



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

EFFECTOS DE LA D-MANOSA SOBRE EL METABOLISMO
DEL HÍGADO, DURANTE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA, EN

Rattus norvegicus

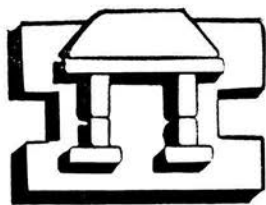
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

EDGAR RUBÉN MENDIETA CONDADO



IZTACALA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZ

IZTACALA, EDO. DE MÉX.

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Miembros del Jurado

Dr. Sergio González Moreno
Dr. Rolando Hernández Muñoz
Dr. Ignacio Peñalosa Castro
Dr. Ismael Ledesma Mateos
Biol. Jorge Gersenowies Rodríguez

Gracias a todos por el tiempo y la dedicación destinados a la revisión de este trabajo.

Dedicatoria

A **Jorge Mendieta Herrera y Celia Condado Torres.** Gracias por toda su generosidad, por sus cuidados, por su paciencia e infinito cariño, pero sobre todo por ser los mejores padres que jamás pude haber imaginado.

A **Angélica Mendieta Condado.** De quien adquirí el gusto por la Biología. Gracias por ser mi mentor de tantos años, por tu cariño entrañable y por ser una hermana ejemplar.

A **Jorge Alberto Mendieta Condado.** Gracias por todo tu apoyo y por tus valiosos consejos, pero sobre todo por ser mi hermano y amigo de siempre.

A **Patricia Zarate Estrada**
Gracias por tu amor incondicional, por tu comprensión y por todo el apoyo que me has brindado. El brillo de tu mirada es el mayor soporte mi felicidad.

In Memorium

De dos sabias personas quienes vigilaron mi infancia con absoluto cariño y que lamentablemente no pudieron estar presentes.

Celerina Herrera de Mendieta
Elodia Torres de Condado

Gracias, donde quiera que se encuentren...

Agradecimientos

Al Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz.

Un gran científico y un gran ser humano, que me abrió incondicionalmente las puertas de su laboratorio, un lugar en especial fértil para el desarrollo de nuevas ideas y el nacimiento de nuevos conceptos. Gracias por todo su apoyo en los momentos difíciles, pero sobre todo por su amistad y confianza.

Al Profesor Jorge Ricardo Gersenowies Rodríguez, por todo su apoyo y amistad a lo largo de la licenciatura.

A todas aquellas personas que me han ayudado hasta este momento, y a quienes debo gran parte de lo que he aprendido, en especial a Mauricio Díaz Muñoz, Alejandro Padilla Trejo, Tzipe Govenzesky, Edda Sciutto, Gabriel Garduño, Iván Flores y Marcos Bonilla.

A Gerardo de Jesús González Aguilar, gran amigo y confidente. Gracias por toda tu ayuda durante la edición de este trabajo.

Miguel Ángel Rendón Mondragón, Adriana Espinosa González, Alain Macedo Marquez y Alejandro Botello. Gracias por hacer de la FES Iztacala un lugar anecdótico, divertido y nostálgico.

A mis compañeros de laboratorio:

Armando Butanda, Lourdes Sánchez Sevilla, Marisela Olguín Martínez y Juan Antonio Suárez Cuenca. Gracias por todo lo que he aprendido de ustedes, por su apoyo y paciencia.

Al Dr. Alberto Aranda, en el Instituto Nacional de Cardiología *Ignacio Chávez*, por su valiosa apreciación en la evaluación histológica de este trabajo.

A la eficiente labor del personal administrativo de la Jefatura de la Carrera de Biología, de la FES Iztacala.

Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la Ciencia, no podrá comprender su tiranía; en otros terrenos sólo es posible avanzar hasta donde lo hicieron quienes nos precedieron y, una vez llegados a este punto no queda ya nada más por aprender; en la investigación científica, por el contrario siempre existe materia para nuevos descubrimientos y nuevas maravillas.

-Mary W. Shelley, Frankenstein—

Efectos de la D-manosa en el metabolismo del hígado,
durante regeneración hepática en *Rattus norvegicus*

Índice General

IZT.

Índice General.....	i
Abreviaturas.....	ii
Resumen.....	iii
Introducción.....	1
<i>La regeneración hepática.....</i>	2
<i>Factores que actúan como blancos proliferativos.....</i>	7
<i>Factores que actúan como mitogénos completos.....</i>	16
<i>Factores identificados como inhibidores.....</i>	21
<i>Otros Factores involucrados.....</i>	23
<i>El catabolismo de la glucosa</i>	
El transporte de glucosa.....	27
La fosforilación de glucosa y las Hexoquinasa.....	27
Redistribución de la Hexoquinasa.....	30
<i>Características de la D-manosa.....</i>	33
Antecedentes.....	37
Hipótesis.....	38
Objetivos.....	38
Materiales y Métodos	
Materiales.....	39
Estrategia Experimental.....	39
Parámetros Proliferativos.....	40
Parámetros Metabólicos.....	42
Parámetros de la Función hepática.....	44
Resultados	
Parámetros Proliferativos.....	45
Parámetros Metabólicos.....	48
Parámetros de la Función hepática.....	53
Análisis de Resultados y Discusión.....	55
Conclusiones.....	62
Referencias.....	64
Anexo.....	69

Abreviaturas

AMP	Adenosín monofosfato
AMPc	Adenosín monofosfato ciclico
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
TK	Timidina cinasa
HK	Hexocinasa
G-6-PDH	Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa
G-6-P	Glucosa-6-fosfatasa
LP	Lipoperoxidación
TBARS	Sustancias Reactivas al ácido Tio-barbitúrico
EDTA	Acido etilen-diamino-tetrasódico
Tris	Hidroximetilaminometano
EGF	Factor de Crecimiento Epidermal
HGF	Factor de Crecimiento hepático
MPI	Manosa fosfato isomerasa
MMP	Manosa fosfato mutasa
CGS	Síndrome de Glicosilación congénita
TGF- α	Factor de crecimiento transformante alfa
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante beta
TNF	Factor de necrosis tumoral
IL-n	Interleucina
RER	Reticulo endoplásmico rugoso
RFA	Proteínas de respuesta de Fase Aguda
HSS	Proteína estimuladora hepática
PKC	Proteína cinasa C
GLUT-n	Transportador de glucosa
HXT	Transportador de hexosas
EROS	Especies Reactivas de Oxígeno

Resumen

La hepatectomía parcial en rata provee un modelo *in vivo* altamente reproducible de la proliferación celular y organogénesis. Al hablar de la proliferación de células altamente diferenciadas, como los hepatocitos, no es difícil suponer que presenten diferencias marcadas con otros modelos de crecimiento celular; sin embargo, uno de los aspectos más conservados y comunes a toda célula en crecimiento, —desde arqueobacterias hasta cultivos neuronales de células de primates— es la oxidación de glucosa. En este sentido las vías glucolíticas, el ciclo del ácido cítrico y la vía de las pentosas no presentan grandes diferencias entre los taxones. Funcionalmente hablando, es posible —según los datos presentados— hacer que las hexocinasas de un hepatocito de rata fosforilen a un sustrato raramente encontrado en la dieta de roedores, pero común en el ambiente de arqueobacterias, hongos y plantas. Este sustrato es la D-manosa, un epímero de la D-glucosa.

En humanos se ha reportado grandes alteraciones en el metabolismo de la glucosilación de proteínas, que en su conjunto se denominan Síndrome de Glucosilación Congénito, (CGS) y mantienen dos variables principales. El tipo Ia, reporta la deficiencia de manosa 6-fosfato mutasa y la tipo Ib la deficiencia de la manosa 6-fosfato isomerasa. Ambas enzimas son hepáticas y naturalmente proveen de un suplemento activo de manosa, disponible para la glucosilación de proteínas en el Aparato de Golgi. Cuando no es posible sintetizarla como en estas enfermedades, suelen presentarse varias complicaciones y cambios en la morfología hepática, que van desde fibrosis hasta la hepatomegalia y deformación en la estructura de los canales biliares, acompañados de manifestaciones clínicas bastante severas. Esto nos da una idea de la importancia estructural de la manosa en el hígado; por lo cual resulta paradójico el saber que la manosa, mantiene una alta toxicidad en sistemas eucariotes de proliferación activa, desde meristemas de

raíz, fibroblastos, células de Erlich y células embrionarias, incluso en embriones de ratón, donde tiene un efecto altamente teratogénico.

Nos interesa conocer los efectos de la manosa sobre la regeneración hepática, pues aparentemente, en él convergen las dos situaciones donde este carbohidrato presenta, tanto un papel estructural esencial, como un papel metabólico altamente tóxico. Por otro lado, el hígado regenerante puede ser estimulado a proliferar de una forma más rápida ó a mantener las funciones hepáticas y hacer que su recuperación sea más lenta.

La administración de manosa altera varios parámetros metabólicos como el índice glicémico, los niveles de triglicéridos, así como la actividad de G-6-Pasa y HK. La hepatectomía por sí sola redistribuye la actividad de las hexocinasas, durante las primeras 48 horas post cirugía, aumentando de forma transitoria la actividad mitocondrial. La manosa es capaz de retrasar esta redistribución, hasta las 72 horas post hepatectomía, donde la actividad en mitocondria se eleva al menos 3 veces sobre el control. Los parámetros de las funciones hepáticas, se ven afectados de manera transitoria durante las primeras horas de la hepatectomía, este efecto se ve aumentado significativamente con la manosa. Histológicamente no existen cambios significativos entre un animal hepatectomizado y otro sometido a hepatectomía más manosa, en ningún tiempo. Así mismo existe un menor grado de esteatosis microvesicular en el animal sin manosa. El número de mitosis no varía significativamente entre ambos grupos experimentales, de forma que quizás las alteraciones metabólicas tan evidentes en los animales tratados con manosa, sean un reflejo de los mecanismos de *defensa* que permite al hígado no disminuir su tasa regenerativa neta.

Introducción

El hígado es una glándula digestiva que se encuentra presente en todos los vertebrados. Su antecedente estructural más cercano es la glándula presente en *Cephalochordados*, los cuales en su tubo digestivo presentan un ciego gástrico con un sistema venoso similar a la porta hepática, del cual aparentemente evolucionaron los divertículos hepáticos que le dieron origen. Sin embargo este tubo ciego es utilizado como un lugar para la absorción del alimento y comparte pocas homologías funcionales con el hígado de mamíferos.

En general en el hígado se llevan a cabo los procesos del metabolismo central, sus principales funciones son la detoxificación de la sangre, producción de bilis para la emulsificación de las grasas y su posterior catabolismo, la síntesis de albúmina y otras proteínas séricas, el metabolismo de los desechos nitrogenados y almacenamiento de ácido araquidónico y glucosa. Durante el desarrollo embrionario está implicado en la producción de eritrocitos y más tarde en la destrucción de aquellos ya viejos.

Principales Funciones Hepáticas

1. Formación de bilis
2. Almacenaje y liberación de glucosa
3. Formación de urea
4. Metabolismo de colesterol
5. Producción de proteínas plasmáticas (albúmina)
6. Metabolismo de las grasas
7. Metabolismo de hormonas polipeptídicas
8. Reducción y conjugación de hormonas esteroideas, corticosteroides y gonadales.
9. Síntesis de hidroxicoalciferol
10. Detoxificación de xenobióticos y toxinas endógenas

Tabla 1. Resumen de las funciones hepáticas en la mayoría de los vertebrados.¹

El hígado recibe irrigación sanguínea doble, ya que le llega sangre oxigenada por la **arteria hepática** y sangre desoxigenada que contiene nutrientes recién absorbidos por la **vena porta**. Las ramas de estos dos vasos transportan la sangre hasta los sinusoides, donde los hepatocitos captan oxígeno, la mayor parte de los nutrientes y ciertas sustancias tóxicas. Los nutrientes se absorben y se metabolizan así como las toxinas, las cuales se inactivan dentro del retículo endoplásmico del hepatocito, por el complejo de citocromos P₄₅₀.

El producto exocrino del hígado es la bilis, la cual se vacía en el intestino para emulsificar las grasas. En la mayoría de los vertebrados, la bilis se almacena en la vesícula biliar y se libera en cantidad suficiente cuando el quimo entra en el intestino. La vesícula biliar no existe en los ciclóstomos —lampreas y pez bruja—, en la mayor parte de las aves y en unos pocos mamíferos, tales como la rata. Las sales biliares participan en la emulsificación de las grasas, así como en la absorción de los lípidos después de su digestión. El colesterol se vuelve soluble en la bilis gracias a la presencia de las sales y fosfatidilcolina. El principal pigmento biliar es la **bilirrubina** cuyo metabolito es el **urobilinógeno**. Los factores que regulan la secreción de la bilis son varios, entre ellos la estimulación vagal, la secretina, el jugo pancreático y el flujo hepático. Los hepatocitos secretan la bilis al interior de los conductos biliares hasta el duodeno.

La Regeneración Hepática

Prometeo como castigo por haber llevado el fuego a los hombres, fue encadenado por Zeus en lo alto de una montaña, donde un águila se alimentaría de sus entrañas. Por las noches el hígado volver a crecer, de forma que el tormento se prolongaría para toda la eternidad. Desde el período de la Grecia Clásica, se conoce el proceso de la reconstitución hepática, de lo cual nos narra brevemente el *Mito de Prometeo*. Cruveihier y Andral a principios del siglo XX, fueron los primeros en reconocer la recuperación del hígado ante un daño y utilizaron el término *regeneración* para describir el proceso.

En 1931, Higgins y Anderson,³⁶ describen un modelo de regeneración hepática mediante la resección del $68\% \pm 2$ del hígado de la rata albina. El hígado remanente se recupera en su totalidad de tamaño en 7-10 días posteriores a la cirugía. El nuevo órgano presenta una pronta recuperación de las funciones hepáticas, comparables a las de un hígado normal, además de que tanto la función glucolítica, como la secreción biliar son efectivas en el nuevo parénquima. Sin embargo, existen diferencias en la actividad inmunológica y detoxificante del hígado en regeneración, comparado con el hígado normal. Así mismo, se calcula que el peso del hígado seco es del 28.7%, del hígado recién extraído y conforma el 1.042% del peso de la rata^{1,36}.

A través del tiempo se han establecido diferentes comportamientos en la respuesta hepática hacia un estímulo proliferativo:

1. La que ocurre después del daño hepático, químico o isquemia.
2. La hiperplasia compensatoria por la pérdida del tejido en otro lóbulo.
3. La respuesta hiperplasia ó hipertrófica hacia agente exógenos.

En 1957 Weiss y Kavanau proponen que el proceso regenerativo esta controlado por lo que llaman *templates* que estimulan el proceso y el crecimiento y *antitemplates*, los cuales inhiben específicamente la acción de los anteriores. En 1962 Bulloug formula la hipótesis de las chalonas, según la cual el factor inhibidor es producido por células funcionales y su concentración en el sistema es proporcional al número de células funcionales, luego entonces, una pérdida del 70% de la masa hepática consecuentaría en un decremento de la concentración del inhibidor y por lo tanto las células proliferarían hasta restaurar la masa original.⁴⁹

Aunque los hepatocitos son células altamente diferenciadas con vidas muy largas, no pierden su capacidad para replicarse. La respuesta proliferativa no es una verdadera regeneración, pero se define como un proceso de crecimiento compensatorio el cual lleva a la restauración de la masa hepática, por replicación

de las células en los lóbulos remanentes del hígado, sin el crecimiento de los lóbulos removidos durante la cirugía. Los hepatocitos del hígado regenerante mantienen sus principales características morfológicas, el patrón de polirribosomas característico de células diferenciadas y conservan un ciclo de la urea activo además de continuar con las funciones hepáticas normales.⁴¹

En el hígado, al parecer todos los hepatocitos son potencialmente proliferativos. El pico del índice de mitosis post-hepatectomía aparece a las 34 horas, mientras que el pico máximo de la síntesis de ADN aparece a las 24 horas. Durante las primeras 24 horas posthepatectomía, los niveles de ARNm para albúmina se mantienen sin cambio y los de α -fetoproteína bajan al 50%. Este mismo mensajero se eleva de 100 a 500 veces en la carcinogénesis hepática y en el desarrollo embrionario. De esta forma, el modelo de regeneración hepática es un modelo proliferativo *in vivo* que mantiene pocas semejanzas con otros modelos de crecimiento celular, como las líneas tumorales *in vitro*, células inmortalizadas, e inclusive modelos embrionarios clásicos.⁴¹

A este último punto, las células de un organismo pluricelular, de acuerdo a la actividad proiliferativa, pueden clasificarse en tres estados:

1. INTERMITOTICAS VEGETATIVAS: Las que las mitosis son frecuentes en condiciones fisiológicas normales, epitelio intestinal, médula ósea y la capa basal de la piel.
2. POSTMITOTICAS REVERSIBLES: Células del hígado y del riñón, en las cuales las mitosis son excesivamente raras, pero que se pueden incrementar notablemente si el tejido es estimulado para que crezca.
3. POSTMITOTICAS ESTABLES: Neuronas, leucocitos, polimorfonucleares y células queratinizadas, en las cuales no se observan mitosis⁴⁵.

La hepatectomía parcial provoca una serie coordinada de cambios metabólicos en el organismo, conocidos en su conjunto como Respuesta de Fase Aguda (RFA). Esta es una señal generalizada de respuesta a daño, y se llevan a cabo en un lapso

de tiempo comprendido entre hora/días. En este modelo es importante señalarlos, ya que muchas de las sustancias liberadas actúan como mediadores, amplificadores y/o potenciadores de la proliferación celular.

1. **Fiebre:** Causada por la acción de prostaglandinas de la serie E, la liberación de prostaglandinas en el hipotálamo es mediada por la acción del pirógeno, resultando en la liberación de ácido araquidónico de la membrana fosfolípida y su consecuente conversión hacia prostaglandinas vía la ciclooxigenasa (COX).
2. **Neutrofilia,** cambios en los niveles de glucagon, insulina, ACTH, hormona de crecimiento, TSH, aldosterona y vasopresina.
3. **Cambios metabólicos** como el incremento en el catabolismo de proteínas, cambios en el metabolismo de triglicéridos, cuerpos cetónicos, y ácidos grasos, aumento de la *gluconeogénesis*.
4. Aumento de las enzimas involucradas en la glicosilación de proteínas. Existe un decremento marcado en la actividad de la Fosfoenolpiruvato carboxicinas, y de la glucosa- 6- fosfatasa.
5. La ceruloplasmina es esencial para el transporte de cobre y puede agregar un papel importante en el abastecimiento de cobre para la citocromo oxidasa. Esta mantiene la actividad de oxidasa y puede tener un papel importante en la oxidación o inactivación de aminas bioactivas⁴⁶.

Aunque todas las células participan en la regeneración, la mayoría de los estudios se han enfocado a la principal célula funcional del hígado: el hepatocito. La síntesis de ADN en estas células comienza 12-16 horas post-hepatectomía, alcanzando el primer pico máximo entre 22 y 24 horas. Un segundo pico más pequeño ocurre a las 48 horas, el cual refleja la síntesis de ADN en la región centrolobular de los lóbulos hepáticos. La síntesis de ADN en las células no parenquimales empieza en promedio un día después que en los hepatocitos.^{49,50}

Un concepto central para el entendimiento de la regeneración hepática es que los hepatocitos son generados por eventos mitóticos que ocurren en hepatocitos maduros. **La generación de los nuevos hepatocitos no proviene a través de células troncales,** –stem cells— haciéndolo diferente con lo que sucede en la médula ósea, las criptas intestinales y otros modelos celulares de

proliferación *in vivo*. Las células troncales existen en el hígado y aparecen en algunas situaciones; tales células comparten marcadores de superficie de hepatocitos y células biliares, y suelen aparecer cuando la síntesis de ADN de hepatocitos se encuentra totalmente inhibida, o cuando los hepatocitos han sido destruidos, como en los casos de la hepatitis fulminante.⁴⁹

En este proceso, los factores de la circulación sanguínea afectan a la síntesis de ADN en el hígado *in situ*. Esto se ha demostrado con los experimentos de **circulación parabiótica**, en los cuales se mantiene circulación cruzada entre dos ratas, una de las cuales se sometió a hepatectomía del 70%. El hígado de la rata no operada respondió con la síntesis de ADN. Este fenómeno se presenta incluso cuando el hígado de la otra rata se removió completamente.

Esencialmente existen pocas especies nuevas de ARNm durante la regeneración, al menos detectables con las técnicas disponibles actualmente⁵¹. Los primeros estudios en este proceso se enfocaron a los cambios metabólicos, encontrando un incremento en la actividad de ornitina descarboxilasa 1.5h después de la hepatectomía.⁴⁹

Otro modelo para estudiar este proceso, es el aislamiento de hepatocitos provenientes de un hígado regenerante. Utilizando hígado aislado y perfundiéndolo con colagenasa, es posible cultivar hepatocitos y mantenerlos viables en un medio suplementado. En este caso la insulina juega un papel esencial debido a que sin ella, los hepatocitos degeneran en un lapso de 24-48 h.; así mismo otros, de los requerimientos son la presencia de prolina en el medio y estar sembrados a baja densidad. La presencia de catecolaminas por sí mismas no pueden iniciar la síntesis de ADN, pero pueden modular la que inician otros factores de crecimiento. Utilizando este modelo se han podido definirse 3 categorías de las sustancias encontradas en la circulación sanguínea de los modelos *in vivo*; Mitógenos completos, inhibidores de crecimiento y blancos proliferativos o mitógenos incompletos.^{48,49,50}

Factores que actúan como blancos proliferativos, durante el proceso regenerativo

Insulina y glucagon. La insulina promueve la síntesis de ADN en el hepatocito, tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, con una inyección intravenosa de insulina, se suprime la síntesis de ADN en ratas.⁴⁴ La insulina y el glucagon parecen ser necesarios en el proceso regenerativo, pero todo parece indicar que su papel es más bien potenciador que iniciador del proceso de crecimiento hepático *in vivo*. Ambos parecen actuar de forma sinérgica, aunque no está claro si su mecanismo de acción es directo o indirecto.⁴⁴

Las ratas con diabetes experimental inducida por aloxano responden a la hepatectomía parcial de forma más lenta, alcanzando valores de tasa de síntesis de ADN de aproximadamente el 60% de ratas sanas. Por el contrario, la administración de insulina exógena acelera la proliferación hepática de ratas diabéticas.⁵²

La administración combinada de insulina y glucagon no tiene efecto sobre ratas controles, pero en ratas hepatectomizadas acelera ligeramente la síntesis de ADN, aunque no modifica la amplitud del proceso.

En ratas pretratadas con zinc-glucagon, la respuesta a la hepatectomía se adelanta con un pico de síntesis de ADN más pronunciado lo que indica que esta hormona produce una aceleración en la regeneración hepática. Sin embargo, cuando el glucagon se añade a cultivos de hepatocitos cuya proliferación se ha estimulado por insulina + EGF, el efecto de la dosis depende del momento en el que se añade la hormona.

La regeneración hepática, tras la hepatectomía esta asociada con un aumento de los niveles de glucagon y una disminución de los de insulina portal y sistémica. Es poco probable que estos cambios se deban al proceso regenerativo en sí, y más bien parecen producidos como consecuencia de la hipoglucemia resultante del proceso quirúrgico. A pesar de esta caída en los niveles de insulina,

esta hormona parece tener un efecto positivo sobre la regeneración, mientras que el efecto del glucagón depende mucho más del estado metabólico de las células y del balance con otras hormonas. Durante el proceso de regeneración hepática, existe un mecanismo de comunicación entre el hígado y el páncreas, de tal forma que bajan los niveles de insulina y suben los de glucagón⁴⁴.

Ledesma concluye que durante la regeneración hay un incremento en el tránsito de receptores para insulina entre el Aparato de Golgi y la membrana plasmática (redistribución). El incremento en los receptores de insulina en el hígado regenerante es debido a un incremento en el tránsito de los mismos, con el aparato de Golgi, como consecuencia de un estado forzado por la disminución de los niveles de insulina circulantes y del requerimiento de ella por el hepatocito para su proliferación⁴⁴.

Existe una síntesis *de novo* de los receptores de insulina, ya que el incremento con el número de sitios de unión es detenido y revertido por la administración de cicloheximida y mitomicina C. Esto podría explicarse por la inhibición de la síntesis de una enzima o proteína que participa en el proceso de translocación del receptor entre el Aparato de Golgi y la membrana plasmática.⁴⁴

Norepinefrina y Epinefrina. Es bien sabido que los efectos adrenérgicos son mediados por diferentes subtipos de receptores con distintos mecanismos de transducción de señales. En los hepatocitos la mayoría de los adrenoceptores son de tipo α_1 o β_2 . El bloqueo de cualquiera de los dos tipos de receptor puede alterar el patrón de síntesis de ADN. Así la administración de un antagonista de tipo α como la fenoxibenzamida, 9 horas después de la hepatectomía, retrasa el pico de síntesis de ADN por 3 horas. Si se administra un antagonista β adrenérgico como el propanolol, 8 horas después de la hepatectomía parcial, el período prerreplicativo se puede alargar 6 horas; si este mismo antagonista se administra 30 minutos antes de la hepatectomía a las 24 horas se observa una disminución la síntesis de ADN, de aproximadamente el 50%⁵³.

Existe una hipótesis según la cual la activación de los nervios espláncnicos activaría la proliferación celular mediante su acción sobre los receptores α 1-adrenérgicos, que desencadena una cascada de segundos mensajeros de tales como un aumento del *recambio* de los inositoles, con la formación de inositol trifosfato –movilizador de calcio intracelular– y de diacilglicerol que activa a la proteína cinasa C (PKC) que a su vez produce la fosforilación de los receptores α 1 y su desensibilización. Así, la PKC actúa como mensajero negativo frente a una respuesta excesiva a través del receptor α 1. Se ha observado como el éster de forbol PMA –forbol, 12 miristato, 13 acetato– previene el proceso regenerativo *in vivo* después de hepatectomía parcial, lo que puede deberse a que esta sustancia activa a la PKC, que fosforila y desensibiliza al receptor α 1, haciéndolo insensible a la acción de las catecolaminas.⁵⁴ La inhibición de la regeneración hepática por parte del éster de forbol a través de una desensibilización de los receptores α 1 es compleja, ya que la PKC desensibiliza otros receptores hormonales que movilizan calcio, como son el EGF, la vasopresina o la angiotensina II.⁵⁵

En cultivos de hepatocitos, la adición de norepinefrina al sembrar las placas provoca un aumento de la síntesis de ADN en la fase S y además adelanta la entrada en esa fase. Tanto la epinefrina y norepinefrina –agonistas α 1 y β –, como el isoproterenol –agonista β – o la fenilefrina –agonista α 1– estimulan la entrada de las células en la fase S lo que demuestra la implicación de ambos receptores en el proceso estimulador, al menos inicialmente.⁵⁵ Experimentos con **prazosin** –bloqueador α 1– y con **timolol** –bloqueador β – combinados con norepinefrina indican que ambos bloquean parcialmente la respuesta a norepinefrina, pero de distinta manera.⁵⁴ El primero lo hace a dosis altas, mientras que el segundo lo hace a dosis bajas. Esto quiere decir que el efecto estimulador de la norepinefrina consta de ambos componentes, siendo el α 1 el mayoritario ante dosis altas de norepinefrina y el β 1 a dosis bajas.^{54,55}

En etapas posteriores del cultivo (transición G1–S), el número de receptores B aumenta y la norepinefrina causa una inhibición reversible de la síntesis de ADN celular, que es mimetizada por el isoproterenol, revertida por el

timolol y no se afecta por el prazosin, lo que sugiere que es un efecto mediado por los adrenoreceptores β .⁵⁵ La estimulación de los receptores provoca un aumento en los niveles de AMPc, que en etapas próximas a la frontera entre la fase G 1 y S produce inhibición de como ocurre con la adición de la síntesis de ADN Glucágon en estas etapas finales del ciclo celular. Por lo que se sugiere que la acción mediada por los receptores B podría jugar un papel en los procesos de finalización de la proliferación celular.⁵⁵

La estimulación de la síntesis de ADN por parte xenobióticos —promotores tumorales— como el hexaclorociclohexano, se ve potenciada si a las placas de cultivo se les añade norepinefrina. Esta estimulación es aditiva, por lo que podemos pensar que este tipo de xenobióticos no median su acción vía adrenoreceptores.⁵⁵

Los cambios rápidos —expresión de oncogenes en 30-60 minutos— que se observan después de hepatectomía parcial podrían explicarse por la liberación de norepinefrina de los nervios simpáticos hepáticos o por aumento de los niveles circulantes de catecolaminas que aparecen poco después de la resección. Algunos autores piensan que norepinefrina es capaz de aumentar el efecto mitogénico de distintos factores de crecimiento presentes en el *microambiente* del hepatocito —EGF, hepatopoiatina A— y contrarrestar el de algunos *mitoinhibidores* como el TGF- β 1.^{55,53}

Vasopresina y Angiotensina. Los experimentos *in vivo e in vitro* revelan una capacidad estimuladora de la síntesis de ADN por parte de la vasopresina. Estudios de regeneración hepática tras hepatectomía, en ratas Brattleboro —una cepa mutante de las ratas Long-Evans, con deficiencia genética de vasopresina— indican que la tasa de síntesis de ADN para esta especie es considerablemente menor que la cepa Long-Evans. La infusión de niveles fisiológicos de vasopresina a las ratas Brattleboro parece normalizar el proceso regenerativo, por lo que esta sustancia parece ser importante en la regeneración; sin embargo, por sí sola no es capaz de mantener activo el proceso. La angiotensina ha demostrado ser necesaria para satisfacer el riego circulatorio. modulación del crecimiento hepático

tras hepatectomía.⁵⁶ En cultivos primarios de hepatocitos adultos, se ve como la arginina-vasopresina potencia la síntesis de ADN inducida por suero de rata o por la combinación de EGF e insulina.⁵⁶ La **angiotensina y la vasopresina** actúan de forma similar a como lo hace la **norepinefrina**, pero de manera menos potente. Su acción implica la estimulación de la glucógenolisis y el *recambio* de inosítoles, que está asociado con una cascada de señales intracelulares. Las tres sustancias pueden actuar como neurotransmisores y tienden a balancear el efecto inhibitorio de TGFβ1 en cultivos de hepatocitos.^{54,55}

Hormonas de la Corteza Suprarrenal. La ACTH y los glucocorticoides tienen un efecto positivo sobre el crecimiento hepático, debido a una acción hipertrófica pero no hiperplásica. Bajo su efecto se produce un aumento del tamaño celular, pero no aumenta el índice de marcaje o el índice mitótico. Incluso en algunas circunstancias pueden llegar a inhibir la hiperplasia desencadenada por hepatectomía parcial o tras la intoxicación con Tetracloruro de carbono.⁵⁷ Algunos autores adjudican a los glucocorticoides un efecto sincronizador del proceso regenerativo. La adrenalectomía bilateral causa un pequeño incremento de la síntesis de ADN, que es suprimido si se trata a las ratas con corticosterona. —su principal glucocorticoide— Se cree que tras la hepatectomía parcial aparece un ligero incremento en los niveles circulantes de corticosteroides que bloquea a las células en un punto de G₀, donde se acumulan, pero la actividad específica de la hormona disminuye posteriormente al unirse a proteínas plasmáticas específicas para ella que también se ven aumentadas; esto permite que las células entren finalmente en fase S de forma más o menos sincronizada⁵⁷. La proliferación de las células hepáticas en ratas inmaduras es fuertemente suprimida por bajas dosis exógenas de glucocorticoides. La administración de una o dos veces la secreción basal de glucocorticoides, puede inducir una sustancial inhibición de la población hepatocitaria, mientras dosis mayores pueden inhibir de manera casi completa la síntesis de ADN⁵⁵.

La situación de los modelos *in vivo* es más compleja, la proliferación celular durante la regeneración hepática muestra una considerable pérdida de sensibilidad a la inhibición por glucocorticoides. Se debe administrar cantidades enormes de glucocorticoides para alcanzar una supresión del 50% de la proliferación celular⁵⁵. En cultivos de hepatocitos de rata neonata, la dexametasona inhibe la capacidad del binomio EGF + glucagón, pero no la del EGF + insulina, de estimular la síntesis de ADN, lo que sugiere que el mecanismo de acción puede implicar la interacción con otros factores para modular los niveles de receptor para EGF⁵³. En cultivos de hepatocitos de ratas adultas se han demostrado tanto un retraso en la síntesis de ADN como una estimulación bifásica.⁵⁵ Se ha observado como el GABA además de sus propiedades como neurotransmisor, puede actuar controlando el crecimiento hepático. La administración de GABA exógeno a ratas hepatectomizadas, impide el componente hipertrófico de la regeneración pero no la síntesis de ADN. El mecanismo pudiera ser debido a la disminución de los niveles séricos de corticosterona y de putrecina hepática que se han observado después de la administración de GABA. La administración exógena de corticosteroides hace que la hipertrofia vuelva a los valores control.⁵⁵

Hormonas Tiroideas. Se acepta que estas hormonas provocan una respuesta hipertrófica e hiperplásica en el hígado. Después de una dosis farmacológica de *triiodotironina* (T_3), la síntesis de ADN y la mitosis se estimulan significativamente, pero con un considerable retraso si se compara con el observado después de la hepatectomía parcial.⁵⁷ Una mezcla conocida por **TAGH** y compuesta por T_3 , aminoácidos, Glucagón y heparina provoca una explosión en la síntesis de ADN similar a la que ocurre tras hepatectomía parcial. La T_3 es el componente más importante de la mezcla, ya que si se adelanta la administración de T_3 8 horas respecto a la mezcla AGH, la síntesis ocurre mucho antes que si la secuencia es la contraria. El Glucagón puede sustituirse por AMPc sin disminución de la actividad.⁵⁸ Se ha observado que la tasa de regeneración en ratas controles,

o tiroidectomizadas tratadas con T₄ es el doble que en ratas tiroidectomizadas no tratadas. Los niveles plasmáticos de T₃ después de la hepatectomía parcial disminuyen y la capacidad de unión de la hormona al núcleo también disminuye, lo que se ha podido observar *in vivo* y en experimentos con núcleos aislados⁵⁸.

Paratohormona y los Derivados de la Vitamina D. La hepatectomía parcial causa una hipocalcemia e hipofosfatemia que persiste al menos 8 horas. Esto justifica que la secreción de paratohormona (PTH) esté aumentada en los primeros estadios tras la resección hepática. Por otra parte la regeneración hepática se ve disminuida en ratas cuyas glándulas paratiroides han sido extirpadas. La administración a estos animales de PTH o calcio, hasta 12 horas después de la resección hepática, normaliza los valores de síntesis de ADN⁵⁹. Parece más evidente una cierta relación funcional entre la homeostasis del calcio y los procesos de regeneración hepática. Actualmente se cree que el AMPc y quizá algún otro segundo mensajero actúan por la movilización del Ca⁺⁺ desde los depósitos de almacenamiento intracelular al citosol donde las concentraciones de Ca⁺⁺ libre en situación de reposo son muy bajas. El calcio puede así activar a determinadas proteínas dependientes de este ión que juegan un papel en los procesos de control de la síntesis de ADN⁵⁹. Parece que el calcio no está involucrado en el control de los momentos iniciales de la regeneración, ya que los hepatocitos pueden activarse en ratas sometidas a hipocalcemia o extirpación del paratiroides y alcanzar un avanzado estado de presíntesis de ADN. Sin embargo, su implicación sí parece importante en los procesos subsiguientes. También se ha sugerido que la señal de inicio de la proliferación celular puede ser la pérdida del contacto inhibitorio mantenido por las células. En este sentido la pérdida de acoplamiento eléctrico puede tener un papel de comunicación intercelular. El 12-0-tetradecanoilforbol-13 acetato es un promotor tumoral que induce desacoplamiento eléctrico, pudiendo actuar por aumento de la concentración citosólica de Ca²⁺. La subida del calcio citosólico determina un aumento de la permeabilidad en la membrana plasmática al K⁺, que se desplaza hacia el exterior

de la célula para distribuirse en función de su gradiente electroquímico, disipando así el potencial de la membrana.⁵⁹ Aunque la vitamina D3 se ha relacionado en otros tipos celulares con la regulación de genes implicados en el proceso de proliferación y diferenciación celular como el **c-myc**, **c-myb** e **histona H4**, en el hígado en regeneración los derivados de esta vitamina pueden jugar un papel en el control de la ADN polimerasa. Por otra parte, el 1, 25 dihidroxicolecalciferol modifica el crecimiento de las células que han iniciado ya el ciclo celular. Su acción parece también estar mediada por las variaciones de concentración del calcio intracelular que inducen.

Prostaglandinas y Tromboxanos En las primeras 8 horas posthepatectomía los niveles de prostaglandina E (PGE), aumenta notablemente en el hígado remanente hasta llegar a duplicarse, debido a un aumento de su biosíntesis. La indometacina previene este aumento, así como el pico de síntesis de ADN subsiguiente.⁵⁵ También se ha observado un aumento de la síntesis de tromboxano después de hepatectomía parcial. El imidazol, que es un inhibidor específico del tromboxano, es capaz de inhibir la síntesis de ADN.⁵⁵ Los inhibidores de la síntesis de prostaglandinas y tromboxano, como la hidrocortisona, dexametasona y ácido mefenámico, evitan que las células hepáticas entren en mitosis después de hepatectomía parcial. El ácido araquidónico revierte completamente el efecto de la hidrocortisona o la dexametasona, pero no el del ácido mefenámico. La indometacina además de evitar la mitosis, inhibe la síntesis de ADN. La adición de PGF 2 α a medios de perfusión de hígados aislados de rata provoca un aumento de los niveles hepáticos de GMP cíclico y de la actividad ornitina descarboxilasa.^{55,53} La síntesis de ADN en cultivos de hepatocitos es activada por ácido araquidónico, PGF2 α y PGE2 α . Se piensa que el efecto del TGF- α se debe en parte a la activación de la ruta del ácido araquidónico mediante la activación de la fosfolipasa A2⁵³.

Hormonas Sexuales. Durante la regeneración hepática que sigue al proceso de hepatectomía existe un aumento de la translocación de los receptores para estrógenos hacia el núcleo. La administración de estrógenos a ratas no hepatectomizadas produce internalización de su receptor y un aumento del peso del hígado y de la síntesis de ADN, Así mismo, se ha encontrado un aumento de la regeneración hepática en ratas preñadas⁵⁵

La Hormona de Crecimiento y los Factores de Crecimiento Tipo Insulina. La GH tiene un claro papel fisiológico estimulando el crecimiento postnatal, un efecto claro de la GH es aumentar la expresión de potentes estimuladores de la proliferación y de la diferenciación de distintos órganos, las somatomedinas o "Insulin-like growth factor" (IGF). Aunque el hígado es el principal órgano productor del IGF-I circulante, el papel de esta hormona como promotora del crecimiento del propio tejido hepático es menos claro que en otros tejidos. En ratones con deficiencia en GH, la administración de IGF-I produce un aumento proporcionado de la masa corporal y hepática⁶⁰, mientras la administración de GH produce mayor crecimiento de la masa hepática que de la corporal.⁶¹ Tanto el IGF-I, como el IGF-II pueden actuar no sólo a través de sus receptores —que son diferentes—, sino a través del receptor para la insulina. En la hepatectomía, el efecto del IGF-II puede reflejar el efecto mimético de estas sustancias con la insulina.⁵⁵

Somatostatina La somatostatina es un péptido producido por el páncreas y el intestino, que se encuentra ampliamente distribuido por el sistema gastrointestinal, alcanzando a nivel portal concentraciones 10 veces mayores que en circulación sistémica. Se ha visto que la somatostatina inhibe la síntesis de ADN inducida por el EGF y HGF en cultivos de hepatocitos de rata adulta de manera dosis dependiente y sin efecto tóxico. Parece ser que la inhibición se produce en una fase temprana del ciclo celular y su mecanismo de acción no es mediado por el AMP cíclico^{55,41}.

Factores que actúan como mitogénos completos durante el proceso regenerativo

Factor de Crecimiento Epidermal (EGF). Es un polipéptido de 53 aminoácidos, aislado inicialmente de las glándulas salivares de ratón macho. Se encuentra presente en gran cantidad de tejidos y fluidos corporales, y está involucrado en la regulación de una gran cantidad de procesos fisiológicos y patológicos, como la embriogenesis, el crecimiento, la reparación de tejidos, regeneración y neoplasia. La urogastrona parece ser el equivalente humano del EGF, ya que presenta gran homología en la secuencia de aminoácidos y en sus funciones.⁵⁵

Este factor de inducción mitótica de las células epiteliales también puede estimular la síntesis de ADN. De hecho fue la primera sustancia en demostrar este efecto, y es aún la hormona polipéptidica más requerida para inducir la síntesis de ADN en hepatocitos en cultivo. En ratas sialadenectomizadas —lo cual causa un decremento mayor en la concentración de EGF— se decreta la respuesta proliferativa cuando se realiza la hepatectomía. Por otro lado las concentraciones de EGF después de la cirugía solo aumentan ligeramente —menos del 30%—. La norepinefrina aumenta drásticamente sus niveles con la hepatectomía y estimula la secreción de EGF por medio de las glándulas de Brunner en el duodeno a través de la circulación portal.^{55,53} La señalización es a través del receptor EGFR, el cual es una glicoproteína de 1186 aminoácidos, la cual se encuentra organizada en 3 elementos estructurales: un dominio extracelular que une al EGF, un dominio transmembranal y un dominio intracelular que posee actividad de tirosina proteína cinasa. Tras la unión del EGF a su receptor, se produce una rápida dimerización y una autofosforilación de las dos subunidades del receptor, el complejo ligando receptor es rápidamente internalizado dentro de las estructuras vesiculares y transportado al aparato lisosomal, donde el complejo es degradado.

La concentración plasmática de EGF en ratas hepatectomizadas está significativamente elevada desde las 6-18 horas posthepatectomía, siendo el aumento detectable a partir de las 2 horas. En ratas se ha descrito que el número de receptores de EGFR aumenta durante las 2-4 horas posthepatectomía para después disminuir por debajo de los valores control durante la fase final de la etapa. La disminución de los receptores de superficie de EGF se llevan a cabo en pocas horas, sugiriendo que el EGF tiene un papel mitogénico sólo durante los eventos primarios de este proceso.

Una de las posibles causas de este proceso de *down regulation* es la disminución de los niveles de ARNm para el receptor de EGF, 18 horas después de la hepatectomía, a un tercio de lo observado en animales intactos. No se han observado grandes cambios en la afinidad del receptor hacia el EGF, por lo que el descenso en la capacidad de unión se debe a una disminución de los receptores sintetizados y quizá a mecanismos postraslacionales como la ocupación intracelular de los receptores por *transforming growth factor- α* , cuyos niveles de ARNm están aumentados hasta 8 veces en este período⁵⁵. Se sabe que las poliaminas, y en concreto la putrescina, son factores importantes en el conjunto de procesos que rigen la regeneración hepática. La administración de EGF a ratas hepatectomizadas estimula la producción de putrescina hepática debido al aumento de dos actividades enzimáticas, la ornitina descarboxilasa —enzima que controla el paso de ornitina a putrescina— y la actividad de aminopropil transferasa —que controla el paso de putrescina a espermidina—. ^{53,55}

Factor de Crecimiento Transformante Alfa. (TGF- α) Los *transforming growth factor α y β* . inicialmente fueron descritos como un factor único, producido por células tumorales, capaz de inducir crecimiento en células no neoplásicas. Sin embargo, posteriormente se consiguió separar dos factores con funciones, estructuras, secuencias de aminoácidos, tamaños de sus ARNm y receptores celulares totalmente distintos⁶.

El efecto del $TGF\alpha$ es el de estimular el crecimiento o la transformación celular, y no se ha encontrado efecto inhibitor sobre ningún tejido. La producción de $TGF\alpha$ por los hepatocitos de rata aumenta durante la regeneración hepática. Los niveles de ARNm para $TGF\alpha$ en hígados en regeneración siguen un desarrollo temporal similar al encontrado para la síntesis de ADN^{6,41,53,55}. Estos niveles no son detectables hasta las 12 horas después de la hepatectomía parcial y se alcanza el máximo a las 24 horas, coincidiendo con el pico de síntesis de ADN.

Por lo tanto, es poco probable que este factor sea el responsable de los cambios más tempranos que ocurren en la expresión génica que acompaña a la síntesis de ADN en los hepatocitos, debido al desarrollo temporal de sus niveles. Como el $TGF\alpha$ se une a las células vía el receptor para EGF y el ARNm para este factor ha sido detectado en los propios hepatocitos, se puede considerar al $TGF\alpha$ como un estimulador del crecimiento de tipo autócrino cuyo papel durante la regeneración hepática queda por establecer.⁶

Se sabe que durante el período prerreplicativo se produce una disminución de la capacidad de unión del EGF a sus receptores en hepatocitos de rata. Uno de los posibles motivos serían los altos niveles de $TGF\alpha$ que pudieran ocupar parcialmente la población de estos receptores.⁵⁵

Factor de Crecimiento Hepático.(HGF) Del suero de ratas control y hepatectomizadas se aisló un potente factor de crecimiento del tipo HBGF, con capacidad para estimular la síntesis de ADN en hepatocitos en cultivo, y que se denominó hepatopoyetina A (HPTA)⁴¹. Este compuesto es muy similar al encontrado por otros autores en plasma humano y en plaquetas de rata, identificado como *hepatocyte growth factor* (HGF). Su estructura es la de un heterodímero compuesto de dos subunidades de aproximadamente 69 y 34 Kd cada una, unidas por un puente disulfuro, provenientes de un mismo precursor activado por un proceso proteolítico⁶.

Aún no está claro cuales son las células productoras de este factor pero las pruebas inmunohistoquímicas de que se dispone revelan que las células parenquimales hepáticas no participan en su síntesis. Entre las posibles fuentes de

producción extrahepática de HGF se encuentran los pulmones, el páncreas exocrino, glándula tiroides, glándulas salivares, cerebro, glándulas de Brunner y plaquetas⁶. Mediante hibridación *in situ*, se ha comprobado que en el hígado también existen células capaces de producir este factor como las células de Kuffer y las células endoteliales^{6,41,55}.

El HGF ejerce su acción a través de un único receptor de membrana plasmática, que ha sido identificado como el producto del protooncogen c-met, con actividad tirosina kinasa. Cuando los niveles de HGF se elevan, durante la regeneración hepática, el receptor sufre un proceso de *down regulation*.^{6,55}

Se cree que el HGF es el factor de crecimiento más potente conocido para hepatocitos aislados, ya que su valor de estimulación máxima-media ronda los 10 pM, mientras que el de otros estimuladores como EGF, TGF α y aFGF está en el rango de 0, 1-5 nM, lo que significa que el HGF es al menos 10 veces más potente que estos factores⁶⁰. El efecto mitogénico del HGF puede estar modulado por el contacto célula-célula, de forma que en hepatocitos cultivados en baja densidad este factor aumenta la síntesis de ADN, pero no cambia los niveles de ARNm para la albúmina; mientras en cultivos de alta densidad el efecto es el contrario⁶¹.

Los niveles plasmáticos de HGF aumentan del orden de 17 y 13 veces, dos horas después de hepatectomía parcial y del tratamiento con tetracloruro de carbono, respectivamente. La concentración de norepinefrina después de la hepatectomía aumenta de forma muy similar a como lo hace el HGF —alcanza un máximo a las 2 horas— y además las catecolaminas puede amplificar la respuesta al HGF. Así pues, un posible mecanismo de acción respondería a la pérdida de masa con una disminución en la captación de HGF y del metabolismo de las catecolaminas, con lo que los niveles plasmáticos tanto de HGF como de norepinefrina aumentarían, provocando una estimulación del crecimiento hepático provocada por el HGF y amplificada por la norepinefrina⁶¹.

Se ha comprobado que el HGF también es un factor hepatotrófico *in vivo*. Mediante inyección intravenosa de HGF a ratones que habían sufrido una hepatectomía parcial del 30% de su masa hepática se consiguió adelantar el pico de síntesis de ADN y estimular su síntesis de una manera dosis dependiente, además de aumentar su peso hepático.^{55,61}

Si la hepatectomía sufrida era del 70% también se producía estimulación, pero en menor grado. Este mismo tratamiento prevenía el aumento de los niveles séricos de bilirrubina y enzimas marcadoras hepáticas después de provocar una colestasis intrahepática por tratamiento con ec-naftil isotiocianato, es decir, también protege la integridad de los hepatocitos *in vivo* contra la hepatitis causada por hepatotoxinas.⁶¹

Originalmente se pensó que el HGF era un mitógeno específico para el hígado, estudios recientes han demostrado su efecto mitogénico sobre otros tipos celulares como queratinocitos, melanocitos y células tubulares renales. Parece ser que el HGF no solo media la respuesta al daño hepático en los hepatocitos, sino que es capaz de ejercer su efecto mitógeno y morfógeno en células no parenquimales hepáticas, como se ha visto en cultivos de líneas derivadas de células epiteliales no parenquimales de ratón⁶¹. La adición de HGF induce mitogénesis y extensión de las colonias que se mantenían en cultivo, además de producir profundos cambios morfológicos que no eran inhibidos por el TGF- β , ni mimetizados por otros factores de crecimiento como TGF- α , EGF, aFGF o insulina⁵⁵. Además de su actividad como mitógeno, estimula la movilidad de células epiteliales.⁶

El HGF parece activar el proceso proliferativo, tanto después de hepatectomía parcial como después de necrosis hepática celular aguda. En otros modelos de proliferación hepática como el de la dieta deficiente en colina, que causa necrosis celular, los niveles hepáticos de ARNm para el HGF se ven aumentados después del tratamiento. Esto debe interpretarse como que el papel del HGF sobre la proliferación celular hepática *in vivo* depende de la naturaleza del estímulo proliferativo.^{6,60,61}

Factores identificados como inhibidores del proceso regenerativo

Factor de Crecimiento Transformante- β . El crecimiento hepático no sólo está controlado por factores estimuladores, sino que los inhibidores juegan un papel muy importante. Para un gran número de tipos celulares, incluidas las células epiteliales, el TGF- β es el inhibidor del crecimiento más potente conocido. Su peso molecular es de 25 Kd, es secretado en forma latente, sin tener actividad biológica, con un peso de 400 Kd. En vertebrados se han identificados cinco formas distintas de este factor —TGF- β 1, β 2, β 3, β 4 y β 5—. Las primeras tres se encuentran en mamíferos, cualquiera de las cuales es capaz de inhibir el crecimiento de hepatocitos en cultivo, las formas 4 y 5 se encuentran en anfibios y peces.^{55,60}

Después de una hepatectomía parcial los niveles de ARNm para el TGF- β alcanzan un máximo (8 a 10 veces el valor normal) a los dos días del pico de síntesis de ADN. Los hepatocitos poseen receptores para TGF- β pero no sintetizan el ligando. Es en las células no parenquimales del hígado —células endoteliales— donde se ha encontrado ARNm para este factor.

Dada la cercanía entre las células endoteliales y los hepatocitos, el TGF- β puede ser el efector de una ruta paracrina, que es activada en el hígado después de hepatectomía parcial, para prevenir la proliferación celular incontrolada, formando parte de las señales que hacen que la regeneración cese en un momento determinado. De hecho, la administración de TGF- β a hígados de rata en regeneración bloquea la síntesis de ADN, si se hace en la fase G1 tardía, mientras que la administración en el momento de la hepatectomía no tiene efecto alguno.⁶⁰

La inhibición del crecimiento producida por el TGF- β y otros factores como la interleucina 10, sobre cultivos de hepatocitos, depende de varios factores como la densidad celular, siendo el efecto del TGF- β más potente a bajas densidades y el de la interleucina 10 a altas densidades celulares⁶⁰, y del mecanismo

desencadenante del proceso proliferativo. Así, el TGF- β inhibe la síntesis de ADN inducida por factores de crecimiento endógenos, pero no la inducida por xenobióticos como el fenobarbital y el hexaclorociclohexano en cultivos de hepatocitos^{55,60}.

No se ha visto efecto sinérgico en la inhibición producida por TGF- β y glucagon sobre la síntesis de ADN, ni que el TGF- β modifique los niveles de AMPc basales o inducidos por Glucágon. Se han probado la importancia del TGF β , durante el desarrollo de los procesos cirróticos, pues incrementa el anclaje de las células a matrices extracelulares y aumenta la síntesis de componentes de la matriz, a través de sus receptores TBRIII, -o proteoglicano—, sin embargo aunque sus niveles comienzan a subir a tiempos tempranos post hepatectomía, todos sus receptores desaparecen al mismo tiempo, lo cual constituye la paradoja del TGF β . Sin embargo, se piensa que puede efectuar otra acción diferente a través del receptor de manosa-6-fosfato/IGF-II.^{6,41,55,60,61}

Interleucinas. Las endotoxinas liberadas por las bacterias intestinales, no eliminadas por el hígado debido a la ausencia de un número apropiado de macrófagos tras la hepatectomía parcial, pueden ser la causa de la estimulación de macrófagos y monocitos para la producción de citocinas que son importantes en la respuesta proliferativa. Estas citocinas, como la interleucina 1 (IL-1) o el **factor de necrosis tumoral (TNF)**, actúan sobre la regeneración hepática activando la ornitina descarboxilasa o promoviendo la liberación de factores proliferativos como la insulina y el glucagon^{6,41,55}.

Parece ser que el lipopolisacárido bacteriano derivado del intestino (LPS) es el responsable de la endotoxemia que aparece en ratas después de una hepatectomía. Este LPS y posiblemente agregados de fibrina o restos de tejidos pueden producir la liberación desde los macrófagos y/o monocitos de citocinas que participan en el proceso de activación de la regeneración hepática. Cuando se practica una hepatectomía parcial en ratones que presentan una liberación de citocinas disminuída, se observa un retraso o depresión en la regeneración hepática en comparación con los animales control⁶.

El **TNF** es producido por los macrófagos activados y posee una variada actividad biológica como citostático y citotóxico para células malignizadas y en la modulación de la expresión de genes y actividades enzimáticas en distintos tipos celulares. A nivel hepático, el **TNF** actúa fundamentalmente sobre las células de Kuffer para activar la liberación y generación de metabolitos tóxicos de oxígeno, que median los cambios inmunológicos y metabólicos propios de la endotoxemia⁵⁵. Tanto la síntesis de ADN como el aumento de los niveles plasmáticos de IL-6, que tienen lugar después de una hepatectomía parcial pueden ser inhibidos por la administración de anticuerpos anti-TNF.⁶⁰

Otros Factores involucrados en la modulación de la respuesta proliferativa

Factores de Crecimiento de Fibroblastos Ácidos y Básicos (aFGF y bFGF). Los FGF pertenecen a una amplia familia de mitógenos que estimulan el crecimiento de una gran variedad de tipos celulares. Se han llamado *Factores de Crecimiento que unen heparina (HBGF)*, debido a su capacidad de unirse ávidamente a la heparina. Es probable que también se unan a los heparina sulfato proteoglicanos presentes en la matriz extracelular y de esta forma reduzcan los niveles circulantes de estos factores.⁶⁰

El aFGF se ha revelado como un estimulador de la síntesis de ADN en cultivos de hepatocitos de forma algo menos potente que el EGF. Al igual que el EGF, la acción del aFGF es potenciada por la insulina, pero sólo en presencia de heparina, y a un nivel que es aproximadamente la mitad al obtenido al añadir al medio de cultivo otro HBGF como es la hepatopoyetina A^{55,60}.

Los niveles de ARNm para el aFGF aumentan 5 horas después de la hepatectomía parcial y permanecen elevados durante 5 días. La expresión de este ARNm se puede detectar tanto en células parenquimales como en no parenquimales. El bFGF también aumenta 48 horas tras hepatectomía y se ha

comprobado su capacidad para estimular la proliferación de hepatocitos en cultivo.^{6,60}

Hepatopoyetina B. Se cree que la hepatopoyetina B (HPTB) no presenta estructura peptídica pura, ya que su comportamiento cromatográfico recuerda a una glicoproteína con un peso molecular de 359 Kd. Es un mitógeno completo para los hepatocitos, aunque no tan activo como el EGF —el máximo efecto obtenido, en términos de síntesis de ADN, es la mitad del obtenido para el EGF—. Aunque ambos son mitógenos completos entre ellos interactúan de modo sinérgico para aumentar la síntesis de ADN^{6,55}.

Sustancia Estimuladora Hepática. (HSS) La sustancia estimuladora hepática es un péptido de peso molecular comprendido entre 12 y 18 KD tanto *In vivo* como *In vitro* es capaz de estimular la síntesis de ADN en células parenquimales hepáticas de ratas normales o hepatectomizadas y en líneas celulares derivadas del hígado. Sin embargo, es incapaz de estimular células o tejidos no hepáticos. Su estimulación sobre estas últimas no es abolida por el TGF- β 1 que se liberan a las 72 horas tras la iniciación de la regeneración para controlar el final del proceso regenerativo⁵⁵.

Hay un período de latencia de 12 horas entre la administración del HSS y la estimulación de la síntesis de ADN. El proceso inicial por el que el HSS estimula a las células de hepatoma HTC *in vitro*, es una rápida captación de Na^+ vía el antiport Na^+/H^+ y la captación rápida de Ca^{++} extracelular. El aumento de Ca^{++} parece ser dependiente de la entrada de Na^+ , y el influjo de Na^+ es necesario pero no suficiente por si mismo para estimular la síntesis de ADN⁶¹.

Se ha comprobado que cualquier sustancia que favorezca o impida la síntesis de la **bilirrubina delta**, estimula o inhibe respectivamente la síntesis de ADN en ratas, control o hepatectomizadas. Cepas de ratas con defectos genéticos para la formación de bilirrubina conjugada —ratas Jun— o de albúmina —ratas Lagase— y, por tanto, para la síntesis de biliproteína, muestran una regeneración hepática muy disminuída después de hepatectomía parcial con respecto a

controles. Todo ello indica un posible papel fisiológico de la bilirrubina delta en la estimulación de la regeneración hepática.⁵³

Sistema Nervioso Parasimpático. La restauración del peso hepático y el contenido en ADN y proteínas del hígado en regeneración, así como la tasa de síntesis de ADN, se ve aumentada tras realizar una vagotomía, pero no después de esplanicsectomía subdiafragmática. Las neuronas que inervan el hígado vía vagal presentan una frecuencia de disparo en condiciones basales de 2-4 pulsos/segundo. Este valor se multiplica por 5 o por 10 al realizar una hepatectomía del 40 o 70%. Sin embargo, en controles y después de una hepatectomía del 3% los valores no se modifican⁵⁵. Esto sugiere tanto un papel en el control de las señales implicadas en la cascada de fenómenos que siguen a la hepatectomía parcial como la existencia de un umbral de intervención del sistema nervioso vegetativo⁵⁵.

El mecanismo no se conoce pero se sabe que después de una hepatectomía parcial las enzimas limitantes en la síntesis de pirimidinas –tanto en la ruta *de novo* como en la de reciclaje— aumentan su actividad y que la vagotomía inhibe esta inducción.⁶⁰ Por otra parte la inyección de un anticolinérgico –atropina— provoca una disminución de la síntesis de ADN. Estos resultados parecen indicar un papel estimulador de los nervios parasimpáticos sobre la síntesis de ADN. Los niveles de insulina disminuyen en ratas controles y en las sometidas a vagotomía después de hepatectomía parcial, por lo que el efecto de la vagotomía no puede atribuirse a la disminución de los niveles de insulina.^{53,55}

Hasta este momento, hemos podido identificar a varias sustancias que tienen actividad estimuladora o inhibidora sobre el proceso de la regeneración hepática, muchas de las cuales son comitogénos –o blancos proliferativos— cuya presencia es necesaria, más no suficiente, para el desarrollo del proceso. Sin

embargo, los factores mencionados en esta revisión, dependen de una señal promotora,-o secuencia de señales— que le permita al hígado *saber* que le falta masa. Al carecer de la participación de las células troncales, la regeneración depende de células maduros^{6, 60}. La búsqueda de la señal iniciadora del proceso de proliferación tras la hepatectomía, es por supuesto una de las líneas clave en el estudio de este modelo. Aunque no existen publicaciones al respecto, los principales candidatos para iniciar la secuencia, es el cambio en el flujo sanguíneo; la señalización a través de mecanorreceptores de las células endoteliales, son quizás los precursores que permiten *encender* la maquinaria proliferativa. Entre las moléculas que posiblemente estén involucradas en la secuencia de eventos muy tempranos, se encuentran el NO₂, los EROS, y posiblemente algunos canales iónicos.

Ya dentro de la etapa conocida, la transducción de señales promueve la activación de protooncogenes tales como c-myc, c-fos, h-ras, c-jun, k-ras, así como los factores de transcripción asociados a proliferación como el Antígeno Nuclear el Proliferación Celular (PCNA), y el Factor Nucléar $\kappa\beta$, (NF- $\kappa\beta$)⁶⁰. En este trabajo, no nos interesa hablar mucho de estas señales, ya que nos encontramos en una fase de tiempo tardía para medirlas, pues nuestra primera medición es a 12 horas de la cirugía, —muchas genes se *prenden* desde los primeros 20 minutos después de seccionar el hígado— además de que el metabolismo de carbohidratos no interfiere con esta secuencia de eventos⁶¹.

El catabolismo de glucosa

El transporte de glucosa al interior de la Célula. La glucosa es el regulador más importante en el transporte de la misma al interior de la célula y afecta en general el transporte de otras hexosas a varios niveles. La concentración de glucosa extracelular controla la transcripción de varios genes HXT, que codifican para los transportadores de glucosa con diferentes propiedades cinéticas. La vida media de un transportador de hexosas Hxt6/7 en presencia del 5% de glucosa en medio sin amonio es de aproximadamente 45min en levaduras.⁴³

El papel fisiológico principal de la insulina es la homeostasis de la glucosa, lo cual está acompañado de la inhibición de la gluconeogénesis en el hígado y la estimulación de la captación de glucosa en los tejidos sensibles a ella, como son el tejido adiposo, el músculo esquelético y cardíaco.

El GLUT 4 es el único transportador de glucosa importante, que es regulado por insulina, de tal forma que la hormona aumenta de 20-30 veces la captación de glucosa por parte de este transportador

Hexocinasas. El metabolismo de la glucosa es de vital importancia en prácticamente todos los organismos que mantienen una vía glucolítica o vía de las pentosas. El paso inicial en estos caminos catabólicos es la fosforilación del sustrato a la forma 6-fosfoéster. Esta reacción es catalizada por la hexocinasa – ATP dependiente: D-hexosa, fosfotransferasa EC 2.7.1.1— la cual es reconocida generalmente como el mayor paso regulatorio que gobierna la tasa de utilización de glucosa.¹⁶

Desde el punto de vista de flujo metabólico, la reacción de la hexoquinasa tiene un papel clave removiendo las hexosas libres del citosol, cambiando los carbonos tanto para la ruta de biosíntesis o de glucólisis, dependiendo de las necesidades celulares.¹⁴

El tejido de las ratas posee cuatro tipos de hexocinasas, incluyendo una hígado- específica de alta K_m (**glucocinasa**) y 3 de baja afinidad, en diferentes proporciones de varios tejidos. Estas isoformas difieren principalmente con respecto a sus valores estimados de k_m para la glucosa y probablemente también para el ATP, el ADP y la glucosa 6-fosfato, así como en su estabilidad al calor y su resistencia a la proteólisis.³⁸

El hígado de la rata expresa las cuatro enzimas, las cuales se designan como I, II, III por su orden de elución en la cromatografía de DEAE-celulosa y por su orden de movilidad en la electroforesis, en gel de celulosa. La glucocinasa, solo se encuentra en el hígado y es la forma que migra más rápidamente, por lo cual se le designa como hexocinasa IV. Cada una de estas enzimas independientemente del tejido del cual proviene, expresa características únicas que la distinguen de las otras; como el grado de inhibición causada por el ATP. Por otro lado, las isoformas son similares con respecto al peso molecular, especificidad hacia las hexosas y los nucleótidos y la afinidad por la fructosa. El pH óptimo para todas las enzimas es similar, entre un rango de 7.8 — 8.8³⁸. Una unidad de actividad de la hexocinasa es definida como el aumento de enzima la cual transforma 1 μ mola de sustrato / minuto a 37 °C y a pH = 7.4³⁸

El tipo I se expresa virtualmente en todos los tejidos y se encuentra en niveles particularmente altos en el cerebro. Se distingue por su habilidad para anclarse a la membrana mitocondrial. El N aminoterminal se encuentra bloqueado, presumiblemente acetilado, lo cual contribuye a mantener la hidrofobicidad necesaria para anclarse a la membrana.¹⁶

La HKII se expresa en músculo junto con la I, pero únicamente la tipo II mantiene una expresión regulada por insulina. En células ascíticas se encuentra en forma soluble y anclada a la mitocondria, con un equilibrio activo entre los dos sitios. Existe un alto grado de dependencia al ion K^+ , por parte de esta isoforma para mantener su estructura estable.¹³ La HKIII presenta un alto grado de inhibición por el sustrato, lo cual la hace distinguible de los demás formas, además de ser muy escasa en los tejidos extrahepáticos.^{16,38}

Tipos y distribución	
ORGANO	TIPO
CEREBRO	I
RIÑON	I
HIGADO	I,II,III, IV
MUSCULO	II
TEJIDO ADIPOSITO	II

Tabla 2. Tipos de Hexoquinasa.

IZT.

La mayor actividad de fosforilación de glucosa en el hígado proviene de la glucocinasa, la cual es eluída de la columna de DEAE-celulosa casi inmediatamente antes de sobrelaparse con la enzima tipo III. El ayuno claramente disminuye la hexocinasa IV del hígado, pero causa un cambio en los niveles de la III. Los ensayos para esta última se hicieron utilizando 0.25 y 0.01 mM de glucosa, ya que esta isoforma es altamente inhibible por sustrato.³⁸

Algunos carbohidratos y sus derivados son sustratos de las hexocinasas de mamíferos. Entre ellos la D-manosa, 2-deoxi-D-glucosa, D-glucosamina a pH 7.5, se han reportado como inhibidores competitivos, tales como la D-xilosa y la N-acetil-glucosamina, las cuales inhiben las 3 isoformas a la misma concentración. Los azúcares que se ha reportado no se fosforilan y por lo tanto no afectan a la actividad de las hexocinasas, son la D-galactosa, D-ribosa, D-sorbitol y D-arabinosa.^{14,16,38} Para el caso de la D-manosa, inhibe completamente la actividad de la hexocinasa a una concentración de 0.09M. La inhibición de las 3 isoformas por glucosa-6-fosfato es competitiva con respecto al ATP.³⁸

La insulina incrementa el transporte de glucosa al músculo esquelético, principalmente por la traslocación de los transportadores de glucosa a la membrana plasmática. Una vez que la glucosa es transportada a la célula su entrada / salida se vuelve irreversible por la fosforilación a glucosa 6-fosfato.³⁹

La insulina y la contracción muscular incrementan la expresión de HKII. La insulina incrementa el transporte de glucosa a la célula y la fosforilación de glucosa de manera independiente. La actividad de la HKI no se afecta por la insulina. En

músculo tenemos que la actividad de hexocinasa se encuentra en pmolas/ (min*microgramo de proteína). La administración de insulina decremента la actividad de HKII en la fracción soluble e incrementa su actividad en la fracción particulada.³⁹

Se ha reportado que la actividad de la glucógeno sintetasa y la fosfofructocinasa se localizan en la fracción soluble, mientras que la piruvato deshidrogenasa —una enzima mitocondrial interna— se localizaba en la región particulada. Estudios de inmunoblot confirman la presencia de HKI en la región soluble y a la HKII en la interfase de la región soluble y particulada.³⁹

Redistribución de la hexocinasa. En el cerebro, la isoforma HKI predomina y se encuentra anclada a la membrana. La mayoría de las enzimas se encuentran asociadas a una porina; que es un canal aniónico de la membrana mitocondrial; esto puede servir para traer a la hexocinasa a un sitio próximo con el sitio de la producción del ATP. La regeneración de ADP por la hexocinasa puede promover el incremento de la fosforilación oxidativa, donde la glucosa puede servir como un aceptor de fosfato. El significado biológico y la ganancia neta de energía aun no están del todo claros, pero la isquemia y la hipoglucemia incrementan la unión de la hexocinasa a la membrana mitocondrial en cerebro, sugiriendo a este fenómeno como un esfuerzo para proteger el suplemento de energía. En este tejido la HKI puede estar asociada con estructuras membranales diferentes a la mitocondria. En macrófagos, los ésteres de forbol traslocan la hexocinasa a los microfilamentos de la zona adyacente a la membrana plasmática. Esto puede colocar a la hexoquinasa en una posición más próxima al suplemento de glucosa por parte de los transportadores de la membrana, potenciando así, tanto la tasa de fosforilación de glucosa, como de su captación. Tanto en músculo esquelético como en corazón, se expresa principalmente la HKII, la cual es sensible a la regulación por insulina, teniendo en este órgano un efecto de redistribución hacia la mitocondria.³⁹

En el maíz, se presentan dos tipos de hexocinasas, de las cuales la unida a la mitocondria, tiene una afinidad más alta por la glucosa que por la fructosa y es fuertemente inhibida por ADP. En tejidos de mamíferos, se ha demostrado que la glucocinasa de Golgi facilita la biosíntesis de UDP-glucosa, lo mismo se ha encontrado para las hexocinasas no citosólicas en las raíces del maíz. Aunque esta enzima tiene un papel primordial en la glucólisis, se ha establecido que la hexocinasa actúa como sensor de glucosa, el cual media a la represión de genes involucrados en la fotosíntesis, el ciclo del glioxilato y la síntesis de alfa amilasa.¹⁴

Durante el desarrollo del proceso regenerativo en el hígado, ocurre una intensificación de la glucólisis y incremento en la respiración para una constante o reducida fosforilación oxidativa. El alto nivel glucolítico también se observa en las células del hígado embrionario.⁴⁰

Los efectos de la administración de acetato de cortisona en la actividad de la HK en las fracciones celulares, se encontró que 8 horas después de la introducción de la hormona la actividad de la HK se redujo en la fracción citoplásmica, manteniéndose sin cambios en la mitocondrial. Después de 16 horas se encuentra una actividad baja en la fracción citosólica, y en la mitocondrial, posiblemente este retardo en la inhibición sea debido al lento tránsito intracelular del glucocorticoide⁴⁰.

Los cambios en la actividad de la HK después de la regeneración hepática tienen su máximo, entre los 3 y 4 días de realizada la hepatectomía. La actividad de la HK en citosol y mitocondria durante el proceso regenerativo, son marcadamente más altos durante el período del máximo numero de mitosis. El carácter de la distribución de la actividad de HK durante el periodo de regeneración no cambia; la actividad en el citosol fue marcadamente más alta que en la fracción mitocondrial; lo cual antagoniza la distribución dentro del hígado embrionario, donde la fracción mitocondrial mantiene una actividad más alta de HK⁴⁰.

La actividad de la Glucosa 6-P- Deshidrogenasa decrece con el proceso regenerativo, en la fracción mitocondrial no se detecta la actividad de esta enzima,

ni en el hígado normal, ni en el regenerante. A 72 hr. de la hepatectomía, la actividad de esta enzima en el citosol se incrementa⁴⁰.

El aumento de la actividad de la GD y la HK durante el proceso regenerativo de las células hepáticas, está obviamente relacionado con su rápida multiplicación y con el incremento en la masa del órgano durante este periodo. El aumento en la actividad de HK corresponde al alto nivel de glucólisis del proceso de suplementación de energía al vigoroso desarrollo del proceso y la producción de sus metabolitos. La alta actividad de GD en la regeneración hepática probablemente asegura la síntesis de una considerable cantidad de pentosas y NADPH, necesario para el metabolismo de proteínas. En experimentos *in vivo* se observa un aumento en la síntesis de ribosa después de la hepatectomía⁴⁰.

Características de la D-manosa

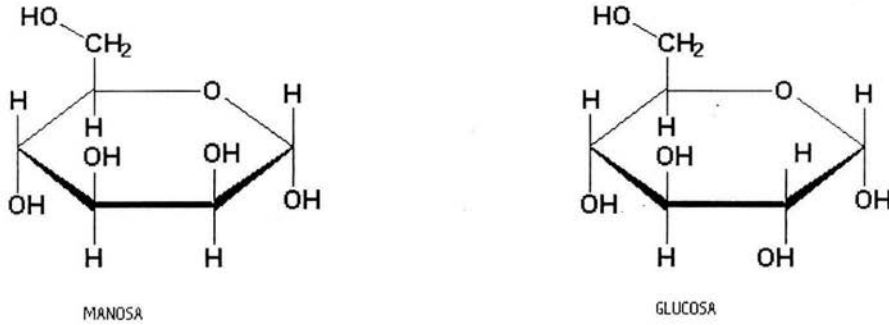


Fig.5 Estructura de la α -D-manosa y la α -D-glucosa

El monosacárido manosa, epímero de la glucosa, – el grupo OH del carbono 2 se encuentra invertido— se encuentran en plantas, hongos y bacterias donde funciona como almacén de energía. Está presente en los tejidos animales como parte integral de algunas proteínas y tiene un papel estructural esencial en los procesos de glucosilación, ya sea de forma mixta con otros azúcares –N-acetilglucosamina, galactosamina, etc.— o de forma ramificada y monomérica como algunos receptores de superficie ubicados en las membranas plasmáticas. Sin embargo es poco metabolizable, y sus niveles basales en los vertebrados son muy bajos en relación con otros monosacáridos. También es llamada semiosa o carubinososa.

La glucosamina, la galactosa y la manosa, constituyen el mayor componente sacárido en la proteína apoLDL-2, con relaciones similares en varias las especies –babuino, mono rhesus, chimpancé y araña—. El ácido síalico, la fucosa y la galactosa forman un menor componente, variando mucho las proporciones entre las especies estudiadas. La diferencia entre las especies en el contenido de ácido síalico y fucosa pueden estar relacionadas con el metabolismo de las lipoproteínas,

así como con la susceptibilidad —o resistencia— a la Aterosclerosis, ya sea por dieta o por inducción espontánea⁴⁷.

Esbozo del metabolismo de la D-manosa

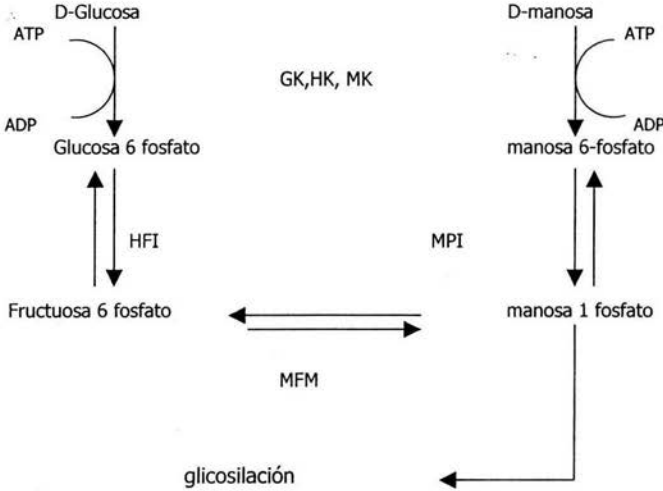


Fig. 6 Rutas del metabolismo de la manosa. Dependiendo del sistema, podemos encontrar varias enzimas que catalicen la fosforilación de glucosa y manosa, hasta el momento la única glucocinasa específica que se ha identificado es la del termófilo

El papel fisiológico de la manosa es esencialmente estructural muy caracterizado y ampliamente difundido dentro de la naturaleza; sin embargo las rutas metabólicas en las cuales tiene participación se encuentran poco estudiadas en vertebrados. La ingesta de manosa por parte de mamíferos se encuentra casi exclusivamente limitada herbívoros y omnívoros, pues la distribución natural de la manosa se limita a sólo algunas plantas. Así mismo, existe un metabolismo hepático activo para la manosa, en el cual pasa de manosa a manosa 6-fosfato, mediante una hexocinasa, misma que puede o no ser específica, y dependiendo del organismo tener una actividad alta. La manosa 6-fosfato que se produce sigue varias rutas metabólicas, entre ellas la principal es isomerizarse hacia fructosa 6-fosfato y entrar a la vía glucolítica. Sin embargo la enzima que cataliza esta

reacción es la manosa fosfato isomerasa, la cual *per se* mantiene una actividad baja, ya que usualmente la manosa no es su sustrato natural, sino la fructuosa 6-fosfato, que al convertirse a M6P puede integrarse a la parte estructural de proteínas glicosiladas esenciales en la señalización.^{14, 15}

La 2-deoxi-glucosa inhibe la unión de lípidos-sacáridos en la formación involucrada en la glicosilación de proteínas. La administración de 1mg/100g de peso corporal produce un decremento en los niveles de glicosaminoglicanos en el tejido total. Se encuentra que la actividad de las enzimas involucradas en las biosíntesis de precursores de los glicosaminoglicanos disminuye, pero las enzimas de la vía degradativa aumentan. Por lo cual el nivel disminuido de la GAG en tejidos en ratas 2-DGLC ocurre por la potenciación de las vías degradativas, así como el decremento en su síntesis.

Existen alteraciones naturales provocadas por la deficiencia en la manosa fosfato isomerasa, en humanos su deficiencia mantiene una estrecha relación con las llamadas Enfermedades Innatas de Glucosilación y es particularmente evidente su efecto en la llamada Síndrome de Alteraciones por Glucosilación tipo Ib, enfermedad autosomal recesiva de CDGS (Carbohydrate Deficient Glycosylation Syndrome), la cual se caracteriza por la deficiencia en la fosfomanosa mutasa M6P-M1P en el cual el individuo al no poder catalizar la reacción de fructuosa 6 fosfato a manosa 6 fosfato, sufre de retraso mental, hepatomegalia, fibrosis hepática sin desarrollo cirrótico entre otras. Algunos de estos síntomas son corregidos mediante la administración exógena de manosa, con lo parece que la hexocinasa/manocinasa no se encuentra alterada.¹³ La Fibrosis hepática congénita, también se encuentra clasificada dentro de las CDGS, en este caso la enzima deficiente es la fosfomanosa isomerasa (M6P-F6P). Los síntomas clínicos son hepatomegalia ligera, retraso mental, hipoalbuminemia.

En los sistemas proliferantes, tales como cultivos de células cancerosas, células de Ehrlich, células de embriones de rata, hepatomas, meristemos de raíz en

maíz.^{7,8,9} o provenientes de embriones, la administración de manosa ha tenido un efecto altamente tóxico, y en sistemas *in vivo* a causado efectos teratogénicos a embriones de rata. Por otro lado, en sistemas proliferantes de raíces la administración de manosa ha causado también un efecto altamente nocivo. Sin embargo las causas identificadas en este ultimo modelo han apuntado hacia un secuestro del fósforo inorgánico biodisponible.⁶

La deficiencia en la actividad de la manosa fosfato isomerasa es al parecer el punto central de la toxicidad de la manosa. En el caso de las enfermedades CDG tipo Ib, existe una deficiencia en los niveles de MPI. Clínicamente la enfermedad manifiesta fibrosis hepática, hepatomegalia moderada e hipoglucemia. Además de alteraciones congénitas en la formación de conducto biliar.

La biosíntesis de manosa, así como su vía de degradación son regulados principalmente por la actividad de la manosa hexocinasa y por la manosa fosfato isomerasa. La manosa se fosforila a manosa 6-fosfato mediante la hexocinasa, en condiciones normales, esta enzima tiene baja actividad en relación a la MPI, con lo cual la manosa 6P producida es rápidamente transformada a fructosa-6P.

Antecedentes

La respuesta proliferativa obtenida al realizar una hepatectomía es directamente proporcional a la masa hepática sustraída, teniendo como máximo la extirpación del 70% del hígado. Arriba de este porcentaje la rata muere en pocos minutos, sin embargo al administrar glucosa durante las primeras horas, la sobrevivencia aumenta y así como la respuesta proliferativa, lo cual hace posible hepatectomías de hasta el 90%. Esto sugiere que durante el proceso, existe una fuerte dependencia del metabolismo oxidativo de la glucosa lo cual es característica de varios sistemas proliferantes. Por otro lado la toxicidad de la manosa en estos sistemas sugiere una inhibición por parte de este epímero en la oxidación de glucosa. Tomando en cuenta la estructura de ambos azúcares, tanto el transporte como la fosforilación puede verse afectada dentro del hígado, cuando se le administra manosa, independientemente de la estimulación debido a la hepatectomía. Este efecto es privativo de la manosa, ya que otros epímeros tales como la D-galactosa, no son sustratos fosforilables que compitan activamente con la glucosa. La D-xilosa es otro epímero, de la glucosa que al ser administrado compete con la D-glucosa por la hexocinasa, sin embargo no se encuentra en tejidos animales y su distribución se encuentra limitado a plantas leñosas.

Hipótesis

Dado que la D-manosa puede interferir en el catabolismo de la glucosa, suponemos que su administración a una rata hepatectomizada, inhibirá tanto los eventos proliferativos, como los eventos metabólicos que normalmente ocurren en el hígado para mantener su función, durante la progresión del proceso regenerativo.

Objetivo General

Determinar el efecto causado por la administración de manosa en la proliferación celular y en la función hepática del hígado regenerante

Nuestros *objetivos específicos* dentro de este trabajo son:

1. Correlacionar el efecto de la manosa sobre la síntesis de ADN durante la regeneración hepática y el índice mitótico a diferentes tiempos posthepatectomía.
2. Evaluar el efecto de la administración de manosa sobre la actividad de las hexoquinasas hepáticas.
3. Evaluar la capacidad hepática para mantener sus funciones durante la regeneración y si esta condición se modifica al administrar manosa.

Materiales y Métodos

La D- (+) Manosa, (no. Cat. M 4625), El NADP (no. Cat N-2010) , ATP (no. Cat A-2383), la hexoquinasa (no. Cat H-537) y el ácido 2-Tiobarbitúrico, (no. Cat T-5500) fueron obtenidos de Sigma Aldrich. La timidina tritiada 37.000 Bq (no. Cat NET0272) se uso de Dupont. Los demás reactivos mencionados en este trabajo, cuya procedencia no se especifica, fueron de la mejor calidad disponible.

Ratas macho Wistar de 240-280 gramos, las cuales se mantuvieron en ciclo circádico normal con alimento **Dietlab** y agua *at libitum*. Se realizó la ligación y extirpación de los lóbulos central e izquierdo del hígado bajo anestesia por éter etílico, de acuerdo a la técnica descrita por Higgins y Anderson³⁴.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL Después de la hepatectomía parcial del 70% se dividió a los individuos en los grupos experimental (Hepatectomía + manosa), control 1 (hepatectomía) control 2 (laparotomía) y control 3 (laparotomía +manosa). Se estandarizaron los tiempos post-cirugía en 12, 24, 48, y 72 horas. A las 2 horas post-cirugía, se administró una dosis única de manosa 1g/kg peso intraperitoneal a la rata. Al sacrificio de los animales se recuperó suero, el hígado remanente y orina.

Para estudiar los efectos de la manosa en el tiempo, se pensó que sería adecuado incluir un grupo experimental que mantuviese varias dosis de manosa de manera constante. Se acordó arbitrariamente en 6 semanas, dando 3 dosis de manosa i.p. de 1.2g/kg de peso corporal, por semana, haciendo un total de 18 dosis. Dos días después de haber puesto la última, se procedió a realizar la

hepatectomía y 24 horas después de la hepatectomía se sacrifico a los animales. De este grupo experimental, designado como *ex2-sos*, cada semana se sangró a los animales para llevar un control de la concentración de glucosa en sangre. Al sacrificio de ellos, por decapitación y bajo anestesia con pentobarbital sódico, se recuperó suero y el hígado remanente

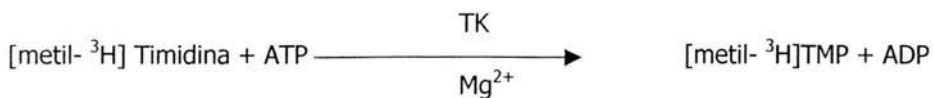
Una fracción del hígado remanente se tomó para los análisis histológicos; el resto fue congelado y posteriormente homogeneizado en amortiguador de Sacarosa [225mM], EDTA [0.3mM], y [10mM] Tris pH 7.4 Posteriormente se centrifugó para obtener membranas plasmáticas, mitocondrias, núcleos, microsomas y citosol. La determinación de la concentración de proteína en los homogenizados y en las fracciones se hizo mediante el método de Lowry³⁶. Las muestras se prepararon para medir los siguientes parámetros:

Parámetros Proliferativos

Determinación de la actividad de Timidina Cinasa (radiométrico ³H). La Timidina cinasa, (TK) es una enzima clave para la generación de sustratos para la síntesis de ADN. Se han encontrado actividades altas de la TK en células proliferantes —enzima de fase logarítmica—.

La timidina marcada con tritio es utilizada como sustrato. Después de la fosforilación, el fosfato radioactivo TMP (y TDP, TTP) son separados del sustrato mediante intercambio iónico sobre papel celulosa DEAE.

La reacción es la siguiente:



El producto radioactivo puede ser fácilmente separado a partir del sustrato radioactivo mediante intercambio iónico.³⁰

Para nuestro ensayo, se tomaron alícuotas de la fracción citosólica y se colocaron en una mezcla de reacción que contiene 220 μ L de amortiguador Tris 1M pH. 8.0, 110 μ L de MgCl₂ 0.2 M, 110 μ L de EDTA, 220 μ L de ATP, 5 μ L de timidina y 50 μ L de [³H]-timidina. Se incubaron durante una hora a 37 °C. La reacción se detuvo colocando la mezcla de incubación en agua en ebullición durante 2 minutos, se centrifugó y a partir del sobrenadante se cuantificó la timidina fosforilada, colocando 0.020 ml en un filtro de DEAE-celulosa, el cual se lavó con formiato de amonio para remover la carga eléctrica, agua destilada y etanol. El filtro una vez seco, se colocó en un vial con 5 ml de líquido de centelleo y se midió la radioactividad en cuentas por minuto, a partir de este dato se calculó la actividad enzimática.³⁷

Lipoperoxidación. La cantidad de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbiturico (TBARS) generadas por la lipoperoxidación se cuantificó por la reacción entre el aldehído malónico y del ácido tiobarbiturico, por el método reportado por Buege y Aust en 1978³⁵. Se utilizó homogenado de hígado en agua bidestilada (1:9 p/v) como fuente de enzima; todas las manipulaciones se hicieron en hielo y rápidamente para prevenir la peroxidación. Aproximadamente 1mg de proteína se incubó durante 30 minutos a 37 °C en 1 ml de 0.15M de Tris, pH 7.4; después de la incubación se le añadió 1.5 ml de ácido acético al 20% pH 3.5 – ajustado con KOH— y 1.5 ml de ácido tiobarbiturico al 0.8%. Las muestras se mantuvieron durante 45 minutos a ebullición en baño maria y después se les añadió 1ml de KCl al 2%. El color formado en el complejo se extrajo con una mezcla de piridina-butanol (15:1 v/v) y detectado a 532 nm. El coeficiente de extinción del color del complejo malonaldehído fue de $1.56 * 10^5 \text{ cm}^{-1}$.³²

Cuantificación de ADN total. (Colorimétrico). Método de la difenilamina. Uno de los métodos más empleados para la cuantificación de ADN total mediante ensayos colorimétricos, es la reacción de la difenilamina y la desoxirribosa. La muestra, previamente desproteinizada con ácido tricloroacético, se calienta a 100 °C durante pocos minutos en una mezcla de ácido acético, ácido sulfúrico y

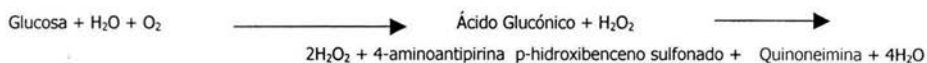
difenilamina. La sensibilidad mejora cuando se le añade ácido perclórico y acetaldehído. El desarrollo del color se da durante una incubación a 30 °C durante 17 horas. Excepto si la muestra contiene ácido ascórbico o sálico, no se presentan interferencias. La lectura se da a 600 nm y presenta un incremento lineal en O.D. al aumentar la concentración de ADN, por lo cual puede calcularse una curva patrón.³¹

Determinación del índice mitótico. (Histológico) Al sacrificio del animal, el hígado remanente se extrajo y aproximadamente 200mg de tejido –en todos los casos del lóbulo caudado– fueron fijados en una solución de formaldehído al 8% en amortiguador de fosfatos. Una vez fijado, el tejido fue procesado histológicamente y teñido con Hematoxilina-Eosina para contrastar los núcleos. Se determinaron 20 campos por laminilla.

Parámetros Metabólicos

Índice Glicémico (Kit, ensayo colorimétrico) La determinación esta basada en el Método de la Glucosa Oxidasa. Kit Serapak de Bayer Cat. No. 6642.

Reacción:



Las implicaciones diagnosticas del incremento de glucosa, se encuentran asociados a enfermedades como la diabetes mellitus, hiperactividad de la tiroides, la pituitaria ó las glándulas adrenales. Los niveles de decremento se asocian a una sobredosis de insulina, la presencia de tumores secretores de insulina y hipopituitarismo, hipoadrenalismo ó condiciones que interfieran con la absorción de glucosa³³.

Triglicéridos (Kit, ensayo colorimétrico). Kit Bayer, Serapak no. cat. B01-4551. El glicerol liberado en la hidrólisis de triglicéridos por acción de la lipoproteína lipasa, se convierte por acción de la glicerol cinasa en glicerol 3-fosfato, que se oxida por la acción de la glicerolfosfato oxidasa en fosfato de dihidroxiacetona y peróxido de hidrógeno. En presencia de la peroxidasa, el peróxido de hidrógeno oxida el cromógeno (4-aminoantipirina/p-clorofenol) en un compuesto de color rojo.^{26,27,28}

Determinación de la actividad de Hexocinasa (ensayo enzimático) La hexocinasa fosforila glucosa utilizando una molécula de ATP para formar glucosa 6-fosfato. La glucosa 6-Fosfato Deshidrogenasa cataliza la conversión de glucosa 6-fosfato y agua a gluconolactona y NADPH. La actividad de la hexocinasa se midió acoplando ambas reacciones y leyendo a 340nm. en el espectrofotómetro.

Determinación de la actividad de Glucosa 6 fosfatasa (ensayo enzimático) La glucosa 6-fosfatasa (G-6-Pasa), se encuentra en el hígado de mamíferos, así como en el riñón y en el hígado de aves. Preparaciones de algunos otros órganos de mamíferos catalizan la hidrólisis de la glucosa 6 – fosfato bajo condiciones de la G-6-Pasa, pero esta actividad parece ser debido a las fosfatasas con baja especificidad de sustrato (fosfatasas ácidas o alcalinas). La G-6-Pasa se encuentra en microsomas del hígado. La enzima no requiere de activadores ni cofactores. La actividad de la G-6-Pasa puede ser determinada por la medición de la cantidad de glucosa o de fosfato inorgánico formando en la incubación de G-6-P. Se cataliza la reacción:



El índice de la reacción es medido por el incremento de fosfato inorgánico con el tiempo²⁹.

Determinación del fósforo inorgánico libre (ensayo enzimático). La determinación de Pi se basa en los cambios en la reducción del Ácido ascórbico mediante el molibdato de amonio en medio ácido, lo cual da un pico máximo de absorción a los 820nm. El complejo formado da un incremento lineal de absorción

O.D. cuando se incrementa la concentración, por lo cual es fácil establecer una curva patrón y extrapolar.

Parámetros de la Función Hepática

Cuantificación de Albúmina en Suero, (Kit, ensayo colorimétrico) Sigma Aldrich, no. cat. 631-2. El verde de Bromocresol se enlaza cuantitativamente a la albúmina formando un intenso complejo verde-azul con una absorbancia máxima a las 628 nm. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de albúmina de la muestra. Normalmente los niveles bajos en el suero de esta proteína, se encuentran asociados a daño hepático, desnutrición, síndrome nefrótico y enteropatías con pérdida de proteínas. Los niveles altos se encuentran en la deshidratación.³³

Cuantificación de amonio Sérico (Kit, ensayo colorimétrico) Sigma-Aldrich No. Cat 171-A. El incremento de amonio en sangre suele estar asociado a daño hepático. El principio para medirlo se basa en una aminación reductiva utilizando la L-glutamato deshidrogenasa en la siguiente reacción:

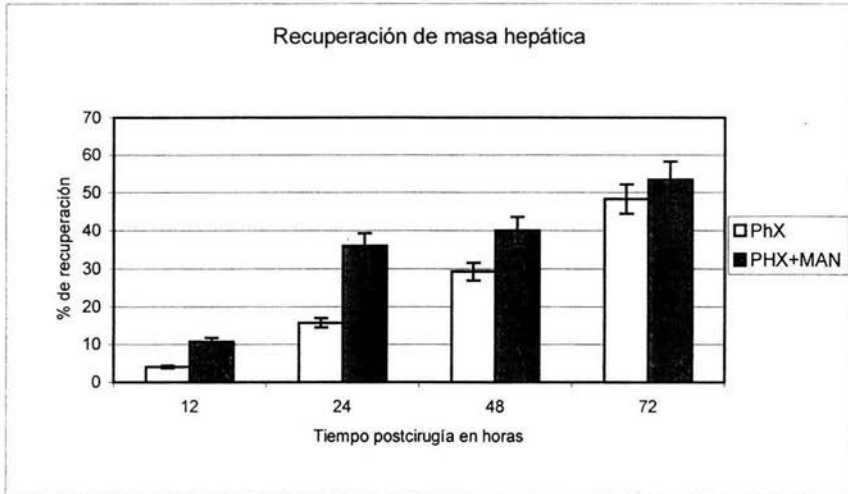


Cuantificación de Bilirrubina (Kit, ensayo colorimétrico) Sigma Aldrich, no. cat. 551-A. La bilirrubina presente en el suero, reacciona directamente con el ácido sulfanílico diazotizado para producir un compuesto llamado azobilirrubina, el cual presenta su pico de absorción máxima a 560 nm. Los niveles incrementado se encuentran asociados a obstrucción biliar y daño hepatocelular.³³

La n de los grupos experimentales y controles varió entre 4 y 6 individuos. El Análisis de varianza y la prueba de Diferencia Verdaderamente Significativa (DVS) de Tuckey fueron realizados en el Software Statistica ver. 3.0, con un intervalo de confianza del $P = 0.05$

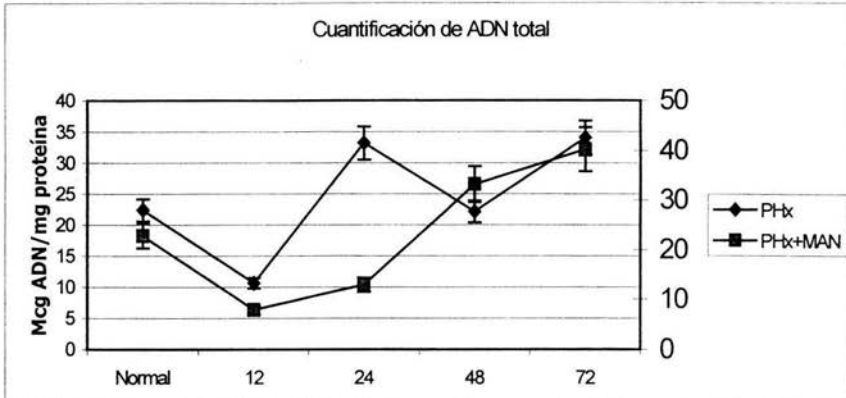
Resultados

Parámetros Proliferativos

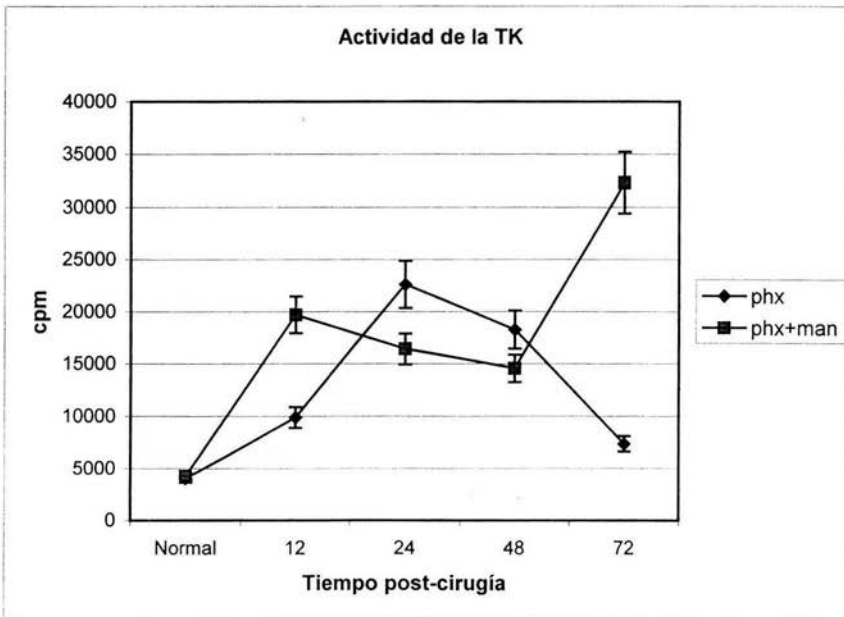


Gráfica 1. Se comparó la relación de peso húmedo del hígado remanente, al momento de extirparlo después del sacrificio de la rata.

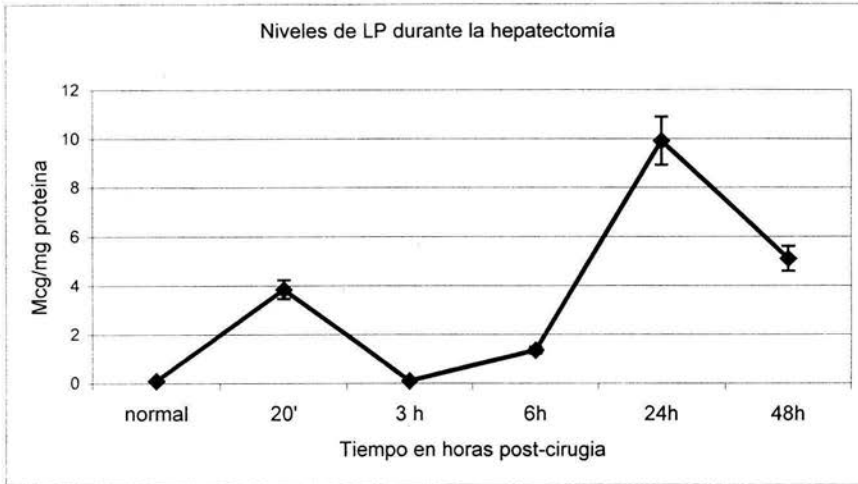
A las 72 horas de la cirugía, las diferencias entre el promedio de los grupos no son significativas, sin embargo es claramente diferente en los demás tiempos, especialmente a 24 horas, donde el tamaño y el peso del hígado remanente en el grupo tratado con manosa, es casi de 2 veces sobre el control. Para determinar cuanto de este peso pertenecía al desarrollo proliferativo, se tomaron 300mg de hígado y se calentaron a 80 °C, durante 72 horas con el fin de secarlo y estimar el porcentaje de masa hepática total. El peso seco de los grupos experimentales no presenta diferencia sobre el grupo control a ningún tiempo. (Dato no mostrado).



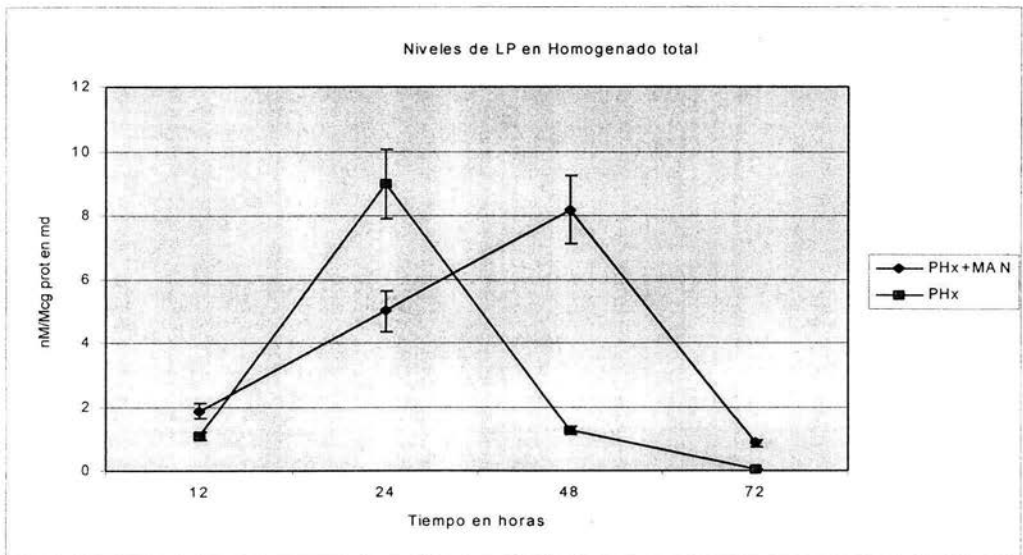
Gráfica 2. La cuantificación de ADN total nos muestra que a las 24 horas post-cirugía, los grupos tratados con manosa, presentan una menor cantidad de células, lo cual confirma los resultados del peso seco del hígado. En la grafica 1, se presenta un aumento del volumen hepático, que no correlaciona con un mayor aumento del tejido. En los datos mostrados como normal y normal +manosa, así como a 72 h. No son significativos.



Gráfica 3. Se observa un pico inicial en la progresión normal de la hepatectomía, a las 24 horas post-cirugía. En los grupos con manosa, se adelanta un pico inicial a las 12 horas, se da un decremento de la actividad a las 24 h. que se mantiene bajo hasta las 48 horas y a 72h presenta una actividad bastante elevada

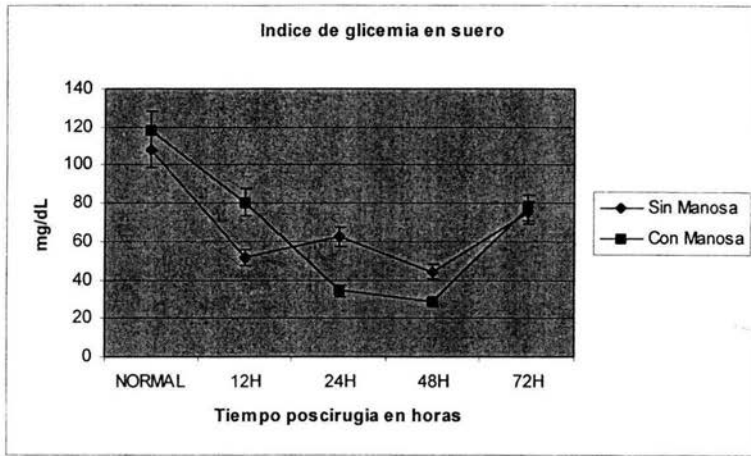


Gráfica 4. Niveles de TBARS durante la progresión normal de la hepatectomía a tiempos tempranos.

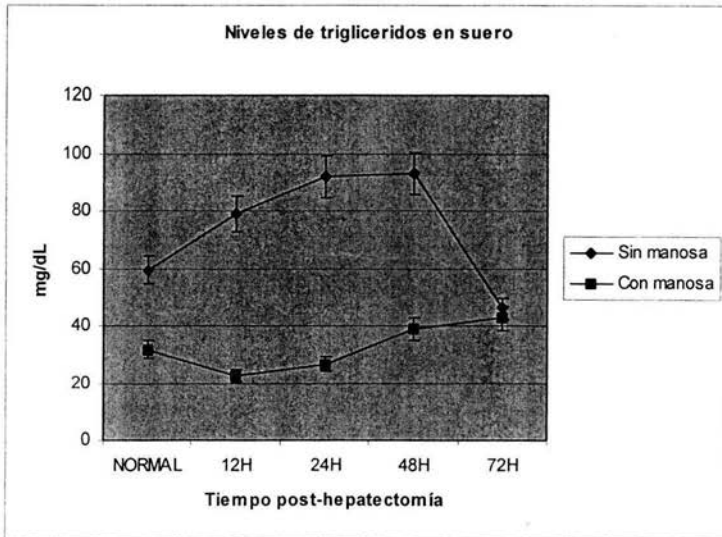


Gráfica 5. Desplazamiento en el pico de TBARS causado por la manosa. Los grupos normales y normales + manosa, además del tiempo de 72h no presentan cambios estadísticamente significativos. El pico característico de TBARS a 24 horas, es desplazado hasta 48 h.

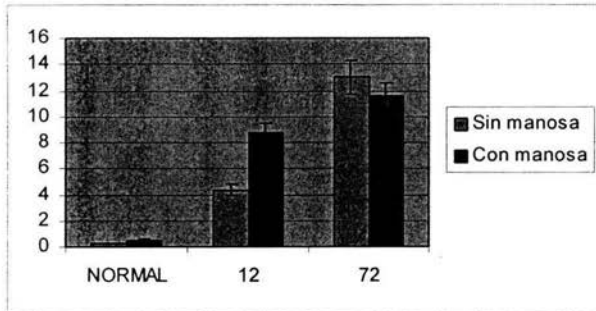
Parámetros Metabólicos



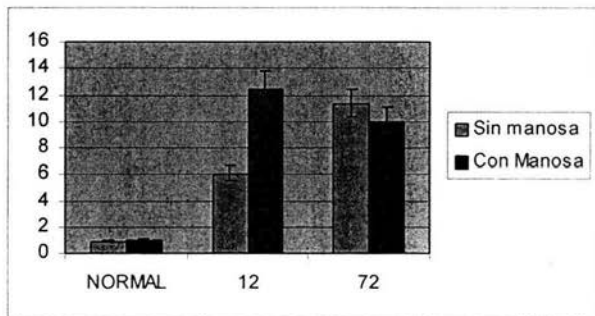
Gráfica 5. Diferencia entre los niveles de glicemia encontrados por efecto de la manosa. A 72 horas las diferencias no son significativas entre los grupos.



Gráfica 6. Efecto de reducción en la hipertrigliceridemia característica del hígado regenerante causado por la administración de manosa.

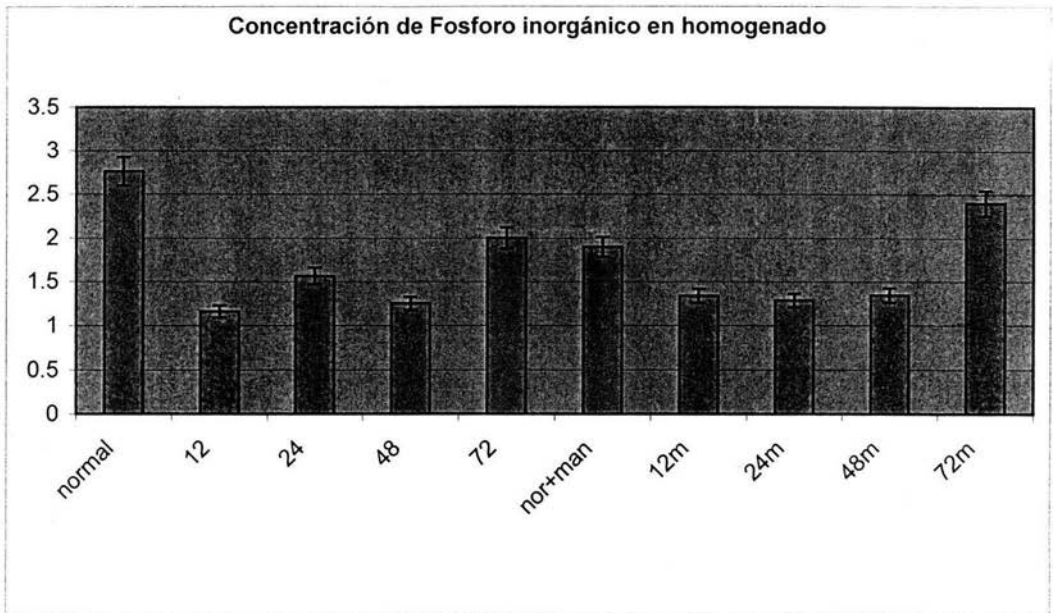


Grafica 7. Niveles de glucosa en Orina. A 72horas los resultados no se muestran significativos, sin embargo en las primeras 12 horas postcirugia, tenemos que la capacidad de la función renal se encuentra comprometida, debido a un aumento transitorio de los niveles de glucosa provocado por la hepatectomía. La manosa es capaz de aumentar aún más los niveles de glucosa en la orina a las 12 horas, no siendo así a las 72 horas, donde, al parecer el hígado comienza a recuperar su capacidad proliferativa.

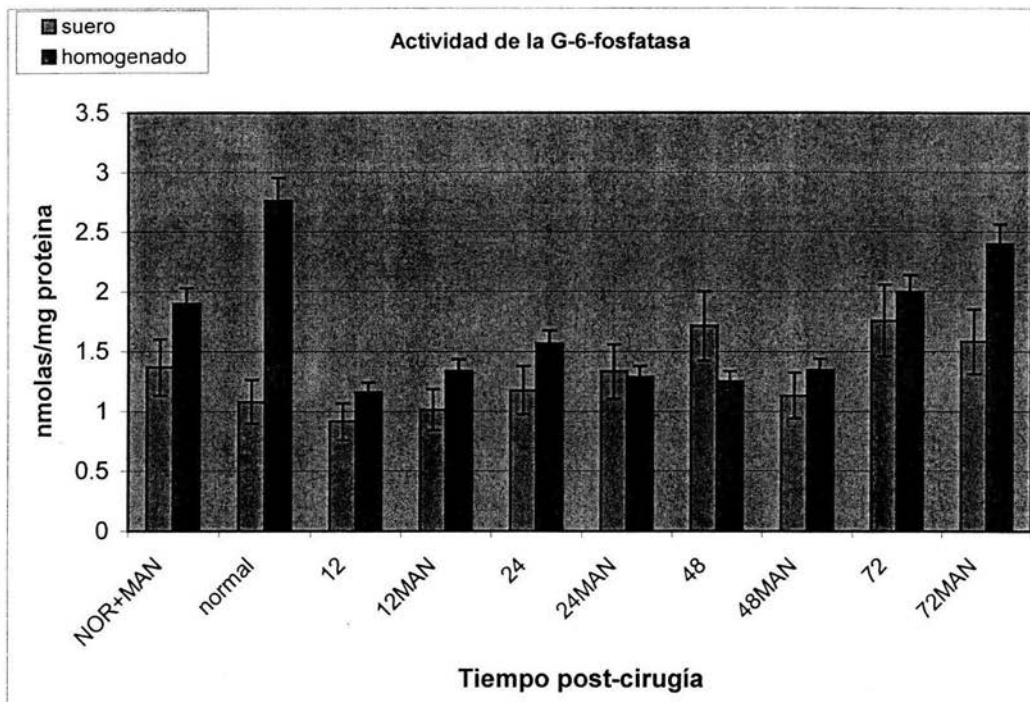


Gráfica 8 Niveles de proteína en orina. Nuevamente se ve un efecto de compromiso renal provocado por la hepatectomía y potenciado a las doce horas por efecto de la manosa, así mismo no existen diferencias significativas entre los grupos controles y el experimental.

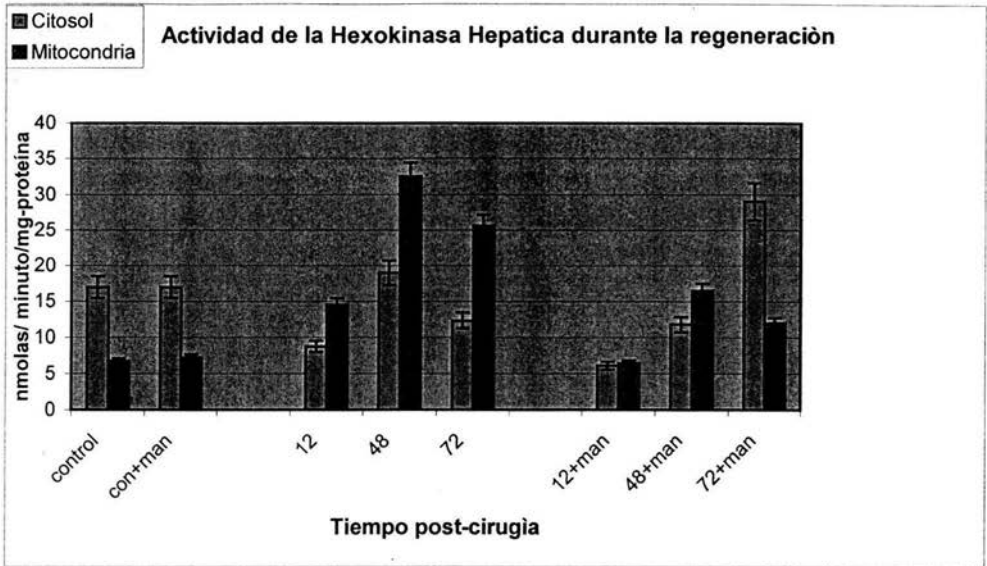
Parámetros de la Fosforilación de Glucosa



Gráfica 9. Concentración de Pi durante el proceso regenerativo, la escala del eje de las ordenadas esta dado en nanomolas/mg de proteína. No existe diferencia significativa entre los grupos controles y experimentales a excepción de los grupos normales y normal +manosa, y 24 y 24 +man, en este último un leve, pero claro descenso en la concentración de los niveles de fósforo.



Gráfica 10. Actividad de la G-6-Pasa, tanto en tejido homogeneizado de hígado, como en suero. Los grupos normal, normal +manosa, 24 y 72 +manosa horas fueron distintos significativamente con respecto a los niveles presentados en suero y homogenado. La administración de manosa parece bajar la actividad en el suero y aumentarla en el homogenado, sin embargo únicamente se da un resultado estadísticamente significativo de esta diferencia en el grupo de 48 horas y en 72 horas +manosa.

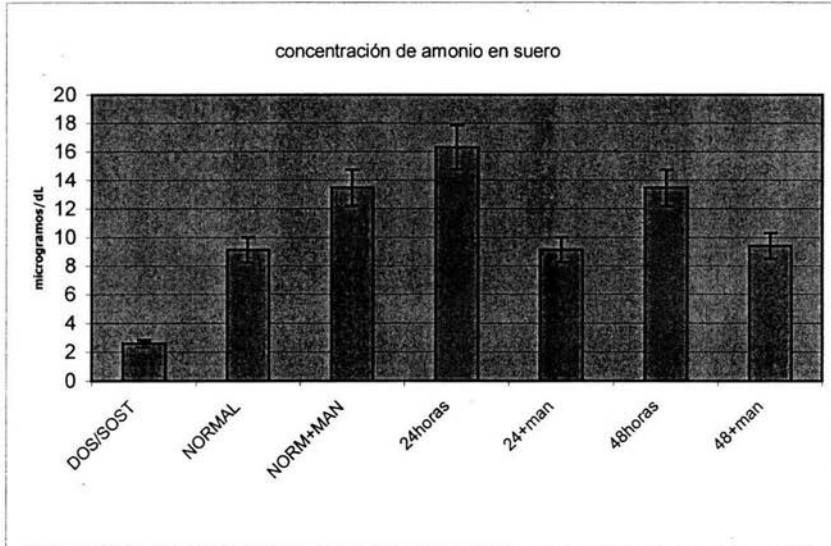


Gráfica 11. La actividad de la hexoquinasa fue medida a 50mM de concentración de glucosa.

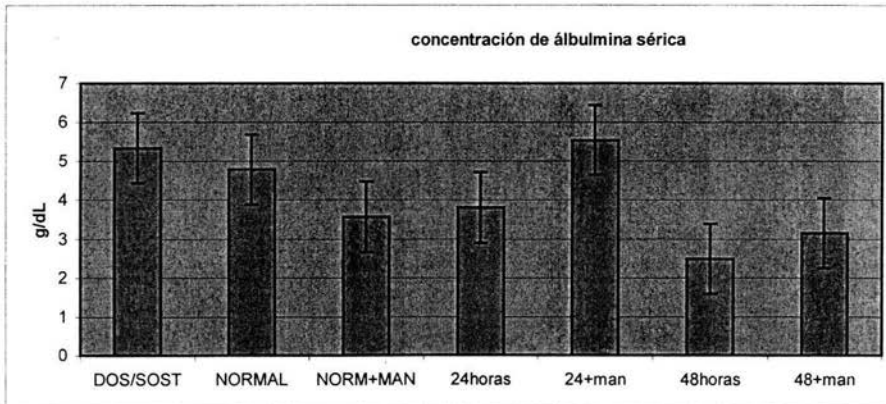
En la actividad de la HK, únicamente la diferencia existente a 12 horas +manosa entre la actividad registrada en citosol y en mitocondria, no fue significativa. Al parecer este grupo de enzimas son más activas en el citosol que en la mitocondria y la manosa no parece modificar esta relación; sin embargo, la hepatectomía por si sola, parece invertir esta condición, de tal forma que durante el proceso regenerativo, la actividad de la hexocinasa mitocondrial aumenta al menos 2 veces sobre los niveles que se encuentran en el citosol, así mismo tanto la actividad citosolica, como mitocondrial, son significativamente diferentes a lo largo de los tiempos registrados. Al administrar la manosa, a las 12 horas post cirugía, los niveles de la actividad de la hexocinasa citosolica caen a un tercio de la actividad normal y aproximadamente a la mitad de la registrada en los grupos únicamente hepatectomizados. A las 48 horas la actividad de la hexocinasa de ambos compartimientos continúan bajas –a la mitad del grupo sin manosa–, pero la relación comienza a parecerse a la que se presenta en la hepatectomía sin manosa. El grupo de 72 horas post cirugía más manosa invierte completamente la situación del grupo hepatectomizado a este tiempo, la hexocinasa citosolica se

recupera claramente con la manosa, mientras que la mitocondrial se mantiene baja.

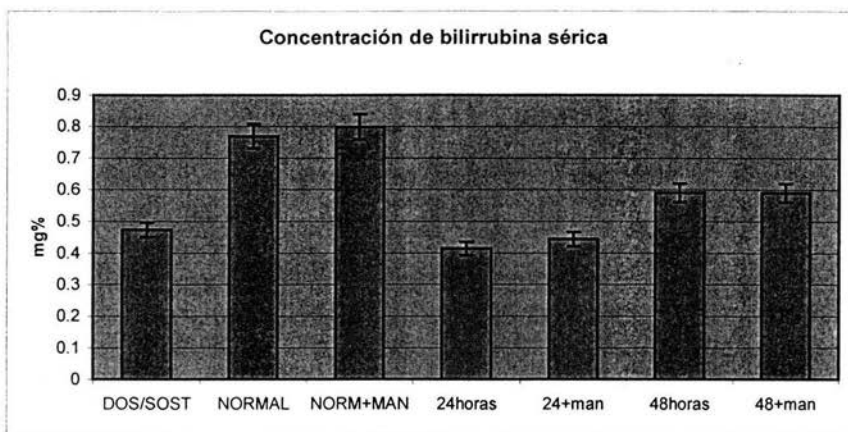
Parámetros de la función hepática en el grupo de dosis sostenida



Gráfica 12. La concentración de amonio en el suero aumenta por la hepatectomía, lo cual nos indica un efecto transitorio de daño hepático, mismo que hacia las 48 horas parece normalizarse. Este efecto se ve reducido por la administración de manosa en los grupos hepatectomizados y paradójicamente la presencia del carbohidrato es capaz de aumentar los niveles de amonio en una rata sin hepatectomía en una dosis aguda. Sin embargo, en dosis sostenidas a lo largo de 3 semanas, podemos observar que la manosa reduce la concentración de amonio.



Gráfica 13. A las 48 horas no existe diferencia significativa, con o sin manosa. Sin embargo a 24 horas se vuelve a ver el efecto de daño transitorio, y observamos que la manosa revierte dicho efecto. Por otro lado, la administración sostenida no es significativamente distinta del normal, pero sí lo es de la administración aguda.



Gráfica 14. No existe diferencia estadística entre el tratamiento agudo con manosa y los grupos únicamente hepatectomizados, sin embargo ésta diferencia se da entre los tiempos.

Observaciones Histológicas.

TRATAMIENTO	MITOSIS	HIPERCROMACIA	TIPO DE ESTEATOSIS	Cantidad
12h	0	*	NINGUNA	0
24h	4.6	***	Gota mixta	escasa
48h	2.6	**	Gota pequeña	moderada
72h	1.5	*	Gota pequeña	escasa
24h+MANOSA	4.5	*	Gota Mixta	moderada
48h+MANOSA	6.3	****	Gota Grande	extensa
72h+MANOSA	2	**	Gota mixta y grande	extensa
CONTROL	0	0	0	0
CONTROL+MAN	0	0	0	0

Tabla 3. Tinción HE, aumento 40X. Mitosis/campo. La diferencia entre los grupos experimentales con manosa y sin ella son es significativa.

Análisis de Resultados y Discusión

La manosa afecta el metabolismo general del organismo siendo su efecto dosis dependiente y comprometiendo la actividad hepática esencial, de tal forma que la administración aguda, de dosis superiores a 1.6g/kg de peso corporal matan al animal, si este fue sometido a una hepatectomía parcial. Los controles de laparotomía no presentan problema en manejar dosis de hasta 6g/kg de peso, presentando una glicemia ligeramente elevada. Esta hiperglicemia se conserva hasta por 48 horas. En el modelo de dosis sostenida el índice glicémico aumenta con la administración de manosa, como sucede en los animales de dosis aguda, (172mg/dL), sin embargo después de la 11va dosis, el índice glicémico se mantiene constante (123mg/dL) y no se modifica con la hepatectomía. En este mismo modelo, los niveles de albúmina se mantuvieron constantes, pero una vez realizada la hepatectomía caen de 5.4 a 3.2uM, debido a la pérdida de la masa hepática. La diferencia entre estos modelos es clave para determinar con mayor profundidad, las alteraciones que presenta el hígado regenerante en presencia de manosa, sin embargo por problemas metodológicos, los resultados con el modelo de dosis sostenida son escasos. Aun así, los datos obtenidos pueden contrastar algunos aspectos del modelo de administración aguda, tal y como es el caso para la glicemia.

Podemos asumir que el aumento en el volumen hepático, en los grupos hepatectomizados 48 horas de la cirugía tratados con la D-manosa, puede deberse a la acumulación de agua por parte del hígado en un estado de congestión pasiva crónica, la cual histológicamente no llega a convertirse en un edema; es decir, una condición patológica de acumulación de líquido. En este sentido es difícil hacer inferencias, sobre la diferencia de volumen entre los grupos tratados con manosa y sin ella, debido a que los resultados del peso seco, no son

distintos significativamente, siendo que si la diferencia de volumen fuese exclusivamente por agua, el peso de los animales sin manosa tendría que ser inferior. Una explicación parcial, puede ser la presencia de una acumulación anormal de lípidos por parte de los hepatocitos, consecuentando en un importante aumento de volumen a las 24 y 48h. de la cirugía.

El análisis histológico nos muestra un estado de esteatosis microvesicular — acumulación de gotitas de grasa—, mismo que podemos diferenciar en al menos 3 estados: Gota Grande, Gota Mixta y Gota pequeña, refiriéndonos al tamaño de las vesículas observadas dentro del hepatocito. En los controles, tanto el grupo intacto, como el tratado con manosa, carecen de esta condición. En el grupo de 12 horas, sin importar el tratamiento con manosa, no se presentan rasgos distintivos de esteatosis.

Durante la progresión de la regeneración hepática, podemos apreciar un aumento considerable de esteatosis, así como los otros parámetros considerados dentro de nuestra observación histológica, — hipercromacia e índice mitótico—. Existen diferencias considerables dentro de los grupos tratados con manosa y aquellos que únicamente fueron hepatectomizados: los animales con manosa presentan una esteatosis de gota grade, muy extensa y localizada en su mayor parte dentro de las áreas cercanas a la zona con elementos del sistema circulatorio. Dentro de los grupos sin manosa, se observa la presencia de una esteatosis mixta, con predominio de la gota pequeña. Tanto la hipercromacia como el índice mitótico, son claramente mayores, también en estos animales. Siendo el máximo a las 48 horas + manosa. Tomando en cuenta que las observaciones histológicas tienen un grado de subjetividad más alto que otros parámetros, debemos ser *conservadores* dentro de las interpretaciones al respecto. Sin embargo, tenemos la impresión de que en los grupos tratados con manosa, se observa una mayor *actividad*: al parecer existe un aumento en la tinción de los núcleos, así mejor definición de las estructuras nucleares.

La manosa consigue desplazar el evento proliferativo en el tiempo, según la actividad de la TK, donde presenta un pico inicial de actividad a las 12 horas después una fase de meseta. La actividad de la enzima no es detectable bajo condiciones normales en fluidos extracelulares y en el plasma sanguíneo, pero en animales y humanos con enfermedades neoplásicas, cantidades significativas de la enzima pueden ser medidas. Las isoenzimas han sido descritas en células tumorales, así como un tipo de enzima específica mitocondrial. La Tk es inhibida fisiológicamente por el TTP Inhibición por retroalimentación. La actividad de la enzima se encuentra presente en el citosol de las células que son muy activas en la síntesis de ADN. La conversión de sustratos procede de forma lineal con el tiempo durante al menos 3 horas.

La cantidad de ADN total presenta un patrón de desplazamiento similar, sin embargo en este parámetro no se ve tan claramente definido. En la lipoperoxidación se observa más claramente el desplazamiento del pico de síntesis. Los radicales libres de oxígeno son sustancias que originalmente se asociaron a daño celular y como consecuencia directa de la acción de agresores químicos, sin embargo la producción de TBARS, según nuestra experiencia, presenta una clara correlación con la actividad proliferativa.³²

El 4-hidroxi2'-nonedal (HNE) es uno de los mayores metabolitos aldehídos producto de la lipoperoxidación, y es considerado como uno de los marcadores más reproducibles de la peroxidación de lípidos. Se localiza principalmente en el citosol de los hepatocitos y en las células del sinusoides de la zona 3 —la más alejada de los elementos circulatorios—. Se ha encontrado que un aumento significativo en su síntesis, correlaciona directamente con el grado de inflamación / necrosis. Así mismo, uno de los mayores blancos de los radicales libres es el ADN, a este respecto, el 8-hidroxideoxiguanosina (8OHdG), una base del ADN modificada, producto de la generación de radicales libres, es considerado como uno de los mejores marcadores de daño oxidativo al ADN.⁴² Posiblemente exista un cierto grado de daño celular cuantificable por la producción de TBARS, sin

embargo, es posible que durante la regeneración, la lipoperoxidación no necesariamente significa lo mismo a todos los tiempos. Al observar un pico de síntesis de TBARS a los 20 minutos de la hepatectomía, podemos referirnos a éste, como una señal proliferativa. A 24 horas de la cirugía, existe la posibilidad de que dicha producción, correlacione con un índice de daño celular —debido a que existe menos masa, es posible el hígado no pueda neutralizar todos los ataques producidos por radicales libres; así mismo el aumento de oxígeno y el conjunto de las reacciones proliferativas, pueden mantener los niveles de TBARS elevados a este tiempo—.

En los animales donde se les administró la manosa, no se aprecia este pico a las 24 horas de la cirugía, posiblemente debido a que el epímero retrasa la secuencia de eventos necesarios para provocar un aumento de los TBARS en este tiempo. Dicha serie de eventos se da en este grupo, con 24 horas de retraso, pues a las 48 horas de la hepatectomía, cuando se administra manosa, tenemos un pico que se comporta de la misma forma, que el pico que se observa a las 24 horas en ratas con progresión de la hepatectomía normal.

Aunque no es posible identificar del todo ésta secuencia de eventos, en nuestro modelo observamos varios efectos, tal como un aumento significativo en los niveles de glucosa sérica en ratas normales. Sin embargo cuando la administramos a ratas hepatectomizadas 2 horas después de la cirugía, obtenemos un efecto de hipoglucemia aguda, el cual también es dosis dependiente, llegando a matar a un animal con dosis superiores de 1.8g/kg de peso corporal.

Si consideramos que la glicemia se encuentra altamente regulada, destacamos principalmente a la glucólisis, glucógenolisis, gluconeogénesis, como las rutas más importantes dentro de nuestro sistema. Al administrar la manosa, suponiendo que ésta inhiba el transporte de glucosa a la célula, podríamos explicar el efecto de hiperglicemia en ratas normales. Tomando en cuenta que 1.2g/kg de peso corporal, de manosa, administrados vía i.p. puede alcanzar concentraciones

de aproximadamente 300mg/dL en sangre, —calculamos en base a lo que sería la concentración de glucosa, de administrarla de la misma forma— con lo cual, tomando en cuenta que la glicemia normal de una rata se estima alrededor de 100mg/dL de glucosa, tenemos 3 veces más manosa en sangre que glucosa, lo cual puede favorecer su transporte dentro de la célula, si es que la reconocen los transportadores GLUT, del hígado. Por otro lado impedimos que la glucosa entre a este mismo espacio. En el momento de hepatectomizar al animal, tenemos un estímulo catabólico que se inicia con la fosforilación de glucosa dentro de la célula. Estando presente la manosa, es posible que por su misma concentración, se fosforile más manosa que glucosa, aproximadamente en forma de 3:1, sin tomar en cuenta la actividad de la glucinasa, —misma que por tener mayor afinidad por la glucosa podría verse menos afectada—. Consecuentemente, la manosa-6-fosfato producida dentro del sistema, siguiendo su ruta metabólica, es catalizada a fructosa-6-fosfato por la manosa fosfato isomerasa (MPI). Esta última enzima, tiene actividades muy bajas en todos los sistemas donde han reportado la toxicidad de la manosa,^{14,15,16} por lo cual, la acumulación de manosa-6-fosfato dentro del hígado podría ser posible. Hasta este momento suponemos 3 puntos cruciales: 1) la manosa es transportada al interior de las células, de forma semejante a la glucosa, 2) la manosa esta siendo fosforilada por el grupo de hexocinasas en el hígado y 3) la MPI tiene baja actividad en hígado.

Para efectos prácticos se acepta que ambos manosa y glucosa, en el modelo de levaduras, presentan un transporte distinto e independiente. En el hígado se expresan desde el GLUT1-GLUT5, todos específicos para glucosa, los cuales mantienen una alta afinidad para su sustrato, sin embargo, dado que la manosa y la glucosa mantienen dos configuraciones espaciales idénticas, es posible la inhibición en el transporte de glucosa por una concentración mayor de la manosa en el medio. **IZT.**

Si bien, el medir cada uno de los puntos anteriores es difícil, en el modelo de regeneración hepática, podemos hacer algunas inferencias de los resultados indirectos que obtuvimos.



Un reflejo de la acumulación de sustratos fosforilados, suele ser la disminución de la concentración de Pi en el sistema. Nuestros datos nos indican que dentro del hígado, no existe tal decremento durante la progresión del proceso regenerativo a excepción de los grupos a 24 horas y en los controles, donde la administración de manosa baja la concentración de Pi. Suponemos que la concentración de Pi es bastante dinámica dentro del hígado, por lo que necesitamos una n más grande para obtener los resultados estadísticamente significativos.

Las concentraciones elevadas de fructosa, depletan completamente los niveles de Pi biodisponibles,²² por la acumulación de fructosa-6-fosfato, ya que la Fosfofructocinasa, trabaja de forma más lenta que la hexocinasa que la fosforila. Con la administración de manosa, parece bajar la actividad de la glucosa 6-fosfatasa en el suero y aumentarla en el homogenado, esto se hace más evidente a 48 horas y en 72 horas +manosa. El significado de esto parece ser la liberación de glucosa al medio y/o Pi, quizás sea esta la razón por la cual en estos tiempos, no vemos disminución de la concentración de Pi en homogenado. De comprobarlo, podemos asumir que los niveles de Pi son necesarios y se encuentran visiblemente regulados, durante los eventos regenerativos.

Está reportado que la manosa inhibe la fosforilación de glucosa,¹⁷ por la hexocinasa tipo I, y III. Los cambios en la distribución de la actividad del grupo de hexocinasas, así como la estimulación de la actividad mitocondrial pueden deberse a un estrés metabólico provocado por la falta de glucosa en el medio, así como la aparente fosforilación de manosa. Se tiene reportado en músculo,³⁹ que la hexocinasa III puede anclarse a la membrana mitocondrial, de forma que mantenga la fosforilación de glucosa más cerca de los procesos de fosforilación oxidativa, la producción de ADP cerca de la mitocondria ejerce una adaptación transitoria más eficiente, que permite rápidamente al músculo recuperarse del estrés metabólico. En el caso del hígado, tenemos reportado¹⁹ que existe una mayor actividad en hexocinasa citosólica, que en la mitocondrial; sin embargo, en

el proceso regenerativo, esta situación se invierte, posiblemente para recuperar *el tiempo perdido en fosforilar manosa* y disparar el crecimiento celular. Esta idea se ve apoyada con los resultados de la TK, donde vemos que a 72 horas existe un pico en la síntesis de ADN, en los grupos tratados con manosa. Así mismo vemos que la actividad de la hexoquinasa mitocondrial aumenta con el simple hecho de someter a la rata a una hepatectomía.

La utilidad de un modelo de administración sostenida de manosa es que puede permitirnos dilucidar los efectos de la acumulación de metabolitos potencialmente tóxicos, además de que tomando cuenta a las CDGs, podría mimetizar estado de acumulación de manosa-6-fosfato, asociado a el establecimiento de una fibrosis congénita (CDGS tipo 1B) por la deficiencia de la manosa-6-fosfato isomerasa. Dado que esta última enzima suponemos, mantiene una actividad muy baja, una dosis sostenida podría aumentar los niveles de manosa-6-P en el hígado, al grado de provocar una fibrosis ligera.

Aunque el proyecto originalmente contempla hasta 72 horas como tiempo post-cirugía límite, probablemente sea interesante ampliarlo hasta 144 horas, tiempo en el cual el hígado remanente ha crecido hasta alcanzar un 90% de la masa hepática original. Aparte de ver el retraso, podemos apreciar si existe un incremento en la síntesis y/o acumulación de colágena, ya que se ha reportado un proceso fibrótico moderado en alteraciones genéticas del metabolismo de la manosa.

CONCLUSIONES

La biodisponibilidad del Pi, únicamente se ve afectada a 24 horas de la hepatectomía y en los grupos control. Existe, sin embargo un aumento en la actividad de G-6 fosfatasa, precisamente en los tiempos donde menos encontramos diferencias en la concentración de Pi, por lo cual nos inclinamos a pensar que esta enzima forma parte importante de un sistema para mantener los niveles del Pi constantes.

La hexocinasa citosólica al parecer no tiene cambios perceptibles con respecto al animal tratado con manosa 24 horas después de la cirugía. Sin embargo la hexocinasa anclada a la membrana mitocondrial si presenta mayor actividad, cuando se le trata con manosa. La hexocinasa citosólica aumenta su actividad a las 72 horas post cirugía+tratamiento con manosa, lo cual puede estar correlacionado con el incremento de los otros estímulos proliferativos, que el azúcar podría haber desfasado.

La manosa afecta de manera constante la producción de TBARS por 24h. Aparentemente y siguiendo los resultados de la TK y la cuantificación de ADN total la proliferación celular, se ve retrasada, al menos por 24 horas. Sin embargo no obtenemos la confirmación de estas aseveraciones, con el índice mitótico, el cual nos indica que no existen diferencias significativas entre la hepatectomía con manosa y sin ella, a ningún tiempo dentro del espacio determinado. A este respecto, nos es claro que la progresión de la regeneración hepática es distinta en presencia, que en ausencia de manosa, por lo cual toda la serie de cambios metabólicos descritas anteriormente nos indican que efectivamente, la manosa posee un efecto adverso para el hígado en regeneración. Dicho efecto, trasciende a otros órganos, como en el caso del riñón, donde compromete su capacidad de

manera transitoria –tomando en cuenta los niveles de glicosuria y proteinuria—, impide la traslocación de la actividad de la hexocinasa hepática, disminuye los niveles de triglicéridos en la sangre y retrasa la producción de TBARS. Sin embargo, ninguno de estas modificaciones metabólicas, fue lo suficientemente potente para detener el proceso. Histológicamente, cuando administramos la manosa a un hígado regenerante, podemos observar señales de daño aumentadas, infiltración grasa, esteatosis más severa, pero el índice mitótico permanece dentro del rango normal. Posiblemente el conjunto de todas estas modificaciones –y algunas otras que no medimos— ayuden a mantener la proliferación celular dentro de los niveles *normales*, lo cual nos indica que la prioridad dentro de un hígado regenerante, no es mantener sus funciones propias, sino recuperar su masa. Posiblemente los niveles de TBARS a 48 horas estén indicando un fuerte daño lipoperoxidativo, y aunque tenga el mismo comportamiento que un pico a las 24 horas en la hepatectomía sin manosa, los significados son diferentes. El retraso en la actividad de la TK, sin embargo permanece contrario a esta idea, por lo cual debemos suponer que el comportamiento

Referencias

1. Arias I.M., et al.,(1982) *The liver, Biology and Pathobiology*, Raven Press, New York, U.S.A
2. Tortora G., Anagnostakos N.P., (1989) *Principios de Anatomía y Fisiología*, Quinta Edición, Editorial Harla, México D.F.
3. Ganong, W.F., (1996) *Fisiología Médica*, El Manual Moderno, 15ª Edición, México D.F.
4. Hernández D., and De la Fuente M., (1989) *Mannose toxicity in Ehrlich tumor cells*, Biochem. Cell Biol. Vol 67.
5. Michealopoulos G., De Frances M., (1997) *Liver Regeneration* , Science vol 276, 4. 60-66
6. Ankoma-Sey V.,(1999) *Hepatic Regeneration-Revisiting the Myth of Prometheus*, News Physiol. Sci., vol 14 149-155
7. Hernández D., M De la Fuente (1989) *Mannose toxicity in Ehrlich ascities tumor cells*, Cell Beiol. 67:311-314
8. Koning *et al* (2000) *Congenital hepatic fibrosis in 3 siblings with phosphomannose isomerase deficiency*. Virchow Arch 437; 101-105
9. Brouquisse R., et al (2001) *Regulation of protein degradation and protease expression by mannose in maiz root tips. Pi sequestration by mannose may hinder the study of its signaling properties*, Plant Physiology: vol 125, 1485-1498.
10. Rosa JL, et al, (1992) *Gene expression of regulatory enzymes of glycolysis/gluconeogenesis in regenerating rat liver*, Biochem J., 287, 113-116.
11. De la Fuente, et al, (1986) *Mecanism of mannose toxicity* , Biochem and Biophysical Research Comm, vol 140, 1; 51-55.
12. Labes, (2001) *Sugar utilization in the hyperthermophilic, sulfate –reducing archeon Archaeoglobus fulgidus strain 7324; starch degradation to acetate and CO₂ via modified Embden- Mayerhof pathway and acetil-CoA synthetase (ADP forming)* Arch Microbiol. 176: 329-338.
13. Rose et. al., (1982) *Stability of hexokinase in vitro and in Ascites Tumor Cells*, Arch. Biochem. And Biophysc. Vol 213, no 2, Feb, pp 625-634.

14. Wagner Seixas, et. Al. (2001), *Subcellular distribution and kinetic properties of cytosolic and non-cytosolic hexokinases in maize seedling roots; implications for hexose phosphorylation*. Journal of Experimental Botany, Vol 52, no 359, pp 1191-1201.
15. Ulrich Vischer (1987), *Hexokinase isoenzymes of RIN-m5F insulinoma cells* Biochem J., 241, 249-255.
16. Dexing Sui (2002) *Purification of the type II and type III Isoenzymes of rat hexokinase, expressed in yeast*. Protein Expression and Purification. 24, 83-89.
17. Albert C. Chou, (1972), *Purification and properties of rat brain hexokinase*. Arch. Of Biochem Biophysc. 151.
18. Radojkivic, (1987), *Hexokinase isoenzymes from the Novikoff hepatoma*. Biochem. J. 242, 895-903.
19. Yuichiro Yamada, (1990), *Increase in liver glucose transporter mRNA levels during rat liver regeneration*, Biochem and Biophys. Research Communications., Vol 168, no 3.
20. Gordon Alton, (1997), *Oral ingestion of mannose elevates blood mannose levels; a first Step toward a potential therapy for Carbohydrate- Deficient Glicoprotein Syndrome type 1*. Biochem and Mol. Medicine. 60, 127-133
21. Genevieve Durand, (2002), *Protein Glicosilation Disease; Blood and urinary oligosaccharides as markers for diagnosis and therapeutic monitoring*, Clinical Chemistry. 46:6 795-805.
22. Mitsuaki; Moriyama, (1999), *Changes in Fructose-inducet production of glucose in rat liver following partial hepatectomy*. Arch. Biochem. Biophysc. Vol 371, no 1, noviembre 1, pp 53-62.
23. Thierry Veronese, (1998), *Proposition for the biochemical mecanism occurring in the sucrose isomerase active site*, FEBS letters, 441, 348-352.
24. James R. Etchinson, (1997), *Enzymatic assay of D-mannose in serum*, Clinical Chemistry, 43:3, 533-538.
25. Matthew W. Fields, (2001), *The glucomannokinase of prevotella bryanty B₄ and its potential role in regulating β -glucanasa expression*, Microbiology, 147, 1035-1043.
26. Antoni G., Bottaso BM, et. al.(1982) LAB, 9:115-118

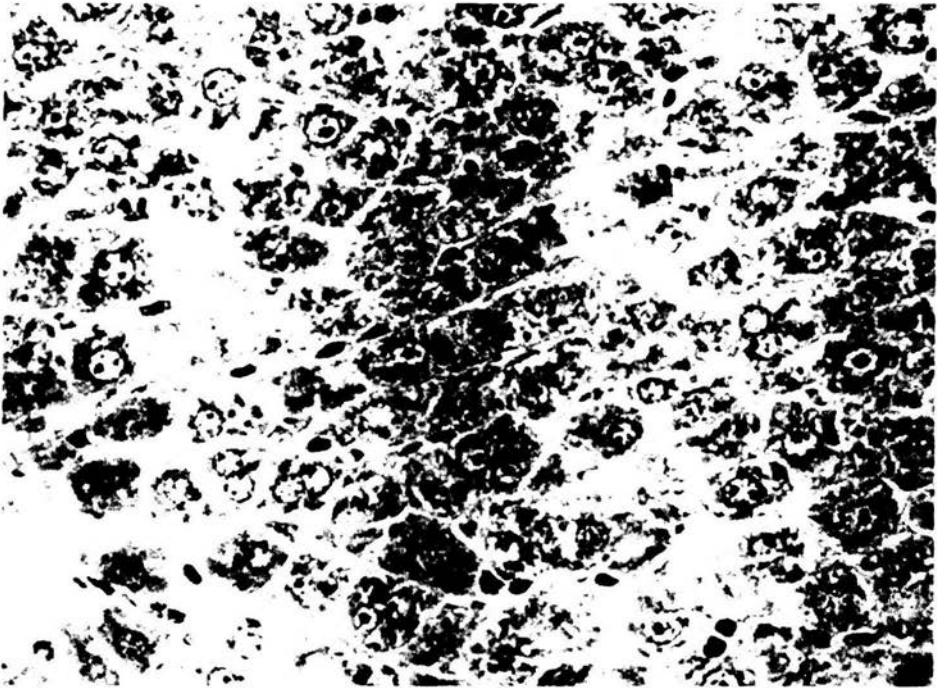
27. Gucolo G., David M.,(1976), *Clin Chem.* 19:476.
28. Werner M., Gabrielson DG., Eastman G.(1981) *Clin Chem.* 21:268
29. Alfred F. Harper, (1965), En *Methods of enzymatic analysis* (Bergmayer H. U.) pp 788-792, Academic Press, New York.
30. Bergmayer H. U., (1965) *Methods of enzymatic analysis* pp 788-792, Academic Press, New York.
31. Burton K., (1968), *Determination of DNA concentration with Diphenylamine*, *Methods in Enzimology*, 12:163-166.
32. Hernández Muñoz R., et. al., (1984), *Effects of adenosine on liver cell damage induced by CCl₄*, *Biochemical Pharmacology*, Vol 33, No. 16, pp 2599-2604.
33. V/A, *Reactivos y Productos Quimicos para investigación en Ciencias de la Vida*, Sigma-Aldrich, 2002-2003. México.
34. Higgins G. y Anderson R.,(1931) *Experimental Patology of the liver; Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal.* *Arch. Pathol.* 12: 186-202
35. Beuge J. Aust S.,(1978), *Microsomal lipid peroxidation.* *Methods in Enzimology.*, 52:302-310.
36. Lowry H., et.al., (1951), Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 279-282.
37. Suers H., Wilmanns W., (1985), *Thymidine Kinase*, *Bergmayer HU, editor Meth. Enzym. Anal.* Vol. 3 Deerfield Beach : VCH Publisher, 468-473.
38. Grossbard L., 1966, *Multiple hexokinases of rat tissue*, *The Journal of Biological Chemistry.* Vol 241, no 35 pp 3546-3560.
39. Vogt, C., (1998), *Effects of insulin on subcelular localization of Hexokinase II in Human skeletal muscle in vivo.* *Journal of clinical endocrinology and Metabolism*, vol 83 no.1.
40. Stepanova, N.G.(1963), *Hexokinase and glucose-6-phosphate Dehydrogenase activitie in cellular fractions of regenerating liver and effect of cortisone*, *Voprosy Meditsinskoi Khimii*, vol 9, no. 5, p 495.
41. Nelson Fausto,(1986), *New perspectives in liver regeneration*, *Hepatology.* Vol 6. no. 2., pp 326-327.

42. Seki S., (2002), *In situ detection of lipid peroxidation and oxidative damage in non-alcoholic fatty liver diseases*, *Journal of Hepatology* 37, 56-62.
43. Krample S., (1998), *Catabolite inactivation of the high affinity hexose transporters Hxt6 and Hxt7 of Saccaromices cerevisiae occurs in the vacuoles after internalization by endocytosis*, *FEBS letters* 441, 343-347
44. Ledesma-Mateos Ismael, (1982), TESIS de Licenciatura para obtener el grado de Biólogo: *Redistribución del receptor de insulina durante la regeneración hepática, causada por la administración de CCl₄*.
45. Bassergy R., 1976, *Multiplication and diversity in mamalian cells*, New York, Dekker. Citado en Ledesma-Mateos
46. Moshage Hans, 1988, Molecular regulation of fibrogen and albumin synthesis during the acute phase response. TESIS de Doctorado.
47. Pargaenker P.S., 1977, *Comp. Biochem. Physiol. B* 56(3): 293-299.
48. Arans, Effects of 2-deoxiglucose on metabolism of glicosaminoglicans in normal and hypercolesteronemic rats, *Indian J. Exp. Biol. Jan*: 38 (1): 31-35.
49. De Blesser C., (1996), The insulin-like Growth Factor II/Mannose 6-phosphate receptor expresión in liver serum and during acute CCl₄ intoxication in rat. *Hepatology* vol 23, no.6 1531-1537
50. Fausto, N, (1999), Lesson from genetically engineered animal models V. Knocking out genes to study liver regeneration: present and future, *Am. Physiol. S.* 40, g917-g921
51. Reutter W., (1984), Modification of intramolecular turnover of terminal carbohydrates of dipeptidylaminopeptidase IV isolated from rat liver plasma membrane during liver regeneration . *Eur. J. Biochem.* 138, 435-438. FEBS 1984
52. Barra, et.al.,(1977), Liver regeneration in normal and aloxan induced diabetic rats, *J. exp. Zoo.* 201:93-100
53. Alison M. C. (1986) Regulation of hepatic Growth. *Physiol. Rev.*, 66: 499-541.
54. Nichizuka Y., (1984), The rol of protein kinase C in cell surface transduction and tumor promoting. *Nature*, 308,693-698.
55. Rodríguez Barbero E.,(1995) Regeneración hepática y factores de crecimiento, *Bioquímica*, vol. 20, no. 4-81

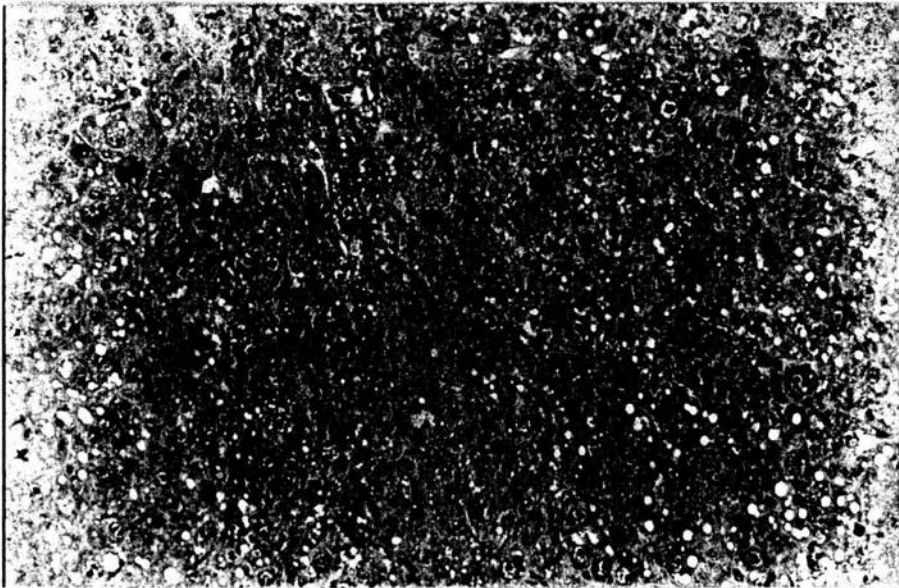
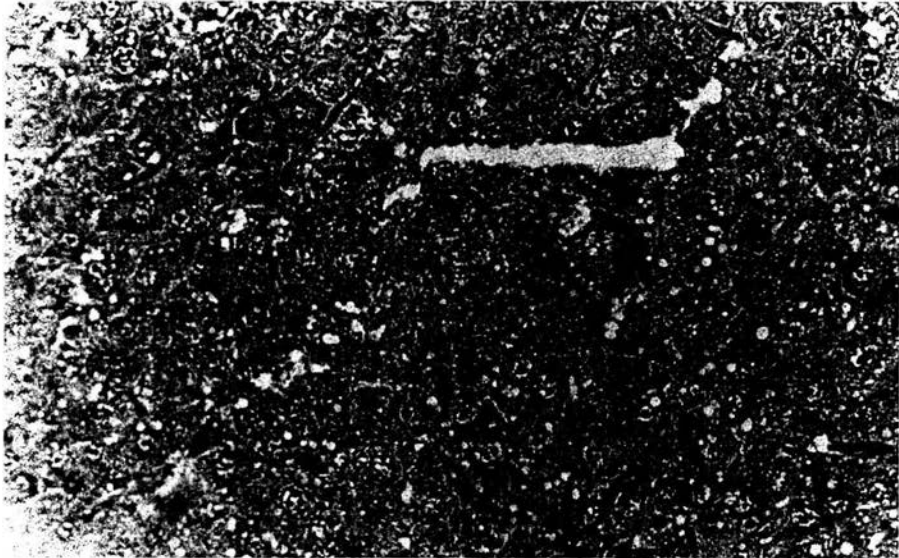
56. Russel WE., Vasopressin modulates liver regeneration in Brattleboro rats, Am. J. Physiol. 245 G321-324.
57. Lee K., et al., (1968), *Stimulation of incorporation by triiodothyronine of thymidinemethyl[³H] in to hepatic DNA of rat.* Arch. Biochem. Biophys. 125:751-757.
58. Short J., et.al., (1972), *Induction of DNA synthesis in the liver of intact animal,* J. Biol. Chem., 247:1757-1766.
59. Macmanus JP., et.al., (1975) *Evidence of the release of calcitonin and PTH during liver regeneration in the rat liver.* Horm. Metabolic Res.,7:83-87.
60. Michaelopoulos G.K, (1991) *Liver Regeneration,* Science 296 5, 165.
61. Fausto N., et. al.(1995) *The role of cytokines on liver regeneration.* FASEB J. 9 1537-1549

ANEXO FOTOGRAFICO

La imagen superior, nos muestra un hígado normal. El tamaño de todas las fotografías es de aproximadamente el 42% del área vista en un aumento de 40X.



La imagen superior nos muestra un hígado regenerante, a 48 horas de la hepatectomía. La fotografía inferior muestra al mismo grupo, pero con el tratamiento con manosa. El símbolo muestra las mitosis encontradas.



La imagen superior corresponde a un hígado 72 horas posthepatectomia. La fotografía inferior muestra el mismo tiempo, pero con manosa.

