



Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
" IZTACALA "

ACTIVIDAD PROLIFERATIVA DEL HIGADO DURANTE
EL EMBARAZO Y EL CICLO ESTRAL EN RATONAS

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G A

P r e s e n t a :

Martha Arcelia Urzúa Meza



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis fué realizada bajo la dirección del M. en C. Luis Arturo Baiza Gutman , en el laboratorio de Biología del Desarrollo, de la Unidad de Morfofisiología de la ENEP.Iztacala.

A mis padres, Sra. Arminda Meza Duarte y Sr. Ruben Urzúa Chavez. A ellos dedico lo que soy, con todo mi respeto y admiración eterna. Por su cariño y por esa luz que me dieron, que me hace decirles GRACIAS por su gran apoyo...

AGRADECIMIENTOS.

Con mi mayor agradecimiento, al M. en C. Luis Arturo Baiza Gutman , por su gran apoyo y confianza, en la dirección del presente estudio y por la amistad que me ha brindado.

Agradezco a la Dra. Cristina Márquez Orozco , por su colaboración en la elaboración del material fotográfico.

A la Biol. Irma Castillo Padilla , por su asesoramiento con el equipo y programas de computación.

A la Biol. Guadalupe Martínez Hdez , por la elaboración de las gráficas en computadora y por su gran amistad.

Al Biol. Martín Palomar Morales , por sus sugerencias en el presente estudio.

INDICE

	Paginas
I. Resumen	1
II. Introducción.	2
1) Ciclo estral en roedores.	4
2) Factores hormonales durante la preñez en roedores.	7
3) Generalidades de estrógenos.	14
4) Estructura histológica del hígado.	17
III. Antecedentes.	21
IV. Objetivo.	26
V. Material y método.	27
VI. Resultados.	29
VII. Discusión.	39
VIII. Conclusiones.	45
IX. Referencias.	46

I.- RESUMEN.

El hígado realiza una función central en la coordinación bioquímica de diversos procesos fisiológicos. Los hepatocitos se han clasificados como células circunstanciales, es decir que una vez diferenciadas solo se dividen por la acción de un estímulo, así el hígado únicamente se divide después de una hepatectomía parcial o en condiciones de un alto requerimiento metabólico en el organismo y por la acción de hormonas como la prolactina y los estrógenos.

Estudiamos la proliferación hepática durante la gestación, proceso en el cual ocurren cambios hormonales y de actividad metabólica. Ratonas CD₁ fueron apareadas, y a los días 3,6,9,12,15 y 18 de preñez, 3 días postparto y de las 4 etapas del ciclo estral, fueron inyectadas con colchicina y después de 6 horas se les extrajo el hígado. Dicho órgano fué procesado para obtener cortes histológicos, los cuales fueron teñidos con hematoxilina y eosina; se contó el número de hepatocitos en división por cada 3000 células por ratona, para determinar el índice mitótico, se evaluó además, el porcentaje de hepatocitos binucleados.

Se observó un incremento estadísticamente significativo en la proliferación de hepatocitos, al noveno día de embarazo con respecto a los otros días y al ciclo estral; además de un incremento en la población de células binucleadas durante toda la gestación con respecto a las etapas del ciclo estral.

Los resultados obtenidos sugieren que el aumento en la proliferación hepática observada, puede deberse a una etapa de alta actividad estrógenica que se presenta por el día 4 de embarazo en la ratona; este aumento y las proporciones encontradas en la población de células binucleadas, pueden estar influenciados también, por cambios en la secreción de otras hormonas como es la prolactina o de otros factores o a un aumento en el metabolismo propio de la preñez.

II.- INTRODUCCION.

La mayoría de los mamíferos poseen ritmos reproductivos circanuales en las cuales durante una época del año efectúan la concepción y paren sus crías. Por lo general esta temporada de apareamiento esta determinada por la duración de la preñez y por el momento óptimo para el parto, que a su vez dependen del clima y del abastecimiento de alimento. Esta época difiere mucho entre los animales silvestres y entre los animales domesticados.

La madurez sexual comienza cuando los animales alcanzan la pubertad, que se asocia generalmente con un determinado peso del cuerpo. en ella aumenta la producción de gonadotropinas de la hipófisis, donde los ovários y los testículos responden liberando hormonas gonadales; las cuales provocan el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, estos cambios ocurren gradualmente y su cronología es diferente en las diversas especies. En las especies pequeñas como los roedores, la pubertad se inicia unas cuantas semanas después del nacimiento, lo cual permite a estos animales aparearse rápidamente. Una vez que alcanzan la pubertad, las hembras pueden aceptar a los machos para copular durante un estado característico, el cual es llamado celo o estro.

Algunos animales pueden tener varios ciclos estrales durante la temporada de apareamiento como los ratones, por lo tanto se dice que son poliestrales; mientras que otras especies solo entran en celo una o dos veces al año, por lo cual se han llamado mono o diestrales.

Los mamíferos pequeños, como el ratón, presentan diversas estrategias reproductivas, algunos poseen una determinada época del año para aparearse y parir sus crías, como en el caso del ratón del bosque templado; cuya periodicidad obedece a diversos

factores que regulan la sincronización de los eventos reproductivos, entre estos se mencionan a los factores medioambientales, así como la reciprocidad con otros ritmos del organismo. Por otra parte los ratones domesticados o de zonas urbanas cuyo periodo de gestación oscila entre 18 y 19 días, pueden aparearse en cualquier época del año, pues los factores que regulan el apareamiento tienden a ser constantes.

El ciclo característico de los primates entre ellos el de la mujer es el denominado ciclo menstrual, el cual tiene las mismas bases hormonales, pero difiere en que termina con la menstruación, que es el desprendimiento de la capa funcional del endometrio acompañada de una pérdida de sangre, y dura aproximadamente 28 días.

Los primates más pequeños tienen una temporada definida de apareamiento cuando son salvajes, aunque se pueden aparear continuamente en condiciones de cautiverio por lo cual carecen de una temporada delimitada de parto, mientras que la mujer y las hembras de los primates antropoides son fértiles en cualquier época del año (30).

1).- Ciclo estral en roedores.

Los roedores como la rata y el ratón tienen un ciclo estral de 4 a 6 días de duración; el ciclo en organismos en cautiverio ocurre a lo largo de todo el año, interrumpiéndose solamente en caso de preñez. Estos ciclos son de corta duración, lo cual se debe a que los cuerpos lúteos que se forman después de la ovulación nunca son funcionales, pero si hay preñez, este fenómeno estimula el desarrollo de un cuerpo lúteo funcional. El ciclo estral suele dividirse en varias fases sucesivas (proestro, estro, metaestro y diestro), cada una de las cuales presentan cambios característicos en la estructura y el funcionamiento de los órganos sexuales. En los roedores podemos reconocer fácilmente estas fases, examinando al microscopio las células que se exfolian de la pared de la vagina (14), dichas fases se describen a continuación (figura 1).

a).- Proestro. Tiene una duración de 12 horas aproximadamente y es básicamente un periodo de preparación durante el cual crecen los folículos que están madurando y hay un incremento en la liberación de estrógenos. La secreción de esta hormona hace que la pared del útero se hidrate y el líquido distienda su cavidad, mientras que las células del epitelio vaginal se multiplican formando una capa gruesa de células epiteliales no cornificadas, cuyas células externas se desprenden; de este modo el frotis vaginal característico de esta etapa contiene células nucleadas sin leucocitos; como se observa en la figura 1. La secreción de 17 β -estradiol de los folículos de von Graaf alcanza sus valores máximos, esto desencadena un incremento preovulatorio de hormona luteinizante (LH) que induce la ovulación, la cual ocurre en la siguiente fase del ciclo. Las concentraciones sanguíneas de LH y de prolactina también se elevan hacia el final del proestro (1,20,32).

b).- Estro. Dura aproximadamente 12 horas; es el periodo de recepción sexual o etapa de calor o celo. En esta fase la hembra acepta al macho para copular y en ella ocurre la ovulación, como consecuencia de la acción hormonal. Los óvulos penetran en los oviductos en el momento más apropiado para la que la fecundación sea probable. Durante el estro, el lumen uterino permanece distendido, pero tiene lugar una degeneración parcial de su epitelio, mientras que la creciente cornificación del epitelio vaginal provoca que en el frotis vaginal se observen principalmente células cornificadas y no nucleadas. Además los folículos cuya ovulación va a tener lugar en el estro siguiente inician su crecimiento. La concentración de progesterona en el plasma, presenta un pico de máxima secreción (1,20,32), como se observa en la figura 1.

c).- Metaestro. Con una duración de unas 21 horas aproximadamente; está señalada por la invasión de leucocitos en el epitelio vaginal, por lo cual esas células predominan en los frotis vaginales, aunque también aparecen algunas células cornificadas y algunas nucleadas. El tamaño del útero se reduce al acercarse la etapa de descanso característico del diestro, produciéndose entonces una disminución notable en la secreción de estrógenos en el ovario (1,20,32).

d).- Diestro. Dura aproximadamente 57 horas; es una etapa que se caracteriza por la presencia de células epiteliales nucleadas junto con leucocitos en los frotis vaginales y por la formación de cuerpos lúteos en el ovario; estos sin embargo carecen prácticamente de función en la rata y el ratón y comienza a degenerar a los tres días de la ovulación, lo cual hace que el ciclo estral de estos animales tenga una duración corta. En realidad en las hembras de esta especie que no se han apareado, el ciclo es puramente folicular (1,20,32).

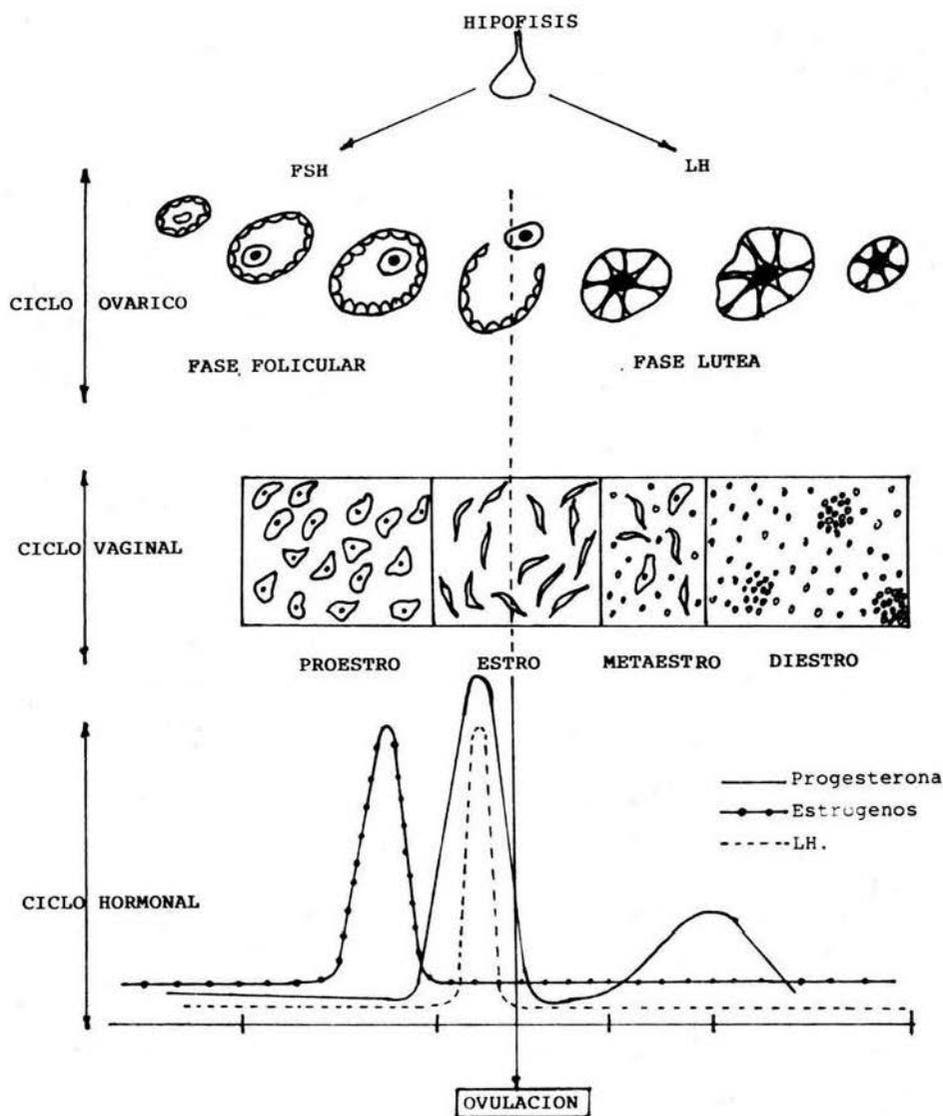


FIGURA 1. REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL CICLO SEXUAL EN RATAS. (Tomado de Sadleir 1982 y Litter 1988).

2).- Factores hormonales durante la preñez en roedores.

Los ciclos estrales cesan durante la preñez y encontramos modificaciones en el aparato genital femenino causadas por las hormonas, con el fin de dar protección y nutrición al embrión en desarrollo.

La gestación en las ratonas domesticadas normalmente comprende una duración de 18 a 19 días, el cual dependerá de la cepa de ratona. La preñez en estos roedores comprende desde la fertilización hasta el proceso de parto.

La preparación del útero para la nidación normal del embrión, requiere de la participación de hormonas y parece seguir una secuencia de tres pasos. Para una implantación normal ocurre lo siguiente:

1).- La preparación del útero con estrógenos durante el proestro, que aumenta la sensibilidad del útero a la inducción de la decidua, en el tiempo de la implantación.

2).- La exposición del útero a la progesterona durante los primeros 4 días de la preñez, que prepara la respuesta a una adicional y mayor estimulación de estrógenos, los cuales son necesarios para el comienzo de la implantación. La concentración de progesterona en el plasma demostrada por radioinmunoensayo, muestra un rápido aumento durante los primeros 2 ó 3 días de la preñez, alcanzando un pico alrededor del tiempo de la implantación.

3).- La inducción de los cambios endometriales requeridos para la implantación, a causa de una segunda exposición de estrógenos sobre el día cuatro de preñez, el llamado pico de nidación de estrógenos que ocurre alrededor de las 15-25 horas antes de la implantación. El pico nidatorio de estrógenos induce todos los cambios asociados con el proceso de implantación (figura 2).

El establecimiento y el mantenimiento inicial de la preñez es controlado por las hormonas luteotróficas de la hipófisis, interaccionando con los esteroides ováricos. Mas tarde la

placenta toma el lugar de la actividad luteotrófica de la hipófisis. La actividad placentaria se manifiesta a partir del 8º día de gestación.

Las concentraciones séricas de progesterona durante la primera mitad de la preñez son altas y en el 7º día decrece ligeramente, posiblemente por la disminución de la esteroidogénesis del ovario, como una consecuencia de la transición de la fuente luteotrófica de la hipófisis, a la placentaria. En el 8º día aumenta ligeramente y se mantiene constante hasta el día 13 aproximadamente. En el día 14 empieza a elevarse alcanzando un pico más alto en el día 16 y nuevamente en el día 17 empieza a declinar, hasta sus valores más bajos en el día de parto, aproximadamente al día 20 (20,30), (figura 3).

El incremento de los niveles de progesterona en el plasma ocurre durante los primeros cuatro días de la preñez, correspondiendo con el desarrollo del cuerpo lúteo, el cual está influenciado simultáneamente por la prolactina y la hormona luteinizante (LH). Las concentraciones de prolactina se elevan significativamente en el mismo periodo (20,26), (figura 4).

La función de la prolactina aun no se ha aclarado, pero se cree que podría ser luteotrófica o podría únicamente aumentar la sensibilidad de las células luteales a la LH por incremento del número de receptores a LH (25).

La concentración de 17 β -estradiol es alta en el primer día, probablemente como resultado de los altos niveles de estrógenos secretados durante el orcestro. Los niveles se mantienen bajos desde el día 5º hasta el día 15 ó 16, cuando empieza a incrementarse y se mantiene hasta el día 20, concomitante con la disminución de progesterona, (figura 2).

Existe un incremento significativo de folículos antrales entre el día 10-14, que podría ser la razón de la concentración baja

de estrógenos durante este periodo. La concentración de estrógenos en gran parte muestra una relación inversa con la concentración de progesterona (20,38).

Murr y col.(26). midieron directamente las concentraciones de gonadotrofinas en el plasma de ratonas preñadas, encontrando que la concentración de hormona luteinizante (LH) se eleva constantemente, mientras que la hormona folículo estimulante (FSH) se mantiene relativamente baja (figura 5); al mismo tiempo hubo un incremento gradual de un gran número de folículos antrales del ovario de la ratona. Los folículos antrales son probablemente consecuencia de la secreción tónica de FSH y de la significativa elevación de los niveles de LH. La secreción postcoital de estrógenos, probablemente es debida a estos folículos antrales (25).

La información acerca del estado temprano de la preñez en las ratonas no es del todo conocida; sin embargo se sabe, que intervienen un complejo sistema hormonal y que una pequeña desviación en los requerimientos hormonales en el organismo pueden evitar la nidación; aunado además de que los ratones son muy sensibles a los estímulos externos; se cree que los estímulos nocivos tales como, el ruido, la privación nutricional y la hipoxia, pueden interferir con la implantación del blastocito en roedores; también los estímulos olfatorios pueden influir en la preñez después de la nidación (23).

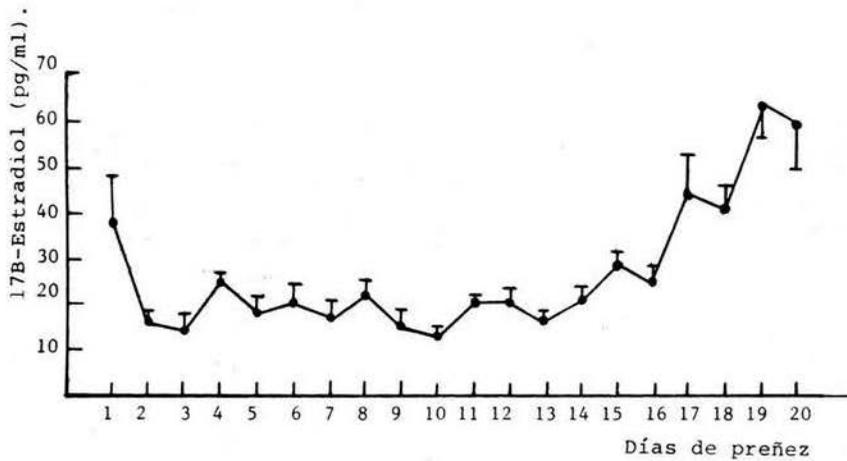


FIGURA 2 . Concentración de 17B-estradiol en el plasma durante la preñez en la ratona. Media \pm SD. (Tomada de McCormack y col.1974).

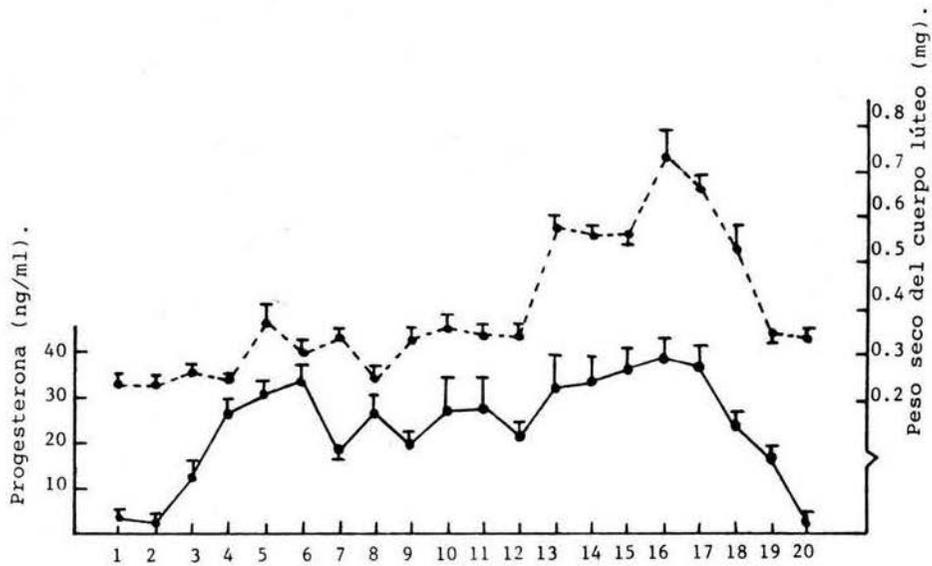


FIGURA 3. Concentración de Progesterona en el plasma (línea continua) y el peso seco (línea punteada) del Cuerpo Lúteo durante la preñez en la ratona. Media \pm SD. (Tomada de McCormack y col.1974).

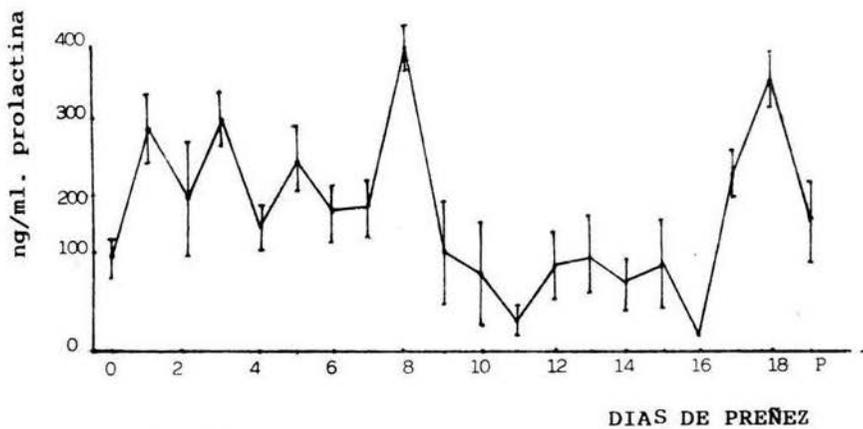


FIGURA 4. Concentraciones de prolactina en el plasma durante la gestación y el parto (P), en la ratona (Tomada de Murr., y col.1974).

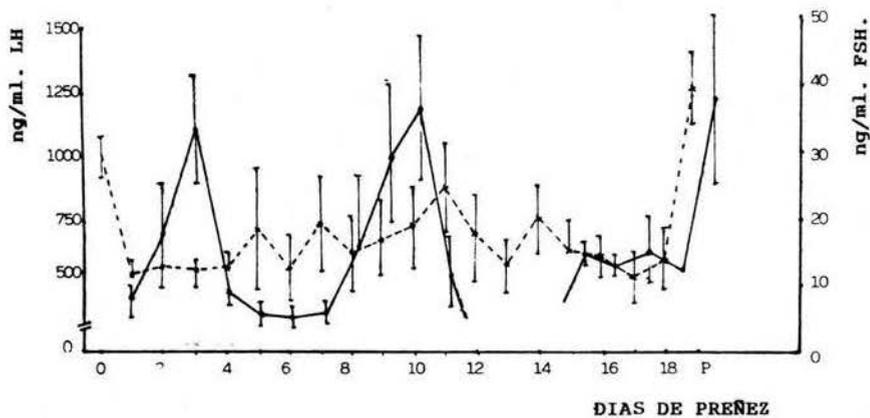


FIGURA 5. Concentraciones de LH (línea continua) y de FSH (línea punteada) en el plasma, durante la gestación y el parto (P) en la ratona (Tomada de Murr., y col.1974).

3).- Generalidades de estrógenos.

Los estrógenos se originan en el folículo de von Graaf debido a una acción conjunta entre las células de la teca interna y de la granulosa durante la fase folicular del ovario. Asimismo se producen en la fase progestacional del ciclo estral y menstrual, formándose entonces por las células tecales del cuerpo amarillo. En las hembras preñadas, los estrógenos provienen de la placenta y del cuerpo lúteo, mientras que en los machos se producen en el testículo y en la corteza suprarrenal. La acción fundamental de los estrógenos es estimular el desarrollo y mantenimiento de los órganos accesorios de la reproducción como son: oviducto, útero, vagina, genitales externos y de los caracteres sexuales secundarios femeninos.

Tanto los estrógenos como la progesterona intervienen en el desarrollo continuo del útero y de las glándulas mamarias. Los estrógenos actúan como hormona de crecimiento específico de la masa muscular uterina y contribuyen así a la fuerza contráctil que se necesitará en última instancia para expulsar el feto en el momento del parto (35).

En los mamíferos inferiores los estrógenos desencadenan el inicio del estro, el cual es evidente en la mucosa vaginal. Los estrógenos naturales pertenecen químicamente al grupo de los esteroides, los principales estrógenos naturales son (figura 6):

A).- La estrona, que se encuentra en gran cantidad en la orina de la mujer embarazada, así como en los ovarios, corteza suprarrenal y el tejido adiposo; se caracteriza por poseer además de un grupo hidroxilo en la posición 3, un grupo cetónico en el carbono 17.

- B).- El estradiol, posee 2 hidroxilos en las posiciones 3 y 17. Es el más activo de los estrógenos, es secretado principalmente por el ovario.
- C).- El estriol, con 3 grupos hidroxilo en las posiciones 3,16 y 17, se ha aislado de la orina de la mujer embarazada y sobre todo viene de la placenta, es un estrógeno de escasa potencia.

Los estrógenos en su mayor parte son inactivados por biotransformación que ocurre especialmente en el hígado. Este órgano conjuga los estrógenos para formar glucurónidos y sulfatos, por la acción de enzimas localizadas principalmente en el retículo endoplásmico liso (REL). Los metabolitos producidos son compuestos hidrosolubles que se excretan rápidamente; la quinta parte de estos productos conjugados se excretan por la bilis, en tanto el resto se elimina por la orina. Asimismo el hígado convierte los estrógenos potentes, estradiol y estrona, en el estrógeno casi inactivo denominado estriol. Estas 3 sustancias se excretan en la orina en un total de un 10%, en la forma de conjugados (18,35).

Debido a nuestro interés en la proliferación hepática, revisaremos a continuación la morfología de este órgano.

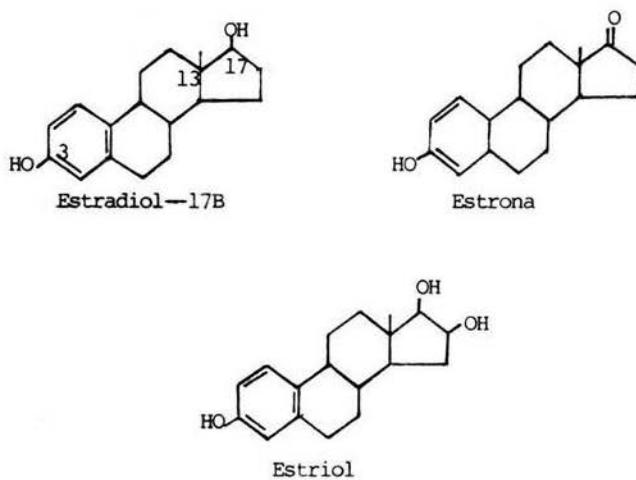


FIGURA 6 . Fórmulas de los estrógenos naturales.

4).- Estructura histológica del hígado.

El hígado es un órgano considerado como una glándula mixta, constituida por un parénquima y un estroma, el parénquima está formado por una trama de cordones celulares mezclado con capilares sanguíneos. Estos cordones están constituido por células llamadas hepatocitos que son las células más abundantes del hígado y las responsables de la mayoría de las funciones hepáticas. En muchas especies y sobre todo en los mamíferos, los cordones de hepatocitos se disponen radialmente en torno a una gran vena central, constituyendo pequeñas unidades histológicas llamadas lobulillos hepáticos.

En un corte transversal, el lobulillo tiene forma hexagonal (en el caso del cerdo) en cuyos vértices se encuentra un área porta. Las áreas portales se identifican por tener: una rama de la vena porta, otra de la arteria hepática, un vaso linfático y un conducto biliar. En el centro del lobulillo se localiza la vena central, la cual es el punto de convergencia de los sinusoides hepáticos, que son los capilares anastomosados de paredes dilatadas que bordean los cordones de hepatocitos (36).

El hepatocito es una célula de contorno poligonal con núcleo redondeado y céntrico, algunos hepatocitos son binucleados. Los núcleos tienen abundante eucromatina y uno o más nucleolos grandes. Un abundante retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi se sitúan hacia los canaliculos biliares. El retículo endoplásmico liso interviene entre otras cosas en procesos de desintoxicación y en la síntesis de glucógeno. Otros organelos regulares son: mitocondrias, lisosomas, peroxisomas, inclusiones lipídicas y pigmentos; las proporciones de estas sustancias varían según el estado funcional de la célula (33).

El estroma lo forman básicamente 4 tipos celulares: las células de Kupffer, las células endoteliales, células de Ito o adipocitos y fibroblastos. Las tres primeras están estrechamente relacionadas con las estructuras de los capilares sinusoidales, mientras que la última está presente en el tejido

conectivo de la cápsula de Glisson, en los espacios porta y próximo a las venas hepáticas (36).

Las células de Kupffer forman parte del revestimiento del endotelio, son células fagocíticas y se distinguen de las células endoteliales típicas, por su tamaño más grande y por su superficie externa irregular, que es caracterizada por poseer múltiples pliegues y ocasionalmente microvellosidades y por su reacción positiva a la peroxidasa endógena en la región perinuclear.

Las células endoteliales no son muy prominentes y forman una barrera casi ininterrumpida en la superficie de los capilares sinusoidales; presentan uniones entre sí, contienen escaso retículo endoplásmico rugoso, además pocas mitocondrias y no son notablemente fagocíticas.

Las células de Ito o adipocitos están localizadas en el espacio de Disse, generalmente en las interrupciones; son células que almacenan lípidos, debido a que contienen varios depósitos limitados por una membrana simple.

Los fibroblastos son células que secretan procolágena, mucopolisacáridos y elastina, contienen abundantes vesículas de retículo endoplásmico rugoso y un dictiosoma bien desarrollado (36).

La interacción de cada uno de estos elementos reflejan la diversidad y alta especialización de funciones de este órgano, que le permiten actuar como una glándula endócrina y exócrina. Dada la alta especialización de funciones de los hepatocitos, esto podría ser incompatible con la división celular, por lo cual a las células del parénquima hepático se les representa como células reversibles postmitóticas, en las cuales las mitosis son raras, pero se pueden incrementar en número, si el tejido es estimulado para que crezca. En el caso de las ratas y ratones los hepatocitos son de vida larga e incluso pueden sobrevivir toda la vida adulta del individuo (5).

En un animal joven, el crecimiento del hígado es por multiplicación y crecimiento celular, pero este crecimiento gradualmente disminuye a valores muy bajos, hasta que la relación del peso del hígado y el peso del cuerpo ha alcanzado su estabilidad. En las ratas las figuras mitóticas son abundantes durante las primeras tres y cuatro semanas después del nacimiento (16).

En el ratón, las mitosis en el hígado virtualmente cesan después de la 4ª y 5ª semana de edad. Subsecuentemente hay un segundo tipo de crecimiento, algunas células incrementan en tamaño y se convierten en multinucleadas o poliploides, tanto en ratas como en el ratón (8,16).

La dinámica del ciclo celular en el hepatocito es compleja, en muchas especies de vertebrados incluyendo al hombre, es frecuente encontrar en el parénquima hepático núcleos poliploides y células binucleadas y aun multinucleadas (8).

En el hígado de la rata recién nacida predominan células diploides mononucleadas, sin embargo posteriormente se acumulan células binucleadas con dos núcleos diploides y células con núcleos tetraploides.

En la rata adulta la mayoría de las células hepáticas son tetraploides y la proporción de células binucleadas es aproximadamente del 10 al 12% (34).

El significado funcional de la poliploidia y de la presencia de más de un núcleo en las células animales no se conoce, se piensa que la poliploidia podría formarse por endoreplicación y las células binucleadas por la división nuclear sin la subsiguiente división citoplásmica (8,34).

Por experimentos de autoradiografía se ha encontrado que pueden incorporar ^3H timidina tanto las células mononucleadas como las

binucleadas, de modo que ambas entran a la fase S del ciclo celular y pueden dividirse.

La regulación del ciclo celular es un proceso complejo y depende del equilibrio de factores inhibitorios y estimulativos que actúan en diversos puntos del control durante el ciclo celular.

La proliferación de hepatocitos durante la regeneración hepática se ha tomado como un modelo para estudiar los mecanismos que controlan la proliferación celular y se han detectado factores que inducen o que inhiben la proliferación hepática (3,5,14,21).

III.- ANTECEDENTES.

La preñez en los mamíferos implica cambios metabólicos y funcionales en diversos aparatos y sistemas maternos, relacionados en parte con los profundos cambios en las condiciones hormonales sistémicas y con la alta demanda metabólica impuesta a la madre por los requerimientos del embrión y posteriormente del feto, además del desarrollo y funcionamiento de un nuevo órgano, la placenta.

El hígado es una glándula que desempeña múltiples funciones fundamentales para el organismo, y durante el embarazo debe experimentar diversos cambios.

En los últimos años se han incrementado los reportes sobre la incidencia de daño hepático en la mujer. Algunos investigadores sugieren que existe una relación etiológica entre la frecuencia de hepatomas y la amplia utilización de anticonceptivos orales (2,5,10,17,24,29). En el curso del embarazo o durante el tratamiento con estrógenos y progestinas, también se han encontrado cambios histológicos hepáticos similares a los provocados por el empleo de anticonceptivos. Lo anterior ha causado interés por estudiar la posible relación entre los esteroides y el embarazo, con cambios morfofuncionales hepáticos.

Existen evidencias directas e indirectas indicativas de que el hígado es afectado por diversas hormonas implicadas en la preñez (estrógenos y prolactina) y cuya concentración sanguínea experimenta cambios marcados durante la misma.

Partes de estas evidencias provienen del estudio de la acción de anticonceptivos en el humano y en modelos animales.

En un estudio por microscopía electrónica de biopsias de hígado, tanto de mujeres jóvenes aparentemente sanas, sometidas a un tratamiento anticonceptivo hormonal y otras cursando el

tercer trimestre de gestación, como de pacientes con tumores trofoblásticos; se encontraron cambios ultraestructurales en los hepatocitos consistentes en: dilatación del retículo endoplásmico e inclusiones cristaloides intramitocondriales. Estas modificaciones señalan que en estas condiciones existe un cambio en el hepatocito, tal vez condicionado por una demanda metabólica mayor, como la que ocurre durante el embarazo, o bien que estos cambios sean el resultado de la acción directa o indirecta de hormonas esteroideas sobre estos organelos (24).

Makundan y col.(21), reportan que el exámen histológico del hígado de ratas tratadas con anticonceptivos orales, revela una alta incidencia de células binucleadas y de figuras mitóticas, así como un incremento en la incorporación de timidina al DNA.

Los cambios hepáticos relacionados con el uso de anticonceptivos orales dependen del estado nutricional del organismo, así los estudios de Makundan y Bamji (22), reportan que en ratas hembras bien nutridas y tratadas con anticonceptivos orales se incrementan: el contenido de DNA y la actividad mitótica del hígado, pero en ellas se retarda la regeneración hepática después de una hepatectomía parcial; mientras que ratas desnutridas con una dieta con 25% menos de calorías y con un 50% de los requerimientos de vitaminas A y B₁₂, tuvieron respuestas similares a las anteriores, excepto que no se retardó la regeneración. Por otro lado la más alta actividad mitótica en los hepatocitos, se encontró en las ratas desnutridas tratadas con anticonceptivos orales, mientras que la proporción de células binucleadas aumentó en el hígado de ratas bien nutridas pero no en las ratas desnutridas (22).

También se han demostrado cambios en el hígado como consecuencia de la administración de estrógenos o antiestrógenos en el organismo *in vivo* y en cultivo.

Fujii, y col.(13), demostraron que la administración oral de estrógenos naturales, causa no únicamente proliferación de células de Kuoffer sino también proliferación de hepatocitos en

ratonas adultas, sin observarse daño al hígado, tales como degeneración o necrosis. Incluso estos autores ensayaron con otras hormonas esteroides como: cortisona, testosterona y progesterona sin encontrar acción de ellas sobre la proliferación de hepatocitos. De los estrógenos naturales ensayados, el estriol resultó el más potente estimulador de actividad proliferativa de hepatocitos y la estrona fue el más débil, este hecho es interesante debido a que el estriol es el estrógeno que presenta efectos genómicos menos potentes y efectos no genómicos más intensos. Además el índice más alto de mitosis fué mil veces mayor al control. Estos autores suponen que la proliferación de hepatocitos por los estrógenos, es resultado de los efectos estimulatorios de éstos sobre el sistema reticuloendotelial, mas que por un efecto directo sobre ellos.

Los estudios de Cole y Sweeney (9), reportan que los hepatocitos de hígados de ratas tratadas con estrógenos sintéticos, presentan alargamiento del núcleo e incremento en el tamaño y número de nucléolos. Ultraestructuralmente presentan además microvelocidades más largas y más abundantes en los espacios intercelulares y las figuras mitóticas en los hepatocitos fueron más abundantes, ocurriendo con una frecuencia 6 veces más , a las 8 semanas de que las ratas fueron tratadas, que al inicio del tratamiento.

Experimentos *in vivo* e *in vitro* reportan claramente que el tamoxifeno, un agente antiestrogénico, inhibe la proliferación de hepatocitos. La inhibición es máxima cuando el tamoxifeno es inyectado *in vivo* inmediatamente después de la hepatectomía e *in vitro* cuando la droga es añadida al cultivo durante las primeras 30 horas después de la siembra; esto último podría implicar al menos *in vitro* una acción proliferogénica directa de los estrógenos sobre los hepatocitos y que el efecto inhibitorio del tamoxifeno, quizá sea debido a la habilidad de unirse a los receptores de estrógenos. El mecanismo de acción de los estrógenos y del tamoxifeno sobre la proliferación de hepatocitos, aun no se ha aclarado. Sin embargo el tamoxifeno

es capaz de inhibir a diferentes tipos celulares por bloquear la transición de la fase G₀/G₁ del ciclo celular (11). Por otro lado, en los ensayos *in vitro* el influjo de Na⁺ en el hepatocito se incrementa al añadir estrógenos al medio, esta y las propiedades mitogénicas de los estrógenos pueden estar relacionado con la progresión de los hepatocitos del estado de reposo (quiescencia) al estado proliferativo (11).

Aunque las hormonas esteroides pueden estar implicadas como agentes causantes de un número de alteraciones inducidas en la función del hígado durante la preñez; estas alteraciones pueden ser consideradas presuntivas, tomando en cuenta el gran número de factores que confluyen en este proceso.

De las hormonas importantes durante la preñez, también se ha encontrado que la prolactina podría inducir proliferación de hepatocitos *in vivo* (7).

El reporte de Buckley y col. (7), sugieren que la prolactina puede ser una hormona involucrada en la regulación fisiológica de la síntesis de DNA en el hígado. Estos experimentos demuestran a la prolactina como una potente hormona mitogénica del hígado, una simple exposición a esta hormona estimula la incorporación de ³H timidina en 48 horas en los hepatocitos en cultivo. Ellos postulan que la administración de prolactina estimula la señal de la fase G₁ del ciclo celular, que activan el ciclo, en hígados de ratas y en otros tejidos.

El estudio de Song y Kappas (32), reportan que el peso del hígado se incrementa progresivamente en ratas preñadas, manteniéndose elevado en el parto y durante la lactancia, pero declina hasta sus valores control en el primer mes después del parto, sin embargo, no se ha estudiado en que medida este crecimiento se debe a la proliferación celular.

Considerando que durante la preñez en los mamíferos ocurren fluctuaciones en las hormonas (estrógenos y prolactina) a las que se han atribuido una acción mitogénica directa o indirecta

sobre los hepatocitos, además del incremento en la demanda metabólica; es posible que los hepatocitos experimenten cambios proliferativos durante la preñez. Por otro lado, si durante el proestro del ciclo estral hay un pico estrogénico, podríamos esperar, también en asociación a él, cambios proliferativos hepáticos durante el ciclo.

IV.- OBJETIVO.

Objetivo general.

Determinar las variaciones en la actividad mitótica de los hepatocitos durante el ciclo estral y la preñez en ratonas.

Objetivos específicos:

Evaluar los siguientes cambios hepáticos durante el ciclo estral y la preñez en ratonas.

- a).- Índice mitótico de hepatocitos.
- b).- Peso hepático.
- c).- Proporción de hepatocitos binucleados.

V.- MATERIAL Y METODO.

En este estudio se utilizaron ratonas albinas *Mus musculus* cepa CD₁ de 45 días de nacidas, de un peso aproximado de 25 a 30 g; las cuales se mantuvieron en un cuarto a temperatura y humedad constante, con un ciclo de luz-oscuridad 14/10 horas (15), con agua y alimento *ad libitum*.

Después de 15 días en estas condiciones (60 días de edad, cuando se alcanza la madurez sexual), se aparearon por el sistema de trio, el cual consiste en colocar dos hembras y un macho por jaula; se revisaron todas las mañanas para detectar la presencia del tapón vaginal, lo cual nos indica el primer día de preñez. Se trabajaron grupos de 6 individuos de los días 3, 6, 9, 12, 15 y 18 de preñez; de cada etapa del ciclo estral y de 3 días de postparto.

A todas ellas el día seleccionado se les inyectó colchicina (Sigma Corp.) (13), disuelta en solución salina fisiológica a una dosis de 0.1 mg por cada 100 g de peso corporal, por vía subcutánea, entre las 8:00 y 10:00 horas; se sacrificaron 6 horas después por dislocación cervical. Se extrajo el hígado y se pesó rápidamente en una balanza de precisión, marca Ohaus modelo 310.

El lóbulo hepático lateral izquierdo se cortó en pequeños fragmentos, que se fijaron en formal amoniacado durante 12 horas. Se lavaron durante 8 horas en agua corriente, después fueron deshidratados en alcoholes graduales de 70, 80, 90, 96, 100 y 100 por ciento durante 60 minutos en cada uno; después se transfirieron a xilol durante 15 minutos y se dejaron toda la noche en aceite de cedro, posteriormente se infiltraron en parafina realizando tres cambios cada uno; por último se incluyeron y se cortaron en un microtomo rotatorio American Optical modelo 820, a 5µm. Los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina por el método convencional (19).

Los cortes se examinaron en un microscopio óptico Carl Zeiss modelo 1 standard 820, a 400X y se contaron el número de células en mitosis de un total de 3000 hepatocitos. Para esto se adaptó una rejilla con 4 cuadrantes, en el ocular del microscopio; a su vez también se adaptó un cubreobjetos marcado con dos líneas cruzadas, sobre las cuales se realizaron 5 puntos o marcas, este cubreobjetos se depositó sobre la preparación histológica, con la finalidad de seleccionar los campos que serían observados, en las zonas correspondientes a las marcas; se consideraron 5 campos en cada preparación hasta completar la cuenta de 3000 hepatocitos.

El índice mitótico se expresó como el número de células en división por cada mil células (13).

Se evaluó la población de células binucleadas por el mismo sistema de conteo. La determinación de la proporción de células binucleadas, se expresó por el número total de células binucleadas, entre el número total de hepatocitos, multiplicadas por 100 (porcentaje).

También se determinó el porcentaje del peso del hígado con respecto al peso corporal.

A los resultados se les aplicó la prueba estadística de análisis de varianza de ANOVA de un factor, por el método de Fisher, para datos de muestras de varias poblaciones. Y la prueba de Tukey, para evaluar a que condición se deben las diferencias (37).

VI.- RESULTADOS.

La actividad proliferativa del hígado es un parámetro que depende de muchos factores, que van desde las condiciones alimenticias y de salud del organismo, hasta variaciones circadianas.

Cuando se comparan los resultados del índice mitótico en las distintas fases del ciclo estral figura 8, se observa una mayor actividad mitótica durante el proestro (IM.= 0.05) que durante el estro, metaestro y diestro; siendo incluso prácticamente nula la actividad durante el metaestro. Estos resultados son no significativos ($P \geq 0.05$) cuando se tratan con ANOVA simple, lo cual nos indica que la actividad proliferativa se mantiene constante durante las 4 fases del ciclo estral.

Durante la preñez el índice mitótico de hepatocitos tiende a oscilar en intervalos similares al ciclo estral, durante los días 3,6,12 y 18 de preñez. Sin embargo se observa un marcado incremento en el número de células en mitosis en el día 9 de gestación con un índice mitótico de IM=0.267; como se observa en la figura 9. Estos resultados analizados por ANOVA simple, son significativamente diferentes ($P \leq 0.01$).

La prueba estadística de ANOVA simple no nos indica cuales medias son iguales o cuales son diferentes; por lo que se procedió a hacer la prueba de las comparaciones entre las medias de las muestras, aplicando la prueba de Tukey. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- a).- Hay diferencia significativa en la actividad proliferativa del grupo de 9 días de preñez, con una significancia de $P \leq 0.01$, con todos los demás lotes.

b).- No hay diferencia en la actividad proliferativa de todos los grupos entre si, a excepción del lote de 3 días postparto.

c).- Hay diferencia significativa en la actividad proliferativa del grupo de 3 días postparto ($P \leq 0.01$) con todos los demás grupos, excepto con el lote de 6 días de preñez.

La fotomicrografía de la figura 7 (a), muestra una preparación histológica del corte de hígado normal de una ratona, sacrificada durante la fase de diestro del ciclo estral, se observa una población celular heterogénea de células hepáticas.

Los núcleos más grandes corresponden a los hepatocitos en su disposición cordonal, los núcleos más pequeños corresponden a las células del estroma.

La fotomicrografía de la figura 7 (b), corresponde a una preparación histológica del corte del hígado de una ratona con 9 días de preñez. Su apariencia histológica en general es normal; sin embargo se observa un hepatocito en mitosis (flecha) el cual se distingue, por la disposición de sus cromosomas condensados y por la acidofilia de su citoplasma.

Las figuras 10 y 11 muestran el porcentaje de células binucleadas durante la gestación y el ciclo estral. En ellas podemos observar que las fluctuaciones durante la preñez fueron relativamente uniformes, aunque al final de la preñez, y a los 3 días postparto, existe una tendencia a disminuir, acercándose estos a los valores del ciclo estral.

Por otra parte la población de células binucleadas durante el ciclo estral resultó mucho menor que durante la gestación, aunque en esta también se presenta uniformidad entre las diferentes fases del ciclo.

No se encontraron diferencias significativas por la prueba de ANOVA simple, entre los distintos días de preñez o entre las

distintas fases del ciclo, sin embargo cuando se comparan las fases del ciclo con la preñez si hay diferencias con una $P \leq 0.01$.

En las figuras 12 y 13 se muestra cómo varía el porcentaje del peso hepático con respecto al peso del organismo en las diferentes poblaciones de ratonas.

El porcentaje del peso hepático durante la gestación presentó un comportamiento uniforme durante toda la preñez, aunque se advierte una disminución del porcentaje del peso hepático al día 18, pero este dato no fue estadísticamente significativo, y corresponde con una elevación marcada en el peso corporal, debido tal vez al crecimiento de los fetos.

Por otra parte en los valores de porcentaje del peso hepático en los animales del ciclo estral, también se advierte una población uniforme y similar, corroborado con ANOVA simple, en la cual no se presentó diferencias significativas entre los promedios de las poblaciones.

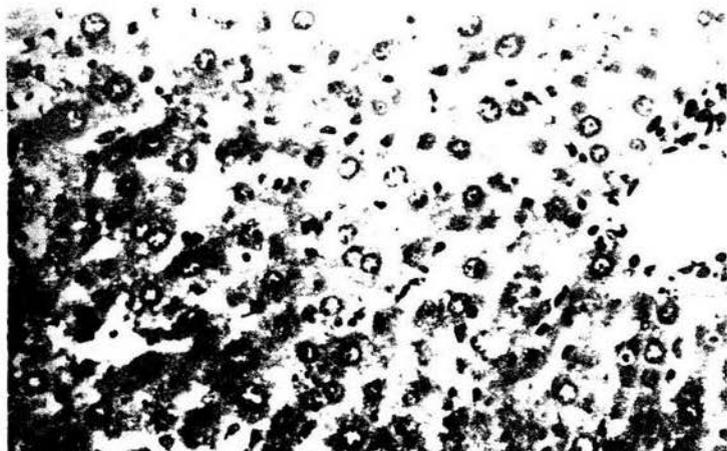


Figura 7(a). Fotomicrografía de una preparación histológica del corte del hígado de una ratona sacrificada durante el diestro del ciclo estral. Se observa una población heterogénea de células hepáticas. Los núcleos más grandes corresponden a los hepatocitos en su disposición cordonal, los núcleos más pequeños corresponden a las células del estroma (aumento 1350X).

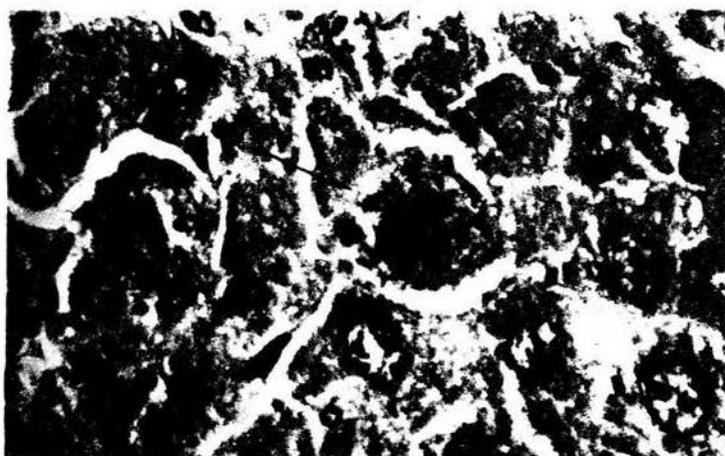


Figura 7(b). Fotomicrografía de una preparación histológica del corte de hígado de una ratona con 9 días de preñez. Su apariencia histológica es normal; sin embargo, se observa un hepatocito en mitosis (flecha); el cual se distingue por la disposición de sus cromosomas y por la acidofilia de su citoplasma (aumento 4375X).

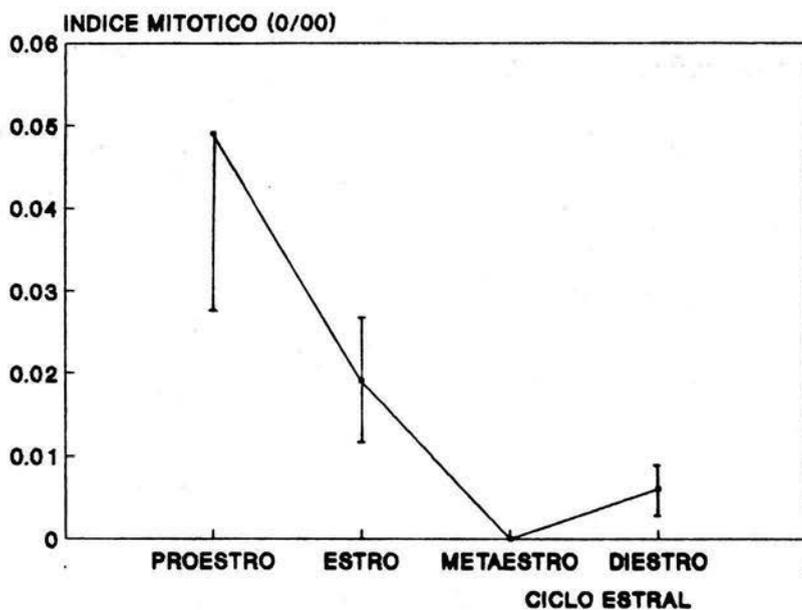


FIGURA 8. Actividad mitótica de los hepatocitos durante las diferentes etapas del ciclo estral, en ratonas ($\bar{X} \pm E.E.$).

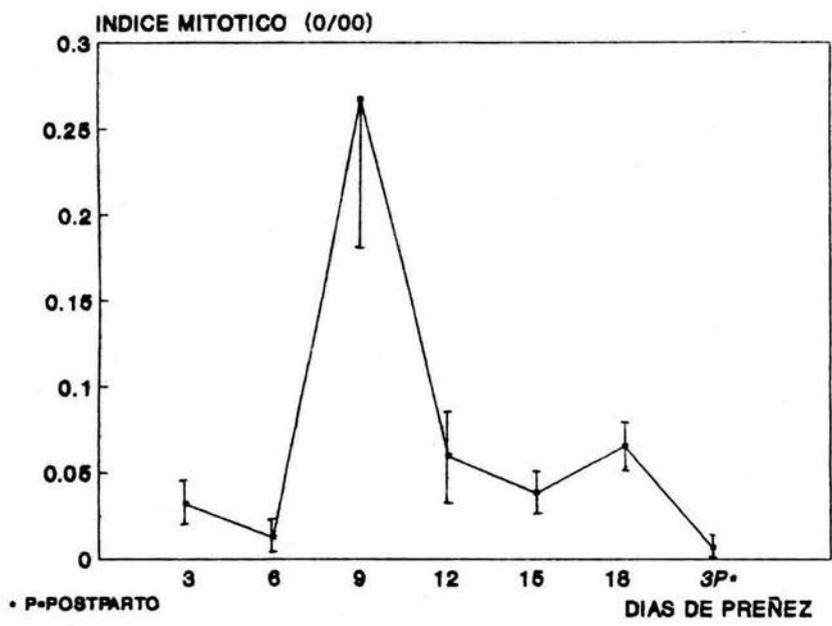


FIGURA 9. Actividad mitótica de los hepatocitos durante la gestación en ratonas ($\bar{X} \pm E.E.$).

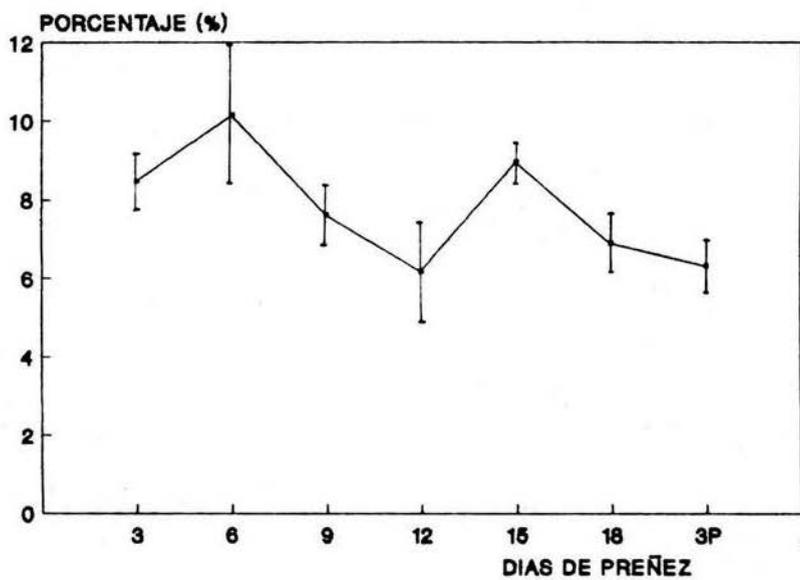


FIGURA 10. Población de células binucleadas durante la gestación en ratonas.
 ($\bar{X} \pm E.E.$).

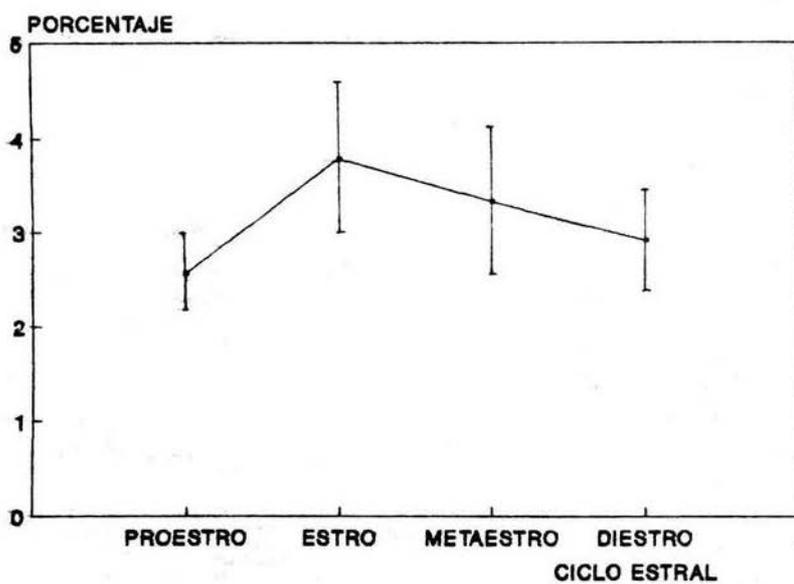


FIGURA 11. Población de células binucleadas durante las diferentes etapas del ciclo estral ($\bar{X} \pm E.E.$).

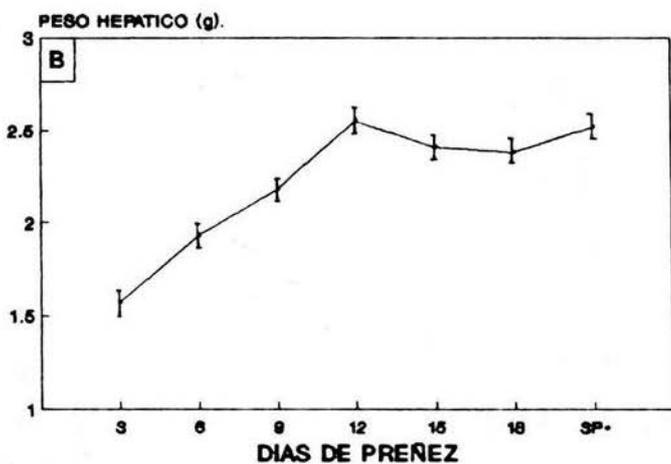
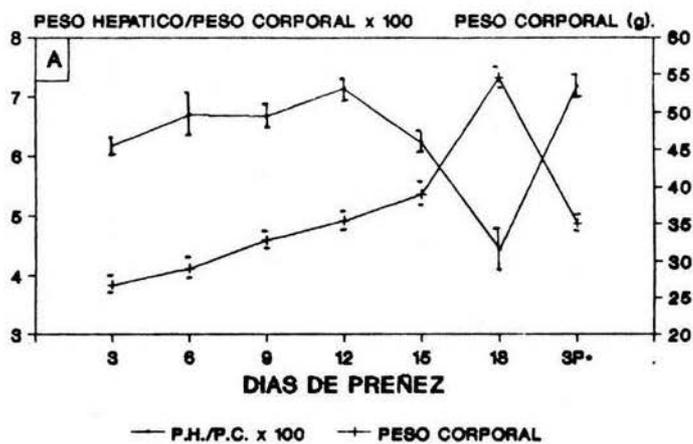


Figura 12. Porcentaje del peso hepático, peso corporal (A) y peso hepático (B) durante la gestación en ratona, ($\bar{X} \pm E.E.$).
 * Postparto.

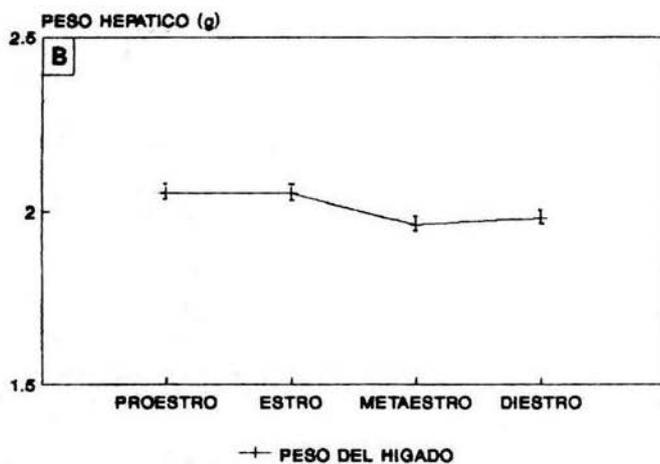
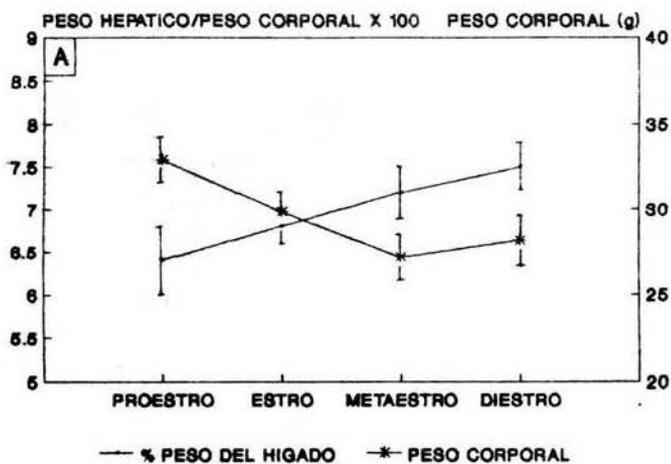


Figura 13. Porcentaje del peso hepático, peso corporal (A) y peso hepático (B) durante el ciclo estral en ratona, ($\bar{x} \pm E.E.$).

VII.- DISCUSION.

Los hepatocitos de un organismo adulto bajo condiciones fisiológicas normales, raramente se dividen, sin embargo en respuesta a daño tisular o remoción quirúrgica de partes del hígado, experimentan replicación del DNA seguida de la división celular, en forma parcialmente sincronizada.

Sin embargo, la dinámica del ciclo celular del hepatocito es compleja y esta célula en el adulto en etapa G₀ postmitótica, más que la regla es la excepción, ya que son abundantes las células poliploides o binucleadas y los hepatocitos pueden experimentar replicación del DNA o división celular completa o incompleta, en diversas condiciones fisiológicas durante la vida de un organismo.

De acuerdo a diferentes estudios los cambios observados en la actividad proliferativa del hígado, pueden depender de varios factores, entre los cuales podemos considerar; el estado funcional del órgano, la demanda metabólica (24), el estado nutricional del organismo (22), disfunciones hepáticas (32), etc.

Durante la gestación el organismo materno experimenta cambios fisiológicos marcados: entre ellos es importante señalar modificaciones en la producción de hormonas como: las gonadotrofinas, la prolactina, los estrógenos y la progesterona; y el aumento en la demanda metabólica.

Los cambios hormonales a su vez inducen cambios en los diversos sistemas y órganos, en donde el organismo materno se adapta para proveer los requerimientos nutricionales y energéticos del nuevo ser en desarrollo. Ambos factores pueden influir en forma importante en el hígado, dadas las múltiples funciones de este órgano. En nuestro estudio, encontramos un aumento

estadísticamente significativo en el índice mitótico de los hepatocitos al 9º día de preñez, con respecto a los demás días de gestación y el ciclo estral; lo anterior se puede atribuir: o al estado funcional del órgano impuesto por el aumento en la demanda metabólica o a la acción de las variaciones hormonales propias del embarazo; dentro de las cuales se encuentran hormonas a las que se le han atribuido efectos mitogénicos sobre el hígado. discutiremos esto a continuación, sin embargo, considerando las múltiples variables que intervienen en la preñez será en mucho especulativo. Debe resaltarse como parte importante de este trabajo, que se encontró variación proliferativa hepática, en un proceso fisiológico normal y no bajo la administración farmacológica de hormonas.

Se conocen ampliamente las propiedades mitogénicas de los estrógenos sobre los órganos reproductores, el hígado de mamíferos durante mucho tiempo no se consideró un órgano blanco de estrógenos, sin embargo este concepto está cambiando, ya que los hepatocitos presentan receptores a estrógenos (27), y varios reportes indican un efecto de anticonceptivos orales y estrógenos sobre ellos.

La apariencia del hígado al microscopio de luz y electrónico es similar en mujeres embarazadas y mujeres que emplean anticonceptivos esteroides, lo que nos hace suponer que los cambios hepáticos durante la preñez, puedan depender de los cambios en las hormonas esteroideas; a la progesterona no se le ha encontrado efecto mitogénico, pero a los estrógenos sí (13), sin embargo, no existe un acuerdo en si el efecto mitogénico de los estrógenos sobre los hepatocitos es directo o indirecto.

De acuerdo a Fujii y col.(13), cuando se administraron estrógenos naturales a ratonas, se observa la respuesta proliferativa de los hepatocitos 5 días después, mientras que en las células de Kupffer, se presentó al tercer día de administrada la hormona. Ellos sugieren, que la proliferación de los hepatocitos, está estrechamente relacionada con los

efectos estimulatorios de esta hormona sobre el sistema reticuloendotelial.

Aunque nuestros estudios presentaron mucha variabilidad, el mayor índice mitótico durante la preñez se presentó en el noveno día, el cual corresponde al 5º día después de la oleada de estrógenos, que ocurre aproximadamente en el 4º día de preñez lo que concuerda con lo encontrado por Fujii y col. (13) (figura 2): lo cual nos hace considerar a los estrógenos como una posible causa de este incremento en la actividad proliferativa.

Sin embargo, por el día 15 de preñez se alcanza concentraciones sanguíneas de estrógenos similares a los del día 4 y posteriormente siguen aumentando alcanzando un máximo al día 19, acorde a esto podríamos esperar un incremento proliferativo en los hepatocitos al fin de la preñez y 3 días postparto , el cual no fué observado; sin embargo, lo anterior no excluye la posibilidad de que los estrógenos sean los estimuladores de la proliferación observada al día 9, ya que la acción de los estrógenos sobre otros tejidos (endometrio) no siempre es la misma y depende en mucho si ha sido expuesto a otras hormonas (como la progesterona) o de un estado funcional transitorio dentro del ciclo estral o durante la preñez.

Es notorio que la concentración sérica de progesterona es alta al día 4 de preñez y cae en los últimos días de la misma (figura 3). Además las concentraciones de otras hormonas son muy distintas al principio y al final de la preñez (figura 5), de modo que la acción de los estrógenos sobre el hígado podría depender de ello.

Además en la segunda mitad de la preñez, la placenta es un órgano muy activo que podría producir hormonas o factores que modifiquen la acción de los estrógenos sobre el hígado.

Otra hormona que varía en forma importante durante la preñez y que puede afectar a los hepatocitos es la prolactina. Los

hepatocitos poseen receptores a la misma, y esta tiene un efecto mitogénico sobre ellos (7,27).

El incremento de la actividad proliferativa del noveno día podría depender también, de la acción de la prolactina, ya que las variaciones de esta a lo largo de la gestación son muy similares a la de los estrógenos, encontrándose una mayor concentración sérica en la primera mitad de la gestación en la ratona con una elevación notable al día 8 (figura 4): las concentraciones bajan durante la segunda mitad de la gestación, a excepción del día del parto. Esto podría explicar parcialmente, la baja actividad proliferativa de las ratonas de nuestro estudio al final del embarazo. La actividad proliferativa encontrada en nuestro estudio, también podría deberse a la acción combinada de ambas hormonas.

Consideramos que es poco probable, que la elevación proliferativa de hepatocitos del día 9 de preñez sea debida a una adaptación a la demanda metabólica propia de la gestación, ya que esta sería mayor al final de la misma, y debería encontrarse un aumento en la proliferación de hepatocitos conforme avanza la preñez.

El exámen histológico del hígado, reveló una mayor frecuencia de células binucleadas durante la gestación, que durante el ciclo estral, aunque el comportamiento dentro del ciclo o de la preñez fue relativamente uniforme. Durante la preñez el porcentaje de células binucleadas es del 6 al 10%, y se mantiene similar al tercer día postparto, mientras que durante el ciclo estral fue del 2.5 al 4%.

En algunos trabajos también se ha encontrado una relación entre estrógenos y una alta proporción de células binucleadas (21,22,34). Sin embargo, la razón de esta relación y la causa de las células binucleadas aún no se conoce, aunque las células binucleadas se han relacionado con actividad proliferativa sin citocinesis.

El incremento en el porcentaje de células binucleadas durante la gestación ocurre al principio de la misma y podría depender de la acción de hormonas como la prolactina, cuya concentración sérica se incrementa al inicio de la misma; consideramos que no se debe a la acción de los estrógenos, que se elevan al 4º día de preñez, posiblemente este estímulo al principio de la gestación no sea suficiente como para que ocurra la división citoplásmica, y con la elevación más tardíamente al día 4 de estrógenos y el incremento de prolactina al día 8, algunas células pueden llevar a cabo la división completa, observándose un aumento del índice mitótico al día 9 de preñez.

No sabemos si las células binucleadas se hayan formado al inicio de la preñez y permanezcan así o continuamente se estén recambiando, en nuestro estudio no observamos metafases de células binucleadas.

Sin embargo la frecuencia de células binucleadas se mantiene relativamente constante durante la preñez y el 3º día postparto, es posible que influya en ello un factor que se mantenga constante durante este proceso como el aumento en la demanda metabólica.

También habría que considerar las posibilidades de un efecto tóxico de la colchicina y de una mayor susceptibilidad a ella por los hepatocitos durante la preñez; pero podría descartarse en base a la larga duración del ciclo del hepatocito y al relativamente corto tiempo de exposición de la colchicina. Cabe señalar aun la pregunta, ¿ si las células binucleadas son indicadora de la acción de un hepatotóxico ?, o de la mayor susceptibilidad a la colchicina durante la preñez.

Nuestros datos con respecto al peso del hígado y al peso corporal, muestran que se presentó un incremento en el peso corporal de la ratona, conforme avanzaba su estado de gravidez, hay un incremento marcado en el peso corporal entre el día 15 al 18 de preñez y después del parto el peso disminuye

a un valor similar al día 15, por tanto debe de haber una etapa de crecimiento fetal rápido al final de la misma.

Por otro lado el análisis estadístico, confirma que no hay diferencias en los pesos del hígado durante la gestación, aun con respecto al ciclo estral. Lo anterior contrasta con lo reportado para la rata (31), en que se encontró que el peso del hígado se incrementa conforme la preñez avanza, por lo que podemos decir que en la ratona se observa un comportamiento diferente que puede depender de una estrategia adaptativa relacionada con el tamaño del animal y diferencias en la dependencia del proceso reproductivo a las condiciones energéticas derivadas de ello (4), ya que el ratón es un organismo de talla pequeña, que casi no almacena energía como grasa y emplea gran parte de las calorías obtenidas de sus alimentos en termorregulación.

VIII.- CONCLUSIONES.

- 1.- El índice mitótico de hepatocitos durante el ciclo estral en ratonas CD₁ no presentó diferencias significativas durante el ciclo estral. En la preñez el índice mitótico fué similar a lo encontrado en el ciclo estral durante los días 3,6,12,15 y 18 de gestación. Sin embargo en el noveno día se encontro un marcado incremento del mismo, aproximadamente 5 veces mayor a los otros días estudiados.
- 2.- No se detectaron cambios en el porcentaje de células binucleadas de los hepatocitos durante el ciclo estral (2.5 al 4%), la proporción de éstas se incrementa notablemente al inicio de la preñez y se mantiene elevado durante la misma (6 al 10%).
- 3.- No se observaron diferencias significativas en los pesos hepáticos de las ratonas durante la gestación y el ciclo estral, contrario a lo reportado en la rata; lo anterior tal vez este relacionado a un mayor requerimiento de energía para termorregulación en animales pequeños como el ratón.
- 4.- La actividad mitótica presente en el noveno día de gestación, y la alta proporción de células binucleadas durante la misma, podrian deberse a la acción de la prolactina o de los estrógenos; o a la acción conjunta de ambas hormonas, ya que ha ambas se les ha atribuido una acción mitogénica sobre los hepatocitos y también varían notablemente durante la gestación.

IX. REFERENCIAS.

- 1.- Barrignston,E.J. (1975). Introducción a la endocrinología general y comparada. Blume.,Madrid.,p.145-151.
- 2.- Baum,J., Bookstein,J., Holtz,F., Kein,E. (1973). Possible association between benign hepatomas and oral contraceptives. Lancet. 27:926-29.
- 3.- Braun,L., Mead,J., Panzaica,M., Mikumo,R., Bell,G., Fausto,N. (1988). Transforming growth factor *B* mRNA increases during liver regeneration: a possible paracrine mechanism of growth regulation. Proc.Natl.Acad.Sci. 85:1539-43.
- 4.- Bronson,F., Risman,E. (1986). The biology of puberty. Biol. Rev. 61:157-195.
- 5.- Bucher,N. (1967). Experimental aspects of hepatic regeneration. New. Engl. J. Med.277(13):686-696.
- 6.- Buckley,A., Putman,Ch., Montgomery,D., Haddock,D. (1986). Prolactin administration stimulates rat hepatic DNA synthesis. Biochem. Biophy. Res. Commun. 38(3):1138-45.
- 7.- Buckley,A., Putman,Ch., Russell,D. (1988). Prolactin as a mammalian mitogen and tumor promoter., Adv. Enzyme. Regul. 27(4):371-391.
- 8.- Carriere,R. (1967). Polyploid cell reproduction in animal adult rat liver. Exptl. Cell. Res. 46:533-540.
- 9.- Cole,M.F., Sweeney,M.D. (1980). Changes in rat hepatocyte plasma membranes caused by synthetic estrogens. Lab.Invest. 42(2):225-230.

- 10.- Dixit,S:P: (1980). Liver and the contraceptive pill. Can. J: Surg. 23(3):222-27.
- 11.- Francavilla,A., Polimeno,L., Dileo,A., Barone,M., Ove,P., Coetzee,M., Eagon,P., Makowra,L., Ambrosino., Mazzaferro,V., Starzl,T. (1989). The effect of estrogen and tamoxifen on hepatocyte proliferation *in vivo* and *in vitro*. Hepatology 9(4):614-620.
- 12.- Fox,R., Lair,C. (1970). Sexual cycles., en Hafez,E. (Ed.). Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. Lea & Febiger., Philaladelphia., p. 107-122.
- 13.- Fujii,H., Hayama,T., Kotani,M. (1985). Stimulating effect of estrogens on proliferation of hepatocyte in adult mice. Acta Anat. 121 (3):174-178.
- 14.- Fujji,H., Kotani,M. (1986). Promoting effect of estrogen on regeneration of the liver transplanted to on ectopic site in mice. Virchows Arch. 409:453-460.
- 15.- Halberg,F., Barnum,C.(1961). Continuous light or darkness and circadian periodic mitosis and metabolism in C₁ and D_e mice. Am. J. Physiol. 201(2):227-230.
- 16.- Leduc,E. (1964). Regeneration of the liver., Roviller,Ch. (Ed.), Academic Press., Engl. p.63-83.
- 17.- Lingeman,C.H. (1974). Liver-cell neoplasms and oral contraceptives. Lancet 12:12-64.
- 18.- Litter,M. (1988). Farmacologia experimental y clinica., 7^a Ed., El Ateneo., Buenos Aires., p.1872,1183-1196.
- 19.- Luna,L.G. (1968). Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology., 3^a Ed. McGraw Hill Book Company., New York., p.258.

- 20.- McCormack, J., Greewald, G. (1974). Progesterone and oestradiol-17 β concentrations in the peripheral plasma during pregnancy in the mouse. *J. Endocr.* 62:101-107.
- 21.- Makundan, M.A., Krishnamurthi, D., Bamji, M.S. (1981). Liver regeneration after partial hepatectomy in oral contraceptive-treated female rats. *Biochem. Med.* 26:222-230.
- 22.- Makundan, M.A., Bamji, M.S. (1984). Liver regeneration in oral contraceptive treated female rats-effects of moderate malnutrition. *Horm. Metabol. Res.* 16:641-645.
- 23.- Marchlewska, A. (1983). Pregnancy blocking by pheromones., in Vandenberg, F. (Ed.). *Pheromones and reproduction in mammals.* Academic Press Inc., New York., p. 151-171.
- 24.- Martinez, M.J., Aznar, R.R., Bautista, O.J., Gonzalez, A.A. (1970). La ultraestructura de la célula hepática en mujeres bajo el efecto de hormonas esteroides: anticonceptivos orales, embarazo normal y tumores trofoblásticos. *Arch. Inv. Med. Méx.* 1:25-44.
- 25.- Morishige, W., Pepe, G., Rothchild, I. (1973). Serum luteinizing hormone, prolactin and progesterone levels during pregnancy in the rat. *Endocr.* 92(5):1527-30.
- 26.- Murr, S., Bradford, E., Geschwind, I. (1974). Plasma luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin during pregnancy in the mouse. *Endocr.* 94(1):112-116.
- 27.- Roy, A., Chatterjee, B. (1983). Sexual dimorphism in the liver., *Ann. Rev. Physiol.* 45:37-50.
- 28.- Sadleir, R. (1982). Ciclos y temporadas., Austin, C., Short, R., Células germinales y fertilización. *La Prensa Medica Mexicana.* p.89-106.

- 29.- Schaffener, F. (1966). The effect of oral contraceptives on the liver. *Jama* 198(9):1019-21.
- 30.- Short, R. (1982). Papel de las hormonas en los ciclos sexuales., Austin, C., Short, R. (Ed.). *Hormonas en la reproducción*. La Prensa Medica Mexicana., p.62-71.
- 31.- Song, C., Kappas, A. (1970). The influence of hormones on hepatic function., en Popper, H. Schaffner, F. (Ed.). *Progress in liver diseases Vol.III.*, Grune & Stratton, New York. p.89.109.
- 32.- Song, Ch., Kappas, A. (1980). The influence of estrogens, progestins and pregnancy on the liver., en Farber, E. & Fisher, M. (Ed.). *Toxic injury of the liver., Part B.*, Marcel Dekker New York. p.147-195.
- 33.- Starch, V., Welsch, V. (1973). Introducción a la citología e histología comparada de animales. Urmo., Barcelona., p.273-279.
- 34.- Steiner, J., Perz, Z., Taichman, L. (1966). Cell population dynamics in the liver. *Exp. Mol. Pathol.* 5:46-181.
- 35.- Tepperman, J. (1975). *Fisiología metabólica y endócrina*. 3ª Ed. Interamericana. México. p.81-102.
- 36.- Valadez, S.J. (1986). Homeostasis del tejido conjuntivo hepático: las células de Kupffer. Tesis Profesional ENEPI.UNAM.
- 37.- Wayne, D. (1977). *Biestadística.*, Limusa., México., p.485-87.
- 38.- Whittingham, D., Wood, M. (1983). *Reproductive physiology.*, Foster, H. & Fox, F. (Ed.). *The mouse in biomedical*

research., Vbl.III., Academic Press Inc., New York.,
p.138-158

- 39.- Widman,M., Fahimi,D. (1976). Proliferation of endothelial
cells in estrogen-stimulated rat liver. Lab. Invest.
34(2):141-149.