



P-201 - VENTANA HEPÁTICA PARA MICROSCOPIA INTRAVITAL EN UN MODELO MURINO DE ENFERMEDAD HEPÁTICA GRASA NO ALCOHÓLICA

Martín Prieto, Libertad; Fernández Cebrián, José María; Vázquez Fernández, Carmen; Tolón, Rosa María; Fernández, Conrado; Colas, Enrique

Fundación Hospital Alorcón, Alorcón.

Resumen

Introducción: La enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA) puede evolucionar a cirrosis en un 15-25%. Es la causa más importante de cirrosis criptogénica en países desarrollados. La inflamación es el factor principal para su desarrollo donde el sistema endocannabinoide juega un papel importante así como las células de Kupffer (CK). En este sistema participan derivados de ácidos grasos como la araquidonoiletanolamida o 2-araquidonilglicerol. Estos son degradados por la amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y la monoglicérido lipasa (MGL). Por otro lado la microscopía intravital está adquiriendo cada vez más importancia, permitiéndonos el estudio, desde un punto de vista dinámico, de procesos fisiológicos y patológicos, gracias a la visualización de distintos tipos celulares, factores estructurales no celulares (matriz extracelular), marcado con fluorescencia o biosensores fluorescentes. El objetivo del estudio es comparar la existencia o no de correlación entre la microscopía intravital y los estudios histológicos tradicionales, atendiendo al número, morfología y distribución de las CK, centrándonos en la EHGNA.

Métodos: Utilizamos ratones transgénicos con células mieloides fluorescentes (como las CK). Hay 2 grupos: Un grupo control y un grupo con delección génica de la enzima amido hidrolasa de ácidos grasos (FAAH), lo que produce una potenciación del tono endocannabinoide endógeno. En ambos grupos inducimos esteatosis con una dieta rica en ácidos grasos y pobre en colina. Hemos desarrollado una ventana hepática modificada siguiendo estudios previos de microscopía intravital realizados en Taiwán y Países Bajos. Nuestra ventana es un anillo de aluminio de 14 mm de diámetro con una anchura de 2 mm (este dejar un espacio interior 10 mm). En el espesor cuenta con una ranura/surco de 2 mm en el interior de la cual la piel es suturada. Un cubreobjetos se fija con cianoacrilato. Realizamos una incisión subcostal izquierda de 15 mm. Suturamos una bolsa de tabaco alrededor de la incisión para colocarla en la ranura del anillo, donde se frunce y anuda. Para disminuir la transmisión del movimiento a la ventana (necesario para poder obtener una imagen de calidad) extirpamos el xifoides. Para la visualización de los sinusoides hepáticos se inyecta en el ojo contraste intravascular fluorescente, Texas Red. Contamos con un sistema de microscopía multifotónica, programado para obtener una imagen por micra, en una zona de 40 micras de espesor. Las imágenes se superponen para obtener un STAC, obteniendo una imagen final más detallada de las células de Kupffer y los sinusoides. Gracias al programa Image J cuantificamos de la fluorescencia (que se corresponde con las CK), evidenciando que esta es mayor en los ratones con esteatosis, además dentro de este grupo es mayor en aquellos con la potenciación de tono

endocannabinoide.



Conclusiones: La microscopia intravital tiene correlación con los estudios histológicos convencionales, nos permite obtener una imagen del hígado, con los sinusoides y células de Kupffer. Permite contar y describir las células y su morfología. Podemos cuantificar la fluorescencia. Los movimientos respiratorios y la adhesión al cubreobjetos representan un reto importante a superar para obtener imágenes nítidas y detalladas.