



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica  
y del Medio Natural

Estudio de la remodelación neuronal en tejido hepático  
dañado mediante microscopía electrónica de volumen

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

AUTOR/A: Romero Rodríguez, Sergio

Tutor/a: Giraldo Reboloso, Esther

Director/a Experimental: NOON XX, LUKE

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023

Universitat Politècnica de València

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural



# **Estudio de la remodelación neuronal en tejido hepático dañado mediante microscopía electrónica de volumen**

Autor: Sergio Romero Rodríguez

Tutora Académica: Dña. Esther Giraldo Reboloso

Tutor Experimental: D. Luke Adam Noon Welsh

Grado en Biotecnología. Año académico 2022-2023

Centro de Investigación Príncipe Felipe. Valencia

**Valencia, 3 de Julio de 2023**

## **Resumen**

Las enfermedades hepáticas crónicas son uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, siendo la onceava causa de mayor mortalidad en el mundo. El daño hepático también alcanza a los nervios que recorren el órgano, imposibilitando la llegada de impulsos no solo a las zonas dañadas, sino también más allá de ellas. Se ha observado que existe la posibilidad de regeneración neuronal, de forma que los axones se extienden, pasando la zona dañada y tratando de reinervar el tejido. En este proceso se ven involucrados los macrófagos que, mediante un proceso de neuroinflamación, promueven la regeneración de los axones. Se ha analizado mediante el uso de microscopía electrónica de volumen (vEM) si el daño hepático provoca cambios en las conexiones que se establecen entre distintos tipos celulares que conforman el hígado y si los macrófagos en concreto pueden estar involucrados en este proceso. Para ello se ha construido un conectoma hepático y se ha estudiado la presencia de macrófagos en los puntos donde la célula de Schwann libera los axones. Se han encontrado cambios en el conectoma tras la aparición de daño hepático además de la sobrerrepresentación de los macrófagos como primer contacto tras la liberación del axón. Además de ello, se ha observado que los contactos con este tipo celular parecen agruparse en zonas cercanas al punto de liberación del axón. Este trabajo se relaciona con el ODS 3 Salud y bienestar.

## **Palabras Clave**

vEM, Macrófago, Célula de Schwann, Neurona, Daño Hepático

**Alumno:** D. Sergio Romero Rodríguez

Valencia, Julio de 2023

**Tutor experimental:** D. Luke Adam Noon Welsh

**Tutora académica:** Dña. Esther Giraldo Reboloso

## **Abstract**

Chronic liver diseases are one of the leading health problems worldwide, ranking as the world's eleventh leading cause of mortality. Hepatic damage also affects the nerves that run through the organ, preventing the transmission of impulses to the damaged areas and beyond them. It has been observed that neuronal regeneration is possible, allowing axons to extend, bypassing the damaged area, and attempting to reinnervate the tissue. Macrophages are involved in this process through neuroinflammation, promoting axonal regeneration. Volume electron microscopy (vEM) has been used to determine if hepatic damage causes changes in the connections established between different types of cells that make up the liver and if macrophages may be involved in this process. A hepatic connectome has been constructed, and the presence of macrophages at the points where the Schwann cell releases the axons has been studied. Changes in the connectome have been found following the occurrence of liver damage and an overrepresentation of macrophages as the first contact after axon release. Additionally, it has been observed that contacts with this cell type appear to cluster in areas close to the axon release point. This work is related to SDG 3, Good Health and Well-being.

## **Keywords**

vEM, Macrophage, Schwann Cell, Neuron, Hepatic Damage

**Student:** D. Sergio Romero Rodríguez

Valencia, July 2023

**Experimental Tutor:** D. Luke Adam Noon Welsh

**Academic Tutor:** Dña. Esther Giraldo Reboloso

## Índice

1.	Introducción .....	1
1.1.	Hígado .....	1
1.1.1.	Daño hepático .....	1
1.1.2.	Regeneración hepática .....	1
1.2.	Regeneración neuronal .....	2
1.3.	Conectoma en el sistema nervioso periférico .....	2
1.4.	vEM.....	2
2.	Objetivos .....	4
3.	Materiales y métodos.....	5
3.1.	Material previo .....	5
3.1.1.	Ratones.....	5
3.1.2.	Obtención de imágenes de vEM .....	5
3.1.3.	Datos de partida .....	5
3.2.	Análisis de imágenes .....	5
3.2.1.	Análisis del conectoma.....	6
3.2.2.	Análisis de varicosidades.....	7
3.2.3.	Análisis de contactos tras la liberación de los axones.....	7
3.3.	Análisis estadístico .....	8
3.3.1.	Análisis del conectoma.....	8
3.3.2.	Análisis de Varicosidades.....	9
3.3.3.	Análisis de Liberación de los axones .....	9
4.	Resultados .....	10
4.1.	Análisis de conectómica .....	10
4.2.	Análisis de varicosidades.....	15
4.3.	Análisis de contactos tras la liberación del axón .....	15
5.	Discusión .....	19
6.	Conclusión .....	21
7.	Referencias .....	22
8.	Anexos .....	25
8.1.	Anexo I. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible .....	25
8.2.	Anexo II. Script en Python para el remuestreo.....	26

## Índice de figuras

<b>Figura 1. Región de interés segmentada y reconstrucción de axón.....</b>	<b>6</b>
<b>Figura 2. Flujo de trabajo seguido para el análisis del conectoma. ....</b>	<b>6</b>
<b>Figura 3. Varicosidades en un axón.....</b>	<b>7</b>
<b>Figura 4. Distintos casos de liberación de axones. ....</b>	<b>7</b>
<b>Figura 5. Flujo de trabajo del análisis de contactos tras la liberación del axón. ....</b>	<b>8</b>
<b>Figura 6. Diferencias entre el número de contactos observados y esperados. ....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 7. Diferencias en la cantidad total de contactos con los distintos tipos celulares entre muestras control y DDC.....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 8. Conectogramas observados y esperados.....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 9. Diferencias en los conectomas control y DDC.....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 10. Análisis de varicosidades.....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 11. Diferencias entre los contactos tras la liberación de los axones observados y esperados en muestras de tejido control. ....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 12. Diferencias entre los contactos tras la liberación de los axones observados y esperados en muestras de tejido DDC.....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 13. Diferencias en los contactos tras la liberación de los axones entre los grupos control y DDC.....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 14. Diferencias en el porcentaje de macrófagos como primer contacto tras la liberación de los axones entre animales control y DDC. ....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 15. Mapa de calor de la posición de los contactos con IC tras la liberación del axón... </b>	<b>18</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1. Total de contactos observados. ....</b>	<b>5</b>
<b>Tabla 2. Número de contactos observados y esperados. ....</b>	<b>10</b>
<b>Tabla 3. Número de conexiones observadas y esperadas en el análisis de conectómica. ....</b>	<b>11</b>
<b>Tabla 4. Número de axones seleccionados y primer contacto tras su liberación según el grupo al que pertenecen. ....</b>	<b>15</b>
<b>Tabla 5. Número de contactos en cada grupo de 2 <math>\mu\text{m}</math> de longitud para muestras DDC y control. ....</b>	<b>18</b>

## **Abreviaturas**

BEC: Célula epitelial biliar.

BV: Vaso Sanguíneo.

DDC: 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina.

eGFP: Proteína verde fluorescente mejorada.

Fb: Fibroblasto.

Hp: Hepatocito.

IC: Macrófago.

LEC: Célula epitelial linfática.

PC: Célula progenitora hepática.

ROI: Región de interés.

vEM: Microscopía electrónica de volumen.

## **1. Introducción**

### **1.1. Hígado**

El hígado es uno de los órganos más grandes e importantes del cuerpo humano. Es crucial para muchos procesos fisiológicos, siendo responsable de la metabolización de nutrientes y desempeñando un papel crucial en el equilibrio hormonal y en la respuesta inmunológica, además de en la descomposición de productos xenobióticos, entre los que se pueden encontrar, por ejemplo, fármacos o toxinas (Trefts et al., 2017). El sistema inmune del hígado juega un papel muy importante a la hora de luchar contra infecciones, ya que alberga una gran cantidad de células inmunes que detectan y eliminan potenciales patógenos que puedan aparecer en la sangre (Kubes & Jenne, 2018). La gran cantidad de funciones que presenta también lleva a que este sea el órgano de mayor tamaño del cuerpo, representando aproximadamente entre un 2% y un 3% del peso total del individuo (Abdel-Misih & Bloomston, 2010).

#### **1.1.1. Daño hepático**

Las enfermedades hepáticas son una de las principales causas de muerte a nivel mundial (Asrani et al., 2019) y entre ellas se pueden encontrar algunas como la esteatohepatitis, tanto alcohólica como no alcohólica, hepatitis B y C o enfermedades autoinmunes genéticas. Todas ellas generan fibrosis en el órgano, la cual se caracteriza por la acumulación de matriz extracelular que altera la estructura del hígado (Wynn, 2004) y con ello, su capacidad para funcionar correctamente. Cuando alguna enfermedad causa daños al hígado, se activa la transdiferenciación de las células estrelladas hepáticas en fibroblastos productores de colágeno, los cuales contribuyen a la reparación del tejido (Roehlen et al., 2020). Sin embargo, si no se detiene, este proceso puede volverse patogénico y resultar en la formación de cicatrices permanentes que, en algunos casos, pueden llevar al fallo completo del órgano (Wynn, 2004).

#### **1.1.2. Regeneración hepática**

El hígado posee una gran capacidad regenerativa que le permite restaurar su masa y funciones originales después de haber perdido parte del tejido, ya sea por su extracción o por el daño causado por toxinas (Michalopoulos & DeFrances, 1997). El proceso de regeneración permite que su tamaño se ajuste a las necesidades del cuerpo, ya que este órgano es capaz de tanto recuperar su tejido perdido como de decrecer en situaciones en las que el metabolismo cambia o aparece alguna enfermedad (Michalopoulos, 2013). Esta característica es crucial en situaciones como trasplantes del órgano, donde se puede perder parte del tejido durante la espera hasta la operación o directamente estar usando un injerto que es demasiado pequeño y necesita expandir su volumen posteriormente (Taki-Eldin et al., 2012).

Los procesos de regeneración hepática no solo se dan en caso de eliminación de parte del tejido, sino que, también, pueden tratar de eliminar las cicatrices fibróticas. Eliminar la causa que produce la inflamación puede ser útil para promover la regresión de la cirrosis, aunque en una gran parte de casos, no se observa signo alguno de reparación (Marcellin et al., 2013). Cuando sí se da, la eliminación de la cicatriz ocurre de una forma demasiado lenta como para evitar complicaciones que pudiesen poner en peligro la vida de la persona afectada, lo que hace necesarias estrategias antifibróticas que permitan acelerar su desaparición (Roehlen et al., 2020).

El proceso de regeneración está gobernado por una gran cantidad de cascadas de señalización de distintos tipos y, cuando una señal falla, otras permitirán que se lleve a cabo (Michalopoulos, 2013). Entre ellas, la señalización nerviosa es crucial para asegurar una regeneración del tejido rápida con la que aumenta la tasa de supervivencia tras la aparición de daños severos, como los que pueden originarse con enfermedades crónicas (Izumi et al., 2018).

## **1.2.Regeneración neuronal**

Las causas que pueden dar lugar a daños en el sistema nervioso son variadas, pero en todos los casos el resultado es la inhabilitación de las células nerviosas para transmitir impulsos a las regiones que inerva (Steward et al., 2012). Los nervios tienen cierta capacidad de regeneración, pudiendo restaurarse hasta 1 mm al día de tejido dañado (Brushart et al., 2002), sin embargo, este ratio no es suficiente para asegurar la completa reparación del nervio. Otro problema que encuentra el proceso es que las fibras nerviosas no son capaces de tomar el mismo camino que tenían anteriormente, lo que provoca la pérdida de los contactos originales (Gordon, 2020).

Durante el proceso de regeneración del tejido nervioso, los macrófagos tanto residentes como los que se puedan infiltrar inician un proceso de neuroinflamación, en el que se eliminan del medio la mielina, que provoca la inhibición de la regeneración, y los otros restos que puedan quedar en el medio. Por otro lado, adoptan un fenotipo prorregenerativo y comienzan a secretar citoquinas y factores de crecimiento que alteran la funcionalidad de las células de Schwann (Jha et al., 2021). Aunque juegan este rol importante, no se sabe aún con certeza cómo los macrófagos son reclutados y como el daño causa el cambio de fenotipo (Chen et al., 2015).

## **1.3.Conectoma en el sistema nervioso periférico**

El conectoma se define como un mapa de las conexiones neuronales cuya función última es entender el funcionamiento del sistema nervioso al completo (Lo & Chiang, 2016). Para ello, se hace uso de herramientas de obtención de imágenes para poder explorar el tejido, y también de programas informáticos que permitan un análisis eficiente de estas imágenes, así como el almacenamiento de información en bases de datos.

A pesar de que recientemente ha aumentado el interés por conseguir un mapa del conectoma humano, la mayor parte de esfuerzos hasta el momento se han centrado en el análisis de las conexiones neurona-neurona dentro del cerebro, dejando de lado al sistema nervioso periférico. Tanto es así que, en primera instancia, se definió el conectoma humano como la descripción estructural comprensible de la red de elementos y conexiones que conforman el cerebro humano (Sporns et al., 2005). La poca atención dada al sistema nervioso periférico deja el mapa inacabado y, con ello, el conocimiento de las conexiones fuera del cerebro se queda incompleto y desorganizado, lo que dificulta adquirir información sobre la gran cantidad de procesos nerviosos que ocurren fuera del sistema nervioso central (Irimia & Van Horn, 2021).

Para tratar de remediar esta situación, se necesitan avances tecnológicos que faciliten el estudio de conectomas de otras áreas del cuerpo, para lo cual es necesario que las nuevas metodologías permitan reconstruir la estructura tridimensionalmente, ser interactivos y anotar y cuantificar de forma precisa (Nowinski et al., 2012). Además, estos nuevos métodos deben reducir el tiempo necesario para poder obtener imágenes con la resolución adecuada y también mejorar el procesamiento de los datos obtenidos tanto en escala como en velocidad (Lo & Chiang, 2016).

## **1.4.vEM**

La microscopía electrónica de volumen (vEM) es un conjunto de técnicas que permiten obtener imágenes de estructuras celulares y tisulares con una profundidad de al menos 1  $\mu\text{m}$  y con una resolución de nanómetros (Peddie et al., 2022). Estas técnicas se basan en combinar diversas imágenes de microscopía electrónica creadas a partir de muestras cortadas en segmentos finos, que luego se combinan, creando una representación digital del tejido analizado. Se comenzó a utilizar en los años ochenta para estudiar el conectoma cerebral, analizando tanto las neuronas enteras como las regiones sinápticas (Collinson et al., 2023). Sin embargo, en la actualidad se

está empleando también en otros campos, como puede ser en virología (Baena et al., 2021) o biología celular (Narayan & Subramaniam, 2015).

Esta técnica presenta también ciertos problemas en la actualidad, ya que genera tanta información que gran parte de ella no es posible analizarla, además de que actualmente existen poca cantidad de expertos e infraestructura adecuada. Sin embargo, su capacidad para combinarse con otras técnicas para poder obtener información adicional sobre el estado funcional de la estructura la convierte en una herramienta poderosa para entender la complejidad biológica tanto a nivel celular como tisular (Collinson et al., 2023).

## **2. Objetivos**

En el presente estudio se propone analizar si, tras eventos de daño hepático, se observan cambios en el conectoma del tejido. Para ello se proponen los siguientes objetivos:

- Comparar el conectoma de tejidos sanos y dañados mediante tecnología vEM para poder analizar sus diferencias.
- Analizar si hay macrófagos mediando en el proceso de remodelación neuronal en el tejido hepático.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Material previo

##### 3.1.1. Ratones

Para el presente estudio se utilizaron un total de seis ratones adultos de una cepa denominada Plp-eGFP, la cual expresa proteína verde fluorescente mejorada (eGFP) en las células gliales. Estos ratones se dividieron en dos subgrupos: tres de los ratones se alimentaron con una dieta control, mientras que el resto se alimentaron con una dieta suplementada con 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina (DDC). La dieta con esta molécula se usa como modelo de colangitis, una enfermedad caracterizada por la aparición de problemas en el flujo de bilis del hígado al duodeno (Wagner & Trauner, 2016), llevando, en última instancia, a causar cirrosis biliar y hepatopatía. Esta dieta causa la obstrucción de los ductos biliares, dañando el epitelio biliar. Además, la acumulación de bilis causa la activación y proliferación de los colangiocitos, así como del incremento de citoquinas proinflamatorias y profibrogénicas. Esto causa la infiltración de neutrófilos y la activación de fibroblastos y de células estrelladas hepáticas, lo que provoca la aparición de fibrosis (Pose et al., 2019).

Se alimentó a tres de los ratones con una dieta suplementada con DDC 0,1 % durante cinco días, se perfundieron con paraformaldehído diluido al 4 % en tampón fosfato salino y posteriormente se eutanasiaron. Se tomaron muestras del hígado de los animales y se embebieron en resina.

##### 3.1.2. Obtención de imágenes de vEM

Las imágenes se obtuvieron mediante tomografía de matriz (AT), en un procedimiento similar al descrito por White et al., 2022: se cortaron las muestras de tejido hepático perfundido en láminas de 70 nm de grosor con un microtomo con una cuchilla de diamante y se fijaron en cubreobjetos de sílice cubiertas de óxido de indio y estaño, las cuales se montaron en un microscopio electrónico de barrido ZEISS® Gemini 300. Las imágenes obtenidas tuvieron una resolución de 5x5x70 nm. Estas imágenes se alinearon y se ensamblaron para crear la representación de la región de interés (ROI). Finalmente, los archivos se cargaron en el programa WEBKNOSOS (<https://webknossos.org/>) para su visualización y análisis.

##### 3.1.3. Datos de partida

Previamente al resto de análisis, se obtuvieron datos sobre contactos observados en las distintas ROI mediante estos métodos, los cuales se muestran en la Tabla 1.

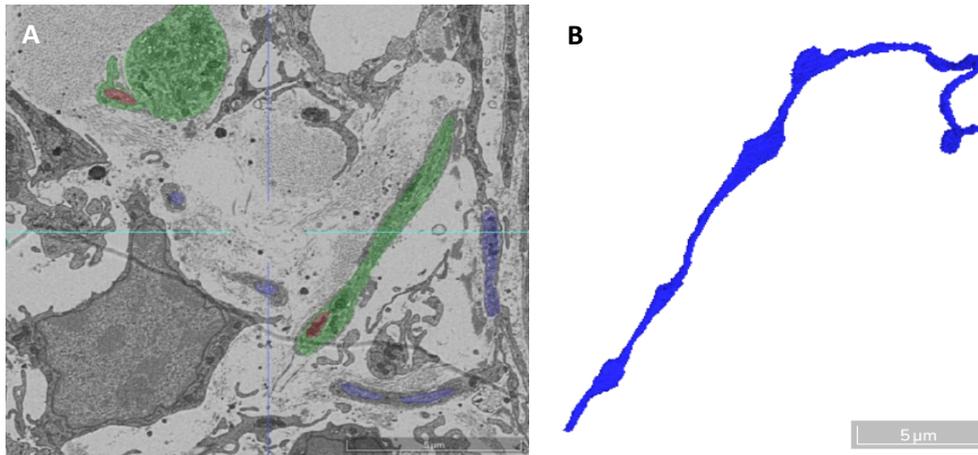
**Tabla 1. Total de contactos observados.** Fb: Fibroblasto; Hp: Hepatocito; BEC: Célula epitelial biliar; BV: Vaso Sanguíneo; LEC: Célula epitelial linfática; IC: Macrófago; PC: Célula progenitora hepática; DDC: 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina.

	Fb	Hp	BEC	BV	LEC	IC	PC	Total
Contactos control	65	73	8	73	4	15	0	237
Contactos DDC	54	68	21	30	11	21	3	206
Total	120	141	29	103	15	36	3	443

#### 3.2. Análisis de imágenes

Las imágenes obtenidas se han analizado mediante el uso de la herramienta online WEBKNOSOS, la cual permite reconstruir en 3D las estructuras presentes en el tejido. Esto se consigue segmentando imagen por imagen la célula, orgánulo o tejido de interés, lo que permite destacarlo del resto del entorno (Figura 1-A) y también crear una imagen tridimensional, tal como se observa en la Figura 1-B. Si bien, este procedimiento permite obtener imágenes que destacan

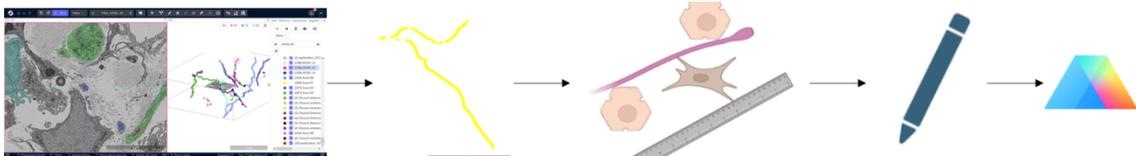
los elementos a analizar, la gran carga de trabajo que supone hace que sea impráctico para ROI extensas y con un alto número de imágenes. Por ello, una solución a este problema, y que la herramienta incluye, es la posibilidad de marcar con nodos que se conectan formando esqueletos. Los esqueletos se adaptan bien a la estructura alargada de los axones, lo cual facilita su reconstrucción. Además, esta opción incluye la ventaja de poder medir su longitud, aumentando su valor a la hora de realizar análisis. Durante el análisis de las imágenes se ha optado por crear esqueletos que representan la longitud de los axones debido a las razones expuestas anteriormente, aunque algunas estructuras se han segmentado para facilitar su visualización. De este modo se analizaron un total de 12 ROI correspondientes a los 6 animales. De ellas, 7 pertenecían al grupo control y 5, al DDC.



**Figura 1. Región de interés segmentada y reconstrucción de axón.** (A) Imagen de vEM (Región de Interés 5.1) con varios axones (en azul y rojo) y una célula de Schwann (en verde) segmentados. Nótese como el axón rojo está completamente rodeado por una célula de Schwann. (B) El axón azul (axón 59) se ha reconstruido tridimensionalmente gracias a la superposición de todas las zonas segmentadas a lo largo de las distintas imágenes que componen esta región de interés (237 imágenes).

### 3.2.1. Análisis del conectoma

Se seleccionaron aquellos axones con más de tres contactos, siendo al menos dos de dichos contactos con hepatocitos. Estos axones se han seguido y se han creado sus esqueletos en la herramienta WEBKOSOS. Una vez finalizados, se ha medido su longitud, la cantidad de nodos que lo componen y se han anotado los contactos que presentan con hepatocitos (Hp), fibroblastos (Fb), células epiteliales linfáticas (LEC), macrófagos (IC) y células progenitoras de hepatocitos (PC). Aparte de estos datos, también se anotaron la distancia entre contactos y los puntos de liberación de un axón por una célula de Schwann, si los hubiese. Todos estos datos se registraron en una hoja de cálculos para su posterior análisis estadístico (Figura 2). Algunos de estos axones también se segmentaron para poder reconstruirse tridimensionalmente y facilitar su observación.



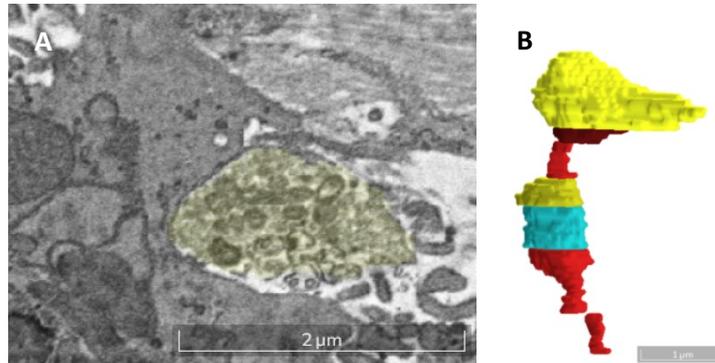
**Figura 2. Flujo de trabajo seguido para el análisis del conectoma.** Mediante el programa WEBKOSOS se crearon los esqueletos de los axones y se midieron distintos parámetros, como su longitud, la cantidad de nodos que lo forman o si en algún punto están cubiertos por células de Schwann. Posteriormente se anotaron los contactos que presentan. Todos estos datos se guardaron para su posterior análisis estadístico.

Por otro lado, con los datos de contactos se construyó una tabla con las distintas conexiones posibles. Se definieron como conexiones todos aquellos pares de contactos sucesivos. Se

anotaron todas las conexiones existentes en los axones seleccionados y se construyó una tabla con la frecuencia de todos los encontrados, separando aquellos provenientes de muestras control y DDC.

### 3.2.2. Análisis de varicosidades

Se definen como varicosidades aquellos puntos en los cuales se aprecia un engrosamiento del axón junto con la aparición de estructuras intracelulares, como mitocondrias. Un ejemplo de este fenómeno se observa en la Figura 3-A, junto con su reconstrucción tridimensional (Figura 3-B).

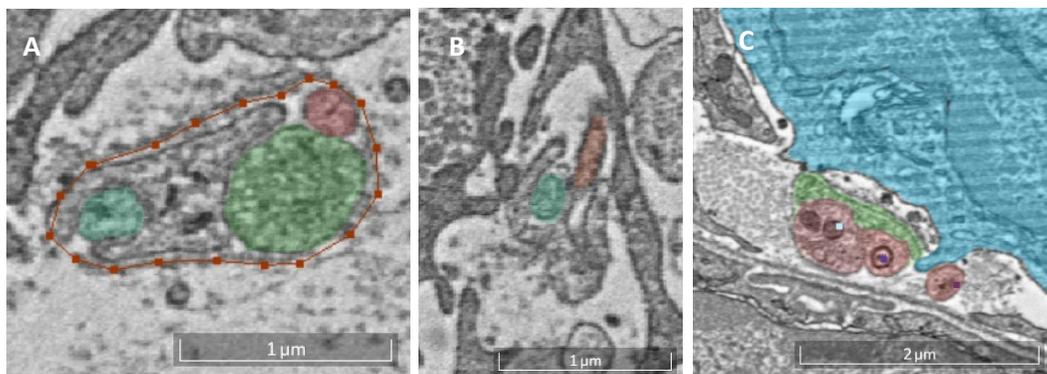


**Figura 3. Varicosidades en un axón.** (A) Se observa el engrosamiento del axón 7 (Región de Interés 3.4) y la gran cantidad de mitocondrias presentes en el punto de contacto con un hepatocito. (B) la vista de su reconstrucción muestra la diferencia en la anchura en este punto con respecto a otras partes. También se observa otra varicosidad menos pronunciada en la zona de contacto con un fibroblasto (segmento azul) y con otro hepatocito (segmento amarillo). Figura creada en colaboración con Emma Climent Cunyat.

Mediante la herramienta WEBKNOSSOS se observaron de nuevo todos los contactos anotados (Tabla 1). Éstos se clasificaron según presentaban varicosidades o no. El criterio a seguir fue que sólo se consideraron como con varicosidades aquellos contactos que presentasen tanto un engrosamiento del axón como la presencia de mitocondrias. Para aquellos contactos procedentes de axones estudiados para el análisis de conectoma, esta información se añadió a su hoja de cálculo. Los datos obtenidos se guardaron para su posterior análisis estadístico.

### 3.2.3. Análisis de contactos tras la liberación de los axones

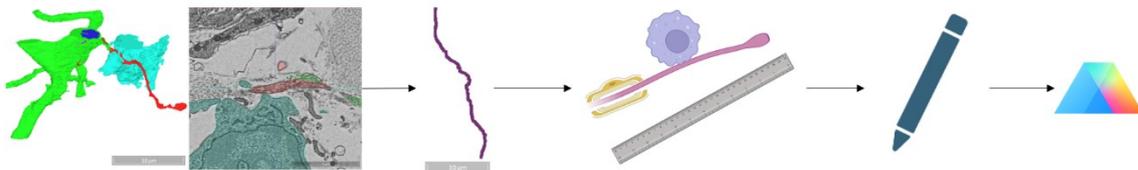
Para tratar de discernir la importancia de los macrófagos (IC) durante el proceso de liberación del axón, se han buscado en todas las regiones de interés aquellos axones que han sido liberados por la célula de Schwann. El criterio establecido para seleccionar los axones válidos ha sido que traspasasen la lámina basal de la célula de Schwann, punto que se habrá seleccionado como punto de liberación. En caso de no observarse la lámina, pero sí desconexión del axón con la célula glial se tomó como punto de liberación aquel en el cual este contacto se pierde (Figura 4-C). Si ninguno de los criterios se cumple, no se considerará como liberación (Figura 4-A).



**Figura 4. Distintos casos de liberación de axones.** (A) Axones rodeados por la lámina basal. Se observan tres axones y una célula de Schwann, que recubre a uno (azul) y está en contacto con otro (verde). El tercer

axón (rojo) parece haber sido liberado, sin embargo, no ha atravesado la lámina basal (marcada con un esqueleto naranja), por lo que, en este punto, no se ha dado todavía un evento de liberación. (B) Axón siendo liberado. En este caso, uno de los axones (rojo) está siendo liberado, mientras que el otro permanece envuelto en la célula de Schwann. No se aprecia la lámina basal. (C). Axón ya liberado y contacto con otra célula. Uno de los axones ha sido liberado y está en contacto con un macrófago (azul), que también está interactuando con la célula de Schwann. La lámina basal se observa como una línea alrededor de los axones asociados a la célula glial.

Se construyó el esqueleto de los axones que cumplían el criterio. A continuación, se marcaron los puntos en los cuales se liberaban de la célula de Schwann y dónde aparecía el primer contacto tras este fenómeno. Se anotaron estos datos junto con la longitud de cada axón y la distancia desde el punto de liberación hasta el primer contacto y se guardaron en una hoja de cálculo (Figura 5).



**Figura 5. Flujo de trabajo del análisis de contactos tras la liberación del axón.** Se seleccionaron axones en los que se observase como la célula de Schwann libera el axón y se construyó su esqueleto. Posteriormente se anotó la posición del primer contacto con respecto al punto de liberación y el tipo de célula involucrada. Estos datos se guardaron para su posterior análisis estadístico.

Adicionalmente, se analizó la posición de los contactos con IC para determinar si su posición a lo largo del axón es aleatoria o se concentran a cierta distancia tras la liberación de éste. Para ello se buscaron contactos adicionales con IC en los mismos axones utilizados en el análisis de liberación y se anotó su distancia hasta el punto de liberación.

### 3.3. Análisis estadístico

#### 3.3.1. Análisis del conectoma

Se han buscado diferencias significativas entre los contactos observados y los esperados si se diesen por azar. Para ello se tomaron los datos de contactos de la Tabla 1 y, a partir de ellos, se estimaron cuántos contactos de cada tipo se esperarían teniendo en cuenta el total de observados. Se realizó un test  $\chi^2$  para analizar si las diferencias entre los valores observados y esperados eran o no significativas. Este mismo test se empleó para estudiar las diferencias entre los grupos control y DDC. Además, los resultados de estos análisis se confirmaron con pruebas exactas de Fisher, ya que este test presenta una mayor precisión cuando el tamaño muestral es pequeño.

Para comprobar la existencia de procesos de remodelación se ha comparado si existen variaciones significativas en cuanto a las conexiones establecidas, tanto entre muestras control y DDC como entre los valores observados y esperados. Las proporciones esperadas se obtuvieron mediante el uso de técnicas de remuestreo, usando como datos de partida los contactos presentes en la Tabla 1. Esto se debe a que, si las conexiones se formasen por azar, cabría esperar que sus proporciones se asemejasen a aquellas generadas por la posición aleatoria de los contactos a lo largo del axón.

El remuestreo se llevó a cabo mediante un script en lenguaje Python, el cual genera un total de 10.000 combinaciones posibles de los datos de partida y devuelve la frecuencia con la que una combinación problema es generada (Anexo II). Una vez obtenidas las proporciones esperadas, se realizó una prueba  $\chi^2$  comparando las proporciones esperadas y observadas tanto en las muestras control como en las DDC. Seguidamente, se realizó otra prueba  $\chi^2$  con el fin de comparar las proporciones observadas en ambos grupos.

### **3.3.2. Análisis de Varicosidades**

Se analizó si existían diferencias significativas entre los porcentajes de varicosidades presentes en los contactos con cada tipo celular mediante un test ANOVA de dos vías. Además, con el fin de comparar las diferencias entre el grupo control y el DDC, se realizó otra vez este análisis desglosando los datos según su procedencia. De este análisis se han excluido tanto los contactos con células progenitoras como con células epiteliales linfáticas, ya que se consideró que no había suficientes datos de estos dos tipos celulares.

### **3.3.3. Análisis de Liberación de los axones**

Para evaluar si existían diferencias significativas entre la cantidad de contactos con un determinado tipo de célula entre muestras control y DDC, se realizaron test  $\chi^2$  para cada caso. Del mismo modo, se compararon los datos de los contactos tras la liberación del axón con la cantidad de contactos totales encontrados en todas las ROI analizadas (Tabla 1). Con ello se pretende determinar si los contactos se realizan con células al azar o si algún grupo se desvía de lo que cabría esperar. Igual que antes, los resultados de las pruebas  $\chi^2$  se comprobaron realizando, pruebas exactas de Fisher.

También se analizaron las diferencias en el porcentaje de macrófagos como primer contacto en cada animal analizado. Para ello, se realizaron múltiples t-test separando los porcentajes por animales y comparando los control con los DDC.

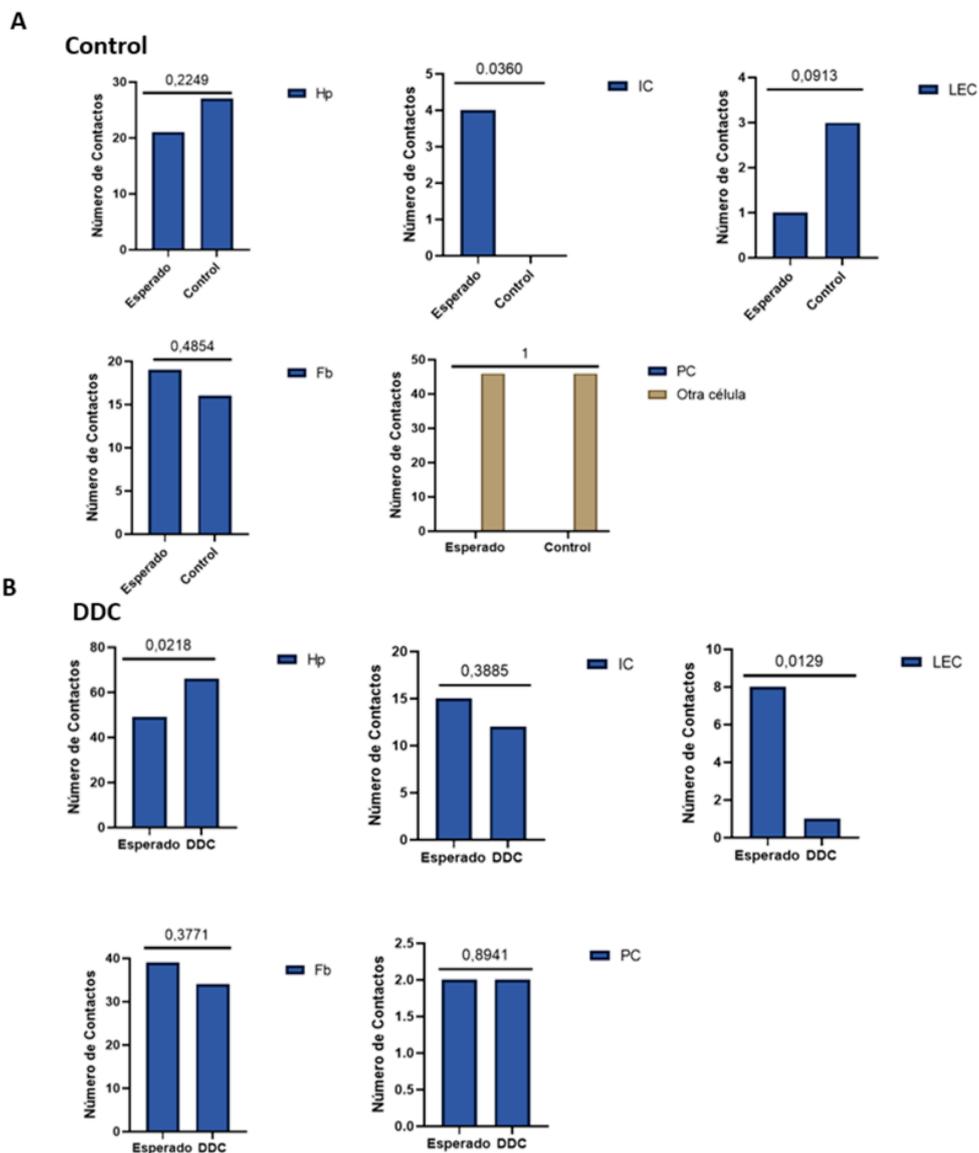
## 4. Resultados

### 4.1. Análisis de conectómica

En el análisis del conectoma se encontraron un total de 38 axones que cumplieren el criterio establecido. De ellos, 11 pertenecían a muestras control y los 27 restantes a muestras DDC. Se encontraron un total de 161 contactos, reflejados en la Tabla 2. Los análisis  $\chi^2$  realizados y comprobados con pruebas exactas de Fisher mostraron diferencias significativas entre el número de contactos con Hp y LEC para DDC (Figura 6-B) y con IC para control (Figura 6-A), con respecto al número de contactos esperados.

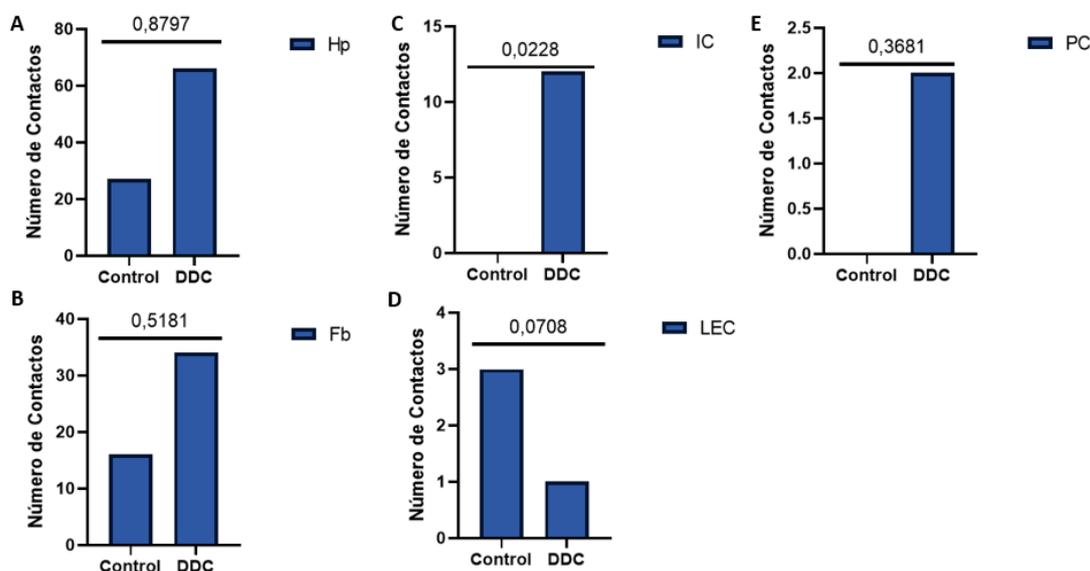
**Tabla 2. Número de contactos observados y esperados.** Fb: Fibroblasto; Hp: Hepatocito; LEC: Célula epitelial linfática; IC: Macrófago; PC: Célula progenitora hepática; DDC: 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina.

	Control Observado	Control Esperado	DDC Observado	DDC Esperado
<b>Hp</b>	27	21,389	66	49,809
<b>Fb</b>	16	19,045	34	39,554
<b>IC</b>	0	4,395	12	15,382
<b>PC</b>	0	0	2	2,198
<b>LEC</b>	3	1,172	1	8,057



**Figura 6. Diferencias entre el número de contactos observados y esperados.** (A) Diferencias en el grupo control. Se han encontrado diferencias significativas en la cantidad de contactos con macrófagos (IC), ya que no han aparecido en este tejido. (B) Diferencias en el grupo DDC. Se encontraron diferencias significativas en la cantidad de contactos con hepatocitos (Hp) y células epiteliales linfáticas (LEC). En ambos casos aparecen en mayor cantidad de la esperada. Significativo si  $*P < 0,05$ ; analizado mediante  $\chi^2$  con un grado de libertad ( $P\text{-value} < 0,05$  si  $\chi^2 > 3,8415$ ) y comprobado mediante test exacto de Fisher. Fb: Fibroblasto; Hp: Hepatocito; LEC: Célula epitelial linfática; IC: Macrófago; PC: Célula progenitora hepática; DDC: 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina.

En cuanto a las diferencias entre los grupos control y DDC, se observaron diferencias significativas para los contactos con IC ( Figura 7-C) y, aunque para los contactos con LEC, el análisis  $\chi^2$  mostró diferencias significativas ( Figura 7-D), la comprobación con el test exacto de Fisher fue negativa. Las diferencias en los contactos con Fb ( Figura 7-B), Hp ( Figura 7-A), y PC ( Figura 7-E) no fueron significativas.



**Figura 7. Diferencias en la cantidad total de contactos con los distintos tipos celulares entre muestras control y DDC.** (C) Se observaron diferencias significativas en la cantidad de contactos con macrófagos (IC), que aumentan su proporción en el tejido dañado. Para el resto de tipos celulares no se observaron diferencias. Significativo si  $*P < 0,05$ ; analizado mediante  $\chi^2$  con un grado de libertad ( $P\text{-value} < 0,05$  si  $\chi^2 > 3,8415$ ) y comprobado mediante test exacto de Fisher. Fb: Fibroblasto; Hp: Hepatocito; LEC: Célula epitelial linfática; IC: Macrófago; PC: Célula progenitora hepática; DDC: 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina.

Todos estos contactos conformaron un total de 125 pares de conexiones, perteneciendo 37 a muestras control y 88 a muestras DDC. Las conexiones observadas y esperadas se detallan en la Tabla 3. Los análisis  $\chi^2$  realizados mostraron la existencia de diferencias significativas entre las conexiones observadas y esperadas para LEC-LEC en las muestras control (Figura 8-A), Hp-LEC en DDC y Hp-Hp para ambos (Figura 8-B).

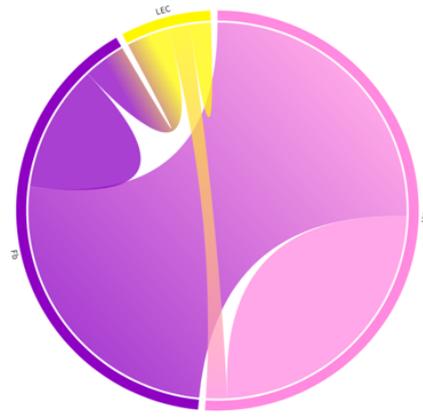
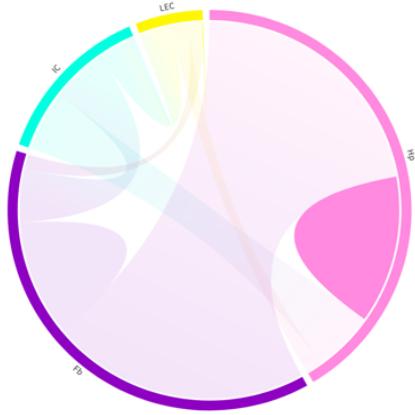
**Tabla 3. Número de conexiones observadas y esperadas en el análisis de conectómica.** Fb: Fibroblasto; Hp: Hepatocito; LEC: Célula epitelial linfática; IC: Macrófago; PC: Célula progenitora hepática; DDC: 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina.

	Control Observado	Control Esperado	DDC Observado	DDC Esperado
Hp-Hp	13	8,101	33	16,511
Hp-Fb	14	14,146	26	26,213
Hp-IC	0	3,339	9	10,300
Hp-LEC	1	0,878	0	5,396
Hp-PC	0	0	0	0,428

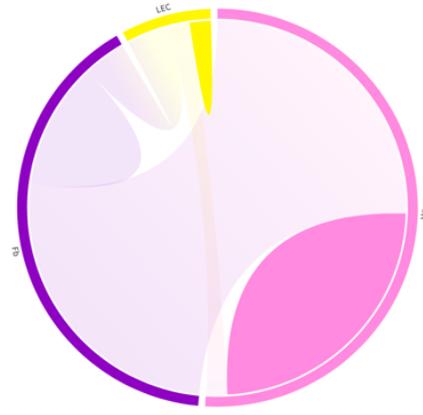
<b>Fb-Fb</b>	6	6,291	10	10,306
<b>Fb-IC</b>	0	2,956	7	8,114
<b>Fb-LEC</b>	2	0,776	1	4,205
<b>Fb-PC</b>	0	0	1	1,190
<b>IC-IC</b>	0	0,335	0	1,558
<b>IC-LEC</b>	0	1,769	0	1,610
<b>IC-PC</b>	0	0	0	0,428
<b>LEC-LEC</b>	1	0,030	0	0,418
<b>LEC-PC</b>	0	0	1	0,275
<b>PC-PC</b>	0	0	0	0,036

**A****Control****Esperado**

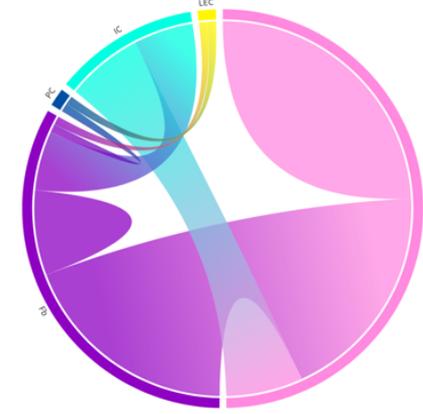
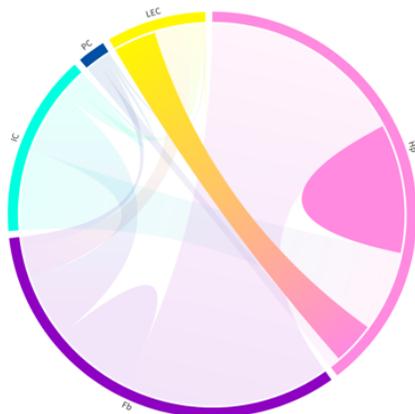
Núm. conexiones = 37

**Observado**11 Axones; Longitud media = 29,91  $\mu$ m; Núm. conexiones = 37; Núm. Contactos = 46

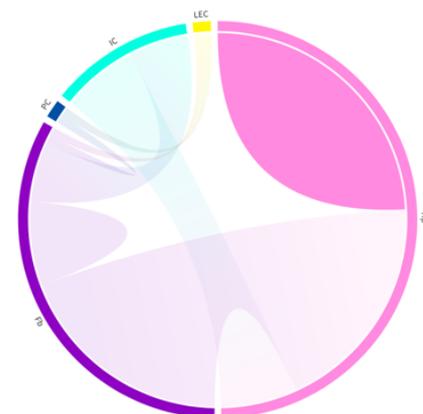
Núm. conexiones = 37

11 Axones; Longitud media = 29,91  $\mu$ m; Núm. conexiones = 37; Núm. Contactos = 46**DDC****B****Esperado**

Núm. conexiones = 88

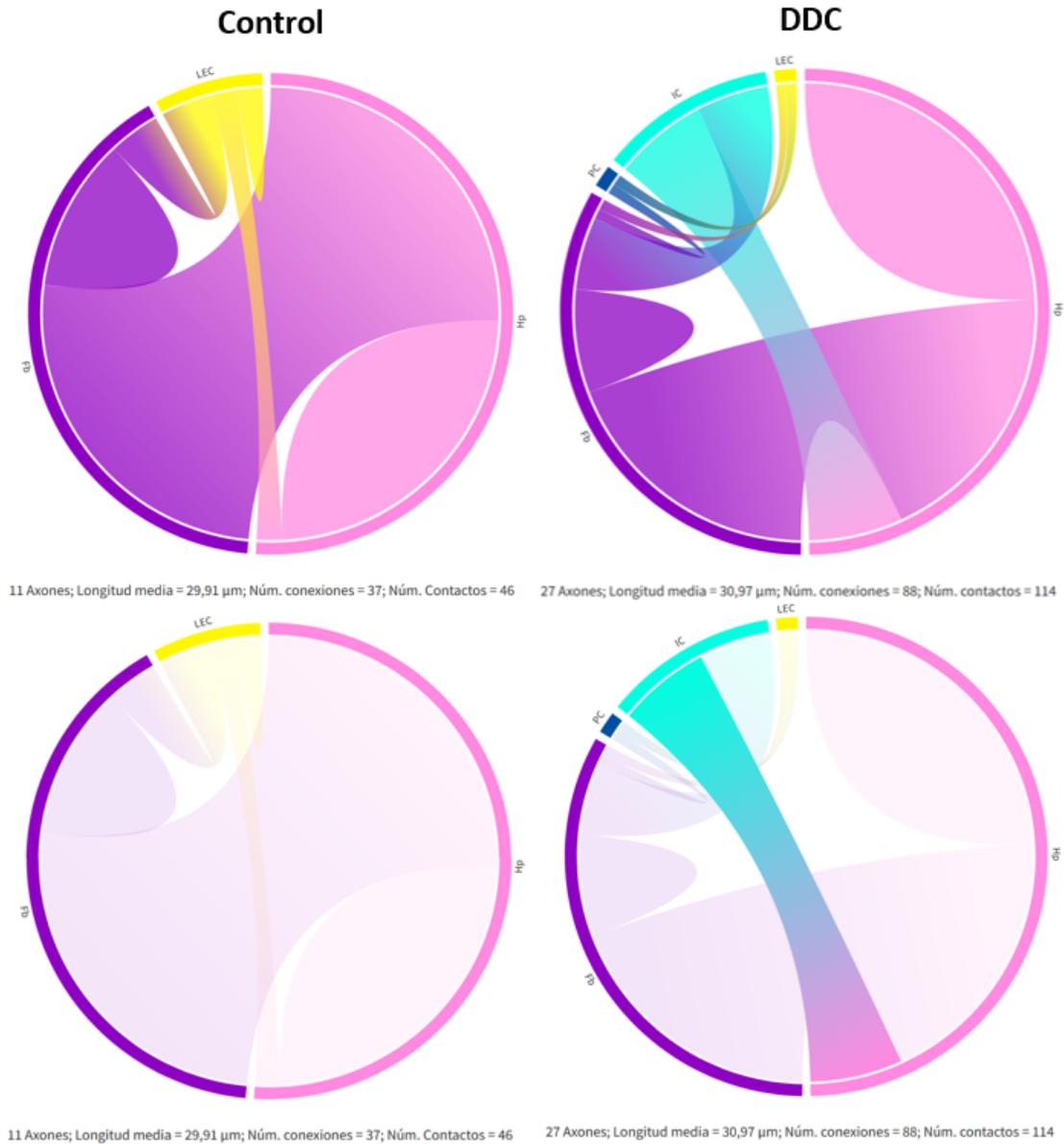
**Observado**27 Axones; Longitud media = 30,97  $\mu$ m; Núm. conexiones = 88; Núm. contactos = 114

Núm. conexiones = 88

27 Axones; Longitud media = 30,97  $\mu$ m; Núm. conexiones = 88; Núm. contactos = 114

**Figura 8. Conectogramas observados y esperados.** Se muestran los distintos pares de conexiones que se establecen en los axones analizados. Se analizaron un total de 11 axones procedentes de muestras control y 27 de muestras DDC, con un total de 37 conexiones para los primeros y 88 para los segundos. Se muestran también aquellas conexiones cuyas diferencias resultan significativas: (A) En los axones control se observa un aumento en las conexiones Hp-Hp y Hp-LEC. (B) En los axones DDC las conexiones Hp-Hp también aumentan, pero las Hp-LEC desaparecen. Significativo si  $*P < 0,05$ ; analizado mediante test  $\chi^2$  con 1 grado de libertad  $P\text{-value} < 0,05$  si  $\chi^2 > 3,8415$  y comprobado mediante test exacto de Fisher. Fb: Fibroblasto; Hp: Hepatocito; LEC: Célula epitelial linfática; IC: Macrófago; PC: Célula progenitora hepática; DDC: 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina. Figura creada en colaboración con Emma Climent Cunyat.

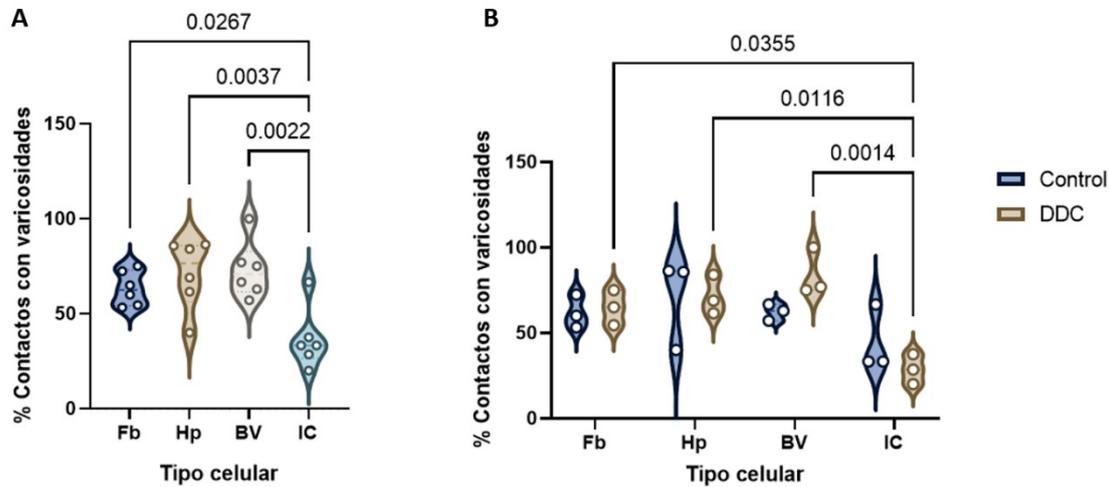
Por otro lado, al comparar los conectogramas control y DDC sólo se observaron diferencias significativas en las conexiones Hp-IC, que no estaban presentes en las muestras control (Figura 9).



**Figura 9. Diferencias en los conectomas control y DDC.** Se han observado diferencias significativas en la cantidad de conexiones Hp-IC entre los conectomas control y DDC, no apareciendo este tipo de contactos en el primero. Significativo si  $*P < 0,05$ ; analizado mediante test  $\chi^2$  con 1 grado de libertad  $P\text{-value} < 0,05$  si  $\chi^2 > 3,8415$  y comprobado mediante test exacto de Fisher. Fb: Fibroblasto; Hp: Hepatocito; LEC: Célula epitelial linfática; IC: Macrófago; PC: Célula progenitora hepática; DDC: 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina. Figura creada en colaboración con Emma Climent Cunyat.

## 4.2. Análisis de varicosidades

Se observó que el porcentaje de contactos con IC con varicosidades era significativamente menor al resto de contactos con otros tipos celulares, cuyas diferencias no fueron significativas (Figura 10-A). De igual modo, también se encontraron diferencias significativas entre los contactos con IC en el grupo DDC y con el resto de los tipos celulares (Figura 10-B).



**Figura 10. Análisis de varicosidades.** (A) Diferencias en el porcentaje de varicosidades entre cada tipo celular. Se observan diferencias significativas entre el porcentaje de contactos con varicosidades en macrófagos (IC) y el resto de los tipos celulares (Fb: Fibroblasto; Hp: Hepatocito; BV: Vaso sanguíneo). (B) Estas mismas diferencias se observan al separar los animales entre control y DDC, aunque sólo las diferencias entre los contactos en muestras DDC fueron significativas. Significativo si  $*P < 0,05$ ; analizado mediante ANOVA de dos vías. Fb: Fibroblasto; Hp: Hepatocito; LEC: Célula epitelial linfática; IC: Macrófago; DDC: 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina. Figura creada en colaboración con Emma Climent Cunyat.

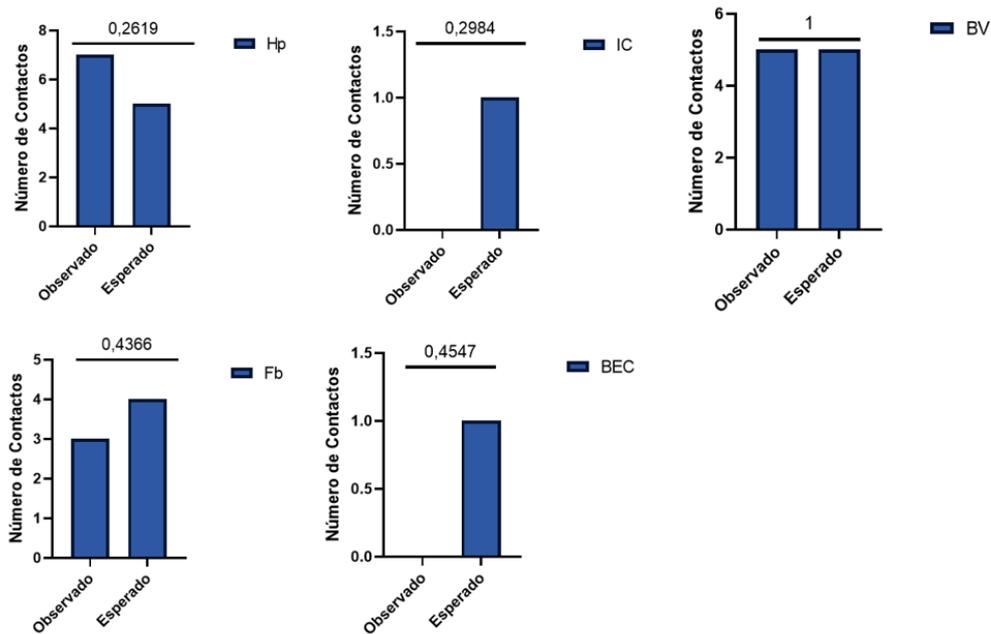
## 4.3. Análisis de contactos tras la liberación del axón

Se seleccionaron un total de 41 axones de entre todos los observados, en los cuales se encontraron 49 eventos de liberación, perteneciendo 27 axones a hígados dañados y 14. De ellos, en 13 ocasiones el primer contacto se da con macrófagos, mientras que en 11 ocurre con hepatocitos, 17 con fibroblastos, 5 con vasos sanguíneos y en una ocasión con células epiteliales biliares. En dos casos, el primer contacto no pudo ser determinado. Estos resultados se pueden observar desglosados en Control y DDC en la Tabla 4. Comparando estos datos con la cantidad total de contactos obtenidos en hígado de ratones tratados (Tabla 1) se observa un aumento en la proporción de contactos con macrófagos en el tejido dañado al centrarse en los que se dan tras la liberación del axón por parte de la célula de Schwann. Esta misma situación se aprecia al comparar el tejido dañado con el control, ya que en este último caso no se han encontrado contactos con monocitos.

**Tabla 4. Número de axones seleccionados y primer contacto tras su liberación según el grupo al que pertenecen.** DDC: 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina.

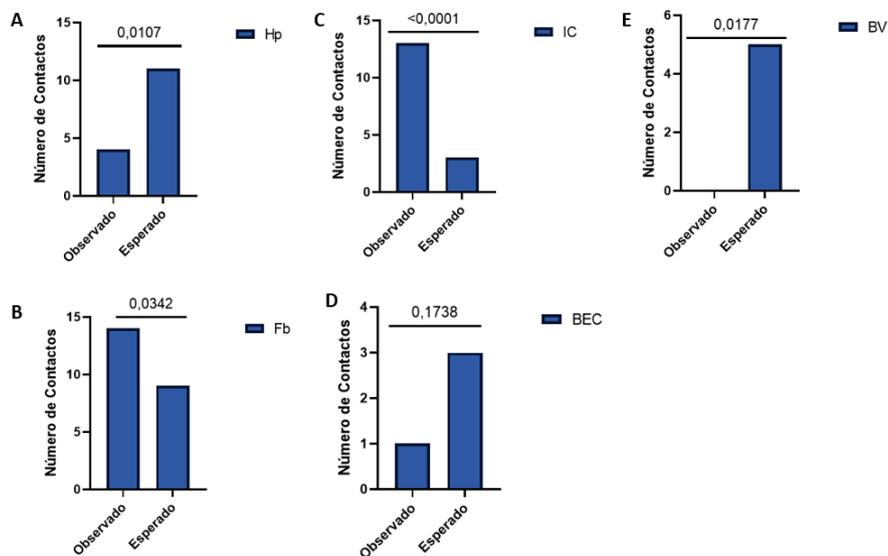
	Control	DDC
Número de axones	27	14
Número de liberaciones	16	33
Primer contacto con IC	0	13
Primer contacto con Hp	7	4
Primer contacto con Fb	3	14
Primer contacto con BV	5	0
Primer contacto con BEC	0	1

Los distintos análisis por  $\chi^2$  en las muestras control no mostraron diferencias significativas entre los contactos esperados y observados para ninguno de los tipos celulares tras la liberación del axón (Figura 11).



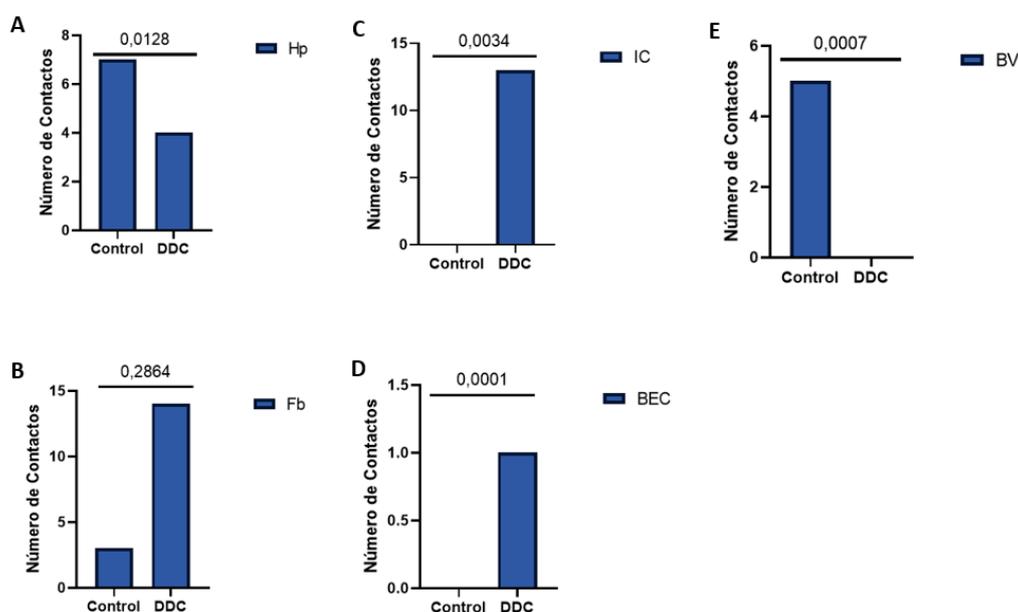
**Figura 11. Diferencias entre los contactos tras la liberación de los axones observados y esperados en muestras de tejido control.** Para ninguno de los tipos celulares analizados se observaron diferencias significativas entre la cantidad de contactos observada y la que cabría esperar si se diesen por azar. Significativo si  $*P < 0,05$ ; analizado mediante  $\chi^2$  con un grado de libertad ( $P\text{-value} < 0,05$  si  $\chi^2 > 3,8415$ ) y comprobado mediante test exacto de Fisher. Fb: Fibroblasto; Hp: Hepatocito; BEC: Célula epitelial biliar; IC: Macrófago; BV: Vaso sanguíneo.

En cambio, los análisis en tejido DDC mostraron que la diferencia entre la cantidad de contactos con macrófagos tras la liberación del axón observados y la que cabría esperar si éstos se diesen por azar es significativa (Figura 12-C). Este fenómeno se ha visto también en Fb (Figura 12-B). Por otro lado, también se ha descubierto una disminución significativa en la cantidad de Hp observados (Figura 12-A) y de BV (Figura 12-E). En cuanto a las células epiteliales biliares (BEC), no se observaron diferencias significativas (Figura 12-D).



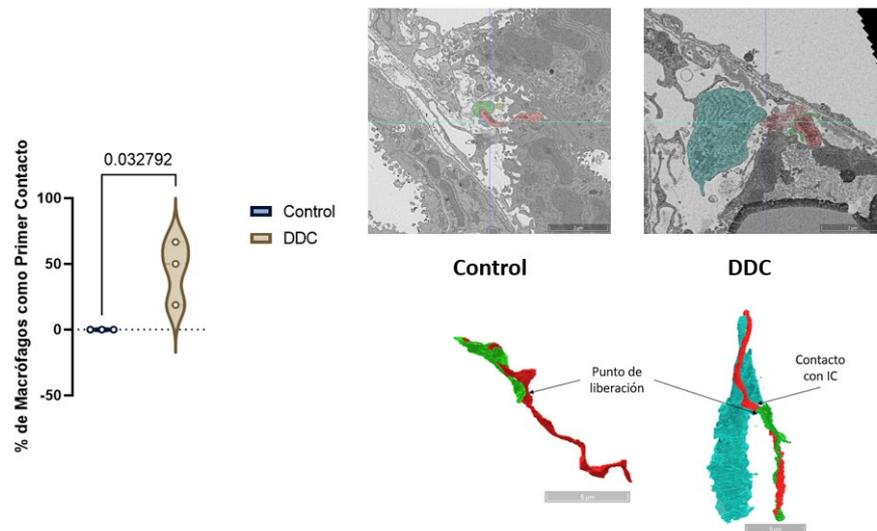
**Figura 12. Diferencias entre los contactos tras la liberación de los axones observados y esperados en muestras de tejido DDC.** (A) Se observaron diferencias significativas en los contactos con hepatocitos (Hp), que ven disminuida su proporción con respecto a lo esperado. (B) Se observaron diferencias significativas en la cantidad de fibroblastos (Fb) observados y esperados, apareciendo en mayor proporción de la esperada. (C) Se observó un aumento significativo en la proporción de primeros contactos con macrófagos (IC) observados con respecto a los esperados. (D) En el caso de las células epiteliales biliares (BEC), no se observaron diferencias significativas entre las cantidades esperadas y observadas. (E) Se encontraron diferencias significativas entre los contactos con vasos sanguíneos (BV) observados y esperados, ya que se ha reducido su cantidad hasta desaparecer. Significativo si  $*P < 0,05$ ; analizado mediante  $\chi^2$  con un grado de libertad ( $P\text{-value} < 0,05$  si  $\chi^2 > 3,8415$ ). Fb: Fibroblasto; Hp: Hepatocito; BEC: Célula epitelial biliar; IC: Macrófago; BV: Vaso sanguíneo.

Al comparar DDC y Control se observa una situación similar, ya que aparecen más IC (Figura 13-C) y disminuyen Hp (Figura 13-A) de forma significativa. Las diferencias observadas en BV fueron también significativas, no encontrándose ningún caso en muestras DDC. Para Fb (Figura 13-B) y BEC (Figura 13-D) no se encontraron grandes diferencias.



**Figura 13. Diferencias en los contactos tras la liberación de los axones entre los grupos control y DDC.** (A) Se observaron diferencias significativas en los contactos con macrófagos (IC), no encontrándose ningún caso en muestras control. (B) Se observaron diferencias significativas en la cantidad de hepatocitos (Hp) entre las muestras control y DDC, apareciendo en mayor proporción en las primeras. (C) No se observaron diferencias significativas en la cantidad de primeros contactos con fibroblastos (Fb) entre ambos grupos. (D) Al igual que con Fb, no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de contactos con células epiteliales biliares (BEC). (E) Se encontraron diferencias significativas entre los contactos con vasos sanguíneos (BV) entre ambos grupos, ya que no se ha encontrado ningún caso en muestras DDC. Significativo si  $P < 0,05$ ; analizado mediante  $\chi^2$  con un grado de libertad ( $P\text{-value} < 0,05$  si  $\chi^2 > 3,8415$ ) y comprobado mediante test exacto de Fisher. Fb: Fibroblasto; Hp: Hepatocito; BEC: Célula epitelial biliar; IC: Macrófago; BV: Vaso sanguíneo; DDC: 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina.

Al analizar animal por animal, se observó de nuevo la existencia de diferencias significativas entre los individuos control y los DDC al no observarse ningún primer contacto con macrófagos en los primeros, mientras que en los segundos todos excedieron el 18% (Figura 14).



**Figura 14. Diferencias en el porcentaje de macrófagos como primer contacto tras la liberación de los axones entre animales control y DDC.** En los animales control no se han observado contactos con macrófagos (IC) tras la liberación de los axones, mientras que, en los DDC, el porcentaje de liberaciones que los presentaba varió entre un 18,75% y un 66,67%. Significativo si  $P < 0,05$  analizado mediante t-test múltiple. IC: Macrófago; DDC: 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina.

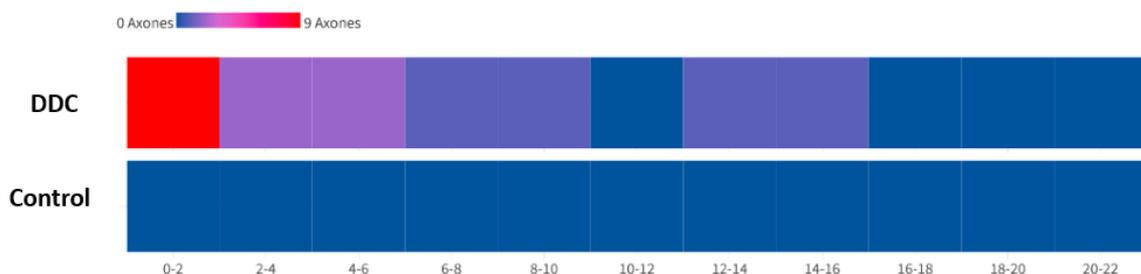
Finalmente, se observó la posición de los contactos con IC tras la liberación del axón. Se agruparon en los 11 conjuntos un total de 17 contactos a lo largo de los 33 axones seleccionados para el análisis de liberación axonal, mostrados en la Tabla 5. Los contactos observados se agruparon en su mayoría a poca distancia del punto de liberación (

	0-2 $\mu\text{m}$	2-4 $\mu\text{m}$	4-6 $\mu\text{m}$	6-8 $\mu\text{m}$	8-10 $\mu\text{m}$	10-12 $\mu\text{m}$	12-14 $\mu\text{m}$	14-16 $\mu\text{m}$	16-18 $\mu\text{m}$	18-20 $\mu\text{m}$	20-22 $\mu\text{m}$
DDC	9	2	2	1	1	0	1	1	0	0	0
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Figura 15), estando 9 de ellos a menos de 2  $\mu\text{m}$  y 6 más en los siguientes 8  $\mu\text{m}$ . Para los casos control no se observó ningún contacto con IC.

**Tabla 5. Número de contactos en cada grupo de 2  $\mu\text{m}$  de longitud para muestras DDC y control.** DDC: 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina.

	0-2 $\mu\text{m}$	2-4 $\mu\text{m}$	4-6 $\mu\text{m}$	6-8 $\mu\text{m}$	8-10 $\mu\text{m}$	10-12 $\mu\text{m}$	12-14 $\mu\text{m}$	14-16 $\mu\text{m}$	16-18 $\mu\text{m}$	18-20 $\mu\text{m}$	20-22 $\mu\text{m}$
DDC	9	2	2	1	1	0	1	1	0	0	0
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



**Figura 15. Mapa de calor de la posición de los contactos con IC tras la liberación del axón.** Los contactos con macrófagos (IC) tras la liberación del axón se agrupan en los primeros micrómetros tras la liberación del axón, estando 9 de ellos a menos de  $2\mu\text{m}$  y 6 más en los siguientes  $8\mu\text{m}$ . DDC: 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina.

## 5. Discusión

Actualmente, existen diversos estudios que han destacado la importancia del mapeado de las conexiones neuronales en situaciones como la planificación de intervenciones neuroquirúrgicas (Irimia & Van Horn, 2021). Sin embargo, pocos de éstos han analizado el sistema nervioso periférico, para el cual se hacen necesarios métodos que permitan anotar de forma precisa, modificable, interactiva y accesible informáticamente (Nowinski et al., 2012). Estas características son las que las técnicas vEM, y los distintos programas para el análisis de las imágenes que producen, pretenden tener y por las cuales es una herramienta a tener en cuenta para este tipo de estudios.

Se encontraron diferencias significativas tanto entre los conectomas de muestras control y DDC, como con sus respectivos esperados si las conexiones se diesen por azar. En este sentido, cabe destacar la falta de contactos con IC en muestras control (Figura 6-A), las cuales se sabe que están presentes y establecen contactos con los axones del tejido, pero no han podido ser halladas por el análisis, lo que parece indicar que no establecen conexiones con Hp, el tipo celular alrededor del cual ha girado el criterio de elección. Esta situación podría significar que la aparición de contactos con IC en el conectoma se debería a la aparición de daño hepático y a la posterior respuesta neuroinflamatoria. Por otro lado, el modelo de análisis ha sido capaz de detectar una sobrerrepresentación en las conexiones Hp-Hp (Figura 8), que podrían deberse al propio criterio de selección de los axones, ya que este favorecería la selección de contactos con hepatocitos, con lo que se prueba que el análisis estadístico funciona. Sin embargo, esta aproximación no permite analizar grupos de conexiones más grandes, con lo que se podría estar perdiendo información que podría ser crucial para el análisis. Además de esto, otro gran problema es la alta carga de trabajo que selección de los axones y la obtención de datos de ellos requiere. En el futuro, con el aumento en la cantidad de información que las técnicas vEM van a poder generar, se va a hacer imposible llevar a cabo estos análisis de forma manual, por lo que será crucial desarrollar herramientas informáticas basadas en inteligencia artificial que lleven a cabo tareas mecánicas como la segmentación de las estructuras (Kievits et al., 2022). Con todo, la metodología utilizada ha permitido dar los primeros pasos para desarrollar un conectoma del hígado, lo cual no se había intentado anteriormente.

En cuanto al análisis de varicosidades, éste ha mostrado que los contactos con IC son menos propensos a crear varicosidades que los del resto de tipos celulares analizados (Figura 3-A), tendencia que se destaca más en los tejidos dañados (Figura 10-B). Además, si se tiene en cuenta que los contactos con macrófagos parecen estar enriquecidos en el tejido dañado (Figura 7-C), se podría sugerir que, cuando se dan eventos de daño hepático, se reclutan macrófagos que establecen contactos transitorios y poco estables con los axones del tejido, transmitiendo o recibiendo señales que favorezcan la regeneración del tejido.

Se ha determinado que los eventos de liberación se dan en menor medida en tejido sano en comparación al dañado (Tabla 4). La falta de casos podría estar causada por una menor necesidad en el tejido de que estas situaciones se den, ya que los axones ya estarían establecidos y no necesitarían extenderse para crear nuevos contactos. Otra posible razón es la menor profundidad de campo que varias de las ROI control presentaban, ya que muchas se componían de pocas decenas de imágenes, lo que hace más complicado seguir axones hasta encontrar puntos donde sean liberados. Independientemente de la razón por la cual este fenómeno ocurra, la liberación de axones es un fenómeno que no se ha estudiado en profundidad aun, por lo que los mecanismos que gobiernan este proceso aún se desconocen.

Por otro lado, se ha encontrado una diferencia significativa en la cantidad de primeros contactos tras eventos de liberación con IC en tejido dañado en comparación con el tejido sano (Figura 14). Además, aunque este primer contacto en tejido sano parece ser aleatorio (Figura 11), tras la aparición de daño, algunas poblaciones cambian sus proporciones, como Fb (Figura 12-B), IC (Figura 12-C), Hp (Figura 12-A) o BV (Figura 12-E), pudiendo deberse ello a una pérdida de la

aleatoriedad para dar paso a un fenotipo reparador en el que estarían involucrados los IC. Teniendo también en cuenta lo observado en el análisis de varicosidades y al observar su posición en el axón (

	0-2 μm	2-4 μm	4-6 μm	6-8 μm	8-10 μm	10-12 μm	12-14 μm	14-16 μm	16-18 μm	18-20 μm	20-22 μm
<b>DDC</b>	9	2	2	1	1	0	1	1	0	0	0
<b>Control</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Figura 15), estas células podrían, tras la aparición de daño hepático, comenzar a buscar axones cubiertos por las células de Schwann y mediar en señales que provocasen la extensión de estos axones, con el objetivo de reinervar las zonas dañadas o aquellas que se encuentren tras ella, cambiando el conectoma local en el proceso. Aunque la forma en la que median en el proceso de liberación no se ha podido analizar mediante las imágenes y técnicas disponibles, otros estudios han señalado que los macrófagos secretan citoquinas que acaban por facilitar la migración de la célula de Schwann y la regeneración del axón (Jha et al., 2021).

Estos resultados apoyarían trabajos anteriores en los que se observó la importancia del papel que los macrófagos juegan tanto para promover la remodelación y reparación de los axones dañados (Jha et al., 2021) como para estimular la proliferación de hepatocitos tras eventos de daño hepático (Izumi et al., 2018). Si bien los mecanismos por los cuales participarían en este primer proceso se desconocen, las células de Schwann podrían provocar su actuación, ya que liberan mielina y secretan factores que reclutan células inflamatorias (Stierli et al., 2019), las cuales fagocitan los restos producidos por el daño y contribuyen a la regeneración axonal y a la remielinización (Gaudet et al., 2011). Todo esto sugiere que la conexión entre los macrófagos y los axones tiene una doble funcionalidad cuando se dan eventos de daño hepático. Por un lado, promovería la expansión de estos axones hacia zonas dañadas tratando de reinervarlas y, por otro, favorecería la proliferación de hepatocitos en dichas zonas, recuperándose así el tejido perdido.

## **6. Conclusión**

- Se ha podido trazar un primer mapa del conectoma hepático tanto de tejido sano como de tejido dañado.
- Se ha observado mediante vEM la existencia de remodelación del conectoma tras la aparición de daño hepático.
- Los macrófagos juegan un papel importante en la remodelación del conectoma tras la aparición de daños, estando involucrados en la liberación del axón y la reinervación del tejido.

## 7. Referencias

- ABDEL-MISIH, S. R. Z., & BLOOMSTON, M. (2010). Liver Anatomy. *Surgical Clinics of North America*, 90(4), 643-653. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2010.04.017>
- ASRANI, S. K., DEVARBHAVI, H., EATON, J., & KAMATH, P. S. (2019). Burden of liver diseases in the world. *Journal of Hepatology*, 70(1), 151-171. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.09.014>
- BAENA, V., CONRAD, R., FRIDAY, P., FITZGERALD, E., KIM, T., BERNBAUM, J., BERENSMANN, H., HARNED, A., NAGASHIMA, K., & NARAYAN, K. (2021). Fib-sem as a volume electron microscopy approach to study cellular architectures in sars-cov-2 and other viral infections: A practical primer for a virologist. *Viruses*, 13(4), 611. <https://doi.org/10.3390/v13040611>
- BRUSHART, T. M., HOFFMAN, P. N., ROYALL, R. M., MURINSON, B. B., WITZEL, C., & GORDON, T. (2002). Electrical Stimulation Promotes Motoneuron Regeneration without Increasing Its Speed or Conditioning the Neuron. *The Journal of Neuroscience*, 22(15), 6631-6638. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-15-06631.2002>
- CHEN, P., PIAO, X., & BONALDO, P. (2015). Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Acta Neuropathologica*, 130(5), 605-618. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1482-4>
- COLLINSON, L. M., BOSCH, C., BULLEN, A., BURDEN, J. J., CARZANIGA, R., CHENG, C., DARROW, M. C., FLETCHER, G., JOHNSON, E., NARAYAN, K., PEDDIE, C. J., WINN, M., WOOD, C., PATWARDHAN, A., KLEYWEGT, G. J., & VERKADE, P. (2023). Volume EM: a quiet revolution takes shape. *Nature Methods*, 20(6), 777-782. <https://doi.org/10.1038/s41592-023-01861-8>
- GAUDET, A. D., POPOVICH, P. G., & RAMER, M. S. (2011). Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *Journal of Neuroinflammation*, 8(1), 110. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-110>
- GORDON, T. (2020). Peripheral Nerve Regeneration and Muscle Reinnervation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8652. <https://doi.org/10.3390/ijms21228652>
- IRIMIA, A., & VAN HORN, J. D. (2021). Mapping the rest of the human connectome: Atlasing the spinal cord and peripheral nervous system. *NeuroImage*, 225, 117478. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2020.117478>
- IZUMI, T., IMAI, J., YAMAMOTO, J., KAWANA, Y., ENDO, A., SUGAWARA, H., KOHATA, M., ASAI, Y., TAKAHASHI, K., KODAMA, S., KANEKO, K., GAO, J., UNO, K., SAWADA, S., KALINICHENKO, V. V., ISHIGAKI, Y., YAMADA, T., & KATAGIRI, H. (2018). Vagus-macrophage-hepatocyte link promotes post-injury liver regeneration and whole-body survival through hepatic FoxM1 activation. *Nature Communications*, 9(1), 5300. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07747-0>
- JHA, M. K., PASSERO, J. V., RAWAT, A., AMENT, X. H., YANG, F., VIDENSKY, S., COLLINS, S. L., HORTON, M. R., HOKE, A., RUTTER, G. A., LATREMOLIERE, A., ROTHSTEIN, J. D., & MORRISON, B. M. (2021). Macrophage monocarboxylate transporter 1 promotes peripheral nerve regeneration after injury in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 131(21), e141964. <https://doi.org/10.1172/JCI141964>

- KIEVITS, A. J., LANE, R., CARROLL, E. C., & HOOGENBOOM, J. P. (2022). How innovations in methodology offer new prospects for volume electron microscopy. *Journal of Microscopy*, 287(3), 114-137. <https://doi.org/10.1111/jmi.13134>
- KUBES, P., & JENNE, C. (2018). Immune Responses in the Liver. *Annual Review of Immunology*, 36(1), 247-277. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052415>
- LO, C.-C., & CHIANG, A.-S. (2016). Toward Whole-Body Connectomics. *The Journal of Neuroscience*, 36(45), 11375-11383. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2930-16.2016>
- MARCELLIN, P., GANE, E., BUTI, M., AFDHAL, N., SIEVERT, W., JACOBSON, I. M., WASHINGTON, M. K., GERMANIDIS, G., FLAHERTY, J. F., SCHALL, R. A., BORNSTEIN, J. D., KITRINOS, K. M., SUBRAMANIAN, G. M., MCHUTCHISON, J. G., & HEATHCOTE, E. J. (2013). Regression of cirrhosis during treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B: a 5-year open-label follow-up study. *The Lancet*, 381(9865), 468-475. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61425-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61425-1)
- MICHALOPOULOS, G. K. (2013). Principles of Liver Regeneration and Growth Homeostasis. *Comprehensive Physiology*, 3(1), 485-513. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120014>
- MICHALOPOULOS, G. K., & DEFRANCES, M. C. (1997). Liver Regeneration. *Science*, 276(5309), 60-66. <https://doi.org/10.1126/science.276.5309.60>
- NARAYAN, K., & SUBRAMANIAM, S. (2015). Focused ion beams in biology. *Nature Methods*, 12(11), 1021-1031. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3623>
- NOWINSKI, W. L., JOHNSON, A., CHUA, B. C., & NOWINSKA, N. G. (2012). Three-dimensional interactive and stereotactic atlas of the cranial nerves and their nuclei correlated with surface neuroanatomy, vasculature and magnetic resonance imaging. *Journal of Neuroscience Methods*, 206(2), 205-216. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.02.026>
- PEDDIE, C. J., GENOUD, C., KRESHUK, A., MEECHAN, K., MICHEVA, K. D., NARAYAN, K., PAPE, C., PARTON, R. G., SCHIEBER, N. L., SCHWAB, Y., TITZE, B., VERKADE, P., WEIGEL, A., & COLLINSON, L. M. (2022). Volume electron microscopy. *Nature Reviews Methods Primers*, 2(1), 51. <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00131-9>
- POSE, E., SANCHO-BRU, P., & COLL, M. (2019). 3,5-Diethoxycarbonyl-1,4-Dihydrocollidine Diet: A Rodent Model in Cholestasis Research (pp. 249-257). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9420-5\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9420-5_16)
- ROEHLEN, N., CROUCHET, E., & BAUMERT, T. F. (2020). Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells*, 9(4), 875. <https://doi.org/10.3390/cells9040875>
- SPORNS, O., TONONI, G., & KÖTTER, R. (2005). The Human Connectome: A Structural Description of the Human Brain. *PLoS Computational Biology*, 1(4), e42. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010042>
- STEWARD, M. M., SRIDHAR, A., & MEYER, J. S. (2012). Neural Regeneration. *En Progress in Brain Research* (Vol. 71, pp. 163-191). [https://doi.org/10.1007/82\\_2012\\_302](https://doi.org/10.1007/82_2012_302)
- STIERLI, S., IMPERATORE, V., & LLOYD, A. C. (2019). Schwann cell plasticity-roles in tissue homeostasis, regeneration, and disease. *Glia*, 67(11), 2203-2215. <https://doi.org/10.1002/glia.23643>

- TAKI-ELDIN, A., ZHOU, L., XIE, H.-Y., & ZHENG, S.-S. (2012). Liver Regeneration after Liver Transplantation. *European Surgical Research*, 48(3), 139-153. <https://doi.org/10.1159/000337865>
- TREFTS, E., GANNON, M., & WASSERMAN, D. H. (2017). The liver. *Current Biology*, 27(21), R1147-R1151. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.019>
- WAGNER, M., & TRAUNER, M. (2016). Recent advances in understanding and managing cholestasis. *F1000Research*, 5, 705. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8012.1>
- WHITE, I. J., FURZELAND, S., & BURDEN, J. J. (2022). Breaking down the correlative workflow for array tomography: From section collection to image analysis. En S. Sanders (Ed.), *From 3D light to 3D electron microscopy: Shared experiences from the volume EM community* (pp. 6-7).
- WYNN, T. A. (2004). Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm. *Nature Reviews Immunology*, 4(8), 583-594. <https://doi.org/10.1038/nri1412>

## 8. Anexos

### 8.1. Anexo I. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible

El presente trabajo se relaciona con el ODS 3 Salud y bienestar ya que la investigación en cómo el hígado se regenera puede llevar a la aparición de nuevos tratamientos contra enfermedades hepáticas y la mejora de la calidad de vida de los afectados.

<b>Objetivos de Desarrollo Sostenible</b>	<b>Alto</b>	<b>Medio</b>	<b>Bajo</b>	<b>No procede</b>
ODS 1. Fin de la pobreza				X
ODS 2. Hambre cero				X
ODS 3. Salud y bienestar	X			
ODS 4. Educación de calidad				X
ODS 5. Igualdad de género				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles				X
ODS 12. Producción y consumo responsables				X
ODS 13. Acción por el clima				X
ODS 14. Vida submarina				X
ODS 15. Vida en ecosistemas terrestres				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos				X

## 8.2. Anexo II. Script en Python para el remuestreo.

```
import random

# Definir la lista de elementos y sus frecuencias
elementos = ["Fb", "Hp", "LEC", "IC", "PC"]
frecuencias = [54, 68, 11, 21, 3]

# Definir la combinación objetivo
combinacion_objetivo = ["Hp", "Hp"]

# Calcular la probabilidad teórica de la combinación objetivo
probabilidad_teorica = 1
total_frecuencias = sum(frecuencias)

for elemento in combinacion_objetivo:
    frecuencia_elemento = frecuencias[elementos.index(elemento)]
    probabilidad_elemento = frecuencia_elemento / total_frecuencias
    probabilidad_teorica *= probabilidad_elemento

# Definir el número de iteraciones de Monte Carlo
num_iteraciones = 100000

# Realizar el análisis de Monte Carlo
ocurrencias = 0

for _ in range(num_iteraciones):
    # Generar una combinación aleatoria
    combinacion_aleatoria = random.choices(elementos, weights=frecuencias,
k=len(combinacion_objetivo))

    # Comprobar si la combinación aleatoria coincide con la combinación
objetivo
    if combinacion_aleatoria == combinacion_objetivo:
        ocurrencias += 1

# Calcular la probabilidad observada
probabilidad_observada = ocurrencias / num_iteraciones

# Imprimir el resultado
print("Probabilidad observada:", probabilidad_observada)
```