



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

**Efecto de la adenosina sobre la progresión del
ciclo celular, durante la regeneración hepática
inducida por hepatectomía parcial**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A**

Biol. Edgar Rubén Mendieta Condado

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
DR. ROLANDO EFRAÍN HERNÁNDEZ MUÑOZ**

**COMITÉ TUTOR:
DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ
DRA. VICTORIA CHAGOYA DE SÁNCHEZ**

MÉXICO, D.F.

JUNIO DE 2010



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/161/10

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **9 de noviembre de 2009**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **MENIETA CONDADO EDGAR RUBEN** con número de cuenta **95569750** con la tesis titulada: **“Efecto de la adenosina sobre la progresión del ciclo celular, durante la regeneración hepática inducida por hepatectomía parcial”**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. ROLANDO HERNANDEZ MUÑOZ**:

Presidente:	DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
Vocal:	DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA
Vocal:	DR. MAURICIO DIAZ MUÑOZ
Vocal:	DRA. MARINA MACIAS SILVA
Secretario:	DR. ROLANDO HERNANDEZ MUÑOZ
Suplente:	DR. RENE DE JESUS CARDENAS VAZQUEZ
Suplente:	DRA. VICTORIA CHAGOYA DE SANCHEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.



Atentamente
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cd. Universitaria, D.F. a 7 de abril de 2010.

JNF
Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

The liver has always been an important symbol in occult physiology. As the largest organ, the one containing the most blood, it was regarded as the darkest, least penetrable part of man's innards. Thus it was considered to contain the secret of fate and was used for fortunetelling. In Plato, and in later physiology, the liver represented the darkest passions, particularly the bloody, smoky ones of wrath, jealousy, and greed which drive men to action. Thus the liver meant the impulsive attachment to life itself.

James Hillman



Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Bioilógicas UNAM. Por todo el apoyo prestado en la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado durante el período 2003-2 a 2008-1, a través de su sistema de becas nacionales para realizar estudios de posgrado, becario #176720.

Al Dr. Rolando Hernández Muñoz, quien a lo largo de más de una década trato pacientemente de enseñarme un poco de Bioquímica. Ahora que nuestros caminos se separan, solo queda externarle mi profundo agradecimiento por su amistad, por sus consejos, y sobre todo por haberme guiado durante todo este tiempo.

A todos mis compañeros del instituto, tanto pasados como presentes, pues se convirtieron en una segunda familia, gracias por toda su ayuda, por sus consejos, pero en especial por su amistad, especialmente a Alain Macedo, Salvador Sánchez, Serafín Ramírez, Marisela Olguín, Lourdes Sánchez, Juan Antonio Suarez, Cristina Trejo, Alejandro Padilla.

A Julio Cesar Saldaña y Mariana Pichardo. Gracias por haberme dejado guiar sus primeros esfuerzos en el laboratorio

Al departamento de Ciencias de la Vida de Bio-Rad México, por todas las facilidades prestadas para la culminación de esta etapa de mi vida, en especial quiero agradecer a Ruth Guerrero y Octavio Zendejas por el voto de confianza.

A todos y cada uno de los integrantes del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Pues no solo fue mi centro de trabajo durante la última década. Este lugar se convirtió en mi hogar con todo lo que ello implica. Aquí reí, jugué, ame, llore y trabaje... y más allá de las actividades diarias, es el lugar que me permitió sacar lo mejor de mí, de convertir los fracasos en éxitos y de convertir las ideas en hechos. Es el lugar donde me fue permitido transformar uno de los sueños más ambiciosos que he tenido, en una realidad tangible. Esta magia no se encuentra inmersa en los ladrillos y cristales, sino en la gente que lo habita y lo llena con aquella extraña sustancia, que describimos como Ciencia, pero que en realidad es la sustancia que nutre los sueños: la imaginación.

Dedicatorias

A la Asociación "**Somos Tres... Una familia feliz.**" Especialmente a una criatura fantástica, a la cual tengo el orgullo de cargar en mis brazos... Gracias Mariana Paola, por ser el bebe más perfecto que jamás pude imaginar. Ser tu padre fue la realización de un sueño que me fue concedido con creces. Te agradezco mucho que me hayas permitido robarte todos esos meses, días y horas de tu infancia, para poder realidad este otro sueño...

A Patricia, por todo el apoyo incondicional que sólo el amor puede lograr. Por ser mi compañera de vida, pero sobre todo por la paciencia y por tu cariño de siempre. *Ellen sila lumen omentielmo*

A Jorge, Angélica, Jorge Eduardo, Papá y Mamá. Sólo me queda expresarles mi más profundo agradecimiento, por que sin su apoyo no hubiera logrado nada, sin sus consejos, sin sus regaños... sin su cariño. Gracias por acompañarme durante buena parte de esta jornada y vigilar mis primeros viajes solo.

Índice

Índice	6
Abreviaturas	7
Índice de Figuras	8
Resumen	9
Abstract	11
Introducción	
1. <i>El Hígado y sus Funciones</i>	12
2. <i>La regulación de la regeneración hepática</i>	15
3. <i>Regulación del ciclo celular de mamíferos</i>	21
4. <i>El metabolismo de la Adenosina</i>	27
5. <i>Antecedentes</i>	31
<i>Hipótesis</i>	34
<i>Objetivos</i>	35
<i>Metodología</i>	
<i>Proceso quirúrgico</i>	36
<i>Análisis histológico</i>	37
<i>Fraccionamiento subcelular</i>	38
<i>Obtención de núcleos</i>	38
<i>Determinación de la actividad de TK</i>	39
<i>Western Blot</i>	39
Resultados	
<i>Efecto Dosis-Respuesta sobre la proliferación</i>	41
<i>Efecto de la adenosina sobre el ciclo celular</i>	45
<i>Efecto de la adenosina sobre el punto de control Rb</i>	47
<i>Efecto de la hepatectomía parcial y tratamiento con adenosina sobre el HGF, HGFA su correspondiente proteasa activadora y c-Met, su receptor específico.</i>	49
<i>Efecto de la HP y el tratamiento con adenosina sobre la expresión de los protooncogenes c-myc, c-fos y c-jun.</i>	49
<i>Efecto de la HP y el tratamiento con adenosina sobre la expresión de los receptores de adenosina.</i>	51
<i>Discusión y conclusiones</i>	52
<i>Perspectivas</i>	58
<i>Apendice A</i>	61
<i>Apendice B</i>	62
<i>Referencias</i>	63

Abreviaturas

Ado	Adenosina
Cdk	Cinasa dependiente de ciclinas
ECM	Matriz extracelular
EGF	Factor de crecimiento epidermal
HGF	Factor de crecimiento hepático
HGFLA	Proteasa activadora del HGF
HP	Hepatectomía parcial
i.p.	Intraperitoneal
IL-6	Interleucina 6
I κ B	Inhibidor kappa B
GdCl ₃	Cloruro de gadolinio
mg/kg p corp.	Miligramo por kilogramo de peso corporal
MPF	Factor promotor de la mitosis
NF- κ B	Factor Nuclear kappa B
PBS	Amortiguador de fosfatos
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
STAT	Proteína transductora y activadora de la señal de transcripción.
TGF- α	Factor de crecimiento transformante alfa
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TK	Timidina cinasa
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral
TOC/ADAM17	Proteasa activadora del TNF- α
VEGF	Factor de crecimiento endotelio vascular
WB	Western blot

Índice de Figuras

1. El hígado	12
2. Esquema de la función hepática	15
3. Células hepáticas	20
4. Esquema del ciclo celular	21
5. Estructura de la adenosina	27
6. Gráfica de Antecedentes	32
7. Tabla resumen de antecedentes	33
8. Procedimiento Quirúrgico	35
9. Tabla 1 de resultados	41
10. Figura 1 de resultados	42
11. Micrografía de mitosis	43
12. Figura de parámetros proliferativos	44
13. Figura WB de ciclinas	46
14. Figura WB de pRb	48
15. Figura WB de HGF	50
16. Figura WB de protooncogenes	52
17. Figura WB de receptores de Ado	53

Resumen

El ciclo celular de los mamíferos es un proceso altamente regulado donde se sincroniza la proliferación de un tipo celular o tejido. El caso del hígado es especial, debido a que es capaz de regenerarse, de forma posterior a un daño (ya sea químico o mecánico). El modelo de hepatectomía parcial ha sido de especial utilidad ya que la respuesta proliferativa es proporcional a la masa de tejido seccionado, de tal forma que existen al menos dos umbrales de estimulación en el modelo: una estimulación baja en la resección de un tercio de la masa hepática y una respuesta alta en la resección de dos tercios. Establecer esta diferencia es fundamental, ya que podemos utilizar como herramienta cualquiera de estas dos respuestas, para probar farmacológicamente sustancias potencialmente inhibitoras ó estimuladoras de la proliferación.

El hígado al recibir un daño toxico, presenta una disminución en sus niveles energéticos (ATP), así como en la concentración de adenosina. Por lo cual en un razonamiento inicial, se pensó que el daño causado por un agente hepatotóxico podría ser revertido por la administración exógena de adenosina. Uno de los hepatotóxicos más ampliamente caracterizado es el CCl_4 , cuya administración crónica es utilizada para inducir la cirrosis experimental en ratas, por lo cual este modelo fue utilizado por el laboratorio para determinar los efectos de la adenosina en la respuesta hepática de un hígado dañado. Dentro de los primeros hallazgos se encontró que la adenosina promueve la degradación de la matriz extracelular, así como la normalización del estado redox y fundamentalmente eleva los parámetros proliferativos. Sin embargo debido a que las ventanas temporales del modelo son demasiado largas, se decidió probar los efectos de la adenosina sobre los animales hepatectomizados removiendo un tercio de la masa hepática, de tal forma que se estableciera si el nucleósido tiene algún efecto directo sobre la proliferación celular o si los resultados anteriores son debidos a una retroalimentación positiva en respuesta a la degradación de colágena.

La administración de adenosina inmediatamente posterior a la hepatectomia parcial de un tercio, aumenta el número de mitosis a las 24 horas post-cirugía en más de tres veces sobre el grupo no tratado, incrementa la tasa de síntesis de DNA y activa de forma

temprana la secuencia de expresión de las ciclinas que regulan el proceso proliferativo. De esta misma forma, el nucleósido consigue aumentar, incluso en los grupos controles la expresión tanto sérica como en el tejido, del factor de crecimiento hepático (HGF). Por otro lado, los factores transcripcionales como pRb, E2F-1, E2F-3, DP-1 expresados en núcleo durante el proceso proliferativo, modifican su temporalidad de expresión por el tratamiento con adenosina. De la misma forma, el protooncogen y factor transcripcional c-myc, se eleva dentro de los primeros minutos posteriores a la cirugía, por acción del nucleósido hasta 5 veces sobre el grupo sin tratamiento. Estos cambios vistos a nivel global nos dirigen a establecer que el profundo cambio visto en la expresión de ciclinas, y en el aumento proliferativo por acción de la adenosina es posiblemente mediado por c-myc y los miembros de la familia E2F. Así mismo, podemos concluir que el nucleósido potencia la regeneración del tejido hepático ante un daño menor o igual al 30% de la masa hepática, por lo cual las implicaciones terapéuticas potenciales son diversas.

Abstract

Eukaryotic Cells have a well orchestrated cell cycle, not entirely known and understood. The liver regeneration is a phenomenon that seems to evoke the proliferation of perfectly differentiated cells, no matter its role at the time of the stimulus. The key of this plasticity seems to be the capability of hepatocytes to minimize their hepatic functions and start as soon as stimulus is given, the replicative responses. We have shown that adenosine administration is capable of reversing fibrosis in the carbon tetrachloride-induced rat cirrhotic liver, stimulating the proliferative potential of the cirrhotic liver. In order to characterize adenosine actions on liver cellular proliferation, we used rats subjected to one-third partial hepatectomy (PH). In PH-animals and acutely administered with adenosine (25 to 200 mg/kg b.w.), some parameters indicative of cell proliferation were determined. In addition, the levels of hepatocyte (HGF), epidermal (EGF) and transforming (TGF- β) growth factors, cyclins, members of the E2F family, protooncogenes, and adenosine-receptors were determined through Western blot analyses.

Adenosine (100 mg/kg b.w.) promoted earlier and significantly enhanced liver cell proliferation as assessed by the levels of PCNA, nuclear Ki-67 antigen, those for cyclins (D1, E, A, B1), and the mitotic index. These effects were also accompanied for a longlasting increase of serum and liver levels of HGF, liver expression of c-met and of HGF activator (HGFLA). Adenosine effects on cell proliferation could be mediated by an early increase in E2F-1 and by that of c-myc, despite phosphorylation of the Rb protein and expression of E2F-3 were decreased. Moreover, the hepatic number of receptors for adenosine were not significantly changed by PH and/or adenosine treatment. In conclusion, data suggest that adenosine actions can accelerate and increase proliferation in a "primed" liver, mainly through enhancing the levels of c-myc, E2F family, cell cycle cyclins, and HGF expression. Therefore, these pharmacological adenosine effects suggest a modulating role for the nucleoside on mitogenic events, once the liver has been induced to proliferate.

Introducción

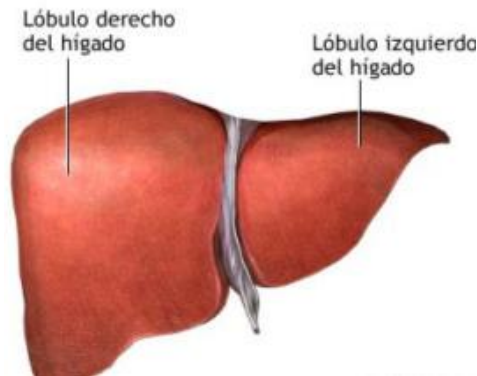


Fig. 1. Representación gráfica del hígado humano.

1. El Hígado y sus Funciones

El estudio de los procesos digestivos comprende un amplio panorama que se extiende a través de los diferentes taxones, y engloba la evolución de un conjunto de estructuras especializadas en la captación, digestión, procesamiento y distribución de nutrientes, las cuales presentan una dependencia del medio ambiente y del nicho ecológico particular de cada especie. Esta divergencia funcional resultó en una gran diversidad de variantes morfológicas, y así también dio origen a estrategias bien conservadas a todo lo largo de la cadena evolutiva, como es la aparición de glándulas auxiliares de la digestión. El prototipo de este tipo de glándulas puede ilustrarse con el hepato-páncreas, que aparece por primera vez en el *phylum arthropoda*, y se conserva a lo largo de los representantes actuales. Esta glándula se especializó evolutivamente en la secreción de enzimas digestivas y hormonas para el procesamiento y almacenamiento de glucosa y detoxificación de xenobioticos. (Moyes C.D., 2007, Barnes R., 1996).

La plasticidad alimenticia que brinda la adquisición de un sistema digestivo glandular se consolida con el *subphylum vertebrata*, donde se separan las funciones del hepato-páncreas en dos órganos separados. El hígado por su parte, se presenta como una

glándula digestiva común a todos los vertebrados. Su origen morfológico más primitivo, es el divertículo hepático encontrado en el pez lanceta *amphyocho* (*phylum cephalochordata*), el cual a pesar de mantener ciertas similitudes no es homólogo funcionalmente al hígado de los vertebrados (Kardog K., 1999; Withers P.C., 1992). Dentro de la clase *mammalia*, el hígado se sitúa anatómicamente como el primer órgano en contacto con la sangre después de su exposición con el intestino, formando el primer punto de la circulación esplénica, lo cual permite la participación del órgano en el proceso de absorción, procesamiento y distribución de la mayor parte de las sustancias que se ingieren a través del tracto digestivo –ver tabla 1 para un resumen de las funciones hepáticas– (Greger R., 1996; Arias, 1996; Druker R., 2006).

Dentro de sus funciones principales se encuentra la absorción, síntesis y secreción de varias sustancias relacionadas con el procesamiento de nutrientes y detoxificación de xenobióticos. Durante el desarrollo embrionario, el hígado aparece como una evaginación ventral, formando un divertículo de la base del primordio del tubo digestivo que crece hacia fuera del mesénquima circundante, el cual induce al endodermo del divertículo a proliferar y diferenciarse en hepatocitos (Kardog K., 1999). Una vez que se ha alcanzado un cierto desarrollo, el divertículo entra en contacto con las venas vitelinas para formar los sinusoides hepáticos —*vasos situados en los espacios existentes entre las láminas unicelulares de los hepatocitos. Ver Esquema 1*—. La unidad mínima funcional del hígado consiste en el lobulillo hepático, el cual se define como la zona del parénquima situada entre dos venas centrilobulares, en cuyo eje central existe un espacio porta que contiene la vena porta terminal, un vaso arterial y conductos biliares pequeños, por donde se vierte la secreción biliar. (Druker R., 2005). Los diferentes tipos celulares están arreglados en forma de columnas que se ramifican, formando una interconexión a través de sinusoides o capilares. Estos sinusoides carecen de membrana basal verdadera y es donde se lleva a cabo el intercambio de metabolitos entre la sangre y la célula hepática; a través del espacio de Disse, que separa la pared endotelial del hepatocito (Greger R., 1996; Kershenovich D., en Druker R., 2005). Dentro del espacio de Disse se estructura la matriz extracelular del órgano, cuyos componentes principales son la colágena tipo I,II, IV, V, VI y VIII, así como fibronectina, laminina y varios tipos de proteoglicanos. (Greger R., 1996). Cuando existe una muerte masiva del parénquima, es en estos espacios donde se acumula la fibra compuesta principalmente de colágena tipo I y III, en respuesta a los estímulos

fibrogénicos y a una serie de alteraciones que tienen como consecuencia el deterioro de la circulación portal, y la pérdida de la funcionalidad hepática. (Armendáriz, 1990).

El hígado presenta un gradiente de concentración de O_2 y nutrientes, que va de la zona más concentrada (periportal) a la más reducida (perivenosa). A lo largo de este gradiente, se distinguen tres zonas metabólicas, donde el equipamiento enzimático y las reacciones de transformación de xenobióticos y la producción de factores de crecimiento es distinta. En general, se distingue como la zona I al espacio **periportal** y es el sitio de procesos oxidativos, glucogénesis, β -oxidación, síntesis de colesterol y secreción de ácidos grasos. La zona III corresponde al espacio **peri venoso**, y es donde se lleva a cabo la glucólisis, lipogénesis y metabolismo de xenobióticos. La morfología del hepatocito en esta zona presenta núcleos más grandes así como retículo endoplásmico más abundante. La zona II no tiene una división tan clara y presenta reacciones de ambas zonas (Vidal-Vanaclocha, 1996).

El hígado presenta una heterogeneidad celular donde predomina la célula parenquimal o hepatocito con cerca de un 65% de la población, seguido de las células de Kupffer y células endoteliales que conforman aproximadamente un 10% del total, además de las Células de Ito, o estelares y la célula del ducto biliar, que representan alrededor del 5% de la población. Con un número semejante, se encuentra presente un tipo especial de linfocito granuloso – una célula *Natural Killer activada*— llamado célula Pit, con funciones de defensa contra infecciones virales y de células tumorales metastásicas. (Greger R., 1996; Kershenobich D., en Druker R., 2005; Vidal-Vanaclocha, 1996). Por último, recientemente se ha descrito un tipo de célula indiferenciada llamada célula oval, cuya población aumenta en casos de infecciones crónicas por virus de hepatitis C y hepatocarcinomas. Esta es una célula troncal que puede diferenciarse a hepatocitos y/o células del ducto biliar en condiciones de daño masivo crónico (Strick-Marchand, 2004); sin embargo, su papel dentro de la regeneración del órgano esta sujeto a discusión, debido a que su presencia se encuentra asociada a la formación de tumores hepáticos. (Knight B., 2005).

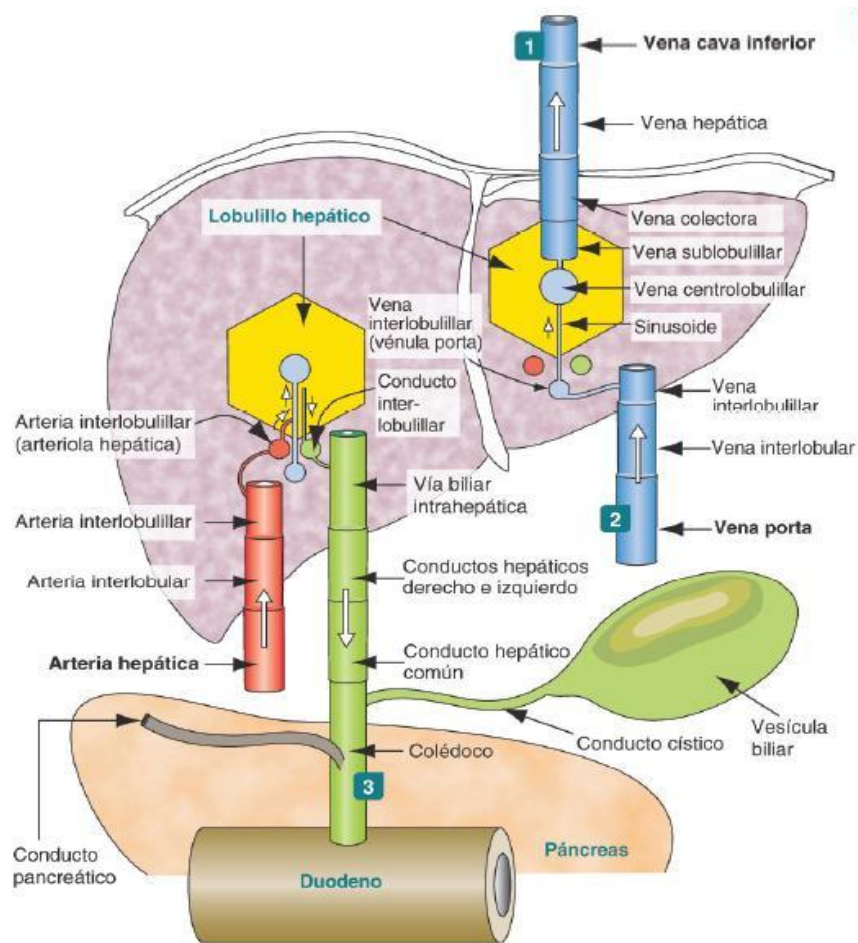


Fig 2. Ubicación del hígado y relaciones anatómicas mas cercanas. Tomado de Sobotta, (2009), Atlas de Anatomía, Editorial Panamericana.

2. La regulación de la regeneración hepática

Uno de los aspectos más fascinantes de la naturaleza, es la capacidad de un organismo de restituir las partes perdidas o dañadas. Los ejemplos más sorprendentes han sido descritos en la *clase amphibia*, donde los anuros y urodelos pueden regenerar varios órganos internos, e incluso ojos y apéndices. En este caso, el proceso es altamente regulado y aunque se sabe que involucra la participación de células pluri potenciales, aun no se conocen todos sus componentes, ni el mecanismo exacto que lo inicia, sin embargo se ha considerado a la disminución en la resistencia eléctrica y la activación por trombina, como los principales mecanismos involucrados, en el modelo de amputación de extremidades en la salamandra. La activación por trombina ocurre dentro de los primeros eventos después del daño y se relaciona con la formación del coagulo de fibrina. Además, de que la activación del HGF y el $TNF-\alpha$ que han sido señalados como parte importante

del sistema regenerativo, requieren un procesamiento por proteasas parecidas a la trombina. (Brockes J.P., 2008)

Para el caso de los mamíferos adultos, sólo se ha descrito una regeneración eficiente en hueso, piel y mucosas, donde se sabe que los mecanismos celulares también involucran la diferenciación de varios tipos celulares que parten de un origen común. Pueden diferenciarse en respuesta a los gradientes de factores de crecimiento, expresión secuencial de factores transcripcionales, de integrinas, entre otros muchos aspectos.

El hígado, a diferencia del resto de los órganos internos posee la capacidad de restaurar una pérdida de hasta el 70% de la masa hepática de forma exacta y precisa. Durante este proceso, la respuesta proliferativa no excluye las funciones hepáticas, por lo cual existe una evidente alteración de las mismas, en los primeros días posteriores al daño tisular agudo. Como consecuencia del proceso, las alteraciones hepáticas producidas en respuesta al daño pueden dividirse en tres partes: las señales que inducen la proliferación de las células hepáticas, los mecanismos emergentes para mantener las funciones del hígado a un nivel mínimo de sobrevivencia, y los mecanismos de apoptosis efectuados por las células incapaces de proliferar o mantener la sobrecarga metabólica en consecuencia a un mayor aporte del flujo sanguíneo. En conjunto, la regeneración hepática presenta una red de señalización bastante compleja, que aun no ha terminado de estudiarse, y aunque estamos lejos de poder manipularla, existen al momento varios modelos de aproximación experimental, donde es posible diseccionar los eventos más importantes, (White P., 2004).

El hepatocito tiene una vida media aproximada de 150 días y su recambio en el hígado normal suele ser de 1 por cada 10,000 células (Michaelopoulos, 1997; Fausto N, 2000; Taub R, 1996). Sin embargo en respuesta a un daño químico o quirúrgico, estas células entran en proliferación activa para reparar la masa perdida en un lapso de aproximadamente 14 días. (Michaelopoulos, 1997). El modelo de regeneración hepática inducido por hepatectomía parcial –ver figura 2—, desde su introducción experimental por Higgins y Anderson en 1931, ha constituido uno de los mejores modelos de estudio de la proliferación celular *in vivo*. El nivel de resección más ampliamente utilizado consiste en la ligadura y extirpación del lóbulo central e izquierdo del hígado, consistentes en 2/3 (67%

± 2.5) de la masa hepática total, obteniendo una respuesta proliferativa sincronizada, que ha sido ampliamente caracterizada (Michaelopoulos G., 1997; Malcom Alison, 1986). Minutos después de la hepatectomía, se induce un aumento en la presión portal hepática, que da por resultado la transducción de un factor o factores –que hasta el momento se mantiene elusivo–, que inicia un periodo de sincronización de los hepatocitos siendo posible que aproximadamente el 60% del total de las células parenquimatosas entren en mitosis (J. Myren, 1989). Así mismo, dentro del hepatocito se ven cambios en la hiperpolarización de la membrana, flujo de iones y cambios en el pH intracelular, que junto con la subsecuente activación de varios grupos de genes, permiten la salida del estado quiescente y la entrada al ciclo celular (Ankoma Sey V., 1999).

La sincronización de la regeneración hepática puede dividirse en una fase de **inducción** que dura pocos minutos, una fase de **inicio** que normalmente dura 2 horas, una fase de **crecimiento** que va desde las 6-48 horas, y una fase de **término** de la proliferación, que inicia claramente después de las 96 horas (Ankoma Sey V., 1999; Nelson F., 2006). En los 7 a 10 días posteriores a la cirugía, se recupera la masa hepática original, sin embargo el hígado recupera cerca del 70% de la masa pérdida durante los primeros 3 días posteriores a la cirugía, para tener aumentos subsecuentes del 5% hasta completar su masa original (Nelson F., 2006; Webber E., 1993). Seguido a la división de los hepatocitos, el resto de las células no parenquimales comienzan su proliferación 20-24h más tarde. La célula de Kupffer alcanza un pico de la respuesta proliferativa entre 48-72 h., después de la cirugía. Su papel dentro del proceso regenerativos es bifásico, ya que puede sintetizar tanto citocinas pro-proliferativas (TNF- α e IL-6), así como antiproliferativas (TGF- β e IL-1); así mismo, cuando su población se elimina del hígado – con la administración de GdCl₃– en forma previa a la hepatectomía, el proceso regenerativo parece potenciarse (Rai R.M., et.al.,1996). La célula sinusoidal-epitelial, alcanza su división hacia las 96 horas de la cirugía. Este tipo celular secreta tanto el VEGF, como angiopoietina, que al parecer solo afecta al endotelio y no tienen efecto sobre la proliferación del parénquima. (Malik R., 2002). Por otro lado, la célula estelar alcanza un pico de proliferación a las 48 horas de la hepatectomía, teniendo un papel determinante dentro del proceso, ya que secreta tanto el HGF como el TGF- α de forma parácrina, así mismo secreta IL-6 y expresa sus receptores, lo cual sugiere un mecanismo de regulación autocrino por esta molécula (Malik R., 2002).

El primer evento dentro de la fase de inducción es la *preparación* o sensibilización de los hepatocitos para responder a los factores de crecimiento verdaderos y pasar del estado quiescente al estado replicativo (G_0 a G_1). Este proceso es mediado principalmente por el (**TNF- α**) el cual se expresa como una proteína transmembranal de 26 kd, que al ser activada proteolíticamente por la proteína TOC/ADAM17, produce una forma soluble de 17 kd. El TNF- α es una citocina multifuncional, que puede causar muerte celular por necrosis o apoptosis y está involucrado en la proliferación celular, diferenciación, inflamación, tumorigénesis etc. La señalización del TNF- α , se da a través de sus receptores TNFR1 (p55) o TNFR2 (p75) (Joyce D., 2001; James L., 2005), los cuales son glicoproteínas transmembranales cuya porción extracelular comparten un 28% de homología y ambas contienen 4 tándem de dominios de cisteínas repetidas. Así mismo, contienen en su región externa un dominio PLAD, que pre acompleja a los receptores y los prepara para la unión con su ligando y posterior trimerización. El TNFR-1, contiene un dominio de 80 aminoácidos en su región carboxilo terminal, conocido como dominio de muerte (DD), el cual en condiciones normales se encuentra unido a una molécula silenciadora (SODD), que impide que otras proteínas de andamiaje se unan a esa porción del receptor y promuevan la vía apoptótica (Knight B., Yeoh G., 2005). La inhibición de este factor o la inactivación de su receptor TNFR1, produce defectos en la regeneración y aumenta la mortalidad después de la hepatectomía parcial, lo cual está asociado con una reducción de la actividad de la vía JNK. El cloruro de gadolinio $GdCl_3$, es tóxico para las células de Kupffer y se administra como estrategia experimental para eliminar esta población celular en el hígado— aumenta los niveles de TNF- α , así como la inducción de IL-6, el protooncogen c-jun, y los factores transcripcionales C/EBP β C/EBP δ y AP-1. (Moshage H., 2003). En ratones con deficiencia en TNFR1, la síntesis de DNA inducida por la regeneración hepática se encuentra visiblemente truncada, así como la expresión de STAT3 y de NF- κ B. Si a estos animales se les administra IL-6 de forma exógena, se corrigen estas deficiencias, lo cual sugiere fuertemente que el papel del TNF- α , es el regular la secreción de IL-6 durante la regeneración hepática. Por otro lado, se ha comprobado que este mecanismo involucra la activación de NF- κ B y C/EBP β en la célula de Kupffer (Yang L., 2005). Los niveles de la IL-6 se elevan rápidamente en el plasma después de la hepatectomía parcial, alcanzando un pico a las 24 horas (Narci Teoh, 2004).

La IL-6 se une a la cadena α de su receptor, en el hepatocito (gp80), lo cual causa la dimerización de la proteína gp130 asociada a él, y la consecuente activación de JAK1, lo que hace que fosforile a los residuos de tirosina de gp130 y a STAT3, con lo cual esta molécula se trasloca al núcleo y activa la transcripción de sus genes blanco (Francavilla A., 1997). Por otro lado JAK1 es capaz de activar las proteínas reclutadoras Gbr2-SOS mediante sus dominios SH2, con lo cual se activa Ras, Raf y de la cascada de MAPK cinasas hasta la activación de ERK 1/2 que fosforila el complejo AP-1 y permite su traslocación al núcleo. (Zimmers T., 2003). Entre ambas rutas se produce la activación de aproximadamente un 36% de los genes de respuesta temprana y el cambio de fase G_0 - G_1 —ver figura 3— (Taub R., 2004). La combinación de **TNF- α** e IL-6 induce la expresión de Oxido Nítrico Sintetasa (iNOS). La producción de oxido nítrico (NO) es importante debido a que su inhibición decreta la proliferación de los hepatocitos y los knockout en iNOS presentan una regeneración defectuosa después de la hepatectomía, que va acompañada de apoptosis y necrosis (García Trevijano, 2005). Por otro lado, la liberación tanto de TNF- α como de IL-6 por parte de la célula de Kupffer, dependen de la activación de los componentes del complemento C3 y C5, como se demuestra en los animales knockout (Strey CW, 2003), donde además se demuestra que C3 y C5 ejercen un efecto cooperativo durante la regeneración hepática, tanto en la liberación de citocinas, como en la expresión normal de NF- κ B y STAT-3.

Los procesos anteriores activan la expresión de los verdaderos mitógenos como el Factor de Crecimiento Hepático (**HGF**), el Factor de Crecimiento Transformante alfa (**TGF- α**), el Factor de Crecimiento Epidermal **EGF**, y los Factores de Crecimiento Semejantes a Insulina (**IGF-I e IGF-II**) así como de sus receptores c- met y EGFR (Michaelopoulos G., 1997; Nelson F., 2005). El inicio de la fase G_1 se da aproximadamente entre 1 y 2 horas después de la cirugía. La señalización a través del receptor para HGF; c-met, activa la vía de MAPK cinasas, que conlleva a la traslocación de Erk 1/2 al núcleo y a la activación de la expresión de la ciclina D, cuyo complejo formado con cdk4 y cdk6 fosforila una batería de factores que permiten superar el punto de restricción del ciclo celular (R), -a partir del cual la progresión se vuelve irreversible— y llevar a cabo la progresión G_1 -S. La IL-6 ha probado ser capaz por sí sola de provocar una hiperplasia en ausencia de daño hepático, activando la vía de JAKs y consecuentemente induciendo la expresión de STAT3, por lo

cual su papel en este modelo quizás sea más amplio (Zimmers T., 2003). Así mismo los animales knock-out han demostrado que la IL-6 es necesaria para la activación de STAT-3, NF- kappa B y para tener una síntesis de DNA eficiente, después de un estímulo de daño hepático. Es importante señalar que el TGF- α ha mostrado ser prescindible en la HP y su papel puede ser asumido por el EGF debido a que comparten el mismo receptor (Black D., 2004; Arthur Zimmermann, 2002). El pico de síntesis de DNA se da a las 24h, seguido de una oleada de células en mitosis que va de la región perivenosa a la centrilobular y que comienza a las 32 horas de la cirugía, alcanzando su nivel máximo a las 48 horas. La actividad de la timidina cinasa (TK) – que es el paso limitante en la serie de fosforilaciones de timidina que permiten su incorporación al DNA en forma de nucleótido trifosfato —, tiene un pico máximo a las 24h de la cirugía, cuyo valor máximo es de 20 veces sobre el control, así mismo se aprecia una elevación en el índice mitótico desde las 24 horas PH y se llega al pico máximo a 48 horas de la cirugía, para bajar hacia las 72 horas. El valor máximo alcanzado en hepatectomía del 70% es de alrededor de 16-20 mitosis/campo. Se estima que aproximadamente 1000 células son reclutadas para tener dos rondas de mitosis aproximadamente (Nelson, 2006) .

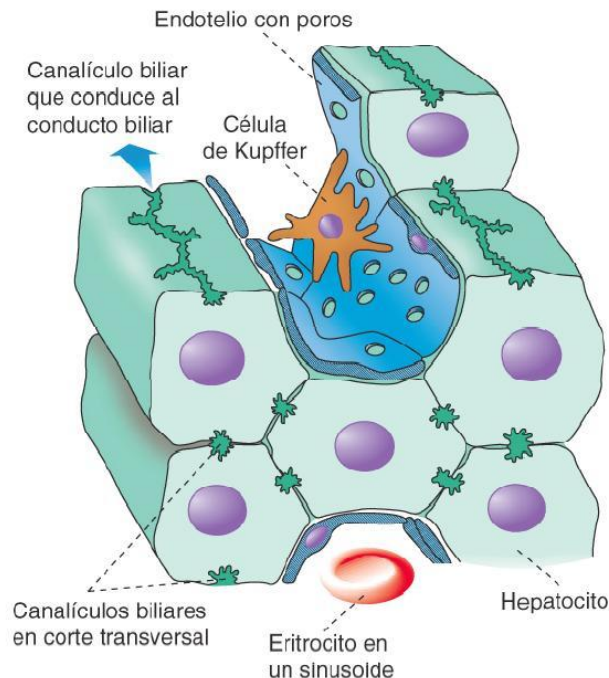


Fig 3. Composición celular del tejido hepático. Tomado de Sobotta, (2009), *Atlas de Anatomía*, Editorial Panamericana. El tejido hepático se compone principalmente de las células del parénquima, representados por los hepatocitos, que forman un arreglo columnar a lo largo de todo el tejido.

Regulación de la regeneración hepática

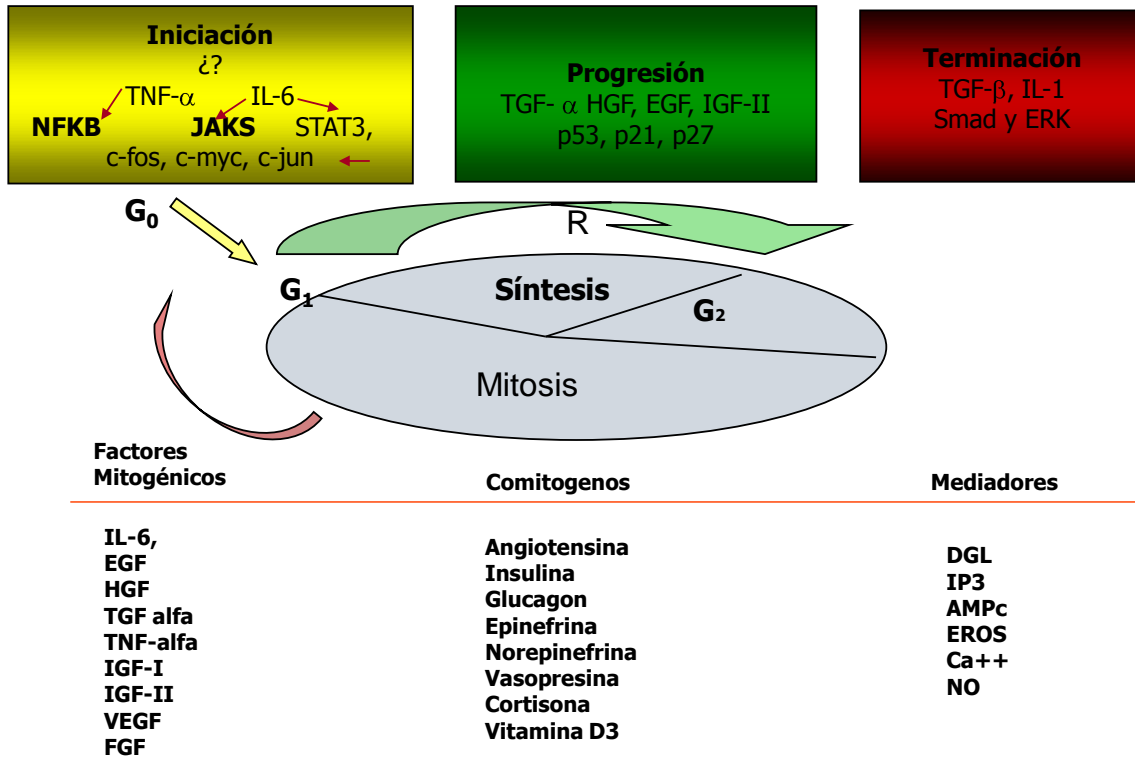


Fig. 4. Panorama general de la regeneración hepática (modificado de [Ankoma-Sey V., 1999](#)). El proceso regenerativo hepático, puede ser dividido en tres grandes etapas, la iniciación, la progresión y la terminación. Los factores de crecimiento, citocinas y mitógenos cambian marcadamente en cada una de ellas, dirigiendo la progresión del ciclo celular. Durante este proceso, podemos dividir a las sustancias que actúan como mitógenos, que son los factores que estimulan la activación de la proliferación, los comitogénicos, que no pueden producir este efecto directamente, pero que su presencia es necesaria para que se inicie el proceso, y los mediadores, que son los mensajeros que actúan amplificando la señal mitogénica.

3. Regulación del ciclo celular de mamíferos

El ciclo celular está regulado por proteínas maestras que forman heterodímeros, las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (cdks) y su subunidad reguladora, las ciclinas. La asociación de compañeros adecuados (cdk-ciclina) permite que estas proteínas cinasas se activen de forma secuencial y el ciclo celular avance a través de cada una de sus etapas ([Alberts B., 1994](#)).

El ciclo celular es un proceso extremadamente regulado donde se lleva a cabo una gran cantidad de eventos moleculares que tienen como finalidad la duplicación y

segregación del material genético en dos células idénticas (Darnell J., 2000). El ciclo celular se divide en cuatro fases: Gap-1, Síntesis, Gap-2 y Mitosis. En la fase Gap-1 (**G₁**) la célula se encarga de producir todo el material necesario para la síntesis del DNA. En la fase de síntesis (S), la célula se encarga de duplicar todo el material genético; mientras que la fase G₂, se encarga de revisar que la duplicación de los cromosomas se haya realizado de forma completa y con la mayor fidelidad posible. Durante la mitosis se duplican y se segregan los cromosomas adecuadamente en las dos células hijas. Este proceso está regulado por proteínas maestras heterodiméricas; que tienen dos componentes, la subunidad catalítica, proteínas cinasas dependientes de ciclinas (cdks) y la subunidad reguladora: las ciclinas. La asociación de compañeros específicos (cdk-ciclina) permite que el ciclo celular avance en cada una de sus etapas.

En el hígado, la señalización a través de los mitógenos, modifica el perfil de expresión génica en cuestión de horas después de la hepatectomía, dirigiendo todo el proceso a un objetivo primario: la proliferación. La expresión de ciclina D1 y la formación de los complejos ciclina D/cdk4,6 es el primer paso secuencial de este mecanismo ya que el resto de las ciclinas no son regulables por mitógenos ni por las condiciones externas de la células (Alberts, 1994). Dentro de los blancos más importantes de este complejo ciclina-cinasa se encuentra la fosforilación de pRb. La fosforilación de pRb permite la disociación de un potente factor transcripcional que se encuentra unido a pRb en su estado hipofosforilado: **E2F** el cual al liberarse se une al promotor del gen de la ciclina E. La expresión de esta ciclina y la formación del complejo ciclina E/cdk2, termina de fosforilar a pRb y lo pasa a su estado hiperfosforilado, con lo cual se libera el resto de E2F y este último, al unirse a sus múltiples genes blanco, permite la progresión del ciclo de G₁ a S. En la fase S, la acción de E2F activa el gen de la ciclina A, y ésta al acomplejarse con cdk2, fosforila a E2F, lo cual hace que este factor se disocie del DNA y se inactive. Cuando se introduce E2F en células quiescentes, este factor es capaz de llevarlas a la fase S por los mecanismos mencionados, sin embargo la sobreexpresión de este factor o la prevención de su inactivación —ya sea sobreexpresando una forma mutante de E2F que no tiene el sitios de fosforilación o inhibiendo específicamente la actividad del complejo ciclina A/cdk2— lleva a las células a apoptosis por ambas vías dependiente e independiente de p53, una vez que han superado la fase S (Lees J., 1999).

El principal punto de regulación de la fase G_1 del hepatocito, esta gobernado por la interacción entre estas dos familias de proteínas: E2F y la familia 'pocket'. En la primera de ellas se han identificado ocho miembros, los cuales se unen directamente al DNA y regulan la expresión de varios genes involucrados en la progresión del ciclo celular de G_1 a S: E2F1, E2F2 y E2F3a funcionan como activadores, mientras E2F3b, E2F4, E2F5, E2F 6 y E2F 7 son represores (Stanelle J.,2006). E2F3a y E2F3b son codificados por un solo locus a través del uso de diferentes promotores y exones 5' codificantes (Leone., 2000) Estas proteínas comparten los dominios de unión al DNA y la región de unión a las proteínas pocket, pero tienen distinta región amino terminal. En el hígado los principales reguladores son E2F-1 y E2F-3. Dentro de los blancos principales de este factor se encuentran el gen para la ciclina A, Ciclina E, CDC25A, PCNA, MCM5 MCM7 y c- myc. Por otro lado la **familia pocket** incluye a pRb y sus proteínas relacionadas p107 y p130, las cuales se encuentran unidas en condiciones normales a los miembros de E2F mediante el 'domino pocket'.

El control en G_1/S es suficiente para detener la progresión del ciclo o promoverlo del estado quiescente, por lo cual es uno de los puntos conocidos como *check points* del ciclo celular, y es uno de los mecanismos oncogénicos que utilizan las proteínas E1 y E7 del virus del papiloma humano. En el caso de las células epiteliales, cuando las células se desprenden de la matriz y se pierde la comunicación a través de la integrina $\beta 1$, éstas se arrestan en G_1 justo con la pérdida de actividad del complejo ciclina E/cdk2 y ciclina D1/cdk4,6 mediante la desfosforilación de pRb (Mark Day, 1997) lo cual conlleva a encender el programa apoptótico. Por otro lado, células tumorales de origen epitelial en presencia de anti-neoplásicos como vincristina, que induce apoptosis, expresan la integrina $\beta 1$, pues al anclarse nuevamente a la matriz, la señal supresora de apoptosis, supera ampliamente los efectos del fármaco (Brakebush Cord, et.al., 2002; Mizejewski, 1999).

La otra parte de la regulación en G_1/S Se lleva a cabo mediante la expresión de la proteína p21^{kip/kip/waf}. La proteína p21 tiene una expresión bifásica dentro de las primeras 36 horas post hepatectomía en el modelo murino, y es inducida tanto por factores de crecimiento como HGF y activina A, como por el TGF β (Albrecht J., 1997), por lo cual se le atribuye una función dual dentro de la progresión del ciclo celular, ya que es necesaria para la traslocación del complejo ciclina D1/cdk 4,6 del citosol al núcleo, como es capaz

de inhibir la progresión a mitosis por varias vías. Así mismo, la inhibición del ciclo celular después de la hepatectomía, ha sido reportada en el ratón transgénico que sobreexpresa p21 bajo el control de promotores hepático-específico (Wu et.al., 1996). El papel inhibitorio de p21 se ejerce mediante la competencia con la fosfatasa CDC25A, por el sitio de unión a los complejos ciclina E/cdk-2 y ciclina A/cdk2. En condiciones normales, la CDC25A remueve el grupo fosfato de la TYR-15 de la cdk2, permitiendo la completa activación de los complejos ciclina /cinasa, que regulan la fase S, p21 al unirse con el complejo ciclina/cinasa, impide la acción de la fosfatasa y la sucesiva activación de las cinasas (Jaime M., 2002). Por otro lado, se ha documentado que p21 se une directamente tanto a E2F como STAT-3, inhibiendo su actividad transcripcional. Así mismo, p21 puede unirse a PCNA y bloquear la actividad de la polimerasa δ , durante la fase de síntesis. El promotor de p21 muestra varios sitios de unión a p53 (el-Deiry, 1993); sin embargo el ratón knock out p53 $-/-$ y el ratón *wild type* mantienen una expresión semejante del RNAm durante las primeras 36 horas posteriores a la hepatectomía del 70%. Sin embargo en respuesta al tratamiento con cicloheximida –inhibidor de la síntesis de proteínas— o a la restricción de proteínas en la dieta, seguidos de una hepatectomía, el fenotipo wild type presenta una marcada inducción del p21 RNAm, no así el knockout p53 $-/-$, quien no presenta inducción (Albrecht J., 1997). Esto sugiere fuertemente que la expresión del RNAm de p21 ésta regulado por la proteína p53, aunque un reporte posterior demuestra que dicho aumento no es regulado directamente por la actividad transcripcional de p53, sobre el promotor de p21, sino por el aumento en la fosforilación de p38, una cinasa de respuesta a estrés que estabiliza a la proteína p21 (Stepeniak E., 2006).

El factor transcripcional p53 tiene múltiples funciones incluyendo la de arrestar el ciclo celular y dirigir el destino hacia apoptosis cuando existe un daño en el DNA. con un papel esencial en el punto de control de daño al DNA en G_1 a través de la activación de p21 (Taylor WR, Stark GR. 2001; Ohi R, Gould KL. 1999), también presenta funciones importantes en el punto de control de daño al DNA en G_2 , ya que este inhibe a Cdc2 a través de la activación de Gadd45, y 14-3-3 σ . Las cinasas ATM y ATR fosforilan la Ser15 de p53 después del daño al DNA. La fosforilación previene la interacción de p53 con Mdm2, por lo tanto la proteína p53 es estabilizada, y se acumula al prevenirse su degradación por ubiquitinilación, lo cual aumenta su concentración en la célula,

permitiendo que actúe como factor transcripcional ([Kraft C. 2003](#)). Se ha demostrado que p53, tras el daño al DNA, induce la transcripción de la proteína 14-3-3 σ , la cual se une y secuestra a la ciclina B1 en el citoplasma. También se ha reportado que la actividad del complejo ciclina B1 /cdc2 es regulado por p53 a través de las proteínas p21 y Gadd, y la activación constitutiva del complejo ciclina B1/cdc2 elimina el arresto en G2 inducido por p53. ([Zhao R., et.al.,2005](#))

Utilizando la tecnología de recombinación específica mediante adenovirus — y la expresión de la recombinasa *cre* — se puede lograr la depleción homocigota del gen blanco, en un cultivo primario de hepatocitos desde 24 horas posteriores a la infección ([S. Sheahan., 2004](#)). A través de esta metodología, se han hecho deleciones de pRb, p53 y p21, así como combinaciones de dobles y triples deleciones, resultando en el aumento de incorporación de BrUd de forma lineal en un lapso de 5 días en cultivo, sin embargo la deleción de p21 hace que la incorporación de BrUd tenga un comportamiento exponencial, con un pico máximo a las 48 horas. En la deleción triple, el efecto se potencia manteniendo la incorporación durante más tiempo, con lo cual se demuestra el control que tiene la relación p21-p53 sobre la síntesis de DNA y la progresión del ciclo ([S. Sheahan., 2004](#)). La importancia clínica de esta regulación se hace patente cuando se demuestra que existe una expresión aumentada del RNAm para p21 y ciclina D en patologías como hepatitis crónica, cirrosis alcohólica y colangitis primaria ([Albrecht J., 1997](#)), las cuales a pesar de mantener diferente etiología, coinciden en mantener la imposibilidad del hepatocito para proliferar y restaurar el órgano. En el modelo de daño hepático crónico inducido por la administración de acetaminofluoreno, seguido de una hepatectomía parcial, se induce el aumento de p53 y p21 a partir de las 12 horas postcirugía, además de un considerable retardo y disminución en la expresión de las ciclinas D, E y A. Así mismo, los experimentos de inmunofluorescencia muestran que la expresión de ciclinas y PCNA se encuentra limitada a las células ovas que se inducen durante la exposición con el hepatotóxico ([Trautwein C., et.al., 1999](#)). Ante la imposibilidad del hepatocito para proliferar en respuesta a un daño crónico, las células ovas aumentan su población, tanto en el modelo experimental ([Trautwein C., et.al., 1999](#)), como en pacientes con diversos grados de patologías hepáticas crónicas ([Yeoh G., 2005](#)). Sin embargo, lejos de presentarse una restauración del hígado, la presencia de

células ovales origina la aparición de puntos focales de células indiferenciadas, que presentan transformación y constituyen el origen de hepatocarcinomas, tanto en el modelo experimental de administración de acetaminofluoreno, como en pacientes con patologías crónicas del hígado (Trautwein C., et.al., 1999; Yeoh G., 2005).

La regulación de la regeneración hepática constituye uno de los puntos clave para el establecimiento de los tratamientos terapéuticos de las enfermedades crónico-degenerativas del hígado y vías biliares, hepatocarcinomas, así como para la optimización de trasplantes hepáticos, que es el tratamiento último de estas enfermedades, conocidas en conjunto como ESLD –*End Stage Liver Diseases*– (Pahlavan P., 2006). Hasta el momento, los modelos experimentales nos han permitido conocer los elementos que participan en el proceso regulatorio de la proliferación, así como el establecimiento de algunos de los mecanismos más conservados, y junto con el avance tecnológico en la identificación masiva de la expresión génica (análisis por microarreglos, proteómica, chips de citocinas), se espera terminar la caracterización de estos elementos en un plazo próximo. A este respecto, Xu y su grupo mediante el uso de microarreglos identificó que existen 300 genes que cambian su expresión en más de dos veces sobre el control al momento de realizar la hepatectomía parcial del 70%. (Xu C.S., 2005). De estos genes, 156 no habían sido reportados con anterioridad. Dentro de la expresión temprana, 34 de estos genes alteraron su expresión dentro de las primeras 6 hrs. y entre las 8 y 36 hrs. posteriores a la hepatectomía, la expresión de 86 genes fue alterada marcadamente, los cuales pertenecen al metabolismo de lípidos, y cadena respiratoria, y otros más se encuentran sin función descrita. Por otro lado, Guo demuestra mediante el abordaje proteómico, que existen 29 proteínas que incrementan su expresión después de la hepatectomía, reportando la relación existente entre el metabolismo de lípidos, las defensas antioxidantes y la regulación de la expresión de factores transcripcionales (Guo F., 2006). La construcción de modelos regulatorios a través de estos análisis genera un esquema más amplio de interacciones que nos permite establecer a E2F, Rb y la fosfatasa CDC25A, como posibles blancos farmacológico, los cuales se perfilan a ser los controladores clave del ciclo celular durante los eventos regenerativos del hígado, y durante el desarrollo del hepatocarcinoma primario.

4. El metabolismo de la Adenosina

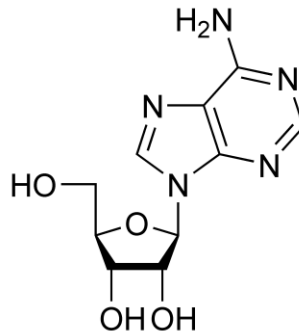


Fig.5 Estructura de la adenosina

La adenosina es un nucleósido de producción endógena, descrita inicialmente por Drury y Szent Gyorgyi en 1921. Se encuentra conformada por una base púrica conocida como adenina y la D-ribosa, un azúcar. Esta molécula posiblemente fue formada durante la síntesis abiótica a partir de moléculas más simples como el CH₄, NH₄, H₂O, según los experimentos de Miller ([Lehninger, 2003](#)). La adenina quizás fue la primera y más abundante base nitrogenada en aparecer en la Tierra. Curiosamente la mayoría de los cofactores enzimáticos contienen adenosina como parte de su estructura, a pesar de que la adenosina no juega ningún papel directo en la función del cofactor ([Lehninger, 2003](#)). La conservación de esta molécula a través de la evolución permitió diversificar su presencia en casi todos los organismos, así como establecer una participación activa en una amplia gama de procesos fisiológicos dentro de los vertebrados. Esta diversidad de funciones puede concretarse esencialmente en dos aspectos principales; el primero como mensajero químico, y visto de tal forma, la adenosina tiene un comportamiento complejo, ya que dependiendo del sistema, puede actuar de forma autócrina, parácrina o endócrina.

La adenosina es un poderoso vasodilatador y cardioprotector, y se ha descrito desde 1963 como reguladora del flujo sanguíneo en el corazón, músculo esquelético e hígado, así mismo reduce el movimiento intestinal, produce hipotermia, sueño, disminuye el flujo sanguíneo en los riñones, puede actuar como un neuromodulador en el sistema nervioso central y regular la respuesta inmune ([Chagoya De Sanchez V., 1995](#))

En el contexto metabólico, el hígado es el principal sitio de síntesis de purinas, no solo para su propio uso, sino que puede actuar como un donador de purinas en forma de adenosina, hipoxantina o adenina a los tejidos que son incapaces de sintetizar *de novo* las bases puricas (Chagoya De Sanchez V., 1995). Se piensa que la exportación de adenosina desde el hígado, depende de la concentración de oxígeno en el tejido.

Por otro lado, el catabolismo de purinas en el hígado es muy activo, siendo los principales desechos nitrogenados el ácido úrico, la alantoína y la urea, dependiendo de la especie que se trate. Además, la concentración de adenosina en el hígado varía con respecto a la hora del día, en un ciclo circádico dando un perfil de concentración bimodal con dos picos: el primero localizado entre las 12:00 y 14:00 horas y el segundo entre las 02:00 y 04:00, donde además los niveles de inosina e hipoxantina permanecen bajos, (Chagoya De Sanchez V., 1995). Consistente con esto, los niveles de adenosina en sangre permanecen bajos durante el día, (8:00 a 20:00), incrementándose durante la noche y alcanzando el pico hacia la media noche. El perfil encontrado para la inosina y la hipoxantina, fueron opuestos que el encontrado para la adenosina, mostrando un mínimo de ambas moléculas hacia la media noche, el cual fue mantenido por 12 horas para la hipoxantina y 5 para la inosina, alcanzando un pico máximo a las 22:00 h., descendiendo repentinamente para coincidir con el pico de adenosina a la media noche. Se ha propuesto que durante el día, la sangre mantiene elevadas la concentración de inosina de las 6-22 horas, de hipoxantina 12-22 hrs o adenosina 22-06 hrs. Una posibilidad atractiva es que tanto la inosina como la hipoxantina producidas por el catabolismo de purinas hepático, son transformados a AMP por la vía de salvamento de purinas durante el día, mientras que la adenosina es fosforilada a AMP por la adenosina cinasa durante la noche, manteniendo un papel clave en la regeneración y el mantenimiento del nivel de purinas en las células sanguíneas (Chagoya De Sanchez V., 1995).

El hepatocito juega un papel clave dentro de la administración de nutrientes que llegan al hígado a través de la vena porta. La acción de los transportadores de la membrana plasmática es responsable de la captación de estos compuestos de la sangre aferente y la mayoría de estos sistemas es regulado por el estado nutricional y algunos factores endocrinos, como es el caso del transporte de aminoácidos neutros en las células hepáticas, donde además se muestra una alta especificidad en la captación. Hasta el

momento se ha descrito el sistema A, para el transporte de aminoácidos neutros, que de hecho es regulado positivamente en la fase temprana del crecimiento hepático, (después de realizar la hepatectomía parcial) por un mecanismo consistente en la síntesis *de novo* de proteínas transportadoras (Pastor-Anglada, 1998), y aunque su papel ha sido debatido anteriormente, es posible que exista un transporte de nucleótidos de adenina del hígado hacia otros órganos.

A pesar de que el ATP es la molécula de intercambio energético más usada en la célula, el 5'AMP ocupa una posición estratégica, ya que está en posición de determinar por un lado, la vía de salvamento o el catabolismo de los nucleótidos de adenina.

En todas las células, el equilibrio bioquímico del adenilato, se presenta de $ATP + 5'AMP$ a $2ADP$, y controla el estado energético celular, el cual está regulado por la adenilato cinasa.

La proporción $ATP/5'AMP$ determina el estado energético celular, por lo tanto un exceso de 5'AMP puede irse tanto a la vía de salvamento a través del ADP, o catabolizarse principalmente a través de dos caminos. El principal es a través de la inosina 5' monofosfato (IMP) por la enzima AMP deaminasa. El IMP se convierte rápidamente a inosina, hipoxantina y finalmente llega a ácido úrico, que en humanos y otros primates es excretado. En otros mamíferos, el ácido úrico es catabolizado hasta alantoína antes de ser excretado. El IMP puede entrar a la vía de salvamento para regenerar el 5'AMP a través de un ciclo de los nucleótidos de purina, usando adenilosuccinato como intermediario.

Una ruta menos usada para la degradación del 5'AMP es la defosforilación directa hacia adenosina, por la 5' nucleotidasa. Este proceso puede llevarse a cabo de forma intra o extracelularmente por una isoforma de la enzima. La adenosina intracelular, es degradada hacia inosina por la adenosina deaminasa (ADA) y eventualmente hasta ácido úrico. Intracelularmente la refosforilación de adenosina a 5'AMP se lleva a cabo por la adenosina cinasa.

La adenosina extracelular puede entrar a la vía de sus transportadores, o unirse a sus receptores. Estos últimos, son proteínas de siete dominios transmembranales acopladas a proteínas G, que inhiben/estimulan la adenilato ciclasa y otras proteínas transductoras. La participación de los receptores de adenosina es heterogénea ya que cada uno mantiene distintas afinidades por su ligando. Alternativamente, la adenosina

puede ser tomada por al menos dos tipos de transportadores celulares tales como los Transportadores de Nucleótidos Equilibrados (ENT's) que son dependientes de gradiente o los Transportadores de Nucleótidos Concentradores (CNT's) que son intercambiadores de cationes como el sodio ([Lee C.C., 2008](#)).

Tales transportadores son especialmente importantes en las células que no tienen síntesis de novo de nucleósidos, tal como es el caso de los eritrocitos. Debido al papel central del hígado en la administración e interconversión de nutrientes, es posible que se lleve a cabo un transporte de los nucleótidos de adenina a través flujo sanguíneo, aunque el papel del hígado como donador de adenosina es controversial ([Lee C.C., 2008](#)).

La actividad de los transportadores de adenosina, puede ser regulada por los receptores de adenosina, tal y como ha sido demostrado en los CNT2, que están controlados por los receptores A1. Sin embargo una vez dentro de la célula, la adenosina es rápidamente fosforilada a 5'AMP debido a que la Km de la adenosina cinasa para la adenosina es de uno a dos ordenes de magnitud menor que la presentada por la Adenosina Deaminasa ([Lee C.C., 2008](#)).

Por otro lado, la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK) es una enzima alostérica, activada por 5'AMP, que ha sido implicada como un regulador positivo del transporte de glucosa en músculo, la glicólisis y la oxidación de ácidos grasos. Así mismo, se ha demostrado que el 5'AMP es un regulador alostérico de dos enzimas claves en el metabolismo de glucosa: es un regulador positivo de la fructosa 1,6 fosfatasa (FDP) y es un regulador negativo de la fosfofructosa cinasa (PFK). La FDP es una enzima limitante para la gluconeogenesis y convierte la fructosa 1,6 difosfato a fructosa 6-fosfato. La unión de FDP con 5'AMP inhibe su actividad enzimática y de ese modo limita la gluconeogénesis. En la dirección reversa, la fosfofructucinasa PFK, es el paso limitante de la glucolisis, convierte a la fructosa 6 fosfato en fructosa 1,6, bifosfato utilizando una molécula de ATP. A diferencia de la FDP la actividad de esta enzima se potencia con la unión del 5'AMP, incrementando así la tasa de glucolisis. Para ambas enzimas, los efectos de la unión con el ATP son los opuestos que los observados con el 5'AMP debido a que los nucleótidos de adenina, se unen al mismo dominio regulatorio. Se ha propuesto anteriormente, que la elevación de los niveles celulares de 5'AMP después de su captación, altera el equilibrio a favor de la producción de ADP, reduciendo los niveles celulares de ATP. Se piensa que la depleción en los niveles de ATP que puede reducir la

actividad termoregulatoria y permitir el establecimiento de un estado hipometabólico. La salida de este estado a través de la conversión de 5'AMP a IMP o adenosina por las nucleotidasas citosólicas, podrían representar un mecanismo para salir de dicho estado ([Lee C.C., 2008](#)).

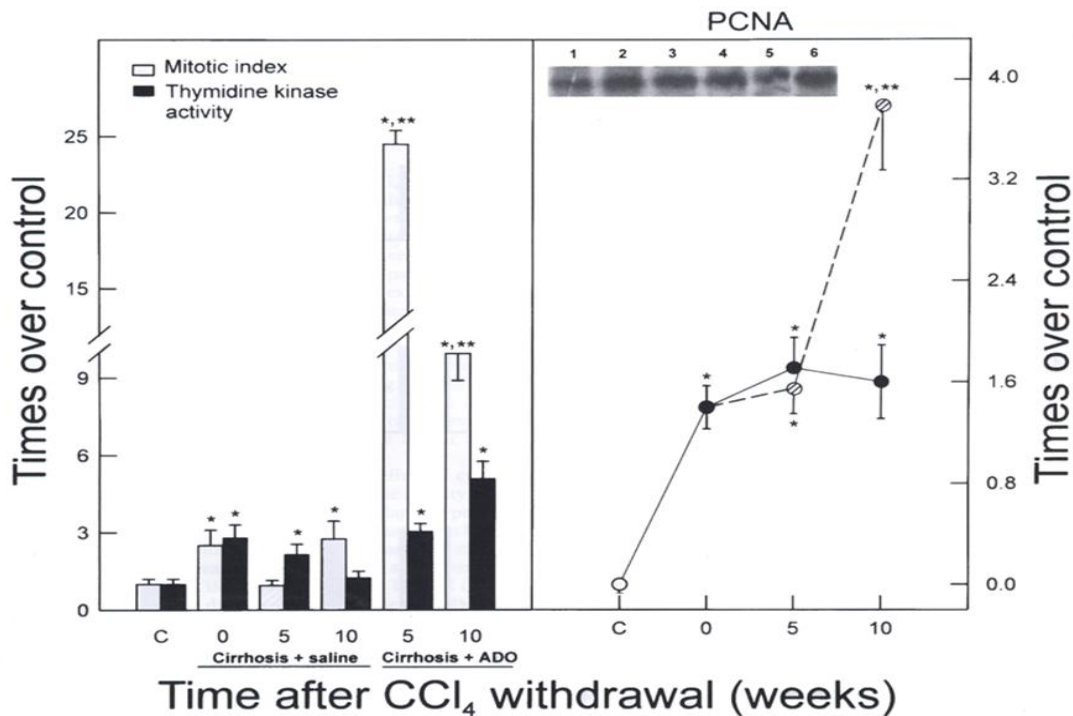
Los niveles de ATP no pueden decrecerse de forma infinita, puesto que se iniciaría un cierre de las funciones celulares, por lo cual aún si los niveles de 5'AMP aumentaran drásticamente. Es por ello que la Km de la adenosina deaminasa para el 5'AMP es más alto que el de la adenilato cinasa para 5'AMP. Este exceso de 5'AMP cerca y más allá de la Km de la adenilato cinasa es rápidamente catabolizado por la AMP deaminasa hacia IMP, limitando así la sobredepleción de ATP en la célula ([Lee C.C., 2008](#)).

5. Antecedentes

El modelo de hepatotoxicidad causado por la administración crónica de CCl₄ en rata, asemeja algunos de los eventos degenerativos de la cirrosis humana, por lo cual se ha utilizado ampliamente como modelo experimental en el estudio de los mecanismos moleculares que pueden intervenir en la progresión de esta patología, así como la efectividad de terapias hepatoprotectoras. ([Pérez Tamayo R., et.al., 1983](#)). La toxicidad directa del CCl₄ es ejercida en todos los tejidos capaces de metabolizarlo debido a la producción de radicales libres por el sistema de citocromos p-450. En este modelo, el impacto del daño mitocondrial recae directamente sobre la inducción de la fibrosis, por lo cual el desbalance del estado redox celular se ve afectado. El estado redox celular, es un regulador importante de varios flujos metabólicos, y puede ser especialmente relevante en el metabolismo de colágena ya que el aumento del poder reductor hepático NADH favorece la conversión de glutamato a prolina, con lo cual decrece su degradación, además de que aumenta el transporte de prolina hacia la mitocondria para su posterior oxidación y promueve las interacciones entre la prolina y demás rutas metabólicas, como la lanzadera de hexosas fosfato. ([Hernandez-Muñoz, 1994](#))

El hígado al recibir un daño toxico crónico, disminuye los niveles energéticos, (ATP) así como la concentración de adenosina. Por lo cual en un razonamiento inicial, se pensó

que el daño causado por un agente hepatotóxico podría ser revertido por la administración exógena de adenosina, debido a que este nucleósido es la única sustancia conocida hasta este momento capaz de aumentar el estado energético celular, (Chagoya De Sánchez, 1972) por lo cual se administro inicialmente a los animales cirróticos tratados con CCl_4 de forma crónica, esperando restaurar el estado redox y consecuentemente la función mitocondrial. Los resultados obtenidos indicaron un mejoramiento de la función hepática, una reducción en la acumulación de colágena y una elevación del cociente NAD/NADH tanto mitocondrial, como citosólico. (Hernández-Muñoz, 1994). La normalización del estado redox por parte del nucleósido, así como el mejoramiento general de las funciones hepáticas por acción de la adenosina, repercutió directamente con la disminución del porcentaje de fibrosis después de 15 semanas, así como una disminución importante en los principales componentes de la matriz extracelular.



Tomado de Hernández-Muñoz, et.al. (2002), *Hepatology*, 28 345-351

Fig 6. Efecto de la adenosina sobre la recuperación espontánea de animales cirróticos en 5 y 10 semanas de tratamiento con el nucleósido. En la parte izquierda de la gráfica se aprecia el índice mitótico y la actividad de timidina cinasa en animales cirróticos a tiempo 0. Después de 5 y 10 semanas posteriores al establecimiento de la cirrosis, se observan los niveles de ambos parámetros idénticos al tiempo 0, en los animales tratados 3 veces por semana con solución salina. Por el contrario, los animales tratados con adenosina, muestran una marcada elevación de la proliferación celular desde las cinco semanas de tratamiento. En la parte derecha de la gráfica, los niveles de expresión de PCNA en homogenado total son

congruentes y coinciden con este resultado, elevándose hasta 4 veces sobre el control a las 5 semanas del tratamiento. Esto demuestra que la adenosina es capaz de aumentar la proliferación de un hígado cirrótico.

Resumen del efecto de la adenosina sobre los animales cirróticos

Funciones anormales en el hígado cirrótico	Tiempo de establecimiento experimental	Recuperación Espontánea	con ADENOSINA
Acumulación de colágena I	10 semanas	VSC 4.6	VSC 2.8
Aumento en la actividad de prolil-hidroxilasa.	10 semanas	VSC 3.2	VSC 0.8
Disminución del cociente mitocondrial. NAD/NADH	5 semanas	Continua Bajo	Aumenta
Aumento en la síntesis de proteínas de RFA	5 semanas	Aumenta	Disminuye
Disminuye la síntesis de ADN (estimulo regenerativo)	10 semanas	Perdida hasta del 60% de la capacidad	

Cuadro 1. La columna uno muestra las funciones hepáticas que mayormente son alterados cuando se establece un cuadro de cirrosis experimental. La columna dos, nos indica el tiempo en que tardamos en establecer la alteración de dicho parámetro, usando un esquema de inyección intraperitoneal de 25mg/kg de peso corporal de CCl₄ 3 veces por semana. RFA= Respuesta de Fase Agua. VSC= Veces sobre el control. La columna cuatro muestra claramente una aumento de la actividad colagenolítica, así como una disminución del depósito de colágena.

Hipótesis

La adenosina es capaz de modular la respuesta proliferativa del hígado, durante los eventos regenerativos después de la hepatectomía parcial. Su mecanismo de acción puede involucrar un aumento en la biodisponibilidad de factores de crecimiento, citocinas o tener un efecto directo sobre la regulación del ciclo celular en el control de G₁/S.

Objetivo General

Determinar si el efecto de la adenosina sobre la proliferación celular en un de un hígado dañado puede ser reproducido durante la hepatectomía parcial, y establecer el mecanismo de acción del nucleósido, mediante el cual exacerba la capacidad proliferativa del hepatocito en el proceso regenerativo.

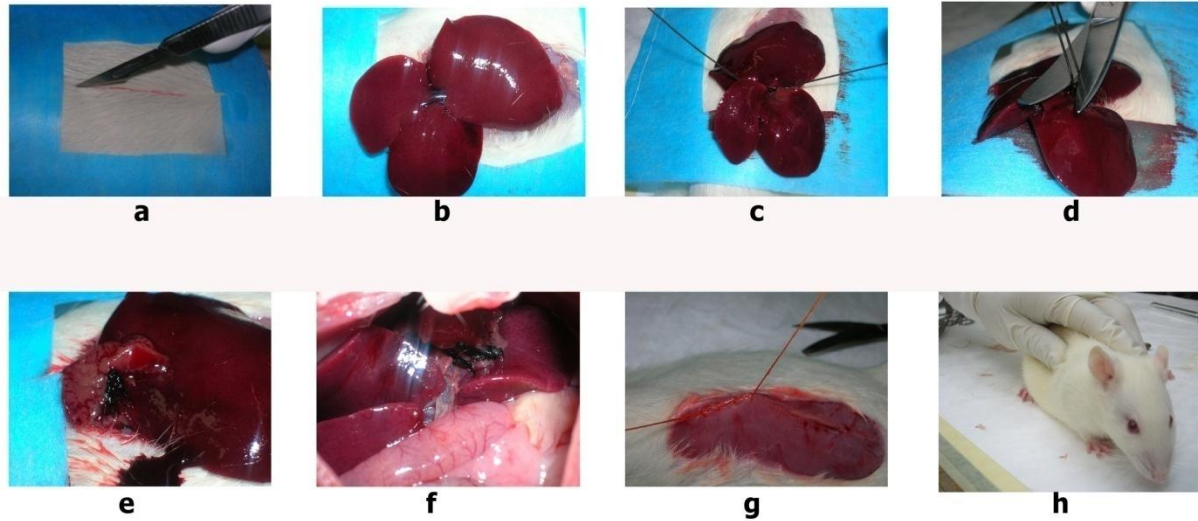
Objetivos Específicos

Demostrar si la administración exógena de adenosina incrementa la síntesis de DNA y el índice mitótico en animales sujetos a hepatectomía parcial de un 30%.

Determinar si la administración de adenosina modifica la concentración y/o el perfil temporal de la expresión las ciclinas D1, E, A y B1, así como los inhibidores del complejo ciclina/cinasa p21 y p27.

Establecer si la adenosina modifica la expresión nuclear de los factores de transcripción DP-1, AP-1, E2F-1, E2F-3, STAT-3, NF-kB, que regulan el paso G₁/S del ciclo celular.

Metodología



Secuencia de una hepatectomía parcial al 30%. a) Incisión debajo del cartilago xifoideo, b) Exposición del lobulo medial e izquierdo, c) - e) ligamiento y excisión del lóbulo izquierdo, f)-g) sutura por planos.

Fig. 7 *Proceso Quirúrgico.*

La resección del 30% de la masa hepática se llevó a cabo bajo la inducción anestésica con éter etílico. Posterior a la anestesia quirúrgica (Fase III), se realizó una incisión en el plano medio ventral de rata, desde el extremo distal del cartílago xifoideo hasta alcanzar los 4 cm de longitud, exponiendo así la capa muscular y posteriormente se realizó un segundo corte para exponer la cavidad peritoneal y los lóbulos izquierdo y medio del hígado. A continuación se ligó el lóbulo izquierdo del hígado para cortar la masa hepática correspondiente al 30%; esta pieza de tejido fue pesado para determinar el porcentaje de masa hepática escindido y obtener la variación del procedimiento quirúrgico. El cálculo de la masa hepática regenerada se realizó tomando en cuenta que el hígado conforma a aproximadamente un 5% del peso corporal. Posteriormente se suturo la capa muscular con punto de anclaje (hilo reabsorbible catgut simple no.0) y la piel con puntos separados (hilo de seda 00).

Para cumplir con los objetivos del trabajo, se realizaron dos curvas temporales posteriores a la hepatectomía, una a tiempos cortos incluyendo 0.5, 1.5, 3 y 6 horas y otra a tiempos largos de 12, 24, 48 y 72 horas con una n mínima igual a cuatro animales.

Extracción del hígado.

Se sacrificó a los animales en el tiempo determinado por la curva temporal con una dosis letal de pentobarbital sódico (5g/kg de peso corporal) y se extrajo el hígado. Posteriormente se retiró el exceso de sangre con una solución de PBS frío y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido (-140° C) hasta su análisis posterior.

Análisis Histológico

Al momento del sacrificio de la rata, se separó una porción del hígado de aproximadamente 80 mg y se fijó en p-formaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos (fosfato mono-básico de potasio 80mM, fosfato dibásico de potasio 20mM, pH= 7.2). Cada muestra se fijó por al menos 48 horas, y al término de las cuales, se deshidrató el tejido en un tren secuencial creciente de etanol, finalmente se incluyó en parafina, se hicieron cortes secuenciales de 10 μ m y se montaron en los portaobjetos. Posteriormente se desparafinaron y se rehidrataron de forma secuencial. Al término, se realizó la tinción de hematoxilina-eosina. Se cuantificaron las mitosis encontradas en al menos 20 campos de 40X, por laminilla. Se contabilizaron obtuvo una n mínima de 6 animales por grupo experimental y/o control. El índice mitótico fue definido como el promedio de las mitosis encontradas por campo.

Fraccionamiento Subcelular

Posterior a la extracción del hígado, se retiró el exceso de sangre y áreas necróticas y homogeneizó el tejido en amortiguador Tris-HCl (Tris 10mM, Sacarosa 225mM, E.D.T.A. 0.3Mm, pH= 7.4), en una relación peso: volumen 1:4. El homogenado se centrifugó a 1500 g por 15 minutos a 4°C. el botón resultante fue recuperado para purificar la membrana plasmática. El sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 7000 g y

12, 000 por 15 minutos a 4°C para recuperar la fracción mitocondrial en el botón. El sobrenadante fue centrifugado a 100,000 g por 60 minutos a 4°C. La fracción del sobrenadante fue denominado como la fracción citosólica y el botón formado se designó como la fracción de microsomas.

Obtención de Núcleos celulares y proteína nuclear.

Se homogeneizó el tejido en una relación peso: volumen 1:2 con amortiguador frío de HEPES 10Mm, MgCl₂ 5mM y KCl 25mM pH= 7.5 en presencia de inhibidores de proteasas (Roche). Posteriormente se añadió 2.06% del volumen total, del amortiguador HEPES 10Mm, MgCl₂ 2mM y Sacarosa 2.4M pH= 7.5. Una vez mezclado por inversión se añadió el 192% del volumen anterior, del amortiguador HEPES 10Mm, MgCl₂ 2mM y Sacarosa 2.3M pH= 7.5. Nuevamente se mezcló por inversión. Posteriormente se colocó el homogenado en un gradiente de sacarosa, y se centrifugo a 106,000 X g por 45 minutos a 4 °C en un rotor SW-28 Beckmann. Se consideró el botón resultante como la fracción nuclear, la cual posteriormente fue recuperada y lavada dos veces en la solución de lavado (HEPES 10Mm, MgCl₂ 2mM y Sacarosa 0.25M pH= 7.5), centrifugándola nuevamente a 165 X g durante 10 minutos a 4 °C. Finalmente se resuspendieron los núcleos en 2 ml de la solución de lavado y fueron preservados a -70 °C hasta su análisis. Una vez recuperados los núcleos, se solubilizaron en un amortiguador de lisis (HEPES 10mM, MgCl₂ 5mM, KCl 25mM, Coctel de inhibidores de proteasas -ROCHE-, SDS 1.4%, deoxicolato de sodio 0.5%, NP-40 2% y glicerol al 5%), se agitaron en vórtex durante 30 segundos y se dividió la muestra en alícuotas para su posterior cuantificación.

Para la cuantificación de proteínas nucleares solubilizadas con detergentes iónicos, se utilizó la reacción del ácido bincinónico. (Scientific Thermofisher). Debido a que la presencia de detergentes en la reacción de Lowry original, tiende a sobreestimar la cantidad de proteínas. Este método combina la reducción del Cu⁺⁺ a Cu⁺ por la proteína en un ambiente alcalino (reacción de biuret) con la alta sensibilidad y selectividad de la reacción colorimétrica del catión cuproso usando un reactivo que contiene el ácido bincinónico. La coloración morada producto de la reacción de este ensayo es formada por la quelación de dos moléculas de BCA con un ión cuproso, y este complejo hidrosoluble

exhibe una fuerte absorbancia a 562 nm que presenta un incremento lineal al aumento en la cantidad de proteínas en un rango de trabajo de 20 a 2000 $\mu\text{g/ml}$.

Determinación de la Actividad de Timidina Cinasa (EC 2.7.1.21)

La incorporación de nucleótidos trifosfatados al DNA, es una de las actividades marcadoras de la fase de síntesis del ciclo celular, (Alberts, 1994) para el caso de la timidina, el paso limitante de la reacción es catalizado por la enzima timidina cinasa (TK), que realiza la fosforilación de timidina a timidina mono fosfato, La actividad de TK fue determinada por el método de Sauers y Wilmanns, utilizando [metil ^{-3}H] timidina (sp. act. 2Ci/mmol: New England Nuclear Co. Boston, MA). El método se basa en determinar la cantidad de timidina marcada se une al filtro de intercambio iónico, (Dietilaminoetil celulosa, Whatman DE 81) de forma posterior a la incubación del citosol de las muestras con timidina marcada/fría.

Western Blot

Se cargaron 25 μg de proteína nuclear solubilizada por carril y se separaron en una electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) en un gel al 12% de acrilamida, utilizando una curva de voltaje creciente (65-110 volts). Al término de la electroforesis, se tiñeron los geles con la tinción de plata y con azul de Coomassie para utilizarlos como controles. Al término de la electroforesis, la proteína separada se transfirió a una membrana de PVDF (Bio-rad, CA) usando un amperaje constante de 250mA, por 2 horas a 4°C. Posteriormente se bloquearon los sitios inespecíficos con un amortiguador de Caseína 1%-gelatina 0.3% (Sigma) en PBS-Tween 20 al 0.3%. (Bio-rad, CA)

Al término del bloqueo, se optimizaron los tiempos y concentraciones tanto del anticuerpo primario, como el secundario, quedando el procedimiento general como incubación 1:10000 overnight a 4°C para el anticuerpo primario y 1:10000 por 60 min. a temperatura ambiente para el anticuerpo secundario. Después de la incubación con el anticuerpo primario y secundario, se lavaron las membranas para retirar el exceso de

anticuerpo y las interacciones inespecíficas, con 8 lavados de PBS -Tween 20 al 0.3%. por 5 minutos.

Los anticuerpos usados se listan la Tabla-**A** del apéndice. Así mismo, se emplearon anticuerpos secundarios acomplejados a peroxidasa de rábano, por lo cual se visualizó la señal a través de la incubación de la membrana con un sustrato quimiolumincente según las instrucciones del fabricante (Millipore ó ECL-plus de Amersham) y se expuso a diferentes tiempos a una placa fotosensible (Sistema GBX Kodak) para su revelado posterior y visualización del resultado. La digitalización de la reacción del Western blot, y el análisis densitométrico fueron realizados en el sistema de fotodocumentación Gel Doc XR y con el software Quantity One versión 4.6.0 (Bio-rad, CA). Una vez que se obtuvo el resultado con las proteínas blanco, se desvistió la membrana incubándola 60 minutos a 60 °C con el siguiente amortiguador (Tris 62.5mM pH 6.7, β -mercaptoetanol 100mM, 2% SDS) con agitación continua. A continuación se lavó la membrana 10 veces por 5 minutos en agitación continua con PBS-Tween al 0.2%. Al término se incubó nuevamente con el amortiguador de bloqueo y posteriormente se incubó con anti-lamina B1, para el control de cargado de proteína nuclear y con anti α -actina para el control de cargado de homogenado total o citosol.

Resultados

Efecto Dosis-Respuesta sobre la proliferación

Tratamiento	Parametros de la proliferación hepática		
	Ganancia de masa hepática	Actividad de TK	Índice Mitótico
Sham + saline		0.25 ± 0.03	0.4 ± 0.1
Sham + 25 mg ADO		0.20 ± 0.02	0.5 ± 0.1
Sham + 50 mg ADO		0.27 ± 0.03	0.6 ± 0.2
Sham + 100 mg ADO		0.31 ± 0.03	0.6 ± 0.1
Sham + 200 mg ADO		0.26 ± 0.03	0.4 ± 0.1
PH + saline	10.5 ± 1.2	1.32 ± 0.19*	5.5 ± 1.4*
PH + 25 mg ADO	12.4 ± 1.4	1.23 ± 0.21*	6.1 ± 0.9*
PH + 50 mg ADO	15.3 ± 1.6**	1.55 ± 0.20*,**	6.1 ± 1.2*
PH + 100 mg ADO	18.2 ± 1.9**	2.66 ± 0.37*,**	7.9 ± 1.0*
PH + 200 mg ADO	14.9 ± 1.3*	1.45 ± 0.30*	6.2 ± 1.1*

Tabla 1. * $P < 0.01$ comparado con el grupo control (sham). ** $P < 0.01$ vs el grupo hepatectomizado. Los resultados fueron obtenidos utilizando una $n = 4$ animales por grupo. Los datos están expresados como promedio \pm error estándar.

La hepatectomía parcial del 30% induce un incremento máximo de la actividad de TK (5.3 ± 0.8 veces sobre el control) y el índice mitótico (13.0 ± 3.5) a las 24 y 48 horas posteriores a la cirugía, respectivamente. Adicionalmente, se obtuvo una recuperación de la masa hepática de un $10.5\% \pm 1.2$ del 30% de la masa removida. La administración de adenosina a estos animales incrementó los parámetros proliferativos indicando una clara potenciación de la regeneración. En la dosis más baja probada (25 mg/kg de peso corporal) los efectos fueron discretos y no estadísticamente significativos; sin embargo en el rango de 50 a 100 mg/kg de peso corporal, se alcanzó un incremento significativo de la proliferación celular. Inesperadamente con la dosis de 200 mg/kg de peso no se promovió la máxima respuesta proliferativa. (Tabla 1, Fig.1). En este trabajo seleccionamos la dosis

de 100 mg/kg de peso para buscar los posibles mecanismos involucrados en la potenciación de la actividad proliferativa del

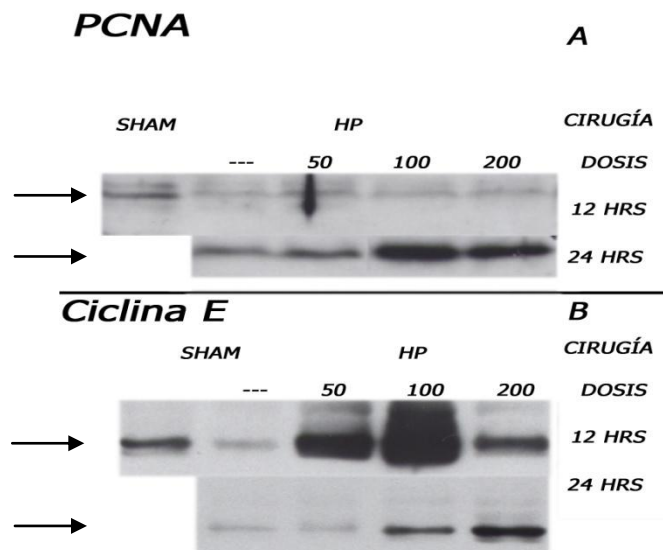


Fig.1. Western Blot del efecto dosis-respuesta de la administración de adenosina sobre la abundancia nuclear de PCNA (A) y Ciclina E (B), a las 12 y 24 horas posteriores a la resección hepática. Se encuentra una expresión máxima de ambas ciclinas en la dosis de 100 mg/kg de peso. El peso molecular corresponde a 37kd para PCNA y 55 kd para ciclina E.

hígado por acción del nucleósido. Con esta dosis también encontramos un adelanto en el índice mitótico, obteniendo un pico de mitosis a las 24 horas post cirugía, mientras que en los animales sometidos únicamente a la cirugía, el máximo de la respuesta lo encontramos a las 48 horas posteriores a la hepatectomía. El incremento en el número de mitosis por acción de la adenosina, es similar al encontrado en modelos donde se extrae una mayor cantidad de masa hepática como en la resección del 70% (dato no mostrado). Así mismo, la robustez de la expresión de PCNA (Fig. 1A) es semejante al encontrado en hepatectomía mayores.

Al realizar la curva temporal, encontramos que la adenosina incrementa hasta tres veces el índice mitótico en los animales sujetos a hepatectomía parcial cuando se les administra la dosis de 100 mg/kg de peso del nucleósido, manteniendo constante este incremento hasta las 48 horas posteriores a la cirugía. (Fig. 2A). Por otro lado, los niveles de PCNA se incrementan a más del doble a las 24 horas, en el grupo hepatectomizado más adenosina, (Fig. 2B) mientras que el antígeno nuclear Ki-67 alcanza valores estadísticamente significativos hacia las 48 posteriores a la cirugía, incrementándose en el grupo sometido a la cirugía mas el nucleósido (Fig. 2C).

Figura 2

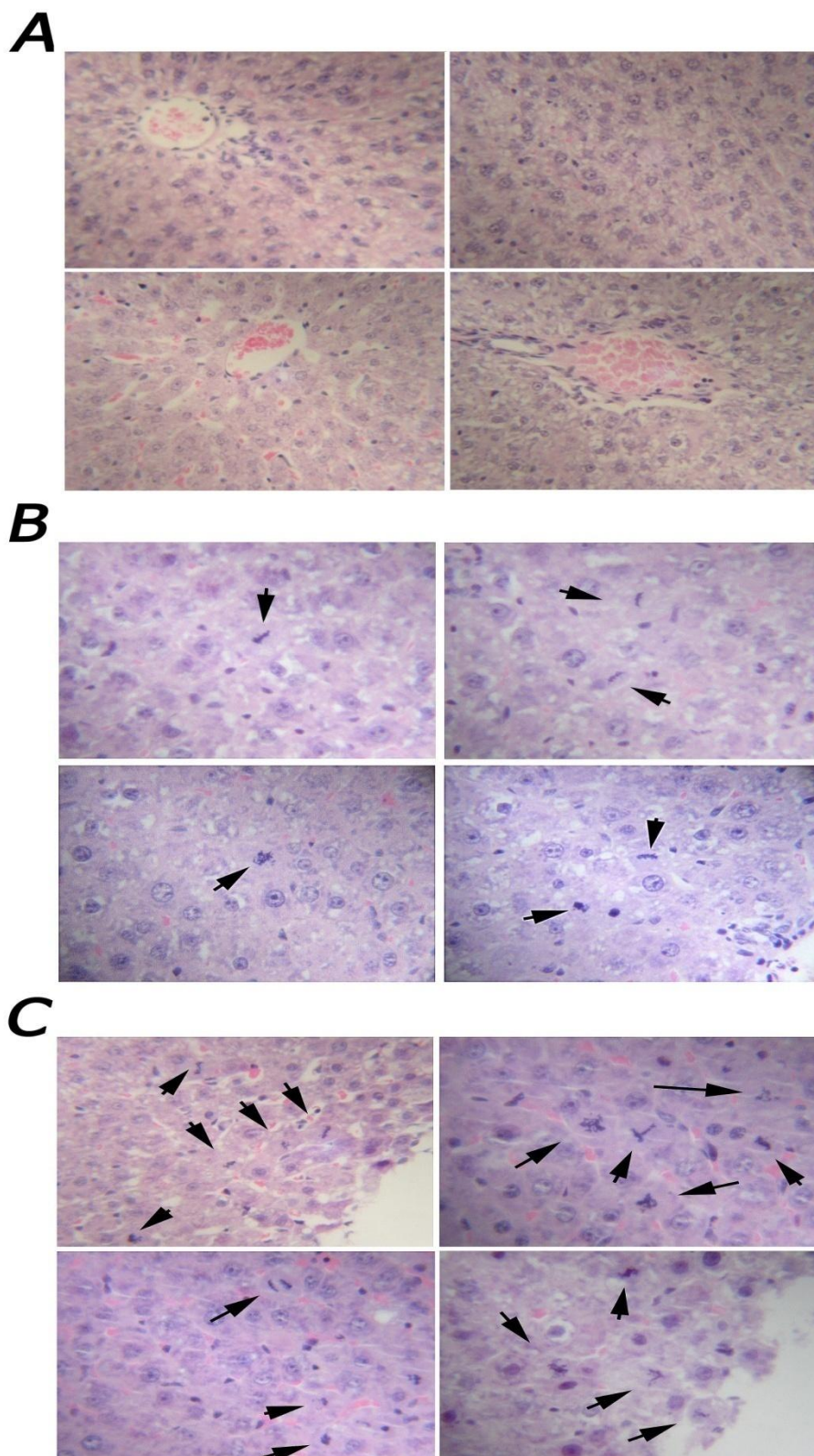


Figura 2. La microfotografía muestra los campos representativos de las mitosis encontradas 24 horas posteriores a una falsa cirugía (**A**), una hepatectomía parcial (**B**) ó hepatectomía parcial más 100 mg/ kg de peso corporal de adenosina (**C**). Las flechas señalan las mitosis encontradas, nótese que el tratamiento con adenosina promueve un aumento en el número de mitosis.

FIGURA 3

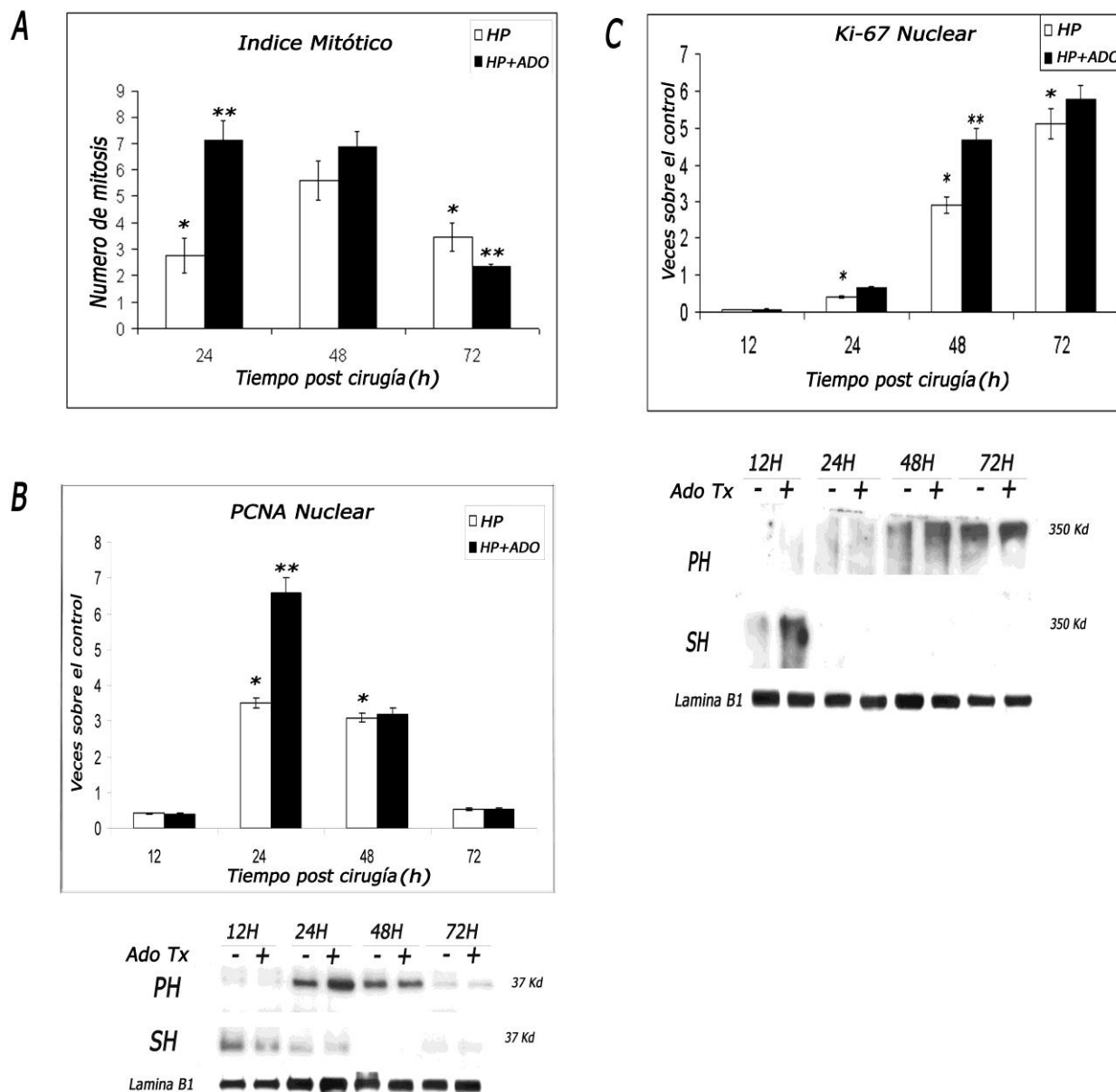


Figura 3. Efecto de la adenosina en la tasa de mitosis hepática y en la expresión del PCNA y del antígeno nuclear Ki-67. Los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar. Se hicieron al menos cuatro observaciones independientes por cada punto en la curva. En **A** se observa el índice mitótico definido por el número de mitosis encontradas en 20 campos, vistos en un objetivo de 40X. En **B**, se muestra la cuantificación del PCNA inmunodetectado, el valor en unidades arbitrarias de densitometría (UAD) de PCNA = 689 UAD/mm². La imagen inferior pertenece a un Western Blot representativo. Se utilizó la inmunodetección de lamina B1 como control de cargado del experimento. En **C**, se detectó la presencia del antígeno nuclear Ki-67 por Western blot. El valor del control de ki-67 = 203 UAD/mm². La imagen bajo la grafica pertenece a lamina B1 como control de cargado. En ambos experimentos de Western blot se normalizo el valor de UAD/mm², como veces sobre el control. Las barras en blanco (HP) respresentan los grupos únicamente hepatectomizados, mientras que las barras negras (HP+ADO) representan los animales sujetos a hepatectomia parcial más 100 mg/ kg de peso corporal de adenosina i.p. Excepto donde se indica, no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tiempos post cirugía analizados en los animales con falsa cirugía

(sham), ni entre los animales sham tratados con adenosina, por lo cual se realizó la comparación de los grupos experimentales vs. el valor promedio sham de todos los tiempos definido anteriormente como *control*.

Efecto de la adenosina sobre el Ciclo celular

Acorde al aumento en el número de mitosis que encontramos con la administración de adenosina, decidimos monitorear la progresión del ciclo celular a través de la expresión nuclear de las ciclinas D1, E, A y B1, las cuales también se modificaron con el tratamiento del nucleósido. La adenosina adelanta la expresión de la ciclina D1 desde las 12 horas post cirugía, aumentando su abundancia hasta 5 veces sobre control, manteniendo sus niveles elevados hasta las 72 horas posteriores a la resección. Este efecto contrasta con el patrón normal de expresión que se observa en los animales que únicamente fueron hepatectomizados, donde el pico de expresión se observa hacia las 48 horas (**Fig. 4A**). La presencia de la ciclina E nuclear, se vió dramáticamente aumentada partir de las 12 horas post cirugía en el grupo hepatectomizado más el nucleósido, obteniendo un incremento de 12 veces sobre el grupo únicamente sujeto a la resección hepática; así mismo, a las 24 horas post cirugía, el tratamiento con el nucleósido mantiene al menos al doble la expresión nuclear de ciclina E sobre el grupo únicamente hepatectomizados (**Fig. 4B**). Después de una resección del 30% de la masa hepática, la cantidad de ciclina A nuclear encontrada en el grupo hepatectomizado aumentó progresivamente a partir de las 12 horas y llega a un pico máximo hacia las 48 horas post cirugía. La adenosina promovió un aumento abrupto de dicha ciclina desde las doce horas post cirugía doblando la cantidad de la proteína a este tiempo vs. el grupo únicamente sujeto a la resección parcial. Así mismo suprimió el pico de expresión hacia las 48 horas, manteniendo los niveles de esta ciclina por arriba de 10 veces sobre el control a todos los tiempos monitoreados (**Fig. 4C**). La ciclina B1 se acumula en el núcleo progresivamente alcanzando un pico hacia las 24 horas en los animales sujetos a la hepatectomía parcial. Debido a que esta ciclina debe degradarse justo antes de que la célula inicie la mitosis, se espera un decremento en su nivel de expresión hacia las 72 horas posteriores a la cirugía. La administración de adenosina promovió un aumento significativo doblado la cantidad presente de dicha ciclina, hacia las doce horas posteriores a la operación; sin embargo, en los tiempos posteriores su comportamiento no difiere significativamente del patrón cursado por los animales sujetos únicamente a la HP. (**Fig. 4D**). La proteína p21^{cip/kip} aumentó ligeramente sus niveles de expresión nuclear en respuesta a la cirugía hasta alcanzar un pico de 3 veces sobre el control entre las 48 y 72 horas. La administración de

adenosina dobló la cantidad nuclear de esta proteína durante las primeras 24 horas post cirugía (**Fig. 4E**). El inhibidor $p27^{cip/kip}$ en un animal hepatectomizado se acumuló hacia las 72 horas post hepatectomía. El tratamiento con adenosina indujo un pico de 6 veces sobre el control hacia las 48 horas post cirugía. (**Fig. 4F**).

FIGURA 4

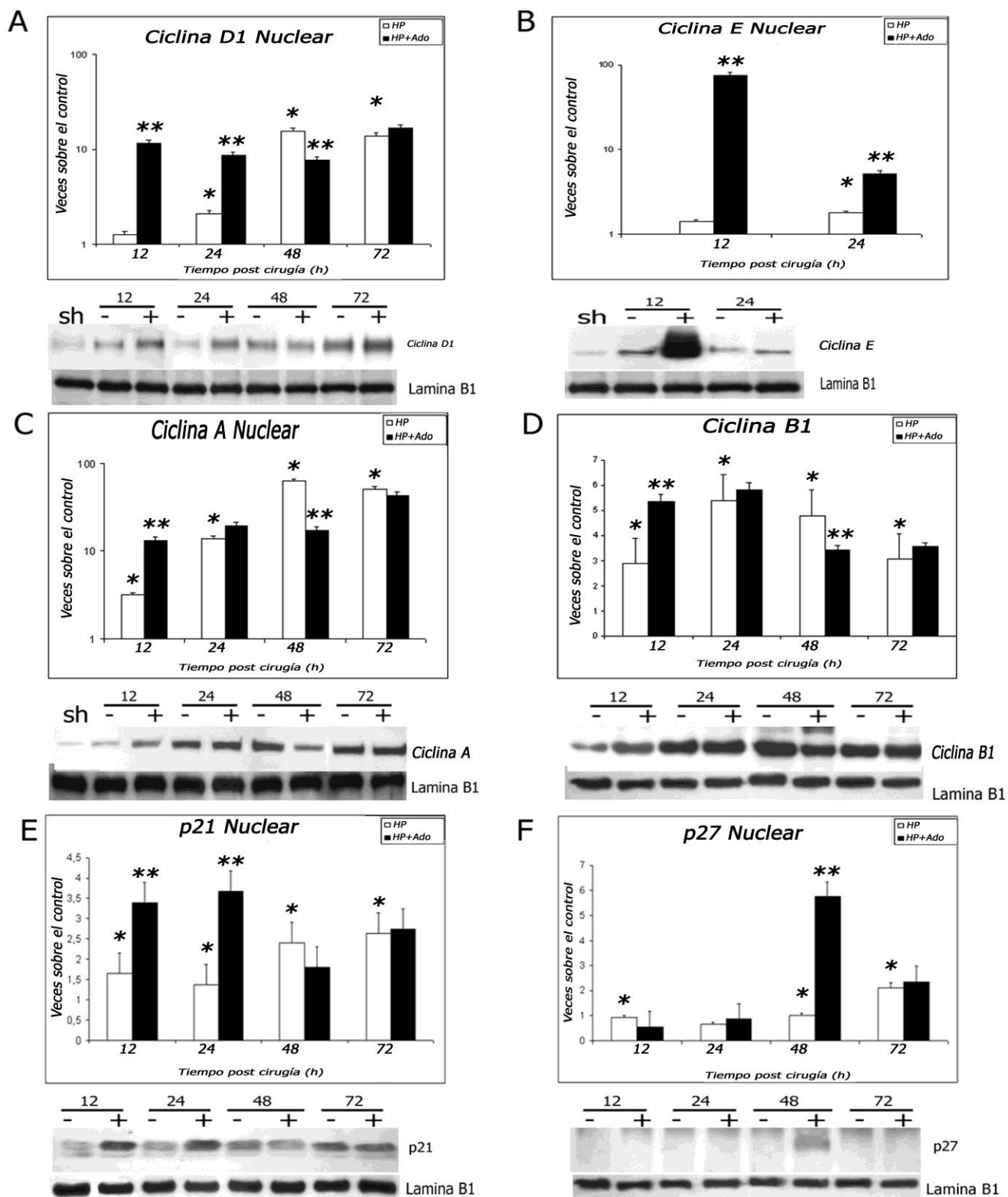


Figura 4. Western Blot del efecto de la adenosina sobre la expresión nuclear de las ciclinas p21 y p27 en los animales sujetos a la resección de un tercio de la masa hepática. Las gráficas corresponden a el promedio del análisis densitométrico \pm error estándar. Se hicieron al menos 4 observaciones independientes por cada punto en la gráfica. Se normalizaron como en la figura 3. Los valores del control son (en UDO/mm²) 5530 para la ciclina d1, 5310 para la ciclina E, 11302 para la ciclina A, 9260 para p21 y 10895 para p27. Los símbolos en el extremo superior derecho. La significancia estadística es como se indica en la figura 2.

Efecto de la adenosina sobre el punto de control Rb

Uno de los blancos principales de los complejos con actividad de cinasa ciclina E/cdk2 y ciclina A/cdk 2, es la fosforilación de la proteína Rb, con lo cual se libera el factor transcripcional E2F y forma un heterodímero funcional con la proteína nuclear DP-1 (**Fig 5**). El aumento de la proteína Rb fosforilada en la serina 795 en el homogenado total, se incrementó a las doce horas de la hepatectomía hasta 4 veces sobre el control sham, siguiendo un incremento máximo a las 48 horas post cirugía. Sin embargo, el tratamiento con la adenosina a los animales parcialmente hepatectomizados, parcialmente bloqueó el aumento de dicha molécula, manteniendo los niveles significativamente más bajos a lo largo de toda la curva temporal. (**Fig. 5A**). Por otro lado, la concentración nuclear de E2F-1 en las primeras horas post hepatectomía se mantuvo en niveles nucleares bajos hasta las 48 horas, donde se presentó un incremento súbito de hasta 60 veces sobre el control, bajando su concentración hacia las 72 horas posteriores a la hepatectomía. La acción del nucleósido adelantó ligeramente la expresión nuclear de E2F-1 durante las primeras 24 horas post cirugía, y retrasó el pico de 48 horas, alcanzando un aumento de 50 veces sobre el control hasta las 72 horas posteriores de la resección hepática (**Fig. 5B**). El perfil de concentración expresado por pRb y E2F-1 coincidieron en el grupo que fue únicamente hepatectomizado; sin embargo el tratamiento con adenosina suprimió que produce la hepatectomía, cambiando drásticamente el perfil nuclear de este factor transcripcional. Otro de los miembros de esta familia, E2F-3, aumentó abruptamente su expresión nuclear a las 24 horas post cirugía. Sin embargo, la adenosina redujo significativamente este aumento (**Fig. 5C**). La proteína DP-1 conforma el complemento transcripcional de E2F, sin embargo los cambios posteriores a la hepatectomía parcial en la expresión nuclear de esta molécula, fueron más discretos. Encontramos un aumento a las doce horas de la operación, después del cual bajan sus niveles y nuevamente hacia las 72 horas se elevaron discreta, pero significativamente su concentración. El tratamiento con adenosina redujo significativamente dicho aumento en todos los tiempos de la curva

temporal, encontrando una reducción significativa a las doce y 72 horas post hepatectomía (Fig. 5D).

FIGURA 5

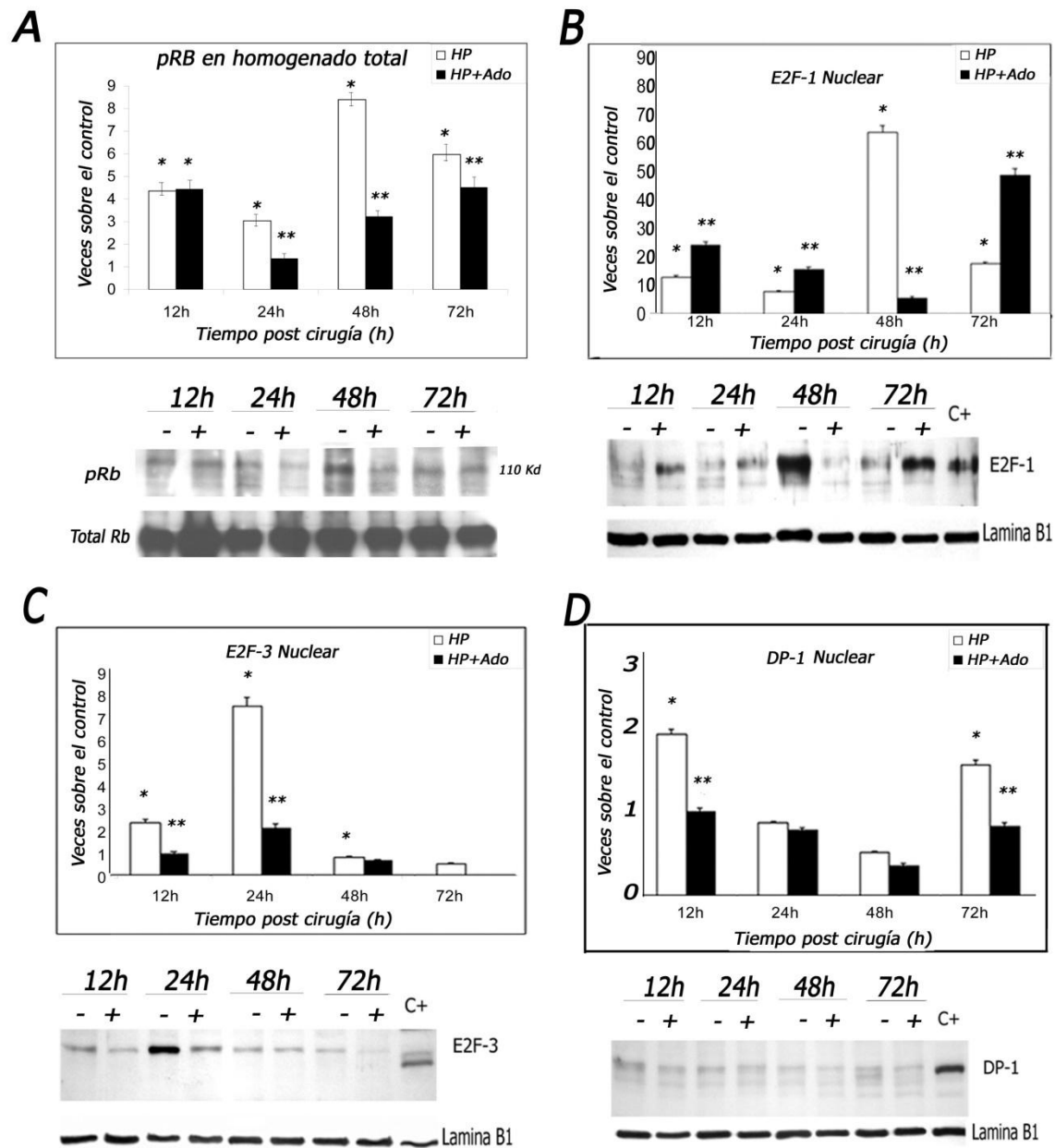


Figura 5. Western blot y análisis densitométrico. Efecto de la adenosina sobre la tasa de expresión hepática de pRb, E2F-1, E2F-3 y DP-1 en animales sujetos a la hepatectomía parcial de un tercio. Las graficas corresponden al promedio del análisis densitométrico \pm error estándar. Se hicieron al menos 4 observaciones independientes por cada punto en la gráfica. Se normalizaron como en la figura 2. Los valores del control son (en UDO/mm²) 835 para pRb, 1103 para E2F-1, 1465 para E2F-3 y 2052 para DP-1. Los símbolos en el

extremo superior derecho. La significancia estadística es como se indica en la figura 3. C+ corresponde al homogenado total de un embrión de rata de 19 días usado como control positivo.

Efecto de la hepatectomía parcial y tratamiento con adenosina sobre el HGF, HGFA su correspondiente proteasa activadora y c-Met, su receptor específico.

Los niveles del receptor c met en la membrana plasmática, se incrementan a las doce horas post cirugía por arriba de veinte veces sobre el control sham, disminuyendo su abundancia hasta las 72 horas. El tratamiento con adenosina, decreta hasta en un 50% la abundancia del receptor a las doce horas posteriores a la hepatectomía, sin embargo permite que el receptor aumente su cantidad hasta tres veces sobre el grupo que sólo fue hepatectomizado, a las 72 horas posteriores a la resección (**Fig. 6A**). El HGFA, es una proteasa específica para el péptido precursor del HGF, que permite junto con el sistema de trombina, y urokinasa, pasar al HGF a su forma activa. Esta molécula dentro del tejido hepático se incrementa doce horas postcirugía en más de dos veces sobre el control sham y disminuye de 24 a 48 horas para posteriormente dar un segundo pico de expresión hacia las 72 horas post hepatectomía (**Fig. 6B**). El tratamiento con el nucleósido incrementa los niveles de expresión a 24 y 72 horas posteriores a la cirugía. Los niveles de HGF en el hígado se mantienen bajos en respuesta a la cirugía por las primeras 72 horas, sin embargo, el tratamiento con adenosina incrementa hasta 7 veces la expresión de esta molécula a 72 horas de la hepatectomía parcial (**Fig. 6C**). Así mismo, en contraste con el resto de los parámetros medidos, los niveles séricos de HGF son afectados en su respuesta tanto a la laparoscopia, como a la hepatectomía parcial, dando por resultado un incremento en ambos grupos, especialmente a las 12 y 72 horas de la operación. (**Fig. 6D**).

Efecto de la HP y el tratamiento con adenosina sobre la expresión de los protooncogenes c-myc, c-fos y c-jun.

La expresión del protooncogen c-fos durante los primeros minutos posteriores a la hepatectomía parcial fue examinada en la **figura 7A** donde se muestra un pico de expresión a los 30 minutos. El tratamiento con adenosina, retrasa claramente este pico hasta los 180 minutos, donde se ve un incremento de más de 3 veces, en el nivel nuclear para c-fos por acción del nucleósido. Así mismo, la resección hepática promueve un aumento en la cantidad de c-jun hacia los 180 minutos posteriores a la resección (**Fig.**

7B). La administración de adenosina, parece no promover ningún cambio en la concentración nuclear de esta proteína.

FIGURA 6

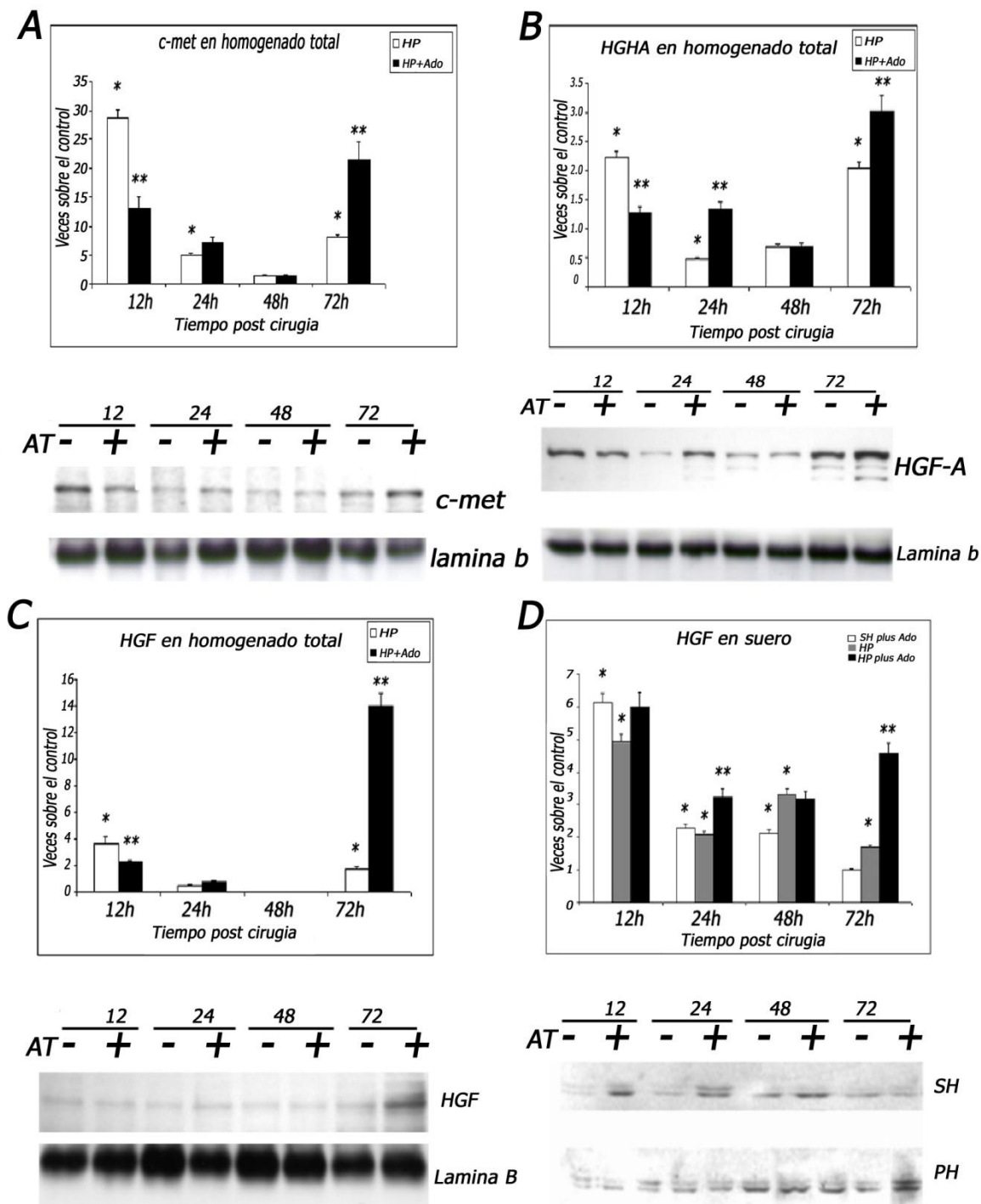


Figura 6. Western Blot del efecto de la adenosina sobre la expresión hepática de los niveles de HGF, HGFA y c met. Las gráficas corresponden a el promedio del análisis densitométrico \pm error estándar. Se hicieron al menos 4 observaciones independientes por cada punto en la gráfica. Se normalizaron como en la figura 3. Los

valores del control son (en UDO/mm²) 895 para el HGF sérico, 560 para el HGF en el tejido, 113 para c-met y 1011 para la proteasa HGFA. Los símbolos en el extremo superior derecho. La significancia estadística es como se indica en la figura 3.

Por otro lado, la abundancia de c-myc durante los primeros minutos post hepatectomía se mantiene constante durante las primeras 3 horas, sin embargo, el tratamiento con adenosina, promovió un incremento abrupto de la proteína de este proto-oncogen, dando por resultado un aumento significativo a los 30 minutos de por lo menos 4 veces sobre el grupo control y sobre el grupo sujeto a hepatectomia parcial (**Fig. 7C**).

Efecto de la HP y el tratamiento con adenosina sobre la expresión de los receptores de adenosina.

La presencia de los cuatro subtipos de los receptores de adenosina: A1, A2a, A2b y A3 se cuantificó en el homogenado total del hígado a través del Western blot. (**Fig. 8**) Todos los subtipos fueron detectables en los grupos controles. Los subtipos A1, A2a y A2b no cambiaron su expresión significativamente, ni en el curso temporal dentro de las primeras 72 horas posteriores a la cirugía, ni con el tratamiento de adenosina. De hecho, el receptor A3 fue solo ligeramente detectable, manteniéndose fuera de los límites de cuantificación tanto del fotodocumentador, como de su software (**Fig. 8C**).

Discusión

La adenosina es considerada una molécula autocoide con una amplia diversidad de papeles biológicos, y posiblemente actúa como un regulador del metabolismo hepático (Chagoya de Sánchez, et.al., 1993) Este nucleósido tiene efectos farmacológicos interesantes en el hígado de la rata, ya que puede aumentar los niveles de ATP y carga energética *in vivo* (Chagoya de Sánchez, et.al., 1972), así como estimular el metabolismo oxidativo en la mitocondria en animales control (Hernández-Muñoz et.al., 1990, 1992, 1994), revirtiendo la cirrosis hepática por la restauración del potencial proliferativo celular. Por lo tanto, el presente trabajo es un intento por

FIGURA 7

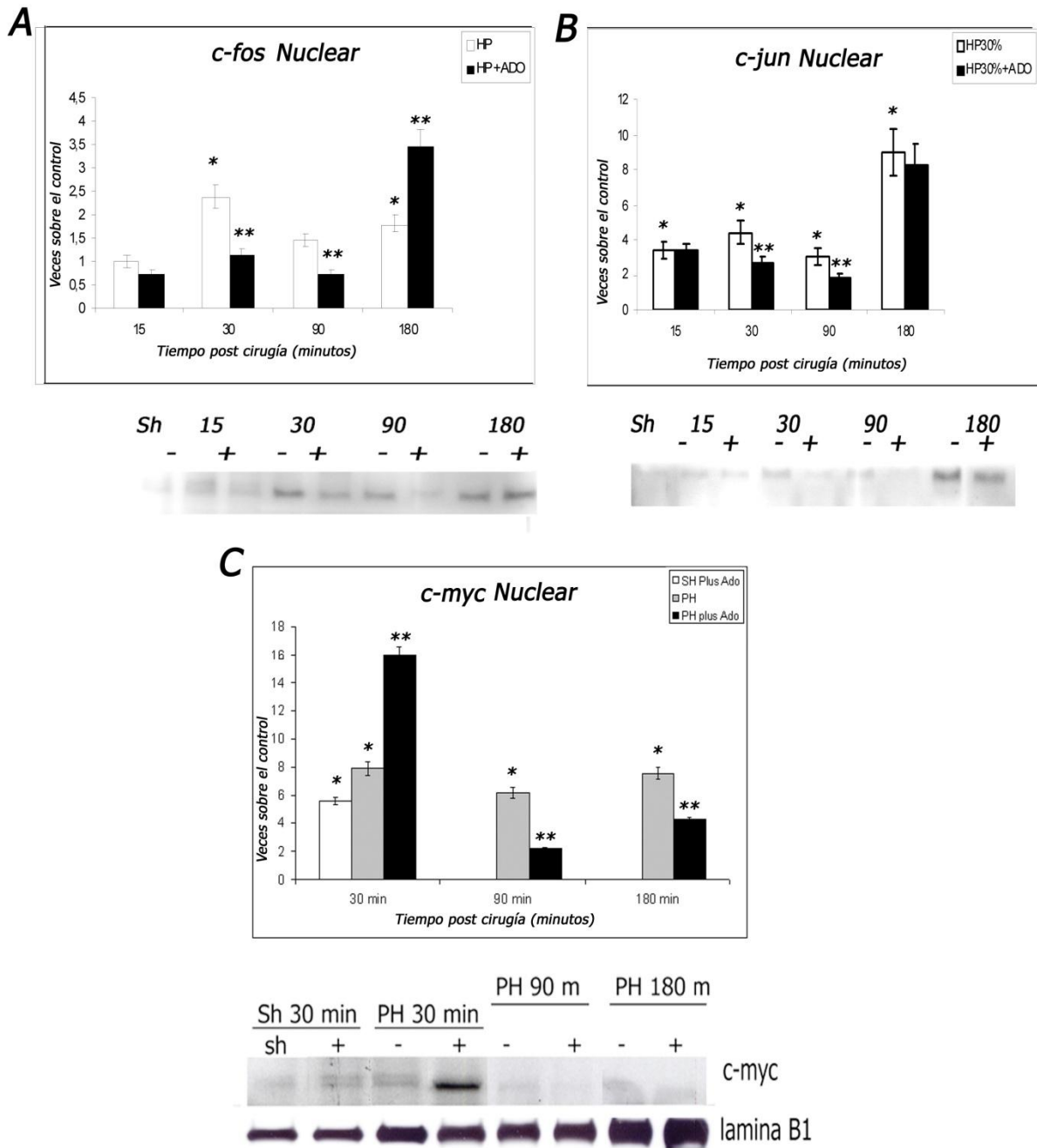


Figura 7. Western blot de efecto de la hepatectomía parcial sobre la expresión nuclear de los protooncogenes c-myc, c-fos y c-jun. Las graficas corresponden a el promedio del análisis densitométrico \pm error estándar. Se hicieron al menos 4 observaciones independientes por cada punto en la gráfica. Se normalizaron como en la figura 2. Los valores del control son (en UDO/mm²) 4012 para c-myc, 3800 para c-fos y 2800 para c-jun. Los símbolos en el extremo superior derecho. La significancia estadística es como se indica en la figura 3.

extender nuestro conocimiento de los mecanismos involucrados que participan en la estimulación producida por el nucleósido en las células hepáticas.

FIGURA 8

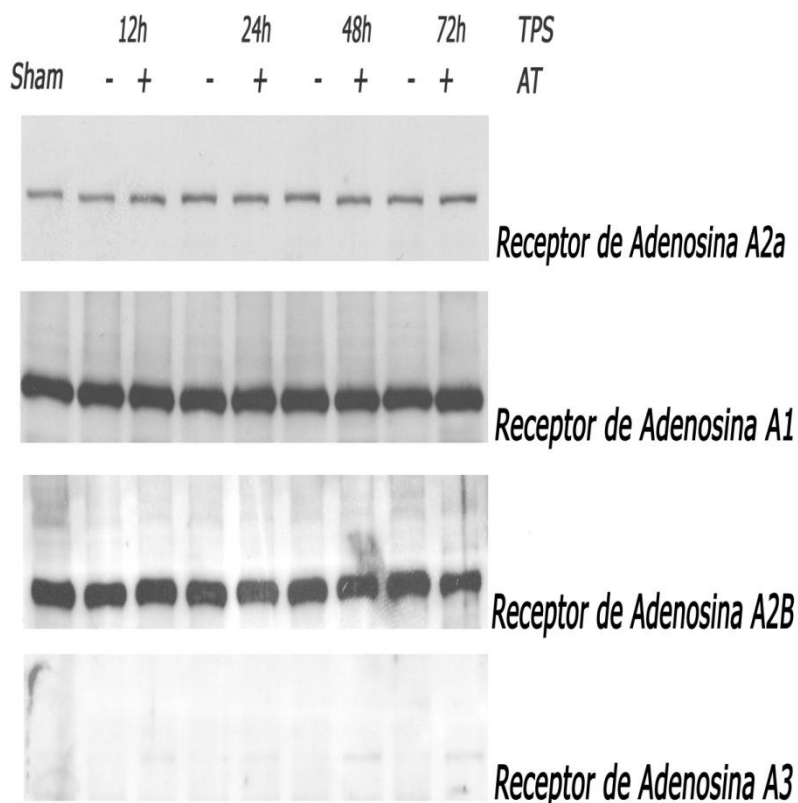


Figura 8. Western blot de los receptores de adenosina A1, A2a, A2b y A3 en homogenado total de hígado, de animales sujetos a hepatectomía parcial y hepatectomía parcial más el tratamiento de adenosina i.p.. Se cargo una mezcla de 4 individuos por tiempo y por grupo. TPS = tiempo posterior a la cirugía y AT = tratamiento con adenosina.

Nuestros resultados indican que la adenosina es capaz de acelerar e incrementar la regeneración hepática inducida por la resección de un tercio de hígado. (Tabla 1, Figura 1, Figura 2) modificando la regulación temporal del ciclo celular. De hecho, la adenosina afecta profundamente el perfil de expresión que presentan las ciclinas D1, E, A y B1, así como lo niveles de las proteínas inhibidoras del ciclo celular $p21^{cip/kip}$ y $p27^{cip/kip}$. Durante la regeneración hepática, $p21^{cip/kip}$ se indujo durante la fase prereplicativa (G1) y se expresó máximamente durante la síntesis de DNA del hepatocito. Por su parte $p27^{cip/kip}$ esta

presente en el hígado quiescente y es mínimamente inducido por la hepatectomía parcial durante los primeros días post cirugía. (Albretch, et.al., 1998) Se acepta, en el caso de p21^{cip/kip} que su papel se define más bien como regulador del ciclo celular, y aunque ha sido descrito como inhibidor de la proliferación (Blagosklonny, 2002; Coqueret, 2003), su unión al complejo ciclina D1/cdk-4,6 es necesario para que el complejo sea traslocado del citoplasma al núcleo. (Albretch, et.al., 1998). La administración de adenosina promueve una alteración profunda del perfil de expresión de p21^{cip/kip}, aumentando junto con los niveles de la ciclina D1, a las 12 y a las 24 post cirugía. Esta coincidencia en temporalidad sugiere que a pesar de la potenciación de la proliferación ocasionada por el nucleósido, el sistema aun es susceptible del control del ciclo celular; lo cual es confirmado por la elevación a las 48 horas de p27^{cip/kip} (Fig. 4E y 4F respectivamente). El perfil de expresión nuclear de las ciclinas, obtenido con la resección de un tercio del hígado y el tratamiento con adenosina, es semejante al perfil encontrado en resecciones más grandes, lo cual concuerda en la idea de que p21^{cip/kip} es un regulador de la tasa proliferativa durante la fase G₁ del ciclo celular (Albretch, et.al., 1998).

Acorde a nuestros datos, la adenosina no actúa como un mitógeno por si mismo, sin embargo ejerce su acción controlando la progresión del ciclo celular, acortando la fase G₁/S y el tiempo requerido para la división celular durante la regeneración hepática, involucrando un cambio en el perfil de abundancia nuclear de las ciclinas reguladoras de la proliferación (Ehrenfried et.al., 1997; Schwabe et.al., 2003). La fosforilación de la Rb es un bien conocido punto de control de la proliferación y el tratamiento con adenosina parece alterarlo, una vez que el hígado ha alcanzado el tiempo optimo para la división celular, aunque se requiere de una caracterización más cuidadosa al respecto, las evidencias conjuntadas en este trabajo, sugieren a este punto regulatorio, como un blanco potencial para la acción de la adenosina, dado que pRB baja su concentración en el tejido de forma muy semejante a la caída que presentan en núcleo las proteínas E2F (Fig. 5). A pesar del hecho de que la familia E2F incluye proteínas que actúan como inhibidores de la proliferación celular, la sobre expresión de E2F-1, 2 y 3 pueden dirigir a las células quiescentes a iniciar un estado proliferativo (Trimarchi y Lees, 2002). La adenosina cambia los perfiles de expresión nuclear de E2F-1 y E2F-3 (Fig. 5) posiblemente debido a la aceleración en el perfil de expresión de las ciclinas. A pesar del doble papel que se le ha

atribuido a E2F-1 durante la regeneración hepática en roedores ([Conner et.al., 2000](#); [Stanelle y Putzer, 2006](#)) la adenosina puede promover un desenlace temprano de la proliferación hepática consecuentando en la acumulación nuclear de E2F-1. Esta molécula parece jugar un papel importante en el control de la división celular durante los periodos de proliferación robusta, donde un incremento temprano de la actividad transcripcional de E2F-3 aparece después de la hepatectomía de dos tercios. Sin embargo, el papel de estos factores transcripcionales en el curso temporal después de la resección hepática de un tercio, aún no es claro. De hecho, nuestros datos revelan una falta de correlación temporal entre la acumulación nuclear de E2F-1 y E2F-3 en el presente modelo experimental (Fig. 5). Debido a que la adenosina acelera la proliferación hepática mientras aumenta exclusivamente la abundancia nuclear de E2F-1, suponemos que este factor se encuentra mayormente asociado al control de la división celular del hígado después de una hepatectomía parcial de un tercio.

Dada la importancia de la adenosina como molécula vasodilatadora ([Lautt et.al., 1985](#)) creemos que el nucleósido puede cambiar la biodisponibilidad y/o la distribución de los factores de crecimiento que controlan la regeneración hepática. Entre ellos, el Factor de Crecimiento Hepático (HGF) ha sido identificado como el mitógeno más importante para que las células hepáticas puedan pasar el punto de restricción (R) que se encuentra en la fase G₁/S ([Michaelopoulos y Zarnegav, 1992](#); [Michaelopoulos y DeFrances, 1997](#); [Michaelopoulos G., 2007](#)). De hecho, el HGF fue descrito como un mitógeno completo y ha sido propuesto como uno de los principales controladores de la regeneración hepática ([Kaibori et.al., 2003](#); [Okajima et.al., 1997](#)). Los datos recogidos en el presente trabajo no obtienen una diferencia significativa entre los grupos hepatectomizados y los grupos que además de la cirugía fueron sometidos a la administración de la adenosina, con respecto al los niveles séricos y/o hepáticos del Factor de Crecimiento Transformante alfa (TGF- α) y el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) –datos no mostrados—. Sin embargo, el nucleósido si es capaz de aumentar tanto los niveles hepáticos, como séricos del HGF, lo cual correlaciona con un incremento en la expresión de su receptor c-Met en la membrana plasmática (Fig. 6). En el hígado, la participación de la proteasa HGFLA es necesaria para que el HGF pase a su forma activa de heterodimética ([Miyazawa et.al., 1994](#)). Debido a que el nucleósido aumenta significativamente los niveles de esta proteasa en el tejido, es posible que exista alguna retroalimentación que regule la abundancia en el tejido de

HGF/HGFLA (Fig. 6). También es interesante, que los animales sham que recibieron adenosina, muestren un incremento en los niveles séricos de HGF, posiblemente exacerbando el proceso de cicatrización estimulado por la laparotomía. Estos datos en conjunto, podrían indicar que la adenosina directamente induce la producción y/o liberación del HGF, pudiendo derivar un tema de estudio aparte, enfocando a identificar las células que producen el HGF por periodos prolongados de tiempo, de forma semejante a los datos encontrados en el modelo de inducción de cirrosis micronodular por administración de CCl_4 (datos no publicados). Nuestros datos muestran que los niveles de HGF se incrementó por la administración de adenosina después de que se alcanzó el pico máximo de síntesis de DNA, lo cual podría indicar que el HGF no está jugando un papel importante en los efectos de la adenosina. Sin embargo, debido a que no se conoce bien el curso temporal de la expresión de HGF posterior a una hepatectomía de un tercio, podemos especular que el decremento temprano de los niveles de HGF y c-met inducido por la adenosina, es debido al decremento de la actividad transcripcional, al inicio de la síntesis de DNA (Fig. 6). Más aun, el incremento de los niveles de HGF promovido por el nucleósido podría estar más relacionado con otras acciones de este factor de crecimiento, tales como potenciar la respuesta inmune, atenuación de la inflamación, la necrosis y la apoptosis etc., como ya ha sido descrito anteriormente (Fausto N., 2000).

La expresión de las ciclinas D y E, dependen grandemente de la expresión del protooncogen c-jun (Ehrenfried et.al., 1997, Schwabe et.al., 2003). De hecho ha sido descrita una clara conexión entre las ciclinas del ciclo celular y la expresión de protooncogenes (Schwabe et.al., 2003). En este trabajo encontramos que la adenosina disminuye tempranamente los niveles de c-fos (Fig. 7). Este resultado puede ser una evidencia indirecta de una conformación alterada del factor transcripcional AP-1, aunque el nucleósido acelera la transición de la fase G_1/S del ciclo celular, y por lo tanto promueve una traslocación temprana de las ciclinas A y B_1 al núcleo, lo cual acelera la mitosis sólo en las células 'cebadadas' para proliferar.

El proto-oncogen c-myc es uno de los principales reguladores de la proliferación tanto en la regeneración del hígado adulto, como en el crecimiento fetal (Sanders y Gruppuso, 2006). Nuestros datos muestran un incremento muy temprano (30 minutos post cirugía) de este proto-oncogen causado por la administración del nucleósido, incluso

en los animales controles (Fig. 7). Este aumento de c-myc por la adenosina, puede constituir el principal mecanismo bajo el cual, el nucleósido ejerce sus efectos sobre la proliferación, ya que c-myc es un poderoso inductor de la síntesis de DNA (Conner et.al., 2003; Sheen y Dickson, 2002) involucrado en la generación de células poliploides durante la carcinogénesis (Santoni-Rigiú, et.al., 1999): Aunque la delección de c-myc no presenta defectos en la regeneración hepática de ratones, (Li. et.al., 2006) su sobre-expresión si produce una potenciación en la proliferación (Santoni-Rigiú, et.al., 1999). Por lo tanto, la adenosina puede potenciar la síntesis de DNA a través de la sobre expresión de c-myc, facilitando la transición de G₁/S controlada por el punto de verificación Rb/E2F.

En el tejido hepático, un cierto nivel de adenosina se mantiene en el medio extracelular (Pastor-Anglada et.al., 1998) que interactúa con sus receptores específicos (A1, A2a, A2b y A3). Con nuestro abordaje experimental, los receptores de adenosina no cambiaron su expresión de forma significativa bajo nuestras condiciones experimentales, sin embargo no es posible descartar su participación en las acciones del nucleósido, aunque es evidente que la presencia del receptor A3 es nula en nuestro modelo experimental y si el resto de los receptores tiene participación activa, esta no depende de los cambios en su expresión durante las 72 horas posteriores a la hepatectomía parcial.

Por otro lado, es posible estimular la proliferación de los hepatocitos in vitro a través de la estimulación del receptor purinérgico P2Y con ATP involucrando la participación de AP-1 y ciclina D1 (Thevananther et.al., 2004). Esto sugiere que los niveles extracelulares de ATP conforman una señal mitogénica (Thevananther et.al., 2004), que puede mediar los efectos que estudiamos en este trabajo, ya que la administración de adenosina incrementa los niveles de ATP y promueve un estado redox más oxidado (NAD/NADH par redox) en animales controles, (Chagoya de Sánchez, 1972; García-Sainz et.al., 1980) y también restaura la energía disponible en el hígado cirrótico (Hernández-Muñoz et.al., 1990, 1994). Si la adenosina acelera la progresión del ciclo celular en la regeneración hepática a través del aumento en los niveles energéticos y potencial redox, es un tema actual de estudio en el laboratorio.

En conclusión, la administración de adenosina a los animales sujetos a una hepatectomía parcial no solo acelera la proliferación celular, sino también incrementa la tasa de mitosis. Esta aceleración en el proceso de hiperplasia hepática, inducido por el

nucleósido, es altamente regulado y parece ser dependiente principalmente de la expresión coordinada de c-myc, E2F y las ciclinas del ciclo celular, además de asociarse a un aumento en los tiempos tardíos de HGF. Los efectos de la adenosina pueden estar muy relacionados con los cambios en el flujo hemodinámico y los cambios metabólicos en el hígado proliferativo, probablemente a través de la interacción con sus receptores y/o a través de los receptores purinérgicos involucrando un mecanismo semejante al reportado para el ATP.

Perspectivas

El objetivo cubierto en el presente trabajo fue demostrar la potenciación de la proliferación hepática, causada por la administración exógena de adenosina, dentro del modelo de hepatectomía parcial. Si bien aun queda por explorar el mecanismo exacto que involucra el nucleósido, podemos establecer al menos 4 líneas independientes de investigación futura.

- 1) El efecto de la adenosina sobre el aumento en la degradación de la matriz extracelular, descrito anteriormente en el modelo de cirrosis hepática, ([Chagoya de Sanchez et.al., 1991](#); [Hernandez Muñoz et.al., 2001](#)) establece un aumento en la actividad de las metaloproteasas MMP-1, 3 y 9. Así como una disminución de los respectivos inhibidores TIMPS. Queda esclarecer si este efecto, en primer lugar es exclusivo en MMPs o si el nucleósido aumenta (directa o indirectamente) la actividad de otras proteasas, particularmente TACE/ADAM 17 que permite la pasar a la forma activa a la forma de TGF- α anclada a la matriz extracelular. Este resultado, además de identificar otro posible blanco de la adenosina, permitiría establecer si la comunicación entre el trinomio célula de Kupffer, matriz extracelular y el hepatocito adquiere una forma más dinámica que la propuesta actual ([Yang L. et.al.,2005](#)), donde el macrófago hepático existe sólo como un "sensibilizador" del hepatocito ante los factores de crecimiento e interleucina 6.
- 2) La adenosina promueve un drástico aumento de las ciclinas D1 y E, en los animales hepatectomizados. Por un lado se sabe que el complejo ciclina E/cdk-2

- 3) puede fosforilar los blancos propios del complejo ciclina D1/cdk-4,6 ([Malumbres 2004](#)). En este punto podemos especular que el mecanismo que involucra el nucleósido, promueve una forma distinta de regulación del ciclo celular donde se activen ambos complejos al mismo tiempo, existiendo una sinergia en la fosforilación de sus proteínas blanco, lo cual reduce de forma significativa, el tiempo requerido para la síntesis de DNA y la duplicación del materia genético. El modelo de un tercio de hepatectomía parcial, ofrece la posibilidad de explorar esta regulación acoplando el uso del siRNAm, y el Far-Western Blot, para inicial el estudio de la interacción proteína-proteína, entre los complejos ciclina E/cdk-2 y pRb, y otros.

- 4) Existen evidencias de que esta ciclina puede funcionar en al menos dos formas, la primera a través de la asociación de la proteína de 56 kd con el cdk-2 para formar el complejo proteína-quinasa clásico. Por otro lado, se han descrito recientemente un grupo de isoformas de la ciclina E menores a 25 kd. Estas isoformas son producto de un procesamiento proteolítico de la proteína de 56 kd, y funcionan predominantemente en sistemas de proliferación muy alta, con ciclo celular bifásico, como el caso de tumores ([Stanelle R., 2006](#)). Dentro del presente trabajo, se encontró una reacción altamente específica dentro del western blot para ciclina E, a la altura de 25 kd. El patrón es semejante al que sigue el resultado mostrado, sin embargo es posible que estas isoformas actúen dentro del modelo de regeneración hepática y posiblemente sean reguladas por el nucleósido, ya sea directa o indirectamente. Los puntos 2 y 3 exponen dos ideas de investigación mutuamente excluyentes en apariencia, sin embargo son un blanco de investigación atractivo por las implicaciones terapéuticas que pueden derivar.

- 5) Un último aspecto en el cual se debe profundizar, es en la regulación de los factores transcripcionales que en apariencia son sensibles a la administración del nucleósido, como es el caso de c-myc y NF- κ B. Hasta el momento, sólo se ha visualizado la translocación de los complejos al núcleo, lo cual aunque es un indicio de su actividad –junto con el aumento en los parámetros proliferativos—, no se ha dirigido un ensayo para probar que el nucleósido efectivamente aumenta la

actividad transcripcional, así mismo sería interesante revisar si existe algún cambio en los genes blanco de dichos complejos.

Apéndice A

Proteína Blanco	Especie del Huésped	Tipo
Ciclina D1	ratón	monoclonal
Cliclina D1	Conejo	Policlonal
Cicliina E	Conejo	policlonal
Ciclina A	Conejo	policlonal
Ciclina B1	Conejo	policlonal
P21	Conejo	policlonal
P27	Conejo	policlonal
PCNA	Conejo	policlonal
Ki-67	Ratón	Monoclonal
pRb	Raton	monoclonal
E2F-1	Conejo	policlonal
E2F-3	Raton	monoclonal
DP-1	Conejo	policlonal
HGF	Conejo	policlonal
HGF-a	Conejo	policlonal
c-Met	Conejo	policlonal
c-myc	Raton	monoclonal
c-fos	Raton	monoclonal
c-jun	Raton	monoclonal
A1	Conejo	Policlonal
A2a	Conejo	Policlonal
A2b	Conejo	Policlonal
A3	Conejo	Policlonal
P65	Conejo	Policlonal
P65	Raton	monoclonal
P50	Conejo	Policlonal
P50	Raton	monoclonal
TNF-a	Conejo	Policlonal
TNF-a	Raton	monoclonal

Tabla A. Listado de anticuerpos utilizados. Fuente Santa Cruz Biotechnology, CA, USA.

Célula	Función	Hígado Embrionario	Hígado normal	Hígado en Regeneración
Hepatocito	Regulador de la presión osmótica	<input type="checkbox"/> -fetoproteína	Síntesis de albúmina y la mayor parte de las proteínas plasmáticas	Decremento transitorio en la síntesis de albúmina
			Síntesis de bilirrubina	Decremento en la síntesis de bilirrubina
	Producción exócrina	No activa	Síntesis de sales biliares Secreción de bilis	
	Metabolismo de desechos nitrogenados		Producción de Urea	
	Homeostasis de glóbulos rojos	Producción de eritrocitos	Captación de eritrocitos viejos por parte del macrófago residente.	
	Metabolismo de Carbohidratos	Casi exclusivamente glicolítico	El hígado remueve el exceso de glucosa después de una comida, en la fase de absorción, almacenándolo en forma de glucógeno. Entre comidas, el hígado libera glucosa, en la fase de post absorción para el uso de órganos dependientes de glucosa como el SNC y los eritrocitos	Hipoglicemia marcada, aunque transitoria y proporcional al grado de resección hepática. El gen GcK de la glucocinasa baja su expresión 2 veces sobre la basal y las hexocinasas aumentan su expresión
	Homeostasis de la concentración de aminoácidos libres en suero		Captación de aminoácidos para la síntesis de glucosa, removiendo los grupos nitrogenados por ureagenesis. Liberación de aminoácidos y	Aumento excesivamente de la concentración de aminoácidos libres en sangre
	Metabolismo de lípidos		Procesamiento de lípidos y producción de cuerpos cetónicos	Aumento de la B-oxidación y expresión de catalasa.
	Metabolismo y eliminación de Xenobióticos	No activa	El hígado es el centro de síntesis de transferina, hemopexina y de los factores de coagulación Sistema de citocromos, Reacciones de Fase I., Hidroxilación, Dealquilación, Deshalogenación, Isomerización, Hidrólisis, Reacciones de Fase II Glucoronidación, Glicosilación, Sulfatación, Mutilación, Acetilación, Conjugación de Glutatión	
Célula de Ito			Acumulación de retinol	Activación del catabolismo de retinoides
			Síntesis de las proteínas de la matriz extracelular	
			Contracción y regulación del flujo sanguíneo en los sinusoides	
			Expresión y secreción de Factores de Crecimiento	Secreción de HGF de forma parácrina
Célula de Kupffer (Macrófago Residente)			Fagocitosis de partículas >0.1µm, microorganismos, células tumorales, eritrocitos viejos. Presentación y secuestro de antígenos MHC-II	Liberación de il-6, il-1 y TNFa durante los eventos proliferativos
			Producción de interleucinas, TNF-a, eicosanoidese interferon a y b	
Célula Endotelial			Barrera entre la sangre y el hepatocito	Cambios en las primeras horas post hepatectomía

Tabla 3. Resumen comparativo de las funciones hepáticas durante los tres estados metabólicos que se han reportado para el órgano. La degradación de colores indicada entre rojo y amarillo, representa la concentración de oxígeno y nutrientes dentro del gradiente generado por la posición del hepatocito. El color azul corresponde a la zona I de mayor oxigenación y el rojo a la zona III, de menor aporte.

Referencias

1. Alberts B et al. 2002. Molecular biology of the cell. 4th Edition. Chapter 17.
2. Albrecht JH, Meyer AH, Hu MY. Regulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/Cip1/Sdi1) gene expression in hepatic regeneration. *Hepatology*. 1997 Mar;25(3):557-63.
3. Ankoma Sey, (1999), Hepatic regeneration: revisiting the Myth of Prometheus, *New Physiol. Sci*, vol 14: 149-155.
4. Arthur Zimmermann, (2002), Liver regeneration: the emergence of new pathways, *Med. Sci. Mon.* 8(3) RA53-63
5. Armendáriz, 1990, Regulation of TGF beta gene expression in rat liver intoxicated with carbon tetrachloride. *FASEB J.* Feb 1;4(2):215-21.
6. Black D., (2004), Molecular and cellular features of hepatic regeneration, *J. Sur. Res.*, 117: 306-315.
7. Bojorquez López LN. La regulación del factor de transcripción NF-κB. Un mediador molecular en el proceso inflamatorio *Rev Invest Clin* 2004; 56(1) : 83-92
8. Brakebush Cord, et al., 2002, Integrins in invasive growth, *The Journal of Clinical Investigation*, Vol 109, no. 8, pp. 999-1006
9. Marie Classon and Ed Harlow, 2002, *The retinoblastoma tumor suppressor in development and cancer*, *Nature Reviews Cancer*, vol 2, p. 910-917.
10. Victoria Chagoya-de Sánchez, (2007), Nuevo fármaco para el tratamiento de la cirrosis *Gac Méd Méx*, 143 (1).
11. Diehl AM and Rai RM (1996). Regulation of signal transduction during liver regeneration. *FASEB J.* 10: 215-227.
12. Druker R., (2005) *Fisiología Médica, Manual Moderno*. México.
13. Fausto N., 2000, *Liver regeneration*, *J. Hepatol.*, 32 (suplemento) 19-31.
14. Nelson Fausto, (1999), Lesson from genetically engineered animal modelsV Knocking ou genes to study liver.
15. Francavilla A., (1997), The In vivo effect of hepatotrophic factors augments liver regeneration, hepatocyte growth factor and insulin like growth factor II on liver natural killer cell function, *Hepatology* 25: 411-415.
16. Gao F., 2006, Proteomic analysis of the transition from quiescent to proliferative stages in rat liver hepatectomy model., *Proteomics*, 6 : 3075-3086.

17. Greger R. and Windhorst U., 1996, *Comprehensive Human Physiology*, Vol 2. From Cellular mechanism to integration, Springer ed.
18. Hernández Muñoz R., et. al.(2001), Adenosine reverses a preestablished CCl₄ induced micronodular cirrosis though enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell prolilferation in rats, *Hepatology* 34: 677-687
19. Hideaki Kamata, 2005, Reactive Oxygen Species Promote TNF- α Induced Death and Sustained JNK Activation by Inhibiting MAP Kinase Phosphatases. *Cell*, Vol. 120, 649–661, March 11.
20. Higgins GM and Anderson RM (1931). Experimental pathology of the liver. *Arch. Pathol.* 12: 186-202
21. James LP, Kurten RC, Lamps LW, McCullough S, Hinson JA. Tumour necrosis factor receptor 1 and hepatocyte regeneration in acetaminophen toxicity: a kinetic study of proliferating cell nuclear antigen and cytokine expression. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005 Jul;97(1):8-14.
22. Jean Campbell, (2001) Expresision of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration, *J. Clin. Invest* 107:1285-1292.
23. Jeffrey M.,2002, Sibling *Rivalry in the E2F family*, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol 3 p.11-20.
24. Joyce D., 2001, *NF- κ B and Cell cycle regulation: the cyclin connection*. *Cytokine and Growth Factors Reviews* no. 12 p. 73-90.
25. Kaibori N., (2003), Effect of exogenously administered HGF activator in liver regeneration, *Transplantation proceedings* 35, 439-440.
26. Kaibori N., (2002), Impairment of activation of hepatocyte growth factor precursor into matureform in rats with liver cirrhosis, *Journal or surgical research* 106, 108-114.
27. Knight B, Matthews VB, Akhurst B, Croager EJ, Klinken E, Abraham LJ, Olynyk JK, Yeoh G. *Immunol.* Liver inflammation and cytokine production, but not acute phase protein synthesis, accompany the adult liver progenitor (oval) cell response to chronic liver injury. *Cell Biol.* 2005 Aug;83(4):364-74.
28. Koniaris LG, 2003, Liver regeneration. *J Am Coll Surg.* Oct;197(4):634-59.
29. Kraft C. 2003. Mitotic entry: tipping the balance. *Curr Biol.* 13(11):R445-6.
30. Lees J., 1999, *Tossing monkeys wrenches into the clock: New ways of treating cancer*.
31. Lewin B. 2000. *Genes VII*. Chapter 27.
32. Lodish H, et al. 2000. *Molecular cell biology*. 4THEdition. Chapter 13.

33. Locker J., (2003) A common set of immediate early response genes in liver regeneration and hyperplasia. *Hepatology*: 38 314-325
34. MacEwan D., (2002), TNF receptor subtype signaling: Differences and cellular consequences, *Cellular Signalling* 14: 477-492.
35. Malcom Alison, 1986, Regulation of hepatic growth, *Physiol Rev.* Jul;66(3):499-541.
36. *Raza Malik, Clare Selden and Humphrey Hodgson, 2002, The role of non-parenchymal cells in liver growth seminars in CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY*, Vol. 13,: pp. 425–431 doi:10.1016/S1084–9521(02)00130-1
37. Raza Malik et.al., (2003) Triiodothyronine enhances the regenerative capacity of the liver following partial hepatectomy, *Hepatology*, 37:79-86
38. Malik R, Selden C, Hodgson H. The role of non-parenchymal cells in liver growth. *Semin Cell Dev Biol.* 2002 Dec;13(6):425-31. Review.
39. Mendieta Condado E., Pichardo-Olvera M., Chagoya de Sánchez V., Sánchez Sevilla L., Hernández Muñoz R. 2009, ADENOSINE ADMINISTRATION CAN ACCELERATE THE CELL CYCLE, DURING RAT LIVER REGENERATION INDUCED BY one third HEPATECTOMY. *J Pharmacol Exp Ther.* Oct;331(1):122-32.
40. Michaelopoulos G.K. and Zarnegar, (1992) Hepatocyte Growth Factor, *Hepatology* vol. 15, 149-155.
41. Michaelopoulos G. K. (1990) Liver regeneration: molecular mechanism of growth control, *The FASEB J.*, vol 4, pp. 176-187.
42. Michaelopoulos G., De Frances M., (1997), Liver Regeneration, *Science*, 176: 60-66.
43. Mizejewski, 1999, Role of integrins in cancer: Survey of expression pattern, *The Journal of Experimental Biology Medicine*, vol 222, pp. 124-138.
44. Molnar C, Garcia-Trevijano ER, Ludwiczek O, Talabot D, Kaser A, Mato JM, Fritsche G, Weiss G, Gabay C, Avila MA, Tilg H. Anti-inflammatory effects of hepatocyte growth factor: induction of interleukin-1 receptor antagonist. *Eur Cytokine Netw.* 2004 Oct-Dec;15(4):303-11.
45. Ohi R, Gould KL. 1999. Regulating the onset of mitosis. *Curr Opin Cell Biol.* 11(2):267-73.
46. Okajima Ai, et.al., (1997) Induction of hepatocyte growth factor activator messenger RNA in the liver following tissue injury and acute inflammation. *Hepatology*, 25: 97-102.
47. Sanjeev Gupta, (2000) Hepatic polyploidy and liver growth, *Seminars in Cancer Biology*, Vol., 10: 161-171

48. Schoemaker MH, Gommans WM, Conde de la Rosa L, Homan M, Klok P, Trautwein C, van Goor H, Poelstra K, Haisma HJ, Jansen PL, Moshage H. Resistance of rat hepatocytes against bile acid-induced apoptosis in cholestatic liver injury is due to nuclear factor-kappa B activation. *J Hepatol.* 2003 Aug;39(2):153-61.
49. Schindler C., (1999), Cytokines and JAK-STAT signaling, *Experimental cell research* 253:7-14
50. Shishiro Oe, et.al. (2003), A trial on regenerating therapy of rat liver cirrhosis by control release of hepatocyte growth factor., *Journal of control release*, 88, pp 193-200.
51. Shimizu et. al., (2001), Mechanism of retarded liver regeneration in plasminogen activator deficient mice: Impaired activation of hepatocyte growth factor after Fas-mediated massive hepatic apoptosis, *Hepatology* 33, 569-576.
52. Schwabe R.F., (2003), C-jun-N-terminal kinase drives cyclin D1 expression and proliferation during liver regeneration, *Hepatology*, 37:824-832.
53. Schrum, 2001, Autocrine expression of activated transforming growth factor-beta(1) induces apoptosis in normal rat liver, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Jan;280(1):G139
54. Sibley DR1988, Phosphorylation of cell surface receptors: a mechanism for regulating signal transduction pathways. *Endocr Rev.* Feb;9(1):38-56.
55. Smits VA, Medema RH. 2001. Checking out the G(2)/M transition. *Biochim Biophys Acta.* 1519(1-2):1-12.
56. Stanelle J.,2006, *E2F1- induced apoptosis: turning killers into therapeutics*, *TRENDS in Medical Medicine* vol. 12 no. 4 p. 177-185.
57. Strick-Marchand*, Serban Morosan†, Pierre Charneau‡, Dina Kremsdorff†, and Mary C. Weiss, 2004, Bipotential mouse embryonic liver stem cell lines contribute to liver regeneration and differentiate as bile ducts and hepatocytes. 8360–8365 *PNAS* June 1, vol. 101 no. 22
58. Taub Rebecca, (2004), Liver Regeneration: from myth to mechanism, *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, vol 5: 836-847.
59. Taub R., 1996, *Liver regeneration 4: Transcriptional control of Liver Regeneration.* *FASEB J:* 10, 413-427.
60. Taub R., 2003, Hepatoprotection via the IL-6/Stat-3 Pathway, *J. Clin. Invest.* 112: 978-980 Taylor WR, Stark GR. 2001. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene.* 20(15):1803-15.
61. Teoh N, Field J, Sutton J, Farrell G. Dual role of tumor necrosis factor-alpha in hepatic ischemia-reperfusion injury: studies in tumor necrosis factor-alpha gene knockout mice. *Hepatology.* 2004 Feb;39(2):412-21.

62. Trautwein C, Will M, Kubicka S, Rakemann T, Flemming P, Manns MP. 2-acetaminofluorene blocks cell cycle progression after hepatectomy by p21 induction and lack of cyclin E expression. *Oncogene*. 1999 Nov 11;18(47):6443-53.
63. Vidal- Vanaclocha F., 1997, *Functional heterogeneity of liver tissue*, R.G. Landes Company.
64. Webber E., 1993, TGF- α expression during liver regeneration after partial hepatectomy and toxic injury and Potential interactions between TGF- α and HGF, *Hepatology*; 18, 1422-1433.
65. White P.,2004, Identification of transcriptional networks during liver regeneration, *JBC* in press
66. Withers P.C., 1992, *Comparative animal Physiology*, Saunders College Publishing. Australia.
67. Xu C.S., 2005, Expressed genes in regeneratong liver after partial hepatectomy, *World J. Gastroenterol.*, 11, (19) 2932-2940.
68. Yamashita, et.al.,(2002), Reduction of monocrotalina-induced injury by deleted variant of hepatocyte growth factor (dHGF) in rats, *Liver* 22: 302-307.
69. Yang L., et.al., 2005, NF- κ B activation in Kupffer cells after partial hepatectomy, *Am. J Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 289: G530-G538
70. Zhao R., et.al.,2005, Viral infections and cell cycle G2/M regulation, *Cell Research*, 15 (3): 143-149.
71. Zimmerts T., 2003, Massive liver growth in mice induced by systemic IL-6 administration, *Hepatology*: 38, 326-334.

Adenosine Administration Accelerates Progression of the Cell Cycle during Rat Liver Regeneration Induced by One-Third Hepatectomy

Edgar Mendieta-Condado, Mariana Pichardo-Olvera, Lourdes Sánchez-Sevilla, Victoria Chagoya de Sánchez, and Rolando Hernández-Muñoz

Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

Received May 27, 2009; accepted July 27, 2009

ABSTRACT

We have shown that adenosine administration is capable of reversing fibrosis in the carbon tetrachloride-induced rat cirrhotic liver, stimulating the diminished proliferative potential of the cirrhotic liver. To characterize adenosine actions on liver cellular proliferation, we used rats subjected to one-third partial hepatectomy (PH). In PH animals acutely administered with adenosine (25–200 mg/kg b.w.), parameters indicative of cell proliferation were determined. In addition, hepatocyte growth factor (HGF), epidermal growth factor, and transforming growth factor- α , cyclins, members of the E2F family, proto-oncogenes, and adenosine-receptors were determined through Western blot analyses. Adenosine (100 mg/kg body weight) induced an earlier increase in liver cell proliferation as evidenced by enhanced levels of proliferating cell nuclear antigen, nuclear Ki-67 antigen, and those for cyclins (D1, E, A, and B1), as well as by

an increased mitotic index. These effects were also accompanied for a long-lasting increase of serum and liver levels of HGF and liver expression of c-Met and HGF liver activator. Adenosine effects on cell proliferation could be mediated by an early increase in E2F-1 and by that of c-Myc, despite the fact that phosphorylation of the Rb protein and expression of E2F-3 were decreased. Moreover, the liver amount of specific receptors for adenosine was not significantly changed by PH and/or adenosine treatment. In conclusion, these data suggest that adenosine actions can accelerate and increase proliferation in a “primed” liver, mainly through enhancing c-Myc, E2F family, cell-cycle cyclins, and HGF expression. Therefore, these pharmacological adenosine effects suggest a modulating role for the nucleoside on mitogenic events once the liver has been triggered to proliferate.

Liver regeneration represents proliferation of highly differentiated cells in order to rapidly reconstitute the original functional mass of the organ even after 70% partial hepatectomy (PH) in rats. During regeneration, liver functions are compromised and limited to the minimum, depending on an equilibrium between the essential functions and the rate of cell proliferation tightly controlled in the remnant liver (Michalopoulos and DeFrances, 1997).

The PH has been a useful model to study liver regeneration for many years, given an ordered and synchronized proliferation of hepatic cells and involving various phases of the cell cycle (Michalopoulos and DeFrances, 1997). In rats subjected to PH, it is possible to establish different thresholds of proliferation, proportional to the extent of the removed liver

mass. Indeed, one-third PH produces a low proliferative burst, with diverse metabolic changes that differ from the maximum achieved with two-thirds PH (Hernández-Muñoz et al., 2003; López-Valencia et al., 2007), proving useful to assess effects of drugs with presumably stimulatory or inhibitory actions on cell proliferation.

We reported previously that adenosine administration (200 mg/kg b.w., administered intraperitoneally three times a week) can reverse a pre-established micronodular cirrhosis induced in rats by chronic CCl₄ treatment. The beneficial action of the nucleoside seems to rely on three major effects: an enhanced liver collagenolytic activity, recovery of the mitochondrial function, and restoration of the cell-proliferative potential of the cirrhotic liver (Hernández-Muñoz et al., 1992, 1994, 2001). However, the mechanisms underlying the stimulatory effect of adenosine on hepatocyte proliferation remain elusive, being extremely difficult to establish a cause-effect relationship. Adenosine administration increases liver

E.M.-C. was supported by a fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for Ph.D. studies.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://jpet.aspetjournals.org>.
doi:10.1124/jpet.109.156620.

ABBREVIATIONS: PH, partial hepatectomy; HGF, hepatocyte growth factor; HGFLA, HGF liver activator; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; TGF- α , transforming growth factor; TK, thymidine kinase; WB, Western blot; PBS, phosphate-buffered saline; ADU, arbitrary densitometry units.

thymidine kinase (TK) activity, mitosis, and the expression of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in cirrhotic rats, which readily indicate active liver cell proliferation (Hernández-Muñoz et al., 2001). However, the large temporal windows in the generation and recovery in the CCL4-induced cirrhosis model in rats do not allow us to study the time course of adenosine-induced stimulation of cell proliferation and the putative mechanisms involved here. Hence, the present study was addressed at assessing adenosine effects on liver regeneration induced by one-third PH, where the temporal sequence of proliferative events has been well characterized.

Based on the aforementioned, we believe that adenosine (directly or indirectly) can modify the progression of the cell cycle in hepatocytes already primed to proliferate. Hence, the main goal of the present study was to assess the effects of adenosine administration on the mechanisms involved in the PH-induced liver regeneration, mainly focused on the expression of cyclins and transcriptional factors involved in cell-cycle progression to gain some insight about what is occurring at the onset of rat cirrhosis where adenosine has shown a clear antifibrotic action (Hernández-Muñoz et al., 2001). Results strongly suggest that the nucleoside is capable of readily modulating liver regeneration through a direct effect involving regulators of the cell cycle, similar to that reported for other purine-related molecules, such as caffeine and *S*-adenosyl-methionine, as metabolic switches of the hepatocyte function (Bode and Dong, 2007; Martínez-Chantar et al., 2006; Pascale et al., 1991).

Materials and Methods

Materials. All antibodies used in this study were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). The enhanced chemiluminescence system (ECL Plus) was from GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK). The biotin-avidin system and the compatible BCA kit detergents were obtained from Pierce Biotechnology (Rockford, IL).

Animal Treatments. Male Wistar rats, weighing between 230 and 250 g, were housed in separated groups of four to five animals, with free access to laboratory chow and water in a 12:12-h light/dark cycle. All procedures were conducted in accordance with the *Institutional Guide for Animal Experimentation* (National University of Mexico). Animals were subjected to one third PH under light ether anesthesia, according to the technique described by Webber et al. (1993). Other PH groups were treated with adenosine (as a single intraperitoneal administration ranging from 25 to 200 mg/kg body weight immediately after surgery). The control group consisted in sham-operated rats. Animals were euthanized at selected times, and blood serum and liver samples were collected.

Liver Subcellular Fractionation. Liver total homogenate was obtained in a lysis buffer containing 20 mM HEPES, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 25 mM KCl, protease inhibitor cocktail, 1.4% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, and 2% Nonidet P-40. The cytosolic and plasma membrane fractions were isolated according to the protocol described by Aguilar-Delfín et al. (1996). Membrane proteins were solubilized in a buffer solution containing 100 mM Tris-HCl (pH 7.4) and protease (Roche-Sintex de México, Mexico City, Mexico), as well as phosphatase inhibitor cocktails (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 0.1% SDS, 0.05% Triton X-100, and 0.05% sodium deoxycholate. In the cytosolic fraction, the activity of TK was measured with [³H]thymidine (2 μCi/mmol; PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA) according to the method of Sauer and Wilmanns (1983).

Purification of Liver Nuclei and Nuclear Protein Preparation. Nuclear fraction was obtained by the method reported by Sindic et al. (2001). In brief, livers were homogenized in ice-cold 10

mM HEPES buffer, pH 7.5, containing 5 mM MgCl₂, 25 mM KCl, and the protease inhibitor cocktail. Homogenates were spun through a discontinuous sucrose gradient and resuspended in the indicated medium (Sindic et al., 2001). Protein quantification was determined with BCA kit detergents.

Western Blot. For this analysis, 30 μg of nuclear protein were loaded on each well. For serum samples, 25 μg of total protein with a PBS buffer (1:10 v/v) were loaded per well and separated in a 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Fifty micrograms of total homogenate and plasma membrane proteins were loaded and separated in 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to a nitrocellulose membrane for 2 h at a constant current of 250 mA/cm². Nonspecific sites were blocked with 1% casein and 1 and 0.3% gelatin in PBS-0.15% Tween 20 buffer. The nitrocellulose membranes then were incubated with monoclonal or polyclonal antibodies (each case indicated) against PCNA, nuclear Ki-67 antigen, cyclins D1, E, A, B1, p21, p27, E2F-1, and E2F-3, as well as c-Myc, c-Fos, and c-Jun overnight at 4°C. In addition, the goat polyclonal antibody for A3 adenosine receptor, rabbit polyclonal antibody for A1 adenosine receptor, rabbit polyclonal antibody for A2b receptor, and mouse monoclonal antibody for A2a receptor were also used. Thereafter, nitrocellulose membranes were washed five times with PBS-0.15% Tween 20 and probed with polyclonal anti-rabbit, anti-mouse, or anti-goat IgG1 antibodies bound to HRP (0.2 μg/ml) for 70 min at room temperature. The membranes were now incubated with ECL Plus and exposed on a photographic film. The images obtained were captured in a Gel Doc XR photo documenting system and analyzed with Quantity One software version 4.6.0 (Bio-Rad, Hercules, CA) to obtain the densitometry plots.

Mitotic Index. Fixed liver samples (10-μm thickness) were stained with hematoxylin-eosin. Mitotic figures were counted in 20 fields per slide using a 40× lens, and the mitotic index was defined as the average of the mitoses found per field (Hernández-Muñoz et al., 2001).

Calculations and Statistical Analysis. The gain of liver mass as a function of time after surgical resection was calculated as described by Diehl et al. (1990). All comparisons were done between means of the PH group and those of PH plus adenosine group using Sigma StatSoftware package version 3.5 for personal computers.

Results

Effects of Several Adenosine Dosage on Some Parameters Indicative of Liver Cell Proliferation When Administered to PH Rats. One third PH induced maximal increases of TK activity (5.3 ± 0.8 times over control) and of mitotic index (13.0 ± 3.5 times over control) at 24 and 48 h after surgery, respectively (Table 1). In addition, we recorded a recovery of $10.5 \pm 1.2\%$ of the original lost mass (30%) 72 h after PH (Table 1). Administration of adenosine to these animals increased the parameters indicative of liver proliferation even more. With the lowest doses tested (25 mg/kg b.w.), the effects were discrete and nonsignificant statistically; however, in the range of 50 to 100 mg, we achieved a significant increase of liver regeneration over rats only subjected to one third PH (Table 1). Unexpectedly, the highest adenosine doses (200 mg/kg b.w.) did not promote the maximal proliferative response (Table 1). Hence, we selected the dose of 100 mg/kg body weight to be administered to PH rats to find out possible mechanisms involved in the stimulatory action of the nucleoside on liver regeneration. Indeed, this adenosine dose administered to rats undergoing one-third PH, elicited a “robust” mitotic response as early as 24 h after surgery (for this experimental PH model), which was evidently higher than that found in PH rats receiving the aden-

TABLE 1

Parameters indicative of liver proliferation as a function of several adenosine (ADO) doses administered to 30% PH rats

Results are expressed as mean \pm S.E. for four independent observations per experimental group. Gain of liver mass is the percentage of recovered mass corresponding at 72 h after PH compared with the initial mass loss of 30%. TK activity is expressed as nanomoles of produced [^3H]TMP \cdot h $^{-1}$ \cdot mg $^{-1}$ of cytosolic protein, whereas the mitotic index corresponds to the average of the mitoses found per field (in 20 fields per slide) from liver samples stained with hematoxylin/eosin.

Treatment	Parameter of Liver Proliferation		
	Gain of Liver Mass	TK Activity	Mitotic Index
Sham + saline		0.25 \pm 0.03	0.4 \pm 0.1
Sham + 25 mg ADO		0.20 \pm 0.02	0.5 \pm 0.1
Sham + 50 mg ADO		0.27 \pm 0.03	0.6 \pm 0.2
Sham + 100 mg ADO		0.31 \pm 0.03	0.6 \pm 0.1
Sham + 200 mg ADO		0.26 \pm 0.03	0.4 \pm 0.1
PH + saline	10.5 \pm 1.2	1.32 \pm 0.19*	5.5 \pm 1.4*
PH + 25 mg ADO	12.4 \pm 1.4	1.23 \pm 0.21*	6.1 \pm 0.9*
PH + 50 mg ADO	15.3 \pm 1.6**	1.55 \pm 0.20**,**	6.1 \pm 1.2*
PH + 100 mg ADO	18.2 \pm 1.9**	2.66 \pm 0.37**,**	7.9 \pm 1.0*
PH + 200 mg ADO	14.9 \pm 1.3*	1.45 \pm 0.30*	6.2 \pm 1.1*

* $P < 0.01$ against the control (sham-operated) group; and ** $P < 0.01$ vs. PH rats only.

osine vehicle (Fig. 1). This stimulated mitosis in the remnant liver from PH rats and induced by the nucleoside was almost similar to that found in rats subjected to a larger PH (70% liver mass; data not shown). Figure 2 depicts the time course of the adenosine effects on the mitotic index and expression of PCNA and Ki-67. Whereas we found a mitotic peak at 48 h after surgery, in those animals concomitantly treated with adenosine, the maximal mitotic peak was achieved 24 h earlier. The effect of the nucleoside was also evident on PCNA expression, given that adenosine increased its levels more than three times over the group with PH alone (24 h after surgery; Fig. 2B). Mitotic cells were scanty in control rats, and adenosine treatment had no effect (Table 1; Fig. 2A). In addition, the nuclear Ki-67 antigen was progressively increased after PH, reaching a maximal peak at 72 h after surgery, which was also significantly increased by adenosine treatment at the time of the maximal mitotic index found in these remnant livers (48 h post-PH; Fig. 2C).

Effects of PH and Adenosine Treatment on Expression of Cyclins, p21 and p27. The PH-induced pattern of cyclin expression (namely D1, E, A, and B1), which are considered as main regulators of the cell cycle, was modified by the adenosine treatment (Fig. 3). Adenosine administration moved forward the increased levels of cyclins D1 and E (12 h after PH), enhancing their expression 5- and 10-fold, respectively, compared to rats that are hepatectomized (Fig. 3, A and B), whereas expression of cyclins A and B1 was less affected by the nucleoside (Fig. 3, C and D). Adenosine also increased the nuclear amount for the p21/Cip/Kip protein, a cell-cycle inhibitor, even higher than in PH alone (Fig. 3E). In addition, PH-induced enhancement of the p27/Cip/Kip protein was potentiated by treatment with the nucleoside (Fig. 3F). Sham-operated controls did not change expression of these proteins in function of the time, and adenosine administration to these control rats did not significantly modify these parameters (data not shown).

Effects of PH and Adenosine Treatment on Expression of Phosphorylated Rb Protein and of the Transcriptional Factors E2F-1 and E2F-3 and on Formation of the DP-1 Complex. The main target of the complex cyclin E/Cdk-2 and that of cyclin A/Cdk-2 is phosphorylation of Rb proteins, which release the transcriptional factors E2F and form the functional heterodimer DP-1 (Fig. 4). The amount of phosphorylated Rb protein (Ser 795) in liver homogenates

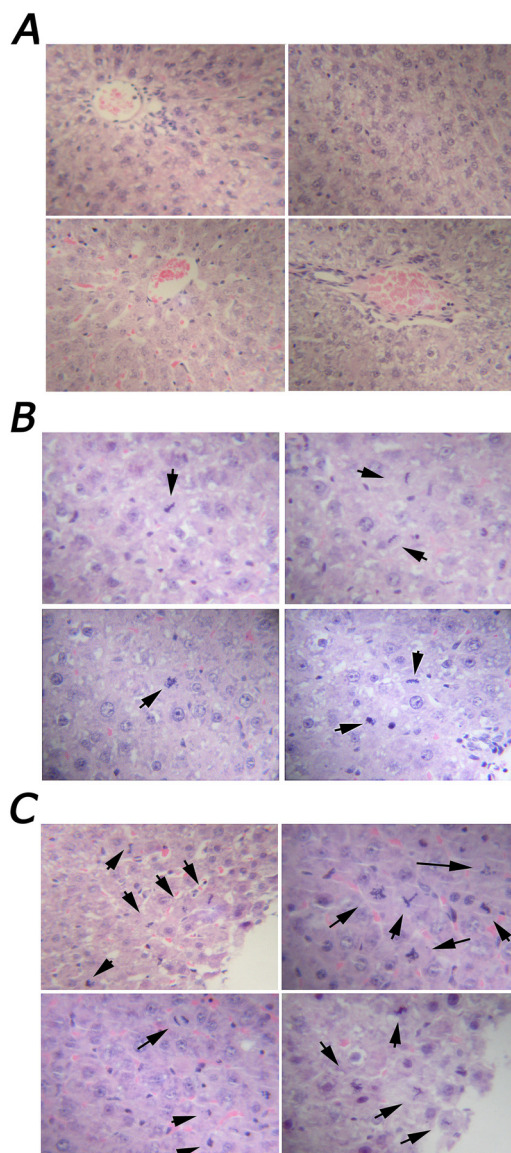


Fig. 1. Micrographs of representative fields with liver cell mitoses in rats subjected to one-third PH and treated with adenosine. Each micrograph was taken at 40 \times objective. A, sham control. B, 30% PH at 24 h after surgery. C, a PH-rat and treated with 100 mg/kg b.w. of adenosine at 24 h after treatments. Mitoses are indicated with arrowheads. Note that adenosine treatment induced even more mitoses than the PH alone.

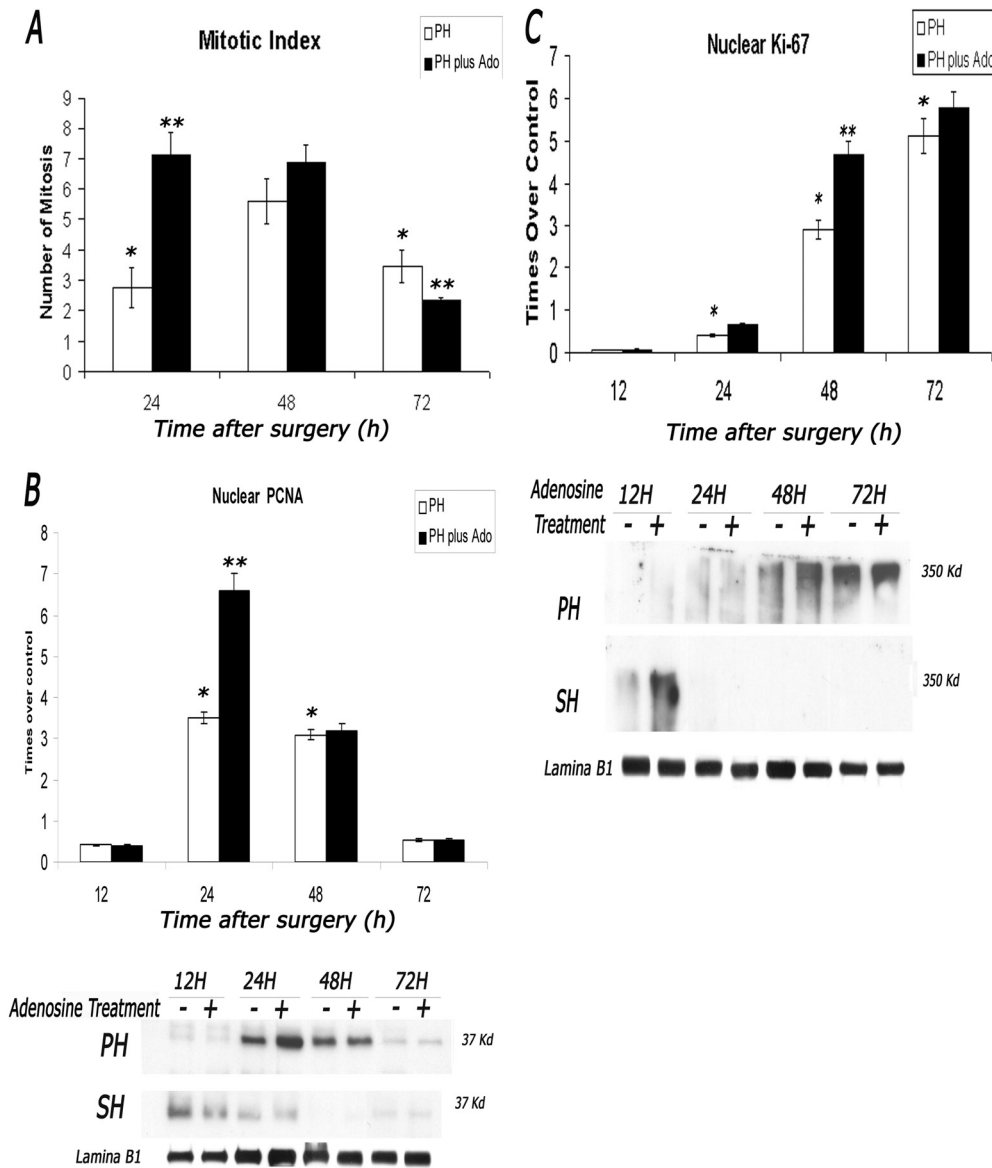


Fig. 2. Effects of adenosine on the rate of liver mitosis and expression of PCNA and nuclear Ki-67 antigen in rats subjected to one-third PH. Results are expressed as mean \pm S.E. for at least four independent observations per experimental point. A, the mitotic index, which represents the average of mitotic figures counted in 20 fields, with a 40 \times objective per slide. B, quantification of immuno-detected PCNA (as times over controls) is depicted (control PCNA value = 689 ADU/mm²). C, quantification of Ki-67 is shown (times over controls; control value = 203 ADU/mm²). Representative WB assays for PCNA and for nuclear Ki-67 antigen are shown below the graphic. Both were normalized for protein charge with a corresponding WB for lamina B1. Symbols for experimental groups are given at the top of the figure. Ado, adenosine. Statistical significance: *, $p < 0.01$ versus sham-operated controls; and **, $p < 0.01$ versus the group with one-third PH.

increased 12 h after surgery up to four times compared with the sham control. However, adenosine treatment to these animals partially blocked the PH-induced enhancement in the expression of pRb protein (24 to 72 h after surgery; Fig. 4A). Expression of E2F-1 expression was progressively increased from 10- to 60-fold, peaking at 48 h post-PH, compared to control rats, and adenosine treatment promoted even higher E2F-1 expression (12–24 h after surgery) and elicited a mirror image at later times (48–72 h post-PH; Fig. 4B). The PH induced a progressive increase in the E2F-3 expression, peaking at 24 h and abruptly declining thereafter, whereas adenosine decreased this PH-induced effect (Fig. 4C). Hence, the complex DP-1 formation increased with two maximal peaks at 12 and 72 h post-PH, respectively. Adenosine reduced the maximal DP-1 expression without modifying its time course (Fig. 4D). Expression of these factors did not change with the time after the sham-operation or with adenosine administration (data not shown).

Effects of PH and Adenosine Treatment on Serum HGF, HGF Liver Activator, and c-Met Receptor Level. Liver plasma membrane levels for c-Met receptors were in-

creased early (12 h after PH), remaining increased at 72 h after surgery (Fig. 5A); this effect was associated with an enhanced expression of the activator for HGF (a serine-protease) induced by the PH (Fig. 5B). Administration of adenosine to PH rats unexpectedly decreased both parameters (Fig. 4, A and B). In addition, we observed an early increase in the hepatic level for HGF (12 h after PH); the nucleoside also decreased early expression of liver HGF, increasing this protein level at 72 h post-PH (Fig. 5C). In contrast, with the other parameters measured, adenosine increased serum HGF levels in sham-operated animals (Fig. 5D). The PH greatly enhanced serum HGF level, with a maximal peak early at 12 h after surgery, which declined slowly but remained significantly higher 72 h after PH (Fig. 5D). Concomitant administration of adenosine induced a second peak, clearly observed 3 days post-PH (Fig. 5D).

Effects of PH and Adenosine Treatment on Liver Expression of c-Fos, c-Jun, and c-Myc. The expression of proto-oncogenes c-Fos, c-Jun, and c-Myc during the first 180 minutes after liver resection was examined (Fig. 6). We found that adenosine reduced the PH-induced elevation of nuclear

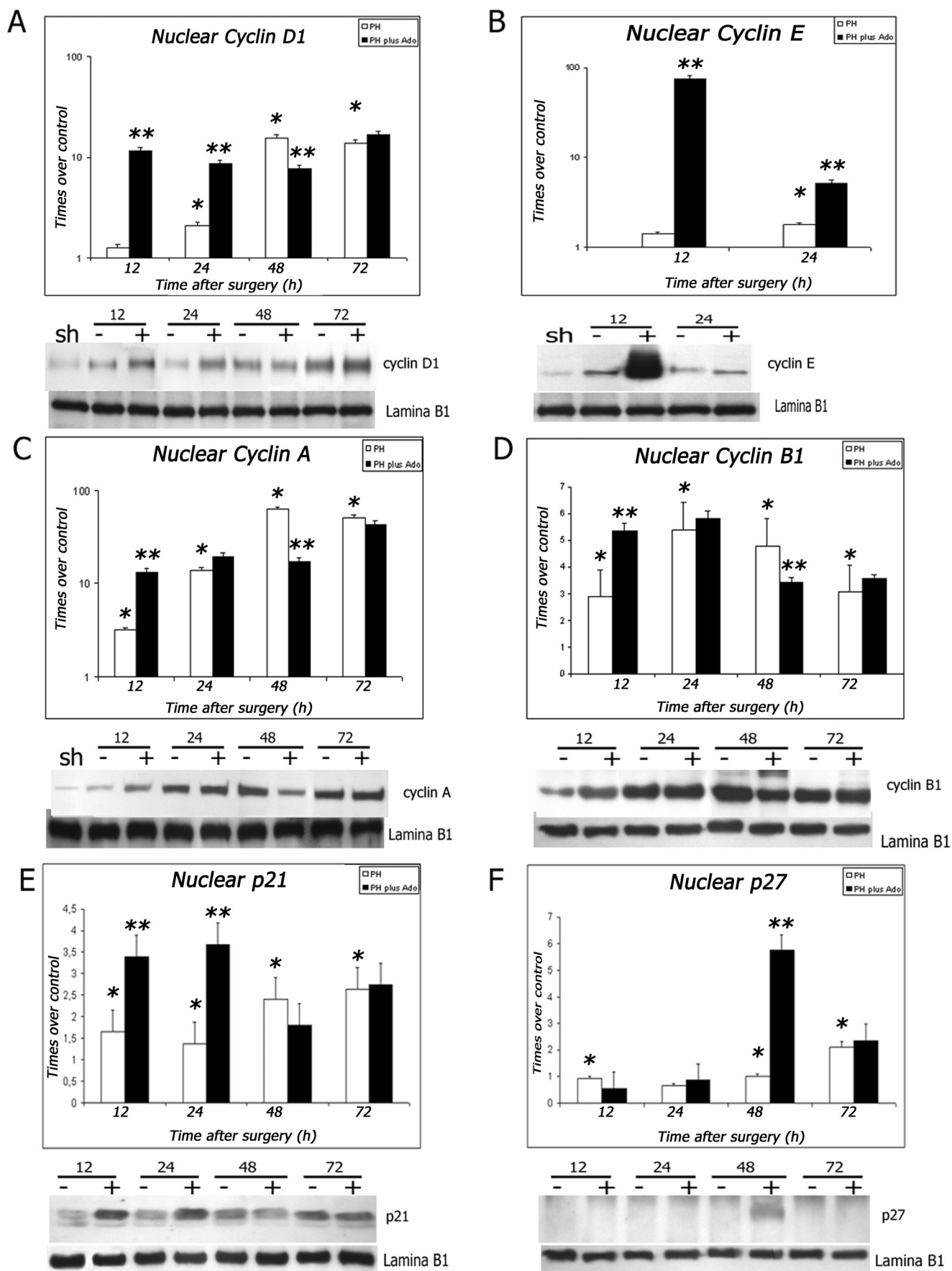


Fig. 3. Effects of adenosine on the rate of liver expression for cyclins p21 and p27 in rats subjected to one-third PH. Results are expressed as mean \pm S.E. for times over control values (four independent observations per experimental point). WB analyses of the nuclear fraction (bottom of each panel) were done for cyclins D1 (A), E (B), A (C), B1 (D), and p21 (E) and p27 (F), normalized as in Fig. 2. Control values (in ADU/mm²) were 5530 (for cyclin D1), 5310 (for cyclin E), 11,302 (for cyclin A), 13,450 ADU/mm² (for cyclin B1), 9260 (for p21), and 10,895 ADU/mm² (for p27). Symbols for experimental groups, are as indicated in Fig. 2. Statistical significance, as indicated in Fig. 2.

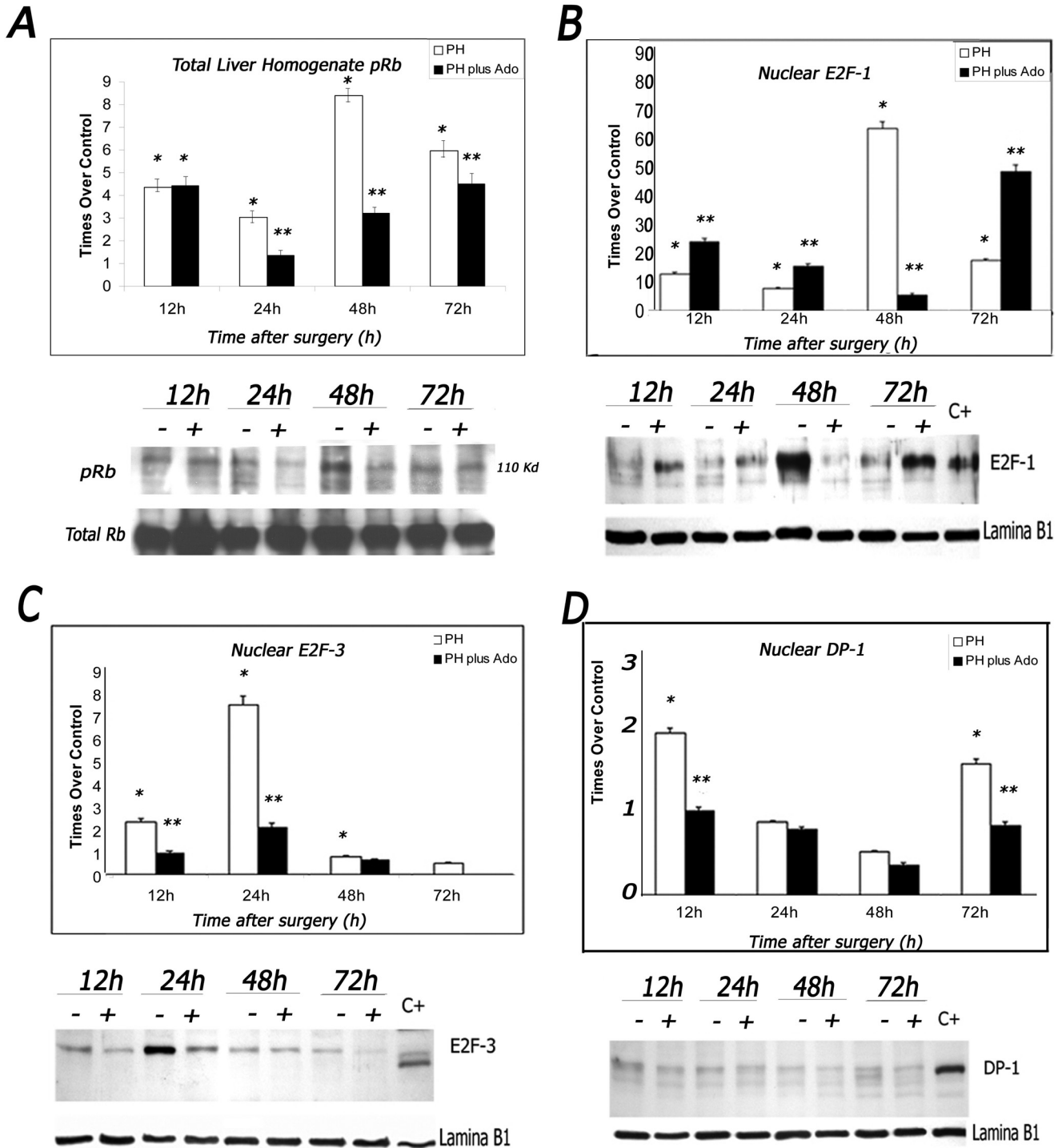


Fig. 4. Effects of adenosine on the rate of liver expression for phosphorylated Rb protein, E2F-1, E2F-3, and for the DP1 complex in rats subjected to one-third PH. Results are expressed as mean \pm S.E. for times over control values for at least four independent observations per experimental point. The WB analyses of liver homogenate were done for phosphorylated Rb protein (A) and for the nuclear amount for E2F-1 (B), E2F-3 (C), and complex DP-1 (D). Representative WB for the corresponding protein, normalized as in Fig. 1, is shown the bottom of each panel. Control values (ADU/mm²) were: 835 (for pRb), 1103 (for E2F-1), 1465 (for E2F-3), and 2052 (for DP-1). C, total homogenate of rat embryos (day 19) was used as a positive control. Symbols for experimental groups at the top of the figure and statistics are as indicated in Fig. 2.

c-Fos level by half, whereas that for c-Jun was not affected (Fig. 6, A and B). On the contrary, c-Myc was promptly translocated into the nucleus (30 min after surgery) in control animals receiving adenosine (Fig. 6C), and nuclear level of c-Myc was constantly increased after PH, accelerating its expression (Fig. 6C).

Effects of PH and Adenosine Treatment on Liver Expression for Adenosine Receptors. Adenosine receptor subtypes A1, A2a, A2b, and A3 in liver homogenates were quantified through Western blot (WB) assays (Fig. 7). All of these receptors for adenosine were expressed in control livers, thus detectable through WB analysis. The A1, A2a, or

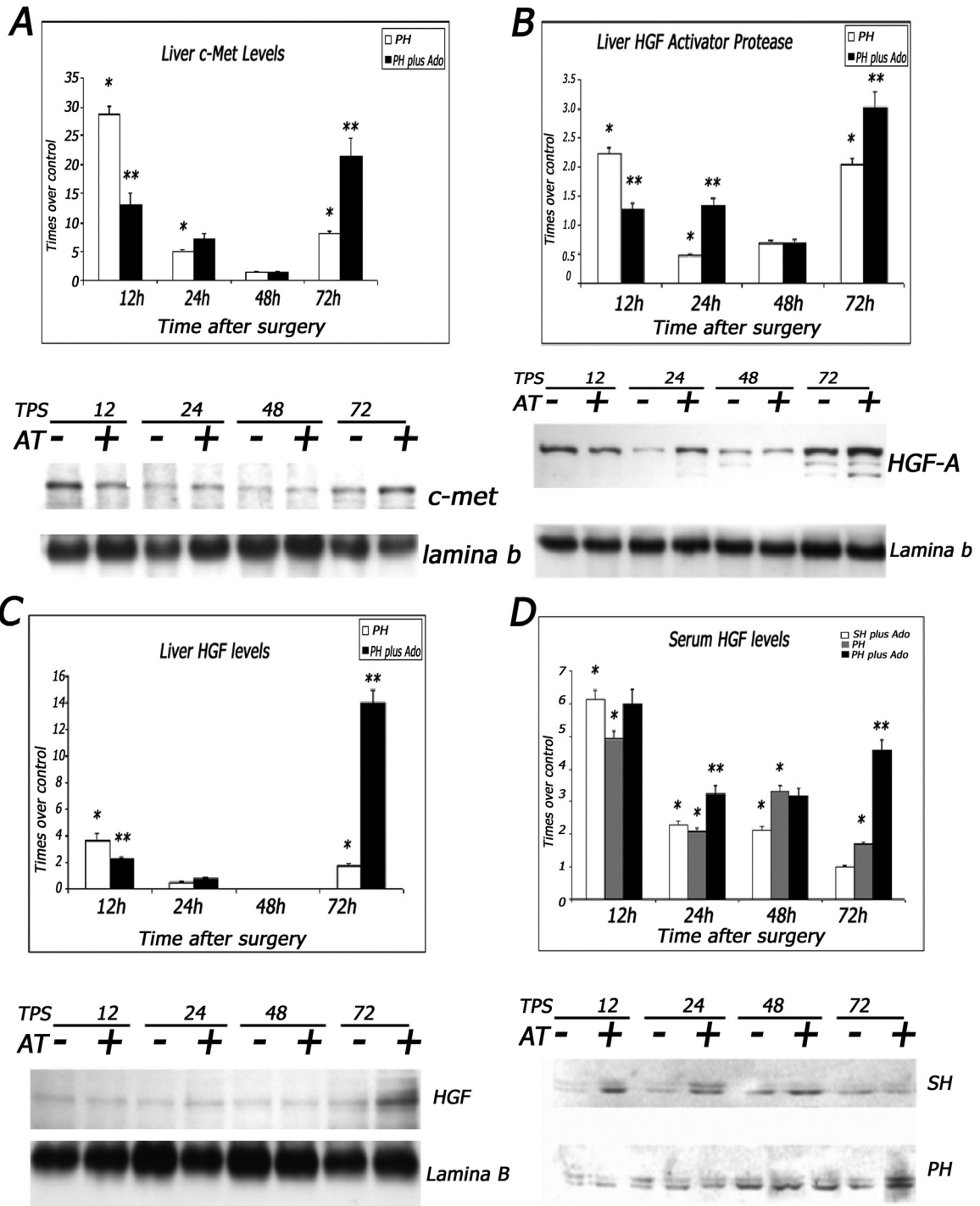


Fig. 5. Effects of adenosine on the rate of liver expression for HGF, its corresponding protease activator (HGFLA), and specific receptor, c-Met, in rats subjected to one-third PH. Results are expressed as mean ± S.E. for times over control values (*n* = 4). The WB analyses of the nuclear fraction were done for liver c-Met (A), HGFLA (B), and liver level of HGF (C). D, the immunodetected amount of HGF in serum. Representative WB is shown at the bottom of each panel. Control values (in ADU/mm²) were 895 (for serum HGF), 560 (tissue HGF), 113 (for C-met), and 1011 (for HGFLA). Symbols for experimental groups are as follows: Sham plus adenosine (white bars), PH only (gray bars), and PH plus adenosine (black bars). Statistics are as indicated in Fig. 2.

A2b adenosine receptor was not significantly changed by either PH or adenosine administration (Fig. 6). Despite the fact that only a lower amount for the A3 adenosine receptor was detected through the antibody used, it seemed that PH and/or adenosine did not have significant effects in the liver amount for this receptor (Fig. 6). Adenosine administration to sham-operated controls did not significantly modify the expression for adenosine receptors (data not shown).

Discussion

Adenosine is considered an autacoid, i.e., a molecule with diverse biological roles, and probably acts as a physiological regulator of liver metabolism (Chagoya de Sánchez et al., 1991). This nucleoside has interesting pharmacological effects on rat liver, increasing liver ATP levels and energy charge in vivo (Chagoya de Sánchez et al., 1972) and stimu-

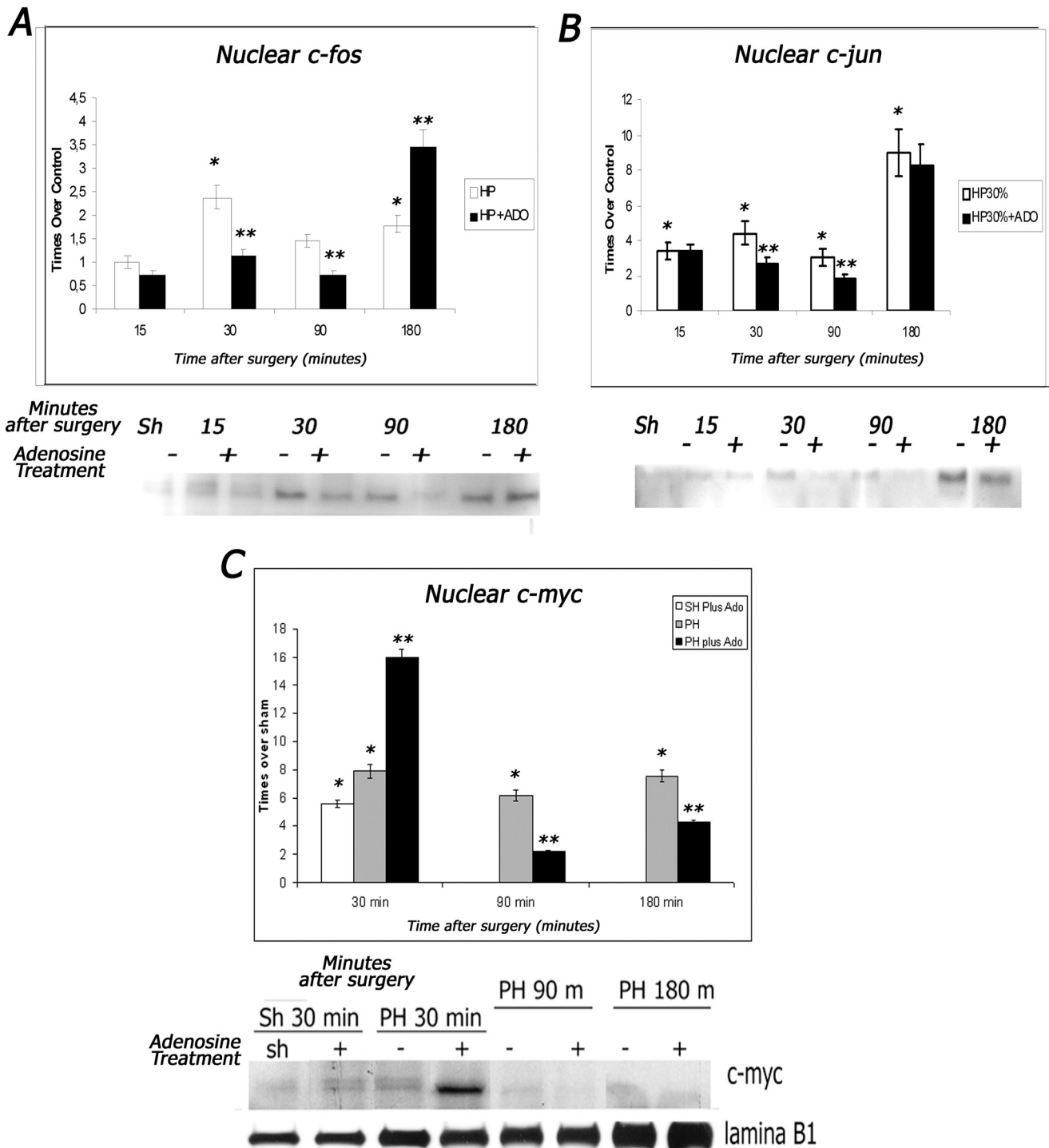


Fig. 6. Effects of adenosine on the rate of liver expression for c-Myc, c-Fos, and c-Jun in rats subjected to one-third PH. Results are expressed as mean \pm S.E. for times over control values ($n = 4$). Densitometric analysis of the WB of the nuclear fraction for c-Fos (A), c-Jun (B), and c-Myc (C) is shown. Control values (in ADU/mm²) were 4012 (for c-Myc), 3800 (for c-Fos), and 2800 (for c-Jun).

lating mitochondrial oxidative metabolism in naive rats (Hernández-Muñoz et al., 1987). In addition, adenosine administration to cirrhotic rats improves liver function, reduces collagen accumulation, and maintains cell energy availability (Hernández-Muñoz et al., 1990, 1992, 1994), reversing rat cirrhosis by stimulating the lost cell-proliferative potential (Hernández-Muñoz et al., 2001).

Therefore, the present study has been an attempt to extend our understanding of the nature of the underlying mecha-

nisms participating in the nucleoside-induced stimulation of liver cell proliferation. Here, adenosine accelerated and increased PH-induced rat liver regeneration (Table 1; Figs. 1 and 2), probably by affecting the time course of cell-cycle regulation. Indeed, the PH-induced pattern of cyclin expression was changed by adenosine (Fig. 3), as well as the nuclear amount for p21 and p27 Cip/Kip proteins. Protein p21, a cell-cycle inhibitor, is reversibly linked to the cyclin D1/Cdk-4,6 complex in the cytoplasm, and it moves further into the

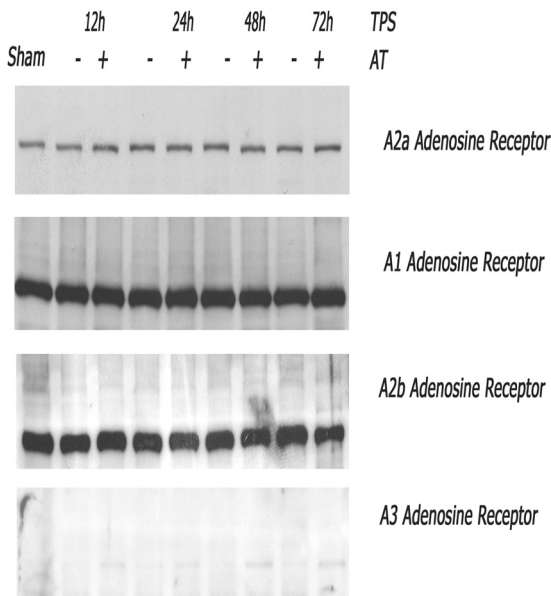


Fig. 7. Western blot of A1, A2a, A2b, and A3 adenosine receptors in rats subjected to one-third PH and/or PH plus adenosine treatment. The pooled liver homogenate from four subjects per experimental group and time is shown. TPS, time after surgery; AT, adenosine treatment.

nucleus, correlating with cyclin D1, Cdk-4, and -6 expression, whereas p27 arrests cell cycle in G₂/M (Blagosklonny 2002; Coqueret, 2003). However, p21 is also necessary to translocate the cyclin D/Cdk-4,6 complex into the nucleus (Albrecht et al., 1998); indeed, adenosine accelerates cell cycle while enhancing expression of p27 in PH animals, which suggests that this acceleration in the cell cycle is still strictly maintained under regulation (Fig. 3). The p21 was induced during the prereplicative (G₁) phase maximally expressed at the onset of hepatocyte DNA synthesis, whereas p27 was present in quiescent liver and minimally induced after PH (Albrecht et al., 1998). Our results then indicated that adenosine administration to rats subjected to one-third PH elicited a response that would be expected in animals subjected to larger hepatectomies (two-third PH). Therefore, the results agree with the statement that p21 regulates the rate of progression through G₁ phase of the cell cycle in vivo (Albrecht et al., 1998). It seems that the nucleoside is not a mitogen by itself but rather exerts a controlling action on cell-cycle progression. Adenosine seems to shorten the G₁/S phase and the time required for cell division during liver regeneration, probably involving cyclin participation (Ehrenfried et al., 1997; Schwabe et al., 2003). Moreover, Rb phosphorylation is a well known point of proliferation control, and adenosine treatment seems to down-regulate it once the liver has reached the optimal time for cell division. Although a careful characterization of this issue is needed, this checkpoint (directly or indirectly) could be a potential target for adenosine actions, given that pRb down-regulation followed a profile quite similar to that of nuclear E2F proteins (Fig. 4). Despite the fact that the E2F transcriptional factor family includes proteins acting as inhibitors of cell proliferation, the E2F-1, -2, or -3 overexpression can drive quiescent cells to a proliferative state (Trimarchi and Lees, 2002). Adenosine changed the expression of E2F-1 and E2F-3 (Fig. 3), probably accelerating cyclin expression and committing hepatic cells into an active cell cycle. Despite the dual role of E2F-1 reported

during rodent liver regeneration (Conner et al., 2000; Stanelle and Pützer, 2006), adenosine might promote an early onset of liver proliferation consequently to E2F-1 nuclear accumulation. E2F-1 seems to play an important role in cell-growth control during periods of robust proliferation, whereas an early increase of transcriptional active E2F-3 appears after two-third PH. However, the time course of liver expression of these transcriptional factors is unknown after one-third PH-induced rat liver regeneration. Indeed, our data revealed a lack of temporal correlation between E2F-1 and E2F-3 in the present experimental model (Fig. 4). Because adenosine accelerated liver proliferation while exclusively enhancing nuclear levels of E2F-1, this confers more importance to this factor in controlling liver regeneration.

Given the vasodilator role of adenosine in liver circulation (Lautt et al., 1985), we believe that the nucleoside may change the bioavailability and/or distribution of growth factors in the regenerating liver. Among them, the HGF has been identified as the major mitogen able to overcome the restriction point in the G₁ of hepatic cells during liver regeneration (Michalopoulos and Zarnegav, 1992; Michalopoulos and DeFrances, 1997). In fact, the HGF is described as a complete mitogen and has been proposed as one of the main controlling steps during liver regeneration (Kaibori et al., 2003; Okajima et al., 1997). Here, adenosine did not significantly modify the PH-induced changes on serum levels for TGF- α and epidermal growth factor (data not shown); however, the nucleoside did increase the serum and hepatic levels of HGF correlating with increased expression of its receptor, the c-Met, but at later times (Fig. 5). In the liver, participation of the protease HGFLA is necessary to cleave single chain HGF into its active heterodimeric form (Miyazawa et al., 1994). It was also interesting that sham-operated receiving adenosine showed increased serum levels of HGF. This could mean that adenosine directly induces production and/or release of this growth factor, constituting an issue to further the study focused, in particular, at identifying the still nonidentified liver cells that produce HGF for longer times, similar to what we are found in the animals with CCl₄-induced micronodular cirrhosis (unpublished data). We found that HGF levels were increased by adenosine administration after the onset of maximal DNA synthesis, which could demonstrate that HGF is not playing an important role in the effects of adenosine. However, because the time course of HGF expression after one-third PH is not well known, we can speculate that early decrease of HGF and c-Met levels, induced by adenosine, is due to a down-regulation of this transcriptional factor at the onset of DNA synthesis (Fig. 5); moreover, the increase of HGF levels promoted by the nucleoside could be related more to other HGF actions (enhanced intrinsic defense system, attenuation of liver inflammation, necrosis, and apoptosis), which have been described previously (Fausto, 2000).

The expression of cyclins D1 and E largely depends on expression of the c-Jun proto-oncogene (Ehrenfried et al., 1997; Schwabe et al., 2003). Indeed, a clear connection between cell-cycle cyclins and the proto-oncogene expression has been established during liver regeneration (Schwabe et al., 2003); here, we found that adenosine decreased early the amount of c-Fos (Fig. 6). These results could be indirect evidence of altered transcriptional factor AP-1 formation, although the nucleoside accelerated cell-cycle G₁/S phase

transition. Therefore, adenosine could promote an earlier translocation of cyclin A and B1 into the nucleus, accelerating mitosis only in primed growing cells.

The c-Myc proto-oncogene is one of main controls of cell proliferation in both adult liver regeneration and fetal growth (Sanders and Gruppuso, 2006). Here, adenosine administration up-regulated c-Myc expression very early after surgery (30 min), even in control animals (Fig. 6). This adenosine-induced c-Myc up-regulation could be the main mechanism underlying its actions, because c-Myc is a potent inducer of DNA synthesis (Conner et al., 2003; Sheen and Dickson, 2002) involved in the generation of polyploid cells during carcinogenesis (Santoni-Rugiu et al., 1999). Although deletion of c-Myc does not impair mice liver regeneration (Li et al., 2006), its overexpression is associated with enhanced proliferation (Santoni-Rugiu et al., 1999). Therefore, adenosine could enhance DNA synthesis through c-Myc up-regulation, facilitating the G₁/S transition controlled by Rb/E2F checkpoint.

In the liver tissue, a certain adenosine amount is maintained in the extracellular medium (Pastor-Anglada et al., 1998) that interacts with its specific receptors (A1, A2a, A2b, and A3). Despite the fact that liver amount for adenosine receptors did not significantly change under our experimental conditions, it is not possible to definitively rule out participation of its receptors in adenosine actions. In fact, hepatocytes can be stimulated to proliferate in vitro through stimulating the purinergic receptor P2Y with ATP and involving participation of AP-1 and cyclin D1 (Thevananther et al., 2004), which has led to the suggestion that extracellular ATP is a hepatic mitogen (Thevananther et al., 2004). Adenosine administration increases liver ATP and promotes a more oxidized redox state (NAD/NADH redox pair) in naive rats (Chagoya de Sánchez et al., 1972; García-Sáinz et al., 1980) and also restores energy availability in the rat cirrhotic liver (Hernández-Muñoz et al., 1990, 1994). Whether adenosine accelerates cell-cycle progression in the regenerating liver by enhancing energy and redox potentials is a current issue under study by our group.

In conclusion, adenosine administration to rats subjected to one-third PH not only accelerates cell proliferation but also increases the rate of cell mitosis. This accelerated liver hyperplasia induced by the nucleoside is highly regulated and seems to be dependent mainly on coordinated expression of c-Myc, E2F, and cell-cycle cyclins associated with long-lasting levels of serum and liver HGF. Adenosine effects could be closely related to enhancing hemodynamic flux and metabolic changes in the proliferating liver, probably through interactions with its receptors and/or through purinergic receptors involving a mechanism similar to that reported for ATP.

Acknowledgments

We thank Dr. Alberto Aranda-Faustro for expert help in evaluating the mitotic index rate and Benito Chávez for technical assistance.

References

Aguilar-Delfin I, López-Barrera F, and Hernández-Muñoz R (1996) Selective enhancement of lipid peroxidation in plasma membrane in two experimental models of liver regeneration: partial hepatectomy and acute CCl₄ administration. *Hepatology* **24**:657–662.

Albrecht JH, Poon RY, Ahonen CL, Rieland BM, Deng C, and Cray GS (1998) Involvement of p21 and p27 in the regulation of CDK activity and cell cycle progression in the regenerating liver. *Oncogene* **16**:2141–2150.

Blagosklonny MV (2002) Are p27 and p21 cytoplasmic oncoproteins? *Cell Cycle* **1**:391–393.

Bode AM and Dong Z (2007) The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer. *Cancer Lett* **247**:26–39.

Chagoya de Sánchez V, Brunner A, and Piña E (1972) In vivo modification of the energy charge in the liver cell. *Biochem Biophys Res Commun* **46**:1441–1445.

Chagoya de Sánchez V, Hernández-Muñoz R, Sánchez L, Vidrio S, Yáñez L, and Suárez J (1991) Twenty-four-hour changes of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine adenosine and their metabolizing enzymes in rat liver; possible physiological significance in phospholipid methylation. *Int J Biochem* **23**:1439–1443.

Conner EA, Lemmer ER, Omori M, Wirth PJ, Factor VM, and Thorgeirsson SS (2000) Dual functions of E2F-1 in a transgenic mouse model of liver carcinogenesis. *Oncogene* **19**:5054–5062.

Conner EA, Lemmer ER, Sánchez A, Factor VM, and Thorgeirsson SS (2003) E2F1 blocks and c-Myc accelerates hepatic ploidy in transgenic mouse models. *Biochem Biophys Res Commun* **302**:114–120.

Coqueret O (2003) New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol* **13**:65–70.

Diehl AM, Wells M, Brown ND, Thorgeirsson SS, and Steer CJ (1990) Effect of ethanol on polyamine synthesis during liver regeneration in rats. *J Clin Invest* **85**:385–390.

Ehrenfried JA, Ko TC, Thompson EA, and Evers BM (1997) Cell cycle-mediated regulation of hepatic regeneration. *Surgery* **122**:927–935.

Fausto N (2000) Liver regeneration. *J Hepatol* **32**:19–31.

García-Sáinz JA, Hernández-Muñoz R, Glender W, Piña E, and Chagoya de Sánchez V (1980) Effects of adenosine on ethanol-induced modifications of liver metabolism. Role of hepatic redox state, purine and fatty acid metabolism. *Biochem Pharmacol* **29**:1709–1714.

Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, and Chagoya de Sánchez V (1987) In vivo and in vitro adenosine stimulation of ethanol oxidation by hepatocytes, and the role of the malate-aspartate shuttle. *Biochim Biophys Acta* **930**:254–263.

Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, Suárez J, and Chagoya de Sánchez V (1990) Adenosine partially prevents cirrhosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Hepatology* **12**:242–248.

Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, and Chagoya de Sánchez V (1992) Effects of adenosine administration on the function and membrane composition of liver mitochondria in carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Arch Biochem Biophys* **294**:160–167.

Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, and Chagoya de Sánchez V (1994) Possible role of cell redox state on collagen metabolism in carbon tetrachloride-induced cirrhosis as evidenced by adenosine administration to rats. *Biochim Biophys Acta* **1200**:93–99.

Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, Suárez-Cuenca JA, Trejo-Solis C, López V, Sánchez-Sevilla L, Yáñez L, and De Sánchez VC (2001) Adenosine reverses a preestablished CCl₄-induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats. *Hepatology* **34**:677–687.

Hernández-Muñoz R, Sánchez-Sevilla L, Martínez-Gómez A, and Dent MA (2003) Changes in mitochondrial adenine nucleotides and in permeability transition in two models of rat liver regeneration. *Hepatology* **37**:842–851.

Kaibori M, Yokoigawa N, Yanagida H, Nagahama T, Kwon AH, Kamiyama Y, and Okumura T (2003) Effect of exogenously administered HGF activator in liver regeneration. *Transplant Proc* **35**:439–440.

Lautt WW, Legare DJ, and d'Almeida MS (1985) Adenosine as a putative regulator of hepatic arterial flow (the buffer response). *Am J Physiol* **248**:H331–H338.

Li F, Xiang Y, Potter J, Dinavahi R, Dang CV, and Lee LA (2006) Conditional deletion of c-myc does not impair liver regeneration. *Cancer Res* **66**:5608–5612.

López-Valencia V, Rangel P, Rodríguez S, and Hernández-Muñoz R (2007) Involvement of alcohol and aldehyde dehydrogenase activities on hepatic retinoid metabolism and its possible participation in the progression of rat liver regeneration. *Biochem Pharmacol* **73**:586–596.

Martínez-Chantar ML, Vázquez-Chantada M, Garnacho M, Latasa MU, Varela-Rey M, Dotor J, Santamaria M, Martínez-Cruz LA, Parada LA, Lu SC, et al. (2006) S-Adenosylmethionine regulates cytoplasmic HuR via AMP-activated kinase. *Gastroenterology* **131**:223–232.

Michalopoulos GK and Zarnegar R (1992) Hepatocyte growth factor. *Hepatology* **15**:149–155.

Michalopoulos GK and DeFrances MC (1997) Liver regeneration. *Science* **276**:60–66.

Miyazawa K, Shimomura T, Naka D, and Kitamura N (1994) Proteolytic activation of hepatocyte growth factor in response to tissue injury. *J Biol Chem* **269**:8966–8970.

Okajima A, Miyazawa K, Naitoh Y, Inoue K, and Kitamura N (1997) Induction of hepatocyte growth factor activator messenger RNA in the liver following tissue injury and acute inflammation. *Hepatology* **25**:97–102.

Pascale RM, Simile MM, Satta G, Seddaiu MA, Daino L, Pinna G, Vinci MA, Gaspa L, and Feo F (1991) Comparative effects of L-methionine, S-adenosyl-L-methionine and 5'-methylthioadenosine on the growth of preneoplastic lesions and DNA methylation in rat liver during the early stages of hepatocarcinogenesis. *Anticancer Res* **11**:1617–1624.

Pastor-Anglada M, Felipe A, Casado FJ, del Santo B, Mata JF, and Valdés R (1998) Nucleoside transporters and liver cell growth. *Biochem Cell Biol* **76**:771–777.

Sanders JA and Gruppuso PA (2006) Coordinated regulation of c-Myc and Max in rat liver development. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**:G145–G155.

Santoni-Rugiu E, Jensen MR, Factor VM, and Thorgeirsson SS (1999) Acceleration of c-myc-induced hepatocarcinogenesis by co-expression of transforming growth factor (TGF)-alpha in transgenic mice is associated with TGF-beta1 signaling disruption. *Am J Pathol* **154**:1693–1700.

Sauer H and Wilmanns W (1983) Thymidine kinase. In: *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer HU, Bergmeyer J, and Grassl M, eds) pp 468–473, Verlag Chemie, Deerfield Beach, FL.

Schwabe RF, Bradham CA, Uehara T, Hatano E, Bennett BL, Schoonhoven R, and

- Brenner DA (2003) c-Jun-N-terminal kinase drives cyclin D1 expression and proliferation during liver regeneration. *Hepatology* **37**:824–832.
- Sheen JH, and Dickson RB (2002) Overexpression of c-Myc alters G(1)/S arrest following ionizing radiation. *Mol Cell Biol* **22**:1819–1833.
- Sindić A, Aleksandrova A, Fields AP, Volinia S, and Banfić H (2001) Presence and activation of nuclear phosphoinositide 3-kinase C2- β during compensatory liver growth. *J Biol Chem* **276**:17754–17761.
- Stanelle J and Pützer BM (2006) E2F1-induced apoptosis: turning killers into therapeutics. *Trends Mol Med* **12**:177–185.
- Thevananther S, Sun H, Li D, Arjunan V, Awad SS, Wyllie S, Zimmerman TL, Goss JA, and Karpen SJ (2004) Extracellular ATP activates c-jun N-terminal kinase signaling and cell cycle progression in hepatocytes. *Hepatology* **39**:393–402.
- Trimarchi JM and Lees JA (2002) Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:11–20.
- Webber EM, FitzGerald MJ, Brown PI, Bartlett MH, and Fausto N (1993) Transforming growth factor- α expression during liver regeneration after partial hepatectomy and toxic injury, and potential interactions between transforming growth factor- α and hepatocyte growth factor. *Hepatology* **18**:1422–1431.

Address correspondence to: Dr. Rolando Hernández-Muñoz, Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apdo. Postal 70-243, México 04510, D.F., Mexico. E-mail: rhermand@ifc.unam.mx
