



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**"ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE LA LIBERACIÓN DE ENZIMAS A
PARTIR DEL TEJIDO HEPÁTICO Y PULMONAR AL MEDIO EXTRACELULAR
EN RATAS SUJETAS A UNA HEPATECTOMÍA DEL 70%"**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A

LORENA CARMINA HERNÁNDEZ ESPINOSA



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO,
MAYO, AÑO 2017**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE
VOCAL: JOSE IGNACIO PARAMO RAMIREZ
SECRETARIO: MARTHA LUCINDA CONTRERAS ZENTELLA
1er. SUPLENTE: MARTHA PATRICIA NERI PAEZ
2° SUPLENTE: AURORA LARA NUÑEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR. DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN BÁSICA. DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA CELULAR Y DESARROLLO
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

ASESOR DEL TEMA: MARTHA LUCINDA CONTRERAS ZENTELLA

FIRMA

SUSTENTANTE: LORENA CARMINA HERNÁNDEZ ESPINOSA

FIRMA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Lobulillo hepático	18
Figura 2. Espacio porta o triadas	18
Figura 3. Anatomía macroscópica del hígado	21
Figura 4. Ciclo de la urea	40
Figura 5. Cavidad pulmonar	48
Figura 6. Segmentos pulmonares	50

LISTA DE REACCIONES

Reacción 1. Reacción catalítica de la Transaminasa Glutámico-Oxalacética (TGO).....	28
Reacción 2. Reacción catalítica de la Transaminasa Glutámico-Pirúvica (TGP).....	30
Reacción 3. Reacción catalítica de la Láctico Deshidrogenasa (LDH).....	33
Reacción 4. Reacción catalítica de la Glutámico Deshidrogenasa (GDH).....	36
Reacción 5. Reacción catalítica de la Ornitina Transcarbamilasa (OTC).....	42
Reacción 6. Reacción catalítica de la Arginasa (ARGasa).....	44

LISTA DE CUADROS DE ENZIMAS

Cuadro 1. E.C. 2.6.1.1-TGO mitocondrial.....	29
Cuadro 2. E.C. 2.6.1.1-TGP citoplasmática.....	30
Cuadro 3. E.C. 2.6.1.2-TGP.....	32
Cuadro 4. E.C. 1.1.1.27-LDH.....	35

Cuadro 5. E.C. 1.4.1.2–GDH.....	37
Cuadro 6. E.C. 2.1.3.3–OTC.....	43
Cuadro 7. E.C. 3.5.3.1–ARGasa.....	45

LISTA DE TABLAS

TABLA 1.1.1 Actividad enzimática de TGO en homogenados de hígado.....	64
TABLA 1.1.2 Actividad enzimática de TGO en homogenados de pulmón.....	68
TABLA 1.2.1 Actividad enzimática de TGP en homogenados de hígado.....	71
TABLA 1.2.2 Actividad enzimática de TGP en homogenados de pulmón.....	74
TABLA 1.3.1 Actividad enzimática de OTC en homogenados de hígado.....	77
TABLA 1.3.2 Actividad enzimática de OTC en homogenados de pulmón.....	80
TABLA 1.4.1 Actividad enzimática de ARGasa en homogenados de hígado.....	83
TABLA 1.4.2 Actividad enzimática de ARGasa en homogenados de pulmón.....	86
TABLA 1.5.1 Actividad enzimática de LDH en homogenados de hígado.....	89
TABLA 1.5.2 Actividad enzimática de LDH en homogenados de pulmón.....	92
TABLA 1.6.1 Actividad enzimática de GDH en homogenados de hígado.....	95
TABLA 1.6.2 Actividad enzimática de GDH en homogenados de pulmón.....	98

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1.1.1 Actividad enzimática de TGO en el medio de incubación de rebanadas hepáticas a las 24 horas.....	66
Gráfica 1.1.2 Actividad enzimática de TGO en el medio de incubación de rebanadas hepáticas a las 48 horas.....	67
Gráfica 1.1.3 Actividad enzimática de TGO en el medio de incubación de rebanadas pulmonares a las 24 horas.....	69
Gráfica 1.1.4 Actividad enzimática de TGO en el medio de incubación de rebanadas pulmonares a las 48 horas.....	70
Gráfica 1.2.1 Actividad enzimática de TGP en el medio de incubación de rebanadas hepáticas a las 24 horas.....	72

Gráfica 1.2.2 Actividad enzimática de TGP en el medio de incubación de rebanadas hepáticas a las 48 horas.....	73
Gráfica 1.2.3 Actividad enzimática de TGP en el medio de incubación de rebanadas pulmonares a las 24 horas.....	75
Gráfica 1.2.4 Actividad enzimática de TGP en el medio de incubación de rebanadas pulmonares a las 48 horas.....	76
Gráfica 1.3.1 Actividad enzimática de OTC en el medio de incubación de rebanadas hepáticas a las 24 horas.....	78
Gráfica 1.3.2 Actividad enzimática de OTC en el medio de incubación de rebanadas hepáticas a las 48 horas.....	79
Gráfica 1.3.3 Actividad enzimática de OTC en el medio de incubación de rebanadas pulmonares a las 24 horas.....	81
Gráfica 1.3.4 Actividad enzimática de OTC en el medio de incubación de rebanadas pulmonares a las 48 horas.....	82
Gráfica 1.4.1 Actividad enzimática de ARGasa en el medio de incubación de rebanadas hepáticas a las 24 horas.....	84
Gráfica 1.4.2 Actividad enzimática de ARGasa en el medio de incubación de rebanadas hepáticas a las 48 horas.....	85
Gráfica 1.4.3 Actividad enzimática de ARGasa en el medio de incubación de rebanadas pulmonares a las 24 horas.....	87
Gráfica 1.4.4 Actividad enzimática de ARGasa en el medio de incubación de rebanadas pulmonares a las 48 horas.....	88
Gráfica 1.5.1 Actividad enzimática de LDH en el medio de incubación de rebanadas hepáticas a las 24 horas.....	90
Gráfica 1.5.2 Actividad enzimática de LDH en el medio de incubación de rebanadas hepáticas a las 48 horas.....	91
Gráfica 1.5.3 Actividad enzimática de LDH en el medio de incubación de rebanadas pulmonares a las 24 horas.....	93
Gráfica 1.5.4 Actividad enzimática de LDH en el medio de incubación de rebanadas pulmonares a las 48 horas.....	94
Gráfica 1.6.1 Actividad enzimática de GDH en el medio de incubación de rebanadas hepáticas a las 24 horas.....	96

Gráfica 1.6.2 Actividad enzimática de GDH en el medio de incubación de rebanadas hepáticas a las 48 horas.....	97
Gráfica 1.6.3 Actividad enzimática de GDH en el medio de incubación de rebanadas pulmonares a las 24 horas.....	99
Gráfica 1.6.4 Actividad enzimática de GDH en el medio de incubación de rebanadas pulmonares a las 48 horas.....	100
Gráfica 2.1 Actividad enzimática de la TGO en medio de incubación de muestras totales y ultra-centrifugadas de hígado y pulmón. Actividad total y específica.....	102
Gráfica 2.2 Actividad enzimática de la TGP en medio de incubación de muestras totales y ultra-centrifugadas de hígado y pulmón. Actividad total y específica.....	104
Gráfica 2.3 Actividad enzimática de la OTC en medio de incubación de muestras totales y ultra-centrifugadas de hígado y pulmón. Actividad total y específica.....	105
Gráfica 2.4 Actividad enzimática de la ARGasa en medio de incubación de muestras totales y ultra-centrifugadas de hígado y pulmón. Actividad total y específica.....	108
Gráfica 2.5 Actividad enzimática de la LDH en medio de incubación de muestras totales y ultra-centrifugadas de hígado y pulmón. Actividad total y específica.....	110
Gráfica 2.6 Actividad enzimática de la GDH en medio de incubación de muestras totales y ultra-centrifugadas de hígado y pulmón. Actividad total y específica.....	112

ABREVIATURAS

ADH	Hormona antidiurética o arginina vasopresina o argipresina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
AFP	Alfa-fetoproteína
ALB	Albúmina
AMP	Monofosfato de adenosina
ARGasa	Arginasa
ARN	Ácido ribonucleico
ARNInc	Ácido ribonucleico largo no codificante
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNmi	Micro Ácido ribonucleico
ARNpi	Ácido ribonucleico asociado a Piwi, actúa en transposones
ATP	Trifosfato de adenosina
BMP	Proteínas morfogenéticas del hueso
C_α	Carbono alfa unido al grupo funcional
CCL₄	Tetracloruro de carbono
CPS-1	Carbamoil fosfato sintetasa I
CO₂	Dióxido de carbono
C.E.	Comisión de enzimas

EGF	Factor epidérmico de crecimiento
FGF	Factor de crecimiento de los fibroblastos
FAD/FADH₂	Flavín adenín dinucleótido oxidado/ Flavín adenín dinucleótido reducido
GDH	Glutamato deshidrogenasa
G₀	Estado quiescente celular
G₁	Estado de crecimiento celular
HCO₃⁻	Ácido carbónico
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HP	Hepatectomía parcial
IL	Interleucinas
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LDH	Lactato deshidrogenasa
MAPK	Proteína cinasas activadas por mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinases)
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinasas de la matriz extracelular
mU	Mili-unidad enzimática (cantidad de enzima necesaria para convertir un nanomol de sustrato en producto por minuto en condiciones experimentales determinadas)
NAD⁺/NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado/ nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP⁺/NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado / Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
nmol	Nano (10^{-9}) mol
NO	Óxido nítrico o monóxido de nitrógeno
OTC	Ornitina Transcarbamilasa
P_i	Fosfato inorgánico
PP_i	Pirofosfato inorgánico
SNARE	Receptor de proteína de fijación soluble de NSF (factor sensible a N-etilmaleimida)
SNAP	Proteínas solubles unidas a NSF
TGF- α	Factor de crecimiento tumoral α
TGF- β	Factor de crecimiento tumoral β
TGP o ALT	Glutamato-piruvato transaminasa o alanina aminotransferasa
TGO o AST	Glutamato-oxalacetato transaminasa o aspartato aminotransferasa
TIMP	Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas
TK	Tirosina cinasa
TNF-α	Factor de necrosis alfa
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial

INDICE

Lista de figuras, reacciones, cuadros, tablas y gráficas.....	1
Abreviaturas.....	5
Índice.....	8
Resumen.....	11
Introducción.....	16
1. Hígado.....	16
1.1 Vascularización del hígado.....	18
1.2 Anatomía macroscópica de hígado.....	19
2. Regeneración hepática.....	21
2.1 Regulación en la regeneración hepática.....	22
2.1.1 Regulación genética de la regeneración hepática.....	23
2.2 Morfología de la regeneración hepática.....	24
2.3 Otros fenómenos relacionados a la regeneración hepática.....	25
2.3.1 Mecanotransducción.....	26
3. Perfil enzimático.....	26
3.1 Transaminasas.....	27
3.1.1 TGO.....	28
3.1.2 TGP.....	30
3.2 Deshidrogenasa.....	32
3.2.1 Lactato deshidrogenasa.....	33
3.2.2 Glutamato deshidrogenasa.....	35
4. Función hepática.....	37

5. Ciclo de la urea.....	38
5.1 Regulación del ciclo de la urea.....	40
5.2 Urea.....	41
5.3 Ornitina Transcarbamilasa (OTC).....	41
5.4 Arginasa (ARGasa).....	43
6. Pulmón.....	45
6.1 Anatomía macroscópica.....	48
6.2 Vascularización del pulmón.....	50
Justificación.....	52
Hipótesis.....	54
Objetivos.....	55
Metodología.....	56
1. Manejo y obtención de muestras hepáticas y pulmonares.....	56
2. Recolección de la muestra hepática.....	56
3. Recolección de la muestra pulmonar.....	57
4. Determinación de actividad enzimática.....	58
4.1 Determinación de actividad enzimática de la TGO.....	58
4.2 Determinación de actividad enzimática de la TGP.....	59
4.3 Determinación de actividad enzimática de la LDH.....	60
4.4 Determinación de actividad enzimática de la GDH.....	60
4.5 Determinación de actividad enzimática de la OTC.....	61
4.6 Determinación de actividad enzimática de la ARGasa.....	61
5. Muestras ultra-centrifugadas.....	62

6. Análisis estadístico.....	63
Resultados.....	64
Discusión.....	114
Conclusiones.....	129
Perspectivas.....	130
Anexo.....	131
Referencias.....	133

RESUMEN

El hígado tiene la extraordinaria capacidad de regenerarse en respuesta a la pérdida de su propia masa; este proceso es cuidadosamente regulado por señales hormonales, con la finalidad de mantener un balance entre el número de células y la cantidad de componentes de la matriz extracelular en el que las propias células se mantienen. La regeneración hepática es un proceso implicado en patologías que afectan crónicamente al hígado (como cirrosis hepática), por lo que representa un tema central de investigaciones con índole endocrino y paracrino.

La hepatectomía parcial (HP) descrita por Higgins y Anderson en 1931, consiste en remover una parte del hígado quirúrgicamente y es uno de los modelos más utilizados para la investigación de los mecanismos reguladores de la proliferación celular [53]. Este modelo estimula la regeneración hepática, involucrando hiperplasia e hipertrofia como dos procesos controlados y compensatorios. Además, induce cambios en los flujos hemodinámicos en el hígado remanente al aumentar tres veces el flujo portal por unidad de tejido.

A nivel celular, las células expuestas a una HP o lesión hepatocelular experimentan un cambio de estado quiescente a estado proliferativo, lo que desencadena la expresión de genes específicos, cuyos productos participan en el tránsito de hepatocitos por el ciclo celular. Posterior a la HP, los factores mitogénicos e inhibidores de los mismos aumentan en sincronía para preservar una proliferación celular controlada.

El proceso de regeneración también implica un aumento selectivo de enzimas hepáticas en el suero que, dependiendo del tipo de lesión, presenta patrones característicos de liberación. Ahora se sabe que este aumento de enzimas no solo depende de la muerte celular, consecuente de la lesión del tejido, sino que también puede depender de una proliferación celular compensatoria y que el patrón de liberación de cada una de las enzimas depende de la identidad de las mismas. Así pues, en una lesión aguda hay dos picos de aumento; el primero es debido a la necrosis y el segundo se atribuye a una liberación de enzima por las células remanentes durante la proliferación. De aquí, que se considere que la determinación de actividades séricas es "marcadora" del tejido hepático y pueda

ser una manera semi-cuantitativa para discriminar entre diferentes lesiones del hígado.

Para dilucidar los factores que afectan la salida de las enzimas al medio extra-hepático, se han realizado estudios que evidencian el papel del flujo hemodinámico en la salida de las enzimas del tejido hacia la sangre, mediante fuerzas mecánicas (fricción) y activación de mecano-transducción en células epiteliales [29]. Estos estudios demostraron que el gradiente de salida no se da por simple difusión, sino que varía de acuerdo a la localización celular de la enzima y la velocidad del flujo, mostrando una liberación reversible y selectiva. Ante tal hallazgo se ha planteado que la salida depende parcialmente de fuerzas mecánicas; es decir, la salida de enzimas hepáticas puede ser dependiente del flujo sanguíneo (1) o independiente de él (2).

El presente trabajo aborda la cuantificación de actividades enzimáticas en rata en un modelo *in vitro*, donde se incubaron rebanadas de hígado y pulmón en solución de Krebs-Ringer, para obtener resultados directamente proporcionales a la cantidad de enzima "funcional" liberada. Para esto, se utilizaron dos grupos experimentales: ratas macho de la cepa Wistar (250g) a las que se les realizó una HP del 70% y sus respectivos controles que fueron sometidos al trauma quirúrgico, pero sin remover el hígado (Sham). Cabe mencionar que esta liberación no se sometió a ningún tipo de fuerza, por lo que es independiente del flujo hemodinámico. La variable de este experimento es la inducción de la proliferación hepática y dos tiempos de recuperación, a las 24 y 48 horas. Se seleccionaron las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH), glutamato deshidrogenasa (GDH), transaminasa glutámico-oxalacética (TGO), transaminasa glutámico-pirúvica (TGP), ornitina transcarbamilasa (OTC) y la de la arginasa (ARGasa) por formar parte de los llamados mapas o modelos enzimáticos tisulares.

Se eligió al pulmón como órgano comparativo, ya que experimentos preliminares han señalado la presencia de la enzima OTC en el tejido pulmonar. Además, dado que el hígado actúa como una pieza de interconectividad con todo el organismo,

es de suponer que cuando hay un cambio homeostático, existe la posibilidad de afectar otros órganos.

Conjuntamente, para explicar el transporte de enzimas de un órgano a otro, este trabajo propone que las enzimas se encuentran en exosomas, paquetes que se secretan al espacio extracelular en forma de vesículas membranosas, que impiden su degradación y permite su reconocimiento. Utilizando el método más convencional para su aislamiento, que es la centrifugación diferencial y ultra-centrifugación, se determinó la proporción de enzimas "libres" o solubles y enzimas transportadas en exosomas o particuladas.

El hígado en proliferación mostró un aumento transitorio en la tasa de liberación de las enzimas TGO, OTC, ARGasa, LDH y GDH mostrando, en general, un aumento de actividad en el medio de incubación en las primeras 24 horas post-HP. La OTC, una enzima mitocondrial, se liberó a partir de rebanadas hepáticas y mostró actividad en precipitados obtenidos por ultra-centrifugación, indicando la presencia de enzimas particuladas. En el caso de la GDH, una enzima también de localización mitocondrial, no mostró variaciones en función de la HP y se observó que las ratas control muestran más actividad enzimática particulada en comparación con la encontrada en hígado en regeneración.

Las enzimas citoplasmáticas como la ARGasa y la LDH, mostraron que su liberación también se exacerba por la regeneración hepática. En el caso de la LDH, la enzima presenta actividad en exosomas de muestras de hígado de ratas control, así como en aquellas cuando el hígado se encuentra en regeneración tras una HP. La ARGasa, por su parte, mostró una mayor actividad en exosomas provenientes de hígado en regeneración.

La única enzima que no presentó un incremento en la tasa de liberación en hígado proliferante fue la TGP, esta enzima que es exclusiva del citoplasma hepático, tuvo un bajo índice de particulación en muestras hepáticas.

En conclusión, la remoción de tejido hepático incremento la tasa de liberación de todas las enzimas (a excepción de la TGP), sin importar su localización celular, por lo que creemos que el aumento dramático en el flujo portal a través de una

masa hepática disminuida por la cirugía, antes de sacrificar a la rata, estimula un "sistema" de liberación que podría involucrar transportadores inter-membranales. Lo anterior se correlaciona con estudios recientes, que demostraron que la liberación de enzimas hepáticas "citoplásmicas" depende en gran medida de la entrada de calcio extracelular, probablemente a través de canales de calcio activados por estiramiento ("stretch-sensitive") [29].

En cuanto al pulmón, las enzimas OTC y ARGasa, que pertenecen al ciclo de la urea, están en menor cantidad con respecto a las encontradas en el tejido hepático (menor al 4%); en relación a las transaminasas y deshidrogenasas, se presentan en menor proporción que en el hígado (equivalente al 70% de la enzima contenida en el hígado).

La tasa de liberación de las enzimas de pulmón, contrastaron mucho con respecto al tejido hepático. Las enzimas que fueron claramente influidas en su liberación por la escisión de tejido hepático fueron la OTC y ARGasa, ya que ambas aumentaron su actividad en el medio en muestras provenientes de animales hepatectomizados, con la diferencia de que la OTC presentó este aumento a las 24 horas y la ARGasa a las 48 horas. En cuanto a su localización en exosomas, pese a que la ARGasa se encuentra en mayor cantidad en el pulmón, fue la OTC la enzima que mostró una liberación particulada.

Las transaminasas por su parte, no se vieron influenciadas por la HP, manteniendo una liberación similar a los animales control. Sin embargo, la TGO presentó un sorprendente porcentaje de localización exosomal, alrededor del 20%, tanto en Sham como en animales hepatectomizados parcialmente.

En cuanto a las deshidrogenasas, encontramos que la LDH se libera activamente del pulmón, con una pequeña influencia de la HP; además, no se observó una localización particulada de esta enzima. La GDH también se liberó a partir de rebanadas pulmonares, presentando mayor liberación en exosomas cuando el hígado se encontraba en regeneración.

Los resultados obtenidos indican que la liberación de enzimas y su transporte dependen de cada enzima en particular, pero es evidente que el hígado y el

pulmón mantienen una comunicación de índole enzimática, la cual aún es un misterio.

INTRODUCCIÓN

1. Hígado

El hígado es la glándula más grande del cuerpo humano (entre 1.8% al 3.1% del peso corporal), y se encuentra dentro de la cavidad abdominal superior derecha, debajo del diafragma. Posee un surco en su superficie, llamado hilio hepático, que permite la entrada de la vena porta, la arteria hepática y el conducto hepático. Es un órgano doblemente vascularizado, ya que la vena porta y la arteria hepática abastecen al hígado de sangre desoxigenada y sangre oxigenada, respectivamente. La sangre venosa proviene de los órganos gastrointestinales¹ y del bazo, por lo tanto, el hígado es el primer órgano que recibe los nutrientes absorbidos del tracto intestinal a través de la circulación portal y se encarga de la eliminación, almacenamiento y liberación de sustancias nuevas al organismo en su estado inalterado o metabolizado, teniendo especial importancia en la detoxificación de xenobióticos (moléculas extrañas al organismo).

El hígado está constituido en su mayoría por hepatocitos, que son células responsables de numerosas funciones metabólicas, endocrinas y exocrinas; estos ocupan entre el 70 y 80% del volumen total y se conocen como células parenquimales. El resto del hígado (entre el 20 y 30%) está compuesto por células no parenquimales, las cuales son: células estelares hepáticas², células endoteliales sinusoides, células de Kupffer³, células del epitelio biliar, células ovas y células de Pitt⁴. Las células no parenquimales se encargan, entre otras cosas, de regular hormonas circulantes (por ejemplo noradrenalina) y de implementar la respuesta humoral mediante la circulación de citocinas inflamatorias y la síntesis y liberación de las anafilotoxinas como C3a y C5a (sistema del complemento) [47,78].

Los hepatocitos tienen una forma poliédrica con un núcleo único y central, uno o varios nucléolos y un citoplasma de aspecto granuloso con gran cantidad de

¹ Páncreas, estómago, intestino y vesícula biliar.

² CEH, también conocidas como lipocitos, las células de Ito o las células de almacén lipídico. Además almacenan vitamina A y regulan y producen tejido conectivo.

³ Absorben y destruyen partículas foráneas como bacterias.

⁴ Células NK contra virus y células tumorales metastásicas.

glucógeno. En su superficie están recubiertos de micro-vellosidades que entran en contacto con el plasma sanguíneo, las cuales sirven para la captación y posicionamiento dentro del tejido. En el espacio inter-hepatocito se encuentran los capilares biliares, que son canalículos encargados de transportar la bilis segregada por los hepatocitos a los conductos biliares. La interacción hepatocito-hepatocito se da por uniones de gap⁵ y su arreglo es formando hexágonos irregulares por láminas fenestradas que se posicionan en torno a la vena central o vena centrolobulillar, y esta vena sirve como desagüe para la sangre que transita de forma centrípeta en las laminas de los hepatocitos a través de los sinusoides hepáticos (vasos sanguíneos). Cada hexágono forma una subunidad conocida como lobulillo hepático (Figura 1) [47,89,90].

El espacio entre las láminas de los hepatocitos y los sinusoides hepáticos, que contienen a las células de Kupffer y células estelares, se llama espacio de Disse y está delimitado por paredes revestidas de células planas endoteliales que carecen de membrana basal verdadera. El endotelio tiene un papel central en la comunicación al permitir el libre intercambio metabólico del plasma sanguíneo con los hepatocitos; además, tienen la capacidad de responder a fuerzas mecánicas y traducirlas a efectos fisiológicos con la participación de la liberación de segundos mensajeros.

El principal componente del espacio de Disse es la matriz extracelular (MEC), formada por colágenas tipo I, III, IV, V, VI y VIII, así como por fibronectina, laminina, elastina, glicosaminoglicanos y varios tipos de proteoglicanos, que está sostenida por una red de fibras reticulares. Cuando aparece una muerte masiva del parénquima, es en estos espacios donde se acumula la fibra compuesta principalmente de colágenas tipo I y III, en respuesta a los estímulos fibrogénicos que tienen como consecuencia el deterioro de la circulación portal y la pérdida de la función hepática.

⁵ Una unión gap está formada por dos hemicanales (llamadas conexinas), donde están contiguas dos células, de manera que la luz de uno se continúa con la del otro.

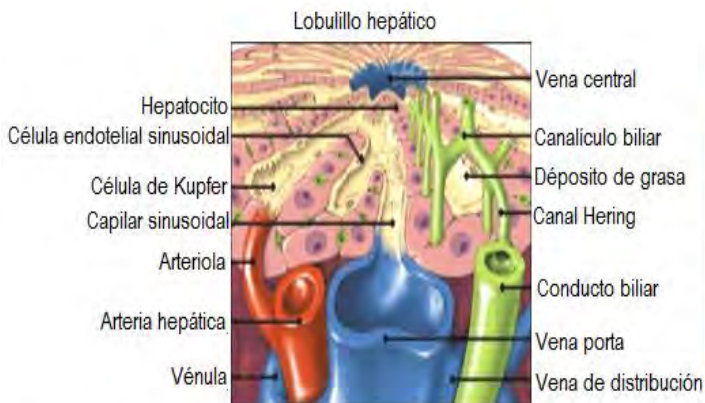


Figura 1. Esta unidad morfológica tiene forma hexagonal y se organiza alrededor de las venas centrolobulillar. El interior esta constituido por cordones de hepatocitos dispuestos de manera radial alrededor de la vena centrolobulillar. Entre los cordones de hepatocitos se localizan los sinusoides hepáticos.

Figura modificada de:
X. Páez, *Fisiología digestiva*, Universidad de los Andes, 2015.

Las áreas triangulares entre los lobulillos hepáticos se denominan espacios porta o tríadas y están constituidos de estromas conjuntivos laxos, ramas de la arteria hepática, ramas de la vena porta y conductos biliares. De forma imaginaria, usando los espacios porta y las venas centrales de dos lobulillos hepáticos como vértices, se forma una zona rómbica que delimita un acino portal o hepático (figura 2) [35,90,97].

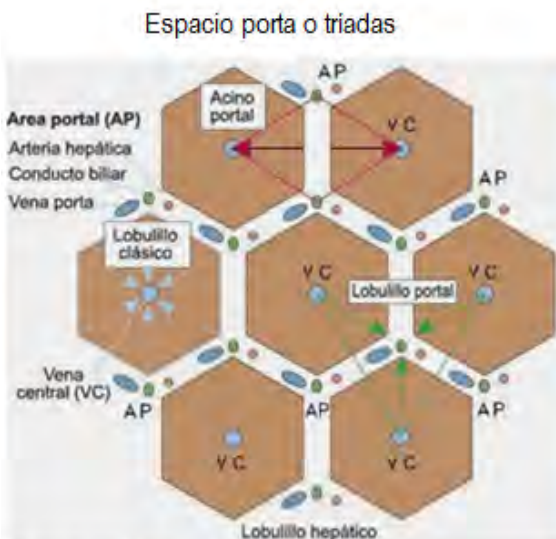


Figura 2. En tres de los vértices del lobulillo hepáticos se localizan los espacios porta o de Kiernan, que son triángulos de tejido conectivo dentro del cual se localiza un conducto biliar, una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta y un vaso linfático. A este conjunto de estructuras se le denomina triada portal. Las ramas laterales de estos vasos convergen a los sinusoides hepáticos situados entre los cordones de hepatocitos, que drenan a la vena centrolobulillar.

Figura modificada de:
Michael H. Ross y Wojciech Pawlina, *Atlas de Histología Descriptiva*, Panamericana, 2012.

1.1 Vascularización del hígado

El flujo sanguíneo dentro de los lobulillos hepáticos se puede simplificar como un circuito de entrada y salida:

ENTRADA. La sangre venosa y arterial forman un "shunt"⁶ fisiológico, que al avanzar se distribuye en ramas de ángulo recto (sinusoides hepáticos) que penetran al lobulillo hepático, donde finalmente converge en la vena centrolobulillar.

El avance de este "shunt", rico en nutrientes (por la vena porta) y oxígeno (por la arteria hepática), genera un gradiente de concentración; es decir, las zonas acinares periportales son los primeros en recibir oxígeno y nutrientes, mientras que las zonas acinares perivenosas reciben más CO₂ y toxinas. A lo largo de este gradiente se distinguen tres zonas metabólicas, donde las reacciones de transformación de xenobióticos y la producción de factores de crecimiento son distintas. La zona I (periportal) se encarga de procesos oxidativos, glucogénesis, β-oxidación, síntesis de colesterol y secreción de ácidos grasos. Mientras que en la zona III (perivenoso) se lleva a cabo la glucólisis, lipogénesis y el metabolismo de los xenobióticos, incluso en esta zona la morfología de los hepatocitos es diferente, con el núcleo más grande y retículo endoplasmático más abundante. La zona II es la zona media y lleva a cabo ambos procesos.

SALIDA. La sangre que se drena a la vena centrolobulillar es transportada a la vena cava inferior mediante las venas hepáticas (derecha, central e izquierda).

Las venas hepáticas convergen y se dividen en dos grupos, el grupo superior y el grupo inferior. El grupo superior drena todo el hígado (excepto el lóbulo caudado), por medio de la vena hepática central que se conecta a la vena hepática derecha y a la vena hepática izquierda. El grupo inferior drena al lóbulo caudado en forma directa hacia la vena cava inferior, a través de vasos segmentarios directos [65,102].

1.2 Anatomía macroscópica de hígado

El hígado tiene cuatro lóbulos de acuerdo a la disposición de los conductos vasculares y biliares; los dos principales son el lóbulo derecho y el lóbulo izquierdo, separados por el ligamento falciforme. El lóbulo derecho contiene a su

⁶ "cortocircuito" en inglés, que también se usa para nombrar a una mezcla venosa y arterial de sangre.

vez el lóbulo caudado (o lóbulo de Spiegel), situado entre la vena cava inferior y la fisura del ligamento venoso, y al lóbulo cuadrado, entre la fosa de la vesícula biliar y la fisura para el ligamento redondo del hígado.

El hígado muestra una cara convexa superior, amplia y regular, que se alarga, estrecha y aplana, tomando forma triangular en su parte izquierda con superficie diafragmática. De igual manera, posee una cara plana, ligeramente cóncava, visceral o inferior que se relaciona con el estómago mediante el epiplón menor y con otras vísceras meta y retro peritoneales, así como una cara posterior o borde hepático, romo y grueso [6].

El hígado posee tres surcos principales. El primero es el surco transversal o del hilio hepático, es aquí donde salen o entran vasos sanguíneos (excepto las venas supra hepáticas), el plexo nervioso⁷, los vasos linfáticos y el conducto cístico que al reunirse forma el colédoco⁸ [4,46]. El segundo es el surco longitudinal derecho o fosa cística, que comienza en el borde superior anterior, este divide al hígado en cuatro cuadrantes por su forma de H y se caracteriza por contener a la vesícula biliar. El tercero es el surco longitudinal izquierdo, situado en la cara anterior y que es la continuación de la línea de inserción del ligamento falciforme.

Para obtener un panorama metódico del hígado, los anatomistas han establecido una división sistematizada basada en la distribución de las venas supra hepáticas y pedículos portales. La proyección vertical de las venas supra hepáticas divide al hígado en cuatro secciones: posterior derecha, anterior derecha, medial izquierda y lateral izquierda. Si a esto se traza un plano horizontal sobre el eje de las venas, se obtienen ocho segmentos. Actualmente, se usa la terminología de Brisbane que establece secciones y segmentos (Figura 3) [3,17].

⁷ El plexo nervioso está acompañado de los vasos nerviosos simpático y vago.

⁸ El conducto biliar común o colédoco es un conducto de la vía biliar originado de la fusión del conducto hepático común con el conducto cístico y que desemboca en la segunda porción del duodeno. Se llama así porque conduce la bilis al intestino

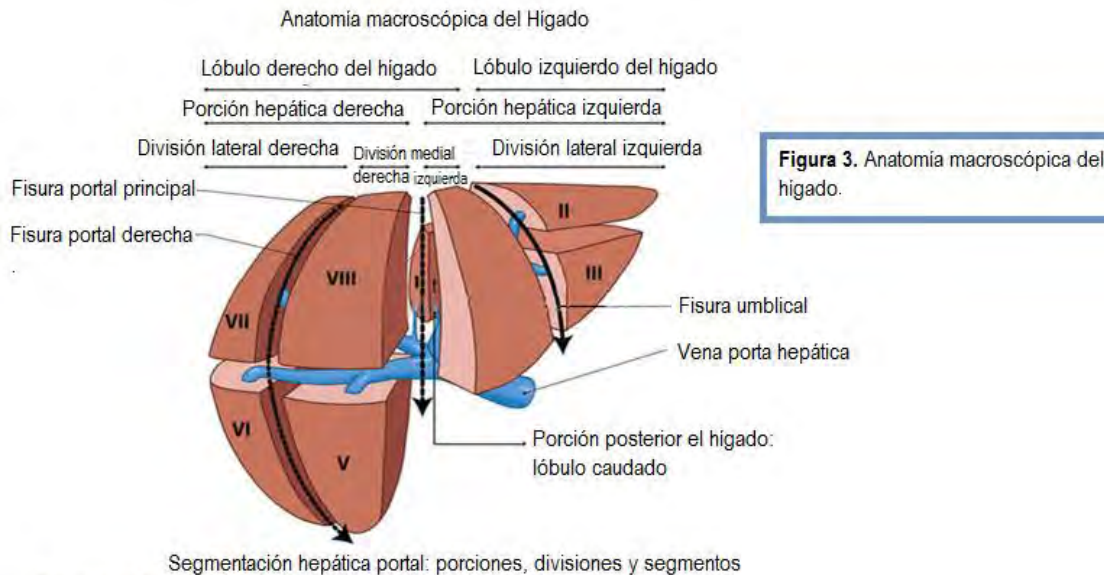


Figura 3. Anatomía macroscópica del hígado.

Figura modificada de:
 Copyright © 2008-2016 IMAIOS SAS (<https://www.imaios.com/es/e-Anatomy/Torax-abdomen-pelvis/Sistema-digestivo-Ilustraciones?structureID=7569&frame=83#>)

En ratas Wistar, al igual que en el humano, el hígado se ubica sobre la cara caudal del diafragma extendiéndose del lado derecho al izquierdo; además presenta una cara superior plana y convexa relacionada al músculo del diafragma y una cara cóncava, plana y visceral relacionada al estómago y parte del duodeno. La diferencia es que el hígado de rata posee seis lóbulos: dos lóbulos derechos (lateral y medial), dos lóbulos izquierdos (lateral y medial), el lóbulo cuadrado y el lóbulo caudado, el cual está en contacto con el riñón y estómago. Además, no presenta vesícula biliar y los ligamentos que sostienen al hígado son diferentes [72].

2. Regeneración hepática

Cuando hay un daño en el hígado existen dos tipos de respuesta, la primera es la prevención de un daño mayor y la segunda es la regeneración del tejido después de una lesión. Los factores determinantes del tipo de respuesta hepática aún no son claros; sin embargo, se conoce que la respuesta es diferente dependiendo del estímulo o daño (quirúrgico, genético, metabólico, infeccioso, inmunológico, colestásico, alcohólico o tóxico) y del tiempo de exposición. Por ejemplo, frente a lesiones agudas, intensas o que destruyan muchas células, se inducirá la regeneración hepática; sin embargo, si el daño es pequeño, repetitivo y crónico,

los intentos por restaurar la homeostasis son insuficientes, conduciendo a la fibrosis o cirrosis observables en el hígado enfermo. En la mayoría de los casos de fibrosis progresiva y cirrosis, es posible observar una combinación de ambas respuestas [36,45].

La regeneración hepática está regulada por eventos locales y, en menor medida, por eventos sistémicos. En este proceso la proliferación celular y el metabolismo de la MEC, actúan en sincronía [92].

2.1 Regulación en la regeneración hepática

La regeneración hepática esta mediada por la producción de metabolitos, citocinas y factores de crecimiento, que promueven o inhiben la proliferación celular.

Los factores de crecimiento son primeros mensajeros que interactúan con receptores glicoproteicos de membrana para traducir señales y estos receptores son cinasas, que por lo general fosforilan en el aminoácido tirosina (TK). Durante la proliferación, los factores de crecimiento que inducen la división celular son: El factor epidérmico de crecimiento (EGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento tumoral α (TGF- α) y el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF). Mientras que el factor involucrado en la inhibición de la proliferación es el Factor de Crecimiento Tumoral β (TGF- β).

Para que la proliferación se produzca es necesaria la formación de nuevos vasos sanguíneos o angiogénesis. Este proceso ocurre cuando las células endoteliales son estimuladas por una amplia gama de factores angiogénicos originados por los hepatocitos durante la regeneración hepática. Dentro de estos encontramos: VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial), la angioyectina (1 y 2), TGF- α , FGF y HGF. El VEGF es el factor de crecimiento más específico y potente, tanto para la angiogénesis como para la vasculogénesis.

Las citocinas, como las interleucinas, también actúan como mediadoras; la IL-6 aparece en el periodo pre-replicativo y hay un aumento transitorio de la IL-10 hacia el final de la regeneración. Otra citocina importante en la regeneración es el factor de necrosis alfa (TNF- α), sintetizado por los macrófagos y neutrófilos. En el hígado, el TNF- α desempeña un papel dual, ya que no sólo actúa como un

mediador de muerte celular, sino que también induce proliferación de los hepatocitos y regeneración hepática. Este es responsable de liberar el factor transcripcional NFκB, con capacidad de activar vías pro-apoptóticas (principalmente caspasas) y anti-apoptóticas (NFκB) junto con la disminución de factores pro-mitóticos, para limitar la proliferación y favorecer el estado quiescente de las células. De esta forma, se mantiene un microambiente heterogéneo y un balance entre el número de células y de la MEC para la conservación morfológica y funcional del tejido.

En los últimos años, se ha esclarecido el fenómeno de la regeneración del hígado mediante el estudio del proceso regenerativo experimental en el hígado de rata, posterior a una HP⁹ o después de una dosis necrogénica de CCL₄¹⁰ (tetra cloruro de carbono). Se sabe que existe un periodo de latencia que dura 12 horas en las ratas hepatectomizadas y 24 horas en las ratas expuestas a CCL₄. Posterior al periodo de latencia, se da lugar a la síntesis máxima de ADN y 8 horas más tarde se continúa con una onda de mitosis. La síntesis máxima de ADN permite distinguir un intervalo pre-replicativo en los hepatocitos cuando pasan de la fase G₀ (estado quiescente) a la G₁ (crecimiento), seguido del intervalo replicativo en el que toman lugar la fase S (síntesis) y la mitosis. La sincronización de ambos intervalos indica que la mayoría de los hepatocitos se encuentran en G₀ del ciclo celular, aunque se considera que las áreas portales tienen mayor potencialidad replicativa. En contraste con otros tejidos como la piel y la médula ósea, la regeneración hepática depende de las células maduras remanentes y no de las células ovas [51,74,92].

2.1.1 Regulación genética

La señal reguladora que el hígado genera para sí mismo activa la expresión de genes específicos, cuyos productos participan en el ciclo celular del hepatocito, y se caracteriza por la expresión específica y transitoria de los ARNm de

⁹ Técnica de Higgins y Anderson. Que consiste en remover los lóbulos mediano y lateral izquierdo, con lo que se quita el 70% del hígado, sin alterar a los otros lóbulos. Se tiene como resultado una hiperplasia compensatoria de los lóbulos remanentes.

¹⁰ El CCl₄ induce daño hepático ya que produce estrés oxidativo, peroxidación lipídica y daño al DNA.

proto genes¹¹ y del "encendido-apagado" de los genes ALB (Albúmina) y AFP (Alfa-Fetoproteína).

Los niveles de ARNm's de los proto genes *fos*, *myc*, *p53* y *ras*, median como un evento secuencial su activación. Los mensajeros de *fos*, *myc* y *p53* aparecen durante el intervalo pre-replicativo después de una HP. La expresión inmediata de *fos* y *myc* sugiere que se encuentran involucrados en la transición de los hepatocitos de G₀ a G₁ y que son la respuesta inicial a las señales de crecimiento generadas por la HP. En cambio, la elevación máxima del nivel de ARNm de *ras* coincide con el pico de síntesis de ADN y se encuentra fuertemente asociada a la mitosis, ya que coincide con el intervalo replicativo. La expresión de *p53*, por otro lado, es más difícil de explicar porque es un gen supresor de la proliferación, pero se especula que se expresa como respuesta a estímulos hormonales inhibidores en prevención de una replicación descontrolada.

En el sistema "encendido-apagado", participan los genes AFP y ALB. En el periodo pre-replicativo el gen de ALB se encuentra encendido y el gen de AFP permanece apagado y es en este intervalo de tiempo donde se incrementa la síntesis de ADN. Después de 24 horas, se presenta un cambio gradual en la expresión de estos genes, las ratas sujetas a la HP muestran una elevación de 2 a 3 veces en el contenido de ARNm nuclear de AFP, así como la presencia citoplasmática de la proteína; mientras que con la administración de CCl₄, se logran niveles máximos del ARNm nuclear y aumento citoplásmicos de la AFP, hasta 48 horas después del tratamiento. El aumento de la expresión de AFP está acompañado de la reducción del ARNm de ALB [74].

2.2 Morfología de la regeneración hepática

La HP genera cambios morfológicos rápidos en todas las poblaciones celulares del hígado. La proliferación celular alcanza un pico a las 72 horas y termina después de 7-14 días. Al segundo o tercer día se aprecian grupos de hepatocitos rodeados de capilares. Entonces, las células del mesénquima penetran entre estos grupos de hepatocitos y comienzan a secretar lamininas y otras moléculas

¹¹ Genes cuyos productos promueven el crecimiento y la división de la célula.

de remodelación. Los componentes de la MEC se modifican, volviéndose más típica del hígado sano, para permitir el flujo normal de la sangre portal hacia la vénula central, difundiéndose libremente a través de los sinusoides. Hacia el final de la regeneración, los capilares se transforman en verdaderos sinusoides que llegan a formar hileras constituidas por endotelio fenestrado y las células de Kupffer, dando al hígado una apariencia normal.

Los hepatocitos y las células del sinusoide hepático participan activamente en el recambio de la MEC, a través de la interacción regulada entre las células hepáticas, los procesos de activación/inactivación celular, la secreción de citocinas y de factores de crecimiento, así como la liberación de enzimas con la capacidad de degradar la MEC. La remodelación de la MEC depende de la inducción de MMPs (metaloproteinasas de la matriz extracelular) y de TIMPs (inhibidores tisulares de las metaloproteinasas). En etapas tempranas, aumenta la expresión de MMP-3, MMP-10, MMP-13 y MMP-14, alcanzando una expresión máxima de 12 a 24 horas. La MMP-2 muestra una elevación retardada, alcanzando un nivel máximo a las 72 horas. En simultaneidad, TIMP-1 y TIMP-2 mantiene su expresión basal en la etapa temprana y aumentan durante el periodo de 12 a 72 horas post-HP. La expresión y actividad de MMPs y TIMPs regulan también de forma indirecta la remodelación matricial, ya que participan en el proceso conocido como "priming", o periodo de acondicionamiento pre-proliferativo, a través de la liberación local de citocinas mitogénicas y factores de crecimiento unidos a la MEC. Además, preparan a la MEC para una degradación posterior con la participación primordial de gelatinasa que preceden y se sinergizan con colagenasas. Finalmente, el equilibrio entre las MMPs y TIMPs favorece la reducción de la MEC hacia el final de la regeneración [37,67,74].

2.3 Otros fenómenos relacionados a la regeneración hepática

Además de los mecanismos ya mencionados, se han identificado otros fenómenos asociados al proceso de regeneración hepática, como son los cambios tempranos en los flujos hemodinámicos y aumento en las actividades séricas de algunas enzimas consideradas como marcadoras de daño hepático. Dichos cambios se han asociado más a una progresión de la regeneración hepática que a una

consecuencia de daño hepatocelular y necrosis, y muy probable debido a cambios en la magnitud del flujo sanguíneo a través de la vena porta. Aquí el endotelio puede tener un papel central en la mediación de estos efectos de transducción, ya que estas células tienen la capacidad de responder a fuerzas mecánicas y traducirlas a efectos fisiológicos con la participación de la liberación de segundos mensajeros [29].

2.3.1 Mecanotransducción

Al aumentar fuerzas mecánicas en la irrigación sanguínea del hígado (Porta-Cava), se genera estrés por fricción (laminar) y esta fricción, en consecuencia, activa muchas vías de transducción de señales en las células epiteliales, llamada mecano-transducción. Este fenómeno activa los canales iónicos de calcio, las proteínas transmembranales expuestas a la superficie extracelular y la producción de ON. En las células endoteliales, las integrinas que conectan a las células con la matriz extracelular que las rodean, establecen una unión con la actina del citoesqueleto, generando cambios estructurales dentro de la célula y activación de prostaglandinas y de la vía MAPK p38 cinasa, sensible al estrés y responsable de regular la transcripción de proteínas con respuesta inflamatoria [51,96].

3. Perfil enzimático

Las enzimas en el organismo se encuentran en mayor medida dentro de las células y en menor medida en el medio extracelular. Cuando un tejido se daña, y se rompen las barreras que delimitan a las células (muerte celular), las enzimas se liberan al medio extracelular. Este aumento en el nivel enzimático en la sangre se usa como un indicador para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades; sin embargo, existe la enorme desventaja de que muchas de las enzimas no son propias de un solo tejido y es el analista o médico quien debe interrelacionar estos conocimientos con la sintomatología del individuo para averiguar qué tipo de daño está ocurriendo [11,101].

Después de lesiones, la concentración plasmática de una enzima liberada puede aumentar en etapas tempranas y tardías, declinar de manera rápida o con lentitud; es decir, las enzimas del citoplasma tienden a aparecer con mayor rapidez que las

de los organelos sub-celulares. En cambio, su eliminación del plasma, varía de acuerdo a su susceptibilidad a la proteólisis y permeabilidad a través de los glomérulos renales [27,92].

Existen dos categorías generales de enzimas hepáticas que reflejan el estado general del hígado y del sistema biliar:

- El primer grupo incluye las enzimas transaminasas: la glutamato-oxalacetato transaminasa sérica o aspartato aminotransferasa (TGOs o ASTs) y la glutamato-piruvato transaminasa sérica o alanina aminotransferasa (TGPs o ALTs). Estas enzimas son indicadoras del daño celular hepático.
- El segundo grupo incluye ciertas enzimas hepáticas, como la fosfatasa alcalina y la γ -glutamiltanspeptidasa, las cuales indican obstrucción del sistema biliar, ya sea en el hígado o en los canales mayores de la bilis que se encuentran fuera de este órgano [51,61].

3.1 Transaminasas

Las transaminasas desempeñan un papel amplio en el metabolismo de los aminoácidos, ya que se encargan de la transferencia del grupo amino, generalmente del glutamato, a un α -cetoácido, con la síntesis de otro aminoácido y el derivado α -ceto del glutamato (α -cetoglutarato). Este proceso, denominado transaminación, tiene una especial importancia metabólica porque genera intermediarios del ciclo de Krebs a partir de otros aminoácidos.

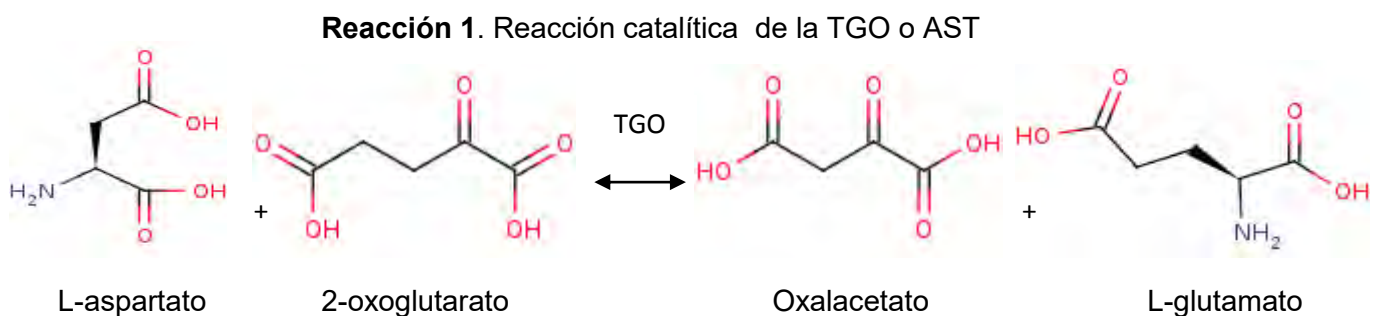
Existen aminotransferasas específicas en las células animales para la síntesis de todos los aminoácidos que se encuentran en las proteínas en tanto se disponga de los correspondientes cetoácidos (excepto la treonina y la lisina).

Las aminotransferasas utilizan la forma activa de la vitamina B₆, el piridoxal fosfato, como coenzima. El piridoxal fosfato tiene como parte funcional un grupo aldehído que se une al grupo amino de una transaminasa, en este sitio es donde la catálisis inicia con la condensación del aldehído y el grupo amino para dar un intermediario de la base de Schiff o aldimina.

Las reacciones de transaminación tienen constantes de equilibrio próximas a la unidad. En consecuencia, la dirección en que se produce una determinada transaminación está controlada en gran parte por las concentraciones intracelulares de sustratos y productos. Esto significa que la transaminación puede utilizarse no solo para la síntesis de aminoácidos, sino también para su degradación de manera concertada con la glutamato deshidrogenasa. También participa en el direccionamiento del exceso de aminoácidos hacia el catabolismo y la regeneración de energía [18,70].

3.1.1 TGO

La TGO (SGOT, GOT, AST) cataliza la reacción de transferencia de un grupo amino del L-aspartato al 2-oxoglutarato para formar oxalacetato y L-glutamato, aunque también actúa sobre la L-tirosina, L-fenilalanina y L-triptófano [118].



Organismo: <i>Rattus norvegicus</i>		
Parámetros	TGO mitocondrial	TGO citosólica
Km para L-aspartato	0.75 mM	0.35 mM
Km para 2-oxoglutarato	1.75 mM	1.25 mM
Actividad específica	22.37 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$	48.45 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$
pH óptimo	6.8	7.5

[118]

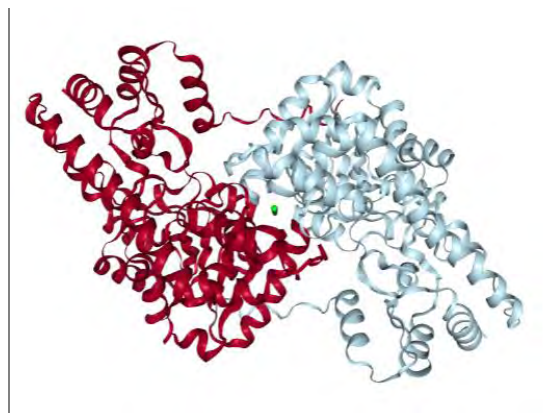
La TGO se encuentra intracelularmente en el citoplasma y en la mitocondria. La TGO citosólica (TGO1 o AST) se encuentra principalmente en sangre y corazón, mientras que la TGO mitocondrial (TGO2 o ASTm) se localiza predominantemente

en el hígado. Esta enzima, también se encuentra en lugares como los músculos, riñones y cerebro. La TGO mitocondrial es dimérica, ya que consta de dos subunidades idénticas, cada una con aproximadamente 400 residuos de aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 45 kDa.

La TGO participa en la gluconeogénesis¹², ya que produce α -oxalacetato, que puede actuar como precursor de la glucosa. También participa en procesos metabólicos de aspartato y glutamato, 4-hidroxi prolina, ácido dicarboxílico y L-quinurenina¹³; forma parte de la respuesta a glucocorticoides, etanol y al estímulo de la insulina, y facilita la captación celular de ácidos grasos libres de cadena larga [113].

Cuadro 1. E.C. 2.6.1.1–TGO o AST mitocondrial
Homo sapiens

**FORMA MADURA DE LA TRANSAMINASA GLUTÁMICO-OXALACÉTICA
MITOCONDRIAL HUMANO**



Los colores están dados por cadena. Consiste en dos subunidades idénticas (dímero). Contiene elementos alfa (46%) y beta (14%). Opera a través de reconocimiento de doble sustrato (mecanismo ping-pong). Su cofactor es piridoxal 5'-fosfato.

6290 átomos, 6436 enlaces, 802 grupos, 2 cadenas, 2 polímeros

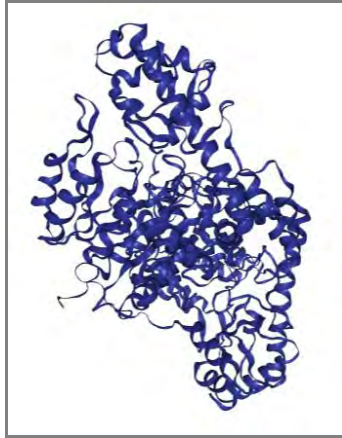
[118]

¹² Proceso cuando la glucosa se sintetiza a partir de precursores no glúcidos.

¹³ Precursor del ácido quinurénico (antagonista de aminoácido excitativo).

Cuadro 2. E.C. 2.6.1.1 –TGO o AST citoplasmática
Homo sapiens

**FORMA MADURA DE LA TGO
CITOPLASMÁTICA DEL HUMANO**



Los colores están dados por cadena. Consiste en una sola subunidad (monómero). Contiene elementos alfa (43%) y beta (13%). Opera a través de reconocimiento de doble sustrato (mecanismo ping-pong). Su cofactor es piridoxal 5'-fosfato.

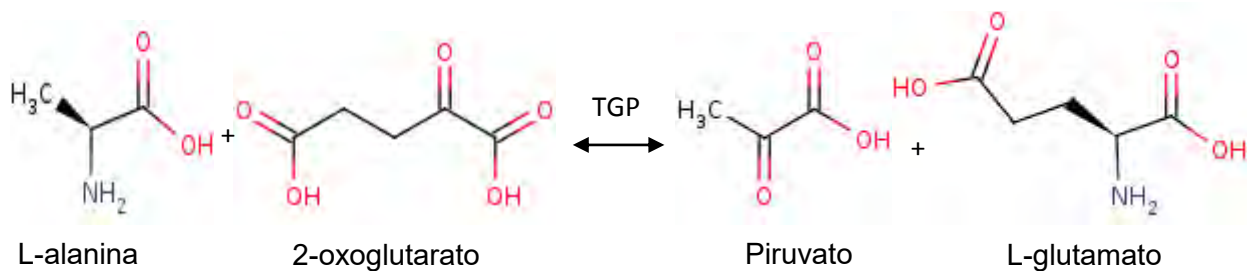
6526 átomos, 6692 enlaces, 828 grupos, 1 cadena, 2 polímeros

[118]

3.1.2 TGP

La TGP (SGPT, GPT, ALT) cataliza la transferencia de un grupo amino desde la L-alanina al 2-oxoglutarato, para formar como productos piruvato y glutamato.

Reacción 2. Reacción catalítica de la TGP o ALT



Organismo: <i>Rattus norvegicus</i>	
Parámetros	TGP
Km para L-alanina	0.51 mM
Km para 2-oxoglutarato	0.12 mM
Actividad específica	AlaAT I 30.58 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ AlaAT II 43.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$
pH óptimo	8.5

[118]

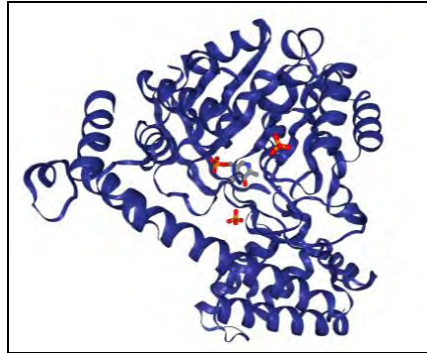
La TGP no es exclusiva del hígado, pero es donde se encuentra en mayor concentración. Tiene isoenzimas (AlaAT I y AlaAT II) citoplasmáticas y mitocondriales y dada su distribución tisular, su aumento es un reflejo más específico que la TGO en enfermedades hepáticas [13,32].

La TGP participa en el metabolismo global de alanina, aspartato y glutamato; además, de participar activamente en la gluconeogénesis y glucólisis por proveer alanina y piruvato.

En caso de daño severo en el hígado, como hepatitis viral aguda, la TGP y la TGO pueden estar elevadas hasta más de 1,000 U/L. En la cirrosis, el aumento de estas enzimas puede ser mínimo (menos de 2-3 veces de lo normal) o moderado (100-300 U/L), debido a la presencia de fibrosis y por consecuencia a la disminución de hepatocitos funcionales. Aumentos leves o moderados de la TGP y la TGO son a menudo usados para valorar el avance de la hepatitis crónica y la respuesta al tratamiento con corticoesteroides e interferón [51,85].

Cuadro 3. E.C. 2.6.1.2 –TGP o ALT
Homo sapiens

FORMA MADURA DE LA TRANSAMINASA GLUTÁMICO-PIRÚVICA
MITOCONDRIAL HUMANA



Los colores están dados por cadena. Consiste en una subunidad (monómero). Contiene elementos alfa (43%) y beta (16%). Opera a través de reconocimiento de doble sustrato (mecanismo ping-pong). Su cofactor es piridoxal 5'-fosfato (puntos rojo= átomos de oxígeno, azul= nitrógeno, gris =carbono).

3696 átomos, 3682 enlaces, 557 grupos, 1 cadena, 3 polímeros

[118]

3.2 Deshidrogenasa

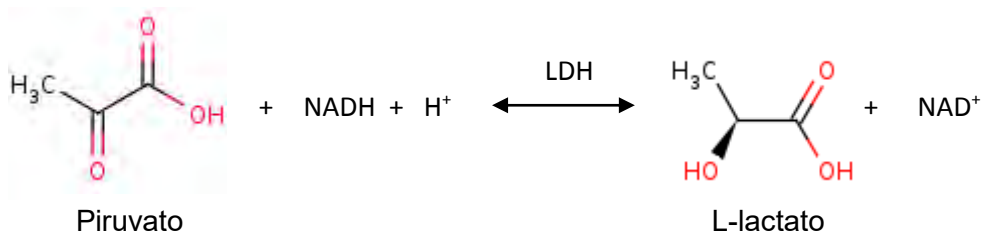
Las deshidrogenasas son conocidas como enzimas redox y están constituidas por dos dominios: un dominio al que se le une la coenzima (NAD^+/NADH , $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ y FAD/FADH_2) y un dominio al que se le une el sustrato. Su acción catalítica se basa en la oxidación o reducción de sustrato, por la remoción o adición de dos átomos de hidrógeno a la coenzima que actúan como aceptor o como donador de electrones y protones.

La importancia metabólica de las deshidrogenasas en el organismo es su participación en el ciclo de Krebs y en la cadena transportadora de electrones [30,105].

3.2.1 Lactato deshidrogenasa

La liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) es un marcador de daño tisular ampliamente utilizado, se encuentra distribuida por todo el organismo y las mayores concentraciones de LDH se encuentran en el hígado (LDH-5), pulmones (LDH-3), corazón, riñón, cerebro, músculo esquelético y eritrocitos. La enzima lactato deshidrogenasa cataliza la reducción de piruvato por el NADH a L-lactato y NAD⁺. La reacción es reversible, por lo que depende de las concentraciones de sustrato y productos [35,86].

Reacción 3. Reacción catalítica de la LDH



Organismo: <i>Rattus norvegicus</i>	
Parámetros	LDH
Km para L-lactato	1.79 mM
Km para piruvato	Varía con cada isoenzima
pH óptimo	8

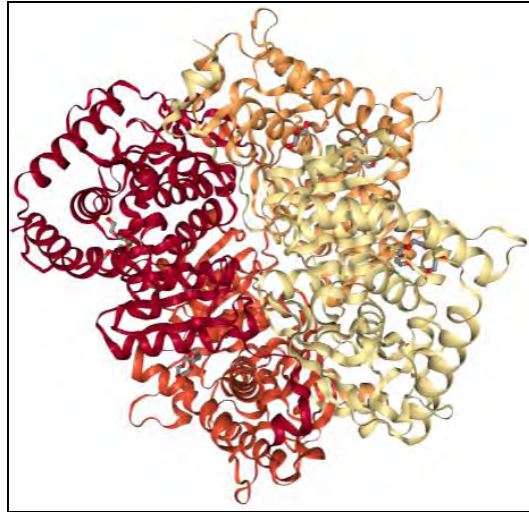
[118]

En términos cuantitativos el lactato es el precursor gluconeogénico más importante. La LDH es abundante en el músculo, y el equilibrio se decanta hacia la reducción del piruvato a lactato. Así pues, se libera lactato a la sangre, de donde puede captarse con facilidad por el corazón que lo oxida como combustible y por el hígado que lo re-oxida a piruvato, para dirigirse a la gluconeogénesis y producir glucosa, la cual se devuelve al torrente sanguíneo y es captada por el músculo para regenerar las reservas de glucógeno. La ruta es esencialmente activa durante la recuperación posterior a un ejercicio muscular intenso [62].

En seres humanos, la LDH está presente en los tejidos de vertebrados, en forma de al menos cinco isoenzimas diferentes separables por electroforesis. Todas las isoenzimas de la LDH contienen cuatro cadenas polipeptídicas, pero las cinco isoenzimas contienen proporciones diferentes de dos tipos de polipéptidos que difieren en composición y frecuencia. Las cadenas A (también llamada M de músculo) y las cadenas B (también designadas H de "heart" corazón) están codificadas por dos genes diferentes. En el músculo esquelético la isoenzima predominante contiene cuatro cadenas B. Las isoenzimas de la LDH de otros tejidos son una mezcla de las cinco formas posibles, que se pueden designar A_4 , A_3B , A_2B_2 , AB_3 y B_4 . Las diferentes isoenzimas de la LDH tienen valores significativamente diferentes de V_{max} y de K_m , especialmente para el piruvato. Las propiedades de la isoenzima A_4 de la LDH favorece la reducción rápida de concentraciones muy pequeñas de piruvato a lactato en el musculo esquelético, mientras que las de la isoenzima B_4 tienden a favorecer la oxidación rápida del lactato a piruvato en el corazón. La cuantificación de las isoenzimas es útil para determinar si la isoenzima hepática A_4 (LDH-5) está elevada [30].

Cuadro 4. E.C. 1.1.1.27 –LDH
Homo sapiens

FORMA MADURA DE LACTATO DESHIDROGENASA DEL HUMANO



Los colores están dados por cadena. Consiste en cuatro subunidades (tetramero). Contiene elementos alfa (44%) y beta (18%). Usa NADH/NAD(+) como co-sustrato.

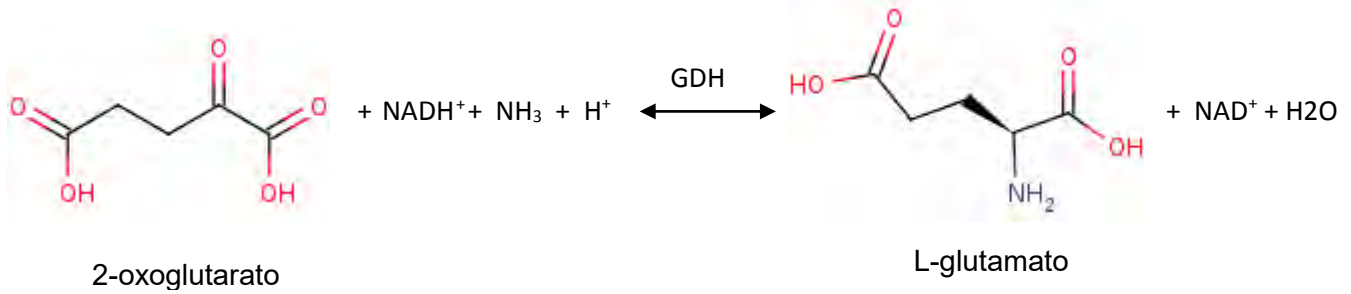
10919 átomos, 10848 enlaces, 1610 grupos, 4 cadena, 4 polímeros

[118]

3.2.2 Glutamato deshidrogenasa

El glutamato se desamina oxidativamente en la mitocondria por la glutamato deshidrogenasa, la única enzima conocida que, por lo menos en algunos organismos, puede aceptar tanto NAD^+ como NADP^+ como su coenzima redox. La reacción ocurre con la transferencia de un ion hidruro del C_α del glutamato al NAD(P)^+ , formando así un α -iminoglutarato que es hidrolizado a α -cetoglutarato y amoníaco [86,105]. El equilibrio de la reacción en condiciones estándar favorece en gran medida la formación de glutamato sobre la formación de NH_4^+ [118].

Reacción 4. Reacción catalítica de la GHD



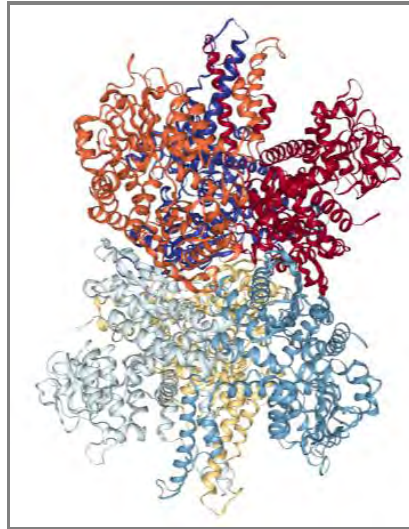
Organismo: <i>Rattus norvegicus</i>	
Parámetros	GDH
Km para 2-oxoglutarato	0.00138 mM
Km para NADH ⁺	0.03609 mM
Actividad específica	0.35 μmol•min ⁻¹ •mg ⁻¹
pH óptimo	8

[118]

En el humano y otros primates, la enzima glutamato deshidrogenasa está codificada por dos genes (GLUD1 y GLUD2) y tiene dos isoenzimas, la GDH-1 y la GDH-2, ambas se expresan en sangre, cerebro, retina, hígado, mucosa intestinal, páncreas, riñones, testículos y ovarios, pero a diferencia de la LDH, no se expresa en el músculo. En la especie *Rattus norvegicus*, la GDH esta codificada solo por el gen GLUD1 y la enzima se encuentra en músculo esquelético, páncreas, hígado, riñón, mucosa intestinal, corazón y cerebro. La GDH tiene una catálisis que depende de los sustratos y productos, por lo que también participa en la formación de glutamato por aminación reductora; esta reacción constituye un primer paso en la biosíntesis de muchos otros aminoácidos. Se encuentra involucrada en el metabolismo de la alanina, aspartato y glutamato, regula positivamente la secreción de insulina y participa en el proceso metabólico de ácidos tricarbóxicos. La isoenzima GDH-1 se expresa en niveles altos en el hígado [30,118].

Cuadro 5. E.C. 1.4.1.2–GDH
Homo sapiens

FORMA MADURA DE LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA MITOCONDRIAL DEL HUMANO



Los colores están dados por cadena. Consiste en seis subunidades (hexámero). Contiene elementos alfa (48%) y beta (13%). Usa NADH/NAD(+) como cofactor.

23244 átomos, 23748 enlaces, 2976 grupos, 6 cadena, 6 polímeros

[118]

4. Función hepática

El hígado puede considerarse como una pieza de interconectividad en el organismo. En otras palabras, el hígado al importar y exportar gran cantidad de moléculas a todo el cuerpo, es el responsable de modular una compleja red de comunicación; y dado que en este órgano se realizan prácticamente todas las rutas metabólicas (más de 1500 funciones químicas), se considerado el laboratorio del cuerpo humano y de otras especies. Sus funciones son:

- 🌈 Almacenamiento y metabolismo de carbohidratos: si la glucosa se encuentra en exceso, el hígado la almacena como glucógeno, y si hay deficiencia de ésta en sangre, se realiza la gluconeogénesis. El hígado no solo almacena glucógeno, sino que también tiene depósitos de vitaminas liposolubles (A, D y E), vitaminas K, vitaminas B₁₂ y metales como hierro y cobre [11].

- Intervención en el metabolismo de proteínas (degradación y síntesis): albúmina, proteínas transportadoras, factores de coagulación, hormonas y factores de crecimiento.
- Eliminación de amonio por el ciclo de la urea.
- Participación en la lipogénesis¹⁴ y en la β -oxidación¹⁵ de ácidos grasos [63].
- Síntesis y eliminación de colesterol y apoproteínas A (las cuales captan el colesterol). Además está involucrado en la degradación de hormonas esteroideas.
- Transformación de fármacos y productos químicos liposolubles en hidrosolubles para su eliminación, mediante la gama de enzimas hepáticas que oxidan, reducen, hidrolizan y desmetilan. De forma similar, el hígado modifica o excreta diversas hormonas como la tiroxina y hormonas esteroideas (estrógeno, cortisol y aldosterona). Cuando el hígado debe excretar sustancias insolubles, como el colesterol y la bilirrubina, utiliza la bilis formada por los hepatocitos. La bilis también es esencial en la digestión y absorción de grasas.
- Síntesis de la transferrina, la cual transporta hierro a través de la sangre y permite la formación de grupo hemo.

Finalmente cabe mencionar que el hígado tiene su propio sistema inmune, donde los linfocitos convencionales y no convencionales están dispersos en el parénquima y los tractos portales [8,25,37].

5. Ciclo de la urea

La degradación de aminoácidos, en todos los órganos del cuerpo, produce amoníaco, el cual se transporta al hígado para su conversión final en urea. La mayoría de los tejidos utilizan la glutamina sintetasa para convertir el amoníaco en glutamina, un producto atóxico y eléctricamente neutro. La glutamina se transporta por la sangre al hígado donde se degrada hidrolíticamente por la glutaminasa para formar glutamato y amoníaco [63].

¹⁴ Síntesis de ácidos grasos.

¹⁵ Uso de los ácidos grasos como combustible que requiere su conversión en acetil CoA, FADH₂ y NADH.

El sitio más importante para el catabolismo de amonio, en animales ureotélicos¹⁶, es el hepatocito, donde se expresan todos los elementos del ciclo de la urea [45]. El ciclo de la urea comienza cuando el amoniaco ($-\text{NH}_3^+$) entra a la mitocondria como glutamato en forma de zwitterión¹⁷ (+/-). Dentro de la mitocondria, se une al HCO_3^- presente (proveniente del CO_2 y agua) y se fosforila por la hidrolisis de ATP; todo esto está catalizado por la enzima carbamoil fosfato sintetasa I (CPS-1), que como lo indica su nombre, favorece la síntesis de carbamoil fosfato.

El ciclo de la urea continúa con la reacción del carbamoil fosfato con la ornitina presente en la mitocondria (producto de este mismo ciclo); a través de la acción de la enzima ornitín carbamoil transferasa o transcarbamilasa (OTC), se transfiere el grupo carbamoil a la ornitina para formar citrulina. Este α -aminoácido "no estándar" se exporta de la mitocondria al citoplasma por medio del transportador citrulina-ornitina en la membrana mitocondrial para continuar con el ciclo [63].

En el citoplasma se encuentra el aspartato (también como zwitterión) y, tras la llegada de la citrulina, la enzima argininosuccinato sintetasa condensa el grupo ureido de la citrulina con el grupo amino del aspartato para producir arginina succinato. Esta reacción es de índole endergónica y requiere una molécula de ATP; además, el ATP también permite formar el intermediario citrulil-AMP, indispensable para esta reacción [70].

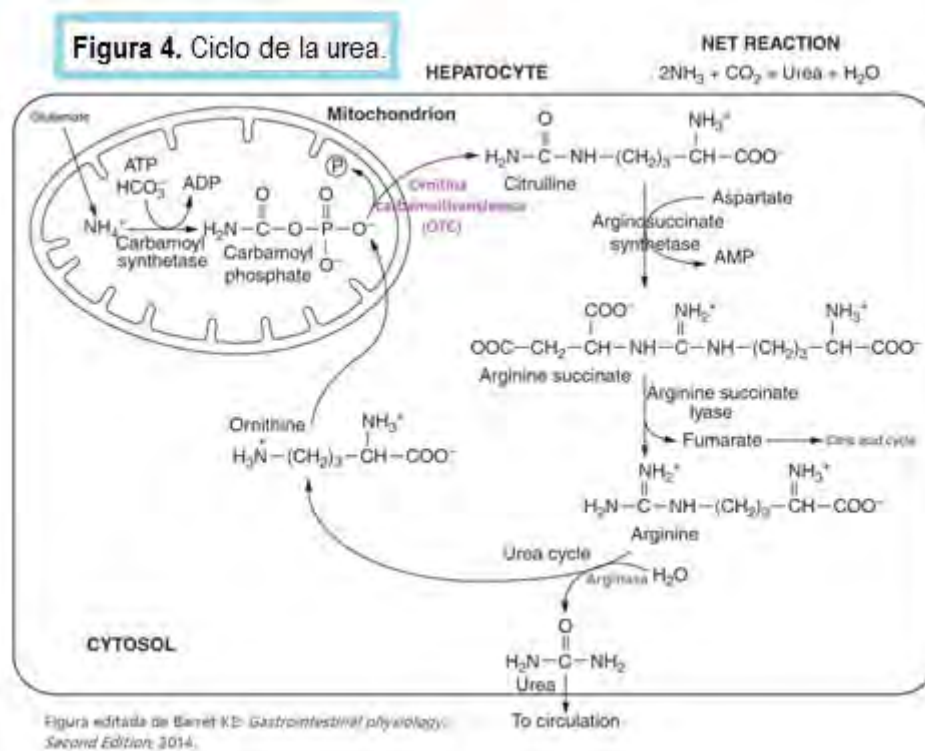
La arginina succinato, en este punto del ciclo, tiene los componentes de la molécula de urea; sin embargo, el grupo amino proveniente del aspartato todavía está unido a su esqueleto de carbono. Por esta razón, la arginina succinato liasa cataliza la formación de fumarato, compuesto del esqueleto de carbono del aspartato, para dejar libre a la arginina que es el precursor inmediato de la urea. El fumarato es redirigido al ciclo de Krebs (o ciclo del ácido cítrico) y se transforma a L-malato y después a oxalacetato [70].

Finalmente la arginina sirve de sustrato para la enzima arginasa, la cual cataliza la unión de un oxígeno (proveniente de una molécula de H_2O) al carbono del grupo

¹⁶ Son aquellos animales que excretan urea.

¹⁷ Del alemán zwitter que significa híbrido. Es un compuesto aminoácido eléctricamente neutro a pH fisiológico (7.4), ya que el grupo carboxilo no está protonado (-) y el grupo amino está protonado (+).

amino y su conversión a un grupo amida. Esta hidrólisis de la arginina da como productos la urea y la ornitina. La ornitina se adentra nuevamente a la mitocondria y reacciona con el carbamoil fosfato, comenzando el ciclo otra vez (figura 4) [88].



El ciclo de la urea convierte de este modo dos grupos amino (uno del glutamato y otro del aspartato) y un átomo de carbono de HCO₃⁻, en la urea, con el costo de cuatro enlaces fosfato de alta energía¹⁸. Este costo energético se recupera con creces por la formación de NADH, a partir de sustratos del ciclo de la urea, como por la reacción de la glutamato deshidrogenasa y la conversión del fumarato a través del oxalacetato a aspartato. La re-oxidación mitocondrial de NADH produce seis ATPs [63,70].

5.1 Regulación del ciclo de la urea

Evidentemente, cuando hay un aumento en la degradación de aminoácidos se genera un exceso de nitrógeno que debe ser excretado y se requiere un aumento en la velocidad de síntesis de la urea. Los incrementos en esta tasa de degradación implican un aumento en la concentración de glutamato a través de

¹⁸ (1) ATP, (2) ATP->AMP + PPi, (3) AMP->Pi y (4) PPi->2Pi

reacciones de transaminación [70]. Esta situación a su vez, provoca un aumento en la síntesis del N-acetil-glutamato a partir de acetil-CoA y glutamato, por la N-acetil-glutamato sintetasa. El N-acetil-glutamato activa alostéricamente a la CPS-1 y, por lo tanto, estimula a todo el ciclo de la urea [63].

Las enzimas restantes del ciclo de la urea están controladas por las concentraciones de sus respectivos sustratos.

5.2 Urea

La urea, una molécula relativamente pequeña (60.06 g/mol) y con una carga prácticamente neutra, cruza fácilmente las membranas celulares, de tal modo que se filtra en el glomérulo para pasar a formar parte de la orina. En presencia de la ADH (hormona antidiurética) la reabsorción de agua aumenta en el túbulo recolector aumentando el concentrado de urea. En esta zona existen transportadores específicos para urea que permiten la reabsorción de la urea y que son asimismo estimulados por la ADH. Sin embargo, en ausencia de ADH, el túbulo colector es más impermeable al agua, por lo que la urea se concentrará menos y será menos reabsorbida y más excretada en la orina. A pesar de que la urea se reabsorbe pasivamente en todo el lóbulo renal, su permeabilidad es menor a la del agua, de tal modo que sólo se reabsorbe la mitad de la cantidad total filtrada. Debido a esto, el riñón sirve como el sitio donde se excreta la mayoría de la urea producida por el hígado. Sin embargo, parte de la urea circulante también puede difundirse pasivamente de nuevo en el intestino, en donde actúan sobre ella las ureasas bacterianas para obtener amoníaco y agua. Una fracción del amoníaco generado se excreta en forma de ion amonio y el resto es reabsorbido de nuevo para ser manejado por el hígado una vez más [70].

5.3 Ornitina transcarbamilasa (OTC)

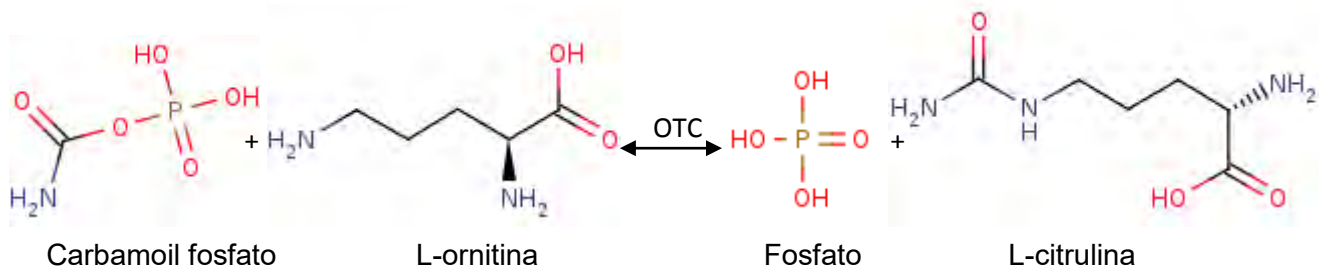
La ornitina transcarbamilasa fue descubierta por Grisolia y Cohen en 1952, cataliza la segunda reacción del ciclo de la urea; esto es, la síntesis de citrulina a partir de ornitina y carbamoil fosfato. La OTC está presente en la mitocondria de los hepatocitos en animales ureotélicos y en menor medida en la mucosa intestinal

de los mamíferos, aunque también se han detectado en el riñón de algunas especies ureotélicas, en algunas plantas y microorganismos.

Debido a la alta concentración de OTC en el hígado y su baja concentración en el suero, los cambios en el citoplasma y mitocondrias de los hepatocitos, hacen que las infecciones degenerativas o factores tóxicos, den lugar a su aumento de actividad en el suero.

En humanos, la deficiencia de OTC es el defecto congénito más frecuente en el ciclo de la urea y se vincula al cromosoma X [54,78,95].

Reacción 5. Reacción catalítica de la OTC

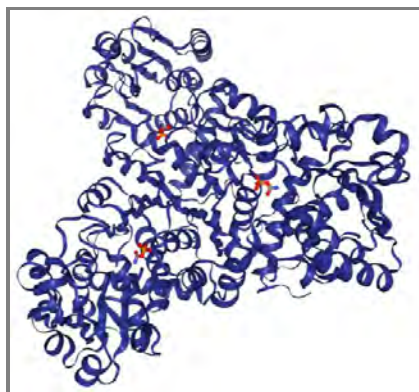


Organismo: <i>Homo sapiens</i>	
Parámetros	OTC
Km para carbamoyl fosfato	0.13-1.24 mM
Km para L-ornitina	0.36-0.55 mM
Actividad específica	86.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$
pH óptimo	7.6

[118]

Cuadro 6. E.C. 2.1.3.3 –OTC
Homo sapiens

**FORMA MADURA DE LA ORNITINA TRANSCARBAMILASA
MITOCONDRIAL HUMANA**



Los colores están dados por cadena. Es un monómero, pero su forma funcional es como trímero. Contiene tanto elementos alfa (41%) y beta (14).

8085 átomos, 7761 enlaces, 1440 grupos, 1 cadenas, 3 polímeros

[118]

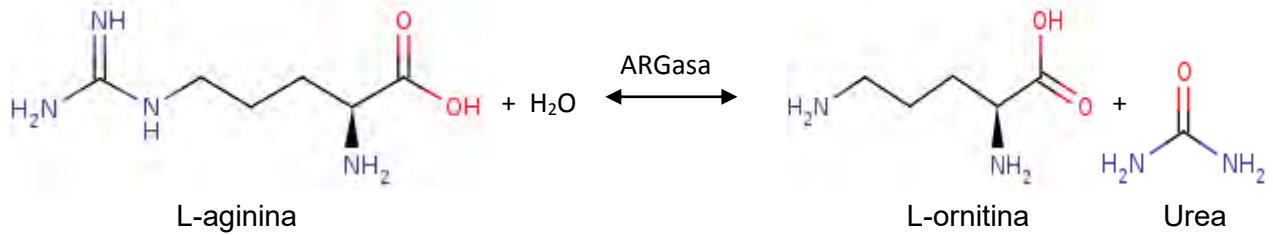
5.4 Arginasa (ARGasa)

La arginasa fue descrita por primera vez en 1904, pero no fue sino hasta 1932 cuando Krebs y Henseleit establecieron su rol como la enzima terminal en el ciclo de la urea [1,58]. Se encuentra principalmente en el hígado, pero se han reportado niveles bajos de actividad en eritrocitos, leucocitos, plaquetas, riñón, músculo esquelético, corazón, cerebro, intestino, páncreas, pulmón, epidermis, placenta, testículos, glándulas salivales, plasma y fibroblastos. Las funciones metabólicas de la ARGasa extra-hepática son pocas claras.

La ARGasa hepática tiene un peso molecular de 37KDa y presenta una estructura oligomérica de dímeros y trímeros. Es una enzima citosólica adherida a las estructuras subcelulares, cuyas propiedades cinéticas muestran un pH óptimo de

9.5 y es dependiente del ión divalente Manganeso (Mn^{+2}) a concentraciones de 2 mM [21,54,118].

Reacción 6. Reacción catalítica de la ARGasa



Organismo: <i>Rattus norvegicus</i>	
Parámetros	ARGasa
Km para L-arginina	1-50 mM
Actividad específica	562 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$
pH óptimo	9.5

[118]

Cuadro 7. E.C. 3.5.3.1 –ARGasa
Homo sapiens

FORMA MADURA DE LA ARGasa EN HUMANO



Los colores están dados por cadena. Es un monómero, pero su forma funcional es en trímero. La enzima requiere un grupo de metal de dos moléculas de manganeso con el fin dar estabilidad a la molécula. Cada subunidad idéntica de la enzima contiene un sitio activo que se encuentra en la parte inferior de una hendidura. Contiene tanto elementos alfa (38%) y beta (15%).

7593 átomos, 7335 enlaces, 1374 grupos, 1 cadenas, 3 polímeros

[118]

La ausencia de actividad de ARGasa en sujetos humanos produce una hiperargininemia, una rara enfermedad hereditaria metabólica, cuya deficiencia se ha demostrado en hígado, células rojas y leucocitos. La determinación de ARGasa en eritrocitos es considerado como el principal parámetro en el diagnóstico de este desorden hereditario.

Otra aplicación clínica de la determinación de ARGasa ha sido descrita en ciertos tipos de anemia [20].

6. Pulmón

El pulmón es el órgano encargado de abastecer de oxígeno a la sangre y de eliminar CO₂. Esto ocurre cuando la sangre venosa del organismo regresa al corazón y es recolectada en el ventrículo derecho, de aquí por medio de la arteria

pulmonar¹⁹ entra a los pulmones [75]. Este intercambio gaseoso se lleva a cabo en los alveolos²⁰, que se encuentran uno junto a otro y comunicados por numerosos poros en sus paredes (poros de Kohn), permitiendo una distribución homogénea del aire intra-alveolar. En cambio, la entrada de aire al alveolo depende solo de una abertura controlada por la acción de un esfínter de músculo liso (fibras elásticas y colágena III). Los alvéolos se encuentran separados por septos inter-alveolares, una lámina epitelial basal y tejido conectivo con una abundante red de capilares sanguíneos (vasos y nervios nutritivos) [94].

El epitelio alveolar de los conductos aéreos está recubierto principalmente por una capa continua de neumocitos tipo I o membranosos (aplanados) y neumocitos tipo II (redondos). Estas células especializadas cumplen las funciones de contener y producir una sustancia surfactante en su pared interna, que contrarresta y equilibra la tensión superficial [24]. El 95% de la superficie alveolar está constituido por neumocitos de tipo I y el 5% está constituido por los neumocitos tipo II, a pesar de que los tipo II son más numerosos que los tipo I (relación 2:1). Cabe mencionar que cuando hay una destrucción del epitelio alveolar los neumocitos tipo II participan en su reparación [35].

La lámina epitelial varía su composición a medida que recubre las vías aéreas, incluyendo bronquios y bronquiolos²¹. La lamina epitelial es sencilla cuando los conductos son más pequeños (bronquiolos y próximos a la zona alveolar), pero a medida que el diámetro aumenta (hacia los bronquios) el epitelio se vuelve pseudoestratificado²². Es importante hacer notar que el revestimiento del epitelio, tampoco es uniforme, ya que se encuentran formado por capas de cinetocilios²³ (que recubre la cara apical de las células epiteliales) y células caliciformes²⁴ (que se distribuyen y especializan de forma diferente). Un ejemplo de lo anterior son las

¹⁹ Llamada arteria, a pesar de transportar sangre venosa.

²⁰ Delgada barrera celular epitelial que forma evaginaciones y permite la hematosis.

²¹ Los bronquios son conductos tubulares fibrocartilaginosos, derivados de la tráquea que guían al oxígeno al tejido parenquimatoso de los pulmones, donde se dividen en bronquiolos.

²² Son aquellos epitelios en que todas las células hacen contacto con la lámina basal, pero no todas alcanzan la superficie, por lo que en realidad son epitelios simples, con varios tipos de células dispuestas en una sola capa, pero con sus núcleos a diferentes niveles.

²³ Son apéndices celulares en forma de pestaña o flagelo, que realizan movimientos rítmicos.

²⁴ Células glandulares, unicelulares secretoras de moco.

células de Clara (o células club) que representan del 11 al 22% del número total de células epiteliales en los bronquios terminales; son células caliciformes sin cilios, distribuidas de forma muy heterogénea y se encarga de producir la proteína CCSP (antiinflamatoria e inmunosupresora) y las principales células progenitoras después de una lesión bronquial. Otros ejemplos son las células cepillo, células serosas y las células SNED (o Kulchitsky). En general, las células ciliadas y caliciformes disminuyen en número a medida que se aproximan a los bronquiolos terminales, mientras que el número de células de clara aumentan.

La pared de los conductos aéreos consta de tres componentes (1) una capa mucosa compuesta de una lámina epitelial y de tejido conectivo; (2) una vaina de músculo liso; y (3) un tubo de tejido conectivo provisto de cartílago.

El tejido conectivo (compuesto de colágena, glicoproteínas, proteoglicanos, glicoproteínas y colagenosas, como fibronectina y laminina), que tiene una presencia reducida en las paredes de los alveolos y mayor presencia lejos de ellas, alberga al sistema linfático (además de unos pocos macrófagos intersticiales, fibroblastos y miofibroblastos) y forma estructuras auxiliares en la pared del conducto aéreo, tales como vainas musculares lisas o cartílago. Consta de tres subdivisiones: (a) bronco-arterial (axilar), rodeando las ramas bronco-arteriales desde los hilios hasta el punto en que las paredes bronquiolares se relacionan íntimamente con el parénquima pulmonar; (b) parenquimatoso o acinar, situado entre las membranas basales alveolares y capilares y (c) sub-pleural, situado entre la pleura y el parénquima pulmonar el cual se continúa con los septos inter-lobulares y el espacio intersticial peri-venosos que llega nuevamente hasta los hilios pulmonares.

La red capilar del pulmón es diferente a la del resto del cuerpo, el endotelio que recubre los vasos sanguíneos es más grueso y, claramente, tiene células metabólicamente más activas. Estas células son particularmente más ricas en cuerpos de Weibel-Palade²⁵, que juegan un papel fundamental en la hemostasis y la inflamación. El endotelio también cumple con muchas de las funciones metabólicas no respiratorias del pulmón, en particular la transformación de ciertas

²⁵ Gránulos de almacenamiento de dos moléculas: el factor de von Willebrand y la P-selectina.

sustancias bioactivas, tales como la angiotensina y prostaglandinas, gracias a pequeñas vesículas llamadas caveolas [42,94].

6.1 Anatomía macroscópica

La cavidad pulmonar, donde se encuentran los pulmones, está recubierta por membranas pleurales y cada pulmón está encerrado en un saco pleural seroso, que consiste en dos membranas continuas: la pleura visceral y la pleura parietal [45]. Entre éstas se forma un espacio (cavidad pleural) con una capa capilar de líquido seroso que permite deslizar suavemente las capas de la pleura durante la respiración [75].

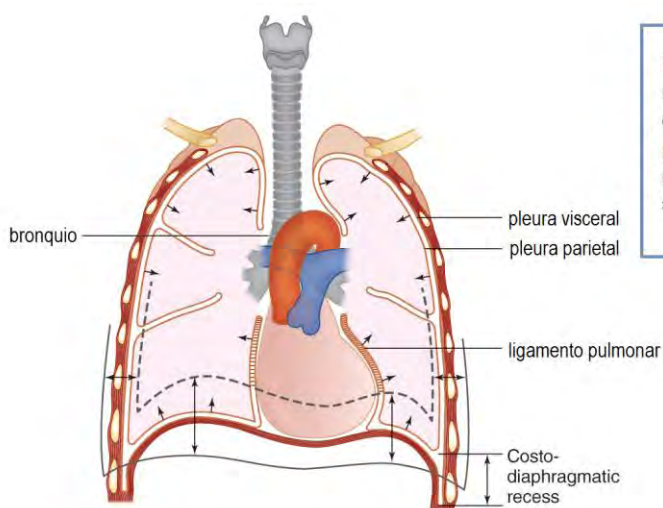


Figura 5. La cavidad pulmonar es abastecida de aire mediante los bronquios, que llegan a los pulmones como una extensión de la tráquea. La expansión y contracción de los pulmones, se lleva a cabo por el deslizamiento de de dos membranas serosas: la pleura visceral y la pleura parietal, separadas por una capa capilar de líquido seroso.

Figura modificada de:
Michael A. Grippi, Jack A. Elias, Jay A. Fishman, Robert M. Kotloff, Allan I. Pack,
Robert M. Senior, Mark D. Siegel, *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders*,
McGraw-Hill, 5 edición, 2015.

Los pulmones son ligeros, suaves, esponjosos y elásticos, tienen forma de semi-cono con un vértice superior y una base inferior (cara diafragmática). Se pueden describir tres caras: una cara costal, una cara mediastínica y una cara diafragmática. La cara costal es regular, lisa y convexa, y está en contacto con las costillas y con los espacios intercostales. La cara mediastínica se apoya contra los

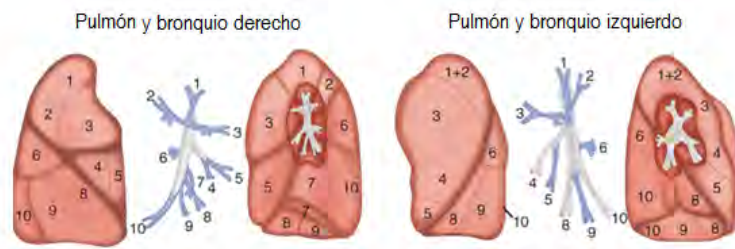
órganos mediastínicos²⁶ y contiene al hilio pulmonar. La cara diafragmática es cóncava y se moldea sobre el hemi-diafragma²⁷ correspondiente [35,42].

Cada pulmón está profundamente separado por las fisuras inter-lobares que los dividen en lóbulos desiguales. El pulmón derecho, con tres lóbulos, es 10% mayor y más pesado que el pulmón izquierdo, que solo tiene dos lóbulos. Sin embargo, a pesar de ello, el pulmón derecho es más corto y más ancho que el izquierdo, puesto que la cúpula derecha del diafragma es más alta y el corazón y el pericardio protruyen más a la izquierda.

La división de los pulmones en lóbulos se caracteriza por la existencia de fisuras y la existencia de un bronquio que ventila cada lóbulo y que, acompañado por elementos lobulares de la raíz pulmonar, le confiere su individualidad anatómica y funcional a los llamados segmentos pulmonares (Véase en la Figura 6). Cada segmento comprende el área de distribución de un bronquio de tercer orden dentro del tejido pulmonar, el cual va acompañado de la arteria correspondiente y posee en su periferia una vena inter-segmentaria. Los segmentos son de forma y dimensión variable, cónica o piramidal de base cortical y de vértice correspondiente al hilio pulmonar.

²⁶ Corazón, parte del timo, parte distal de la tráquea, partes proximales de los bronquios derecho e izquierdo, esófago y el conducto torácico.

²⁷ Cúpula del diafragma que cierra por abajo a la cavidad torácica y la separa de la cavidad abdominal.



Segmentos del pulmón

1. Apical	6. Superior
2. Posterior	7. Medial Basal *
3. Anterior	8. Anterior Basal
4. Lateral	9. Lateral Basal
5. Medial	10. Posterior Basal

* Medial basal (7) not present in left lung

Figura 6. Cada segmento pulmonar se caracteriza por poseer:

- (1) Su raíz broncovascular, formada por su bronquio segmentario y por la arteria homóloga.
- (2) Su forma piramidal con base periférica, cortical y con vértice hilar, con una o varias caras tapizadas por pleura y otras caras adosadas a los segmentos vecinos.
- (3) Un drenaje venoso, dispuesto en l periferia del segmento.

Figura modificada de:

F. Charles Brunicaardi, Dana K. Andersen, Timothy R. Billiar, David L. Dunn, John G. Hunter, Jeffrey B. Matthews, Raphael E. Pollock, *Schwartz's Principles of Surgery*, McGraw-Hill, 10a edición, 2015.

Existen dos fisuras en el pulmón derecho: la fisura oblicua y la fisura horizontal. La fisura oblicua es la de mayor tamaño y se encarga de separar el lóbulo superior del inferior y el lóbulo inferior del medio. La fisura horizontal es la de menor tamaño y se limita a separar el lóbulo superior del medio. El pulmón izquierdo solo tiene una fisura oblicua, que separa el lóbulo superior del lóbulo inferior con un plano fisural irregular.

Los pulmones están separados uno del otro por el mediastino, al cual se sujetan por las raíces pulmonares, esto es, el bronquio, arterias pulmonares, venas pulmonares superior e inferior, los plexos nerviosos pulmonares (simpático, parasimpático y fibras aferentes viscerales) y vasos linfáticos [75,42,94].

En el hilio pulmonar, entra la raíz pulmonar (bronquio principal y arteria pulmonar) y emergen las venas pulmonares y elementos linfáticos.

6.2 Vascularización del pulmón

Funcionalmente, la vascularización se divide en:

1. Circulación pulmonar o pequeña circulación: asegura el pasaje de sangre carbo-oxigenada, a través de la arteria pulmonar que se divide en derecha (más voluminosa y más larga) y en izquierda y posteriormente se convierten en vasos delgados y frágiles que transportan sangre "venosa" a baja presión en

los segmentos pulmonares. Su distribución general sigue la del árbol bronquial y adoptan una ramificación de acuerdo con la distribución segmentaria de los bronquios. En los segmentos pulmonares la sangre es abastecida de oxígeno.

Posteriormente la sangre fluye hacia las venas pulmonares que se originan en la red capilar peri-alveolar y se reúnen en una red peri-lobulillar, que recoge la sangre de las venas bronquiales periféricas y de las venas sub-pleurales (sangre carbo-oxigenada).

2. Circulación nutricia o gran circulación: pertenece a la circulación sistémica, que proviene del ventrículo izquierdo por medio de arterias bronquiales y ramas de la aorta torácica (esta nace del ventrículo izquierdo), abasteciendo a los tejidos pulmonares de sangre oxigenada. Los bronquios sirven como guía para la distribución de estas ramas. Existe una rama bronquial derecha y dos ramas bronquiales izquierdas, para el pulmón derecho e izquierdo. La rama bronquial derecha nace de la aorta a la altura de la tercera arteria intercostal derecha, mientras que las ramas izquierdas se originan de la aorta a nivel de la sexta vertebra torácica.

La sangre venosa de los bronquios principales y lobares es drenada por vénulas de la gran circulación que terminan a la derecha, en la vena ácigos, y a la izquierda, en la vena hemiacigos o en el tronco común de las venas intercostales superiores. Estas son afluentes de la vena branquiocefálica izquierda y desembocan en la aurícula derecho [98].

Es importante tener en cuenta que los resultados obtenidos en un modelo animal, en especial roedores, no son un reflejo fiel de lo que pasa en el humano. Las diferencias notables entre especies, incluyen la circulación bronquial, la presencia de los bronquiolos, la composición ultra-estructural y la distribución de las células epiteliales en los bronquios; además del patrón de expresión de ciertos tipos celulares, como son las células cepillo, las células alveolares y las células intersticiales [42].

JUSTIFICACIÓN

En el ámbito médico, los análisis enzimáticos permiten determinar cuál órgano está dañado e, incluso, diferenciar el tipo de lesión en un órgano específico. Otro elemento a considerar para un diagnóstico clínico es la manifestación de patrones enzimáticos característicos, que brindan información de la posible lesión y pueden ser indicativos de la localización intracelular del daño, así como su curso temporal. Es por esta razón que la enzimología clínica constituye una eficaz herramienta para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades.

En el diagnóstico de enfermedades hepáticas, las determinaciones séricas de las enzimas de mayor relevancia son las transaminasas (TGO y TGP), ya que se consideran como indicadores sensibles de daño hepático, y la lactato deshidrogenasa (LDH), cuyo aumento sugiere un daño isquémico del hígado [61]. En tanto, la determinación de la OTC y ARGasa, a pesar de ser enzimas específicas del hígado, son clínicamente menos útiles que las transaminasas. La GDH es una enzima mitocondrial que por su parte es altamente inespecífica, ya que se encuentra en diversas partes del organismo y no se considera como una enzima que refleje la condición del hígado. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la OTC y la GDH aumentan significativamente en el tejido después de una HP, por lo cual se ha relacionado ampliamente con el progreso de la regeneración hepática. En vista de ello, el presente trabajo pretende evaluar la tasa de liberación de cada enzima (OTC, TGO, TGP, LDH y GDH y ARGasa) tanto en hígado y pulmón, con el fin de demostrar que la liberación selectiva y controlada de enzimas está relacionada íntimamente a la proliferación celular y que, a su vez, es independiente de factores extra-hepáticos y extra-pulmonares.

Para este protocolo se seleccionó al pulmón como un órgano comparativo e inexplorado, con el objetivo de estudiar qué efectos desencadena la regeneración hepática en órganos vecinos. La interconectividad del hígado y pulmón está dada por la irrigación de la vena cava inferior-corazón-arteria pulmonar.

La comunicación inter-órgano por medio de enzimas, es un concepto innovador y muy poco estudiado. En la regeneración hepática se ha sugerido que el

incremento de actividad enzimática en plasma, y por ende su liberación, podría estar relacionada con el control de la progresión del proceso proliferativo. De ser así, los niveles séricos de actividades enzimáticas constituirían una parte de un sistema complejo de comunicación inter-órganos.

Si existe este sistema de comunicación, la "exportación" e "importación" de enzimas sería el medio por el cual se transmitirían los mensajes. No obstante para que este sistema funcione, las enzimas necesitan estar en un estado que permita su reconocimiento y evite su inmediata degradación. Ante tal incógnita, este trabajo de investigación propone que las enzimas, al ser exportadas hacia el torrente sanguíneo, cuentan con una cubierta de naturaleza lipídica que facilita su transporte y reconocimiento en el órgano receptor. Se creó un protocolo tentativo para estudiar la presencia de esta capa lipídica y para hacer una correlación con la liberación enzimática en ambos tejidos.

A pesar de que aún no se conocen en detalle los mecanismos que controlan la tasa de liberación de enzimas hepáticas y su influencia en otros órganos, este trabajo permitirá dilucidar algunas interrogantes y establecer algunas otras, para comprender el proceso de proliferación, desde el punto de vista enzimático. Este conocimiento a su vez, dará directrices en la liberación y transporte de las enzimas estudiadas para ser consideradas, como indicadores sensibles en la regeneración hepática y en un futuro ser utilizadas en la clínica.

HIPÓTESIS

Ya que la regeneración hepática, se ve acompañada de una elevación drástica en las actividades séricas de algunas enzimas consideradas como marcadores de función hepática y este incremento enzimático es independiente a la necrosis y de una disfunción mitocondrial, la liberación enzimática se presenta como un proceso controlado cuya función es servir de señales a distancia a órganos blancos como el pulmón, el cual se utiliza como un tejido comparativo. Por lo tanto, la liberación de enzimas en muestras hepáticas sería totalmente diferente a la que podría darse en el pulmón.

OBJETIVOS

General

Demostrar que la liberación de enzimas hepáticas depende parcialmente de fenómenos de mecano-transducción, como consecuencia de un aumento en el flujo sanguíneo, por haber realizado una HP. Estos cambios se estudiarán al eliminar la acción de una presión de flujo por utilizar como sistema rebanadas de hígado. Estudiaremos si dichas enzimas se liberan de forma soluble, como podría esperarse, o se liberan en forma "particulada" como exosomas y compararemos el efecto de esta liberación en otro órgano, en este caso el pulmón.

Particulares

- Caracterizar la liberación de enzimas hepáticas, tanto en animales control como animales sometidos a una HP del 70%, utilizando rebanadas hepáticas y pulmonares, donde se conservan los vasos sanguíneos y no se tiene una presión de flujo por perfusión.
- Explorar si existe una buena correlación entre la salida de las enzimas hepáticas y la actividad remanente en el tejido después de incubar.
- Caracterizar si las enzimas se liberan en forma soluble o se encuentran particuladas, en exosomas.
- Estudiar el efecto de la liberación de enzimas hepáticas en condiciones basales (Sham) y hepatectomizadas sobre otro órgano, como es el pulmón.

METODOLOGÍA

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar con un peso inicial de 250-300g, a las cuales se les mantuvo bajo condiciones controladas de temperatura, humedad, y bajo un ciclo de 12:12 horas de luz/oscuridad. Los animales se mantuvieron con una dieta (cubos de purina) y agua libre. Se dividieron en dos grupos experimentales: Sham (sujetos con trauma quirúrgico pero sin remoción alguna del tejido hepático) y hepatectomizados al 70% (modelo de HP de Higgins y Anderson). Los animales se sedaron en una cámara cerrada de éter y se sacrificaron por decapitación a dos tiempos diferentes post-cirugía, 24 y 48 horas.

Se recolectaron muestras de sangre del cuello de los animales en BD Vacutainer SST, con heparina y EDTA, y se separó el suero por centrifugación en una centrifuga clínica (700 xg). Las muestras obtenidas se almacenaron en refrigeración.

1. Manejo y obtención de muestras hepáticas y pulmonares

Después de sacrificar a la rata, se extrajo el pulmón e hígado de la cavidad abdominal superior e inferior, respectivamente. El método de sacrificio, además de ser humanitario, favorece la obtención del tejido con la mínima cantidad de sangre y como medida adicional, los tejidos se colocaron en una solución de NaCl al 0.9% (p/v) para eliminar todo rezago superficial de sangre. Una vez "limpio" se procedió a rebanar cada tejido, por medio del aparato McIlwain Tissue Chopper, que cortó al tejido finamente en rebanadas con un grosor de 500 μm .

2. Recolección de muestra hepática

De las rebanadas de tejido hepático obtenidas, se pesaron tres muestras de aproximadamente 1 g cada una. Las primeras dos muestras se incubaron en solución de Krebs-Ringer durante una hora y la tercera muestra no fue incubada (basal).

Las muestras incubadas se sumergieron en 5 mL de solución de Krebs-Ringer como medio de incubación, previamente gaseado con carbógeno y con pH a 7.4; se incubaron durante 60 minutos, con agitación constante a una temperatura de

37°C. Se recolectaron 3 mL de muestra del medio de incubación cada diez minutos, con la respectiva reposición del medio; excepto a los 60 minutos, que se obtuvo como sobrenadante, tras centrifugar las rebanadas en el medio. Después de la incubación el tejido se saco del medio y se homogenizo en 5 mL de solución de Krebs-Ringer. Además, la muestra de tejido no incubada se homogenizo en el mismo volumen que las muestras incubadas, por lo que se obtuvieron tres muestras de homogeneizado, dos muestras incubadas y una no incubada (basal).

Para el medio de incubación se tomaron siete muestras. La primera muestra o muestra basal, tuvo contacto con el tejido, pero fue recolectada inmediatamente. Las otras muestras se obtuvieron al recolectar un volumen de 3ml cada 10 minutos, durante la hora de incubación.

3. Recolección de muestra pulmonar

De las rebanadas de tejido pulmonar obtenidas, se pesaron tres muestras de aproximadamente 0.5 g cada una. Las primeras dos muestras se incubaron en solución de Krebs-Ringer durante una hora y la tercera muestra no fue incubada (basal).

Las muestras incubadas se sumergieron en 4 mL de solución de Krebs-Ringer como medio de incubación, previamente gaseado con carbógeno y con pH a 7.4; se incubaron durante 60 minutos, con agitación constante a una temperatura de 37°C. Se recolectaron 2 mL de muestra del medio de incubación cada veinte minutos, con la respectiva reposición del medio; excepto a los 60 minutos, que se obtuvo como sobrenadante, tras centrifugar las rebanadas en el medio. Después de la incubación el tejido se saco del medio y se homogenizo en 4 mL de solución de Krebs-Ringer. Además, la muestra de tejido no incubada se homogenizo en el mismo volumen que las muestras incubadas, por lo que se obtuvieron tres muestras de homogeneizado, dos muestras incubadas y una no incubada (basal).

Para el medio de incubación se tomaron cuatro muestras. La primera muestra o muestra basal, tuvo contacto con el tejido, pero fue recolectada inmediatamente. Las otras muestras se obtuvieron al recolectar un volumen de 2ml cada 20 minutos, durante la hora de incubación.

4. Determinación de actividad enzimática

Todos los ensayos se midieron utilizando el método de espectrofotometría por la adición de un cromógeno o por la absorción específica de un sustrato o producto.

4.1. Determinación de actividad enzimática de la TGO

La actividad de la transaminasa TGO se midió por el aumento de oxalacetato, al ser formado por la transferencia de un grupo amino del L-aspartato al 2-oxoglutarato. El oxalacetato se determinó por la adición de 2,4-dinitrofenil hidracina, la cual reacciona con él. Algo de oxalacetato es descarboxilado espontáneamente a piruvato. La mezcla de ensayo contiene, por lo tanto, oxalacetato, piruvato y 2-oxoglutarato, los cuales forman 2,4-dinitrofenilhidrazonas. Es posible discriminar las hidracinas adyacentes formadas al usar un blanco de reactivo, el cual, contiene a las hidracinas formadas ajenas a la acción catalítica de la TGO. Como consecuencia de que la absorbancia de la mezcla reactiva no constituye una función lineal de la concentración de oxalacetato, se recomienda utilizar una curva testigo, utilizando la enzima malato deshidrogenasa (MDH) como indicador de la enzima, la MDH cataliza la reacción $\text{oxalacetato} + \text{NADH} \leftrightarrow \text{Malato} + \text{NAD}^+$, siendo el parámetro de la desaparición de NADH el indicador de la cantidad de oxaloacetato producido.

Se agrega 1 mL Buffer de fosfatos (0.1M, pH 7.4), que contiene L-Aspartato (0.1 M) y α -oxoglutarato (2 mM), a 0.2 mL de la muestra. Se mezcla e incuba durante 60 minutos a 37°C. Transcurrida la reacción se agrega 1 mL de 2,4-dinitrofenil hidracina (1 mM) y se deja reposar por 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se añade 10 mL de NaOH (0.4 N), se mezcla y se lee a 546 nm contra el blanco de reacción, para determinar el contenido de la hidrazona del ácido oxalacético formado. El blanco de reacción se prepara de la misma forma excepto que no se incuba, para que no se produzca la reacción catalítica. El control tiene todo menos la muestra, para ajustarse a cero.

La solución de NaOH y el reactivo de cetona que contiene al 2,4-dinitrofenil hidracina son estables indefinidamente. El buffer de sustrato y la solución de piruvato se almacenan entre 0 y 4°C, para ser estables por un mes.

La enzima es estable por dos semanas o más, si se almacena a una temperatura de 4 o -20°C. De ser posible debe almacenarse entre -70 y -80°C, para que su estabilidad se mantenga por incluso un año.

4.2. Determinación de actividad enzimática de la TGP

La actividad de la transaminasa se mide por el incremento de piruvato. El piruvato, formado a partir de la L-Alanina y 2-oxoglutarato, se determina colorimétricamente por la adición de 2,4-diitrofenil hidracina en medio alcalino. El 2-oxoglutarato residual también reacciona con la 2,4-dinitrofenil hidracina, lo cual se toma en cuenta al hacer un blanco de reacción. El método es estandarizado por comparación directa con la determinación de TGP con LDH como indicador de la enzima o con estándares conteniendo diferentes cantidades de piruvato, pero con cantidades moleculares constantes de piruvato y 2-oxoglutarato.

Se agrega 1 mL Buffer de fosfatos (0.1 M, pH 7.4), que contiene L-Alanina (0.2 M) y α - oxoglutarato (2 mM), a 0.2 mL de la muestra. Se mezcla e incuba durante 30 minutos a 37°C. Transcurrida la reacción se agrega 1 mL de 2,4- dinitrofenil hidracina (1 mM) y se deja reposar por 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se añade 10 mL de NaOH (0.4 N), se mezcla y se lee a 546 nm contra el blanco de reacción, para determinar el contenido de la hidrazona del ácido pirúvico formado. El blanco de reacción se prepara de la misma forma excepto que no se incuba, para que no se produzca la reacción catalítica. El control tiene todo menos la muestra, para ajustarse a cero.

La solución de NaOH y el reactivo de cetona que contiene al 2,4-dinitrofenil hidracina son estables indefinidamente. El buffer de sustrato y la solución de piruvato se almacenan entre 0 y 4°C, para ser estables por un mes.

La enzima es estable por dos semanas o más, si se almacena a una temperatura de 4 o -20°C. De ser posible debe almacenarse entre -70 y -80°C, para que su estabilidad se mantenga por incluso un año. La actividad se mantiene por más tiempo si se mantiene en una solución de glicerol 25%.

4.3. Determinación de actividad enzimática de la LDH

La actividad de la LDH se determina a 30°C como la cantidad de piruvato consumido por disminución de la absorbancia debida a la oxidación del NADH a 340nm. El equilibrio es hacia el lactato y el NAD⁺. No es necesario el blanco.

Se agrega 2.5 mL de solución de Tris/NaCl/NADH (Tris 81.3 mM, NaCl 203.3 mM, NADH 0.244 mM, pH 7.2) en 0.05 mL de muestra a 30°C. Se mezcla y se agrega 0.5 mL de la solución Tris/NaCl/Piruvato (Tris 81.3 mM, NaCl 203.3 mM, piruvato 9.76 mM, pH 7.2) para disparar la reacción. Se mezcla y, después de 30 segundos, se lee a 340 nm cada minuto, durante 5 minutos.

La estabilidad de la enzima en suero permanece por un periodo de 48 horas a 20°C o 4°C. Después de congelada disminuye la actividad de acuerdo al patrón de la isoenzima (10 al 20% en 48 horas). No debe congelarse a temperaturas de -20°C, ya que tiene una pérdida de 20% en la actividad.

4.4. Determinación de actividad enzimática de la GDH

La actividad de la enzima mitocondrial GDH, se mide en función de su catálisis en la incorporación directa de amonio al 2-oxoglutarato, empleando NADH como cofactor y donador de electrones, para formar NAD⁺ y L-glutamato. Se mide su actividad a una temperatura de 20-25°C mediante la disminución de NADH a una longitud de 340nm. No es necesario el blanco.

Se agregan 2 mL de Buffer de fosfatos KH₂PO₄ (75 mM, pH 7.4), 0.3 mL de la solución acetato de amonio (1.2 M), 0.05 mL de NADH (9 mM), 0.05 mL de ADP (90 mM) y 0.55 mL de agua a 0.1 mL de la muestra. Se mezclan y se añade 0.02 mL de α-cetoglutarato, para disparar la reacción. Se mide cada minuto a la longitud de 340 nm durante 5 minutos.

La estabilidad de la enzima permanece mayor al 90% de su actividad original por un mes si se almacena a 4°C. Si se desea conservar por varios meses es recomendable almacenarla en una suspensión de sulfato de amonio saturado al 50%, DTT 0.1 mM y glutamato 25 mM.

4.5. Determinación de actividad enzimática de la OTC

La OTC cataliza la transferencia de un grupo carbamil activo del grupo amino de la ornitina del ciclo de la urea para formar citrulina.

En suero se encuentra en bajos niveles. La actividad de la OTC aparentemente no requiere coenzimas. Es inhibida por sustancias que bloquean grupos -SH. No es influenciado por la hemolisis. La conversión del sustrato es lineal con el tiempo.

El equilibrio de la reacción es hacia la citrulina. La cantidad de citrulina formada por unidad de tiempo es una medición de la actividad de OTC.

La citrulina se determina por la alta sensibilidad de la reacción con la diacetilmonoxima-antipirina. La urea en la muestra, la cual puede interferir, es destruida al agregarse ureasa. Blancos individuales de las muestras son necesarios para corregir la citrulina presente (citrulina preformada o basal).

Se agregó sustrato de ureasa (carbamilfosfato 23 mM, ornitina 2.5 mM, ureasa 2,500 U/L) a 0.025 mL de muestra. Se mezcla y se incuba a 37°C durante 30 minutos. Se añade 3 mL de reactivo cromogénico. Hervir por 15 minutos. Enfriar la muestra a chorro de agua y leer la absorbancia a 460 nm, para determinar la cantidad del compuesto cromógeno formado a partir de citrulina y diacetilmonoxima-antipirina. El blanco de reacción se prepara sin la muestra.

La solución de sustrato y urea es inestable, por lo que se debe preparar fresca. Se pueden congelar alícuotas y descongelar antes de utilizarlas. El reactivo cromogénico es estable a temperatura ambiente por dos horas.

4.6. Determinación de actividad enzimática de la ARGasa

La actividad catalítica de la arginasa está determinada por la disminución en la concentración de arginina o en el incremento de la concentración de urea y ornitina. En este caso se mide la ornitina después de detener la reacción con ácido acético. En la presencia de ácido acético, la ornitina reacciona con la ninhidrina para dar un color rojo que se lee a 515 nm. Es necesario utilizar un blanco de reacción para compensar la cantidad de sustrato y productos pre-existente en la muestra.

De forma rutinaria, la reacción se activa al agregar en la muestra solución de Mn^{2+} e incubar por $55^{\circ}C$, pero en este caso la activación no se llevo al cabo debido a que la actividad de la muestra era muy alta. Se agrega 0.3 mL de buffer de carbonato (0.1 M, pH 9.5, $37^{\circ}C$) y 0.1 mL de una solución de arginina (0.1M) en 0.0025 mL de la muestra. Se mezcla e incuba durante 10 minutos a una temperatura de $37^{\circ}C$. Para detener la reacción se añade 1.5 mL de ácido acético. Como cromógeno se adiciona 0.5 mL de ninhidrina. Se mezcla y se deja 60 minutos en incubación en agua hirviendo. Se enfría y lee a 515 nm, para determinar la cantidad de ornitina formada.

El blanco de reacción se prepara de la misma forma, cambiando únicamente el momento de adición de la solución de arginina, la cual se agrega después de detener la reacción con ácido acético.

Estabilidad de las soluciones: guardar todas las soluciones a una temperatura de 0 a $4^{\circ}C$. Preparar solución de arginina fresca, el mismo día. La solución estándar de ornitina y ninhidrina son estables por un mes cuando se guardan en oscuridad. El buffer de Tris, el buffer de carbonato y la solución de manganeso son estables mientras no se contaminen.

La muestra control a la cual se ajusta el cero lleva todo los reactivos, pero sin la muestra.

La enzima se puede almacenar a una temperatura de $-20^{\circ}C$ y ser estable por tres semanas o a $-70^{\circ}C$ y ser activa durante varios meses. Si se almacena a 0 o $4^{\circ}C$ su actividad no cambia durante dos semanas.

5. Muestras ultra-centrifugadas

Las muestras obtenidas al recolectar la solución de Krebs-Ringer durante la hora de incubación se centrifugan a 1,850 xg por 10 minutos a $4^{\circ}C$, para remover núcleos y membranas del medio; posteriormente se centrifuga a 9,700 xg durante 10 minutos a $4^{\circ}C$, en este punto la muestra se divide en dos, una a la que se le denomina "completa o total", la cual no se ultracentrífuga y la que es ultra-centrifugada. La ultra-centrifugación se realiza a 120,000 xg durante 60 minutos a $4^{\circ}C$ para precipitar todo lo que no sea completamente soluble en el medio. El

botón o pellet se re-suspende en 1 ml de buffer de fosfatos (50mM de K_2HPO_4) a pH de 7.4.

Finalmente para obtener la actividad específica se realizó la determinación de proteína por el método de Lowry en el pellet re-suspendido.

6. Análisis estadístico

Los datos se expresan como promedio \pm el error estándar de 4 o 5 ratas experimentales independientes y el análisis estadístico se obtuvo con una prueba de “*t* de Student”, donde se consideró un valor de $p \leq 0.05$ como significativo. También se utilizó al análisis de varianza ANOVA, test de Tukey, con un valor de $p \leq 0.05$ como significativo. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Prisma 5 para Windows Versión 5.

RESULTADOS

1. Liberación de enzimas al medio extra-hepático y extra-pulmonar: Niveles de actividad enzimática en hígado y pulmón de ratas controles (Sham) y aquellas que fueron sometidas a una HP del 70%.

1.1 Resultados obtenidos para la actividad enzimática de TGO o AST.

TABLA 1.1.1 Actividad enzimática de TGO en homogenados (HM) de hígado obtenidos a partir de ratas controles (Sham) y ratas sujetas a una HP del 70%.

Tratamiento	Actividad de TGO en el HM de hígado (nmol•min ⁻¹ • g ⁻¹ de hígado)	
	No incubado (basal)	Después de la incubación
Sham-24 h	170.14 ± 25.41	103.77 ± 20.50
HP del 70%-24h	306.90 ± 40.35*	174.92 ± 35.63**
Sham-48 h	162.65 ± 5.88	127.93 ± 18.22
HP del 70%-48h	207.13 ± 30.72	139.33 ± 27.46

La actividad esta expresada como promedio de la actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes ± el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA: *p<0.05 contra el grupo control, **p<0.05 tejido no incubado contra el incubado.

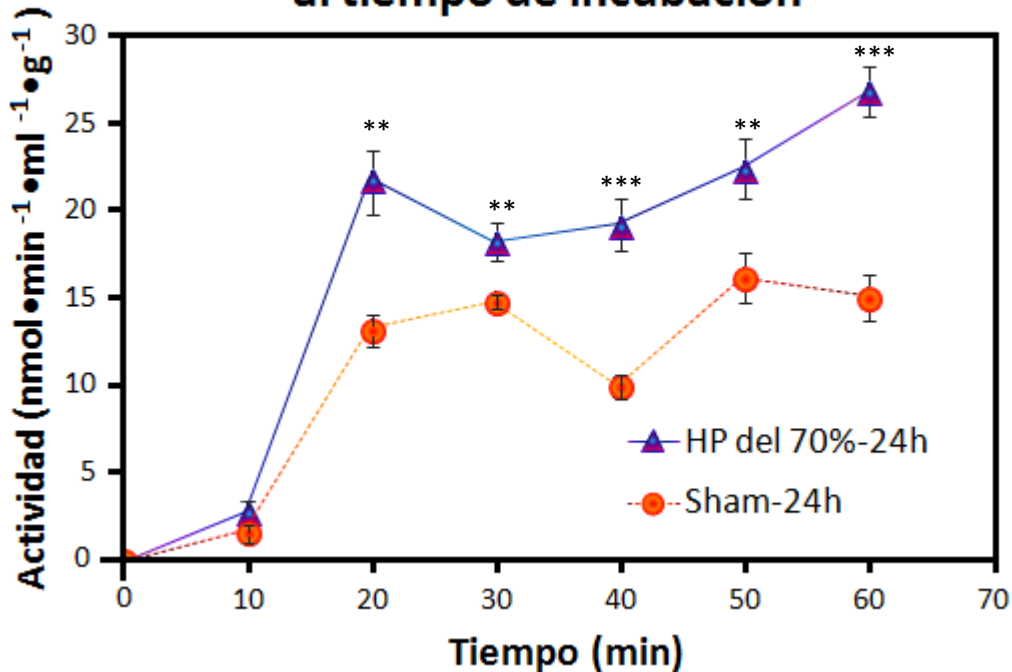
Al comparar la actividad de la enzima entre las muestras no incubadas e incubadas de la rata control a las 24 horas, no se observa estadísticamente un aumento significativo; a pesar de esto, sí es evidente que hay una disminución de la actividad enzimática, sugiriendo una liberación al medio. Tras efectuar una HP del 70% y extraer el tejido a las 24 horas, la muestra no incubada presenta un valor de actividad de TGO significativamente mayor a el tejido hepático incubado. Esto se interpreta como una liberación enzimática al medio, ya que la actividad

está disminuyendo en el tejido. Si comparamos la muestra obtenida de animales sometidos a una HP del 70% no incubada con su control, vemos que el aumento en la actividad de la enzima es del doble, mostrando que si no hay incubación la enzima no sale del tejido. Tomando en cuenta estos resultados, se puede plantear que el aumento en la liberación es resultado de la regeneración hepática (HP-70%) y el aumento en el flujo sanguíneo como consecuencia de la disminución de la masa en el hígado y se observa al incubar las muestras en el medio de Krebs-Ringer.

En tanto, a las 48 horas cuando comparamos las muestras de animales control y hepatectomizados entre ellas, ya sea incubadas o no incubadas no encontramos diferencias en la actividad enzimática en el tejido. Esto nos indica que la respuesta a la HP del 70% que se observa a las 24 horas, disminuye a las 48 horas.

Gráfica 1.1.1 Actividad enzimática de la TGO en el medio de incubación a partir de rebanadas hepáticas de rata control (Sham-24h) y ratas con HP-70% a las 24 horas, respecto al tiempo.

Hígado. Liberación de TGO al medio con respecto al tiempo de incubación

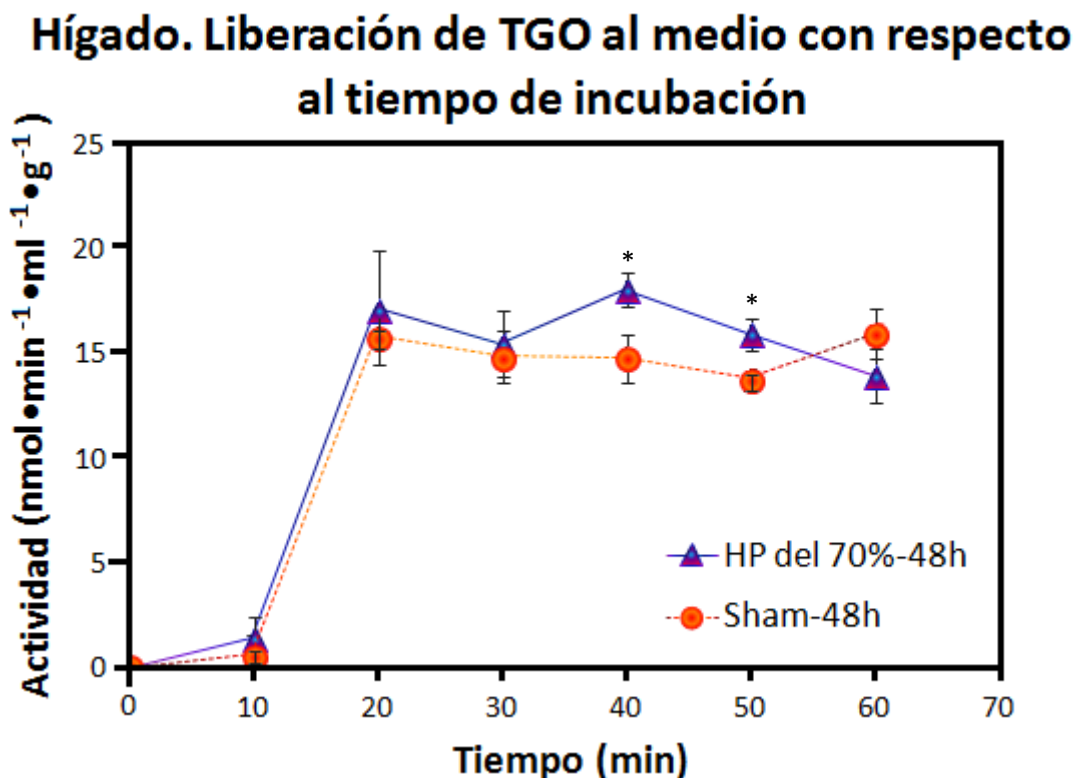


Cada punto en la gráfica está representado por el promedio de actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

La liberación de la TGO del tejido hepático, es discreta a los 10 minutos y a partir de los 20 minutos se da la máxima liberación, después de este tiempo la liberación se mantiene más o menos en el mismo nivel.

La actividad enzimática de la TGO en el medio de incubación revela una liberación de la enzima a partir de rebanadas hepáticas hacia el medio, tanto en tejido hepático de animales hepatectomizados, como en su control. La liberación enzimática difiere en magnitud entre ambas preparaciones, poniendo de manifiesto que tras una HP la liberación se incrementa, como consecuencia de la proliferación y el aumento en el flujo sanguíneo.

Gráfica 1.1.2 Actividad enzimática de la TGO en el medio de incubación a partir de rebanadas hepáticas de rata control (Sham-48h) y ratas con HP-70% a las 48 horas, respecto al tiempo.



Cada punto en la gráfica está representado por el promedio de actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

Se presentó una liberación de la enzima TGO al medio a partir de rebanadas hepáticas de ratas sacrificadas a las 48 horas post-cirugía, tanto en el hígado de ratas hepatectomizadas, como en el control. Al igual que a las 24 horas, la liberación a los 10 minutos es discreta y a los 20 minutos se observa la máxima liberación enzimática, para posteriormente mantenerse constante a lo largo del tiempo medido. La liberación a partir del tejido hepatectomizado difiere significativamente de su control en solo dos tiempos (40 y 50 minutos), por lo tanto el efecto de la HP no es tan evidente como a las 24 horas.

Se puede concluir que la TGO o AST es una enzima que se libera del tejido hepático al medio, incluso si no hay daño tisular. Sin embargo, el daño tisular

favorece un aumento en la salida de la enzima a las 24 horas y disminuye a las 48 horas.

TABLA 1.1.2 Actividad enzimática de TGO en HM de pulmón obtenidos a partir de ratas controles (Sham) y ratas sujetas a una HP del 70%.

Tratamiento	Actividad de TGO en el HM de pulmón (nmol•min ⁻¹ • g ⁻¹ de pulmón)	
	No incubada (basal)	Después de la incubación
Sham-24 h	91.74 ± 6.82	73.07 ± 6.90
HP del 70%-24h	210.43 ± 45.52	120.95 ± 23.63
Sham-48 h	100.5 ± 21.05	72.87 ± 4.68
HP del 70%-48h	103.34 ± 21.04	59.95 ± 7.29

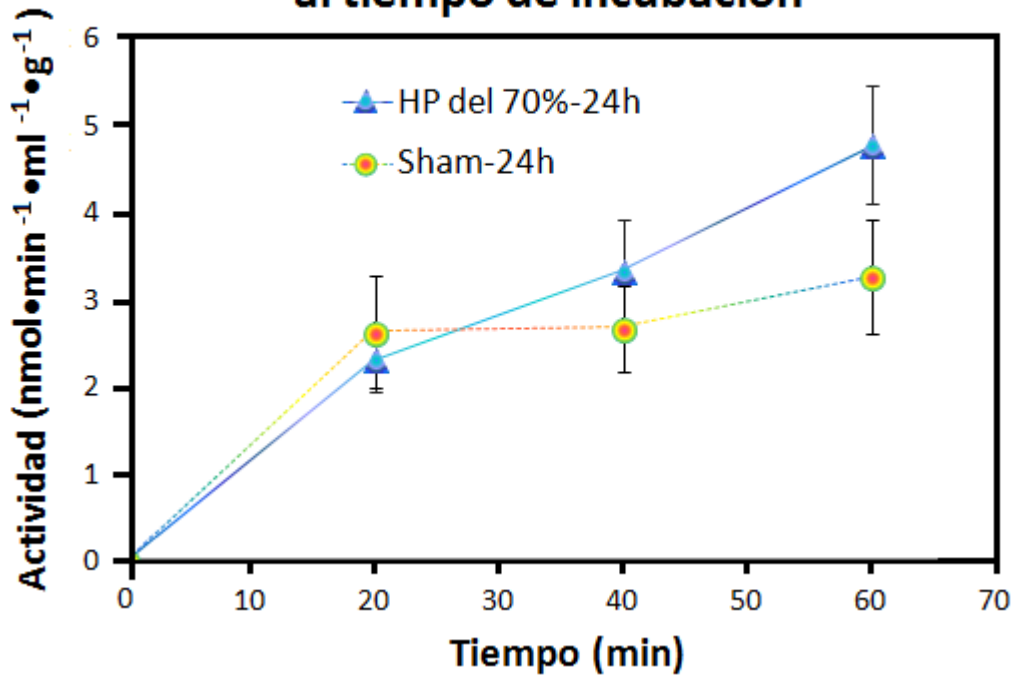
La actividad esta expresada como promedio de la actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes ± el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA: *p<0.05 contra el grupo control, **p<0.05 tejido no incubado contra el incubado.

Al comparar el tejido pulmonar incubado con el no incubado, tanto en animales hepatectomizados como en los controles, se observa que el tejido incubado presenta menor actividad, a pesar de esto no existen diferencias significativas entre ambos tejidos.

En una primera aproximación al comparar la actividad enzimática de la TGO en tejido pulmonar de ratas sujetas a una HP del 70% y sacrificadas a las 24 horas con su control, se encontró que se presenta mayor actividad de TGO tras una HP. Sin embargo, como la diferencia no es estadísticamente significativa, no se puede afirmar que la HP tenga efecto en la enzima total en el tejido pulmonar.

Gráfica 1.1.3 Actividad enzimática de TGO en el medio de incubación a partir de rebanadas pulmonares de rata control (Sham-24h) y ratas con HP-70% a las 24 horas, respecto al tiempo.

Pulmón. Liberación de TGO al medio con respecto al tiempo de incubación



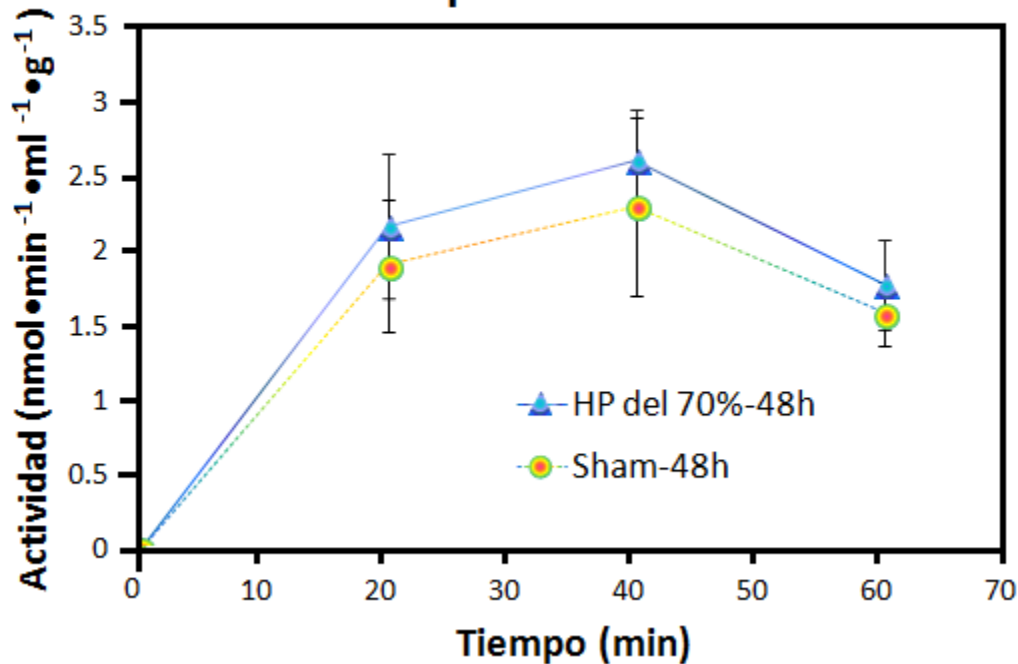
Cada punto en la gráfica está representado por el promedio de actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

La actividad enzimática de la TGO que se presenta en el medio de incubación nos indica una discreta liberación desde las rebanadas de pulmón al medio. Este comportamiento se debe a que el contenido total de TGO en el tejido pulmonar es menor al presentado en el tejido hepático y a que el pulmón libera un menor porcentaje de enzima que el hígado.

La HP del 70% no tiene efecto en la liberación de la TGO a partir de rebanadas pulmonares, ya que en la liberación de la enzima en las muestras pertenecientes a ratas hepatectomizadas y sacrificadas a las 24 horas, no se presentan diferencias significativas al compararse con sus controles.

Gráfica 1.1.4 Actividad enzimática de TGO en el medio de incubación a partir de rebanadas pulmonares de rata control (Sham-48h) y ratas con HP-70% a las 48 horas, respecto al tiempo.

Pulmón. Liberación de TGO al medio con respecto al tiempo de incubación



Cada punto en la gráfica está representado por el promedio de actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

En el caso de animales sacrificados a las 48 horas después de la cirugía, la actividad determinada en el medio también se mostró de forma discreta (6 veces menor), partiendo del hecho de que en el tejido la actividad enzimática fue menor que a las 24 horas y su liberación no presentaron diferencias significativas, indicando que la HP del 70% no tiene efecto.

En conclusión, a pesar de que la enzima TGO si se encuentra dentro del tejido pulmonar, la liberación hacia el medio es mínima.

1.2 Resultados obtenidos para la actividad enzimática de TGP o ALT.

TABLA 1.2.1 Actividad enzimática de TGP en HM de hígado obtenidos a partir de ratas controles (Sham) y ratas sujetas a una HP del 70%.

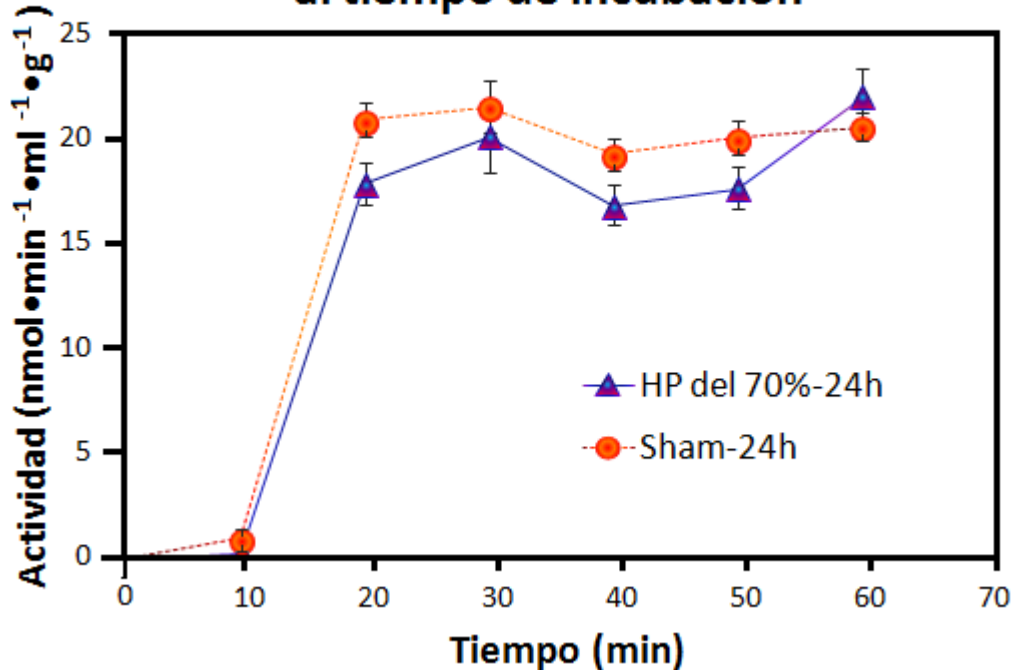
Tratamiento	Actividad de TGP en el HM de hígado (nmol•min ⁻¹ • g ⁻¹ de hígado)	
	No incubada (basal)	Después de la incubación
Sham-24 h	223.41 ± 51.53	160.75 ± 21.07
HP del 70%-24h	251.27 ± 55.10	199.60 ± 22.28
Sham-48 h	200.09 ± 36.51	161.12 ± 18.81
HP del 70%-48h	179.28 ± 32.54	172.28 ± 0.72

La actividad esta expresada como promedio de la actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes ± el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA: *p<0.05 contra el grupo control, **p<0.05 tejido no incubado contra el incubado.

Podemos observar que a pesar de que no hay una diferencia estadística significativa, tanto en las muestras de tejido hepático de las ratas Sham como de las ratas sujetas a una HP del 70% hay una posible liberación de la enzima TGP al medio de incubación, aunque es muy pequeña, sin observarse diferencias entre los tiempos de sacrificio de las ratas. De acuerdo a los resultados, la HP del 70% no tiene un papel claro en la liberación de esta enzima al medio.

Gráfica 1.2.1 Actividad enzimática de TGP en el medio de incubación a partir de rebanadas hepáticas de rata control (Sham-24h) y ratas con HP-70% a las 24 horas, respecto al tiempo.

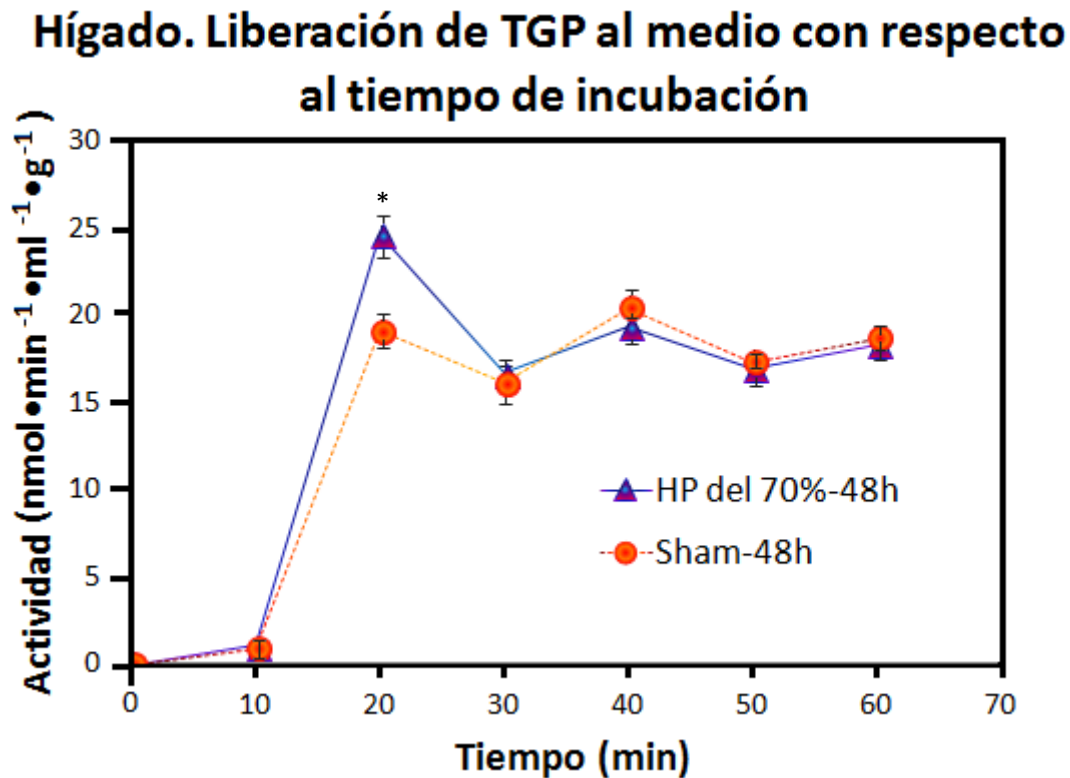
Hígado. Liberación de TGP al medio con respecto al tiempo de incubación



Cada punto en la gráfica está representado por el promedio de actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

Se puede observar en la gráfica, que la liberación de la TGP del tejido hepático al medio de incubación no se ve afectada por la HP del 70% en ratas sacrificadas a las 24 horas. La enzima se libera al medio de incubación a partir de los 10 minutos de incubación, alcanzando su máximo a los 20 minutos, de manera semejante a lo observado para la TGO.

Gráfica 1.2.2 Actividad enzimática de TGP en el medio de incubación a partir de rebanadas hepáticas de rata control (Sham-48h) y ratas con HP-70% a las 48 horas, respecto al tiempo.



Cada punto en la gráfica está representado por el promedio de actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

En muestras de animales sacrificados a las 48 horas post-cirugía, tanto en el control como en ratas hepatectomizadas, se presenta una liberación de la enzima a partir de rebanadas hepáticas al medio de incubación. La cinética de liberación de la enzima TGP es similar a la observada a las 24 horas, excepto a los 20 minutos donde el tejido de animales sujetos a una HP del 70% muestra diferencia significativa con su control, alcanzando su máxima liberación a este tiempo. Posteriormente, la actividad de la TGP disminuye y mantiene una magnitud de liberación similar a su control, sin presentar diferencias significativas. Estos resultados indican que posiblemente la liberación no aumenta tras una HP y no se ve afectada durante la regeneración hepática.

TABLA 1.2.2 Actividad enzimática de TGP en HM de pulmón obtenidos a partir de ratas controles (Sham) y ratas sujetas a una HP del 70%.

Tratamiento	Actividad de TGP en el HM de pulmón (nmol•min ⁻¹ • g ⁻¹ de pulmón)	
	No incubada (basal)	Después de la incubación
Sham-24 h	189.20 ± 29.38	163.66 ± 10.75
HP del 70%-24h	202.5 ± 20.24	168.54 ± 19.02
Sham-48 h	204.32 ± 33.77	173.17 ± 6.01
HP del 70%-48h	160.06 ± 23.49	125.80 ± 9.10

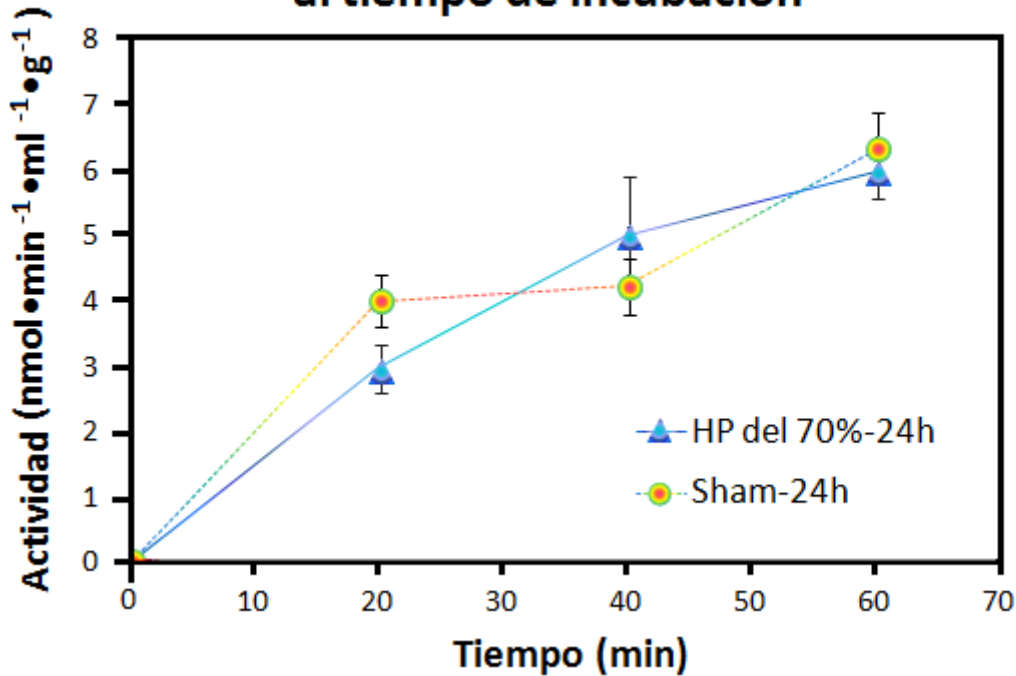
La actividad esta expresada como promedio de la actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes ± el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA: *p<0.05 contra el grupo control, **p<0.05 tejido no incubado contra el incubado.

Al analizar los datos mostrados en esta tabla, es evidente que se presenta una ligera disminución de actividad en tejido incubado respecto al no incubado, tanto de animales control como hepatectomizados; sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas. Esto se puede interpretar como una pequeña liberación que no se ve reflejada en el contenido total de enzima en el tejido pulmonar.

Por otro lado, al comparar los tejidos de animales hepatectomizados con sus controles, las actividades son muy parecidas y no presentan diferencias significativas entre ellas. Estos resultados nos indican que la HP no afecta el contenido de actividad en tejido.

Gráfica 1.2.3 Actividad enzimática de TGP en el medio de incubación a partir de rebanadas pulmonares de rata control (Sham-24h) y ratas con HP-70% a las 24 horas, respecto al tiempo.

Pulmón. Liberación de TGP al medio con respecto al tiempo de incubación



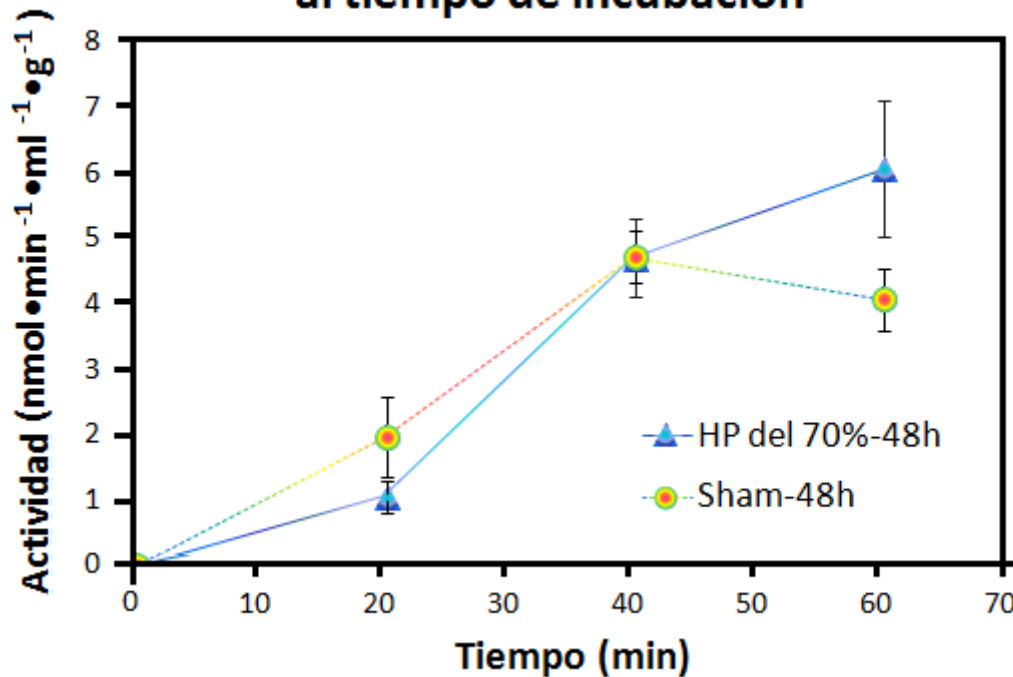
Cada punto en la gráfica está representado por el promedio de actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

De manera semejante a la liberación de la TGO en tejido pulmonar, la actividad de la enzima TGP en el medio es de magnitud menor a la presentada en el tejido hepático.

La liberación de la enzima sigue el mismo perfil tanto en ratas control como en ratas sujetas a una HP, sin presentar diferencias significativas entre ambas. Esto sugiere que en ratas hepatectomizadas y sacrificadas a las 24 horas, la liberación no se ve afectada tras una HP del 70%.

Gráfica 1.2.4 Actividad enzimática de TGP en el medio de incubación a partir de rebanadas pulmonares de rata control (Sham-48h) y ratas con HP-70% a las 48 horas, respecto al tiempo.

Pulmón. Liberación de TGP al medio con respecto al tiempo de incubación



Cada punto en la gráfica está representado por el promedio de actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

En animales sacrificados a las 48 horas post-cirugía la liberación de la enzima TGP fue de magnitud similar a la presentada en animales sacrificados a las 24 horas. El perfil de liberación es semejante en muestras de animales hepatectomizados y de animales control, ya que no se presentan diferencias significativas durante el tiempo de incubación.

En conclusión, el contenido de TGP o ALT en tejido pulmonar y su liberación al medio, no se ve influenciada por la regeneración hepática tras una HP.

1.3 Resultados obtenidos para la actividad enzimática de OTC.

TABLA 1.3.1 Actividad enzimática de OTC en HM de hígado obtenidos a partir de ratas controles (Sham) y ratas sujetas a una HP del 70%.

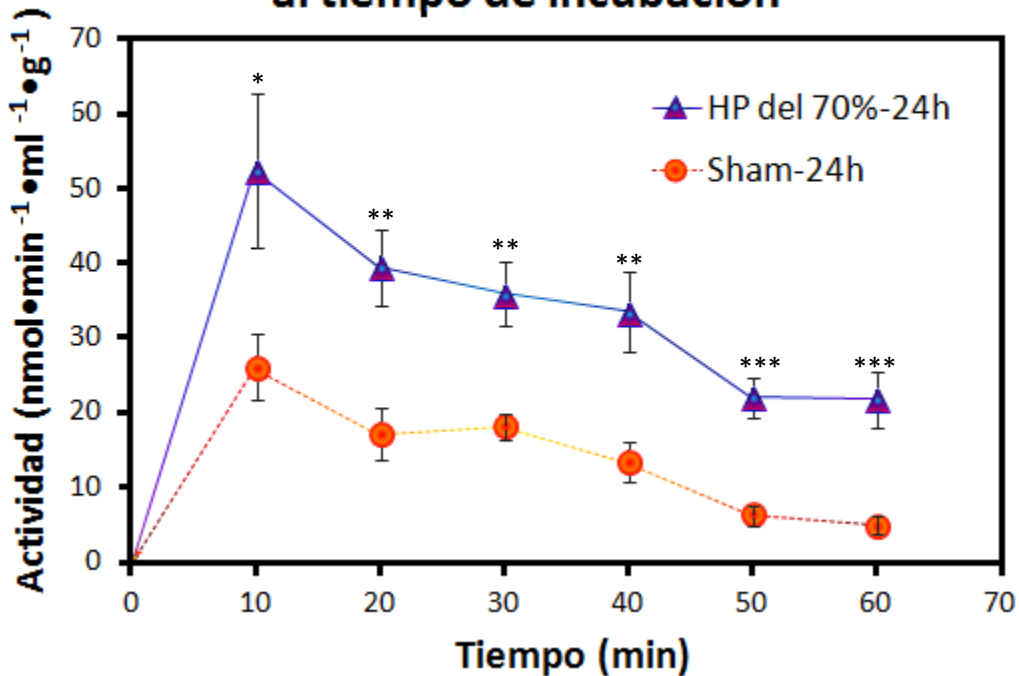
Tratamiento	Actividad de OTC en el HM de hígado (nmol•min ⁻¹ • g ⁻¹ de hígado)	
	No incubada (basal)	Después de la incubación
Sham-24 h	1,534.89 ± 211.46	1,466.31 ± 18.82
HP del 70%-24h	2,899.36 ± 308.46*	2,855.15 ± 65.2*
Sham-48 h	1,191.12 ± 47.25	1,144.73 ± 15.40
HP del 70%-48h	2,349.74 ± 63.72*	2,286.21 ± 12.28*

La actividad esta expresada como promedio de la actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes ± el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA: *p<0.05 contra el grupo control, **p<0.05 tejido no incubado contra el incubado.

En esta tabla se observa que la actividad de OTC en tejido incubado en comparación al tejido no incubado no muestra una diferencia significativa. Por otro lado, al comparar la muestra de animales hepatectomizados con su control, tanto a las 24 como a las 48 horas, se demostró que la actividad enzimática es mayor tras una HP del 70%, indicando que el incremento en la actividad enzimática está ampliamente relacionado con la regeneración hepática, inducida por una HP del 70%.

Gráfica 1.3.1 Actividad enzimática de OTC en el medio de incubación a partir de rebanadas hepáticas de rata control (Sham-24h) y ratas con HP-70% a las 24 horas, respecto al tiempo.

Hígado. Liberación de OTC al medio con respecto al tiempo de incubación



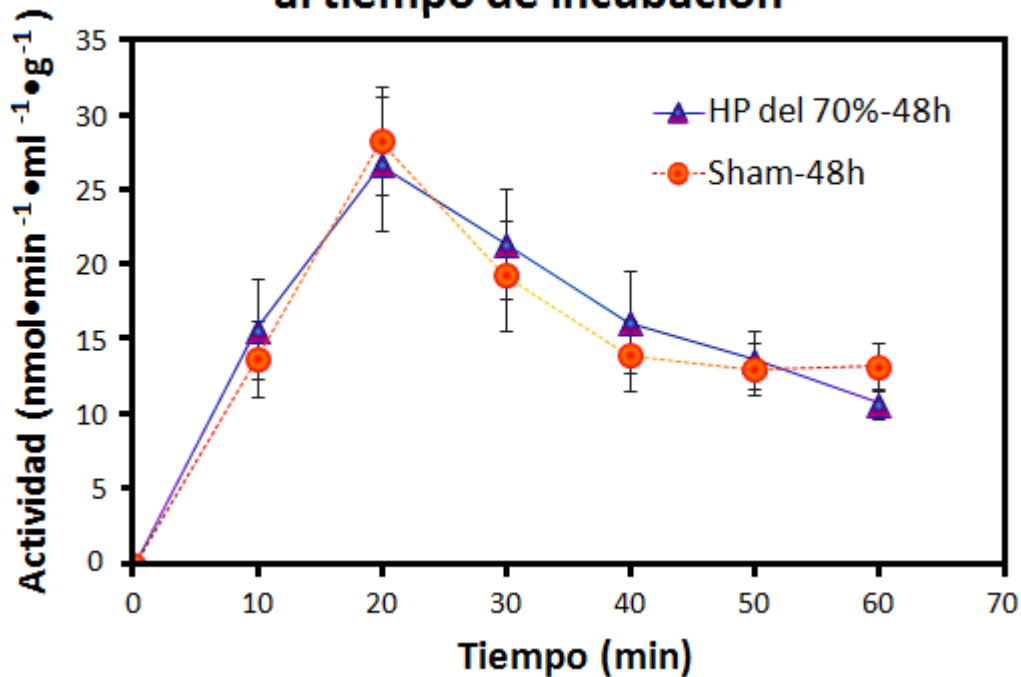
Cada punto en la gráfica está representado por el promedio de actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

Los resultados muestran una evidente liberación de la actividad enzimática de la OTC al medio de incubación. Esta liberación claramente se ve favorecida por la HP de 70%, aumentando de 2 a 3 veces en esta condición.

Tanto en la muestra control como hepatectomizada, la liberación tiene una cinética decreciente, donde se muestra una liberación casi inmediata a los 10 minutos y conforme avanza el tiempo disminuye.

Gráfica 1.3.2 Actividad enzimática de OTC en el medio de incubación a partir de rebanadas hepáticas de rata control (Sham-48h) y ratas con HP-70% a las 48 horas, respecto al tiempo.

Hígado. Liberación de OTC al medio con respecto al tiempo de incubación



Cada punto en la gráfica está representado por el promedio de actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

A las 48 horas post-cirugía, también se presenta una liberación de la enzima OTC al medio de Krebs-Ringer; esta liberación es menor (50%) a la observada a las 24 horas y por lo contrario a lo observado a las 24 horas, no se observan diferencias significativas al comparar la muestra de animales hepatectomizados y su control; el máximo de actividad se muestra a los 20 minutos, por lo tanto, el efecto de la HP 70% mostrado a las 24 horas desaparece totalmente.

A diferencia de lo presentado a las 24 horas, la liberación máxima al medio de esta enzima se da a los 20 minutos; aún así, a partir de este tiempo, la cinética de liberación se mantiene decreciente. Cabe mencionar que la magnitud de liberación es semejante a la presentada en la Sham de 24 horas.

En conclusión la OTC es liberada a partir del tejido hepático y este efecto se ve exacerbado en un tiempo de 24 horas tras una HP; no obstante, el efecto desaparece a las 48 horas.

TABLA 1.3.2 Actividad enzimática de OTC en HM de pulmón obtenidos a partir de ratas controles (Sham) y ratas sujetas a una HP del 70%.

Tratamiento	Actividad de OTC en el HM de pulmón (nmol•min ⁻¹ • g ⁻¹ de pulmón)	
	No incubada (basal)	Después de la incubación
Sham-24 h	65.98 ± 11.50	27.53 ± 7.08*
HP del 70%-24h	100.36 ± 15.11*	63.40 ± 11.44**
Sham-48 h	50 ± 7.82	15.25 ± 3.08*
HP del 70%-48h	76.67 ± 18.13	30.23 ± 2.56**

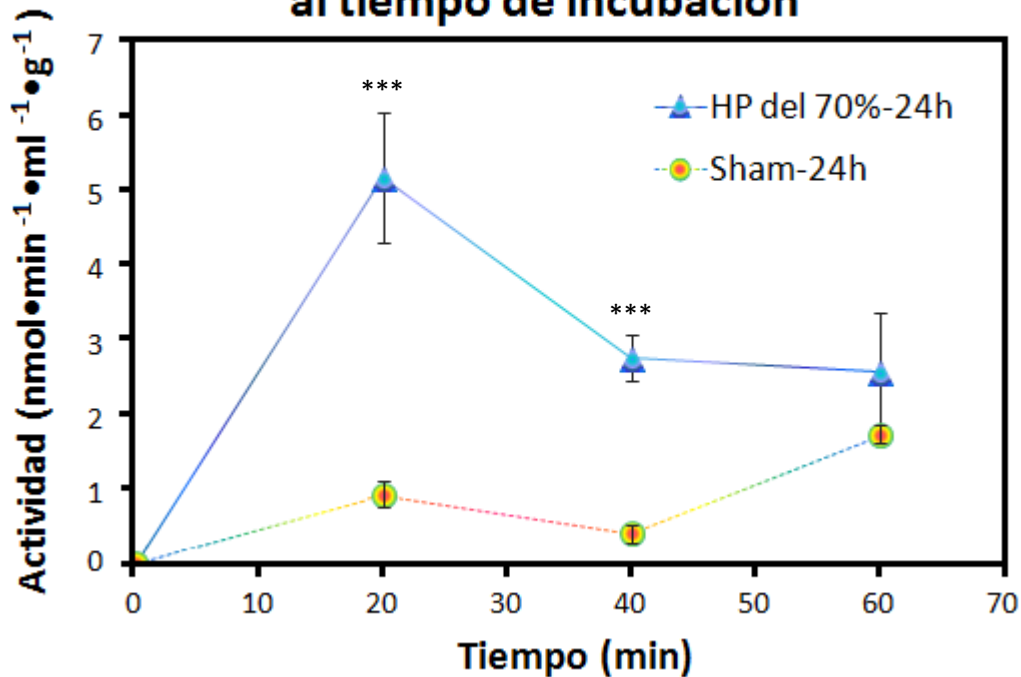
La actividad esta expresada como promedio de la actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes ± el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA: *p<0.05 contra el grupo control, **p<0.05 tejido no incubado contra el incubado.

La actividad de la enzima OTC en tejido no incubado e incubado de pulmones obtenidos de animales sacrificados a las 24 y 48 horas tras realizarse una HP del 70%, son estadísticamente diferentes, lo que se interpreta como una liberación al medio. Mientras que los controles no muestran diferencias después del periodo de incubación.

Si comparamos la actividad enzimática de animales hepatectomizados y sus controles a las 24 horas, se muestran diferencias estadísticamente significativas, en tejido incubado y no incubado. Mientras que a las 48 horas, las diferencias significativas se presentan solo en el tejido incubado. Esto nos indica que la HP puede ser responsable de un aumento en el contenido total de la enzima presente en el tejido pulmonar, como respuesta a la regeneración.

Gráfica 1.3.3 Actividad enzimática de OTC en el medio de incubación a partir de rebanadas pulmonares de rata control (Sham-24h) y ratas con HP-70% a las 24 horas, respecto al tiempo.

Pulmón. Liberación de OTC al medio con respecto al tiempo de incubación

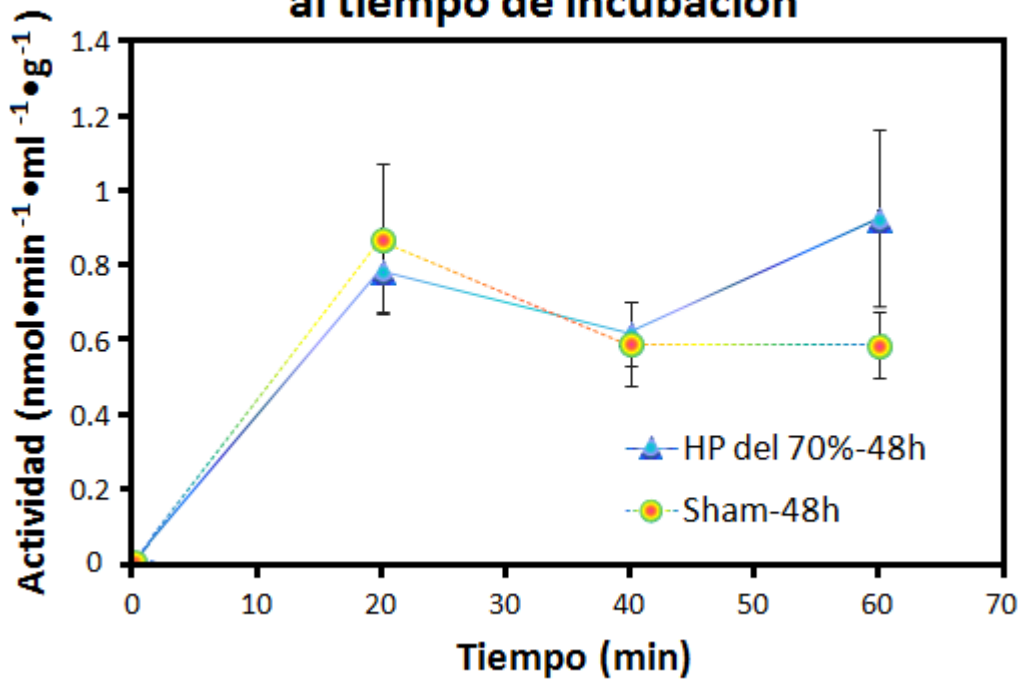


Cada punto en la gráfica está representado por el promedio de actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

La actividad de la enzima OTC en el medio de Krebs-Ringer a partir de rebanadas pulmonares, tanto de animales control como de animales hepatectomizados, muestra una liberación discreta. La liberación en animales sujetos a una HP del 70% presenta su máxima liberación a los 20 minutos y es significativamente mayor a su control a los 20 y 40 minutos. Esto nos indica un aumento en la liberación de OTC relacionado a la regeneración hepática tras una HP del 70%.

Gráfica 1.3.4 Actividad enzimática de OTC en el medio de incubación a partir de rebanadas pulmonares de rata control (Sham-48h) y ratas con HP-70% a las 48 horas, respecto al tiempo.

Pulmón. Liberación de OTC al medio con respecto al tiempo de incubación



Cada punto en la gráfica está representado por el promedio de actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

La actividad de la enzima OTC evaluada en animales sacrificados a las 48 horas post-cirugía, mostró una magnitud similar a la presentada en las muestras de tejido pulmonar de ratas Sham sacrificadas a las 24 y 48 horas.

En conclusión, la cantidad de la enzima OTC que se encuentra en el tejido pulmonar es muy baja, solo el 4.2 % de la que hay en el hígado, y tras una HP el nivel enzimático en el tejido aumenta a corto plazo (24 horas), para después regresar a los valores basales (48 horas) aun después de la HP.

1.4 Resultados obtenidos para la actividad enzimática de ARGasa.

TABLA 1.4.1 Actividad enzimática de ARGasa en HM de hígado obtenidos a partir de ratas controles (Sham) y ratas sujetas a una HP del 70%.

Tratamiento	Actividad de ARGasa en el HM de hígado ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de hígado)	
	No incubada (basal)	Después de la incubación
Sham-24 h	77.61 \pm 12.98	45.05 \pm 4.80
HP del 70%-24h	118.07 \pm 10.48*	58.99 \pm 5.91**
Sham-48 h	97.94 \pm 11.73	70.46 \pm 10.44
HP del 70%-48h	147.26 \pm 21.76	85.49 \pm 13.98

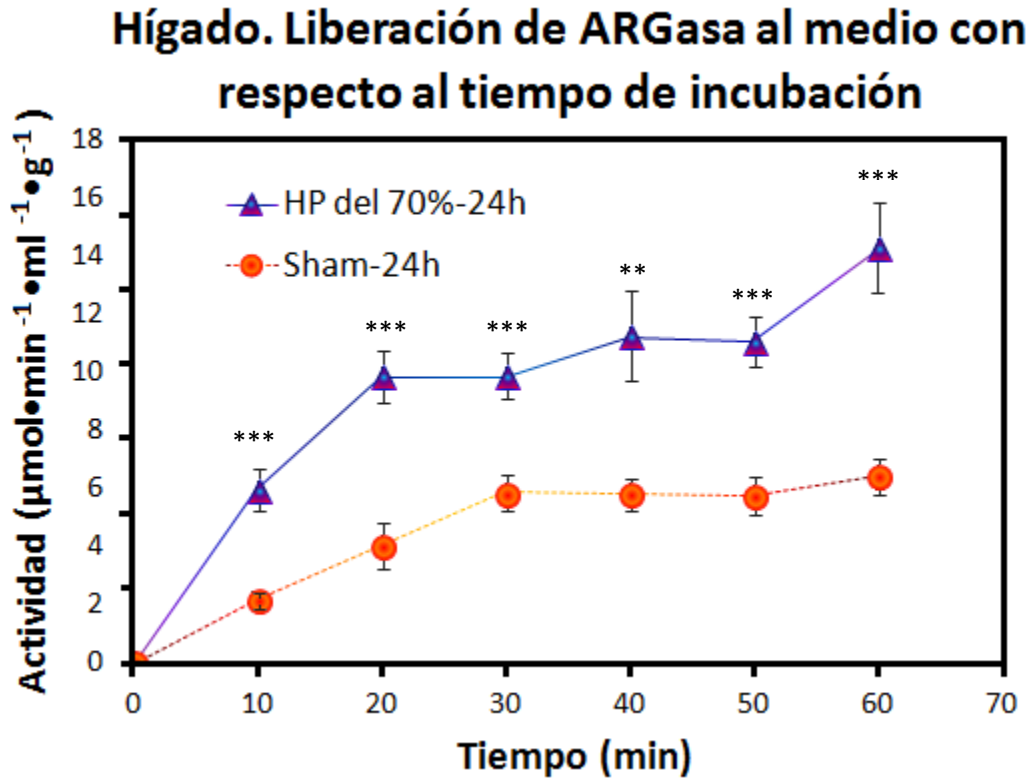
La actividad esta expresada como promedio de la actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA: * $p < 0.05$ contra el grupo control, ** $p < 0.05$ tejido no incubado contra el incubado.

Al comparar la actividad de la enzima ARGasa en el tejido hepático incubado y no incubado de ratas sujetas a una HP del 70% y sacrificadas a las 24 horas se observa que la actividad enzimática de la ARGasa es significativamente menor en el tejido incubado, lo cual sugiere una liberación al medio. En tanto, la actividad de ARGasa en ratas Sham y hepatectomizadas y sacrificadas a las 48 horas, muestran una disminución en el contenido de enzima tras la incubación; sin embargo, no presentan diferencias significativas. Lo anterior indica que la liberación es más apreciable a las 24 horas de sacrificio, pero también se hace presente a las 48 horas.

Sí comparamos la muestra obtenida de animales tras una HP del 70% y sacrificadas a las 24 y 48 horas con su control, se observa que la cantidad de enzima total en el tejido es significativamente mayor en muestras de animales

hepatectomizados. Aunque este efecto es evidente, la diferencia estadística solo se aprecia a las 24 horas.

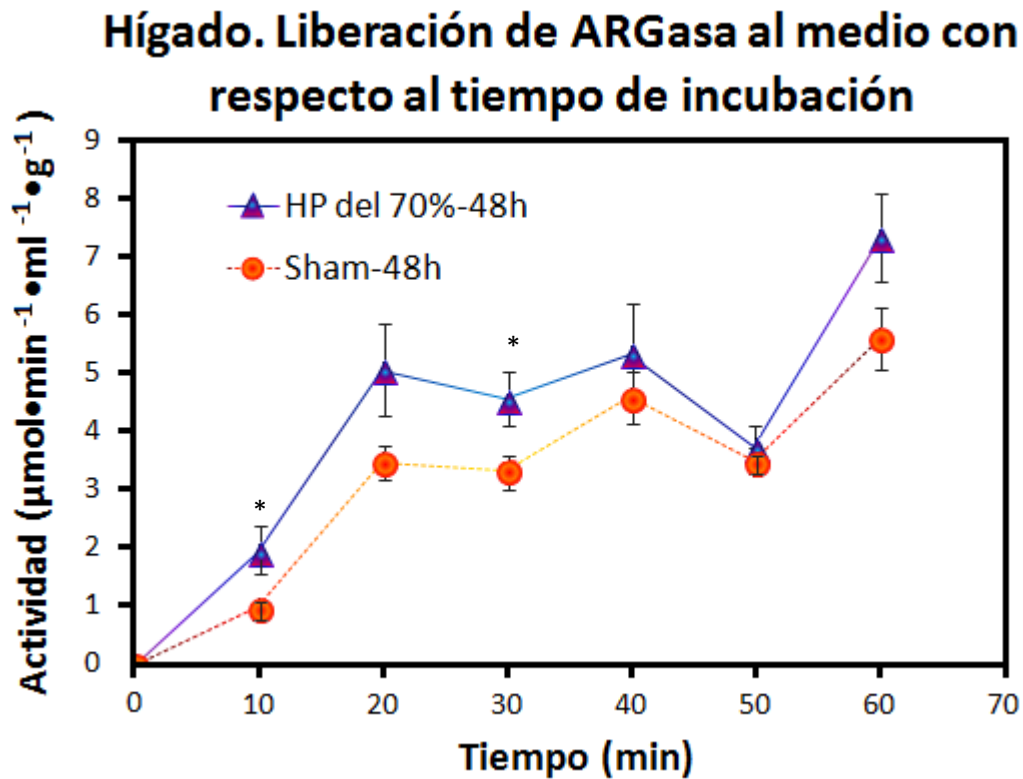
Gráfica 1.4.1 Actividad enzimática de ARGasa en el medio de incubación a partir de rebanadas hepáticas de rata control (Sham-24h) y ratas con HP-70% a las 24 horas, respecto al tiempo.



Cada punto en la gráfica está representado por el promedio de actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

Como se observa en la gráfica, la actividad enzimática de ARGasa en el medio de incubación refleja una liberación en ambas muestras; sin embargo, la muestra de tejido hepático procedente de animales hepatectomizados y sacrificados a las 24 horas, presenta el doble de liberación que el tejido hepático de animales control. Esto quiere decir que la liberación de ARGasa al medio se ve aumentada como resultados de la regeneración hepática tras una HP.

Gráfica 1.4.2 Actividad enzimática de ARGasa en el medio de incubación a partir de rebanadas hepáticas de rata control (Sham-48h) y ratas con HP-70% a las 48 horas, respecto al tiempo.



Cada punto en la gráfica está representado por el promedio de actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

En cuanto a las 48 horas después de la cirugía se observa que la HP pierde su efecto sobre la liberación, ya que el tejido de animales hepatectomizados solo presenta dos diferencias significativas con su control, a los minutos 10 y 30. Además, la magnitud de liberación enzimática en ambas muestras, se asemeja a la presentada en ratas Sham sacrificadas a las 24 horas.

Por lo tanto la ARGasa contenida en el tejido se libera al medio y esta liberación se exagera tras una HP del 70% después de 24 horas; sin embargo, este efecto no se aprecia a las 48 horas.

TABLA 1.4.2 Actividad enzimática de ARGasa en HM de pulmón obtenidos a partir de ratas controles (Sham) y ratas sujetas a una HP del 70%.

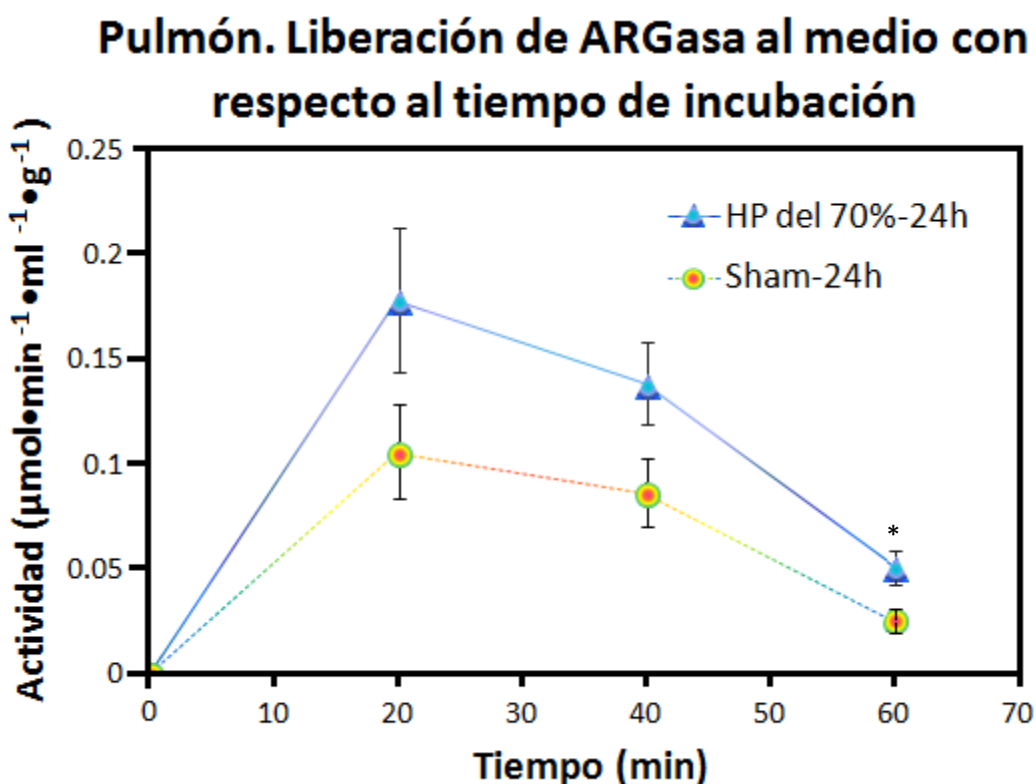
Tratamiento	Actividad de ARGasa en el HM de pulmón ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de pulmón)	
	No incubado (basal)	Después de la incubación
Sham-24 h	0.86 \pm 0.14	0.61 \pm 0.14
HP del 70%-24h	3.10 \pm 0.36*	1.73 \pm 0.28**
Sham-48 h	0.76 \pm 0.11	0.46 \pm 0.06
HP del 70%-48h	2.00 \pm 0.54	0.43 \pm 0.06**

La actividad esta expresada como promedio de la actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA: * $p < 0.05$ contra el grupo control, ** $p < 0.05$ tejido no incubado contra el incubado.

Se encontró actividad de ARGasa en el tejido pulmonar, aunque muy disminuida en relación al tejido hepático. El tejido pulmonar no incubado de animales que sufrieron HP de 70% y fueron sacrificados a las 24 horas son los que muestran menor aumento en la actividad de ARGasa (38X), mientras que tanto sham de 24 horas como ambas preparaciones de ratas sacrificadas a las 48 horas muestran aumentos mucho mayores en la actividad de la enzima (73-128X). En las muestras que fueron incubadas se observa un comportamiento similar. Las muestras de animales hepatectomizados, tanto a las 24 como a las 48 horas de sacrificio, presentaron una disminución de actividad de ARGasa en el tejido pulmonar incubado con respecto al tejido pulmonar no incubado, lo cual nos indica que hay una liberación de la actividad enzimática al medio, la cual es mucho mayor en animales con HP 70% y sacrificados a las 48 h. Es decir, tras una HP del 70% que da como resultado la inducción de la regeneración hepática, la liberación de ARGasa aumenta.

Al comparar la muestra de animales hepatectomizados y sacrificados a las 24 horas con su control, se observa que la actividad de ARGasa es significativamente mayor en tejido pulmonar proveniente de animales sujetos a una HP (3,6 X). En tanto, en las muestras de animales hepatectomizados y sacrificados 48 horas después si se observan un aumento (2.6X), aunque no es estadísticamente significativo en relación a su control. Estos datos indican que tras una HP, es muy evidente que el mayor incremento en la actividad de ARGasa en el tejido se observa cuando los animales se sacrifican a las 24 horas.

Gráfica 1.4.3 Actividad enzimática de ARGasa en el medio de incubación a partir de rebanadas pulmonares de rata control (Sham-24h) y ratas con HP-70% a las 24 horas, respecto al tiempo.

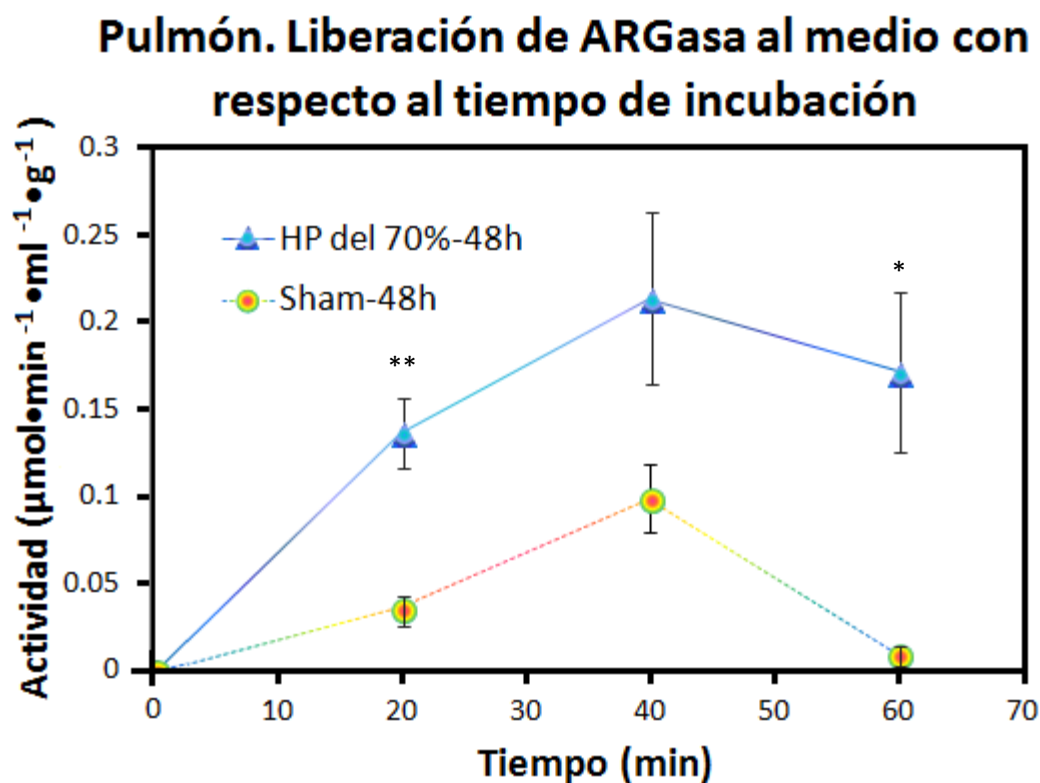


Cada punto en la gráfica está representado por el promedio de actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

La actividad de ARGasa encontrada en el medio de incubación nos indica que tanto el tejido pulmonar de las ratas sujetas a una HP del 70% como su control, presentan un patrón de liberación semejante, con una cinética de campana y un

máximo a los 20 min. El único tiempo al cual se muestra una diferencia significativa entre los animales sujetos a una HP con respecto a su control es al minuto 60, por lo que parece no haber un efecto claro de la HP.

Gráfica 1.4.4 Actividad enzimática de ARGasa en el medio de incubación a partir de rebanadas pulmonares de rata control (Sham-48h) y ratas con HP-70% a las 48 horas, respecto al tiempo.



Cada punto en la gráfica está representado por el promedio de actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

En muestras de animales sacrificados a las 48 horas después de la cirugía se observa que, la liberación de ARGasa a partir de tejido pulmonar es mayor en animales que fueron hepatectomizados. Por lo tanto, el efecto de la HP del 70% es más notorio en animales sacrificados a las 48 horas.

En conclusión, un porcentaje de la ARGasa contenida en el tejido pulmonar se libera al medio, tanto en muestras de animales hepatectomizados como de

animales control y, a pesar de que el efecto de la HP no es claro, se observa que tiende a aumentar a las 48 horas.

1.5 Resultados obtenidos para la actividad enzimática de LDH

TABLA 1.5.1 Actividad enzimática de LDH en HM de hígado obtenidos a partir de ratas controles (Sham) y ratas sujetas a una HP del 70%.

Tratamiento	Actividad de LDH en el HM de hígado ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de hígado)	
	No incubado (basal)	Después de la incubación
Sham-24 h	4.25 \pm 1.03	0.68 \pm 0.05*
HP del 70%-24h	1.36 \pm 0.26*	0.64 \pm 0.13**
Sham-48 h	3.98 \pm 0.90	2.73 \pm 0.45
HP del 70%-48h	2.45 \pm 0.36	1.62 \pm 0.17

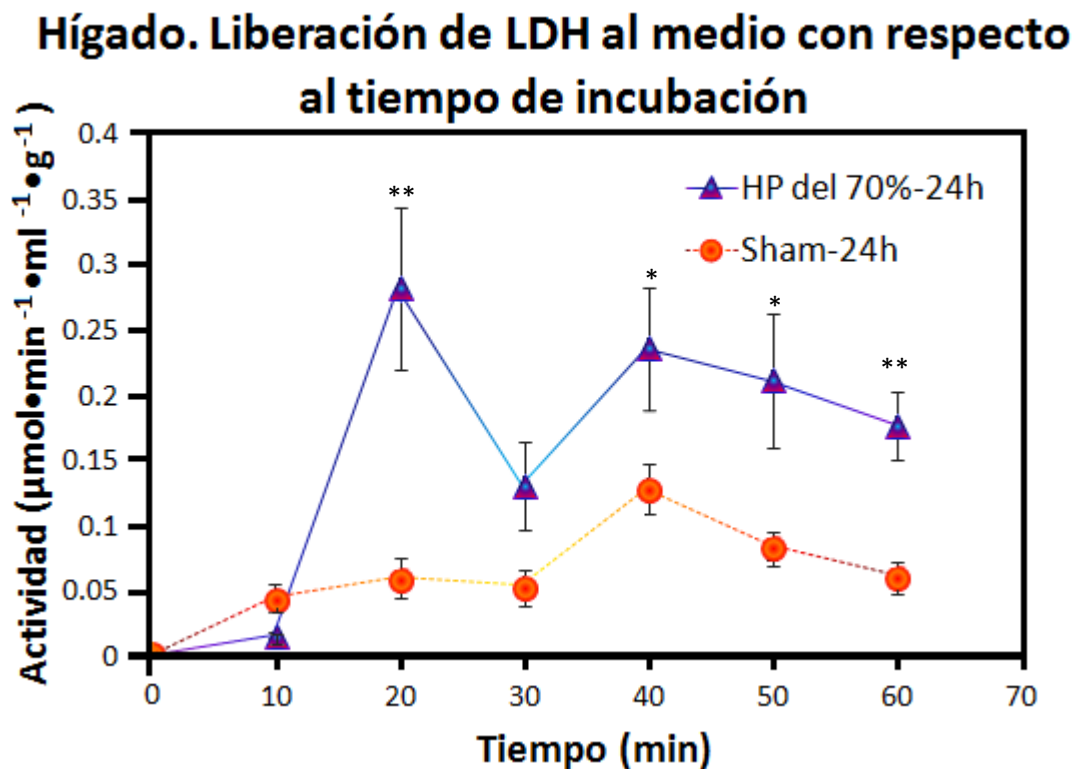
La actividad esta expresada como promedio de la actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA: * $p < 0.05$ contra el grupo control, ** $p < 0.05$ tejido no incubado contra el incubado.

Al comparar las muestras obtenidas de animales hepatectomizados con sus controles observamos que la HP del 70% parece provocar que la actividad enzimática de la LDH disminuya, de manera contraria a lo observado en otras enzimas. Este comportamiento es apreciable a las 24 y 48 horas post-cirugía, pero solo es estadísticamente significativo a las 24 horas, tanto en tejido incubado como no incubado.

Sorprendentemente la actividad de la LDH encontrada en el tejido hepático de animales sin HP y sacrificados a las 24 h disminuyó apreciablemente (84%) en relación a la no incubada, indicando que la regeneración celular no es la única señal que produce la liberación de la enzima (animales con HP liberan 53%). En cualquiera de las condiciones probadas, se observó una disminución después de

la incubación en la actividad de LDH determinada en el tejido, indicando que hay liberación de la enzima. Sin embargo, en ninguna de las muestras estudiadas del tejido de animales de 48 horas post-cirugía se detectaron diferencias estadísticamente significativas, indicando que la cantidad liberada es muy pequeña. Por otro lado, la salida de la actividad enzimática como resultado de la HP solo se observa a las 24 horas post-cirugía.

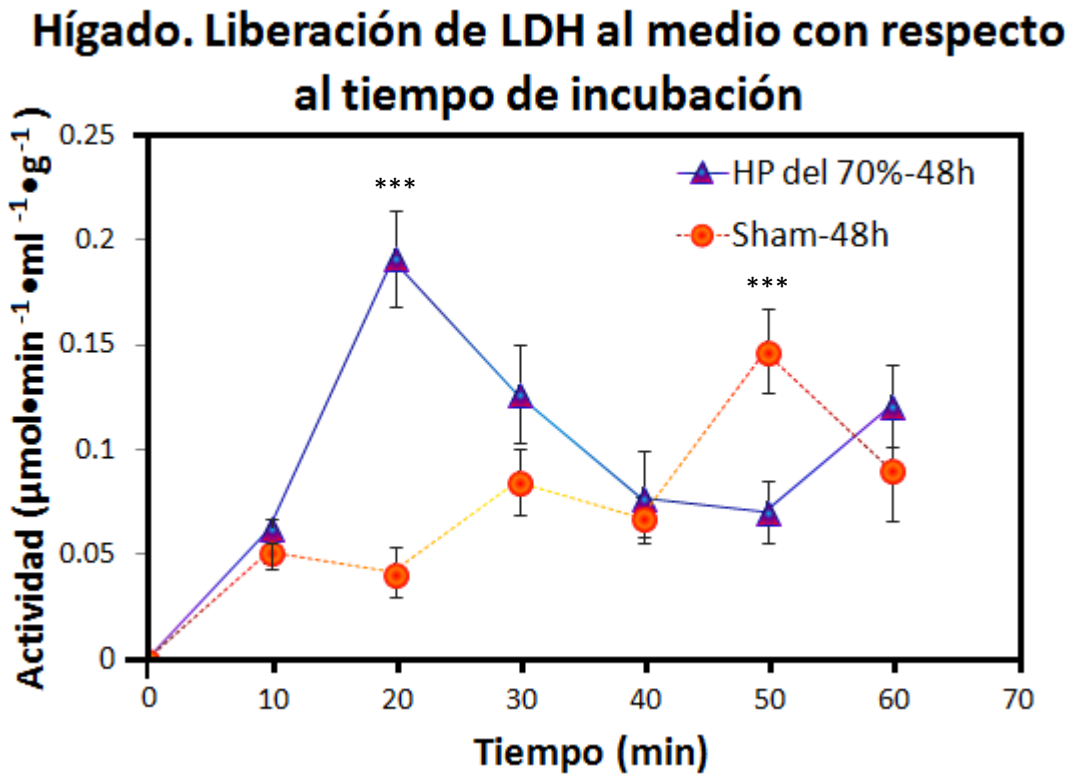
Gráfica 1.5.1 Actividad enzimática de LDH en el medio de incubación a partir de rebanadas hepáticas de rata control (Sham-24h) y ratas con HP-70% a las 24 horas, respecto al tiempo.



Cada punto en la gráfica está representado por el promedio de actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

Como se observa en la gráfica, la liberación de LDH al medio de Krebs es mayor en tejido hepático obtenido de animales hepatectomizados con respecto a su control (6 veces), presentando un máximo a los 20 minutos.

Gráfica 1.5.2 Actividad enzimática de LDH en el medio de incubación a partir de rebanadas hepáticas de rata control (Sham-48h) y ratas con HP-70% a las 48 horas, respecto al tiempo.



Cada punto en la gráfica está representado por el promedio de actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

A diferencia del comportamiento presentado a las 24 horas, se observa que en muestras obtenidas de animales sacrificados a las 48 horas la HP del 70% provoca la máxima salida al medio de la actividad de LDH a los 20 min, para luego disminuir; en contraste en el control se observa un pico de actividad enzimática hasta los 50 min (75 % del observado para animales con HP), para caer después al nivel de la actividad observada en los animales hepatectomizados. La máxima actividad alcanzada en animales que sufrieron la HP del 70 % es menor de la que se observa a las 24 horas post-cirugía (aumenta 4 veces con respecto al control).

En conclusión, aparentemente la HP del 70% provoca que la actividad enzimática de la LDH disminuya, de manera contraria a lo observado en otras enzimas; este efecto es significativo en el tejido hepático de animales sacrificados a las 24 horas.

En cualquiera de las condiciones probadas se observó la liberación de la LDH al medio, aunque es también más evidente a las 24 horas. Sorprendentemente la actividad de la LDH encontrada en el medio, después de incubar el tejido hepático de animales control y sacrificados a las 24 h, disminuyó apreciablemente (84%) en relación a la no incubada, indicando que la regeneración celular no es la única señal que produce la liberación de la enzima (animales con HP liberan 53%).

TABLA 1.5.2 Actividad enzimática de LDH en HM de pulmón obtenidos a partir de ratas controles (Sham) y ratas sujetas a una HP del 70%.

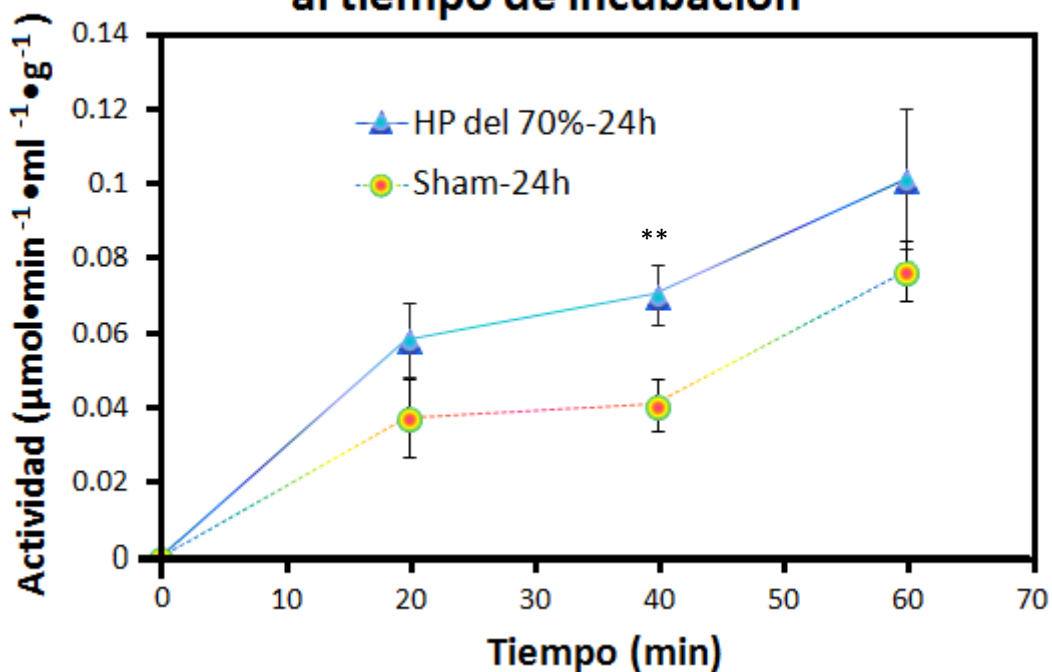
Tratamiento	Actividad de LDH en el HM de pulmón ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de pulmón)	
	No incubado (basal)	Después de la incubación
Sham-24 h	2.71 \pm 0.25	1.78 \pm 0.26
HP del 70%-24h	3.77 \pm 0.91	2.39 \pm 0.19
Sham-48 h	2.86 \pm 0.37	2.13 \pm 0.23
HP del 70%-48h	3.09 \pm 0.65	1.89 \pm 0.31

La actividad esta expresada como promedio de la actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA: * $p < 0.05$ contra el grupo control, ** $p < 0.05$ tejido no incubado contra el incubado.

La actividad de la enzima LDH en tejido pulmonar fue semejante a la actividad en el tejido hepático. Al comparar el tejido pulmonar no incubado e incubado de muestras provenientes de animales sujetos a una HP del 70% y animales control, no se observan diferencias significativas, tanto a las 24 como a las 48 horas. Por lo tanto, la liberación no se ve reflejada en el contenido total de actividad de la LDH en el tejido pulmonar. De la misma manera, al comparar las muestras de animales hepatectomizados y sus respectivos controles, no se presentan diferencias significativas que indiquen un incremento en la liberación como respuesta a la HP.

Gráfica 1.5.3 Actividad enzimática de LDH en el medio de incubación a partir de rebanadas pulmonares de rata control (Sham-24h) y ratas con HP-70% a las 24 horas, respecto al tiempo.

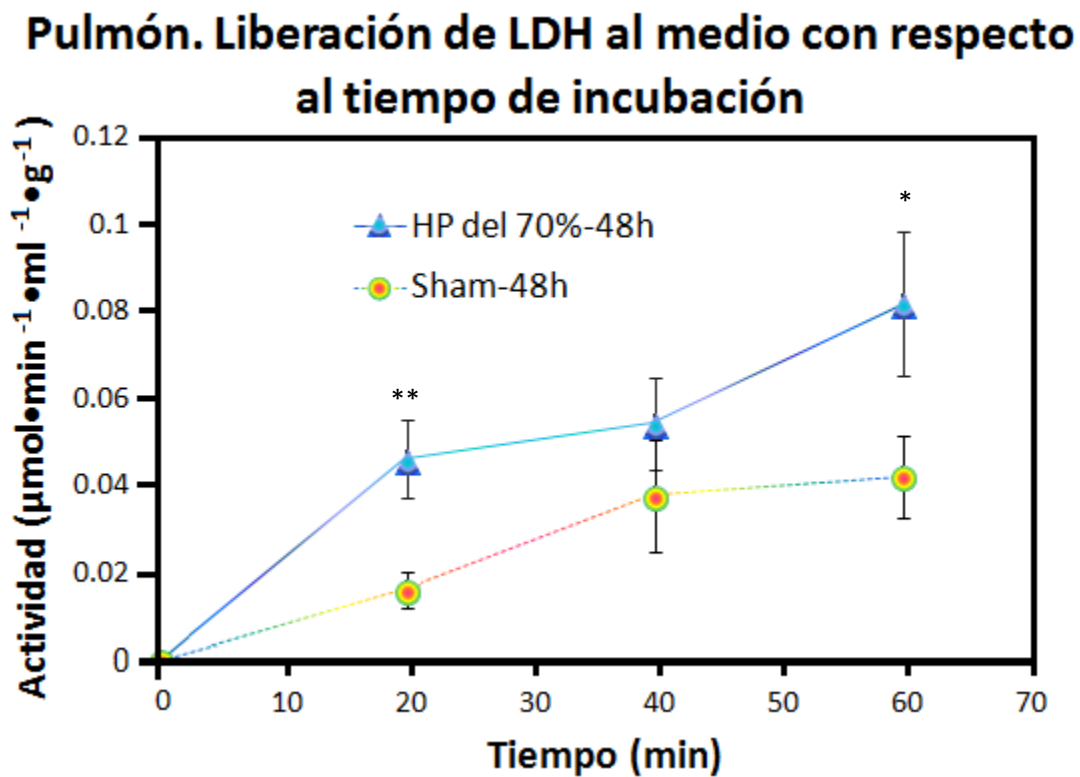
Pulmón. Liberación de LDH al medio con respecto al tiempo de incubación



Cada punto en la gráfica está representado por el promedio de actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

La liberación de la LDH al medio de incubación a partir del tejido pulmonar es menor (aproximadamente 2.5 veces) y con un patrón diferente, en comparación al tejido hepático. Tanto las muestras provenientes de animales hepatectomizados como las de animales control muestran el mismo perfil de liberación de la enzima con respecto al tiempo, lento y escaso, sin un máximo aparente. Sin embargo, al minuto 40 la liberación de la actividad enzimática a partir del tejido pulmonar de animales hepatectomizados muestra estadísticamente un valor significativamente mayor con respecto a su control. Estos resultados muestran la posibilidad de que la liberación de la LDH al medio posiblemente sea incrementada por efecto la HP.

Gráfica 1.5.4 Actividad enzimática de LDH en el medio de incubación a partir de rebanadas pulmonares de rata control (Sham-48h) y ratas con HP-70% a las 48 horas, respecto al tiempo.



Cada punto en la gráfica está representado por el promedio de actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

Después de 48 horas de la cirugía, se observa un perfil de salida de la LDH semejante al de las 24 horas, con la diferencia de que la liberación de muestras de animales hepatectomizados es significativamente mayor a su control a los minutos 20 y 60. Por lo tanto, el efecto de la HP a las 48 horas es más evidente que a las 24 horas.

En conclusión, a diferencia de las otras enzimas estudiadas, la LDH es una enzima que se encuentra abundantemente en el pulmón, similar a la contenida en el hígado. La liberación, por su parte, es constante y muy discreta (cerca del 3% del total en el tejido), y aparentemente es afectada por la HP a las 48 horas de sacrificio.

1.6 Resultados obtenidos para la actividad enzimática de GDH

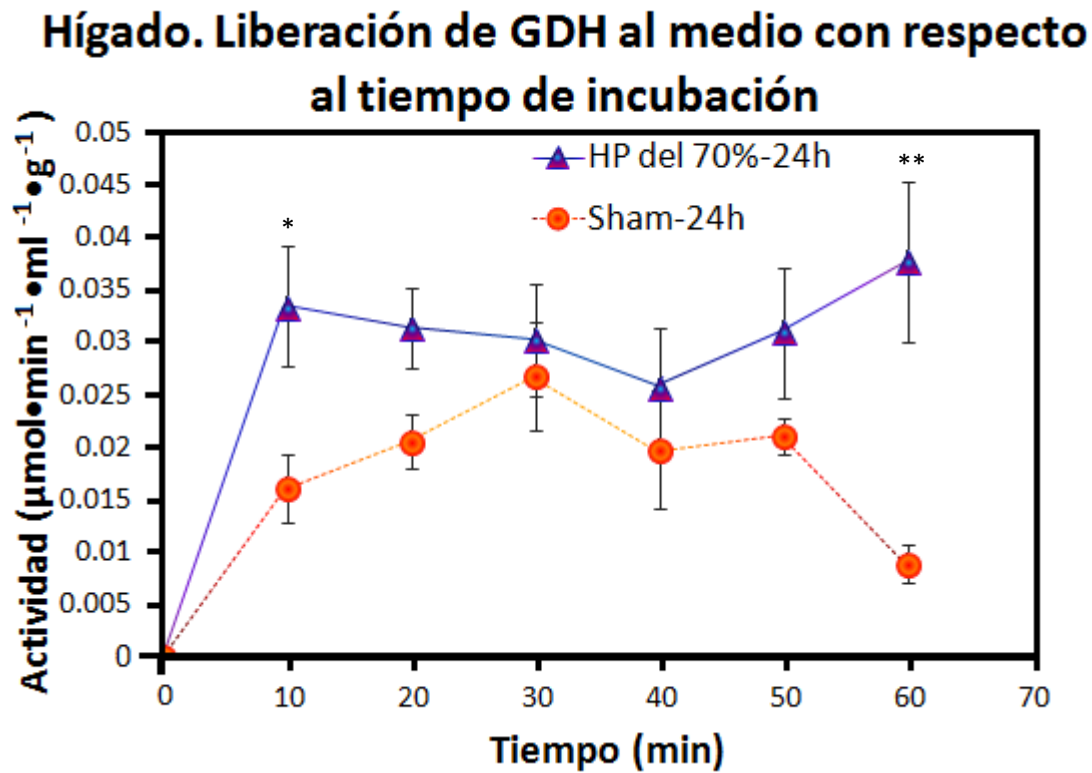
TABLA 1.6.1 Actividad enzimática de GDH en HM de hígado obtenidos a partir de ratas controles (Sham) y ratas sujetas a una HP del 70%.

Tratamiento	Actividad de GDH en el HM de hígado ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de hígado)	
	No incubado (basal)	Después de la incubación
Sham-24 h	3.35 ± 0.20	2.83 ± 0.21
HP del 70%-24h	3.43 ± 0.51	2.50 ± 0.15
Sham-48 h	2.93 ± 0.48	2.17 ± 0.10
HP del 70%-48h	$1.72 \pm 0.14^*$	1.33 ± 0.30

La actividad esta expresada como promedio de la actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA: * $p < 0.05$ contra el grupo control, ** $p < 0.05$ tejido no incubado contra el incubado.

Al comparar la actividad de la enzima GDH no se observa una diferencia estadísticamente significativa entre las diferentes muestras de tejido hepático obtenidas en ninguna de las condiciones estudiadas a excepción del tejido hepático obtenido a las 48 horas post-cirugía, donde la actividad en ratas control es significativamente mayor que la actividad presentada en las muestras hepatectomizadas, ya sea incubada o no; este fenómeno es semejante al observado en la LDH. A pesar de esto, es evidente que hay una disminución de la actividad enzimática después de la incubación, sugiriendo su liberación al medio.

Gráfica 1.6.1 Actividad enzimática de GDH en el medio de incubación a partir de rebanadas hepáticas de rata control (Sham-24h) y ratas con HP-70% a las 24 horas, respecto al tiempo.

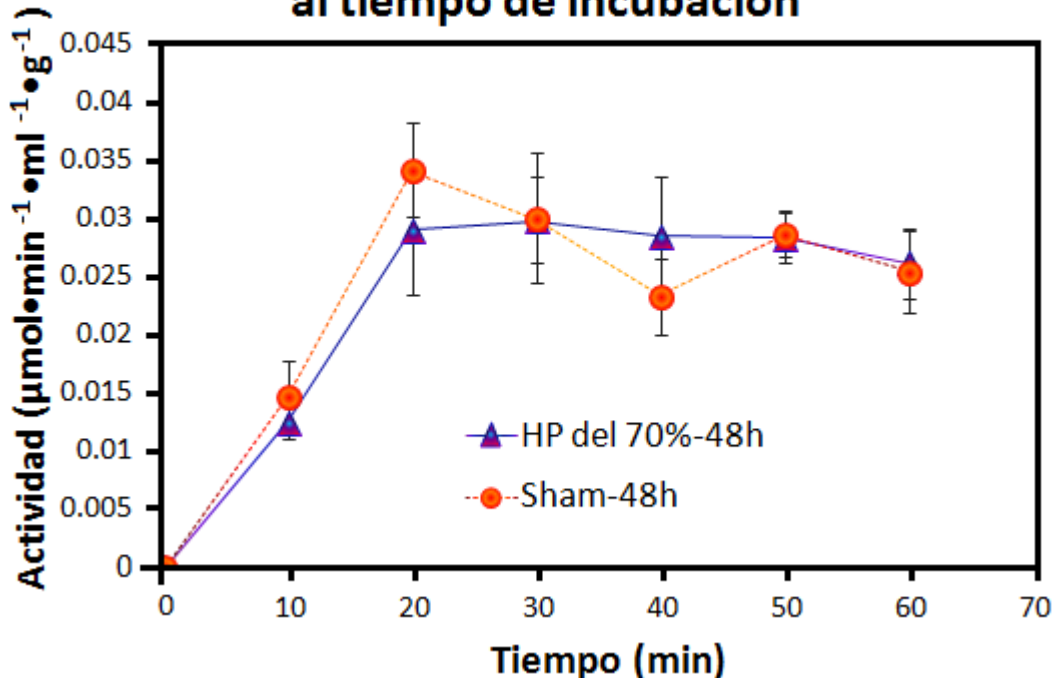


Cada punto en la gráfica está representado por el promedio de actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

La liberación de la GDH a partir de tejido hepático al medio es de magnitud discreta, tanto en muestras de animales hepatectomizados como en animales control. La tasa de liberación mantiene valores más o menos al mismo nivel, presentando dos discrepancias estadísticamente significativas, a los 10 y 60 minutos. Esto nos indica que la HP no tiene un efecto claro en la liberación tras 24 horas de la HP.

Gráfica 1.6.2 Actividad enzimática de GDH en el medio de incubación a partir de rebanadas hepáticas de rata control (Sham-48h) y ratas con HP-70% a las 48 horas, respecto al tiempo.

Hígado. Liberación de GDH al medio con respecto al tiempo de incubación



Cada punto en la gráfica está representado por el promedio de actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

Se presentó una pequeña liberación de la enzima GDH al medio a partir de rebanadas hepáticas de ratas sacrificadas a las 48 horas después de la cirugía, tanto en el hígado de ratas hepatectomizadas, como en el control. Al igual que a las 24 horas, la liberación mantiene valores más o menos constantes. Si comparamos la liberación obtenida de muestras de animales hepatectomizados y sus respectivos controles, observamos que no se muestra ninguna diferencia significativa durante el periodo de incubación.

Se puede concluir que la GDH es una enzima que se libera del tejido hepático al medio y que no se ve influenciada por la HP del 70%.

TABLA 1.6.2 Actividad enzimática de GDH en HM de pulmón obtenidos a partir de ratas controles (Sham) y ratas sujetas a una HP del 70%.

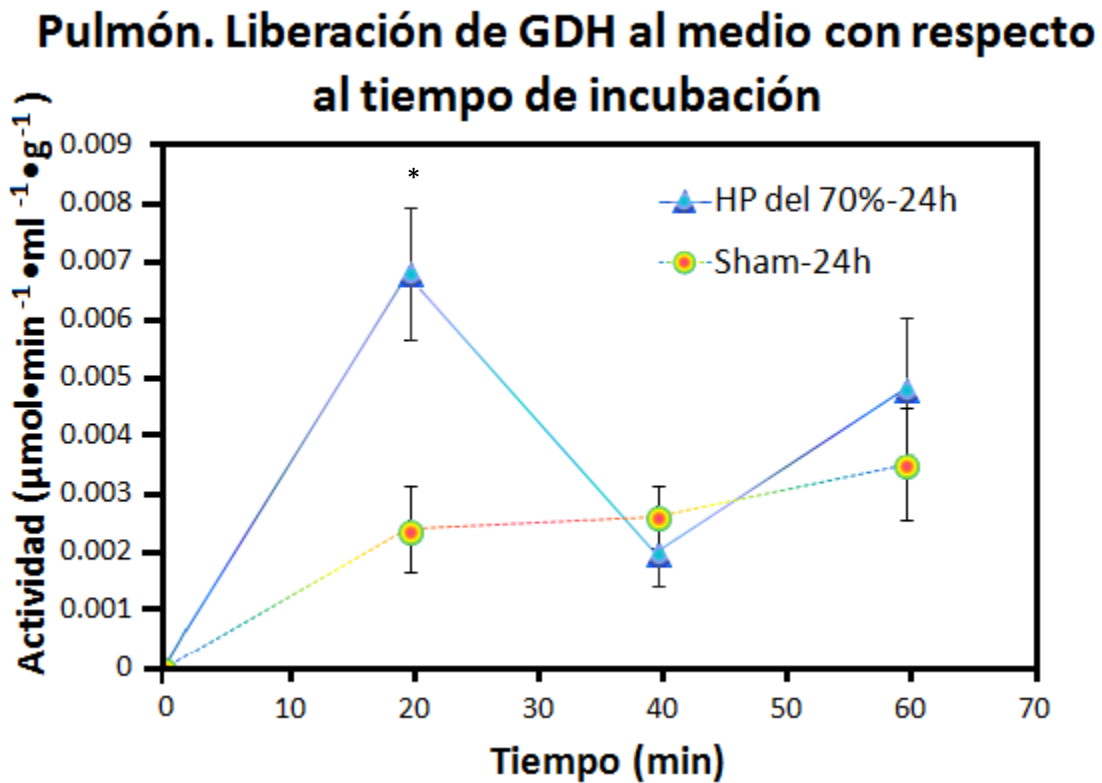
Tratamiento	Actividad de GDH en el HM de pulmón ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de pulmón)	
	No incubado (basal)	Después de la incubación
Sham-24 h	3.21 \pm 0.86	2.38 \pm 0.04
HP del 70%-24h	1.39 \pm 0.25*	1.04 \pm 0.04*
Sham-48 h	2.37 \pm 0.31	1.96 \pm 0.15
HP del 70%-48h	2.00 \pm 0.46*	1.52 \pm 0.11

La actividad esta expresada como promedio de la actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA: * $p < 0.05$ contra el grupo control, ** $p < 0.05$ tejido no incubado contra el incubado.

Al comparar la muestra de animales hepatectomizados con la muestra control, se observa que tanto a las 24 como a las 48 horas, las muestras controles tienen una actividad significativamente mayor; este fenómeno es similar a lo presentado en la LDH. Por lo tanto la HP parece estar asociada a la disminución de enzima GDH en el tejido.

La actividad de la GDH presentada en el tejido pulmonar es parecida a la actividad de la GDH en el tejido hepático. Al comparar la actividad presentada en la muestra no incubada e incubada de tejido pulmonar de ratas sujetas a una HP del 70% y sus controles, no se presentan diferencias significativas, a pesar de ello se observa que las muestras incubadas tienen menor actividad. Estos datos sugieren una pequeña liberación de la actividad enzimática al medio.

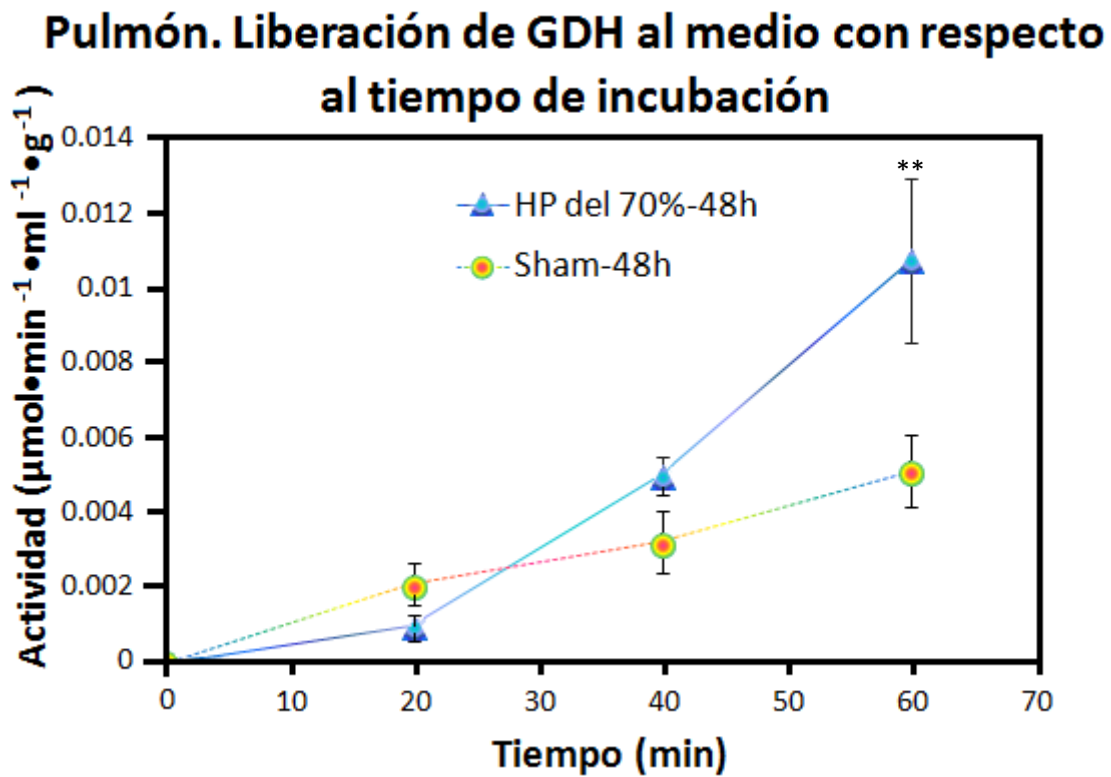
Gráfica 1.6.3 Actividad enzimática de GDH en el medio de incubación a partir de rebanadas pulmonares de rata control (Sham-24h) y ratas con HP-70% a las 24 horas, respecto al tiempo.



Cada punto en la gráfica está representado por el promedio de actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

La presencia actividad de la enzima GDH determinada en el medio de incubación del tejido pulmonar nos indica que tanto el tejido pulmonar de las ratas sujetas a una HP del 70% como su control, presentan una liberación discreta al medio; esta actividad enzimática es mayor a la que se obtiene en el tejido hepático (0.007 vs 0.0035). Las muestras provenientes de animales hepatectomizados tienen una máxima liberación a los 20 minutos, presentando un valor 3 veces mayor a su control, para después disminuir a los mismos niveles. Tomando en cuenta estos resultados, se puede plantear que la HP del 70% puede tener efecto en el aumento de liberación.

Gráfica 1.6.4 Actividad enzimática de GDH en el medio de incubación a partir de rebanadas pulmonares de rata control (Sham-48h) y ratas con HP-70% a las 48 horas, respecto al tiempo.



Cada punto en la gráfica está representado por el promedio de actividad enzimática de 4 o 5 ratas experimentales independientes \pm el error estándar. Para la estadística se usó la prueba de t de Student y ANOVA. Significancia estadística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$.

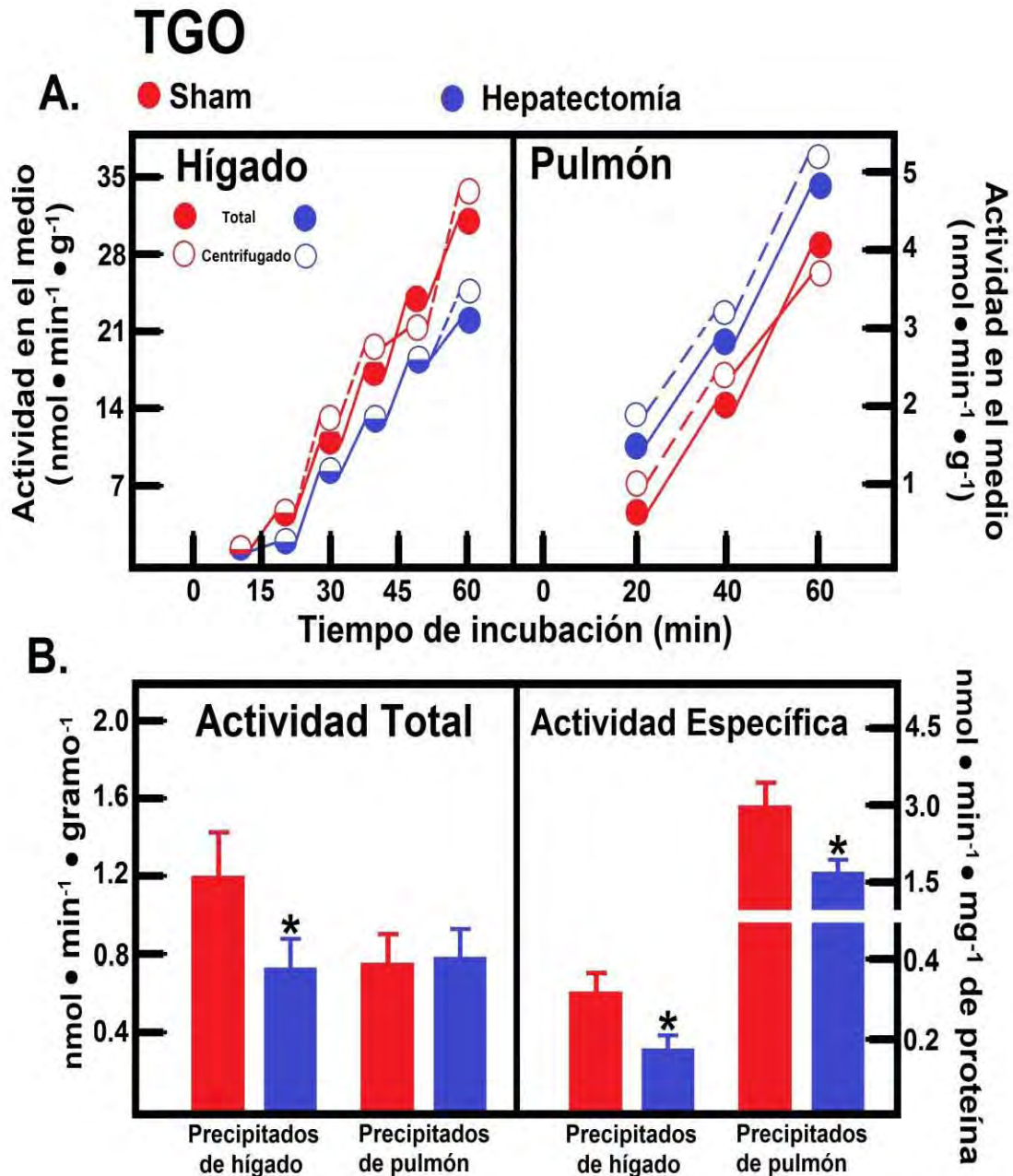
La actividad enzimática de la GDH en el medio de Krebs a partir de tejido pulmonar de animales hepatectomizados y animales control, sacrificados a las 48 horas, presentan una liberación discreta. Los valores obtenidos entre ambas muestras en los primeros 40 minutos de incubación son muy similares, mientras que al aumentar el tiempo de incubación a los 60 minutos la liberación de la actividad enzimática en la muestra de animales sujetos a una HP del 70% es significativamente mayor a su control.

Por lo tanto la GDH que se encuentra en el pulmón se libera de forma discreta al medio y la liberación puede estar afectada por la HP del 70%.

2. Determinación de la presencia de exosomas en el medio extra-hepático y extra-pulmonar.

Las soluciones de Krebs obtenidas a partir de la incubación del tejido hepático y pulmonar de ratas controles (Sham) y aquellas que fueron sometidas a una HP del 70%, se ultra-centrifugaron. Se midieron las actividades, tanto en las muestras que fueron ultra-centrifugadas y se compararon con muestras sin ultra-centrifugar, denominadas totales.

Grafica 2.1. A. Cinética de la partición de la actividad enzimática de la TGO de hígado y pulmón en el medio de incubación. **B.** Actividad totales y específicas particuladas de la TGO.

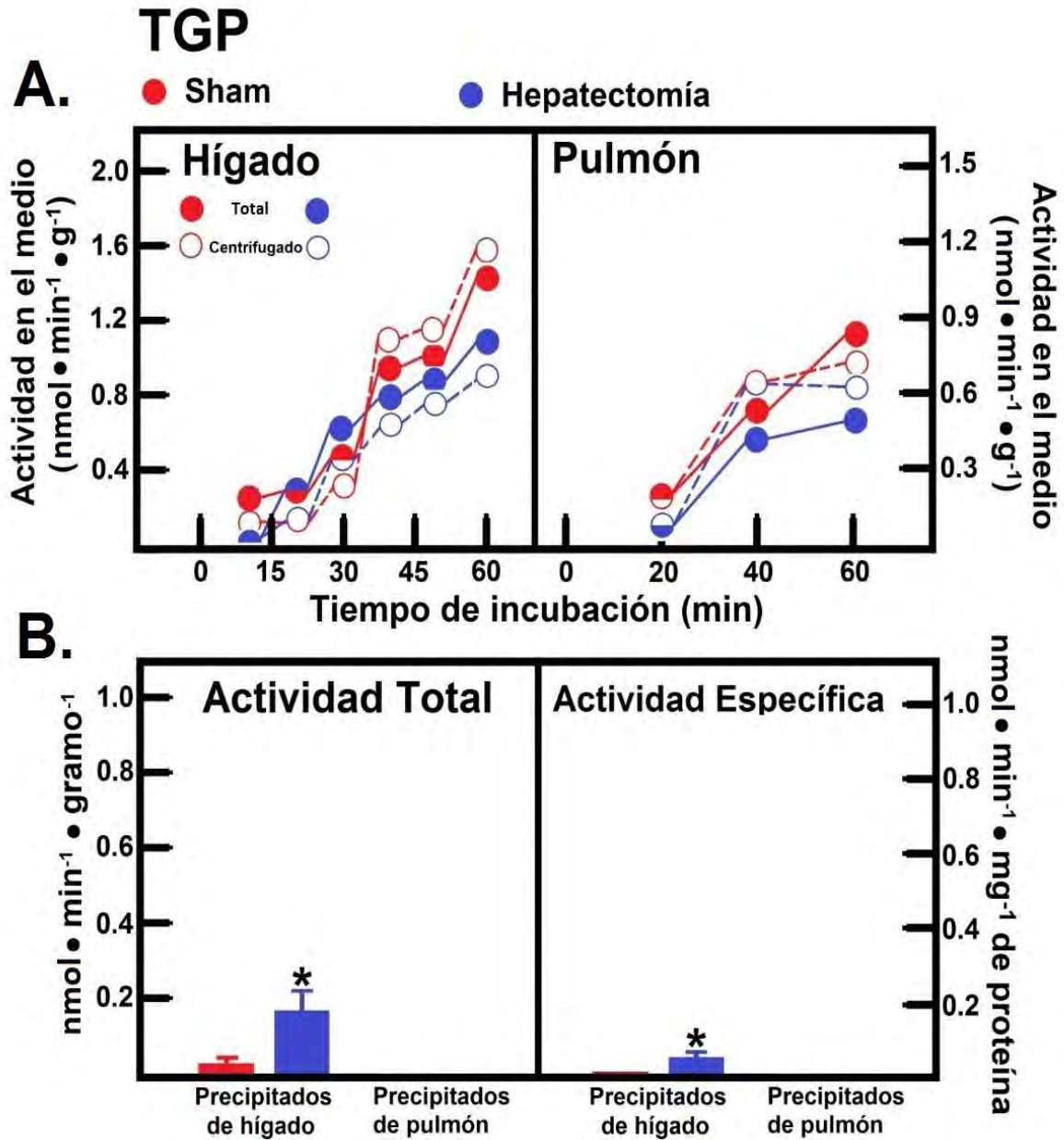


Las actividades de la TGO, determinadas en el medio de incubación obtenidas de la muestra hepatectomizada y Sham, fueron similares al comparar las muestras totales y ultra-centrifugadas; sin embargo, las actividades totales reflejan una muy pequeña fracción de actividad enzimática que se precipitó (3.3%), sugiriendo que

se encuentra en forma particulada. No obstante, al comparar las actividades totales de las fracciones particuladas se observa que la actividad es mayor en sujetos Sham que en los sujetos HP-70%, indicando que el hígado en regeneración libera la TGO en una proporción menor.

A pesar de que como ya habíamos mencionado anteriormente, el pulmón libera 7 veces menos actividad de TGO, que el hígado al medio de incubación, es de sorprender el alto porcentaje de particulación de la actividad enzimática (20%) en pulmón de rata Sham y HP-70%, cuando se determino en actividad específica. Al comparar la actividad específica del pulmón con el hígado, se observa que la del pulmón es mayor, lo que sugiere que la enzima liberada en pulmón se encuentra más particulada de la que se pueda liberar en hígado.

Grafica 2.2. A. Cinética de la partición de la actividad enzimática de la TGP de hígado y pulmón en el medio de incubación. **B.** Actividad totales y específicas particuladas de la TGP.

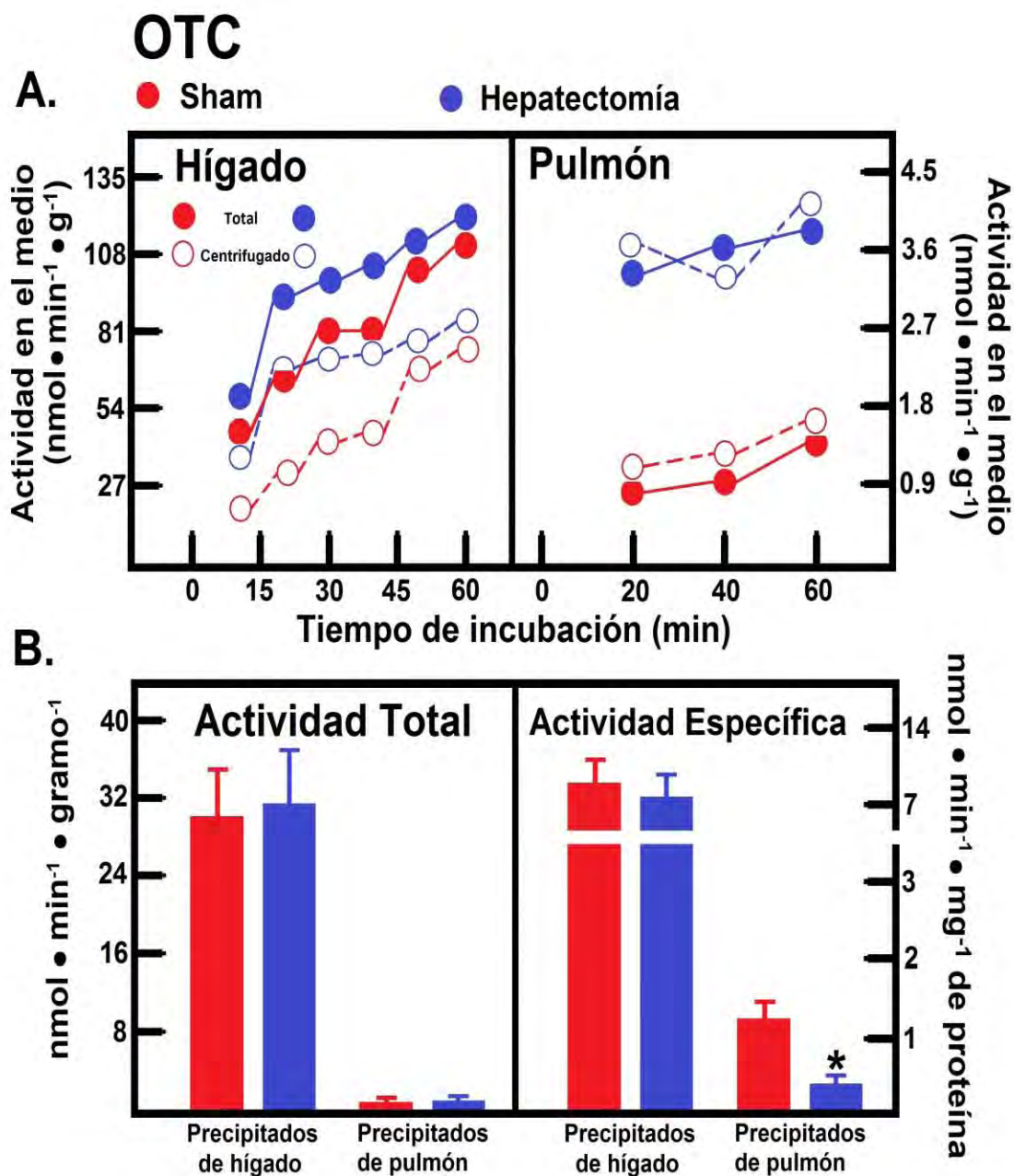


Las actividades de la TGP determinadas en el medio de incubación obtenidas de la muestra hepatectomizada y Sham, presentan actividades semejantes al comparar las muestras totales y ultra-centrifugadas, tanto en hígado como en pulmón. Sin embargo, al analizar la actividad total y específica se observa una pequeña fracción de actividad enzimática en el hígado. Esta actividad de las

fracciones particuladas, aunque pequeñas, fueron significativamente mayores en el hígado proveniente de animales hepatectomizados (15%) que en ratas Sham (2.6%), indicando que el hígado en regeneración libera la TGP un poco más que el hígado de animales Sham.

El pulmón por su parte, no presenta actividad en la fracción particulada, sugiriéndonos que toda la actividad de la TGP se encuentra de forma soluble en el medio de incubación.

Grafica 2.3. A. Cinética de la partición de la actividad enzimática de la OTC de hígado y pulmón en el medio de incubación. **B.** Actividad totales y específicas particuladas de la OTC.

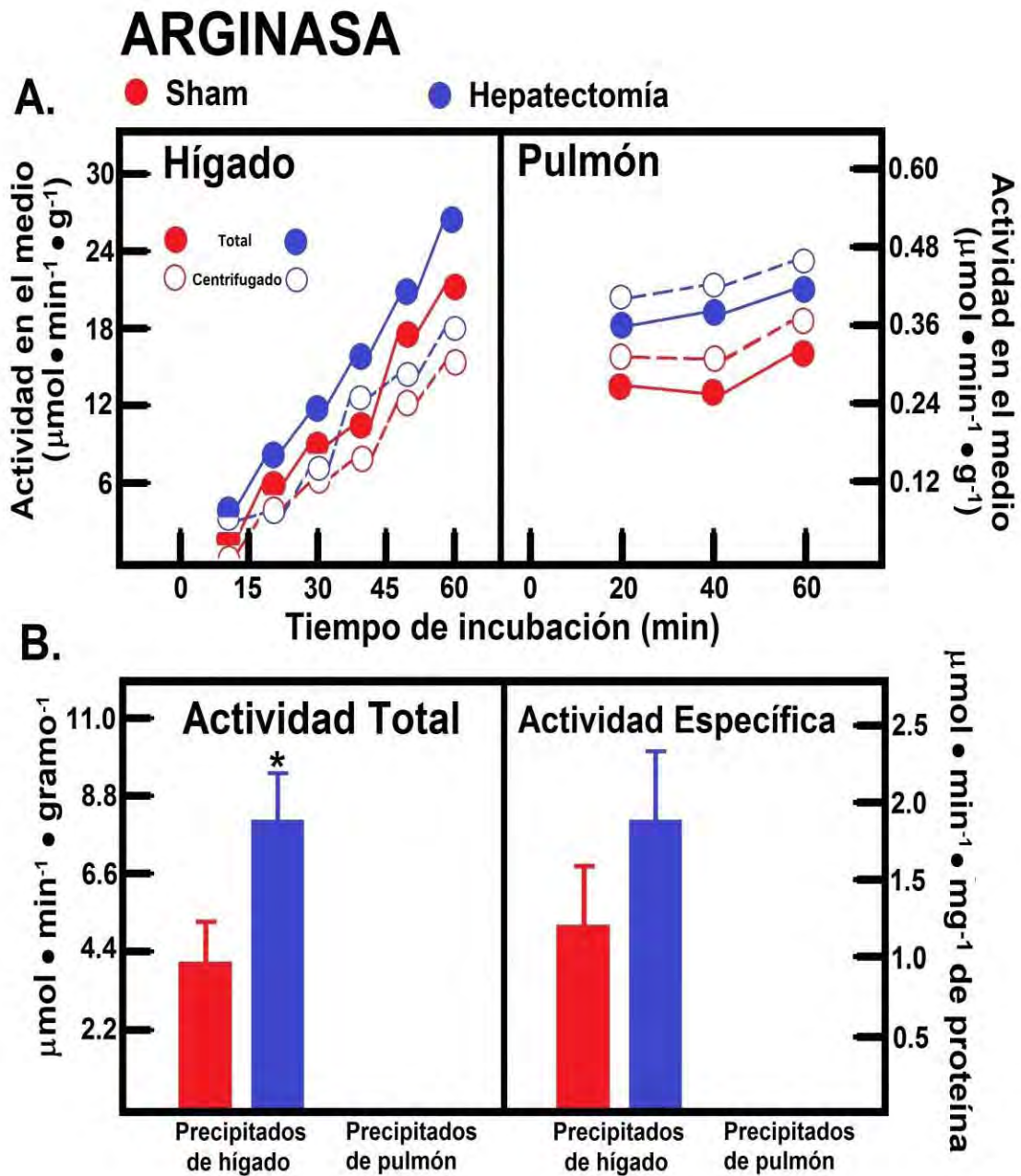


Las actividades de la OTC, determinadas en el medio de incubación obtenidas de animales hepatectomizados y Sham, fueron diferentes al comparar las muestras totales y ultra-centrifugadas de hígado, ya que las muestras ultra-centrifugadas

mostraron menos liberación de la actividad enzimática. La fracción particulada presenta una actividad enzimática similar en tejido hepático de ratas Sham y hepatectomizadas (alrededor del 26%), indicando que la actividad de la OTC en la fracción particulada no depende del proceso de regeneración hepática.

A pesar de que el pulmón libera una muy pequeña actividad de OTC al medio de incubación en comparación con el hígado, la liberación presenta un alto porcentaje de particulación de la enzima. La actividad en la fracción particulada obtenida de animales Sham (50%) fue significativamente mayor a la de en animales hepatectomizados (26.8%), sugiriendo que el pulmón de una rata sujeta a una HP-70% tiene una menor liberación de enzima particulada.

Grafica 2.4. A. Cinética de la partición de la actividad enzimática de la ARGasa de hígado y pulmón en el medio de incubación. B. Actividad totales y específicas particuladas de la ARGasa.

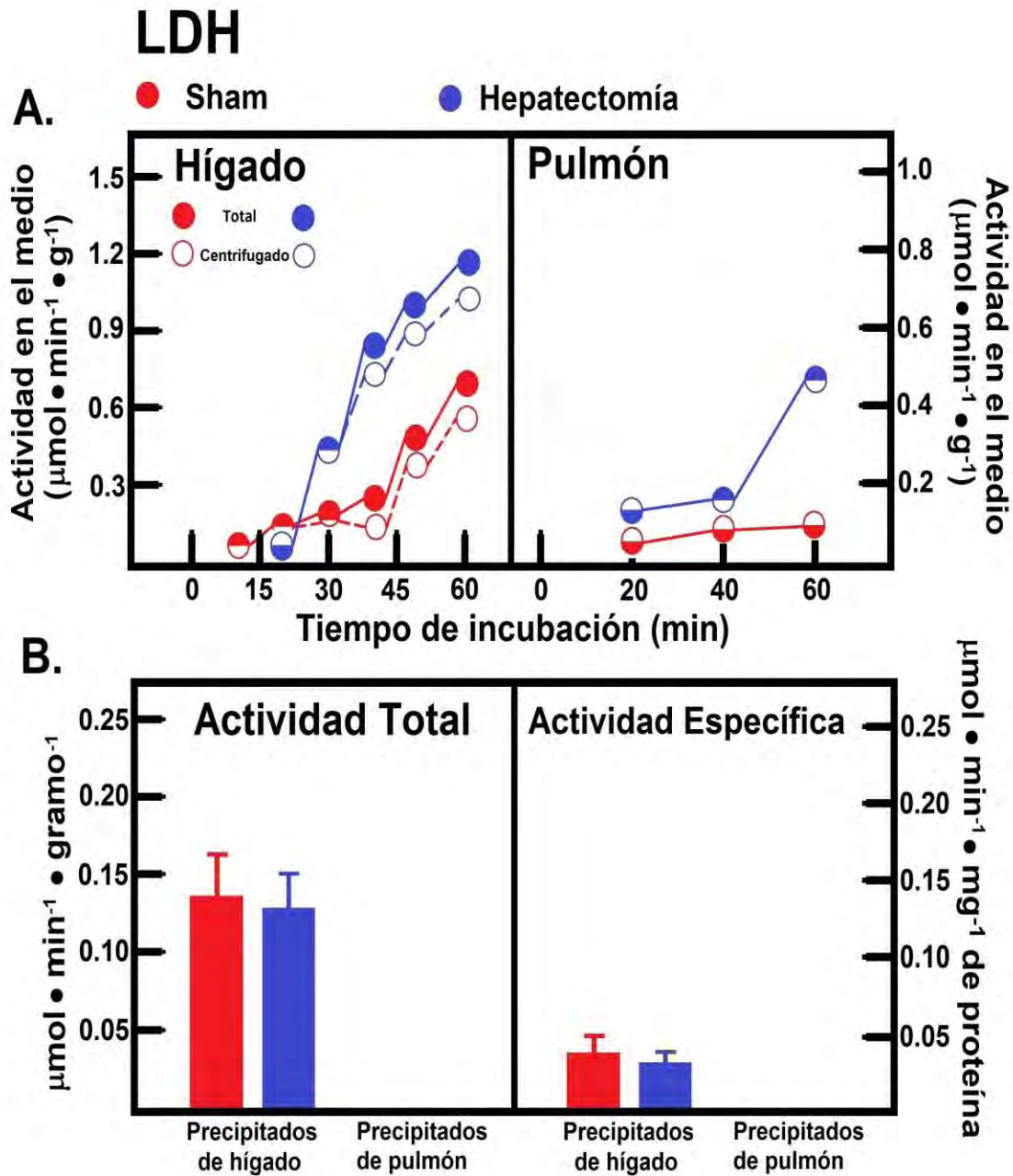


Las actividades de la ARGasa, determinadas en el medio de incubación obtenidas de la muestra hepatectomizada y Sham, fueron mayores en las muestras totales al compararlas con las muestras ultra-centrifugadas, indicando que una parte de la

actividad esta particulada. Lo anterior se ve reflejado en la fracción de actividad enzimática determinada en la fracción particulada obtenida tanto en animales hepatectomizados como en animales Sham. Al comparar la actividad total en hígado, la fracción particulada de la ARGasa fue mayor en muestras de animales hepatectomizados (32.3%) que en animales Sham (19%), indicando que el hígado en regeneración libera ARGasa en una proporción mayor.

En el pulmón, las actividades de ARGasa fueron similares en las muestras totales y ultra-centrifugadas. Además no se mostró actividad en la fracción particulada, lo que nos indica que la actividad de la ARGasa está toda en forma soluble en el medio de incubación.

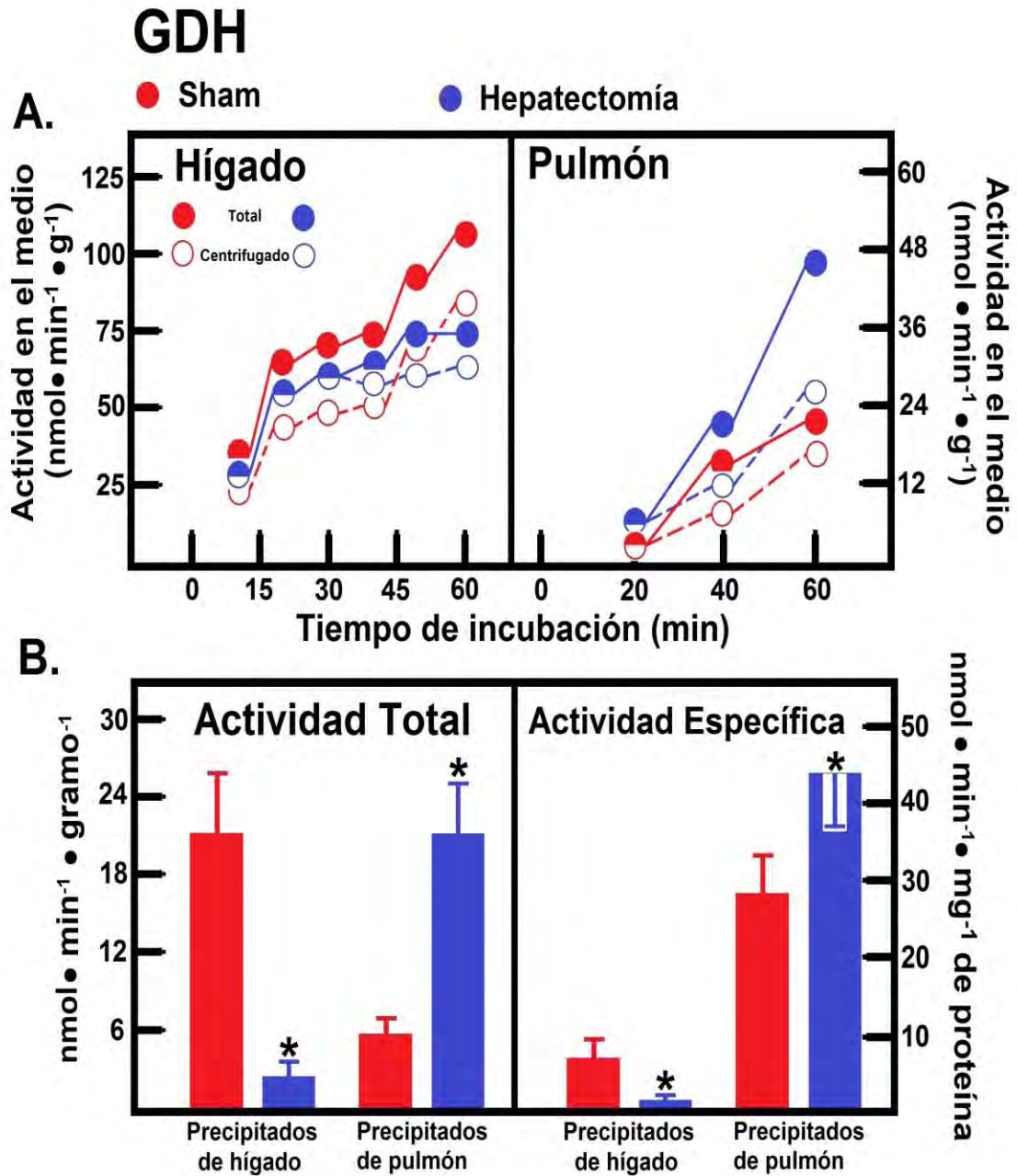
Grafica 2.5. A. Cinética de la partición de la actividad enzimática de la LDH de hígado y pulmón en el medio de incubación. **B.** Actividad totales y específicas particuladas de la LDH.



En el caso de la LDH es posible observar actividad enzimática en el medio de incubación, tanto en hígado como en pulmón, y aunque no parece haber diferencias significativas entre las muestras ultra-centrifugadas y aquellas que no

lo fueron, se pudo determinar una muy pequeña fracción de la actividad particulada en el caso del hígado (10.8% para HP 70% y 18.6% para Sham), lo que no pudo observarse para el pulmón.

Grafica 2.6. A. Cinética de la partición de la actividad enzimática de la GDH de hígado y pulmón en el medio de incubación. **B.** Actividad totales y específicas particuladas de la GDH.



En cuanto a la actividad enzimática de la GDH puede observarse, tanto en hígado como en pulmón, que en la fracción que se libera al medio de incubación hay una porción que se particula, ya que se encuentran diferencias entre la actividad total

en el medio sin centrifugar y aquella que fue ultra-centrifugada. En el caso del hígado es más evidente en las muestras obtenidas de ratas Sham, mientras que en el pulmón, la presencia de actividad particulada es muy clara en ambos tipos de muestras (tanto en ratas Sham como en aquellas que fueron sometidas a una HP 70%). Este hallazgo se ve reflejado cuando se determina la actividad enzimática en las fracciones particuladas, donde observamos que para hígado, la mayor actividad se observa en muestras de animales Sham (19.4% de la actividad determinada en el medio de incubación), mientras que en pulmón, la actividad enzimática encontrada en las muestras de ratas con HP 70% tiene casi el doble de actividad (44.3% y 25.4%, respectivamente).

DISCUSIÓN

La regeneración hepática es un proceso extraordinario y cuidadosamente regulado, implicando una cuidadosa regulación tanto endocrina como paracrina. La hepatectomía parcial (HP) consiste en remover una parte del hígado quirúrgicamente y es uno de los modelos más utilizados para la investigación de los mecanismos reguladores de la proliferación celular [53]. Este modelo induce cambios en los flujos hemodinámicos en el hígado remanente, al aumentar tres veces el flujo portal por unidad de tejido.

A nivel celular, las células expuestas a una HP experimentan un cambio a un estado proliferativo, implicando un ciclo celular controlado. El proceso de regeneración también implica un aumento selectivo de enzimas hepáticas en el suero con patrones característicos de liberación dependientes de la proliferación celular compensatoria, considerándose a las actividades séricas como "marcadoras" del tejido hepático. Para dilucidar los factores que afectan la salida de las enzimas al medio extra-hepático, se han realizado estudios que evidencian el papel del flujo hemodinámico en la salida de las enzimas del tejido hacia la sangre, mediante fuerzas mecánicas (fricción) y activación de mecano-transducción en células epiteliales [29], demostrándose que el gradiente de salida no se da por simple difusión, sino que varía de acuerdo a la localización celular de la enzima y la velocidad del flujo, mostrando una liberación reversible y selectiva que puede ser dependiente del flujo sanguíneo (1) o independiente de él (2).

Se ha postulado que el hígado actúa como una pieza de interconectividad con todo el organismo, por lo que se puede suponer que un cambio homeostático en este órgano puede afectar algunos otros. Experimentos preliminares han señalado la presencia de la enzima hepática OTC en el tejido pulmonar.

El objetivo principal del presente trabajo de investigación fue estudiar los posibles mecanismos que controlan la liberación de enzimas, a partir de un hígado sano de rata, así como el efecto de la regeneración hepática como resultado de una HP del 70%, que exacerba la liberación enzimática. Además, para determinar qué consecuencias tiene un cambio homeostático en el hígado en otros órganos, se comparó el efecto de la HP del 70% en la liberación de enzimas pulmonares,

donde los “neumocitos”, se encuentran siempre en un estado quiescente. Dado que se ha demostrado que las presiones hemodinámicas influyen mayormente en este fenómeno, este estudio se efectuó en rebanadas de tejido, las cuales con una influencia mínima o nula de las fuerzas físicas generadas por un flujo hidrostático, liberan cantidades abundantes de enzimas.

En la práctica clínica, la liberación neta de enzimas hacia la circulación sanguínea se puede considerar como indicativa de daño hepático, independientemente de que permanezcan en niveles “normales” [26] o se encuentren elevadas en el órgano en cuestión [114]. Cuando se estudiaron en el modelo experimental de daño hepático inducido por la administración de tetracloruro de carbono (CCl₄) en ratas, las actividades enzimáticas en suero sanguíneo y en el tejido hepático, se demostró que las actividades varían de acuerdo a la enzima estudiada [31], con un patrón de aparición determinado, en donde las enzimas consideradas “marcadoras” de localización mitocondrial, tardan más en aparecer que las enzimas que se encuentran en el citoplasma del hígado [91,114]. Por ejemplo, las actividades de las isoenzimas de la malato deshidrogenasa (MDH) y de la TGO, que aparecen en el medio de perfusión del hígado aislado, se derivan principalmente del citoplasma hepático y no de las isoformas mitocondriales [93,114]. Por lo tanto, la liberación de enzimas a partir de un órgano determinado puede depender de alteraciones en la integridad de las membranas plasmática, una disfunción mitocondrial y/o cambios probables en la regulación del volumen celular [34,104]; además, la tasa de liberación de una enzima dada también puede depender de la susceptibilidad del tipo de la célula hepática dañada en el “microambiente” celular del hígado [43,71].

En el caso de enfermedades hepáticas avanzadas, se encuentran valores altos de actividades séricas para la TGO y la TGP, y se dice que la relación TGO/TGP (*Ritis ratio*) está asociada al tipo de lesión hepática y/o a su progresión, lo que le confiere un valor pronóstico [10,104,107]. Del mismo modo, se ha sugerido que las variaciones plasmáticas de la GDH pueden reflejar necrosis celular, preferencialmente en la zona de la vena central de los lóbulos hepáticos [43]. En relación a la preservación de trasplantes, las actividades de la TGO y la de la LDH,

así como la producción de urea, parecen discriminar entre hígados viables y no-viables [55,108]; sin embargo, el que aumente la actividad de transaminasas durante la perfusión de un hígado potencialmente adecuado para trasplante, no significa necesariamente que el órgano se haya dañado durante la preservación [106].

En el caso del hígado de rata en regeneración inducida por una HP, hemos encontrado un patrón de liberación de enzimas a la circulación totalmente diferente a lo que se encuentra en modelos de regeneración inducidos por daño químico al hígado. A pesar de que los niveles séricos tanto de TGP como de TGO reflejan la progresión de la necrosis, que también se induce por la administración aguda de CCl₄ en ratas [50], se ha reportado una disociación entre el potencial proliferativo hepático y la salida masiva de enzimas del hígado necrótico. De hecho, en el modelo de daño hepático por CCl₄ se puede diferenciar la etapa de liberación de enzimas que corresponde a la necrosis masiva, de la etapa que representar una regeneración compensatoria del hígado [31]. Estos datos confirman que la magnitud del índice mitótico de los hepatocitos corre en paralelo con la extensión de la necrosis, mientras que los niveles séricos de TGP y de TGO aumentan más tempranamente sin una clara correlación con la necrosis o proliferación celular [56].

De manera muy importante, nuestro grupo de investigación encontró una predominancia en la liberación de enzimas que se localizan en la mitocondria (principalmente OTC y GDH) sobre aquellas consideradas “citoplásmicas” (LDH y TGP) en ratas sometidas a una hepatectomía del 70%, lo que contrasta con los modelos de regeneración hepática por daño químico. Esta situación “única” no se acompañó de una disminución de estas enzimas en el tejido hepático remanente después de la HP, excepto en el caso de la LDH [29]. Igualmente se encontró, que la magnitud de liberación enzimática depende de la cantidad del tejido removido; sin embargo, el porcentaje de la HP no afecta la predominancia de liberación de enzimas mitocondriales [29]. El aumento transitorio de enzimas liberadas a la sangre inducido por una HP, se conoce desde hace muchos años [5,7,12], pero recientemente se ha relacionado con una mayor mortalidad en ratas sometidas a

HP mayores del 70% [83]. Creemos que esta mortalidad está relacionada al aumento dramático en el flujo de la vena porta que se da al pasar la sangre portal a través de una masa hepática disminuida por la cirugía y esto, a su vez, induce la activación progresiva de las células de Kupffer en el hígado remanente y promueve la liberación de factores pro-inflamatorios [83,112]. Sin embargo, los trasplantes parciales de hígado se han hecho con éxito, pese al aumento abrupto de actividad sérica de TGP, la cual se normaliza progresivamente en la semana siguiente al trasplante [109]. Por lo tanto, a pesar de que las enzimas hepáticas se pueden liberar masivamente, esto no impide que se generen señales tempranas de regeneración que permitan la restauración exitosa de la masa hepática original [76,83].

Con base en esto, se ha dicho que la liberación de enzimas por parte del hígado en proliferación es un proceso selectivo, donde ocurre una predominancia clara en la salida de enzimas que se encuentran en el compartimiento mitocondrial hacia la circulación sistémica [29]. Esta liberación de enzimas hepáticas mitocondriales coincide con los picos de síntesis de DNA, en ausencia de alteraciones morfológicas evidentes *in vivo* [76] e *in vitro* [29]. En el trabajo de Díaz-Juárez et al. [29], se demostró que la liberación diferencial de enzimas por parte del hígado en regeneración se puede reproducir en modelos *in vitro* de hígado perfundido, solo variando la relación velocidad de flujo/masa hepática. Los efectos de aumentar el cociente flujo/masa sobre la liberación de enzimas fueron reversibles, además, se pudo incrementar la salida de enzimas hepáticas en órganos de animales controles, que mimetizaron parcialmente lo que ocurre en hígados provenientes de animales sujetos a una HP. También se demostró, en preparaciones *in vitro*, que una fracción muy importante de las enzimas liberadas no dependió de factores extra-hepáticos, sin que se observaran grandes alteraciones en la morfología hepática a pesar de que estos órganos fueron sometidos a perfusiones prolongadas [29]. La liberación de enzimas también se registró en rebanadas hepáticas y en hepatocitos aislados, aunque de magnitudes muy diferentes [29]. Estos efectos diferenciales en la liberación de enzimas coinciden con el hallazgo de que la actividad sérica de GDH aumenta mucho en muestras de animales con hepatectomía, mientras que en preparaciones *in vitro*

se libera muy poco. Esto se podría explicar si los niveles séricos de la GDH se remueven o eliminan lentamente en animales con HP, ya que se ha reportado una variabilidad grande en la vida media de las actividades séricas de enzimas diferentes [81]. Por otro lado, el hecho de que la liberación de enzimas sea parcialmente independiente de factores extra-hepáticos, indicaría la existencia de factores hepáticos locales de importancia en el control de este fenómeno [16]. Estos hallazgos permiten sugerir que las fuerzas mecánicas ejercen una influencia importante en la liberación de enzimas por parte de hígados sanos y de órganos en regeneración, donde las células endoteliales pueden ser las “dianas” de estas fuerzas mecánicas.

Esto último se comprobó con otro protocolo experimental donde se estudió la participación o papel del estrés por fricción (“shear stress”) al que están sometidas las células endoteliales de los vasos sanguíneos [28]. Aquí se demostró que la liberación de enzimas hepáticas “citoplásmicas” depende en gran medida de la entrada de calcio extracelular, probablemente a través de canales de calcio activados por estiramiento (“stretch-sensitive”). Además, de que la producción de NO también ejerce cierta regulación sobre la liberación de enzimas, principalmente en aquellas “mitocondriales”. Todo esto está fuertemente regulado por la magnitud de estrés por estiramiento, lo que se demostró a través de incrementar la viscosidad del medio de perfusión, que también afectó en una forma selectiva la liberación de las enzimas hepáticas que se determinaron en este estudio [28].

Lo anterior concuerda con lo que se ha visto en relación a la liberación de enzimas hepáticas durante el proceso de regeneración en ratas, liberación que se asocia más frecuentemente con periodos de isquemia, reperfusión y cambios hemodinámicos. Por ejemplo, cuando se inducen periodos cortos de isquemia en el hígado durante la proliferación, se promueve la aparición de niveles altos de actividades séricas de la TGP y de la TGO, pero sin afectar la capacidad regenerativa del hígado [68]. De aquí, que exista un mecanismo dependiente de los cambios de presión del flujo que controla parcialmente la liberación de enzimas, y que sea el responsable de traducir las señales que ejercen las fuerzas físicas sobre el endotelio y otras estructuras hepáticas (parénquima) como una

función, conocida como “mecano-transducción”, donde el estrés por estiramiento es de importancia fundamental [57].

La mecano-transducción regula muchos procesos fisiológicos en mamíferos que incluyen el control de la presión sanguínea, así como respuestas al estiramiento de varios órganos vascularizados [59]. Esta fuerza mecánica de transducción puede regular, a través de señales bioquímicas intracelulares en las células endoteliales, eventos como el control del flujo sanguíneo en el riñón y la presión arterial involucrando muchas moléculas aún desconocidas [19].

Actualmente se conoce un número importante de eventos intracelulares que son “disparados” por el estrés de fricción y que induce el paso de un fluido. Estos, incluyen una estimulación directa a las proteínas trans-membranales en la superficie luminal de los vasos sanguíneos, activación de canales iónicos, movilización de calcio intracelular y producción de NO [2]. El estrés mecánico se traduce a lo largo de los elementos del cito-esqueleto, lo que produce cambios en las membranas de las células endoteliales, que actúan como mecano-receptores primarios en respuesta a la fricción [82]. Un posible papel que puede tener la mecano-transducción en la liberación de las enzimas hepáticas podría estar ligado a que, al incrementar la magnitud de estrés por fricción inducida por un flujo dado, dicha mecano-transducción regula la entrada de calcio a la célula y la producción de NO [28].

Las fuerzas de estiramiento aumentan la cantidad de calcio intracelular a través de los canales sensibles al calcio y, adversamente, forman especies reactivas de oxígeno (EROs), que podrían ser las responsables del daño celular [15]. Sin embargo, algunos estudios sugieren, que al aplicar una fuerza mecánica a las integrinas de membrana, se pueden activar los canales iónicos mecano-sensibles que participan en la modulación de la estructura del cito-esqueleto o en su contractilidad [38]. La producción de estrés por fricción laminar ejerce efectos anti-apoptóticos, anti-ateroscleróticos y anti-trombóticos en las células endoteliales, y la fuerza mecánica puede regular el desarrollo cardiaco, incluyendo apoptosis de

cardiocytes, electrical remodeling of the heart, as well as changes in gene expression and autocrine and paracrine effects [96].

Despite what has been stated, the question of why mitochondrial enzymes are released more than cytoplasmic enzymes in the rat liver during regeneration? remains unanswered. In relation to the mitochondria, there is sufficient evidence that indicates that mitochondrial function increases instead of being damaged during liver proliferation [44,51,80]. Therefore, if a possible mitochondrial damage induced by HP can be ruled out as the cause of the release of mitochondrial enzymes into the hepatic cytoplasm [40], the mechanisms involved in this phenomenon remain unknown. In this way, the present thesis work has been an experimental attempt to explain these autocrine and paracrine mechanisms.

For example, in the case of OTC, enzymatic activity increased almost twice after 24 h of 70% HP, remaining at this level at 48 h, which indicates a clear effect of 70% HP on enzyme expression and liver regeneration; however, both in controls and in hepatectomized animals, the activity of the enzyme in the hepatic tissue did not decrease after incubation; despite this, when measuring the kinetics of enzyme release into the medium, a little activity was observed at short times, which was more evident in animals with HP, although not significant. In the case of another mitochondrial enzyme, GDH, no increase in its enzymatic activity was observed as a result of 70% HP, although a discrete release into the medium was observed after incubation of the tissue. However, it has been demonstrated that there is a clear effect in samples of hepatectomized animals when increasing three times the hemodynamic flow by perfusion [29]. This discrepancy could be explained by the existence of possible "pools", or mature enzymes confined in some sub-cellular compartment, mainly vesicles, which also do not depend on *de novo* synthesis of the enzymes, since this phenomenon occurs, even when treating animals with cycloheximide, which is a well-known compound that inhibits protein synthesis in eukaryotic cells.

En el caso de las enzimas citoplásmicas, los resultados fueron muy diferentes. Por ejemplo, la actividad enzimática encontrada en el tejido hepático de la LDH después de la HP al 70% disminuye en relación a sus controles, siendo más evidente a las 24 h después de realizada la hepatectomía. Así mismo, la actividad de la enzima es liberada al medio a partir del tejido hepático en mayor proporción a ese tiempo. En cambio, la ARGasa, que es la enzima con mayor actividad en el tejido hepático, aumenta su actividad en hígado después de la HP, y muestra una clara salida del tejido hepático al medio después de su incubación. Por otro lado, la otra enzima considerada exclusiva de citoplasma hepático, la TGP, no muestra cambios significativos en su actividad después de la HP, pero sí es clara su liberación al medio de incubación, aunque esta no sea significativa estadísticamente. Estos datos apoyan a lo previamente reportado, sobre que la liberación de enzimas hepáticas citoplásmicas depende de la entrada de calcio extracelular, mientras que la producción de NO regula más la liberación de enzimas mitocondriales, como se demostró al usar bloqueadores de canales de calcio, así como inhibiendo la producción de NO [28].

En cuanto a los resultados encontrados en las enzimas del pulmón, estos contrastaron mucho con respecto al tejido hepático. En el pulmón de rata adulta encontramos una actividad muy baja de la enzima mitocondrial hepática OTC, similar a la reportada para pulmón de humanos adultos (4-4.2%), comparadas con las determinadas en sus correspondientes hígados [41]. En el tejido pulmonar de animales sometidos a HP aumentaron los niveles de la actividad de OTC 1.5 veces con respecto a los controles; se pudo observar liberación de esta actividad enzimática al medio de incubación, aunque no se observó disminución significativa en el tejido pulmonar después de ser incubado. La actividad de OTC pulmonar se libera también al medio de incubación de ratas controles, aunque en menor proporción. Estos resultados sugieren que el aumento observado en la actividad de OTC pulmonar en ratas que habían sufrido la HP70%, se debió a una "importación" de la OTC circulante en sangre, liberada a partir del hígado proliferante *in vivo*; además, pareciera que el proceso de regeneración hepática en la rata requiere de un cierto aumento de la OTC en el pulmón.

La ARGasa es una enzima citoplasmática muy importante por su relación con la inmunidad celular, involucrada en la proliferación celular al ser una fuente de ornitina para la síntesis de poliaminas y cuya presencia es muy importante en el hígado. Se ha reportado la presencia de la ARGasa tanto en pulmón de rata como el de humano [20,73]. Nuestros resultados nos muestran que el tejido pulmonar de animales controles liberó actividad de ARGasa al medio de incubación, a pesar de que esta liberación no fue estadísticamente significativa. La hepatectomía incrementa la actividad de la enzima pulmonar aún más que para el caso de la OTC (hasta 3.5 veces a las 24 post-cirugía) pero, a diferencia de lo que ocurrió con la OTC, la mayor liberación de la actividad de ARGasa al medio fue observado a las 48 h de haberse efectuado la HP. Tanto la OTC como la ARGasa son enzimas involucradas en el ciclo de la urea en hígado; de acuerdo a nuestros resultados, podemos proponer que ambas enzimas parecen liberarse con la misma temporalidad a la circulación sistémica, en el hígado de rata en regeneración. Sin embargo, parecería que en el pulmón no ocurre lo mismo, aunque se debe de considerar que los niveles de actividad para ambas enzimas son muy bajos en este tejido.

En el caso de la TGP, no se ha reportado esta actividad en el pulmón de rata, pero existe una actividad de TGP en células cancerosas de pulmón humano [14]. En nuestro modelo, pudimos detectar una considerable actividad de TGP en pulmón, la cual se libera en una proporción muy baja y la HP no tuvo efecto.

El pulmón de rata tiene una considerable actividad de TGO [64], como ocurre en otros tejidos además del hígado y corazón. En el caso del pulmón, se habla de una AST-1, que en un modelo de hipertensión pulmonar en rata, disminuye su expresión de manera paralela a la acumulación de colágena en el pulmón [64]. La liberación de esta enzima a partir del pulmón fue también muy pequeña y tampoco encontramos efecto de la HP en la liberación de su actividad enzimática en el tejido pulmonar.

En cuanto a las deshidrogenasas en el tejido pulmonar, se ha reportado que la LDH se sobre-expresa en tumores cancerosos de pulmón [110]. En este estudio, encontramos que la LDH se libera activamente del pulmón al medio de incubación; la HP al 70% incrementó su liberación a las 24 horas post-cirugía e, interesantemente, disminuyó su actividad a las 48 h en relación a su control, indicando que la actividad de la LDH pulmonar disminuye cuando el hígado está en proliferación; este hallazgo no podemos explicarlo y deberá ser investigado con mayor detalle. Proponemos dos posibles explicaciones: (1) se ha demostrado en investigaciones preliminares que el nivel de LDH aumenta en la mitocondria cuando el tejido hepático es sometido a una HP, por lo tanto la cantidad de enzima contenida en la mitocondria no es considerada en la determinación de actividad enzimática en tejido hepático y (2) la liberación post-HP de la LDH al suero podría contribuir a su disminución en el tejido en condiciones *in vivo*. La HP aumenta la liberación de LDH hacia la circulación *in vivo* y, aunque suponemos que dicho aumento en la actividad sérica de la LDH dependería del hígado remanente, no podemos descartar una participación del pulmón en este proceso.

Finalmente, el pulmón tiene una cantidad significativa de actividad de GDH involucrada en el metabolismo de amonio por el pulmón, aunque la principal ruta de destoxificación de este catión es la reacción de la glutamina sintetasa [23]. La GDH se liberó del pulmón control, aunque no fue estadísticamente significativo. La remoción quirúrgica de una parte del hígado, nuevamente disminuyó los niveles de la actividad enzimática, sin modificar la tasa de liberación de la actividad al medio de incubación.

En conjunto, estos datos muestran que un órgano como el pulmón puede liberar también actividad enzimática al torrente sanguíneo en forma diferencial.

De todas las enzimas estudiadas, tanto en hígado así como en el pulmón, la única actividad enzimática que se encuentra muy disminuida en el pulmón, es la de la OTC. Nuestra observación es que la presencia de esta enzima solo se eleva en el pulmón de las ratas sujetas a una HP y su liberación a partir de este órgano aumenta solo a las 24 horas post-cirugía. De aquí, suponemos que ese aumento

de actividad de OTC pulmonar es de origen hepático y la “importación” al pulmón es por vía sanguínea. Sin embargo, esta posibilidad abre la pregunta de ¿cómo una enzima catalíticamente activa pueda ser transportada al interior de un tejido, como el pulmón?

Durante la última década se ha confirmado que prácticamente todas las células son capaces de liberar paquetes de información con el potencial de regular el funcionamiento celular a larga distancia. Estos paquetes son secretados al espacio extracelular en forma de vesículas membranosas que contienen un repertorio de proteínas y moléculas de ARN determinado por la célula que las produce. El cargamento y concentración de las vesículas extracelulares se modifica drásticamente en casos de enfermedades crónicas y degenerativas. Puesto que las vesículas extracelulares modulan a distancia la función celular, es posible que la información contenida en las vesículas extracelulares pudiera iniciar procesos degenerativos en ciertos tejidos.

Una vesícula extracelular engloba a las partículas esferoides y membranosas que son liberadas al espacio extracelular por prácticamente todas las células procariontes y eucariontes [87]. Por su origen subcelular, las vesículas se han clasificado en exosomas, ectosomas (también conocidas como micropartículas o microvesículas) y cuerpos apoptóticos. Actualmente los tipos de vesículas que se consideran relevantes para el proceso de comunicación intercelular son los exosomas y los ectosomas. Los exosomas se generan por la invaginación de los denominados cuerpos multivesiculares que a su vez provienen de endosomas tempranos [48,86]. Los exosomas son secretados tras la fusión de los cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática. Dado su origen subcelular, los exosomas presentan un enriquecimiento de proteínas endosomales como las tetraspaninas (CD9, CD81 y CD63) y de lípidos como el colesterol, la esfingomielina, la ceramida y la fosfatidilserina [22]. De manera similar, los ectosomas presentan una composición lipídica y proteica más parecida a la membrana celular, ya que se forman a partir del desprendimiento de dominios de la membrana.

El método más convencional para su aislamiento es la centrifugación diferencial y ultra-centrifugación (100,000 a 200,000g), que permite obtener una colección de partículas que se les denomina vesículas extracelulares para referirse a todas las subpoblaciones de vesículas independientemente de su origen [66]. Los mecanismos de producción de los exosomas comprenden la maduración de los endosomas (organelos involucrados en el reciclamiento de componentes de membrana y degradación de proteínas), que se van acumulando como vesículas en su lumen. Algunas subpoblaciones de endosomas o cuerpos multivesiculares que contienen tetraspaninas y marcadores de endosomas tardíos son capaces de fusionarse con la membrana celular y liberar las vesículas al exterior [22]. En la movilización, reciclamiento y fusión de los cuerpos multivesiculares a la membrana plasmática, están involucradas proteínas de las familias Rab, SNARE y SNAP. Aunque se ha avanzado en el entendimiento de los mecanismos intracelulares que participan en la secreción de los exosomas, todavía no se conoce a cabalidad las vías de señalización que regulan su secreción en condiciones fisiológicas. De igual manera, tampoco se sabe qué determina que se liberen vesículas de compartimentos intracelulares o de la membrana plasmática y cómo varía esta proporción dependiendo del tipo celular.

Uno de los aspectos más sobresalientes de las vesículas extracelulares es que funcionan como vectores de moléculas de ARN (ARNmi, ARNm, ARNinc, ARNpi), lo cual les brinda el potencial de modificar la expresión genética, y por ende la funcionalidad, de las células receptoras [97,103]. Además, se han predicho por análisis bio-informáticos posibles secuencias de ARN que determinan su movilidad en vesículas extracelulares [9]. No obstante, sigue sin entenderse cómo se determina el contenido de una vesícula. Mucho menos se conoce las implicaciones funcionales que trae consigo un cambio en la composición molecular de las vesículas extracelulares para la fisiología general de un organismo. Sin embargo, el hecho de que las vesículas circulen en todos los fluidos corporales (sangre, saliva, orina, líquido sinovial, líquido biliar, leche, líquido cefalorraquídeo, etc.), hace suponer que juegan un papel primordial en la regulación de los procesos fisiológicos. Además, el estudio de las vesículas extracelulares ha adquirido gran relevancia clínica por su uso potencial en diagnóstico y terapia. Se

postula que la composición molecular de la vesícula pudiera reflejar diferentes estadios de una enfermedad y servir como monitor de la acción de algún tratamiento [77]. De igual manera, las vesículas extracelulares también participan en procesos homeostáticos tales como la coagulación, la angiogénesis, la respuesta inmune, el desarrollo embrionario, la reparación tisular y el mantenimiento de nichos de células troncales y calcificación ósea [49,111].

El estudio de la función de las vesículas en condiciones normales es un área en pleno desarrollo que al momento solo ha permitido la asociación de ciertos componentes de las vesículas con la regulación de algunos procesos biológicos. En un modelo de reparación hepática, las vesículas extracelulares derivadas de células madre del hígado aceleraron la recuperación morfológica y funcional en un proceso dependiente de la transferencia de ARN [52]. Un papel bien definido de las vesículas es su participación en procesos de mineralización del hueso. Las vesículas extracelulares contienen las enzimas y proteínas necesarias para promover la formación de cristales de hidroxiapatita; además, transportan BMP, VEGF y la sialoproteína de hueso, que en conjunto promueven la expresión de la fosfatasa alcalina y la formación de capilares en la placa de crecimiento [79].

De acuerdo a estos reportes, nosotros planteamos que existe la posibilidad de que las enzimas hepáticas puedan ser transportadas en estas partículas lipídicas, los exosomas, lo cual explicaría mucho de los hallazgos en relación a los mecanismos que controlan la importación y exportación de estas enzimas. La actividad enzimática presente en el medio de incubación de los tejidos hepático y pulmonar en las diferentes condiciones, fue comparada con una fracción de este medio donde se obtuvieron exosomas por ultra-centrifugación; los resultados obtenidos fueron muy interesantes. La actividad enzimática de OTC fue muy importante en los exosomas aislados del medio de incubación del tejido hepático, en las diferentes condiciones, mientras que en el pulmón la actividad observada en estas vesículas fue discreta. Estos resultados sugieren que de ser cierto que la OTC sea exportada del hígado al pulmón, posiblemente ocurra a través de una cubierta lipídica. En cuanto a la ARGasa, que es la enzima con mayor tasa de liberación hepática, mostró un alto porcentaje de exosomas, cuya mayor actividad fue

determinada en hígado en proliferación. Bajo estas mismas condiciones el pulmón no liberó enzimas particuladas, por lo que postulamos que el contenido de ARGasa en tejido pulmonar está relacionado a la exportación desde el hígado y que esta ARGasa no se libera a partir del pulmón, más que en forma soluble.

La LDH mostró salida de enzima particulada a partir del tejido hepático y, al igual que la ARGasa, no mostró precipitación alguna en tejido pulmonar, lo que quiere decir que su salida es en forma soluble. La GDH, por su parte, presentó un alto porcentaje de actividad enzimática particulada en muestras control, con respecto al hígado en proliferación; en cambio el pulmón presenta un patrón contrario en el cual la HP aumenta la particulación de GDH en el medio. Estos datos pueden indicar que cuando hay una inducción de proliferación en el hígado, el pulmón en "repuesta" puede contribuir al aumento en suero de GDH.

La TGO en tejido hepático liberó un pequeño porcentaje de enzima particulada al medio, donde la mayor cantidad se obtuvo a partir de rebanadas de hígado de animales control. En cuanto al tejido pulmonar, la TGO sorprendentemente liberó un alto porcentaje de actividad enzimática particulada. La actividad de la otra transaminasa evaluada, la TGP, no pudo ser observada en la fracción particulada ni en el pulmón ni en el hígado, lo cual nos indica que la enzima liberada en el medio es mayormente soluble.

En general, en este estudio encontramos que la mayoría de las enzimas hepáticas estudiadas salen en una gran proporción en forma particulada, lo que indica que están localizadas en los exosomas. En el caso del pulmón, las pocas enzimas liberadas a partir de este órgano, se encuentran de manera "soluble". Esta discrepancia podría explicarse en el hecho de que las enzimas hepáticas se liberan en dos estados, uno soluble y otro "particulado", siendo este último el que, por mecanismos aún desconocidos, pudiese atravesar las membranas celulares y alcanzar órganos a distancia.

A pesar de que existe la idea de que la liberación de enzimas por parte del hígado podría ser un mecanismo de señalización a distancia, se requiere aún de mucho

trabajo para explorar estas posibilidades que abren por completo un nuevo campo de investigación en el área de la biología celular y la fisiología.

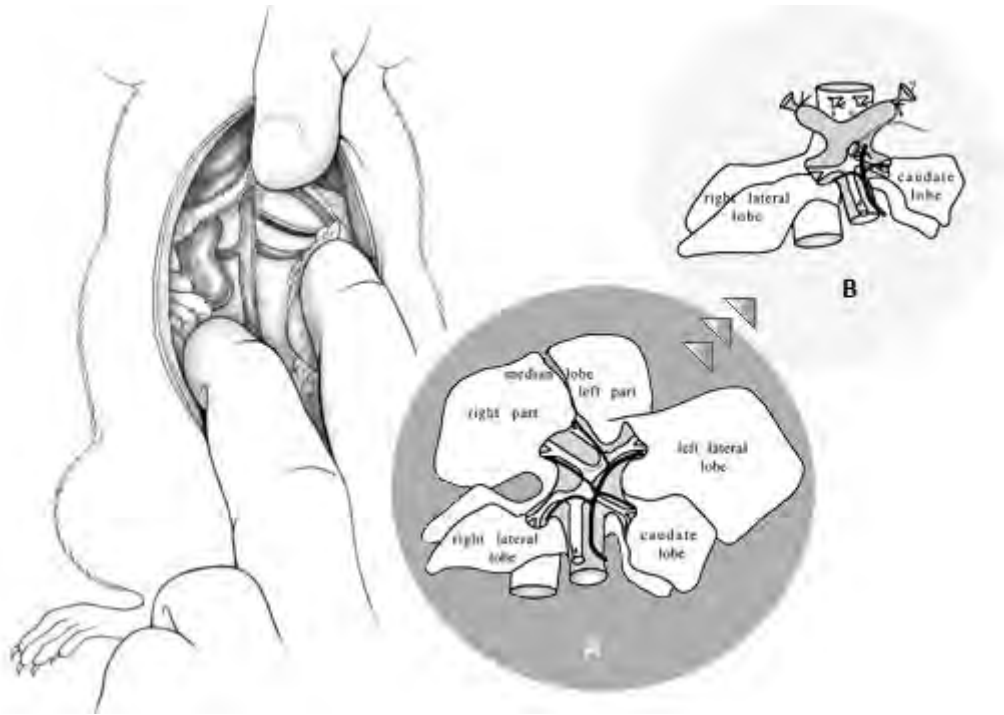
CONCLUSIONES

- ▶ Se demostró que el tejido hepático libera actividad enzimática a través de un mecanismo independiente del flujo de perfusión. Además, las enzimas de localización mitocondrial presentan tasas mayores de liberación que las citoplásmicas.
- ▶ Se observó que la liberación de la actividad enzimática es aún mayor en el hígado en regeneración posterior a hepatectomía parcial. Este efecto fue transitorio, puesto que a las 48 horas posteriores a la cirugía, no hubo ya diferencias entre hígados proliferantes y aquellos quiescentes (controles).
- ▶ En comparación, el pulmón de la rata mostró una discreta liberación de actividad enzimática (después de incubación *in vitro*), a pesar de poseer actividades significativas de la mayoría de las enzimas estudiadas.
- ▶ El pulmón normal de rata adulta presentó actividad muy baja de OTC, la cual se incrementó en muestras de animales hepatectomizados. Esto nos hace suponer que la OTC encontrada en pulmón tuvo su origen hepático y se importó al pulmón por vía sanguínea.
- ▶ Las enzimas hepáticas se liberan en dos estados o situaciones, solubles o particuladas, presumiblemente en exosomas. De aquí que consideramos que algunas enzimas hepáticas pueden alcanzar y ser incorporadas por otros órganos cuando se transportan a través de dichos exosomas.
- ▶ Se encontró una actividad específica relativamente alta en los precipitados del medio de incubación, lo que refuerza la idea de que ese confinamiento de enzimas hepáticas en exosomas tiene una función fisiológica como parte de un nuevo mecanismo de señalización inter-órganos.

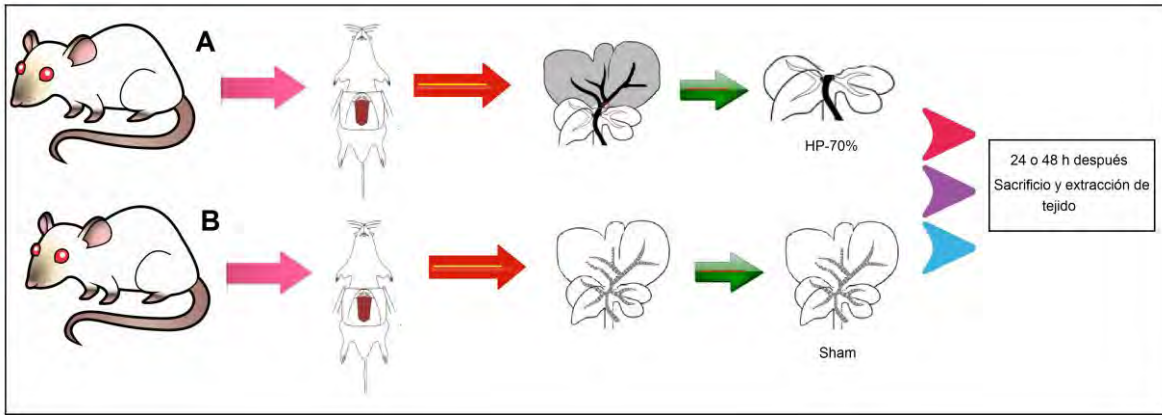
PERSPECTIVA

- ▶ Demostrar que las enzimas liberadas del hígado se incorporan en el pulmón, preferencialmente o únicamente en su forma particulada.
- ▶ En caso de conseguir lo anterior, estudiar cambios del metabolismo pulmonar como consecuencia de importar enzimas catalíticamente activas que en condiciones normales no se encuentran en este tejido.
- ▶ Comparar la expresión de algunas enzimas como la OTC y la ARGasa tanto en hígado control como bajo condiciones de proliferación, y contrastarla con su expresión en los pulmones de los mismos animales.
- ▶ Aislar y “purificar” los exosomas, para caracterizar que otros componentes moleculares acompañan a las enzimas liberadas, buscando en particular factores de crecimiento y citocinas.

ANEXO



Hepatectomía parcial del 70% con exclusión previa de los lóbulos eliminados. (A) Hígado normal de rata diferenciado en los lóbulos medianos y laterales izquierdos que se elevan hacia la cabeza de la rata, para descubrir los lóbulos lateral derecho y caudado. El árbol biliar, la arteria hepática y la vena porta están expuestos en el hilio del hígado. (B) Las venas que irrigan a los lóbulos mediales y lateral izquierdo son ligadas. Posteriormente los lóbulos son disecados y removidos, para finalmente cerrar la abertura por planos [120].



Procedimiento quirúrgico en sujetos experimentales. (A) HP-70%: Incisión abdominal en rata Wistar y remoción de lóbulos mediales y lateral izquierdo. (B) Sham: Incisión abdominal, sin remover ningún lóbulo del hígado [121].

REFERENCIAS

1. A. Kossel, H. D. Darkin (1904), *Über die arginase*. Biol. Chem. (41): 321-331.
2. Adamek N, Coluccio LM, Geeves MA (2008). *Calcium sensitivity of the cross-bridge cycle of Myo 1c, the adaptation motor in the inner ear*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A (105): 5710-5715.
3. Agreda VS (1992). *Manual de embriología y anatomía general*. España, Valencia. Editorial Servei de publicacions: Universitat de València. 1ª edición, pág. 735-743.
4. Alejandra G. Miranda Díaz, José M. Hermosillo Sandoval, Gonzalo Huerta-Rosas, Germán G. López Guillén, Ernesto G. Cardona Muñoz, Trinidad García Iglesias, et al (2010). *El comportamiento del factor de necrosis tumoral alfa e interleucina 6 en lesiones de vías biliares*. Rev. Med. Chile (138): 1259-1263.
5. Almersjö O, Bengmark S, Hafström LO, Olsson R (1969). *Enzyme and function changes after extensive liver resection in man*. Ann. Surg. (169): 111-119.
6. Argüello Arias y Pedro T (2004). *Resección del lóbulo caudado: reporte de un caso y revisión de técnicas quirúrgicas*, Rev. Colomb. Cirug. (19): 65-67.
7. Aronsen KF, Ericsson B, Pihl B (1969). *Metabolic changes following major hepatic resection*. Ann. Surg. (169): 102-110.
8. Barrett KE (2014). *Series Lange Physiology: Gastrointestinal physiology*. U.S.A. Editorial McGraw Hill. 2ª edición, cáp. 10.
9. Batagov AO, Kuznetsov VA, Kurochkin IV (2011). *Identification of nucleotide patterns enriched in secreted ARNs as putative cis-acting elements targeting them to exosome nano-vesicles*. BMC Genomics. (12 Suppl) 3:S18. doi: 10.1186/1471-2164-12-S3-S18.

10. Batt AM, Ferrari L (1995). *Manifestations of chemically induced liver damage*. Clin. Chem. (41): 1882-1887.
11. Baynes JW, Dominiczak MH (2011). *Bioquímica Médica*. España, Barcelona, Editorial Elsevier. 3ª edición, pág. 33 y 389-395.
12. Bengmark S, Engevik L, Olsson R (1968). *Changes in ornithine carbamoyl transferase activity in serum and in liver after partial hepatectomy in rats*. Scand. J. Gastroenterol. (3): 264-266.
13. Bennington JL (1991). W.B. Saunders Company: *Diccionario enciclopédico del laboratorio clínico*. España, Barcelona. Editorial Médica Panamericana, 1ª edición, pág. 55.
14. Beuster G, Zarse K, Kaleta C, Thierbach R, Kiehntopf M, Steinberg P, Schuster S, Ristow M (2011). *Inhibition of alanine aminotransferase in silico and in vivo promotes mitochondrial metabolism to impair malignant growth*. J. Biol. Chem. (286): 22323-22330.
15. Borle AB, Barsic M (1995). *Chemical hypoxia increases cytosolic Ca²⁺ and oxygen free radical formation*. Cell Calcium (17): 307-315.
16. Bradham CA, Schemmer P, Stachlewitz RF, Thurman RG, Brenner DA (1999). *Activation of nuclear factor-kappaB during orthotopic liver transplantation in rats is protective and does not require Kupffer cells*. Liver Transplant. Surg. (5): 282-293.
17. Brunicaudi FC, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Matthews JB, Pollock RE (2015). *Principles of surgery*. U.S.A. Editorial McGraw-Hill. 10ª edición, cáp. 31.
18. Castillo-Rodríguez F, Roldan-Ruiz MD, Blasco-Plá R, Caballero-Domínguez MJ, Caballero-Domínguez FJ, Moreno-Romero C, et al. (2005).

- Biotecnología Ambiental*. España, Madrid. Editorial Tébar. 1ª edición, pág. 177.
19. Chachisvilis M, Zhang YL, Frangos JA (2006). *G protein-coupled receptors sense fluid shear stress in endothelial cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (103): 15463-15468.
20. Cho JS, Oh YJ, Kim OS (2015). *The effects of arginase inhibitor on lung oxidative stress and inflammation caused by pneumoperitoneum in rats*. BMC Anesthesiol. (15): 129.
21. Colombo J. P., Konarska L. (1985). *Arginase*. In: Bergmeyer H V, editor. *Methods of enzymatic analysis II*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier; pág. 285–294.
22. Colombo M, Raposo G, Théry C (2014). *Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. (30): 255-289.
23. Cooper A.J., Freed BR (2005). *Metabolism of [13N] ammonia in rat lung*. Neurochem. Int. (47): 103-118.
24. Cristancho-Gómez W (2008). *Fisiología respiratoria: lo esencial en la práctica clínica*. Colombia, Bogotá. Editorial manual moderno. 2ª edición, pág 29-30.
25. Crowley LV (2014). *Essential of human disease*. U.S.A. New York. Editorial Burdlington, MA: Jones & Bartlett. 2nd edición, pág. 378.
26. Curtis SJ, Mortiz M, Snodgrass PJ (1972). *Serum enzymes derived from liver cell fractions. I. The response to carbon tetrachloride intoxication in rats*. Gastroenterology (62): 84-92.
27. Devlin TM (2004). *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*. España, Barcelona. Editorial Reverté, S.A. 4ª edición, pág. 1074.

28. Díaz-Juárez J, Hernández-Muñoz R (2011). *The role of calcium and nitric oxide during liver enzyme release induced by increased physical forces as evidenced in partially hepatectomized rats*. Liver Transpl. (17): 334-343.
29. Díaz-Juárez J, Rivera-Valerdi L, Bernal-Cerrillo DE, Hernández-Muñoz R (2006). *Predominance of released mitochondrial enzymes by partial hepatectomy-induced rat regenerating liver is controlled by hemodynamic changes and not related to mitochondrial damage*. Scand. J. Gastroenterol. (41): 223-233.
30. Díaz-Portillo J, Fernández del Barrio MT, Paredes Salido F (1996). *Actos básicos de bioquímica clínica*. España, Madrid. Editorial Díaz de Santos, 1ª edición, pág. 103-104.
31. Dinman BD, Bernstein IA (1968). *Acute carbon tetrachloride hepatotoxicity. Enzymatic activity and structural concomitants during the regenerative phase*. Arch. Environ. Health (16): 777-786.
32. Dixon M, Webb EC, Thorne CJ, Tipton KF (1979). *Enzymes*. Gran Bretaña. Editorial Lonfman. 3a edición, pág. 282-284.
33. Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB (2000). *Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests*. Clin. Chem. (46): 2027-2049.
34. Fievet CJ, Gigandet MP, Ansel HC (1971). *Hemolysis of erythrocytes by primary pharmacologic agents*. Am. J. Hosp. Pharm. (28): 961-966.
35. Fox SI (2011). *Fisiología humana*. U.S.A., New York. Editorial McGraw Hill. 12ª edición, pág 108, 525-532 y 628-633.
36. García-Rodríguez JA, López-Sánchez C (2001). *Manual de estudios sobre alcohol*. España, Madrid. Editorial EDAF, 1ª edición, pág. 54-55.

37. Geneser F, Brüel A, Christensen EI, Trandum-Jensen J, Qvortrup K (2015). *Histología*. Editorial médica panamericana. Ciudad de México. 4ª edición, pág. 519.
38. Glogauer M, Arora P, Yao G, Sokholov I, Ferrier J, McCulloch CA (1997). *Calcium ions and tyrosine phosphorylation interact coordinately with actin to regulate cytoprotective responses to stretching*. J. Cell Sci. (110): 11-21.
39. Gomella LG, Haist SA (2007). *Clinician's Pocket Reference: The Scut Monkey*. U. S. A. McGraw-Hill Companies. 11ª edición, cáp. 4.
40. Greco M, Moro L, Pellicchia G, Di Pede S, Guerrieri F (1998). *Release of matrix proteins from mitochondria to cytosol during the prereplicative phase of liver regeneration*. FEBS Lett. (427): 179-182.
41. Greengard O, Herzfeld A (1977). *The undifferentiated enzymic composition of human fetal lung and pulmonary tumors*. Cancer Res. (37): 884-891.
42. Grippi MA, Elias JA, Fishman JA, Kotloff RM, Pack AI, Senior RM, et al. (2015). *Fishman's Pulmonary diseases and disorders*. U.S.A. Editorial McGraw Hill education. 5ª edición, pág. 620-640.
43. Guder WG, Habicht A, Kleissl J (1975). *The diagnostic significance of liver cell inhomogeneity: serum enzymes in patients with central liver necrosis and the distribution of glutamate dehydrogenase in normal human liver*. [in German, English summary]. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. (13): 311-318.
44. Guerrieri F, Pellicchia G, Lopriore B, Papa S, Esterina Liquori G, Ferri D, Moro L, Marra E, Greco M (2002). *Changes in ultrastructure and the occurrence of permeability transition in mitochondria during rat liver regeneration*. Eur. J. Biochem. (269): 3304-3312.
45. Guyton AC (2008). *Tratado de fisiología médica*. España, Barcelona. Editorial Elsevier. 11ª edición, pág. 471-472, 855.

46. Hamilton WJ (1983). *Anatomía Humana*. México. Publicaciones culturales. 1ª edición, pág. 403.
47. Hammer GD, McPhee SJ (2014). *Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine*. U.S.A. Editorial McGraw-Hill Companies. 7ª edición, cáp. 14
48. Harding C, Heuser J, Stahl P (1983). *Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes*. J. Cell Biol. (97):329-339.
49. Hergenreider E, Heydt S, Tréguer K, Boettger T, Horrevoets AJ, Zeiher AM, Scheffer MP, Frangakis AS, Yin X, Mayr M, Braun T, Urbich C, Boon RA, Dimmeler S (2012). *Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs*. Nat. Cell Biol. (14):249-256.
50. Hernández-Muñoz R, Glender W, Díaz-Muñoz M, García-Sáinz JA, Chagoya de Sánchez V (1984). *Effects of adenosine on liver cell damage induced by carbon tetrachloride*. Biochem. Pharmacol. (33): 2599-2604.
51. Hernández-Muñoz R, Sánchez-Sevilla L, Martínez-Gómez A, Dent MA (2003). *Changes in mitochondrial adenine nucleotides and in permeability transition in two models of rat liver regeneration*. Hepatology (37): 842-851.
52. Herrera MB, Fonsato V, Gatti S, Deregibus MC, Sordi A, Cantarella D, Calogero R, Bussolati B, Tetta C, Camussi G (2010). *Human liver stem cell-derived microvesicles accelerate hepatic regeneration in hepatectomized rats*. J. Cell Mol. Med. 14(6B):1605-1618.
53. Higgins GM, Anderson RM (1931). *Experimental pathology of the liver: restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal*. Arch. Pathol. (12): 186-202.
54. Hiroshi Murayamaa, Masaki Ikemotob, Yoshihiro Fukudab y Atsuo Nagataa (2008). *Superiority of serum type-I arginase and ornithine carbamyltransferase in the detection of toxicant-induced acute hepatic injury in rats*. Clin. Chim. Acta (391): 31-35.

55. Lu S, Harvey PR, Makowka L, Petrunka CN, Ilson RG, Strasberg SM (1987). *Markers of allograft viability in the rat*. *Transplantation* (44): 562-569.
56. Kanta J, Bartos F (1991) *Relationship of liver damage and liver regeneration after carbon tetrachloride treatment in rats*. *Sb. Ved. Pr. Lek. Fak. Karlovy Univerzity Hradci Kralove* (34): 237-242.
57. Karwatowska-Prokopczuk E, Ciabattini G, Wennmalm A (1989). *Effects of hydrodynamic forces on coronary production of prostacyclin and purines*. *Am. J. Physiol.* (256): H1532-H1538.
58. Krebs HA, Henseleit K *Urea Formation in Animal Organism*. *Biol. Chem.* (210): 33-66.
59. Kung C (2005). *A possible unifying principle for mechanosensation*. *Nature* (436): 647-654.
60. LaDou J, Harrison RJ (2014). *Current Diagnosis & Treatment: Occupational & Environmental Medicine*. U. S. A. Editorial McGraw-Hill Education. 5ª edición, cáp. 25.
61. Laposata M (2014). *Laboratory Medicine: The Diagnosis of Disease in the Clinical Laboratory*. U.S.A. Editorial McGraw-Hill Education. 2ª edición, cáp. 16.
62. LeBlond RF, Brown DD, Suneja M, Szot JF (2015). *DeGowin's Diagnostic Examination*. U.S.A. McGraw-Hill Education. 10ª edición, cáp. 18.
63. Lehninger, David L. Nelson y Michael M. Cox (2015). *Principios de Bioquímica*. U.S.A. Ediciones Omega. 6ª edición, pág 200-204, 696-709, 833 y 852.
64. Liu J, Yu W, Liu Y, Chen S, Huang Y, Li X, Liu C, Zhang Y, Li Z, Du J, Tang C, Du J, Jin H (2016). *Mechanical stretching stimulates collagen synthesis via down-regulating SO2/AAT1 pathway*. *Sci. Rep.* 16;6:21112. doi: 10.1038/srep21112.

65. Long MS (2004). *Lo esencial en aparato digestivo*. España, Madrid. Editorial Elsevier. 2ª edición, pág. 57-63.
66. Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Di Vizio D, Gardiner C, Gho YS, Kurochkin IV, Mathivanan S, Quesenberry P, Sahoo S, Tahara H, Wauben MH, Witwer KW, Théry C (2014). *Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles*. J. Extracell. Vesicles 22;3:26913. doi: 10.3402/jev.v3.26913.
67. Martínez-Poveda B (2006). *Metaloproteinasas de la matriz extracelular como dianas antineoplásicas*. Revista encuentros en la biología, (1): No. 108.
68. Maruyama H, Harada A, Kurokawa T, Kobayashi H, Nonami T, Nakao A, Takagi H (1995). *Duration of liver ischemia and hepatic regeneration after hepatectomy in rats*. J. Surg. Res. (58): 290-294.
69. Masuda Y, Shimizu A, Mori T, Ishiwata T, Kitamura H, Ohashi R, et al. (2001). *Vascular endothelial growth factor enhances glomerular capillary repair and accelerates resolution of experimentally induced glomerulonephritis*. Am. J. Pathol. (159): 599-608.
70. Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG (2002). *Bioquímica*. España, Madrid. Editorial Pearson Addison Wesley. 3ª edición, pág 799-817.
71. Miyake S (1979). *The mechanism of release of hepatic enzymes in various liver diseases. Altered activity ratios of GOT and GPT in serum and liver of patients with liver diseases*. Acta Med. Okayama (33): 343-358.
72. Möller-Bredo R, Vazquez-Odo N (2011). *Anatomía del hígado de rata Wistar*, Int. J. Morphol. (29): 76-79.
73. Monin L, Griffiths KL, Lam WY, Gopal R, Kang DD, Ahmed M, Rajamanickam A, Cruz-Lagunas A, Zúñiga J, Babu S, Kolls JK, Mitreva M, Rosa BA, Ramos-Payan R, Morrison TE, Murray PJ, Rangel-Moreno J,

- Pearce EJ, Khader SA (2015). *Helminth-induced arginase-1 exacerbates lung inflammation and disease severity in tuberculosis*. J. Clin. Invest. (125): 4699-4713.
74. Montoya de Lira H, Panduro-Cerda A (1996). *Mecanismos de regeneración hepática*. Revista de investigación y ciencia, (17): 40-41.
75. Moore KL, Dalley II AF (2002). *Anatomía con orientación clínica*. U.S.A., Baltimore. Editorial médica panamericana. 4ª edición, pág 96-116.
76. Morales-González JA, Gutiérrez-Salinas J, Yáñez L, Villagómez-Rico C, Badillo-Romero J, Hernández-Muñoz R (1999). *Morphological and biochemical effects of a low ethanol dose on rat liver regeneration: role of route and timing of administration*. Dig. Dis. Sci. (44): 1963-1974.
77. Müller G (2012). *Microvesicles/exosomes as potential novel biomarkers of metabolic diseases*. Diabetes Metab. Syndr. Obes. (5): 247-282.
78. Murayama H, Ikemoto M, Fukuda Y, Tsunekawa S, Nagata A (2007). *Serum level of ornithine carbamoyltransferase is influenced by the state of Kupffer cells*. Clin. Chim. Acta (380): 170-174.
79. Nahar NN, Missana LR, Garimella R, Tague SE, Anderson HC (2008). *Matrix vesicles are carriers of bone morphogenetic proteins (BMPs), vascular endothelial growth factor (VEGF), and noncollagenous matrix proteins*. J. Bone Miner. Metab. (26): 514-519.
80. Nishihira T, Tanaka J, Nishikawa K, Jikko A, Taki Y, Morimoto T, Koizumi K, Kamiyama Y, Ozawa K, Tobe T (1986). *Biological significance of enhanced mitochondrial membrane potential in regenerating liver*. Hepatology (6): 220-224.
81. Pagani F, Panteghini M (2001). *Biological variation in serum activities of three hepatic enzymes*. Clin. Chem. (47): 355-356.
82. Pahakis MY, Kosky JR, Dull RO, Tarbell JM (2007). *The role of endothelial*

- glycocalyx components in mechanotransduction of fluid shear stress.* Biochem. Biophys. Res. Commun. (355): 228-233.
83. Panis Y, McMullan DM, Emond JC (1997). *Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection.* Surgery (118): 142-149.
84. Passonneau JV (1993). *Enzymatic Analysis.* U.S.A., Washington D.C. The Humana Press. 1a edición, pág. 258-259 y 281-282.
85. Patel TB, Olson MS (1985). *A reexamination of the role of the cytosolic alanine aminotransferase in hepatic gluconeogenesis.* Arch. Biochem. Biophys. (240):705-711.
86. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ (1996). *B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles.* J. Exp. Med. (183): 1161-1172.
87. Raposo G, Stoorvogel W (2013). *Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends.* J. Cell. Biol. (200): 373-383.
88. Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA (2015). *Harper's Illustrated Biochemistry.* U.S.A. Editorial McGraw-Hill Education. 30ª edición, pág. 265-271.
89. Romert P, Matthiessen ME, Quistorff B (1990). *Ultrastructural changes of liver parenchyma following digitonin-pulse perfusion of rat liver.* Cell Tissue Res. (261): 423-430.
90. Ross MH, Pawlina W, Barnash TA (2012). *Atlas de Histología Descriptiva.* España, Barcelona. Editorial médica panamericana, 1ª edición, pág. 624-630.
91. Ruggiero G (1973). *Rate of release of cytoplasmic and mitochondrial enzymes from the isolated and perfused rat liver treated with phalloidin.* J. Lab. Clin. Med. (82): 695-703.

92. Sargent S (2009). *Liver diseases: an essential guide for nurses and health care professionals*. Reino Unido, Chichester. Editorial Wiley-Blackwell a John Wiley & Sons. 1ª edición, pág. 8-10.
93. Schmidt E, Schmidt FW (1967). *Release of enzymes from the liver*. Nature (213): 1125-1126.
94. Segarra E (2006). *Fisiología de los aparatos y sistemas*. España, Cuenca. Editorial Universidad de Cuenca: Facultad de ciencias médicas. 1ª edición, pág. 98, 102-104.
95. Shabalin IG, Porebski PJ, Cooper DR, Grabowski M, Onopriyenko O, Grimshaw S, Savchenko A, Chruszcz M, Minor W (2012). *Structure of anabolic ornithine carbamoyltransferase from Campylobacter jejuni at 2.7 Å resolution*. Struct. Biol. Commun. (68): 1018-1024.
96. Shyu KG (2009). *Cellular and molecular effects of mechanical stretch on vascular cells and cardiac myocytes*. Clin. Sci. (Lond.) (116): 377-389.
97. Sinnatamby CS (2003). *Anatomía de Last: regionada y aplicada*. España, Barcelona. Editorial Paidotribo. 10ª edición, pág. 253-255.
98. Silverthorn DU (2007). *Fisiología Humana: un enfoque integrado*. España, Madrid. Editorial médica panamericana. 4ª edición, pág. 560-580.
99. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT Jr, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO (2008). *Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers*. Nat. Cell Biol. (10): 1470-1476.
100. Smrekova R, Vajdova K, Kukan M, Ulicna O, Lutterova M, Wsolova L (2000). *A rapid, simple, and cost-effective method for screening liver preservation solutions in the rat*. Transplantation (70): 430-436.

101. Stern SD, Cifu AS, Altkorn D (2015). *Symptom to Diagnosis: An Evidence-Based*. U.S.A. McGraw-Hill Education. 3ª edición, cáp 26.
102. Thews G, Mutschler E, Vaupel P, Núñez A (1983). *Anatomía, fisiología y patofisiología del hombre*. España, Barcelona. Editorial Reverté, 1ª edición, pág. 395.
103. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO (2007). *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nat. Cell Biol. (9): 654-659.
104. Verrill HL, Pickard NA, Gruemer HD (1977). *Mechanism of cellular enzyme release. I. Alterations in membrane fluidity and permeability*. Clin. Chem. (23): 2219-2225.
105. Voet D, Voet JG, Pratt CW (2007). *Fundamentos de Bioquímica: La vida a nivel molecular*. España, Barcelona. Editorial médica panamericana, 2ª edición, pág. 312-323, 528.
106. Weber M, Bircher J, Hacki W, Strebel H, Scholl E, Pedrinis E (1973). *Substitution of the liver: III. Functional capacity of the homologously perfused pig livers*. Biomedicine (18): 304-310.
107. Wilkinson JH (1970). *Clinical significance of enzyme activity measurements*. Clin. Chem. (16): 882-890.
108. Woods HF, Krebs HA (1971). *Lactate production in the perfused liver*. Biochem. J. (125): 129-139.
109. Xia R, Emond JC (1993). *Orthotopic partial liver transplantation in the rat: a model of 70% hepatectomy and reduced size liver transplantation*. Transplantation (56): 1041-1043.
110. Xie H, Hanai J, Ren JG, Kats L, Burgess K, Bhargava P, Signoretti S, Billiard J, Duffy KJ, Grant A, Wang X, Lorkiewicz PK, Schatzman S, Bousamra M, Lane AN, Higashi RM, Fan TW, Pandolfi PP, Sukhatme VP,

- Seth P (2014). *Targeting lactate dehydrogenase-A inhibits tumorigenesis and tumor progression in mouse models of lung cancer and impacts tumor-initiating cells*. Cell Metab. (19): 795-809.
111. Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colás E, Cordeiro-da Silva A, Fais S, Falcon-Perez JM, Ghobrial IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel M, Heegaard NH, Hendrix A, et al. (2015). *Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions*. J. Extracell. Vesicles 14;4:27066. doi: 10.3402/jev.v4.27066.
112. Zhong Z, Connor H, Mason RP, Qu W, Stachlewitz RF, Gao W (1996). *Destruction of Kupffer cells increases survival and reduces graft injury after transplantation of fatty livers from ethanol-treated rats*. Liver Transpl. Surg. (2): 383-387.
113. Zhou SL, Gordon RE, Bradbury M, Stump D, Kiang CL, Berk PD (1998). *Ethanol up-regulates fatty acid uptake and plasma membrane expression and export of mitochondrial aspartate aminotransferase in HepG2 cells*. Hepatology (27): 1064-1074.
114. Zimmerman HJ, Kodera Y, West M (1965). *Rate of increase in plasma levels of cytoplasmic and mitochondrial enzymes in experimental carbon tetrachloride hepatotoxicity*. J. Lab. Clin. Med. (66): 315-323.
115. Micheau M, Hoa D. Anatomía del abdomen y del sistema digestivo: ilustraciones.
<https://www.imaios.com/es/e-Anatomy/Torax-abdomen-pelvis/Sistema-digestivo-Ilustraciones> vista por última vez 30/08/2016.
116. http://www.spinreact.com/files/Inserts/Bioquimica/BEIS11_GPT-ALT_2014.pdf vista por última vez 30/08/2016
117. King M. The medical biochemistry page:

<http://themedicalbiochemistrypage.org/> vista por última vez 30/08/2016.

118. The Comprehensive Enzyme Information System.

<http://www.brenda-enzymes.org/> vista por última vez 30/08/2016

119. Páez X. Fisiología del sistema digestivo:

<http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/32942> vista por última vez 30/08/2016

120. Figura modificada de *A preclinical model of hepatocyte gene transfer: the in vivo, in situ perfused rat liver*, 2000.

http://www.nature.com/gt/journal/v7/n21/fig_tab/3301313f3.html vista por última vez 18/04/2017

121. https://www.researchgate.net/figure/5456525_fig5_Figure-1-The-rat-liver-before-and-after-PVL-and-PVE-A-Schematic-anatomy-of-the-rat vista por última vez 18/04/2017