

Procesamiento digital de imágenes en el estudio de las estructuras fibriales interlobulillares del hígado humano: esqueleto intrahepático

Hernández, Horacio A.; Filipovic, Gladys N.; Madariaga, María J.; Lugano, María C.; Alvarez, Sandra L.; Trapé, Marcela E.; Kraiselburd, Berta B.; Oriti, Sandra A.

Area Morfología. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.
Suipacha 570 - (2000) Rosario - Santa Fe - Argentina.
FAX 0341-4804598.

RESUMEN: El hígado de los mamíferos presenta variantes estructurales dentro del mismo orden taxonómico. Se han descrito alrededor de 80 especies, de las cuales 70 presentan una estructura lobulillar formada por lobulillos hepáticos perfectamente definidos por tabiques conjuntivos completos mientras que las restantes presentan una estructura pseudolobulillar sin división de lobulillos concreta o aparente. Microscópicamente, la pseudolobulillar se manifiesta por áreas perilobulillares del mismo color pero en tono más intenso que el resto del lobulillo cuando se utilizan técnicas de coloración como Tricrómicas (Van Gieson o Masson), PAS o Bielchowsky. Con el objetivo de identificar, aislar y resaltar lo observado en dichas coloraciones, se recurrió a la asistencia de la computación. El Análisis Digital de Imágenes (A.D.I.) aplicado a fotos de preparaciones de hígado humano coloreadas con Tricrómica de Masson y Bielchowsky permitió apreciar con mucha mayor definición elementos fibrilares estructurales que no aparecían tan evidentes en las fotos de las coloraciones originales.

Palabras clave: hígado humano - parénquima hepático - Análisis Digital de Imágenes

SUMMARY: The liver of mammals presents structural variants within the same taxonomic order. Around 80 species have been described, 70 of which present a lobular structure formed by hepatic lobules perfectly defined by complete connective walls whereas the remaining ones present a pseudolobular structure, without concrete or apparent lobular division. Microscopically, the pseudolobulation is manifested by perilobular areas of the same but more intense color that the rest of the lobule when using stain methods like Trichromes (Van Gieson or Masson), PAS or Bielchowsky. A computer assisted study was performed to identify, isolate and highlight the observations made by the above mentioned methods. With Digital Image Analysis (D.I.A.), applied to human liver slides pictures, stained with Masson Trichrome and Bielchowsky methods, it is appreciated a greater definition of structural fibrillar elements that were not so evident in the original pictures.

Key words: human liver - hepatic parenchyma - Digital Image Analysis.

Introducción

Estudiando el hígado de los mamíferos, observamos que esta clase taxonómica de animales no posee una única estructura hepática en la totalidad de sus órdenes. Los mamíferos pueden dividirse en dos grupos perfectamente definidos: a) el que posee una lobulillar hepática perfectamente definida, formada por unidades discretas, poliédricas, limitadas entre sí por tabiques conjuntivos perfectamente

visibles. Este grupo está representado por un pequeño número de casos (alrededor de 8 especies) (Foto 1). b) el grupo cuya lobulillar es muy imperfecta, reduciéndose la presencia de tejido conjuntivo interlobulillar a los llamados espacios porta y a algunas trazas de diferente espesor, rudimentarias, más o menos largas, muchas veces interrumpidas por tejido hepatocítico. Eventualmente se observa alguna figura poligonal perfectamente delineada. En este grupo se encuentran los casos más numerosos, entre los cuales está incluido el género humano (Hominidea) (Foto 2).

Las preparaciones histológicas de tejido hepático humano, que fueron objeto de nuestro estudio por otros motivos experimentales, han venido demostrando, de acuerdo con un mayor o menor contraste fotográfico inducido ya sea en el proceso de exposición o

* Este trabajo ha sido presentado en forma de comunicación oral en las "XII Jornadas Científicas de la Sociedad de Biología de Córdoba" - 28 de junio al 2 de julio de 1999 - Villa de Merlo y ciudad de Córdoba.

revelado, la presencia de una pseudo-demarcación muy débil, representada por un sombreado hipercrómico que se aprecia a la manera de una banda divisoria interlobulillar que carece de estructura conjuntiva manifiestamente objetiva y/o estructural.

El desarrollo embriológico de los hígados, en las distintas especies de mamíferos, se manifiesta de forma similar durante las etapas de dicho desarrollo. En el proceso general se observa un núcleo conjuntivo interior (mesodérmico), llamado Septum Transverso, que separa el celoma intraembriionario en dos partes, una superior que dará origen a la cavidad torácica, y una inferior, origen de la cavidad que en este momento debemos llamar abdominopélvica. Al interior de este conglomerado tisular penetra y se desarrolla el brote endodérmico que, proveniente de la parte terminal del intestino anterior, da origen a la porción hepatocítica del hígado. Este esbozo hepático se cubre y a la vez es penetrado por el tejido del Septum Transverso. Esta penetración dará origen a los lobulillos hepáticos, tomando jerarquía de tabique en los siguientes órdenes:

1) Suidos: cerdo de granja o doméstico y salvaje, jabalí y pecaí (14, 15).

2) Camélidos del viejo mundo: dromedario y batriano (5, 8, 10-13). No se han encontrado referencias sobre los camélidos americanos: llama (alpaca), vicuña y guanaco.

3) Carnívoros, plantígrados úrsidos: oso pardo, negro, gris y polar (2-8).

4) Carnívoros, procionidos: oso lavador (mapache) (5, 6, 8, 12).

5) Roedores: degú (rata de las madrigueras) (9).

En los otros órdenes, durante el desarrollo embrionario, el tejido conjuntivo que conformaba el Septum Transverso pierde su estructura inicial y sólo quedan algunos restos que de alguna manera estarían manifestándose en las separaciones interlobulillares a manera de una sombra densa periférica al lobulillo.

En la tecnología moderna, han hecho su aparición en todos los campos de la ciencia los procedimientos de ordenación y computación de datos por métodos digitales. El uso de computadoras personales de fácil manejo ha traído como consecuencia directa una explosiva adquisición de datos y desarrollo de métodos rápidos para su obtención y comparación, aplicables también a estructuras histológicas, especialmente el Análisis Digital de Imáge-

nes (A.D.I.). Un programa de procesamiento de imágenes puede utilizarse tanto en observaciones microscópicas directas como en fotografías (tiempo real o remoto) en blanco y negro o color, o microfotografías. Los resultados ampliamente satisfactorios comunicados por otros autores y los hallados por nosotros nos decidieron a aplicar estos métodos computarizados al estudio de la estructura conjuntiva de los discutidos tabiques interlobulillares hepáticos.

El primer objetivo planteado fue el análisis del destino de los tabiques embrionarios iniciados a partir del Septum Transverso mesodérmico en el hígado humano y la posibilidad de demostrar objetivamente los restos interlobulillares de los mismos en el hígado adulto. En una primera etapa, implementamos la aplicación de la computación a través del A.D.I. con el objetivo de comprobar si resulta una herramienta útil para resaltar elementos fibrilares que no aparecen destacados en coloraciones de rutina y conocer detalles sobre su organización estructural.

Ekataksin y Wake (16) han publicado un trabajo tridimensional muy completo sobre el esqueleto conjuntivo reticular en el hígado de cerdo que tendría cierta correspondencia con nuestro estudio en hígado humano.

Material y Método

Para la realización de este trabajo se utilizaron 10 biopsias de hígado humano con morfología normal, obtenidas de autopsias realizadas y protocolizadas en el Instituto Médico Legal de Rosario, provenientes de muertes accidentales. Las mismas se fijaron en formalina al 10% y se procesaron histológicamente hasta su inclusión en parafina. Se realizaron cortes de 7 micras, los cuales fueron coloreados mediante los métodos tricrómicos de Van Gieson y Masson y la impregnación argéntica de Bielchowsky (17) y fotografiados usando película Fuji 35mm 100 ASA. Las fotografías correspondientes a las coloraciones de Bielchowsky y Tricrómica de Masson fueron escaneadas mediante un scanner Genius full-page e ingresadas como datos para el procesamiento de las imágenes (18-23). Se utilizó una PC con microprocesador Pentium Celerón, de 64 Mb de RAM y un disco rígido de 6,2 Gb. El software para el desarrollo del A.D.I. fue el K.Y.E. Photolmpact. Se utilizó la función "Rotación de paleta" para:

1- Definir los distintos grados de saturación del color con el fin de diferenciar estructuras que, de otro modo, aparecen al ojo humano como una biomasa homogénea;

2- Resaltar con relieves los diferentes grados de saturación de color;

3- Eliminar aquellos colores que representaban estructuras que no eran de interés para el estudio.

Las imágenes fueron obtenidas con una impresora Hewlett Packard 693 C.

Resultados y discusión

La foto 3 muestra las áreas perilobulillares ampliamente contrastadas mediante la utilización de la impregnación argéntica de Bielchowsky. El recuadro marca la zona de la fotografía sometida al A.D.I.

Se han marcado cuatro pseudolobulillos específicos utilizados en el procesamiento.

La foto 4 muestra la pseudolobulillación del hígado humano que se manifiesta por la presencia de áreas perilobulillares de igual color pero más intenso que el resto del lobulillo, utilizando la coloración tricrómica de Masson. El área total de la foto fue sometida al proceso de A.D.I.

A modo ilustrativo, la Figura 1 (a, b, c y d) muestra imágenes obtenidas de las distintas etapas del proceso de A.D.I. correspondiente a la coloración de Bielchowsky:

La Figura 1a corresponde al efecto Neón que resalta estructuras en base a relieves.

Las Figuras 1b y 1c son productos de cambios realizados en los colores.

La Figura 1d corresponde al efecto Emboss que pone de sobrerrelieve la parte densa de la foto original mientras que la parte central queda en bajorrelieve.

La Figura 2 muestra el resultado final del proceso de A.D.I. correspondiente a la coloración de Bielchowsky, donde aparece una imagen fibrilar perilobulillar nítida y contrastada.

La Figura 3 muestra el resultado final del proceso de A.D.I. correspondiente a la coloración Tricrómica de Masson, donde aparece una imagen puntillada reticular en las zonas perilobulillares. No se muestra, como se hizo en el caso anterior, la secuencia de imágenes intermedias del procesamiento.

En el procesamiento de la foto correspondiente a la coloración de Bielchowsky podemos observar

que las imágenes reproducen fielmente la trama fibrilar puesta en evidencia por la impregnación argéntica, aunque con mayor definición como consecuencia de su separación digital del resto del tejido.

En el procesamiento de la foto correspondiente a la coloración Tricrómica de Masson podemos observar como resultado final una imagen reticular que se corresponde con las áreas perilobulillares más oscuras que se observan en la foto original. Se obtiene así una muy mejorada imagen de una supuesta trama fibrilar que no se pone en evidencia mediante la coloración.

A partir de los resultados obtenidos con la aplicación del ADI al estudio selectivo de ciertos elementos estructurales de los tejidos podemos considerar que este método podría resultar una herramienta útil para resaltar dichos elementos aislándolos y sobreexpresándolos, aun cuando las coloraciones originales no los pongan de manifiesto claramente.

Podemos utilizar estos resultados como punto de partida para el estudio de elementos resaltados a través del A.D.I. aplicándolo a otras coloraciones como Van Gieson, Orceína o PAS.

También sería de utilidad la implementación del A.D.I. en el estudio de casos de patología hepática donde se encuentre comprometida su trama fibrilar (fibrosis, cirrosis).

Las imágenes obtenidas por A.D.I. no proporcionaron mayores datos sobre la organización estructural de la trama perilobulillar. Estudios tridimensionales podrían contribuir a un mayor conocimiento sobre su distribución espacial.

Conclusión

Se pudo constatar que el A.D.I. resulta un elemento de trabajo útil y válido cuando se quieren destacar estructuras o elementos histológicos que aparecen poco claros con coloraciones de rutina. Se debería ampliar el uso de esta técnica para otras coloraciones y características del tejido a fin de conocer los alcances de este aporte.

Agradecimientos

A la histotecnóloga Alejandra I. Martínez, por su colaboración en el procesamiento histológico de las muestras. Al Técnico Químico y Analista de Sis-

temas Operativos Sr. Sebastián H. Hernandez, quien desarrolló el software sin el cual el trabajo no hubiera sido posible.

Bibliografía

- 1- Rappaport, A.M.; Borowy, Z.J.; Loughheed, W.M. and Lotto, W.N., 1954. Subdivision in exagonal liver lobule in structural and functional unit. Role in hepatic physiology and pathology. *Anat. Record* **119**: 11-13.
- 2- Braus, H., 1924. "Anatomie des Menschen Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte". Julius Springer, Ed. (Berlin).
- 3- Mac Indoe, A.H., 1928. Vascular lesions of portal cirrhosis. *Arch. Patol. Lab. Med.* **5**: 23-42.
- 4- Pfuhl, W., 1932. "Die Leber, In Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen" Ed. Springer (Berlin),
- 5- Elias, H. y Sherrick, J.C., 1969. "Morphology of the liver". Academic Press. (New York).
- 6- Jones, A.L. y Spring-Mills, 1988. "The liver and gallbladder" from L. Weiss Histology textbook. Ed. Urban & Schwarzenberg (Baltimore). 687-714.
- 7- Teutsch, H.F., 1980. Regionality of glucose-6-phosphate hydrolase in the liver lobule of the rat. Metabolic heterogeneity of portal and septal sinusoids. *Hepatology* **8**: 311-317.
- 8- Jones, A.L., 1988. "Anatomy of normal liver" from D. Zakim and T.D. Boyer Liver Disease Textbook. Ed. Saunders (Philadelphia). 1, 3-30.
- 9- Opper, A., 1900. Mundhöhle, Bauchspeicheldrüse und Leber. In: Lehrbuch der vergleichenden mikroskopischen Anatomie der Wirbeltiere. Ed. Gustav Fischer, Jena, Vol. III.
- 10- Turner, W., 1877. Note on the lobule and the connective tissue of the Camel's liver. *Journal Anat. Physiol* **11**: 311-317.
- 11- Braus, H., 1924. "Anatomie des Menschen, Einlehrbuch für Studierende und Ärzte". Julius Springer (Berlin).
- 12- Arey, L.B., 1932. On the presence of the so-called portal lobule in the seal's liver. *Anat. Rec.* **81**: 318-322.
- 13- Kelly, D.E.; Wood, R.I. and Ender, E.D., 1984. "Bailey's Textbook of Microscopic Anatomy". Williams and Wilkins (Baltimore).
- 14- Kostorz, R., 1936. Über die Leberabgrenzung in der Leber des Säugetiere. *Anat. Anz.* **83**: 121-149.
- 15- White, E.G., 1939. Some observations on the liver of the liver pig. The hepatic lobule and liver cell during post-natal growth. *J. Anat.* **23**: 365-386.
- 16- Ekataksin, W. and Wake, K., 1991. Liver units in three dimensions: I. Organization of argyrophilic connective tissue skeleton in porcine liver with particular reference to the "compound hepatic lobule". *The American Journal of Anatomy* **191**: 113-153.
- 17- García del Moral, R., 1993. "Laboratorio de anatomía patológica". McGraw-Hill-Interamericana de España.
- 18- Howell, P.G.T. and Reid, S.A., 1986. A microcomputer-based system for rapid on line stereological analysis in SEM. *Scanning* **8**: 139-144.
- 19- Mansfield, R.; Petrouso, E., 1996. "Visual basic 4 – Manual de programación profesional". Inforbook's Ediciones (Barcelona).
- 20- "PhotoImpact 3.0-SE for Windows 95. Bundle version", 1996. Ed. Taiwan.
- 21- Manual del usuario para tabla digitalizadora: "CAD complete for Windows", 1996.
- 22- Elliot, S.; Miller, I.; Pyrus, G., 1994. "Inside 3D studio". Release 3. New Riders Publishing (Indianapolis – Indiana).
- 23- Elliot, S.; Miller, I.; Pyrus, G., 1996. "Inside 3D studio". Release 4. Inforbook's Ediciones (España).

Foto 1: Hígado de cerdo mostrando el tabicamiento lobulillar completo. Tricrómica con azul de anilina.

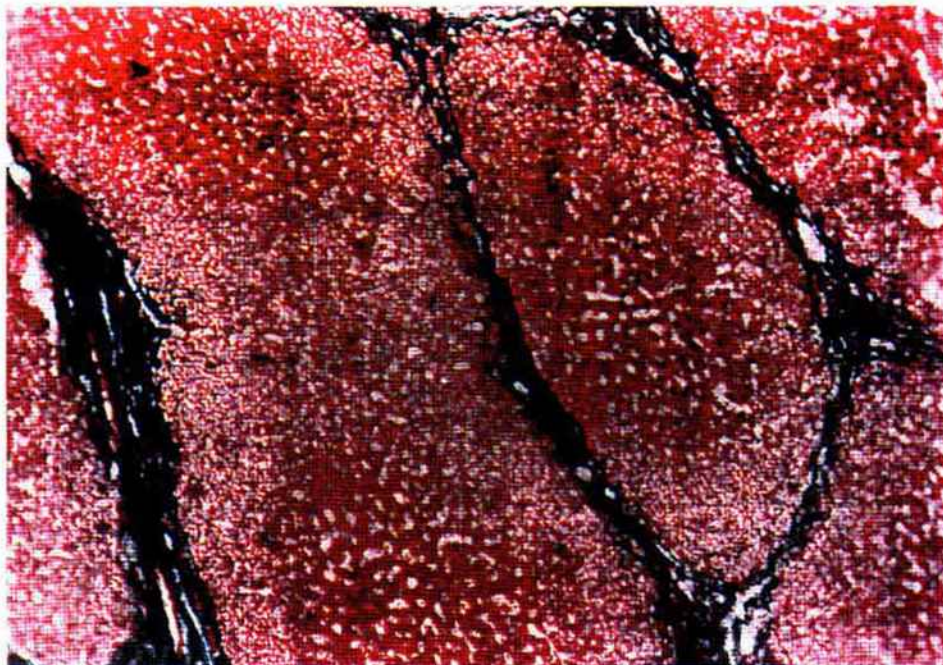


Foto 2: Hígado humano mostrando islotes de tejido conjuntivo correspondientes a los espacios porta y la ausencia absoluta de tabiques interlobulillares. Tricrómica de Masson.



Foto 3: Hígado humano mostrando las áreas perilobulillares de color más intenso. El recuadro marca la zona de la fotografía que fue sometida al A.D.I. Impregnación argéntica de Bielchowsky.

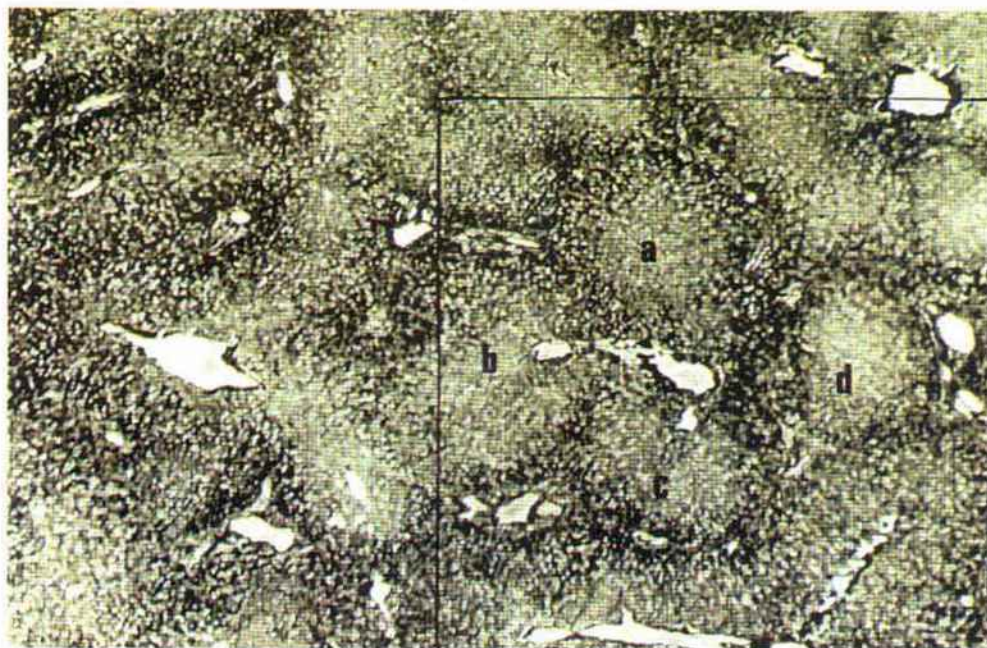


Foto 4: Hígado humano mostrando la pseudolobulillación en forma de áreas perilobulillares de igual color pero más intenso que el resto del lobulillo. Tricrómica de Masson



Figura 1: Imágenes obtenidas de las distintas etapas del proceso de A.D.I. correspondientes a la coloración de Bielchowsky. a- Efecto Neón, que resalta estructuras en base a relieves; b- refuerzo del color; c-inversión del color a través de la paleta; d- efecto Emboss de sobre y bajo-relieve.

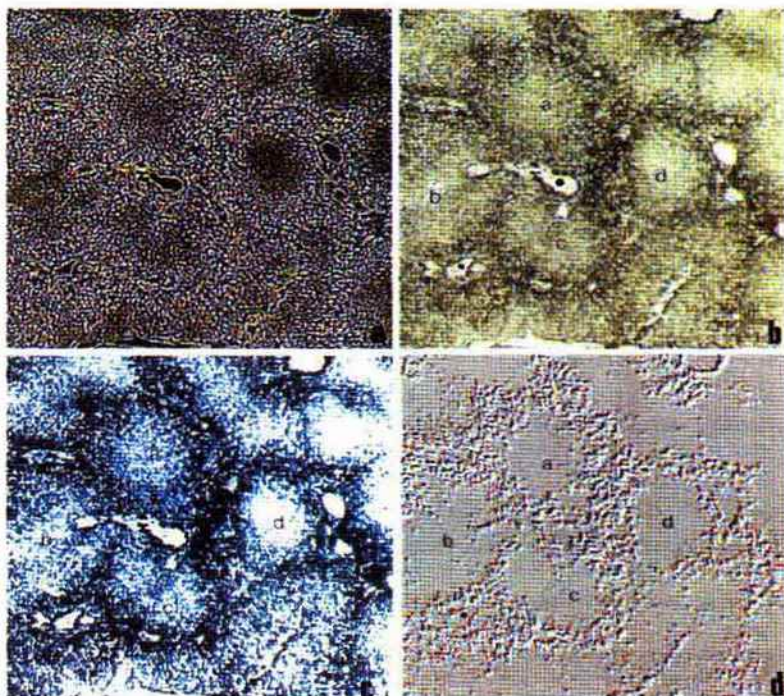


Figura 2: Resultado final del proceso de A.D.I. para la coloración de Bielchowsky. Se observa la imagen fibrilar perilibulillar nitida y contrastada.

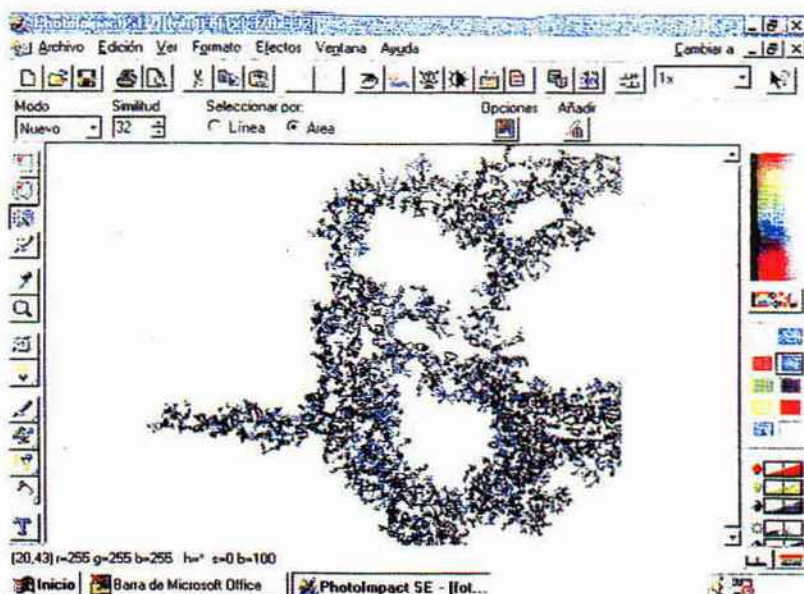


Figura 3: Resultado final del proceso de A.D.I. para la coloración Tricrómica de Masson. Se observa una imagen puntillada reticular en las zonas perilobulillares.

