ha descrito la necesidad de tiempos prolongados (siempre mayores que dos semanas) para que la suplementación de vitamina E incremente los niveles de antioxidantes, incluso cuando el estímulo peroxidativo es discontinuo¹³⁹.

Hemos encontrado mucha controversia en la literatura sobre posibles diferencias de la susceptibilidad oxidativa de distintas fuentes de AGPI de distintas series. En este sentido, se ha recalado que junto a la diferente inducción del citocromo P₄₅₀ según los lípidos de la dieta, la formación de radicales lipídicos en respuesta al estrés oxidativo (en nuestro caso inducido por la TAA) se ve influenciada por la composición de los lípidos celulares¹³⁹; por lo tanto deben existir diferencias entre los AGPI de la serie n-3 y n-6.

Para algunos autores, las dietas ricas en poliinsaturados de la serie n-3 favorecen el desarrollo de hígados grasos, inducen factores fibrogénicos y encuentran una correlación positiva entre los cambios bioquímicos de microsomas hepáticos y la inducción de patología hepática. Además, Morimoto et al. (1994)¹³¹, describen un aumento de los procesos inflamatorios en animales alimentados con alcohol y aceite de pescado rico en AGPI n-3. Cuando se usan estas dietas los requerimientos de vitamina E aumentan con el objeto de mantener el estatus apropiado de antioxidantes y prevenir la peroxidación^{33,161}. Para estos autores, los procesos de peroxidación aumentan con el contenido de AGPI de la serie n-3 en los fosfolípidos tisulares comparado con los n-6.

Sin embargo, otros investigadores mantienen que la alteración de la composición de ácidos grasos en las membranas celulares debido a los n-3 pueden aumentar la eficacia del sistema defensivo antioxidante a nivel molecular y prevenir la susceptibilidad de las membranas a la peroxidación, siempre y cuando exista un aporte adecuado de antioxidantes^{58,152,161,188}. Los ácidos grasos de la serie n-3 inhiben la formación de los eicosanoides que se originan a partir del ácido araquidónico. De esta forma, los eicosanoides que inducen la inflamación hepática (LTB₄ y PGE₂) disminuyen con las dietas n-3^{7,19,58,86,152,161}.

En nuestro estudio, con la dieta que contenía mayor riqueza de AGPI de la serie n-3 las alteraciones hepáticas observadas durante el periodo de recuperación, son menores que con la enriquecida con las dos series. Apoyándonos en este resultado y en las sugerencias de otros autores, podemos pensar que, en el caso de las dietas ricas en AGPI de las series n-3 y n-6, al proceso oxidativo inducido por la mayor disponibilidad celular de éstos, habría que sumar el efecto proinflamatorio de los AGPI de la serie n-6.

Por otro lado, al analizar los resultados obtenidos en los grupos controles, encontramos muchas diferencias entre ellos. Centrándonos en la segunda semana, los hepatocitos de animales que recibieron AGPI en la dieta presentan menores áreas celulares y nucleares que los de grupos controles con dieta semipurificada. La relación área nucleolar/área celular es mayor en grupos controles que reciben poliinsaturados, lo que puede ser explicado por el hecho de que, aunque presenten núcleos más pequeños, es el área total de la célula la más afectada.

La influencia positiva de la dieta semipurificada puede deberse al contenido reducido de ácidos grasos esenciales de esta dieta junto al efecto antioxidante de los ácidos grasos monoinsaturados que constituyen un 50% de los lípidos totales de la dieta.

Aunque la interpretación de estos resultados es difícil, sí podemos concluir que existe una influencia a nivel celular ejercida por la suplementación de ácidos grasos poliinsaturados, por el tipo de serie empleada y por el tiempo que se suministren dichas dietas.

La acumulación grasa que encontramos en estos animales, podría de alguna manera desplazar el funcionamiento del hepatocito, más que hacia un desarrollo celular normal, hacia la síntesis de proteínas y apoproteínas que les permitiera "eliminar" la cantidad de lípidos acumulados intracelularmente.

A pesar de las anormalidades detectadas en el tamaño del hepatocito y de su núcleo, también hay que destacar en ellos su retículo endoplasmático rugoso desarrollado con numerosas cisternas y la existencia de aparatos de Golgi patentes. Además, recordar que el nucleolo no se encuentra afectado. Es decir, la maquinaria precisa para la síntesis de proteínas no se encuentra en apariencia alterada, sobre todo en los hepatocitos con menor acumulación grasa.

Sí estas alteraciones fueran indicativas de una correcta síntesis proteica y sí, por otro lado, éstas no son utilizadas para un apreciable desarrollo a nivel estructural, quizás podría ser explicado como una producción forzada de lipoproteínas (VLDL) con objeto de liberar una cantidad adecuada de lípidos hacia el plasma.

El hecho de que en las ratas controles que recibieron dietas enriquecidas en AGPI, los índices plasmáticos de ácidos poliinsaturados de cadena larga de las series n-3 y n-6 no muestren diferencias significativas frente al grupo con dieta semipurificada, y que incluso el grupo que tomó sólo de la serie n-3 presente índices más elevados de AGPI de la serie n-3, podría significar una normal circulación de ácidos grasos exportados desde el hígado ¹²⁸.

Por último, hay que tener en cuenta que los componentes de la serie n-6 son mayoritarios en las membranas de las células de animales terrestres y es posible que el aumento de la ingesta de ácidos grasos de la serie n-3, que implica un cambio en la composición de las membranas, se refleje a su vez a nivel de desarrollo o funcionalidad celular ^{149,174}.

En conclusión, la menor reparación histológica de los hígados con cirrosis producida por la administración de TAA, puede ser argumentada por el acúmulo de grasa en las células hepáticas. Incluso bajo condiciones no patológicas, el suplemento en la dieta de cantidades de AGPI usadas en este estudio, sobrepasa el nivel óptimo para un metabolismo lipídico normal.

Por una parte, sería de interés estudiar la utilización de dietas con cantidades más apropiadas de poliinsaturados de ambas series y mayor aporte de antioxidantes en estados de cirrosis, con el objetivo de normalizar los niveles de ácidos grasos en plasma y permitir una mejor recuperación estructural del hígado. Además, sería importante utilizar AGPI de diferentes fuentes ya que, dependiendo de éstas la susceptibilidad oxidativa puede ser mayor o menor y algunas (como es el caso de los fosfolípidos) contribuyen a la movilización de lípidos intracelulares. Así, se podrían aprovechar las numerosas propiedades y efectos positivos de estos ácidos grasos esenciales en otras patologías y en la prevención de las mismas.

CONCLUSIONES

1ª *La cirrosis hepática inducida por la administración oral de tioacetamida en dosis de 300 mg/l en el agua de bebida durante un periodo de 4 meses, se caracteriza por la aparición de cambios en la morfología hepática, como la presencia de necrosis, fibrosis, la transformación nodular del parénquima hepático y la desorganización del patrón vascular.*

2ª *La administración de tioacetamida en dosis y periodo como los utilizados en este estudio, causa lesiones hepáticas comparables histológica y metabólicamente a la cirrosis hepática de etiología alcohólica en humanos y un proceso de malnutrición proteico-energética asociado a la enfermedad. Las características esenciales de la cirrosis hepática en humanos, es decir la aparición de nódulos parenquimáticos y septos fibrosos, están presentes en nuestros animales experimentales.*

3ª *La intoxicación crónica de TAA provoca el desarrollo de hipertrofia hepática, una reducción de la binuclearidad de células del parénquima y el establecimiento de esteatosis hepática debido a variaciones en la concentración lipídica. Así mismo, como consecuencia de la administración crónica del hepatotóxico, aparecen alteraciones en la ultraestructura de los hepatocitos: desorganización del retículo endoplasmático rugoso, aumento significativo del tamaño nuclear y nucleolar y disminución del tamaño de los hepatocitos.*

4ª *El cese de la administración del tóxico es, en parte, responsable de la recuperación hepática. No obstante, el tipo de dieta suministrada durante este periodo tiene influencia en la recuperación histológica y funcional del hígado dañado por la administración de tioacetamida.*

5ª *En los animales con cirrosis hepática experimental que recibieron la dieta semipurificada rica en grasa y con una proporción elevada de ácidos grasos monoinsaturados, observamos una mejora histológica del hígado dañado.*

6ª *Las dietas enriquecidas con ácidos grasos poliinsaturados no ayudan a la reparación histológica de las alteraciones inducidas por la administración del agente hepatotóxico, sobre todo cuando se utilizaron AGPI de las series n-3 y n-6. Este hecho puede ser argumentado por el acúmulo de grasa en las células hepáticas y la mayor susceptibilidad de las membranas celulares a la peroxidación lipídica.*

7ª *Por otro lado, en el caso de la dieta rica en AGPI de la serie n-3 y n-6, el proceso oxidativo inducido por la mayor disponibilidad celular de poliinsaturados, junto al efecto proinflamatorio de los AGPI de la serie n-6, serían responsables de que las alteraciones observadas durante la recuperación sean mayores que utilizando sólo AGPI de la serie n-3.*

8ª *En los animales sanos, la ingesta de dietas enriquecidas con ácidos grasos poliinsaturados conduce a cambios histológicos en el hígado, sobre todo respecto a la acumulación grasa, la binuclearidad y la morfometría del hepatocito.*

9ª *Teniendo en cuenta la esencialidad y la importancia funcional de los AGPI, su deficiencia en la cirrosis y los efectos positivos de estos ácidos grasos en otras patologías, sería conveniente evaluar los efectos de dietas con cantidades más apropiadas de poliinsaturados de ambas series y un mayor aporte de antioxidantes en estados de cirrosis, así como analizar la influencia de estos ácidos grasos obtenidos de diferentes fuentes.*

BIBLIOGRAFIA

1. Adams HR, Busch H. Effect of thioacetamide on incorporation of orotic acid-2-C¹⁴ into RNA fractions in liver. *Cancer Res* 23: 576-582, 1963.
2. Al-Nasser IA. Effect of thioacetamide on the ability of liver mitochondria to retain calcium. *Med Sci Res* 21: 485-487, 1993.
3. Andersen MW, Ballal NR, Busch H. Nucleoli of thioacetamide-treated liver as a model for studying regulation of preribosomal RNA synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 78: 129-135, 1977.
4. Anghileri LJ, Heidbreder M, Weiler G, Dermietzel R. Hepatocarcinogenesis by thioacetamide: correlations of histological and biochemical changes, and possible role of cell injury. *Exp Cell Biol* 45: 34-47, 1977.
5. Arias MI, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz DA, eds. *The liver: biology and pathobiology*. 3^a Edit. Raven Press Ltd, New York 1994.
6. Ashworth CT, Werner JD, Wrightsman FJ. Effect of thioacetamide-induced sublethal hepatic cell injury on protein synthesis. *PSEBN* 119: 495-501, 1965.
7. Ayala A, Chaudry IH. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid modulation of immune cell function before or after trauma. *Nutrition* 11: 1-11, 1995.
8. Bachem MG, Meyer D, Riess U, Melchior R, Sell KM, Bittinger A, Gressner AM. Paracrine stimulation of fat storing cells via soluble mediators produced by myofibroblast-like cells. *Kupffer Cell Found* 3: 164-170, 1991.
9. Bachem MG, Meyer D, Schafer W, Riess U, Melchior R, Sell KM, , Gressner AM. The response of rat liver perisinusoidal lipocytes to polypeptide growth regulator changes with their transdifferentiation into myofibroblast-like cells in culture. *J Hepatol* 18: 40-52, 1993.
10. Ballabriga A. Essential fatty acids and human tissue composition. An overview. *Acta Paediatr Suppl* 402: 63-68, 1994.
11. Becker FF. Thioacetamide hepatocarcinogenesis. *JNCI* 71: 553-558, 1983.
12. Bennoun M, Rissel M, Engelhardt N, Guillouzo A, Briand P, Weber-Benarous A. Oval cell proliferation in early stages of hepatocarcinogenesis in Simian Virus 40 Large T transgenic mice. *Am J Pathol* 143: 1326-1336, 1993.
13. Belyaev ND, Budker VG, Deriy LV, Smolenskaya IA, Subbotin VM. Liver plasma membrana-associated fibroblast growth stimulatory and inhibitory activities during experimental cirrhosis. *Hepatology* 15: 525-531, 1992.



14. Biasi F, Albano E, Chiarpotto E, Corongiu FP, Pronzato MA, Marinari UM, Parola M, Dianzani MU, Poli G. *In vivo and in vitro evidence concerning the role of lipid peroxidation in the mechanism of hepatocyte death due to carbon tetrachloride. Cell Biochemistry and Function 9: 111-118, 1991.*
15. Bioulac-Sage P, Dubuisson L, Le Bail B, Bernard P, Carles J, Saric J, Balabaud C. *Ultrastructural evidence for sinusoidal endothelial and perisinusoidal cell regeneration in experimental models in the rat and in human liver disease. Kupffer Cell Found 4: 564-567, 1993.*
16. Blumrich M, Pack R, Oesch F, Petzinger E, Steinberg P. *Deficiency of bile acid transport and synthesis in oval cells from carcinogen-fed rats. Hepatology 19: 722-727, 1994.*
17. Bozom A, Blendis LM. *The nitric oxide hypothesis and the hyperdynamic circulation in cirrhosis. Hepatology 20: 1343-1350, 1994.*
18. Bouziane M, Prost J, Belleville J. *Dietary protein deficiency affects n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid hepatic storage and very long density lipoprotein transport in rats on different diets. Lipids 29: 265-272, 1994.*
19. Broughton KS, Whelan J, Hardardottir I, Kinsella JE. *Effect of increasing the dietary (n-3) to (n-6) polyunsaturated fatty acid ratio on murine liver and peritoneal cell fatty acids and eicosanoid formation. J Nutr 121: 155-164, 1991.*
20. Bucher NLR. *Liver regeneration: an overview. J Gastroenterol Hepatol 6: 615-624, 1991.*
21. Burr GO, Burr MM. *A new deficiency disease produced by rigid exclusion of fat from the diet. J Biol Chem 82: 345-367, 1929.*
22. Cabré E, Periago JL, Abad-Lacruz A, Gil A, González-Huix F, Sánchez de Medina F, Gassull MA. *Polyunsaturated fatty acid deficiency in liver cirrhosis: its relation to associated protein-energy malnutrition (preliminary report). Am J Gastroenterol 83: 712-717, 1988.*
23. Cabré E, Periago JL, Abad-Lacruz A, González-Huix F, González J, Esteve-Comas M, Fernández-Bañares F, Planas R, Gil A, Sánchez de Medina F, Gassull MA. *Plasma fatty acid profile in advanced cirrhosis: unsaturation deficit of lipid fractions. Am J Gastroenterol 85: 1597-1604, 1990.*
24. Cabré E, Periago JL, González J, González-Huix F, Abad-Lacruz A, Gil A, Sánchez de Medina F, Esteve-Comas M, Fernández-Bañares F, Planas R, Gassull MA. *Plasma polyunsaturated fatty acids in liver cirrhosis with or without chronic hepatic encephalopathy: a preliminary study. J Parent Enteral Nutr 16: 359-363, 1992.*
25. Cabré E, Gassull MA. *Nutritional aspects of chronic liver disease. Clin Nutr 12: S52-S63, 1993.*

26. Cascales M, Feijóo B, Cerdán S, Cascales C, Santos-Ruiz A. The effect of thioacetamide on urea cycle enzymes of rat liver. *J Clin Chem Clin Biochem* 17: 129-132, 1979.
27. Cascales M, Robles-Chillida EM, Feijóo B, Cerdán S, Martín-Sanz P, Santos-Ruiz A. Alteraciones producidas por la tioacetamida sobre las aminotransferasas GOT y GPT y la glutamato deshidrogenasa en hígado de rata. Estudio ultraestructural. *Rev Esp Fisiol* 38: 105-112, 1982.
28. Cascales M, Martín-Sanz P, Cracieunescu DG, Mayo I, Aguilar A, Robles-Chillida EM, Cascales C. Alterations in hepatic peroxidation mechanisms in thioacetamide-induced tumors in rats. Effect of a rhodium (III) complex. *Carcinogenesis* 12: 233-240, 1991.
29. Cascales M, Martín-Sanz P, Alvarez A, Sánchez-Pérez M, Díez Fernández C, Boscá L. Isoenzymes of carbohydrate metabolism in primary cultures of hepatocytes from thioacetamide-induced rat liver necrosis: responses to growth factors. *Hepatology* 16: 232-240, 1992.
30. Caturelli E, Costarelli L, Giordano M, Fusilli S, Squillante MM, Pompili M, Rapaccini GL, Livraghi T. Hypocholeic lesions in fatty liver. Quantitative study by histomorphometry. *Gastroenterology* 100: 1678-1682, 1991.
31. Cerdán S, Cascales M, Santos-Ruiz A. Effect of thioacetamide on the pentose phosphate pathway and other NADP-linked enzymes of rat liver cytosol. *Mol Pharmacol* 19: 451-455, 1980.
32. Cha Y-S, Sachan DS. Opposite effects of dietary saturated and unsaturated fatty acids on ethanol-pharmacokinetics, triglycerides and carnitines. *J Am Coll Nutr* 13: 338-343, 1994.
33. Cho S-H, Choi Y-S. Lipid peroxidation and antioxidant status is affected by different vitamin E levels when feeding fish oil. *Lipids* 29: 47-52, 1994.
34. Christensen MS, Mortimer B-C, Høy C-E, Redgrave TG. Clearance of chylomicrons following fish oil and seal oil feeding. *Nutr Res* 15: 359-368, 1995.
35. Christie ML, Sack DM, Pompeselli J, Horst D. Enriched branched-chain amino acid formula versus a casein-based supplement in the treatment of cirrhosis. *J Parent Enteral Nutr* 9: 671-678, 1985.
36. Christon R, Fernández Y, Linard A, Périquet A, Deltour P, Mitjavila S. Diet-induced structural and functional modifications in the pig liver endoplasmic reticulum membrane: effect of polyunsaturated fatty acid deficiency. *J Nutr Biochem* 3: 510-517, 1992.
37. Clawson GA, Moody DE, James J, Smuckler EA. Nuclear envelope alterations accompanying thioacetamide-related enlargement of the nucleus. *Cancer Res* 41: 519-526, 1981.

38. Clement B, Grimaud J-A, Campion J-P, Deugnier Y, Guillouzo A. Cell types involved in collagen and fibronectin production in normal and fibrotic human liver. *Hepatology* 6: 225-234, 1986.
39. Clot P, Tabone M, Aricó S, Albano E. Monitoring oxidative damage in patients with liver cirrhosis and different daily alcohol intake. *Gut* 35: 1637-1643, 1994.
40. Connor WE, DeFrancesco CA, Connor SL. N-3 fatty acids from fish oil. *New York Acad Sci* 683: 16-34, 1993.
41. Coulevar A, Scoazec J-Y, Feldmann G. Expression of cell-cell and cell-matrix adhesion proteins by sinusoidal endothelial cells in the normal and cirrhotic human liver. *Am J Pathol* 143: 738-752, 1993.
42. Crawford DHG, Cuneo RC, Shepherd RW. Pathogenesis and assesment of malnutrition in liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 8: 89-94, 1993.
43. Dannerberg AJ, Riedenberg MM. Dietary fatty acids are also drugs. *Clin Pharmacol Ther* 55: 5-9, 1994.
44. Dasgupta A, Chatterjee R, Chowdhury JR. Thioacetamide-induced hepatocarcinoma in rat. *Oncology* 38: 249-253, 1981.
45. DeDeckere EAM, Kloots W, van Bommel CJ. Hepatic de novo fatty acid synthesis in the rat. *Ann Nutr Metab* 37: 192-198, 1993.
46. De Bleser PJ, Braet F, Lovisetti P, Vanderkerken K, Smedsrød B, Wisse E, Geerts A. Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut* 35: 1509-1516, 1994.
47. De Diego JA, Molina LM, Fariña J, Del Cañizo JM, Fernández JA, Arangocilla P. Acontecimientos microsomales y mitocondriales en el proceso de regeneración hepática inducido de forma experimental. *Cirugía Española* 35: 137-143, 1981.
48. Deesi T, Koletzko B. Polyunsaturated fatty acids in infant nutrition. *Acta Paediatr Suppl* 395: 31-37, 1994.
49. Derr RF, Gutmann C. Alcoholic liver disease may be prevented with adequate nutrients. *Med Hypothesis* 42: 1-4, 1994.
50. Díez-Fernández C, Boscá L, Fernández-Simón L, Alvarez A, Cascales M. Relationship between genomic DNA ploidy and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacetamide. *Hepatology* 18: 912-918, 1993.
51. Dinh L, Dumont O, Durand G. Comparison of liver microsome enzyme and fatty acid composition recovery in adult and old rats deficient in 18:3 N-3 refed a diet containing 18:3 N-3. *Biochem Biol Inter* 32: 869-876, 1994.

52. Dixon WJ, Brown MB, Engelman L, Jennrich RI. *BMDP statistical software manual*. Berkeley: University of California Press, 1990.
53. Dowdy S, Wearden S. *Statistics for research, 2nd edition*. Wiley Interscience, New York, 1985.
54. Dyroff MC, Neal RA. Identification of the major protein adduct formed in rat liver after thioacetamide administration. *Canc Res* 41: 3430-3435, 1981.
55. Edwards MJ, Keller BJ, Kauffman FC, Trurman RG. Kupffer cells are involved in carbon tetrachloride toxicity. *Kupffer Cell Found* 4: 391-393, 1993.
56. Edwards MJ, Keller BJ, Kauffman FC, Trurman RG. The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 119: 275-279, 1993.
57. Elias PM, Mostad IL, Ziboh VA. The permeability barrier in essential fatty acid deficiency: evidence for a direct role for linoleic acid in barrier function. *J Invest Dermatol* 74: 230-233, 1980.
58. Emerit J, Klein JM, Coutellier A, Congy F. Radicaux libres et peroxydation lipidique en biologie cellulaire: perspectives physio-pathologiques. *Path Biol* 39: 316-327, 1991.
59. Factor VM, Radaeva SA, Thorgeirsson SS. Origen and fate of oval cells in dipin-induced hepatocarcinogenesis in the mouse. *Am J Pathol* 145: 409-422, 1994.
60. Fawcett DW. *Tratado de histología. 11ª edición*. Interamericana McGraw-Hill, eds. Madrid, 1987.
61. Fan S-T, Lo C-M, Lai ECS, Chu K-M, Liu C-L, Wong J. Perioperative nutritional support in patients undergoing hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 331: 1547-1542, 1994.
62. Fernández MI, Torres MI, Moreira E, Fontana L, Gil A, Ríos A. Influence of the administration of long chain polyunsaturated fatty acids on the process of histological recovery in liver cirrhosis produced by oral intake of thioacetamide. *Dig Dis Sci*, 1995. (En prensa).
63. Fontana L, Moreira E, Torres MI, Fernández MI, Ríos A, Sánchez de Medina F, Gil A. Serum amino acid changes in rats with thioacetamide-induced liver cirrhosis. *Toxicology*, 1995. (En prensa).
64. Franke H, Zimmermann T, Dargel R. Qualitative and quantitative changes in hepatic lipoprotein particles following acute injury of the rat liver induced by thioacetamide. *Virchows Arch [Cell Pathol]* 44: 99-113, 1983.
65. Franke H, Zimmermann T, Dargel R. Changes in intra and extrahepatic VLDL in the rat following acute injury by thioacetamide. *Virchows Arch [Cell Pathol]* 48: 277-288, 1985.

66. Fraser R, Dobbs BR, Rogers GWT. Lipoproteins and the liver sieve: the role of the fenestrated sinusoidal endothelium in lipoprotein metabolism, atherosclerosis and cirrhosis. *Hepatology* 21: 863-874, 1995.
67. French SW. Nutrition in the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Alcohol Alcoholism* 28: 97-109, 1993.
68. Friedman SL. Cellular sources of collagen and regulation of collagen production in liver. *Seminars Liver Dis* 10: 20-29, 1990.
69. Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis. *New England J Med* 328: 1828-1835, 1993.
70. Funatsu K, Ueno M, Mizuno Y, Nishida J, Oda M, Tsuchiya M. Hepatocellular injury due to active oxygen radicals produced by rat liver macrophages. *Kupffer Cells Found* 3: 73-77, 1991.
71. Gallagher CH, Gupta DN, Judah JD, Rees KR. Biochemical changes in liver in acute thioacetamide intoxication. *J Path Bact* 73: 193-201, 1956.
72. Geerts A, Lazou J-M, De Bleser P, Wisse E. Tissue distribution, quantitation and proliferation Kinetics of fat-storing cells in carbon tetrachloride-injured rat liver. *Hepatology* 13: 1193-1202, 1991.
73. Gerlyng P, Grotmol T, Stokke T, Erikstein B, Seglen PO. Flow cytometric investigation of a possible precursor-product relationship between oval cells and parenchymal cells in the rat liver. *Carcinogenesis* 15: 53-59, 1994.
74. Gibbons GF, Burnham FJ. Effect of nutritional state on the utilization of fatty acids for hepatic triacylglycerol synthesis and secretion as very-low-density lipoprotein. *Biochem J* 275: 87-92, 1991.
75. Greenwel P, Schwartz M, Rosas M, Peyrol S, Grimaud J-A, Rojkind M. Characterization of fat-storing cell lines derived from normal and CCl₄-cirrhotic livers. *Lab Inves* 65: 644-653, 1991.
76. Gressner AM. Liver fibrosis: perspectives in pathobiochemical research and clinical outlook. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 29: 293-311, 1991.
77. Gressner AM, Lotfi S, Gressner G, Haltner E, Kropf J. Synergism between hepatocytes and kupffer cells in the activation of fat-storing cells (perisinusoidal lipocytes). *J Hepatol* 19: 117-132, 1993.
78. Gressner AM, Bachem MG. Cellular communications and cell-matrix interactions in the pathogenesis of fibroproliferative diseases: liver fibrosis as a paradigm. *Ann Biol Clin* 52: 205-226, 1994.

79. Gressner AM. Perisinusoidal lipocytes and fibrogenesis. *Gut* 35: 1331-1333, 1994.
80. Gil A, Lozano E, DeLuchi C, Maldonado J, Molina JA, Pita ML. Changes in the fatty acids profiles of plasma lipid fraction induced by dietary nucleotides in infants born at term. *Eur J Clin Nutr* 42: 473-481, 1988.
81. Gupta DN. Production of cancer of the bile ducts with Thioacetamide. *Nature* 5: 257, 1955.
82. Gupta DN. Acute changes in the liver after administration of thioacetamide. *J Pathol Bact* 72: 183-192, 1956.
83. Halsted CH. Folate deficiency in alcoholism. *Am J Clin Nutr* 33: 2736-2740, 1980.
84. Haratake J, Furuta A, Hashimoto H. Immunohistochemical and ultrastructural study of hepatic sinusoidal linings during dichloropropanol-induced acute hepatic necrosis. *Liver* 14: 90-97, 1994.
85. Herzberg GR. Dietary regulation of fatty acid and triglyceride metabolism. *Can J Physiol Pharmacol* 69: 1637-1647, 1991.
86. Hillier K, Jewell R, Dorrell L, Smith CL. Incorporation of fatty acids from fish oil and olive oil into colonic mucosal lipids and effects upon eicosanoid synthesis in inflammatory bowel disease. *Gut* 32: 1151-1155, 1991.
87. Hiraoka H, Yamashita S, Matsuzawa Y, Kubo M, Nozaki S, Sakai N, Hirano K-I, Kawata S, Tarui S. Decrease of hepatic triglyceride lipase levels and increase of cholesteryl ester transfer protein levels in patients with primary biliary cirrhosis: relationship to abnormalities in high-density lipoprotein. *Hepatology* 18: 103-110, 1993.
88. Hoffmann C, Lahme B, Brenzel A, Gressner M. The relation between hepatocellular damage and activation of fat-storing cell proliferation in vitro. *Inter Hepatol Commun* 2: 29-36, 1994.
89. Holman RT, Johnson SB, Hatch TF. A case of human linolenic acid deficiency involving neurological abnormalities. *Am J Clin Nutr* 35: 617-623, 1982.
90. Hori N, Okanoue T, Sawa Y, Mori T, Kashima K. Effect of a somatostatin analogue (SM 201-995) on hemodynamics and glucagon secretion in cirrhotic rats. *Gastroenterol Jpn* 28: 276-283, 1993.
91. Hori N, Okanoue T, Sawa Y, Mori T, Kashima K. Hemodynamic characterization in experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide administration. *Dig Dis Sci* 38: 2192-2202, 1993.
92. Huang S-C, Fritsche KL. Alteration in mouse splenic phospholipid fatty acid composition and lymphoid cell populations by dietary fat. *Lipids* 27: 25-32, 1992.

- 93.Huang Y-S, Koba K, Horrobin DF, Sugano M. Interrelationship between dietary protein, cholesterol and n-6 polyunsaturated fatty acid metabolism. *Prog Lip Res* 32: 123-137, 1993
- 94.Ikeda I, Wakamatsu K, Inayoshi A, Imaizumi K, Sugano M, Yazawa K. α - Linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids affect lipid metabolism differently in rats. *J Nutr* 124: 1898-1906, 1994.
- 95.Imamura H, Kawasaki S, Bandai Y, Sanjo K, Idezuki Y. Morphometry of sinusoids and portal hypertension in non-alcoholic cirrhosis. *J Hepatol* 21: 167-173, 1994.
- 96.ILAR. Controls of diets in laboratory animal experimentation. *Nutr Abstract Rev: Livestock Feeds and Feeding* 49: 413-419, 1979.
- 97.Jack EM, Bentley P, Bieri F, Muakkassah-Kelly SF, Staubli W, Suter J, Waechter F, Cruz-Orive LM. Increase in hepatocyte and nuclear volume and decrease in the population of binucleated cells in preneoplastic foci of rat liver: a stereological study using the nucleator method. *Hepatology* 11: 286-297, 1990.
- 98.Jiménez W, Clària J, Arroyo V, Rodés J. Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 7: 90-97, 1992.
- 99.Johnson SJ, Hillan KJ, Hines JE, Ferrier R, Burt AD. Proliferation and phenotypic modulation of perisinusoidal (Ito) cells following acute liver injury: temporal relationship with TGF β 1 expression. *Cell Mol Aspects Cirrhosis* 216: 219-222, 1992.
- 100.Jump DB, Clarke SD, Thelen A, Liimatta M. Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J Lip Res* 35: 1076-1084, 1994.
- 101.Keohane PP, Attril H, Grimble G, Spiller R, Frost P, Silk DBA. Enteral nutrition in malnourished patients with hepatic cirrhosis and acute encephalopathy. *J Parent Enteral Nutr* 7: 346-350, 1983.
- 102.Kondrup J, Nielsen K, Hamberg O. Nutritional therapy in patients with liver cirrhosis. *Eur J Clin Nutr* 46: 239-246, 1992.
- 103.Krahenbuhl S, Weber FL, Brass EP. Decreases hepatic glycogen content and accelerated response to starvation in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Hepatology* 14: 1189-1195, 1991.
- 104.Krahenbuhl S, Talos C, Reichen J. Mechanisms of impaired hepatic fatty acid metabolism in rats with long-term bile duct ligation. *Hepatology* 19: 1272-1281, 1994.

- 105.Kretzschmar M, Machnik G, Oesterle D, Zimmermann T, Klinger W. Gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) in experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide: a biochemical and enzyme histochemical study. *Exp Pathol* 43: 195-203, 1991.
- 106.Kizer DE, Shirley BC, Cox B, Howell BA. Effect of thioacetamide on adenylic acid Deaminase activity and nuclear ribonucleic acid metabolism in rat liver. *Cancer Res* 25: 596-603, 1965.
- 107.Koulish S, Kleinfeld RG. The role of the nucleolus. *J Cell Biol* 23: 39-51, 1964.
- 108.Kuratko CN, Tsai S-Y, Pence BC. Effects of dietary fat and 1,2-dimethylhydrazine on microsomal lipid peroxidation. *J Nutr Biochem* 5: 78-83, 1994.
- 109.Latifi R, Killam RW, Dubrick SJ. Nutritional support in liver failure. *Surg Clin North Am* 71: 567-578, 1991.
- 110.Lieber CS. Effects of prolonged ethanol intake: production of fatty liver despite adequate diets. *J Clin Invest* 44: 1009-1021, 1965.
- 111.Lieber CS. Alcohol, liver, and nutrition. *J Am Coll Nutr* 10: 602-632, 1991.
- 112.Lieber CS. A personal perspective on alcohol, nutrition, and the liver. *Am J Clin Nutr* 58: 430-442, 1993.
- 113.Lieber CS, Robin SJ, Li J, De Carli LM, Mak KM, Fasulo JM, Leo MA. Phosphatidyl choline protects against fibrosis and cirrhosis in the baboon. *Gastroenterology* 106: 152-159, 1994.
- 114.Lindroos PM, Zarnegar R, Michalopoulos K. Hepatocyte growth factor (Hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology* 13: 743-749, 1991.
- 115.López Pedrosa JM. Contribución de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la dieta a la reparación tisular en cerdos malnutridos durante el periodo neonatal. *Tesis Doctoral. Universidad de Granada*, 1995.
- 116.Maher JJ, Tzagarakis C, Giménez A. Malondialdehyde stimulates collagen production by hepatic lipocytes only upon activation in primary culture. *Alcohol Alcoholism* 29: 605-610. 1994.
- 117.Mak KM, Lieber CS. Portal fibroblasts and myofibroblasts in baboons after long-term alcohol consumption. *Arch Pathol Lab Med* 110: 513-516, 1986.
- 118.Mak KM, Lieber CS. Lipocytes and transitional cells in alcoholic liver disease: a morphometric study. *Hepatology* 5: 1027-1033, 1988.

119. Mancini R, Paolucci F, Baroni GS, Jezequel AM, Orlandi F. Phenotypic analysis of inflammatory infiltrate in rats with dimethylnitrosamine-induced cirrhosis. *Int J Exp Pathol* 72: 119-128, 1991.
120. Martínez-Hernández A. The hepatic extracellular matrix. II. Electron immunohistochemical studies in rats with CCL4- induced cirrhosis. *Lab Invest* 53: 166, 1985.
121. Martínez-Hernández A, Delgado FM, Amenta PS. The extracellular matrix in hepatic regeneration: localization of collagen types I, III, IV, laminin, and fibronectin. *Lab Invest* 64: 157-166, 1991.
122. Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: molecular structure and implications for a central role in liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol* 6: 509-519, 1991.
123. Matsuoka M, Tsukamoto H. Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor β implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis. *Hepatology* 11: 599-605, 1990.
124. Melchiorri C, Bolondi L, Chieco P, Pagnoni M, Gramantieri L, Barbara L. Diagnostic and prognostic value of DNA ploidy and cell nuclearity in ultrasound-guided liver biopsies. *Cancer* 74: 1713-1719, 1994.
125. Meyer DH, Bachem MG, Gressner AM. Bidirectional effects of Kupffer cells on hepatocyte proliferation in vitro. *FEBS* 283: 150-154, 1991.
126. Meyer DH, Bachem MG, Gressner AM. A model of paracrine regulation of hepatocellular proliferation. *Cell Mol Aspects Cirrhosis* 216: 311-314, 1992.
127. Minato Y, Hasumura Y, Takeuchi J. The role of fat-storing cells in Disse space fibrogenesis in alcoholic liver disease. *Hepatology* 3: 559-566, 1983.
128. Moreira E. Contribución de los ácidos grasos poliinsaturados de la dieta al tratamiento de la cirrosis hepática. *Tesis Doctoral, Universidad de Granada*, 1993.
129. Moreira E, Fontana L, Periago JL, Sánchez de Medina F, Gil A. Changes in fatty acid composition of plasma, liver microsomes and erythrocytes in liver cirrhosis induced by oral intake of thioacetamide in rats. *Hepatology* 21: 199-206, 1995.
130. Moreira E, Fontana L, Torres MI, Fernández MI, Ríos A, Sánchez de Medina F, Gil A. Dietary long-chain polyunsaturated fatty acids influence the recovery of thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. *JPEN*, 1995. (En prensa).
131. Morimoto M, Zern MA, Hagbjörk A-L, Ingelman-Sundberg M, French SW. Fish oil, alcohol, and liver pathology: role of cytochrome P450 2E1. *PSEBM* 207: 197-204, 1994.

132. Morley CDG, Boyer JL. Stimulation of hepatocellular proliferation by serum factor from thioacetamide-treated rats. *Biochim Biophys Acta* 477: 165-176, 1977.
133. Moshage H, Yap S-H. Molecular and cellular biology of the liver. *Curr Op Gastroenterol* 9: 367-373, 1993.
134. Muller MJ, Rieger A, Willmann O, Lautz HU, Balks HJ, Von Zur Muhlen A, Canzler H, Schmidt FW. Metabolic responses to lipid infusions in patients with liver cirrhosis. *Clin Nutr* 11: 193-206, 1992.
135. Muller MJ, Boker KHW, Selberg O. Metabolism of energy-yielding substrates in patients with liver cirrhosis. *Clin Investig* 72: 568-579, 1994.
136. Muscaretoli M, Cangiano C, Cascino A, Ceci F, Caputo V, Martino P, Serra P, Fanelli FR. Exogenous lipid clearance in compensated liver cirrhosis. *JPEN* 10: 599-603, 1986.
137. Nakayama Y, Takahara T, Miyabayashi C, Itoh H, Watanabe A, Sasaki H, Muragaki Y, Ooshima A, Onoue K. Ultrastructural localization of type IV collagen and laminin in the Disse space of rat liver with carbon tetrachloride induced fibrosis. *Liver* 11: 260-271, 1991.
138. Nanji AA, Zhao S, Lamb RG, Dannenberg AJ, Sadrzadeh SMH, Waxman DJ. Changes in cytochromes P-450, 2E1, 2B1, and 4A, and phospholipases A and C in the intragastric feeding rat model for alcoholic liver disease: relationship to dietary fats and pathologic liver injury. *Alcohol Clin Exp Res* 18: 902-908, 1994.
139. Nanji AA, Sadrzadeh SMH, Yang EK, Fogt F, Meydani M, Dannenberg AJ. Dietary saturated fatty acids: a novel treatment for alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 109: 547-554, 1995.
140. Nassar BA, Das UN, Huang Y-S, Ells G, Horrobin DF. The effect of chemical hepatocarcinogenesis on liver phospholipid composition in rats fed n-6 and n-3 fatty acid-supplemented diets. *Chemical Hepatocarcinogenesis* 199: 365-368, 1992.
141. Nompleggi DJ, Bonkovsky HL. Nutritional supplementation in chronic liver disease: an analytical review. *Hepatology* 19: 518-533, 1994.
142. Nikolov EN, Dabeva MD. Turnover of ribosomes in regenerating rat liver. *Int J Biochem* 15: 1255-1260, 1983.
143. Nozu F, Takeyama N, Tanaka T. Changes of hepatic fatty acid metabolism produced by chronic thioacetamide administration in rats. *Hepatology* 15: 1099-1106, 1992.
144. Ogoshi S, Iwasa M, Yonezawa T, Tamiya T. effect of nucleotide and nucleoside mixture on rats given total parenteral nutrition after 70% hepatectomy. *JPEN* 9: 339-342, 1985.

145. Okita M, Watanabe A, Nagashima H. Nutritional treatment of liver cirrhosis by branched-chain amino acid-enriched nutrient mixture. *J Nutr Sci Vitamin* 31: 291-303, 1985.
146. Olason D, Smuckler EA. Changes in hepatic nuclei induced by acetamide and thioacetamide. *Arch Pathol Lab Med* 100: 415-418, 1976.
147. Palacios E, Osada J, Cascales M, Santos Ruiz A. Alteraciones en el metabolismo lipídico que acompañan a la cirrosis producida por tioacetamida. *Rev Esp Oncol* 29: 505-510, 1982.
148. Pawlosky R, Barnes A, Salem N. Essential fatty acid metabolism in the feline: relationship between liver and brain production of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Lipid Res* 35: 2032-2040, 1994.
149. Peck MD. Interaction of lipid with immune function I: biochemical effects of dietary lipids on plasma membranes. *J Nutr Biochem* 5: 466-478, 1994.
150. Pérez Tamayo R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ an adequate model of human cirrhosis ?. *Hepatology* 3: 112-120, 1983.
151. Popper H. Pathological aspects of cirrhosis. *Am J Pathol* 87: 228-257, 1977.
152. Pré J. La lipoperoxydation. *Path Biol* 39: 716-736, 1991.
153. Reynolds ES. The use of lead citrate at high PH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208-212, 1963.
154. Rojkind M. Fibrogenesis in cirrhosis. Potential for therapeutic intervention. *Pharmac Ther* 53: 81-104, 1992.
155. Romijn JA, Endert E, Sauerwein HP. Glucose and fat metabolism during short-term starvation in cirrhosis. *Gastroenterology* 100: 731-737, 1991.
156. Ross MH, Reith EJ, Romrell LJ. *Histología*. 2ª edición. Panamericana, ed. Buenos Aires, 1992.
157. Rosser BG, Gores GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 108: 252-275, 1995.
158. Russell RM. Vitamin A and zinc metabolism in alcoholism. *Am J Clin Nutr* 33: 2741-2749, 1980.
159. Rustan AC, Hustvedt Bo-E, Drevon CA. Dietary supplementation of very long-chain n-3 fatty acids decreases whole body lipid utilization in the rat. *J Lip Res* 34: 1299-1309, 1993.

160. Ryoo JW, Buschmann RJ. A morphometric analysis of the hypertrophy of experimental liver cirrhosis. *Virchows Arch [Pathol Anat]* 400: 173-186, 1983.
161. Saito M, Nakatsugawa K. Increased susceptibility of liver to lipid peroxidation after ingestion of a high fish oil diet. *Internat J Vit Nutr Res* 64: 144-151, 1994.
162. Schirmacher P, Geerts A, Pietrangelo A, dienes HP, Rogler CE. Hepatocyte growth factor/hepatopoietin A is expressed in fat-storing cells from rat liver but not myofibroblast-like cells derived from fat-storing cells. *Hepatology* 15: 5-11, 1992.
163. Schmitt-Graff A, Chakroun G, Gabbiani G. Modulation of perisinusoidal cell cytoskeletal features during experimental hepatic fibrosis. *Virchows Arch A [Pathol Anat]* 422: 99-107, 1993.
164. Scholmerich J. Portal hypertension in chronic liver disease. *Hepato-Gastroenterol* 38: 346-348, 1991.
165. Seki S, Sakaguchi H, Kawakita N, Yanai A, Kuroki T, Mizoguchi Y, Kobayashi K, Monna T. Detection of proliferating liver cells in various diseases by a monoclonal antibody against DNA polymerase- α : with special reference to the relationship between hepatocytes and sinusoidal cells. *Hepatology* 14: 781-788, 1991.
166. Shakoori AR, Drakhshan M-E. Effect of thioacetamida on the body weight, liver weight, histological structure and the total nucleic acids content of mouse liver. *Pakistan J Zool* 7: 117-133, 1975.
167. Shibayama Y, Nakata K. Role of septal fibrosis in development of hepatic circulatory disturbance in the presence of liver cell enlargement. *Liver* 12: 84-89, 1992.
168. Shiratori Y, Geerts A, Ichida T, Kawase T, Wisse E. Kupffer cells from CCl₄-induced fibrotic liver stimulate proliferation of fat-storing cells. *J Hepatol* 3: 294-303, 1986.
169. Shiratori Y, Teraoka H, Matano S, Matsumoto K, Kamii K, Tanaka M. Kupffer cell function in ethanol-fed rats. *Liver* 9: 351-359, 1989.
170. Slater TF. Free radical studies in relation to cancer and liver regeneration. *South African J Sc* 87: 588-590, 1991.
171. Smuckler EA, Koplitz M. Thioacetamide-induced alterations in nuclear RNA transport. *Cancer Res* 34: 827-838, 1974.
172. Sobezak J, Duguet M. Molecular biology of liver regeneration. *Biochemie* 68: 957-967, 1986.
173. Sokal RR, Rohlf FJ. *Introducción a la bioestadística*. Editorial Reverté, SAJ. Barcelona, 1986.

174. Spady DK. Regulatory effects of individual fatty acids on LDL transport in the rat. *J Lip Res* 34: 1337-1346, 1993.
175. Spector AA, Moore SA. Effects of polyunsaturated fatty acids in endothelium. En: *Endothelial Cell Dysfunctions*. Simionescu N and Simionescu M, Eds. 507-524. Plenum Press, New York, 1992.
176. Sprecher H. The influence of dietary alterations, fasting and competitive interactions on the microsomal chain elongation of fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 3: 60-113, 1976.
177. Steele WJ, Okamura N, Busch H. Effects of thioacetamide on the composition and biosynthesis of nucleolar and nuclear ribonucleic acid in rat liver. *J Biol Chem* 240: 1742-1749, 1964.
178. Stubbs CD, Clandinin MT. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim Biophys Acta* 779: 89-137, 1984.
179. Swails WS, Bell SJ, Bistrain BR, Lewis EJ, Pfister D, Forse A, Kelly S, Blackburn GL. Fish-oil-containing diet and platelet aggregation. *Nutrition* 9: 211-217, 1993.
180. Tani M, Tomiya T, Yamada S, Hayashi S, Yahata K, Tamura Y, Akiyama M, Kawai S, Masaki N, Fujiwara K, Oda T. Regulating factors of liver regeneration after hepatectomy. *Cancer Chemother Pharmacol* 33(suppl):S29-S32, 1994.
181. Takada R, Saitoh M, Mori T. Dietary γ -linolenic acid-enriched oil reduces body fat content and induces liver enzyme activities relating to fatty acid β -oxidation in rats. *J Nutr* 124: 469-474, 1994.
182. Takahara T, Kojima T, Miyabayashi C, Inoue K, Sasaki H, Muragaki Y, Ooshima A. Collagen production in fat-storing cells after carbon tetrachloride intoxication in the rat. *Lab Invest* 59: 509-521, 1988.
183. Teare JP, Greenfield SM, Watson D, Pouchard NA, Miller N, Rice-Evans CA, Thompson RPH. Lipid peroxidation in rats chronically fed ethanol. *Gut* 35: 1644-1647, 1994.
184. Tennery PN, Waring RH. Early changes in thioacetamide-induced liver damage. *Toxicol Lett* 19: 299-307, 1983.
185. Torres MI, Fernández MI, Ríos A. The importance of thioacetamide treatment time in relation to liver regeneration. *Electron Microscopy. EUREM 92, Granada, Spain* 3: 885-886, 1992.
186. Torres MI. Influencia de los nucleótidos de la dieta en la regeneración hepática tras cirrosis inducida por tioacetamida: estudio a microscopía óptica y electrónica. *Tesis Doctoral, Universidad de Granada*, 1994.

187. Torres MI, Fernández I, Fontana L, Gil A, Ríos A. Influence of dietary nucleotides on liver structural recovery and hepatocyte binuclearity in cirrhosis induced by thioacetamide. *Gut*, 1995. (En prensa).
188. Venkatraman JT, Chandrasekar B, Kim JD, Fernandes G. Effects of n-3 and n-6 fatty acids on the activities and expression of hepatic antioxidant enzymes in autoimmune-prone NZBxNZW F₁ mice. *Lipids* 29: 561-568, 1994.
189. Verboeket-Van de Venne WPHG, Westerterp KR, Van Hoek B, Swart GR. Habitual pattern of food intake in patients with liver disease. *Clin Nutr* 12: 293-297, 1993.
190. Wall KM, Diersen-Schade D, Innis SM. Plasma and tissue lipids of piglets fed formula containing saturated fatty acids from medium-chain triglycerides with or without fish oil. *Am J Clin Nutr* 59: 1317-1324, 1994.
191. Weibel ER. *Stereological methods. Vol 1: practical methods for biological morphometry.* Academic Press Inc, London Ltd, 1987.
192. Willumsen N, Skorve J, Hexeberg S, Rustan AC, Berge RK. The hypotriglyceridemic effect of eicosapentaenoic acid in rats is reflected in increase mitochondrial fatty acid oxidation followed by diminished lipogenesis. *Lipids* 28: 683-690, 1993.
193. Wisse E, Geerts A, Bouwens L, Vanderkerken K, De Bleser P, Hautekeete M, De Zanger RB, Niki T, Floribert DM, Braet F, Delens N. Contribution of electron microscopy to the study of liver sinusoidal cells. *Electron Microscopy. EUREM 92, Granada, Spain* 3: 797-801, 1992.
194. Yamazaki RK, Shen T, Schade B. A diet rich in (n-3) fatty acids increases peroxisomal β -oxidation activity and lowers plasma triacylglycerols without inhibiting glutathione-dependent detoxication activities in the rat liver. *Biochim Biophys Acta* 920: 62-67, 1987.
195. Yonekubo A, Honda S, Okano M, Takahashi K, Yamamoto Y. Dietary fish oil alters rat milk composition and liver and brain fatty acid composition of fetal and neonatal rats. *J Nutr* 123: 1703-1708, 1993.
196. Yonekubo A, Honda S, Okano M, Takahashi A, Yamamoto Y. Effects of dietary fish oil during the fetal and postnatal periods on the learning ability of postnatal rats. *Biosci Biotech Biochem* 58: 799-801, 1994.
197. Yonekubo A, Kanno T, Takahashi K, Koyanagi N, Nozak Y, Yamamoto Y. Effects of dietary fish oil on polyunsaturated fatty acid desaturation in fetal and postnatal rats. *Biosci Biotech Biochem* 58: 802-806, 1994.
198. Zar JH. *Biostatistical analysis. 2nd edition.* Prentice-Hall. Englewood Cliffs, 1984.
199. Zerbe O, Gressner AM. Proliferation of fat-storing cells is stimulated by secretions of Kupffer cells from normal and injured liver. *Exp Mol Pathol* 49: 87-101, 1988.

200. Zimmermann T, Franke H, Dargel R. Studies on lipid and lipoprotein metabolism in rat liver cirrhosis induced by different regimens of thioacetamide administration. *Exp Pathol* 30: 109-117, 1986.
201. Zimmermann T, Muller A, Machnik G, Franke H, Schubert H, Dargel R. Biochemical and morphological studies on production and regression of experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in Uje:WIST rats. *Z Versuchs* 30: 165-180, 1987.
202. Zimmermann T, Gardemann A, Machnik G, Dargel R, Jungermann K. Metabolic and hemodynamic responses of bivascularly perfused rat liver to nerve stimulation, noradrenaline, acetylcholine and glucagon in thioacetamide-induced micronodular cirrhosis. *Hepatology* 15: 464-470, 1992.