

Hipoxia crónica intermitente. Análisis de sus efectos bioquímicos, histológicos y de diámetro portal en ratas cirróticas

Roberto Gajardo C.¹, Diego Benavides C.¹, Francisco Castro C.¹, Gabriel Iribarren R.¹,
Gabriela Núñez A.², Fernando Moraga C.², Juan Madariaga G.² y Gustavo Bresky R.²

¹Estudiantes de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile.

²Departamento de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile.

Recibido: 27 de septiembre de 2010
Aceptado: 14 de diciembre de 2010

Correspondencia a:
Gustavo Bresky Ruiz
(56) 51-205986.
Larrondo 1281.
Coquimbo, Chile.
E-mail: bresky@ucn.cl

Chronic intermittent hypoxia. Analysis of biochemical, histological and portal diameter effects in cirrhotic rats

Introduction: Hepatic cirrhosis is a frequent cause of morbidity and mortality. On the other hand, in Chile, the mining activities are associated with a significant amount of people alternating work periods in high mountain settings with rest periods at sea-level settings, generating a pattern of chronic intermittent hypoxia (CIH). **Objective:** To assess the histological effect on the liver and the biochemical consequences of CIH in an experimental model for cirrhosis in rats. **Methods:** Histological, biochemical and portal diameter alterations were assessed in Sprague-Dawley exposed to a model of cirrhosis induced by intraperitoneal injection of carbon tetrachloride (CCl₄). The rats were exposed to 24 h of 12% FiO₂ and 24 h of environmental FiO₂ at sea level. **Result:** Rats exposed to CCl₄ developed cirrhosis. In the group of cirrhotic rats, it was observed that CIH rats showed lower aminotransferase levels than the normoxic group, for both enzymes (AST: 185 ± 63 IU/L vs 554 ± 440 IU/L; p < 0.05 and ALT: 137 ± 63 IU/L vs 602 ± 497 IU/L; p < 0.05). A higher portal diameter was found among the CIH cirrhotic rats compared to cirrhotic rats in the normoxia group (normoxic cirrhotic: 74 ± 21 mm; hyperoxic cirrhotic: 66 ± 18 mm; normoxic control: 44 ± 19 mm; p < 0.05). **Conclusion:** The present study suggests that CIH would have a potential liver-protective role, although associated to increased portal pressure in cirrhotic rats.

Key words: Chronic intermittent hypoxia; portal hypertension; cirrhosis; animal models.

Introducción

En Chile, la patología hepática constituye la segunda causa de muerte entre los 45 y 65 años. Estadios iniciales de la cirrosis hepática son muchas veces subclínicos, y pueden evolucionar con complicaciones secundarias a hipertensión portal o desarrollo de hepatocarcinoma¹. En estadios más avanzados de la enfermedad, los pacientes requieren trasplante hepático para mejorar sus expectativas de sobrevivencia².

Esta situación epidemiológica se enmarca en un país en que la minería representa la principal divisa, constituyendo la fuente de trabajo para un importante sector de la población. Gran parte de los grandes yacimientos se encuentra sobre los 2.800 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m). La mayoría de sus trabajadores utilizan sistemas de turnos, en los que alternan varios días de trabajo en altura y otros tantos de descanso en sus hogares (a nivel del mar o a baja altura), sometiéndose a una condición de hipoxia crónica

intermitente (HCI). Sus efectos han sido estudiados principalmente en la regulación cardiorrespiratoria y su relación con el fenómeno de apnea del sueño, sin embargo, a nivel de función hepática no hay datos concluyentes³⁻⁷.

Por un lado, la hipoxia podría producir daño hepatocelular mediado por el aumento de especies reactivas de oxígeno con incremento del estrés oxidativo^{3,7,12}. Por otro lado, existe alguna evidencia de que el pre-acondicionamiento hipóxico, dado por los períodos de normoxia e hipoxia intermitente, modula la expresión génica encargada de la apoptosis hepatocelular y regula el estado redox mitocondrial¹³⁻¹⁷. Lo anterior, tendría un rol protector en el contexto de una hepatopatía crónica sometida a condiciones de hipoxia intermitente. Igualmente la hipoxia se asociaría a cambios tanto en la distribución de flujos sanguíneos como en la función endotelial de diferentes territorios vasculares^{4,7,9,18-22}. Todo ello, en conjunto, se traduciría en variaciones de flujos y presión del territorio portal.

No obstante lo anterior, existe escasa evidencia en la literatura respecto de las posibles repercusiones de la hipoxia crónica intermitente sobre la condición de cirrosis hepática. Es por esto que se desarrolló un protocolo experimental evaluando las diferencias bioquímicas, histopatológicas y de diámetro portal en ratas Sprague-Dawley en un modelo de cirrosis inducida por tetracloruro de carbono (CCl_4)²³ y sometidas a condiciones de normoxia o de HCl.

Material y Métodos

El estudio de animales se realiza de acuerdo al protocolo de Helsinki. Veinte ratas macho *Sprague-Dawley* fueron obtenidas del bioterio del Laboratorio de Fisiología del Departamento de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Católica del Norte. Todas iniciaron protocolo con un peso 90-100 g y recibieron comida en pellet para rata de laboratorio (Champion® S.A., división industrial, Santiago, Chile) y agua *ad libitum*. El modelo de cirrosis fue producido mediante la administración de tetracloruro de carbono 0,4 g/kg de peso corporal de rata, administrado al 50%, 2 veces por semana, por un período de 8 semanas. Durante todo el protocolo, los animales fueron mantenidos en jaulas con temperatura (20° C) y luz controlada (12 h día; 12 h noche). Cumplido el protocolo, las ratas fueron divididas en 4 grupos según muestra la Tabla 1.

Protocolo de hipoxia crónica intermitente (HCI)

El modelo de hipoxia corresponde a hipoxia normobárica, en donde se reduce la fracción inspirada de oxígeno. Para ello se confeccionaron cilindros con una mezcla certificada (12% FiO_2 , balance en Nitrógeno, Indura- Chile). Los animales sometidos a HCl, se dispusieron en una cámara de acrílico a la que se le administró a flujo constante una mezcla al 12% de FiO_2 (5 L/m, este flujo es adecuado para desplazar gases al interior de la cámara y equilibrar en el interior de ésta una fracción de oxígeno equivalente a 12%). El protocolo del estudio consistió en exponer a las ratas (tratadas con CCl_4 y sin tratamiento con CCl_4) de manera intermitente a una hipoxia de 24 h, seguida de 24 h de normoxia durante 1 mes. Al final del protocolo de HCl, los animales fueron sacrificados mediante anestesia con hidratocloral (100 mg/kg peso corporal, IP); se realizó apertura de cavidad abdominal y se expuso la vena porta, la cual fue medida mediante el uso de un calíper para vasos (*vascular measuring ruler*, WPI®). Seguidamente, se tomó muestra de sangre de vena cava inferior para análisis bioquímicos en suero de transaminasa oxaloacética (GOT) y transaminasa pirúvica (GPT), los cuales fueron procesados en un multianalizador (*Model 901*, Hitachi®, Japón) y los

resultados expresados en Unidades Internacionales por litro (UI/L). Posteriormente, los animales fueron sacrificados por exanguinación.

Histología

Las muestras de hígado fueron tomadas de todos los animales y fijadas en formalina al 10%, tamponada con *buffer* fosfato-salino pH 7,4. Se obtuvieron 4 cortes histológicos hepáticos de 6 mm de grosor, los cuales fueron teñidos con hematoxilina eosina, retículo, tricómico de Masson y hematoxilina. La esteatosis fue medida utilizando un método semicuantitativo: ausente (< 5%), leve (< 30%), moderada (30-60%) y severa (> 60%). El criterio utilizado para fibrosis fue *score* 0: sin fibrosis; *score* 1: fibrosis portal sin formación de septos; *score* 2: fibrosis portal con formación de escasos septos delgados; *score* 3: fibrosis portal con presencia de numerosos septos delgados formando pseudonódulos sin cirrosis franca, y *score* 4: fibrosis severa (cirrosis)²⁴. Para la actividad necroinflamatoria se graduó como grado 0: sin actividad inflamatoria, grado 1: actividad leve o mínima, grado 2: actividad leve, grado 3: actividad moderada y grado 4: actividad severa de acuerdo al grado de inflamación portal y lobulillar y la evidencia de actividad de interfase y necrosis focal²⁵.

Los valores obtenidos fueron expresados como promedio \pm desviación estándar (DE), las diferencias fueron analizadas con test de t ($p < 0,05$) mediante el uso de *Primer of Biostatistics*.

Resultados

El análisis macroscópico reveló que todos los animales tratados con CCl_4 , presentaron hígado con aspecto macroscópico de cirrosis y aumento de la circulación colateral en territorio abdominal. Al evaluar el diámetro portal, éste fue mayor en las ratas tratadas con CCl_4 sometidas a hipoxia respecto de las tratadas con CCl_4 normóxicas (cirróticas normóxicas: 74 ± 21 mm; cirróticas hipóxicas: 66 ± 18 mm; control normóxico: 44 ± 19 mm; $p < 0,05$). Los dos grupos de ratas con cirrosis presentaron diámetros significativamente mayores que las ratas sin cirrosis. Entre los grupos de ratas cirróticas el mayor diámetro portal se observó en las que habían sido sometidas a HCl (Figura 1).

Tabla 1. Grupos asignados

	Controles		Cirrosis (CCl_4 50%)	
	Normoxia	Hipoxia (Fi O_2 12%)	Normoxia	Hipoxia (Fi O_2 12%)
n	3	3	7	7

Artículo Original

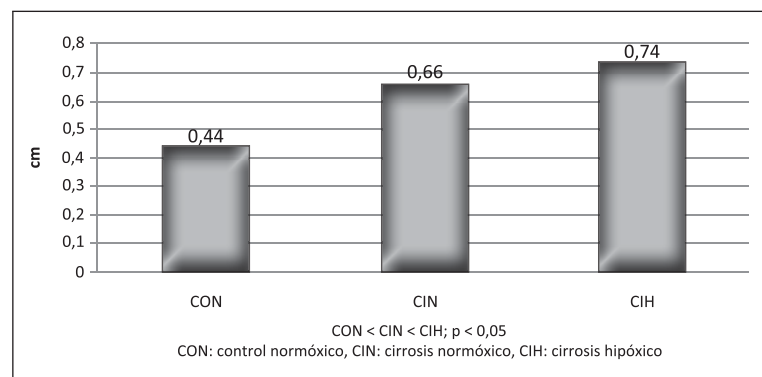


Figura 1. Comparación de los diámetros portales entre los grupos de estudio.

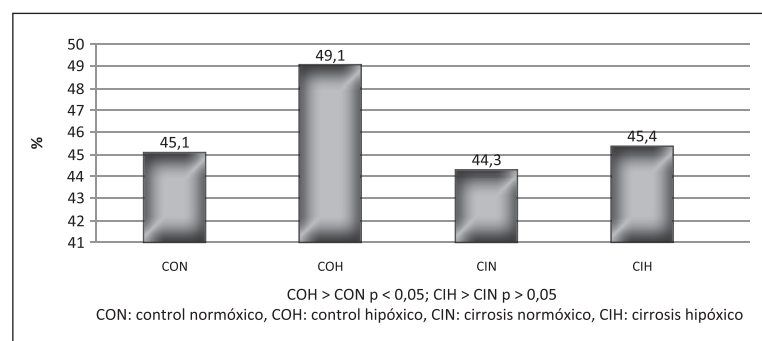


Figura 2. Comparación del porcentaje de hematocrito entre los grupos de estudio.

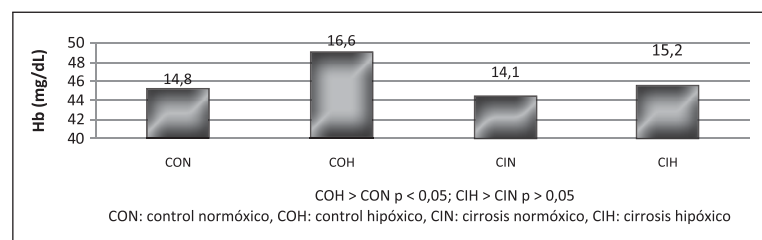


Figura 3. Comparación de la concentración de hemoglobina entre los grupos de estudio.

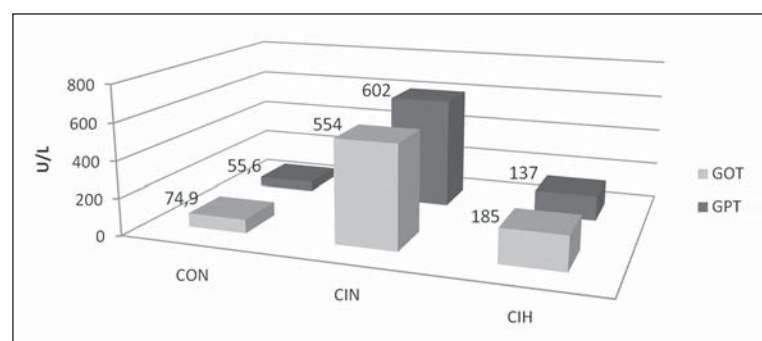


Figura 4. Comparación de los valores de transaminasas entre los grupos de estudio.

El análisis histológico, corroboró la presencia de cirrosis en 100% de los hígados de las ratas tratadas con CCl_4 . No se observó presencia de infiltrado inflamatorio en ninguno de los grupos estudiados. Por otro lado, se observó un mayor porcentaje de ratas con presencia de esteatosis entre las cirróticas con normoxia *versus* las que se habían sometido a hipoxia intermitente (100% *vs* 50%; $p < 0,05$).

Los grupos sometidos a hipoxia presentaron mayores niveles de hematocrito y hemoglobina en relación con los normóxicos. Esta diferencia fue estadísticamente significativa entre los controles hipóxicos y normóxicos (hematocrito: $49,1\% \pm 2$ *vs* $45,1\% \pm 3$ $p < 0,05$; hemoglobina: $16,6$ g/dL ± 1 ; $14,8$ g/dL ± 1 $p < 0,05$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos hipóxicos y normóxicos de ratas cirróticas (hematocrito: $45,4 \pm 3\%$ *vs* $44,3\% \pm 4$ $p > 0,05$; hemoglobina: $15,2$ g/dL ± 1 *vs* $14,1$ g/dL ± 1 ; $p > 0,05$) (Figuras 2 y 3).

La evaluación de las transaminasas (GOT y GPT) en los grupos cirróticos mostró que las ratas cirróticas (normóxicas e hipóxicas) presentaron mayores niveles plasmáticos de ambas enzimas que los controles ($p < 0,05$) (Tabla 2).

Al comparar, en el grupo de ratas cirróticas, las diferencias entre las sometidas a HCI con las normóxicas, se puede observar que las con HCI presentaron niveles de transaminasas menores que el grupo que permaneció en condiciones de normoxia, para ambas enzimas [(GOT: 185 ± 63 UI/L *vs* 554 ± 440 UI/L; $p < 0,05$) (GPT: 137 ± 63 UI/L *vs* 602 ± 497 UI/L; $p < 0,05$)] (Figura 4).

Discusión

Los niveles de hematocrito y hemoglobina de los animales controles sometidos a HCI reflejan la respuesta eritrocitaria generada por la condición de hipoxia. El mecanismo probablemente involucrado es el incremento de la síntesis factor inducido por hipoxia (FIH), el cual modula la expresión de genes asociados con una respuesta adaptativa a la falta de oxígeno, entre los cuales, se encuentran el gen de la eritropoyetina y el de la óxido nítrico sintetasa²⁶. En cambio, en los animales cirróticos la condición de HCI no produjo un aumento en la poliglobulia adaptativa a la hipoxia. Este efecto podría explicarse porque la cirrosis se asociaría a una menor capacidad de síntesis de eritropoyetina; desgraciadamente, nosotros no evaluamos en esta investigación la concentración de eritropoyetina en los diferentes grupos para confirmar esta hipótesis.

El hallazgo de un mayor diámetro portal en las muestras de ratas cirróticas sometidas a HCI podría deberse a un hiperflujo hepático compensatorio generado en condiciones de hipoxia. Esto se podría expli-

Tabla 2. Comparación de valores de transaminasas entre grupos cirróticos y controles

	Controles		Cirrosis (CCI ₄ 50%)		p
	Normoxia	Hipoxia (Fi O ₂ 12%)	Normoxia	Hipoxia (Fi O ₂ 12%)	
n	3	3	7	7	
GOT (UI/L)	74,9 ± 14	69,8 ± 10	554 ± 440	185 ± 63	p < 0,05
GPT (UI/L)	55,6 ± 5	60,2 ± 5	602 ± 497	137 ± 63	p < 0,05

car por posibles cambios en la distribución de flujos sanguíneos y/o en cambios en la función endotelial esplácnica o portal generada por la hipoxia. Sin embargo, reconocemos como limitante de nuestro trabajo, no tener registros de presiones portales ni medición de flujos, por lo que no podemos inferir el significado real ni los mecanismos exactos que explican nuestras mediciones vasculares. Por otro lado, este aumento de diámetro coincidió con una tendencia a la normalización de los niveles de transaminasas de las ratas cirróticas sometidas a HCI. Una posible explicación a esta situación podría ser el pre-acondicionamiento hipóxico, dado por los períodos de normoxia e hipoxia intermitente previos que podrían haber modulado la expresión génica encargada de la apoptosis hepatocelular y regular el estado redox mitocondrial¹³⁻¹⁷. No obstante, no logramos identificar la presencia de necrosis ni de infiltrados inflamatorios, por lo que se desprende que la repercusión en la actividad histológica sería menor. En resumen, nuestros datos sugieren que la hipoxia crónica intermitente tendría un posible rol protector hepático, pero asociado a probable incremento de presión portal en los cirróticos.

Resumen

Introducción: La cirrosis hepática es causa frecuente de morbimortalidad. Por otro lado, en Chile, la actividad minera se asocia a un gran número de perso-

nas que alternan faenas en alta montaña con períodos de descanso cercano al nivel del mar, generando un patrón de hipoxia crónica intermitente (HCI). El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto histológico en el hígado y las repercusiones bioquímicas de la HCI en un modelo experimental de cirrosis en ratas.

Métodos: Se evaluaron las alteraciones histopatológicas, bioquímicas y de diámetro portal en un modelo de cirrosis en ratas Sprague-Dawley por inyección intraperitoneal de tetracloruro de carbono (CCI₄). Las ratas fueron sometidas a alternancia de 24 h en FiO₂ de 12% y 24 h de FiO₂ ambiental a nivel del mar.

Resultados: Las ratas sometidas a CCI₄ desarrollaron cirrosis. En el grupo de ratas cirróticas, se observó que las con HCI presentaron niveles de transaminasas menores que el grupo que permaneció en condiciones de normoxia, para ambas enzimas (GOT: 185 ± 63 UI/L vs 554 ± 440 UI/L; p < 0,05 y GPT: 137 ± 63 UI/L vs 602 ± 497 UI/L; p < 0,05). En las ratas cirróticas en condiciones de HCI se encontró un mayor diámetro portal comparado con las cirróticas que permanecieron en normoxia (cirróticas normóxicas: 74 ± 2 mm; cirróticas hipóxicas: 66 ± 18 mm; control normóxico: 44 ± 19 mm; p < 0,05). **Conclusión:** El presente estudio sugiere que la HCI tendría un posible rol protector hepático, pero asociado a un probable incremento de presión portal en ratas con cirrosis.

Palabras clave: Hipoxia crónica intermitente, hipertensión portal, cirrosis, modelos animales.

Referencias

- Gabrielli M, Vivanco M, Hepp J, Martínez J, Pérez R, Guerra J, et al. Liver transplantation results for hepatocellular carcinoma in Chile. *Transplant Proc* 2010; 42: 299-301.
- Hepp J, Zapata R, Buckel E, Martínez J, Uribe M, Díaz JC, et al. General considerations, indications and contraindications for liver transplantation in Chile: a multicenter consensus development document. *Rev Med Chile* 2008; 136: 793-804.
- Jun J, Savransy V, Nanayakkara A, Bevans S, Li J, Smith PL, et al. Intermittent hypoxia has organ-specific effects on oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 295: R1274-81.
- Lefebvre B, Godin-Ribuot D, Joyeux-Faure M, Caron F, Bessard G, Lévy P, et al. Functional assessment of vascular reactivity after chronic intermittent hypoxia in the rat. *Respir Physiol Neurobiol* 2006; 150: 278-86.
- Lam SY, Tipoe GL, Fung ML. Upregulation of erythropoietin and its receptor expression in the rat carotid body during chronic and intermittent hypoxia. *Adv Exp Med Biol* 2009; 648: 207-14.

Artículo Original

- 6.- Bozova S, Elpek GO. Hypoxia-inducible factor-1alpha expression in experimental cirrhosis: correlation with vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *APMIS* 2007; 115: 795-801.
- 7.- Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Kinman N, Rey C, Poupon R, et al. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology* 2002; 35: 1010-21.
- 8.- Jeong WI, et al. Hypoxia potentiates transforming growth factor-beta expression of hepatocyte during the cirrhotic condition in rat liver. *Liver Int* 2004; 24: 658-68.
- 9.- Paternostro C, David E, Novo E, Parola M. Hypoxia, angiogenesis and liver fibrogenesis in the progression of chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 281-8.
- 10.- Feng SZ, Tian JL, Zhang Q, Wang H, Sun N, Zhang Y, et al. An experimental research on chronic intermittent hypoxia leading to liver injury. *Sleep Breath* 2010 Jun 27 [Publicación electrónica en avance].
- 11.- Savransky V, Nanayakkara A, Vivero A, Li J, Bevans S, Smith PL, Torberson MS, et al. Chronic intermittent hypoxia predisposes to liver injury. *Hepatology* 2007; 45: 1007-13.
- 12.- Medina J, Arroyo AG, Sánchez-Madrid F, Moreno-Otero R. Angiogenesis in chronic inflammatory liver disease. *Hepatology* 2004; 39: 1185-95.
- 13.- Glanemann M, Vollmar B, Nussler AK, Schaefer T, Neuhaus P, Menger MD. Ischemic preconditioning protects from hepatic ischemia/reperfusion-injury by preservation of microcirculation and mitochondrial redox-state. *J Hepatol* 2003; 38: 59-66.
- 14.- Corpechot C, Barbu V, Wendum D, Chignard N, Housset C, Poupon R, et al. Hepatocyte growth factor and c-Met inhibition by hepatic cell hypoxia: a potential mechanism for liver regeneration failure in experimental cirrhosis. *Am J Pathol* 2002; 160: 613-20.
- 15.- Crenesse D, Laurens M, Gugenheim J, Heurteaux C, Cursio R, Rossi B, et al. Intermittent ischemia reduces warm hypoxia-reoxygenation-induced JNK(1)/SAPK (1) activation and apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology* 2001; 34: 972-8.
- 16.- Kurhaliuk NM, Serebrovs'ka TV, Kolesnikova IeE. Regulation of oxidative phosphorylation by liver mitochondria receptors after adaptation by rats to periodic normal pressure and acute hypoxia. *Ukr Biokhim Zh* 2002; 74: 114-9.
- 17.- Serebrovs'ka TV, Kurgaliuk NM, Nosar VI, Kolesnikova IeE. Intermittent hypoxic training with exogenous nitric oxide improves rat liver mitochondrial oxidation and phosphorylation during acute hipoxia. *Fiziol Zh* 2001; 47: 85-92.
- 18.- Resch M, Wiest R, Moleda L, Frederdorf S, Stoelcker B, Schroeder JA, et al. Alterations in mechanical properties of mesenteric resistance arteries in experimental portal hypertension. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 297: G849-57.
- 19.- Kasalický J, Ressler J, Urbanová D, Widimský J, Ostádal B, Pelouch V, et al. Relative organ blood flow in rats exposed to intermittent high altitude hypoxia. *Pflugers Arch* 1977; 368: 111-5.
- 20.- Schleimer K, Stippel DL, Kasper HU, Tawadros S, Allwissner R, Gaudig C, et al. Portal hyperperfusion causes disturbance of microcirculation and increased rate of hepatocellular apoptosis: investigations in heterotopic rat liver transplantation with portal vein arterialization. *Transplant Proc* 2006; 38: 725-9.
- 21.- Firat O, Mutlukoca N, Makay O, Yilmaz F, Omur O, Kitapcioglu G, et al. Portal hyperfusion or hepatic venous congestion: which one affects Kupffer cell function more? *Exp Clin Transplant* 2009; 7: 40-4.
- 22.- Eipel C, Abshagen K, Ritter J, Cantré D, Menger MD, Vollmar B. Splenectomy improves survival by increasing arterial blood supply in a rat model of reduced-size liver. *Transpl Int* 2010; 23: 998-1007.
- 23.- Muñoz Torres E, Paz Bouza JI, Abad Hernández MM, Alonso Martin MJ, López Bravo A. Experimental carbon tetrachloride-induced cirrhosis of the liver. *Int J Tissue React* 1988; 10: 245-51.
- 24.- Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996; 24: 289-93.
- 25.- Scheuer P, Chalk B. *Staining methods (eds), in "Clinical tests of histopathology"*. Wolf medical publication Ltd (London); 1986. pp. 84-5.
- 26.- Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: Oxygen Sensing at the Molecular Level. *Physiology* 2004; 19: 176-82.