

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR**

***PAPEL DEL FLUJO EN LA  
LIBERACIÓN DE ENZIMAS  
HEPÁTICAS DURANTE LA  
REGENERACIÓN DEL HÍGADO***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:**

***DOCTORA EN CIENCIAS***

**P R E S E N T A:**

***JULIETA ANABELL DÍAZ JUÁREZ***

**DIRECTOR: *DR. ROLANDO HERNÁNDEZ  
MUÑOZ***



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.

**El Comité Académico del Doctorado en Ciencias Biomédicas, designó  
como jurado para examen al grado de Doctor en Ciencias a:**

**Dr. Ruy Pérez Tamayo**

**Presidente**

**Dr. Edmundo Chávez Cossío**

**Vocal**

**Dra. Marina Macías Silva**

**Vocal**

**Dr. David Kershenobich Stalnikowitz**

**Vocal**

**Dra. Victoria Eugenia Chagoya Hazas**

**Vocal**

**Dra. Martha Franco Guevara**

**Vocal**

**Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz**

**Secretario**

*Prometeo, uno de los titanes, hijo de Iapeto y de Climene y hermano de Atlas, robó el fuego de los dioses para entregárselo a los hombres de arcilla que habitaban la húmeda y fría tierra. Zeus lo castigó haciendo que Vulcano lo atase a una roca donde todos los días bajaba un buitre que desgarraba el vientre y se alimentaba de su hígado. Durante la noche, cerraban las heridas y el hígado se regeneraba, asegurando al buitre un eterno alimento y a Prometeo un eterno suplicio.....*

*La realización, desarrollo y terminación de la investigación que a continuación  
presento no hubiese sido posible sin la existencia de dos instituciones con  
reconocimiento internacional en el área biomédica:*

*Instituto de Fisiología Celular*

*Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”*

*Gracias por existir y por apoyar a la generación de ideas con conocimiento científico*

El amar, el sentir y el proteger a un ser humano antes de verlo, de palparlo, de olerlo son funciones que solamente pueden ser percibidas en la generadora de la vida, es decir, en una madre.

Desde las células más ancestrales del ser humano en el momento de la concepción sufren cambios estructurales reflejados en funciones específicas y cambiantes.

Es imposible pensar en la existencia de la vida en una forma estática; el ser humano es un ser en constante regeneración no exclusiva del recambio celular, sino de sus experiencias de vida, de sus conocimientos, de su espíritu y de la percepción de la vida misma.

El ser humano estático o que genera cambios mínimos durante su vida puede considerarse que se encuentra en un estado de célula estacionaria, esperando la apoptosis y los seres que cambian caóticamente se consideran como una célula en crecimiento acelerado y neoplásico. Luego entonces, debe de existir un control regulado de estos cambios que a nivel celular siguen en estudio y seguirán por siempre, ya que dependen de factores externos, que no son accesibles a la mano del hombre y son gobernados por la naturaleza que rodea al ser humano.

Es por ello, que durante la realización de este trabajo me apasionó la idea de poder contribuir en una parte tan nutritiva de la información externa hacia los órganos y específicamente al hígado que es un órgano altamente irrigado por el flujo sanguíneo. Mis deseos más profundos es que quien lea estas líneas perciba a la regeneración celular como un concepto de vida y se deje a un lado la idea de *por qué es la vida* y se

intercambio por el *para qué* es la vida, los seres humanos estamos en este planeta para algo y ese algo es vivir y regenerarnos continuamente.

Espero que este trabajo sea la generadora de vida a más investigaciones.

Agradezco profundamente el apoyo incondicional a mi tutor, el Dr. Rolando Hernández Muñoz, quien con su sobresaliente trayectoria en el campo de la investigación fue posible la realización y culminación de este trabajo. En lo personal le agradezco que en todo momento mostró una actitud positiva, espiritual e intelectual al gran cambio de mi vida, que fue el ser madre.

A la Dra. Victoria Chagoya que con su experiencia académica fortaleció el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Rafael Villalobos por sus puntuales y adecuadas observaciones.

En cuando al concepto espiritual agradezco desde lo más entrañable de mis sentimientos a mis dos hijos: mi amada y sentimental hija Arizbell y mi adorado y cariñoso hijo Leoncio, los cuales nacieron durante mi formación doctoral y quienes me dieron toda la fuerza para vencer los obstáculos más impredecibles que sucedieron durante este período y que contribuyeron a ser lo que soy.

A mi hermana Beatriz y mis padres, quienes sin ellos en las condiciones que se me presentaron jamás podría haber concluído con este trabajo.

# ***INDICE***

	<b>Pág.</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>4</b>
<b>INDICE</b>	<b>7</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>13</b>
1) <b>ASPECTOS ANATOMOFISIOLÓGICOS DEL HÍGADO.</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>LOCALIZACIÓN ANATÓMICA</b></li> <li>• <b>MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA</b></li> <li>• <b>TIPOS CELULARES</b></li> <li>• <b>CIRCULACIÓN ARTERIAL Y VENOSA</b></li> </ul>	
2) <b>FUNCIONES CELULARES REGULADAS POR EL FLUJO SANGUÍNEO.</b>	<b>21</b>
<b>CARACTERÍSTICAS HEMODINÁMICAS DEL FLUJO SANGUÍNEO.</b> <b>FUERZAS ASOCIADAS AL FLUJO.</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>ENDOTELIO VASCULAR</b></li> <li>• <b>MECANOTRANSDUCCIÓN</b></li> </ul>	
3) <b>ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN EL HÍGADO</b>	<b>25</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>ENZIMAS DE LOCALIZACIÓN MITOCONDRIAL</b></li> <li>• <b>ENZIMAS DE LOCALIZACIÓN CITOPLASMÁTICA</b></li> </ul>	
4) <b>REGENERACIÓN HEPÁTICA</b>	<b>28</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>FACTORES MITÓGENOS</b></li> <li>• <b>FACTORES NO MITOGÉNICOS</b></li> </ul>	
5) <b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>33</b>



<b>6) HIPÓTESIS</b>	<b>37</b>
<b>7) OBJETIVOS</b>	<b>38</b>
<b>8) METODOLOGÍA</b>	<b>39</b>
<b>9) RESULTADOS</b>	<b>43</b>
<b>10) DISCUSIÓN</b>	<b>72</b>
<b>11) CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>81</b>
<b>12) PERSPECTIVA CLÍNICA</b>	<b>82</b>
<b>13) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>83</b>
<b>14) ANEXO I</b>	<b>93</b>
<b>5) ANEXO II</b>	<b>94</b>

## ***RESUMEN***

***INTRODUCCIÓN:*** El proceso de regeneración hepática es un claro ejemplo de crecimiento tisular controlado. A pesar de muchos años de estudiar a la regeneración hepática, el detalle de la naturaleza de los factores que controlan o disparan este fenómeno es desconocido. En el control del crecimiento tisular durante la regeneración hepática, la masa funcional tisular hepática total es un factor determinante y el estado estacionario de masa celular actúa de alguna manera en el compartimiento proliferativo para regular la producción celular. En teoría, se puede pensar que la masa celular normal es la responsable de mantener la concentración de algunas señales que inhiben la proliferación celular, o que un hígado con menos masa o células dañadas puede desencadenar la producción de factores o señales que activen la proliferación celular. Otro epifenómeno que se ha involucrado en el proceso de regeneración hepática es el flujo sanguíneo. Los hallazgos que apoyan un posible papel del flujo sanguíneo en el control de la regeneración hepática se basan en la observación consistente de un aumento en el flujo sanguíneo durante la regeneración hepática en diferentes modelos animales. Por otro lado, cuando se practica una hepatectomía parcial (HP) hasta del 70% de la masa hepática en ratas, los hepatocitos remanentes proliferan hasta restaurar la masa hepática inicial, a pesar de que se detecta un aumento dramático en las actividades séricas de enzimas que se consideran como órgano-específicas y, las cuales se han utilizado como marcadores proteicos para el diagnóstico de enfermedades hepáticas que conllevan necrosis celular. Aunque dicho aumento es “selectivo” y drástico, al parecer no se asocia a daño del tejido hepático en proliferación. Los mecanismos que controlan la liberación celular de enzimas hacia la sangre durante el proceso de proliferación hepática no se han explorado. En este trabajo propongo que la

liberación de enzimas hepáticas hacia el torrente sanguíneo después de una HP parcial pudiera ser controlada en parte por las fuerzas mecánicas generadas por el flujo sanguíneo, cuyo blanco es el endotelio vascular, en un proceso llamado mecano-transducción. **OBJETIVO:** Investigar la participación del flujo sanguíneo en la liberación de enzimas de origen hepático en el proceso de regeneración del hígado. Elucidar si el fenómeno de mecano-transducción está íntimamente ligado al control de la liberación hepática de enzimas a la sangre, manteniendo de éstas los niveles séricos muy estrechos (“normales”) y modulando su liberación en el endotelio vascular en respuesta al tejido faltante o funcionalmente dañado. **MÉTODOS:** Para esto, se utilizaron dos grupos experimentales: ratas macho de la cepa Wistar (250g de peso) a las que se les practicó una HP del 70% de la masa hepática, y sus respectivos controles que fueron sometidos al trauma quirúrgico, pero sin remover el hígado (“falsamente operadas”). Se midieron inicialmente por métodos espectrofotométricos convencionales la actividad de nueve enzimas en suero de los grupos experimentales, pero también se determinaron en efluentes durante la perfusión de hígados aislados, así como en el medio de incubación para rebanadas hepáticas y hepatocitos aislados. En otra serie de experimentos, utilizando los hígados perfundidos provenientes de los grupos experimentales, se evaluaron los papeles de incrementar la velocidad de flujo, el aumento en la magnitud del estrés por fricción (“shear”) al incrementar la viscosidad del líquido de perfusión, el efecto de modificar químicamente la integridad del glucocáliz de la capa endotelial, la dirección o vectorialidad de las fuerzas hidrostáticas aplicadas cambiando la orientación de la perfusión *in vitro*; así como la posible participación de cambios intra-celulares de calcio, de los canales iónicos activados por estiramiento ( CIAE ) y de la producción de óxido nítrico (NO). **RESULTADOS:** Posterior a una HP del 70% de la masa hepática, se encontró un aumento drástico en la

actividad sérica de enzimas, principalmente de aquellas reconocidas como de localización intramitocondrial del tejido hepático. En hígados aislados de estos animales, las enzimas hepáticas se liberaron de manera diferencial cuando se varió *in vitro* la relación flujo/masa hepática, al variar la magnitud y presión del flujo en los órganos aislados. Este evento fue completamente reversible y no se relacionó con alteraciones estructurales (histología) o funcionales (producción de urea), ni se encontró un aumento de lipoperoxidación en los tejidos aislados sujetos a una velocidad de flujo creciente. En rebanadas de hígado y en hepatocitos aislados se identificó un segundo mecanismo que no es dependiente del flujo sanguíneo. Además se encontró que la respuesta de la liberación de enzimas por el tejido hepático sujeto a un flujo impuesto, no es dependiente de factores extrahepáticos. Para caracterizar el primer mecanismo, dependiente del flujo, se demostró que requiere de síntesis *de novo* de proteínas, probablemente relacionadas a las membranas citoplasmáticas de las células endoteliales. El papel de fenómenos de mecano-transducción mediados por el endotelio, quedó evidenciado al aumentar la magnitud de estrés por fricción (aumentando la viscosidad del medio de perfusión), al eliminar los componentes de carbohidratos (ácido hialurónico, heparina, ácido siálico) de las glucoproteínas del glucocáliz endotelial, y al modificar la dirección de la perfusión del hígado (vena porta vs. vena cava). Además, se encontró que la liberación de enzimas hepáticas se controla en gran medida por la entrada de calcio, principalmente del medio extracelular, al parecer en una forma selectiva a través de los canales iónicos sensibles a “estiramiento”. La producción de NO jugó un papel menor en el control de la liberación de enzimas hepáticas.

**CONCLUSIÓN:** En animales sometidos a una HP del 70% de la masa, se produce una liberación masiva de enzimas hepáticas, tanto *in vivo* como *in vitro*, que no están relacionadas con necrosis celular, ni con alteraciones mitocondriales del tejido

remanente. Este efecto se demostró ser dependiente del estrés por fricción que genera el paso de un fluido por el endotelio vascular presente en el hígado, ejerciendo un efecto mecánico que se traduce en la respuesta fisiológica hepática de liberar enzimas. El principal mediador de la respuesta parece ser el calcio, el cual entra a través de CIAE (mecano-receptores), y una producción aumentada de NO también participa en la regulación de este evento, pero en menor magnitud. El hecho de que este fenómeno se exacerbe dramáticamente en el hígado en regeneración, nos hace sugerir que la elevación de actividades séricas de enzimas hepáticas tiene un papel regulatorio en el progreso de la proliferación hepática en rata, lo que en humanos pudiera tener implicaciones en la clínica.

# ***INTRODUCCIÓN***

## ***ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS***

En el organismo humano el diafragma divide estructuralmente a la cavidad abdominal de la torácica. Para determinar la situación anatómica de un órgano, el abdomen se divide en nueve regiones, de las cuales el hipocondrio derecho aloja al hígado. El hígado ocupa la parte más alta del hipocondrio derecho, la más grande del epigastrio y excepcionalmente se extiende dentro del hipocondrio izquierdo. Corresponde por la parte posterior a las tres últimas vértebras dorsales, y al nivel de la línea axilar derecha, a las siete últimas costillas. En el recién nacido representa el 5% **(1,2)** y en el adulto 2.5% del peso corporal **(3)** por lo que en el adulto aproximadamente pesa entre 1, 400 a 1600 gramos en el hombre y 1,200 a 1400 gramos en la mujer **(3,4)**. Mide 7-10 cm de longitud **(1)**.

Embriológicamente el hígado tiene una especial importancia, porque supone la perfecta conjunción de dos estructuras embrionarias diferentes (mesodermo y endodermo). Durante la cuarta semana de gestación, se forma un divertículo hepático. Esta evaginación, consiste en cordones celulares de proliferación rápida que se introducen en el *septum transversum*; éste es: la placa mesodérmica entre la cavidad pericárdica y el pedículo del saco vitelino. Los cordones de células hepáticas siguen introduciéndose en el *septum transversum*, mientras que la comunicación entre el divertículo hepático y el intestino anterior (duodeno) disminuye de calibre, formándose así el conducto biliar; este produce una pequeña evaginación ventral, que dará origen a la vesícula biliar y conducto cístico. Al continuar el desarrollo, los cordones hepáticos epiteliales se entremezclan con los senos sanguíneos de las venas onfalomesentéricas y umbilicales

en el septum transversum y así se forma el tejido mesenquimatoso del hígado. En la décima semana de desarrollo, el hígado pesa aproximadamente el 10% del peso corporal total. Existen dos factores importantes que contribuyen a aumentar el peso del hígado en esta etapa: uno es la función hematopoyética, puesto que se pueden observar nidos voluminosos de células en proliferación entre las células hepáticas y las paredes de los vasos que originan eritrocitos y leucocitos. El segundo factor es la existencia de abundantes sinusoides de las venas onfalomesentéricas y umbilicales. Esta actividad disminuye gradualmente en los dos últimos meses de la vida intrauterina y en el neonato, el hígado corresponde solo al 5% del peso corporal total (5).

Macroscópicamente tiene cuatro lóbulos pero dos son los principales: el lóbulo derecho y el lóbulo izquierdo; el derecho contiene a su vez el lóbulo cuadrado y el caudado. Los cuales se encuentran limitados por una capa delgada de tejido conjuntivo denominada cápsula de Glisson. Las estructuras anatómicas de fijación son por el ligamento redondo del hígado, por la vena cava inferior y por los repliegues del peritoneo que de él parten a las paredes del abdomen o a las vísceras cercanas (FIGURA 1, ANEXO II) (1, 4).

### ***ARQUITECTURA TISULAR***

#### ***TIPOS CELULARES***

Microscópicamente, está constituido por diversas poblaciones celulares. Las principales y más abundantes células son las del parénquima, también llamados hepatocitos (60% por número y 80% por volumen (6,7) y por cuatro tipos de células no parenquimatosas, que se encuentran en una proporción menor (35% por número y 17% por volumen) (FIG 2 y FIG3 ANEXO II) (8,9,10).

Aunque el hígado es la glándula interna más grande, su espesor es sólo de una a dos células. Esto se debe a que las células hepáticas, o hepatocitos, forman láminas hepáticas o redes trabeculadas que sólo tienen una o dos células de espesor (**11, 12, 13**). Las láminas hepáticas están dispuestas en unidades funcionales denominadas lobulillos hepáticos. Estas láminas, están separadas entre sí por grandes espacios capilares denominados sinusoides. Los sinusoides poseen poros extremadamente grandes (denominados fenestras) y, a diferencia de otros capilares, carecen de membrana basal. (**FIG 2 y FIG 4 ANEXO II**). Esto hace que los sinusoides hepáticos sean mucho más permeables que otros capilares, permitiendo incluso el paso de proteínas plasmáticas con moléculas apolares unidas a las proteínas, como la grasa y el (**14**). Las fenestras, la falta de membrana basal y la estructura laminar del hígado proporcionan un contacto íntimo entre los hepatocitos y el contenido de la sangre (**15,16**). Los hepatocitos se observan con facilidad al realizar una tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E) y por la cual se ha observado que algunos hepatocitos son binucleados. El hepatocito es una célula poliédrica y multifacética con 8 o más superficies de contacto. El diámetro varía entre 13 y 30  $\mu\text{m}$ , en promedio es de 25  $\mu\text{m}$ . El hepatocito tiene tres superficies de dominio: a) la superficie basolateral (perisinusoidal y paracelular) con muchas microvellosidades b) la superficie recta o dominio continuo. Esta superficie es continua a células adyacentes donde los divertículos de la membrana son separados por uniones cerradas (uniones Gap). Las uniones Gap entre los hepatocitos pudieran tener un papel importante en la propagación de las señales desde un hepatocito a otro, y c) la superficie del canalículo biliar (**17**).

Los tipos celulares no parenquimales son: 1) Células endoteliales, con fenestraciones de 100-200 nm, que forman la pared de los sinusoides (descritas anteriormente) (**18,19**). El



espacio entre las células endoteliales y los hepatocitos se conoce como el espacio de Disse y es el responsable de la falta de membrana basal. 2) Células de Kupffer (20), son macrófagos que se encuentran en el área periportal, los cuales se unen al lumen de la red sinusoidal para formar parte del sistema reticuloendotelial. Tienen forma de estrella cuyas protusiones alargan al espacio de Disse, debido a que pueden penetrar al mismo. Poseen actividad endógena de peroxidasa. Secretan metabolitos del ácido araquidónico y tienen receptores específicos de membrana para insulina, glucagon y lipoproteínas. 3) Células perisinusoidales (células de Ito, lipocitos o almacenadoras de lípidos), estas se localizan en el espacio de Disse (21), rodeando a las células endoteliales sinusoidales, y poseen una gran actividad contráctil, ya que tienen filamentos de actina y miosina. Estas células contienen gran cantidad de vitamina A almacenada en forma de gotas, sintetizan diferentes proteínas del tejido conectivo y secretan diferentes factores de crecimiento (22,23,24). Tienen un papel importante en la formación de la biomatriz (25,26,27).4) Células Pit, son células que tienen una vida media muy corta, las cuales son linfocitos granulados de gran tamaño y con actividad de natural killer (NK) y se localizan en el revestimiento endotelial del lumen sinusoidal. (28,29,30,31) (FIG 2,FIG 4,ANEXO II).

Las células no parenquimales tienen efectos biológicos en los hepatocitos. La circulación de IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  o de anaflatoxinas C3a y C5a y hormonas circulantes, tales como noradrenalina son solamente un ejemplo de los efectos múltiples en el hepatocito (32). Además estos efectos parecen tener una importancia en la regulación de funciones celulares. El contacto célula a célula de la unión entre la célula de Kupffer con el hepatocito y células perisinusoidales a las terminaciones nerviosas y la

proximidad de los hepatocitos perivenosos a las células endoteliales de la vena central tienen importancia funcional.

Las múltiples y diversas funciones del hígado son proporcionadas por las células parenquimales y no parenquimales, cada una sola o en cooperación (33). El tejido hepático, histológicamente parece ser uniforme, sin embargo, por morfometría e histoquímica, este es heterogéneo (como se ha descrito). Esta heterogeneidad está relacionada con la microcirculación, células de la zona periportal y de la zona perivenosa que poseen un diferente repertorio de enzimas clave, translocadores, receptores y estructuras subcelulares y tienen diferentes capacidades funcionales, por lo que la posición anatómica de cada uno de los tipos celulares del hígado es importante.

### ***BIOMATRIZ HEPÁTICA***

La matriz extracelular hepática contiene proteínas (colágena tipos I, III, IV y V, elastina), glicoproteínas (fibronectina, laminina, ondulina, nidogen-entactina, tenascina y osteonectina), proteoglicanos (heparán sulfato, condroitin-4-sulfato, condroitin-6-sulfato y sulfato de dermatan) y glicosaminoglicanos (hialuronato) (***FIG 6, FIG 6-B ANEXO II***). La biosíntesis y la degradación de la biomatriz es regulada por un estricto intercambio entre las células parenquimales y no parenquimales (33). Las células perisinusoidales sintetizan la mayor proporción de la biomatriz, puesto que, los hepatocitos, células de Kupffer y células endoteliales solamente contribuyen en una pequeña proporción (34, 35,36) Las células endoteliales son responsables de la degradación intracelular de los componentes de la biomatriz en lisosomas, después de que se lleva a cabo la ingestión endocitótica, mientras que la metaloproteinasas

producidas por los hepatocitos y células perisinusoidales son responsables de la degradación extracelular (37,38)(FIG 3 y FIG 6 ANEXO II).

### ***MITOCONDRIA HEPÁTICA***

Las mitocondrias son organelos respiratorios que constituyen alrededor del 20% del volumen citoplasmático de las células hepáticas (39). Existen aproximadamente 2,000 mitocondrias por hepatocito y en promedio cada una mide  $0.8 \mu\text{m}^3$ . Las mitocondrias hepáticas varían en tamaño y volumen de acuerdo a la relación y a la cantidad de aporte sanguíneo que reciban. Las mitocondrias son más numerosas, más grandes y más largas en los hepatocitos que rodean al tracto portal, se encuentran relativamente cercanas al retículo endoplasmático rugoso y abarcan aproximadamente el 7% del citoplasma celular (40).

### ***CIRCULACIÓN HEPÁTICA***

El hígado es un órgano que se encuentra presente sólo en vertebrados, recibe sangre arterial de una rama de la aorta abdominal y sangre venosa de la porta hepática. Por la cara visceral –inferior y anterior- penetran los vasos sanguíneos y salen los conductos por los que el hígado envía su secreción al intestino; esta región es llamada hilio hepático. El parénquima hepático se divide en lóbulos hexagonales que miden de 1 a 2  $\mu\text{m}$ , en el centro de cada lobulillo existe una vena central, y en la periferia de cada lobulillo hay ramas de la vena porta hepática y de la arteria hepática, que se abren hacia los sinusoides. Estos constituyen la unidad funcional hepática o también llamada ácino de Rappaport. El ácino hepático (FIG 2, ANEXO II) representa una pequeña masa de parénquima, de tamaño y forma irregular, la cual está rodeada por la arteriola hepática terminal, la vénula portal y los ductos biliares (espacio portal). El acino se encuentra

ubicado entre dos o más vénulas hepáticas terminales (vena central). De esta manera, en el lobulillo hay una zona central que rodea a la vena, llamada centrolobulillar o pericentral, una zona periférica o periportal alrededor de los espacios porta y una zona intermedia denominada mediozonal. La sangre arterial y la sangre venosa portal, que contiene moléculas absorbidas en el tubo digestivo, se mezclan cuando la sangre fluye por los sinusoides desde la periferia del lobulillo a la vena central. Las venas centrales de diferentes lobulillos hepáticos convergen para formar la vena hepática, que transporta la sangre desde el hígado a la vena cava inferior.

La bilis se produce en los hepatocitos y se segrega a unos finos conductos denominados canalículos biliares, situados en el interior de cada lámina hepática. Estos canalículos biliares descargan en la periferia de cada lobulillo a los conductos biliares, que a su vez descargan en conductos hepáticos que conducen la bilis fuera del hígado. Dado que la sangre fluye por los sinusoides y la bilis viaja en dirección contraria en el interior de las láminas hepáticas, la sangre y la bilis no se mezclan en los lobulillos hepáticos (41). La sangre arterial puede entrar en el sinusoides en forma directa, a través de las vénulas portales, o después de formar el plexo peribiliar. Las arteriolas entran en el ácino únicamente en la llamada zona 1 de Rappaport. Esta es la región más oxigenada del ácino. La zona 3 de Rappaport es la que delimita los bordes externos del ácino; la sangre que llega a esta zona ha pasado ya por las zonas 1 y 2, y por lo tanto tiene una concentración de oxígeno baja. Esta zona es particularmente sensible a lesiones hipóxicas inducidas por fármacos o deficiencias en la irrigación sanguínea.

La anatomía vascular hepática está preparada para crear un gradiente de oxígeno importante entre la arteria y la vénula hepática; sin embargo, los sinusoides están

dispuestos simétricamente de manera que no puede haber difusión lateral de oxígeno. En el hígado normal no hay posibilidades para que se produzcan derivaciones de oxígeno de la arteria a la vena hepática, por lo que, la extracción de oxígeno a través del hígado es una de las más eficientes del organismo.

La determinación de los flujos sanguíneos hepáticos se ha realizado en el perro. Las determinaciones en el hombre son recientes, y se deben de manera preponderante a la utilización de la técnica introducida por Bradley y cols. (42).

El hígado recibe un flujo de 100 a 130 ml/min/100g en el perro, el gato y en el hombre. De este flujo, 25 a 35% proviene de la arteria hepática, y el resto, de la vena porta. El flujo hepático total es aproximadamente 25% del gasto cardiaco. De estos flujos y presiones ya establecidos, puede calcularse que la resistencia de la arteria hepática es 30 a 40 veces más alta que la resistencia portal (43).

Estudios realizados por transiluminación sugieren la existencia de esfínteres a la entrada de las arteriolas en los sinusoides, luego entonces, un sinusoide recibe sangre arterial, portal o una mezcla de las dos. Esta particularidad circulatoria podría deberse a la actividad del músculo liso en las arteriolas y vénulas portales.

En el hígado normal no existen otras comunicaciones más que la de los sinusoides entre la arteria hepática y la vena hepática o entre la vena porta y la vena hepática. Se han demostrado anastomosis de menos de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro entre la arteria hepática y las vénulas portales antes que entren en el sinusoide (44).

## ***FUNCIONES CELULARES REGULADAS POR EL FLUJO SANGUÍNEO***

### ***CARACTERÍSTICAS HEMODINÁMICAS REGULADAS POR EL FLUJO SANGUÍNEO***

Las células que conforman a los tejidos de los vertebrados se encuentran sometidas a un medio ambiente mecánico, el cual es generado por la interacción entre las fuerzas gravitacionales, las fuerzas locales que son provocadas por la presión y el movimiento de la sangre y la tensión intracelular originada de la organización de los elementos del citoesqueleto. Todo esto se da cuando las células interaccionan con la matriz extracelular en respuesta a la tensión del flujo sanguíneo (45).

En el sistema vascular el flujo sanguíneo es normalmente laminar y las turbulencias son relativamente raras. Se sabe de una forma diferente de flujo laminar, denominado flujo laminar perturbado, el cual ocurre en regiones cercanas a la bifurcación y en los vasos de gran longitud. La diferencia entre flujo laminar perturbado y flujo laminar turbulento radica en que en este último existe un desajuste de la frecuencia, dirección y magnitud de las fuerzas que actúan en la superficie endotelial, mientras que en el flujo laminar perturbado las fuerzas que actúan en el endotelio tienen una amplitud y dirección predecible. Las fuerzas hemodinámicas provocadas por el flujo sanguíneo pueden ser descritas en términos de estrés. El estrés es una fuerza por unidad de área que tiene dos componentes: una fuerza perpendicular a la superficie llamada presión por deformación y una fuerza tangencial llamada estrés por fricción (*shear stress*) resultante de la fricción del flujo en la superficie endotelial. Los componentes subendoteliales como son las fibras de colágena, elastina y la musculatura vascular son las estructuras más

sensibles a la presión por deformación, sin embargo, el endotelio está sujeto a todo el shear stress, el cual es inducido por el flujo sanguíneo. El shear stress que actúa sobre una célula endotelial causa un estrés interno que es transmitido a los sitios de unión celular y a las células vecinas. Cuando se genera el estrés intracelular, la célula endotelial es capaz de alterar sus propiedades estructurales y mecánicas en respuesta al flujo sanguíneo, así por ejemplo existe reorganización del citoesqueleto y por lo tanto distribución de F-actina. El shear stress depende de la longitud y de la geometría del vaso (la cual a su vez depende de la viscosidad, de la velocidad del flujo y del radio de los vasos). En vasos grandes y no ramificados, por ejemplo, la aorta, el shear stress es de aproximadamente  $30 \text{ dinas/cm}^2$  y es de forma laminar. En regiones con una geometría compleja, donde existen zonas de flujo laminar alternadas con zonas de flujo turbulento existen variantes en el shear stress, estimándose un rango aproximado de  $8 \text{ dinas/cm}^2$ . La carótida es muy susceptible al daño por aterosclerosis debido a su geometría. En vasos muy pequeños, como las arteriolas, con un diámetro de  $20$  a  $40 \mu\text{m}$  el rango de shear stress es de  $5$  a  $25 \text{ dinas/cm}^2$ , cuando el rango del flujo cambia debido a que se dirige hacia las arterias ocurren dos interesantes fenómenos: uno agudo y otro crónico. El flujo se incrementa resultando en una vasorelajación rápida y el flujo sufre un decremento a un largo período de tiempo (días o semanas). Ambas respuestas son dependientes del endotelio **(46,47,48)**.

## ***ENDOTELIO VASCULAR***

### ***¿CÓMO INTERACTÚAN LAS FUERZAS HEMODINÁMICAS CON EL ENDOTELIO?***

En el sistema vascular de los mamíferos el endotelio es la única estructura anatómica que responde a estas fuerzas hemodinámicas. El endotelio se encuentra localizado entre la corriente sanguínea y la musculatura vascular. Durante muchos años se le consideró solamente como una estructura anatómica. Actualmente se han realizado descubrimientos muy relevantes que señalan al endotelio como un órgano metabólicamente activo con múltiples funciones endócrinas.

Entre las principales funciones del endotelio se encuentra su participación en el mantenimiento de las propiedades anticoagulantes, la regulación de la permeabilidad vascular, el control del diámetro del lumen vascular, la prevención de la formación de trombos. En todos estos procesos los factores hemodinámicos interactúan directa e indirectamente con el endotelio. De una manera directa las fuerzas hemodinámicas actúan sobre la superficie endotelial, donde se encuentran enzimas y receptores membranales, modificando las interacciones enzima-sustrato y agonista-receptor; e indirectamente cambiando las concentraciones locales de estos agonistas en la superficie endotelial. Sin embargo, existen múltiples mecanismos sensibles al flujo que pueden provocar muchos eventos vasculares. Las células endoteliales sintetizan y secretan un gran número de moléculas bioactivas, entre ellas se encuentran la endotelina 1 (ET-1), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), prostaciclina, factor relajante derivado del endotelio, las cuales regulan múltiples funciones celulares. Así por ejemplo, tenemos que la endotelina-1 es un mitógeno del músculo liso, el cual tiene un



papel importante en la proliferación de células de músculo liso, proceso involucrado en la patogénesis de la aterosclerosis. El factor relajante derivado del endotelio o también llamado óxido nítrico (NO) es un importante vasodilatador endógeno y segundo mensajero derivado de las células endoteliales que tiene un importante papel en diversas funciones vasculares y proliferativas y en el desarrollo de múltiples patologías como la hipertensión arterial sistémica (49,50,51).

### ***MECANOTRANSDUCCIÓN***

Los mecanismos moleculares por los cuales la célula endotelial responde a las fuerzas hemodinámicas es desconocido. Las técnicas de biología molecular han permitido dilucidar el posible mecanismo de transducción pero no se conoce completamente. *In vitro e in vivo* se ha observado que las células endoteliales estimuladas por shear stress responden rápidamente al estímulo mecánico externo generando señalización intracelular, es decir, el endotelio es un “mecanosensor” responsable de la transducción de una respuesta física a una respuesta bioquímica o fisiológica intracelular. El shear stress genera segundos mensajeros (NO, calcio, IP<sub>3</sub>, cAMP), provoca fosforilación de proteínas, estimula proteínas de citoesqueleto y regula la expresión génica.

## ***ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN EL HÍGADO***

La falla hepática se produce cuando el hígado está tan dañado que no puede seguir realizando sus funciones normales. Cuando se establece la insuficiencia o falla hepática frecuentemente se requiere de la pérdida de por lo menos el 60-80% de la masa hepática. Por ello, la hepatopatía puede presentarse sin evidencia de insuficiencia hepática. Los enfermos afectados pueden no mostrar signos clínicos identificables hasta que la enfermedad está muy avanzada. Debido a esto, es importante diferenciar entre enfermedad e insuficiencia hepática ya que cuando se presenta insuficiencia hepática el pronóstico suele ser malo, a menos que el proceso patológico sea agudo y aún se esté produciendo regeneración. La enfermedad hepática crónica suele asociarse con fibrosis. Hay una variedad amplia de signos clínicos que pueden ocurrir con la enfermedad, insuficiencia o falla hepática. Desafortunadamente, la mayoría de signos son inespecíficos y tienen una alta variabilidad dependiendo de la extensión y duración de la enfermedad hepática.

Algunos de los signos clínicos de enfermedad, insuficiencia o falla hepática son: pérdida de peso, depresión, disminución del apetito, diarrea, ictericia, edema, sangrado inusual o inexplicable entre otros.

Las “pruebas de función hepática” es un término aplicado a una variedad de pruebas de sangre para averiguar el estado general del hígado y del sistema biliar. Las pruebas rutinarias de función hepática pueden dividirse entre las que son valores reales de la función hepática, como seroalbúmina o tiempo de protombina; y aquellas que son simplemente marcadores de la enfermedad hepática o del sistema biliar, como las

diferentes enzimas hepáticas. Además de las pruebas hepáticas usuales que se obtienen a través de los paneles automatizados de químicos serológicos rutinarios, los médicos están en la posibilidad de ordenar pruebas hepáticas más específicas, como las pruebas de serología viral o pruebas autoinmunes que, cuando son positivas, pueden determinar la causa específica de una enfermedad hepática.

Existen dos categorías generales de enzimas hepáticas. El primer grupo incluye las enzimas transaminasas: alaninoaminotransferasa (ALT, por sus siglas en inglés) y la aspartato aminotransferasas (AST, por sus siglas en inglés), antes conocidas como TGP y TGO. Estas enzimas son enzimas indicadoras del daño a la célula hepática. El segundo grupo incluye ciertas enzimas hepáticas, como la fosfatasa alcalina y la  $\gamma$ -aglutamiltranspeptidasa, 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.

La ALT y AST son enzimas que se encuentran en el citosol de las células hepáticas, las cuales se liberan hacia la circulación sanguínea cuando existe daño en la célula hepática. Se cree que la ALT es un indicador más específico de la inflamación hepática, mientras que la AST puede aparecer elevada en enfermedades de otros órganos, como el corazón o el músculo. En caso de daño severo en el hígado, como en la hepatitis viral aguda, la ALT y la AST 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 probablemente a la presencia de fibrosis y por consecuencia a la disminución de hepatocitos funcionales. Aumentos leves o moderados de la ALT y la AST son a menudo usados para valorar el avance de la hepatitis crónica, y la respuesta al tratamiento con corticoesteroides e interferón.

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima de localización citosólica, que se encuentra en una gran variedad de órganos. Puede presentarse una elevación de esta enzima, en una variedad amplia de problemas y no es un indicador útil o específico de daño hepático.

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 (cada una con  $M_r$  33.500), pero los 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 A y en el corazón el 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  $B_4$ . Los diferentes isoenzimas de la LDH tienen valores significativamente diferentes de  $V_{max}$  y de  $K_m$ , especialmente para el piruvato. Las propiedades del isoenzima  $A_4$  de la LDH favorecen la reducción rápida de concentraciones muy pequeñas de piruvato a lactato en el músculo esquelético, mientras que las del isoenzima  $B_4$  tienden a favorecer la oxidación rápida del lactato a piruvato en el corazón.

La distribución de las diferentes formas isoenzimáticas de la LDH refleja que la diferenciación y desarrollo de tejidos adultos a partir de sus formas embrionarias o fetales. Por ejemplo, el hígado fetal tiene una distribución característica de isoenzimas de la LDH, que cambia a medida que el órgano se diferencia hacia su forma adulta.

La cuantificación de la isoenzima es útil para determinar si la isoenzima hepática (LDH-5) está elevada. (52,53,54).

## ***REGENERACIÓN HEPÁTICA***

El hígado posee la capacidad de reestablecer la pérdida de tejido por el proceso de regeneración. Esta capacidad tiene una importante relevancia fisiológica en numerosas enfermedades hepáticas, tales como hepatitis viral y alcohólica, trastornos metabólicos, o después de una cirugía hepática. Uno de los modelos animales más estudiados es la hepatectomía de dos tercios (PH 2/3), el cual fue descrito originalmente por Higgins and Anderson (55).

En 1931, Higgins y Anderson observaron en ratas sometidas a una hepatectomía parcial, en las que extirpaban 2/3 del hígado dejando intactos los lóbulos restantes, que éstos crecían rápidamente hasta restablecer la masa hepática original durante los 5 a 7 días posthepatectomía. Otros estudios, en perros, monos y humanos, han establecido que la respuesta regenerativa es proporcional a la cantidad de hígado removida. Incluso resecciones pequeñas, menos del 10% de la masa hepática, dan como resultado una respuesta que lleva a la recuperación del tamaño original. Ello también sucede con el órgano *in toto*: al transplantar el hígado de un bovino a un ser humano, el hígado aumenta rápidamente de tamaño y dentro de una semana alcanza el tamaño del hígado humano. El fenómeno también se observa a la inversa. Al transplantar un hígado de un perro grande a uno de menor tamaño, la masa del hígado transplantado disminuye hasta que se hace proporcional al nuevo cuerpo. Estos estudios demuestran que la masa hepática es regulada en forma precisa y que las señales pueden tener efectos positivos o negativos sobre dicha masa. (56,57)

En contraste con otros tejidos capaces de regeneración (médula ósea, piel), la regeneración hepática no depende de un grupo de células germinales (*stem cells*) sino que se produce por la proliferación de todas las células maduras remanentes: los hepatocitos, células epiteliales biliares (que recubren los canalículos), células endoteliales fenestradas, células de Kupffer (macrófagos en los sinusoides) y las células de Ito. Todas proliferan para restablecer el tejido perdido pero la velocidad de su respuesta es diferente. Los hepatocitos son los primeros en proliferar, primero alrededor del espacio periportal y luego extendiéndose hacia las venas centrales. Las otras células proliferan después de los hepatocitos, lo cual, sugiere que estos producen el estímulo para dicha proliferación.

La arquitectura hepática se reestablece siguiendo una secuencia determinada. La síntesis de DNA se lleva a cabo entre 12 a 16 horas después de la hepatectomía. De 24 a 48 horas posthepatectomía se observan acúmulos de hepatocitos como resultado de su proliferación activa. Luego, los procesos de las células de Ito penetran estos acúmulos y producen diferentes tipos de lamina de manera que, eventualmente, los hepatocitos se reacomodan para formar las placas hepáticas típicas del hígado maduro. Los capilares de los acúmulos, revestidos de la membrana basal capilar, cambian a la estructura sinusoidal con escasa matriz y revestidos de las células fenestradas y con presencia de células de Kupffer.

El proceso ha sido repetido hasta con 12 hepatectomías sucesivas sin que dé signos de agotamiento. La capacidad clonogénica del hepatocito también parece ser ilimitada. En modelos en que el hígado es incapaz de sostener la vida del animal, unos 1000 hepatocitos aislados inyectados en ese hígado crecen formando acúmulos, iguales a los

descritos en el modelo de hepatectomías parciales, y restablecen finalmente la masa hepática original salvando la vida del animal. Modelos matemáticos permiten calcular que un solo hepatocito da origen a  $1,7 \times 10^{10}$  células al cabo de un mínimo de 34 divisiones celulares. Como un hígado de rata normal contiene  $3 \times 10^8$  células, un hepatocito bajo estas condiciones es capaz de generar alrededor de 50 hígados de rata.

Estudios con cultivos de células hepáticas han mostrado que bajo el estímulo del factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF) y del factor de crecimiento epidérmico (EGF), los hepatocitos sufren primero un proceso de dediferenciación y luego uno de rediferenciación para formar ya sea hepatocitos maduros o estructuras semejantes a ductos biliares. Esto muestra que los hepatocitos no son células diferenciadas terminalmente, lo que es inesperado dado la gran complejidad de las funciones de un hepatocito maduro. Incluso más espectacular que esto, es la capacidad de los hepatocitos de proliferar mientras mantienen simultáneamente sus funciones esenciales: regulación de la glucosa, síntesis de proteínas, secreción de bilis y biodegradación de toxinas. Estas funciones se mantienen incluso si sólo queda un tercio del órgano y el 90 % de las células residuales están proliferando. Esta actividad se debe a la interacción de diversos eventos complejos como la regulación de la matriz, disolución y luego resíntesis de los diferentes dominios de membrana especializados del hepatocito y la alineación y coordinación de unos 150 cromosomas en cada mitosis.

¿Qué estímulos inician la respuesta regenerativa, cómo se regulan las diferentes etapas y cómo se detiene el proceso? Las investigaciones hasta ahora dejan muchas interrogantes, pero han permitido establecer una serie de hechos. El primero es que las señales mitogénicas son producidas por elementos que aparecen rápidamente en la

sangre y que son llevadas a los hepatocitos remanentes y estimulan su proliferación. Tejido hepático transplantado a sitios extrahepáticos también aumenta la síntesis de DNA luego de la hepatectomía. Con ratas unidas a través de una circulación parabiótica, se demostró que al hacer la hepatectomía en una de ellas, el hígado de la otra se regenera también, observándose el efecto máximo cuando la hepatectomía es total. **(58)**.

Existen factores de crecimiento involucrados directamente en la respuesta mitogénica y una serie de otros factores que actuarían indirectamente pero cuya presencia es indispensable para generar los estímulos mitogénicos apropiados. Dentro de los primeros estaría el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF) que aumenta rápidamente después de la hepatectomía, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y el factor de crecimiento transformador- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ). HGF y TGF- $\alpha$  se producirían en los mismos hepatocitos y EGF en las glándulas de Brunner en el duodeno, llegando al hígado a través de la circulación portal. Aunado a éstos, es necesaria la presencia de otros sistemas de señales que aparecen como necesarios para la producción de estos factores o bien para que estos produzcan sus efectos: citoquinas, insulina y noradrenalina.

Las citoquinas, especialmente la IL-6 y TNF- $\alpha$ , secretados por las células de Kupffer, son especialmente importantes en los mecanismos iniciales de la regeneración. La insulina, si bien no tiene efectos mitogénicos directos sobre los hepatocitos, es indispensable para que las señales mitogénicas actúen apropiadamente. Igualmente, la noradrenalina tampoco actúa como mitógeno, pero amplifica la acción de HGF y EGF a través de la activación del receptor adrenérgico  $\alpha_1$ , y, además, induciendo la secreción de EGF por parte de las glándulas de Brunner en el duodeno. **(59,60)**.



Además se han identificado algunas enzimas que se liberan durante la regeneración hepática como son la deshidrogenasa láctica (LDH), glutamato-oxalacetato transaminasa (TGO), glutamato-piruvato transaminasa (TGP), ornitín carbamiltransaminasa (OTC) e inhibición de otras enzimas, tales como la carbamifosfato-sintetasa.

Uno de los epifenómenos involucrado en el proceso de regeneración hepática es el flujo sanguíneo. Se ha demostrado que el flujo sanguíneo hepático aumenta cerca de 4 veces al 2° día de hepatectomía parcial del 50 % en cerdos adultos. En ratas hepatectomizadas parcialmente también se demostró un aumento del flujo de 200 a 300%. En ratas con hepatectomía parcial existen altos niveles de antioxidantes tales como glutatión, enzimas inactivadoras de radicales libres, y un alto contenido de antioxidantes liposolubles en microsomas, el incremento selectivo de lipoperoxidación en membranas plasmáticas y citosol de células hepáticas pueden estar relacionado con una producción excesiva de radicales libres. Un incremento en el aporte de oxígeno y de otros metabolitos, son causados por un aumento del flujo sanguíneo hepático. El mecanismo por el cual pudiera actuar el flujo sanguíneo no se ha explorado. Existen cuando menos dos posibilidades: una es que un flujo aumentado aporte mayor cantidad de substratos y contribuya al proceso de regeneración, la segunda y más atractiva, es que el flujo sanguíneo a través de la estimulación del endotelio promueva la liberación de factores conocidos y desconocidos que funcionaran como señales que controlen la proliferación celular.

La regeneración hepática es una respuesta primordial del hígado ante el daño tisular. La compleja interacción de factores que determinan esta respuesta involucra a un estímulo

(experimentalmente una hepatectomía), expresión de genes, síntesis de diversos factores de crecimiento y la interacción de otros factores que modulan la respuesta (61,62).

## ***PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA***

En México, la primera causa de mortalidad general se debe a enfermedad cardiovascular (63). Los órganos llamados de “choque” u órganos “nobles” que contribuyen a cambios hemodinámicos importantes para el desarrollo de patología cardiovascular son el hígado y el riñón, a la inversa una enfermedad cardiovascular afecta de manera importante la hemodinámica de ambos órganos. Por otro lado, en la práctica médica, el encontrar niveles de enzimas séricas por arriba de los niveles considerados como “normales o estándar”, se considera representar un resultado de un aumento en la liberación de macromoléculas hacia la circulación sistémica a partir de órganos dañados, lo que permite el diagnóstico para ciertas enfermedades (64). De hecho, se considera que diferentes tipos de lesiones en un órgano específico, se acompañan de diferentes tipos de patrones enzimáticos en suero; en el hígado, el análisis de la liberación de enzimas revela que normalmente cada enzima presenta un gradiente de concentración característico entre el órgano y la sangre, lo que predice su tasa de liberación hacia la circulación periférica (65-67). A pesar de que aún desconocemos en detalle los mecanismos que controlan la tasa de liberación de enzimas hepáticas y el nivel de sus actividades séricas, la cuantificación de éstas en plasma se considera un método semi-cuantitativo para discriminar entre los diferentes tipos de lesión hepática. De hecho, los patrones enzimáticos en suero pueden ser indicativos de la localización intracelular o compartimiento subcelular dañado, así como su curso temporal (68,69). Los niveles elevados de transaminasas (ALT y AST) se consideran indicadores de daño hepático

(experimentalmente una hepatectomía), expresión de genes, síntesis de diversos factores de crecimiento y la interacción de otros factores que modulan la respuesta **(61,62)**.

## ***PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA***

En México, la primera causa de mortalidad general se debe a enfermedad cardiovascular **(63)**. Los órganos llamados de “choque” u órganos “nobles” que contribuyen a cambios hemodinámicos importantes para el desarrollo de patología cardiovascular son el hígado y el riñón, a la inversa una enfermedad cardiovascular afecta de manera importante la hemodinámica de ambos órganos. Por otro lado, en la práctica médica, el encontrar niveles de enzimas séricas por arriba de los niveles considerados como “normales o estándar”, se considera representar un resultado de un aumento en la liberación de macromoléculas hacia la circulación sistémica a partir de órganos dañados, lo que permite el diagnóstico para ciertas enfermedades **(64)**. De hecho, se considera que diferentes tipos de lesiones en un órgano específico, se acompañan de diferentes tipos de patrones enzimáticos en suero; en el hígado, el análisis de la liberación de enzimas revela que normalmente cada enzima presenta un gradiente de concentración característico entre el órgano y la sangre, lo que predice su tasa de liberación hacia la circulación periférica **(65-67)**. A pesar de que aún desconocemos en detalle los mecanismos que controlan la tasa de liberación de enzimas hepáticas y el nivel de sus actividades séricas, la cuantificación de éstas en plasma se considera un método semi-cuantitativo para discriminar entre los diferentes tipos de lesión hepática. De hecho, los patrones enzimáticos en suero pueden ser indicativos de la localización intracelular o compartimiento subcelular dañado, así como su curso temporal **(68,69)**. Los niveles elevados de transaminasas (ALT y AST) se consideran indicadores de daño hepático

(70), mientras que el aumento de lactato deshidrogenasa (LDH) sugiere un daño isquémico del hígado (71).

Sin embargo, existe una discrepancia entre el aumento drástico en las actividades séricas de las enzimas hepáticas y la integridad estructural del órgano así como de la función hepática, después de una resección parcial del hígado, donde los hepatocitos remanentes entran en un proceso proliferativo conocido como regeneración hepática post-cirugía (72). La asociación de la regeneración hepática inducida por una HP y la liberación de enzimas al suero, se reportó desde hace unos 30 a 40 años, como los aumentos en las actividades de ALT y AST en ratas sometidas a una HP parcial del 70% de la masa hepática, sin embargo, se ha observado que la actividad de la ornitín-carbamiltransferasa (OCT), que es una enzima mitocondrial hepática, también aumenta después de una HP. En una forma similar, en pacientes sujetos a una HP, se encontró una elevación “selectiva” de enzimas en suero, y aquí la actividad de la OCT fue la que se incrementó en una mayor proporción. A pesar de que la capacidad regenerativa del hígado remanente se conserva, se han encontrado grandes elevaciones de enzimas hepáticas en suero, en forma independiente incluso de la magnitud del tejido hepático resecado. Los aumentos en la actividad sérica de enzimas hepáticas son mayores en HP hasta de un 85% de la masa hepática, pero en estas últimas condiciones, la mortalidad aumenta grandemente en los animales sujetos a esa magnitud de HP .

Mientras que lo último se ha interpretado como una consecuencia de una necrosis progresiva y de una falla hepática posterior a una HP masiva, en otros modelos de daño hepático y regeneración, el aumento en las actividades de la ALT y la AST no correlacionan con necrosis celular. Por ejemplo, el daño hepático y la consecuente

regeneración que se induce con la administración aguda de tetracloruro de carbono en ratas, no se correlaciona con la magnitud en los aumentos de las actividades séricas de las transaminasas . Estos hallazgos apoyan la idea de que un aumento en la cantidad de enzimas hepáticas en suero puede ser un evento dual; es decir, un aumento inicial de liberación de enzimas hepáticas se debe a necrosis celular, mientras que una segunda elevación puede estar más relacionada a una proliferación celular compensatoria del hígado dañado. Por lo tanto, la razón del aumento de enzimas en suero es controversial en el caso de la regeneración hepática inducida por HP in ratas. En este contexto, ya se ha reportado por nuestro grupo una elevación de enzimas, principalmente aquellas de localización mitocondrial, fenómeno que aparentemente no se relaciona con daño hepático evidente. A pesar de que una HP del 70% en ratas induce una liberación de enzimas de la mitocondria al citoplasma, la función mitocondrial se preserva en el hígado en el regeneración, y no se ha reportado necrosis o apoptosis en este modelo experimental .

A partir de lo ya mencionado, tenemos la hipótesis parcial de que la liberación de enzimas se debe principalmente a cambios hemodinámicos, los cuales se han reportado que ocurren tempranamente después de una HP del 70% en ratas (**73,74**).

El ambiente mecánico de las células de mamíferos se define por interacciones complejas entre las fuerzas gravitacionales, como por ejemplo, la presión y movimiento de un fluido, las cuales tienen influencia en la tensión intracelular que aumenta cuando se organizan los elementos constituyentes del cito-esqueleto (**75,76**). El endotelio está localizado entre la pared vascular y la pared que encara hacia el flujo sanguíneo, y estas células que se alinean con la circulación arterial, están expuestas a las fuerzas físicas

que genera el paso de un fluido de una gran magnitud proporcional, tal como ocurre con el “estrés por fricción” (laminar), que es el componente tangencial de las fuerzas hemodinámicas . El estrés por fricción activa muchas vías de transducción de señales en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (77,78,79).

En las mismas células, se generan fuerzas mecánicas debidas al cito-esqueleto (80), y estas fuerzas físicas modifican la morfología celular, la organización del cito-esqueleto, la diferenciación celular, la expresión genética e incluso la supervivencia de la célula (81,82). Estas fuerzas están integradas en un sistema llamado de transducción de señales mecano-químicas, que constituyen un proceso que permite a las células percibir y responder hacia estímulos físicos, como el de “estiramiento”, presión y estrés por fricción causadas por el paso del fluido (83). Una carga mecánica activa varias vías y regulan en una forma importante la expresión de diversos componentes de la matriz extracelular (84). Aquí, las integrinas conectan a las células con la matriz extracelular que las rodean, establecen una unión con la actina del cito-esqueleto, transmiten las señales a través de la membrana, así como también contribuyen a la transducción de señales mecánicas en respuestas químicas, a través de cambios en la estructura del cito-esqueleto (83,84).

Se ha reportado un número de eventos intracelulares que son “disparados” por el estrés por fricción. Estos incluyen una estimulación directa sobre las proteínas transmembranales expuestas hacia la superficie luminal, activación de canales iónicos que afectan la movilización intracelular de calcio, así como la producción de NO. Se cree que estos eventos participan en la transducción de señales entre los elementos del cito-esqueleto a otras regiones en el interior de las células (87). De hecho, la membrana

citoplásmica de las células endoteliales y sus cambios de micro-viscosidad pueden afectar moléculas que se consideran como mecano-receptores, en respuesta a las variaciones en el estrés de fricción **(86)**.

Basados en todo lo ya expuesto, el presente estudio se diseñó para contestar la siguiente hipótesis:

### ***HIPÓTESIS***

Los cambios en las actividades séricas de enzimas hepáticas son dependientes de las variaciones del flujo sanguíneo portal y la presión de éste, tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*. Las elevaciones en la cantidad de enzimas hepáticas en suero no están relacionadas con un daño hepático. Esta dependencia hacia la magnitud del flujo portal para la liberación de enzimas hepáticas, se encuentra al menos parcialmente controlada, por fenómenos o propiedades mecano-biológicas, cuyos efectores principales son los movimientos intracelulares de calcio y la producción de NO en las células endoteliales, entre otros posibles mediadores.

citoplásmica de las células endoteliales y sus cambios de micro-viscosidad pueden afectar moléculas que se consideran como mecano-receptores, en respuesta a las variaciones en el estrés de fricción **(86)**.

Basados en todo lo ya expuesto, el presente estudio se diseñó para contestar la siguiente hipótesis:

### ***HIPÓTESIS***

Los cambios en las actividades séricas de enzimas hepáticas son dependientes de las variaciones del flujo sanguíneo portal y la presión de éste, tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*. Las elevaciones en la cantidad de enzimas hepáticas en suero no están relacionadas con un daño hepático. Esta dependencia hacia la magnitud del flujo portal para la liberación de enzimas hepáticas, se encuentra al menos parcialmente controlada, por fenómenos o propiedades mecano-biológicas, cuyos efectores principales son los movimientos intracelulares de calcio y la producción de NO en las células endoteliales, entre otros posibles mediadores.



## ***OBJETIVO ESPECÍFICO***

Investigar la participación del flujo sanguíneo en la liberación de enzimas de origen hepático en el hígado normal y hepatectomizado de rata.

## ***OBJETIVOS PARTICULARES***

- Medir la liberación de enzimas de origen hepático (TGO, TGP, OTC, GDH y LDH) en el hígado normal y hepatectomizado de rata a flujo normal (6 ml/min) y a diferentes flujos (2, 12, 18 y 40 ml/min).
- Medir la liberación de estas enzimas hepáticas cuando se cambia las condiciones hemodinámicas (cambios de viscosidad y cambios en la concentración de calcio extracelular).
- Medir la actividad de las enzimas hepáticas cambiando las condiciones de la matriz extracelular endotelial.
- Medir la liberación del óxido nítrico en presencia de cada una de las enzimas hepáticas sometidas a diferentes velocidades de flujo (2, 12, 18 y 40 ml/min).

## ***METODOLOGIA***

**Tratamiento de Animales.** Se utilizaron ratas de la cepa Wistar con un peso inicial de 250g, a las cuales se les mantuvo bajo condiciones controladas de temperatura, humedad, y bajo un ciclo de 12:12 h de luz/oscuridad. Los animales se mantuvieron con una dieta (cubos de purina) y agua libre. Se dividieron en dos grupos experimentales: uno sometido a una HP del 70% de la masa hepática, de acuerdo a la técnica descrita originalmente por Higgins y Anderson (55), y el otro, como grupo control, consistió en animales sujetos al trauma quirúrgico pero sin remoción alguna del tejido hepático (falsamente operados). Solo en otro grupo de animales controles y los sometidos a HP, se le administró una dosis de 1.8 mg/kg de peso de cicloheximida (inhibidor de síntesis de proteínas), seis horas antes del fin del experimento. Los animales se sacrificaron a diferentes tiempos post-cirugía, y bajo una anestesia general con 40 mg/kg de peso de pentobarbital sódico. Todos los procedimientos se llevaron a cabo con las disposiciones de trato humanitario, establecidas en la NOM para “Regulación para el Cuidado de Animales y Experimentación” emitida por la SAGARPA.

**Toma de Muestras de Suero e Hígado.** Se colectaron muestras de sangre del cuello de los animales, y se separó el suero por centrifugación. Cuando fue necesario, los sueros se almacenaron a una temperatura de - 50°C hasta su uso. Las muestras de hígado obtenidas se homogenizaron en una solución amortiguadora (pH 7.4) que consistió en sacarosa 250 mM y TRIS-HCl 10 mM. En estas muestras se determinó la actividad total de las enzimas en el tejido hepático.

**Determinación de las Actividades Enzimáticas.** Se cuantificaron las siguientes enzimas: LDH (EC 1.1.1.27), glutámico deshidrogenasa (GDH; EC 2.6.1.2), alanina (ALT; EC 2.6.1.2),

aspártico aminotransferasas (AST; EC 2.6.1.1) y la OCT (EC 2.1.3.3) por métodos descritos previamente (5,11,12). Otras enzimas también determinadas fueron: la fosfatasa alcalina (FA; EC 3.1.3.1) y la  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidasa (GGT; EC 2.3.2.2) usando “kits” diagnósticos adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO). Además se determinaron también las actividades de la deshidrogenasa málica (MDH; EC 1. 1. 1.37) y la del isocitrato (IDH; EC 1.1.1.42) por medio de técnicas espectro-fotométricas. Las actividades de las enzimas se expresan como UI/L (Unidades Internacionales x litro), o también como unidades  $\bullet \text{ min}^{-1} \bullet \text{ g}^{-1}$  de hígado profundido o de rebanadas hepáticas. La actividad de las enzimas en hígado, se expresó como  $\mu\text{mol} \bullet \text{ min}^{-1} \bullet \text{ mg}$  de proteína hepática.

**Perfusión de hígados aislados y cambio de la magnitud de flujo.** A diferentes tiempos post-cirugía, tanto los animales controles como aquellos sometidos a HP se les anestesió con éter etílico y se abrió la cavidad abdominal. La perfusión del hígado ya aislado se llevó a cabo por los descrito por Habib et al. (85), pero en este caso, no usamos un sistema re-circulante. La solución de perfusión consistió en un sistema amortiguado (pH 7.4) de Krebs-Ringer-bicarbonato, previamente oxigenado con carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>), al que también se le agregó glucosa 5mM. Los hígados se perfundieron en una dirección anterógrada, esto es, a través de la vena porta con un flujo inicial de  $3 \text{ ml} \bullet \text{ min}^{-1} \bullet \text{ g}^{-1}$  de hígado por 5 minutos, para eliminar los restos de sangre presentes en los vasos intra-hepáticos. Después de esto, se ajustó la velocidad de flujo a  $1 \text{ ml} \bullet \text{ min}^{-1} \bullet \text{ g}^{-1}$ , considerada como la normal de acuerdo a reportes previos (95). En algunos experimentos se inició con una velocidad de flujo de  $0.5 \text{ ml} \bullet \text{ min}^{-1} \bullet \text{ g}^{-1}$ . La solución saliente (“perfusado”) se recolectó cada 15 a 20 minutos y se fue incrementando la magnitud de flujo de perfusión hasta  $3 \text{ ml} \bullet \text{ min}^{-1} \bullet \text{ g}^{-1}$ , excepto en algunos casos indicados en las figuras. En todos los casos, la perfusión de los hígados aislados duró hasta 2 horas como un máximo.

En otra serie de experimentos, encaminados a demostrar la influencia de la orientación del flujo aplicado, los hígados aislados de los animales experimentales se perfundieron en una dirección retrógrada, es decir de la vena cava a la porta, pero sin modificar las condiciones ya descritas para la perfusión.

**Evaluación de la Integridad hepática y su Función posterior a la Perfusión con Magnitudes Crecientes en la Velocidad de Flujo.** En hígados perfundidos provenientes de los grupos experimentales (a través de la vena porta) se tomaron muestras a diferentes tiempos de perfusión para determinar lo siguiente: pequeñas fracciones del tejido hepático se fijaron en formaldehído al 10% amortiguado (pH 7.2) con PBS para una evaluación histológica, la cual se llevó a cabo en doble-ciego por un patólogo calificado. En otra sección del tejido se determinó la cantidad de malondialdehído (MDA) como una medida de la cantidad de lipoperoxidación. La función hepática se evaluó por la cantidad de producción de urea medida en los perfusados provenientes de los órganos perfundidos, en la presencia de ornitina 4 mM, cloruro de amonio 2.5 mM, y de glutamina 10 mM (88).

**Preparación de Rebanadas Hepáticas y de Células Aisladas.** Se obtuvieron rebanadas hepáticas, y se aislaron hepatocitos a través de un método modificado por Seglen , donde los hígados se perfundieron con un la misma solución ya descrita, pero con la adición de calcio y de colagenasa bacteriana (Sigma) al 0.03% (p/v). La viabilidad de los hepatocitos fue de más del 90%, determinada por la prueba de exclusión del Azul de tripano .

**Evaluación de la Participación del Endotelio Vascular sobre la Liberación de Enzimas Hepáticas Mediada por Mecano-Transducción.** Se llevaron a cabo otros protocolos experimentales en el mismo modelo de perfusión de hígado aislado, para probar el papel que ejercen otros factores. La participación del calcio se evaluó por la adición del catión (2 mM) al medio de perfusión. El papel del glucocáliz endotelial también se estudió, utilizando enzimas capaces de degradar los residuos de carbohidratos presentes en las glucoproteínas que componen las membranas endoteliales, como son la heparinasa (EC 4.2.2.7), condroitinasa (EC 4.2.2.4), hialuronidasa y una lectina, el complejo formado por la ferritina unida a concanavalina A. Estas enzimas y la lectina se administraron separadamente al medio de perfusión (15 mU/L); también se aumentó la magnitud de estrés de fricción al aumentar la viscosidad del medio de perfusión al agregarle dextran (p.m. 70 kDa) al 10% (p/v). Estos protocolos se encuentran reportados con anterioridad (**89,90,91**). Finalmente, se evaluó el papel del NO, utilizando un inhibidor de la NO Sintetasa, L-NAME (20  $\mu$ M) y midiendo la cantidad de NO generado por medio del método reportado por Hortelano et al. (**91**). En todos estos protocolos, siempre se probó el efecto de aumentar la magnitud del flujo de perfusión tanto en hígados provenientes de animales controles y en aquellos sujetos a una HP del 70%.

**Análisis Estadístico.** La velocidad de liberación de las enzimas hepáticas se calculó por el programa Kinetics Enzfitter Program, basándonos en las consideraciones propuestas por Peltenberg et al. sobre la simultaneidad de liberación de enzimas en preparaciones de hígados aislados (**92**). La significancia estadística entre grupos se analizó por medio de una prueba de ANOVA de “dos colas” y, en el caso de significancia (establecida en  $p < 0.01$ ), se aplicó una prueba *ad-hoc* que en este caso fue la de Student's *t*-test.

## ***RESULTADOS***

**Actividades Séricas de Enzimas Después de la HP.** Durante las primeras horas post-HP DEL 70%, se observó una elevación importante de las actividades enzimáticas, pero el aumento de dichas enzimas fue de diferente magnitud, dependiendo de la enzima estudiada (Figura 1). Las actividades “absolutas” de las enzimas estudiadas en suero fueron mayores para aquellas proteínas localizadas en el citoplasma del hígado, como la LDH, ALT y AST. La LDH mostró una disminución inicial a las 6 h post-HP, pero su actividad aumentó significativamente a partir de esta hora y alcanzó un pico máximo a las 24 h post-cirugía; en cambio, la TGP mostró un aumento lineal con el tiempo post-HP y también mostró un pico de actividad de 5 a 6 veces sobre los niveles séricos de ALT en controles (Figura 1). Posteriormente, ambas enzimas citoplásmicas retornaron a su nivel basal. Las enzimas localizadas en mitocondria, como la OCT, GDH, mostraron patrones similares de liberación después de la HP, pero sus aumentos fueron de mucho mayor magnitud (30 a 80 veces) cuando se compararon las actividades séricas de los controles (Figura 1). Para enzimas localizadas en ambos espacios subcelulares, como la MDH y la IDH, las fluctuaciones encontradas posterior a la HP fueron más complejas (Figura 1). Los niveles séricos de TGO y de MDH aumentaron en mucho menor medida que los de la TGP. La IDH tuvo dos picos de actividad posterior a la HP, el mayor 6 h post-HP ( $38 \pm 6$ , vs.  $4 \pm 1$  UI/L, en controles,  $p < 0.01$ ), y el segundo pico también fue a las 24 h ( $23 \pm 3$ ), regresando a su nivel basal, posteriormente. Tanto los niveles de FA así como los de la GGT (enzimas citoplásmicas) solo presentaron incrementos pequeños y no lineales con el curso temporal post-cirugía (no mostrado).

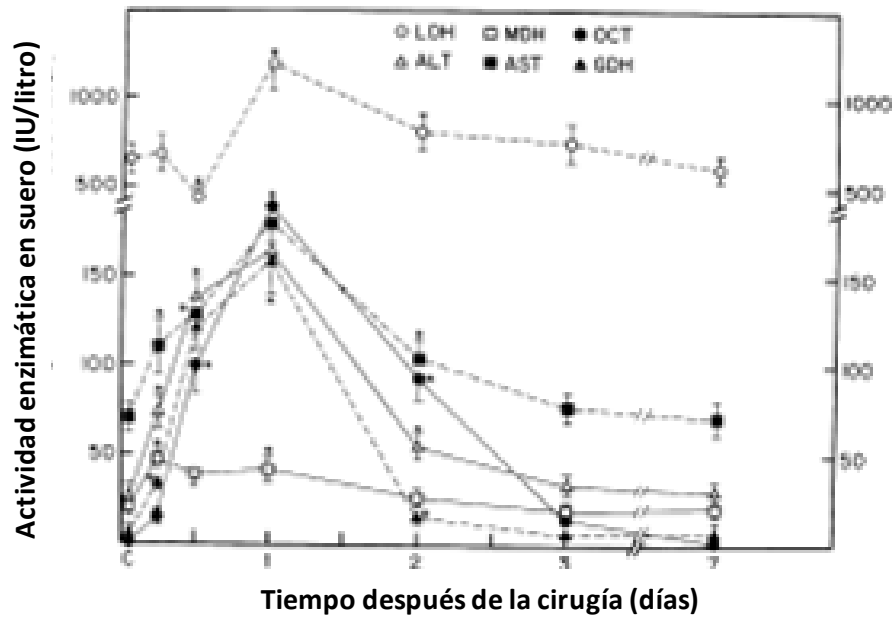
La actividad sérica de la ALT varió mucho más que la de la AST. De hecho, la relación TGO/TGP se propone como un indicador de diferentes tipos de daño hepático. En

nuestras condiciones, encontramos un efecto opuesto al encontrado durante el daño hepático (un aumento de la relación AST/ALT); de hecho el cociente AST/ALT en controles (2.6), se disminuyó significativamente en los animales sometidos a HP a las 24 horas (1.1) y regresó al valor control (2.4) a las 72 h posteriores a la HP del 70%.

### **Niveles de Enzimas en Hígados de Ratas Controles y de Aquellas Sometidas a una**

**HP.** A pesar de que durante la regeneración hepática en ratas se presentó niveles altos de actividades enzimáticas en suero, la cantidad total de estas enzimas en el tejido hepático no se modificó significativamente, con la excepción de la actividad de LDH (**Tabla 1**). Las actividades de ambas aminotransferasas tendieron a disminuir, pero la actividad hepática de la LDH si decayó significativamente en el hígado en proliferación, pero estas actividades enzimáticas se normalizaron a los 7 días posteriores a la HP (Tabla 1). Por otro lado, fue sorprendente encontrar que las actividades de las enzimas mitocondriales, OCT and GDH, en el hígado remanente no disminuyeron, a pesar de su gran extrusión hacia la circulación sistémica después de una HP del 70% (**Tabla 1**). De tal manera, no encontramos una correlación entre la magnitud de liberación de enzimas y sus actividades encontradas en muestras de hígado.

**Figura 1. Perfil de las Actividades Séricas de varias Enzimas en Muestras Tomadas a Varios Tiempos Posteriores a una HP.**



Las actividades enzimáticas se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar de 6 observaciones independientes por punto experimental, para las actividades de la lactato deshidrogenasa (LDH), alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), ornitín carbamoiltransferasa (OCT), malato deshidrogenasa (MDH), y glutámico deshidrogenasa (GDH). Los valores de las actividades enzimáticas en los controles se muestran bajo la letra "C" (controles).



**Tabla 1. Actividades Enzimáticas en homogenados de hígado obtenidos de animales controles y de aquellos sujetos a HP del 70%.**

Grupo Experimental	Actividad total ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de proteína hepática)				
	ALT	LDH	AST	OCT	GDH
Controles	$0.45 \pm 0.04$	$8.1 \pm 0.9$	$0.75 \pm 0.08$	$1.1 \pm 0.1$	$1.5 \pm 0.2$
HP del 70% - 12 h	$0.33 \pm 0.04$	$4.1 \pm 0.5^*$	$0.58 \pm 0.08$	$1.3 \pm 0.1$	$1.2 \pm 0.2$
HP del 70% - 24 h	$0.42 \pm 0.04$	$3.6 \pm 0.4^*$	$0.70 \pm 0.10$	$1.0 \pm 0.1$	$1.8 \pm 0.3$
HP del 70% - 48 h	$0.36 \pm 0.04$	$5.1 \pm 0.7^*$	$0.68 \pm 0.08$	$1.1 \pm 0.1$	$1.4 \pm 0.3$
HP del 70% - 170 h	$0.33 \pm 0.03$	$7.5 \pm 0.8$	$0.63 \pm 0.09$	$0.9 \pm 0.2$	$1.2 \pm 0.2$

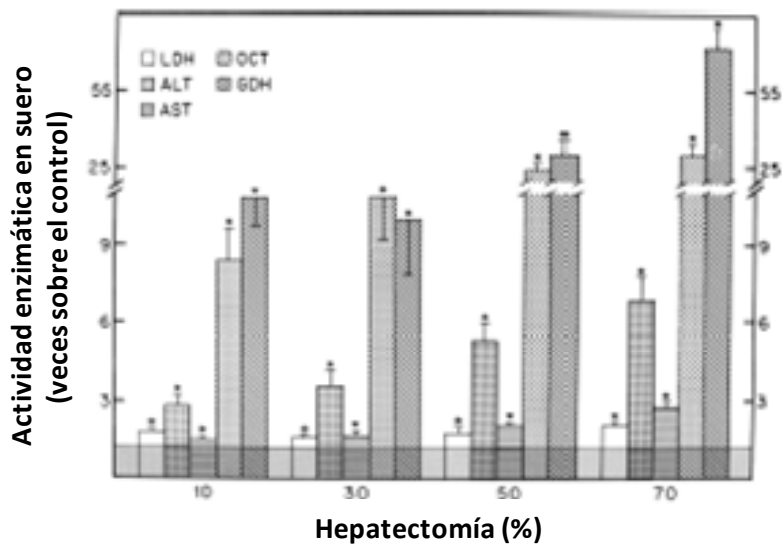
Las actividades enzimáticas están expresadas con el promedio  $\pm$  error estándar de 6 observaciones independientes por punto experimental. Los homogenados de hígado se realizaron en una solución amortiguadora (pH 7.4) de sacarosa 250 mM, TRIS-HCl 10 mM y EDTA 1 mM, determinándose aquí las actividades enzimáticas por métodos espectro-fotométricos. Estadística: \* $p < 0.01$  contra los animales controles.

**La Actividad Sérica de Enzimas en Función de la Cantidad Removida de Tejido Hepático.** La magnitud de pérdida de la masa hepática influyó las actividades séricas de las enzimas liberadas. Se encontró un patrón variable de actividades séricas de enzimas hepáticas con hepatectomías en un rango de 10 a 30% de la masa hepática (**Figura 2**). La LDH alcanzó rápidamente su máxima actividad sérica, mientras que tanto la ALT como la AST se fueron elevando en suero en una forma correlativa con la magnitud de pérdida de masa hepática. En cambio, tanto la OCT como la GDH mostraron un claro umbral de máxima respuesta, ya que en el rango de HP del 10 al 30%, no hubo linealidad en sus aumentos, y sus actividades séricas se incrementaron

abruptamente con una HP de más de un 40% de la masa hepática (**Figura 2**). Los aumentos séricos de FA, GGT o de IDH no correlacionaron con la cantidad de hígado removido (no mostrado).

**Liberación de Enzimas por el Hígado Aislado y Perfundido *in vitro* Provenientes de los Grupos Experimentales.** Con esta serie de experimentos confirmamos el origen hepático de las enzimas séricas que se elevan después de una HP del 70%, utilizando hígado perfundido, rebanadas hepáticas y hepatocitos aislados. Cuando los hígados de animales sujetos a HP (12 h post-cirugía) se perfundieron a una velocidad constante  $3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  (que es aproximadamente 3 veces sobre los hígados controles), se liberó significativamente las actividades de ALT, OCT y LDH, y en menor magnitud para la GDH, las cuales siempre fueron mayores que en los controles a la misma velocidad de flujo de perfusión (**Tabla 2**). Estos efectos inducidos por la HP fueron evidentes aún entre 24 a 48 h post-cirugía, pero ya no se observaron a los 7 días post-HP. En la ausencia de una velocidad impuesta de flujo, como es el caso de las rebanadas hepáticas, también se observó una liberación mayor de enzimas, en especial de la OCT y la GDH, en muestras de hígado provenientes de animales sujetos a una HP del 70% (**Tabla 2**). Contrastando con las preparaciones de hígado completo y de rebanadas hepáticas., los hepatocitos aislados liberaron una menor cantidad de enzimas al medio y no se observaron diferencias importantes entre ambos grupos experimentales (**Tabla 2**).

**Figura 2. Actividades Séricas de Varias Enzimas en Función de la Magnitud del Cociente Flujo/Masa Hepática *In vivo*.**



Las actividades enzimáticas se expresan como el promedio  $\pm$  error estándar ( $n=6$ ) de número de veces sobre las actividades del control, para las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH), alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), ornitín carbamoiltransferasa (OCT), y glutámico deshidrogenasa (GDH). La relación Flujo sanguíneo/masa hepática se modificó *in vivo* realizando una serie de hepatectomías comprendiendo desde la remoción del 10% hasta el 70% de la masa del hígado, y se compararon con el grupo control (indicado en la figura por la barra sombreada inferior). Los símbolos para cada enzima se encuentra en la parte superior de la figura. La significancia estadística fue de:  $*p<0.01$  contra el grupo de animales controles.

**Tabla 2. Liberación de Actividades Enzimáticas a partir de Hígados Aislados, Rebanadas Hepáticas y Hepatocitos Obtenidos de Animales Controles y de aquellos Sujetos a HP del 70%.**

Grupo Experimental	Enzimas liberadas ( $\text{mU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de hígado)				
	ALT	LDH	AST	OCT	GDH
<b>Hígado Perfundido</b>					
Controles	6 ± 1	18 ± 3	4 ± 1	20 ± 3	1.5 ± 0.4
HP del 70% - 12 h	42 ± 6*	34 ± 5	14 ± 3*	143 ± 23*	4.3 ± 0.6*
HP del 70% - 24 h	27 ± 4*	134 ± 24*	11 ± 2*	67 ± 10*	5.7 ± 1.0*
HP del 70% - 48 h	23 ± 4*	16 ± 3	8 ± 2	39 ± 5	1.8 ± 0.3
HP del 70% - 170 h	10 ± 3	46 ± 6*	9 ± 3*	13 ± 3	1.6 ± 0.2
<b>Rebanadas Hepáticas</b>					
Controles	4 ± 1	14 ± 2	3 ± 1	15 ± 3	1.2 ± 0.2
HP del 70% - 12 h	5 ± 1	3 ± 1*	4 ± 1	8 ± 1*	4.8 ± 0.6*
HP del 70% - 24 h	6 ± 1	7 ± 2*	4 ± 1	32 ± 4*	2.1 ± 0.4*
HP del 70% - 48 h	7 ± 2	17 ± 2	3 ± 1	30 ± 5*	0.9 ± 0.2
HP del 70% - 170 h	3 ± 1	3 ± 1*	2 ± 0.5	14 ± 2	0.9 ± 0.2
<b>Hepatocitos</b>					
Controles	3 ± 1	9 ± 2	3 ± 1	9 ± 1	0.7 ± 0.2
HP del 70% - 24h	2 ± 0.5	4 ± 1*	2 ± 1	5 ± 1*	0.6 ± 0.1
HP del 70% - 48 h	3 ± 1	5 ± 1*	2 ± 1	7 ± 2	0.7 ± 0.1

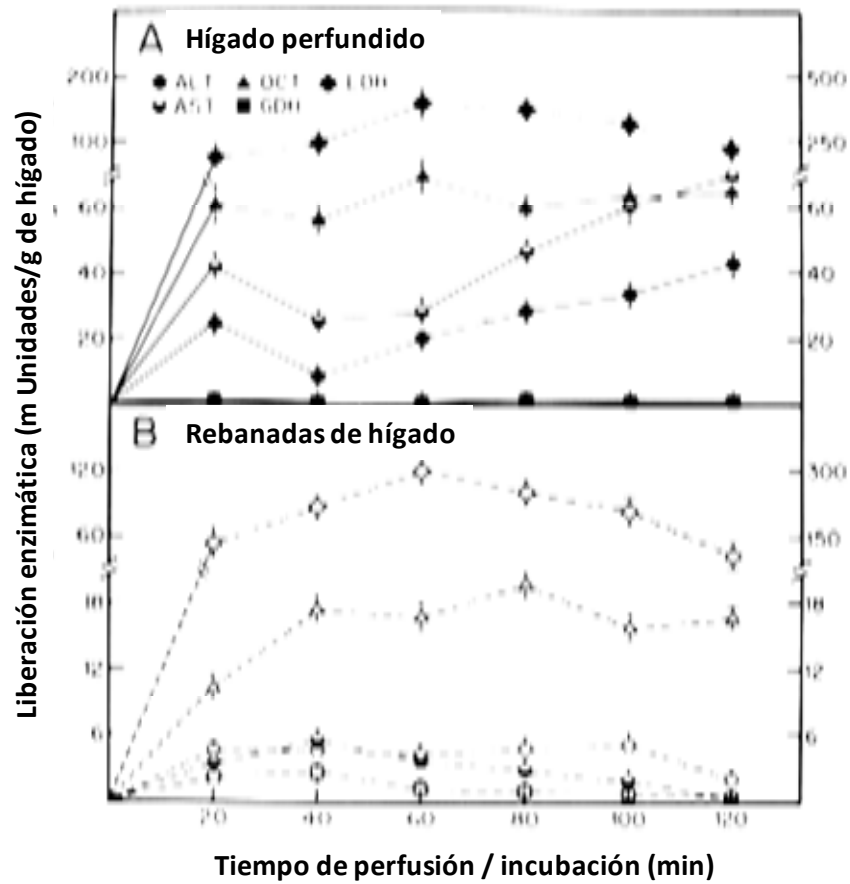
Las actividades enzimáticas están expresadas como el promedio ± error estándar de 6 observaciones independientes por punto experimental. Los hígados se perfundieron a una velocidad de flujo constante de 1 (controles) o 3  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de hígado en animales con HP. Estadística: \* $p < 0.01$  contra los animales controles.

Estos datos indican la existencia de un mecanismo dependiente del flujo sanguíneo, y otro independiente, que controlan la tasa de liberación de enzimas. La liberación de enzimas LDH, OCT y GDH se mantuvo constante en los perfusados obtenidos de los hígados aislados, mientras que en la ALT y la AST se presentaron fluctuaciones mayores, alcanzando un equilibrio a tiempos posteriores de perfusión (**Figura 3A**). La liberación de enzimas por rebanadas hepáticas alcanzó rápidamente un equilibrio que se mantuvo durante las dos horas que duró la incubación (**Figura 3B**).

**Efectos de Variar la Magnitud del Flujo de Perfusión sobre la Liberación de Enzimas por el Hígado Aislado.** Una vez demostrada la selectividad de la liberación de enzimas por el hígado en regeneración, se estudió el efecto de incrementar la velocidad de flujo de perfusión sobre la liberación de enzimas por el hígado perfundido. Con un flujo de  $0.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de hígado, la liberación de enzimas al medio de perfusión fue discreta, pero ésta incremento en una forma progresiva cuando la velocidad de flujo se elevó de 1 a  $3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de hígado, además con una clara predominancia de enzimas localizadas en el citoplasma (LDH y ALT) (**Figura 4**, símbolos abiertos). En hígados provenientes de animales sujetos a HP (símbolos cerrados), el aumento en la velocidad de flujo produjo un aumento drástico en la liberación de OCT y de ALT, las cuales siempre fueron mayores que las de GDH y LDH, respectivamente, 24 h después de la cirugía (**Figura 4, panel derecho**). A pesar de los grandes aumentos en la liberación de enzimas al medio, sobre todo a velocidades altas de flujo de perfusión, el proceso fue reversible al retornar al flujo considerado como fisiológico (**Figura 4**).

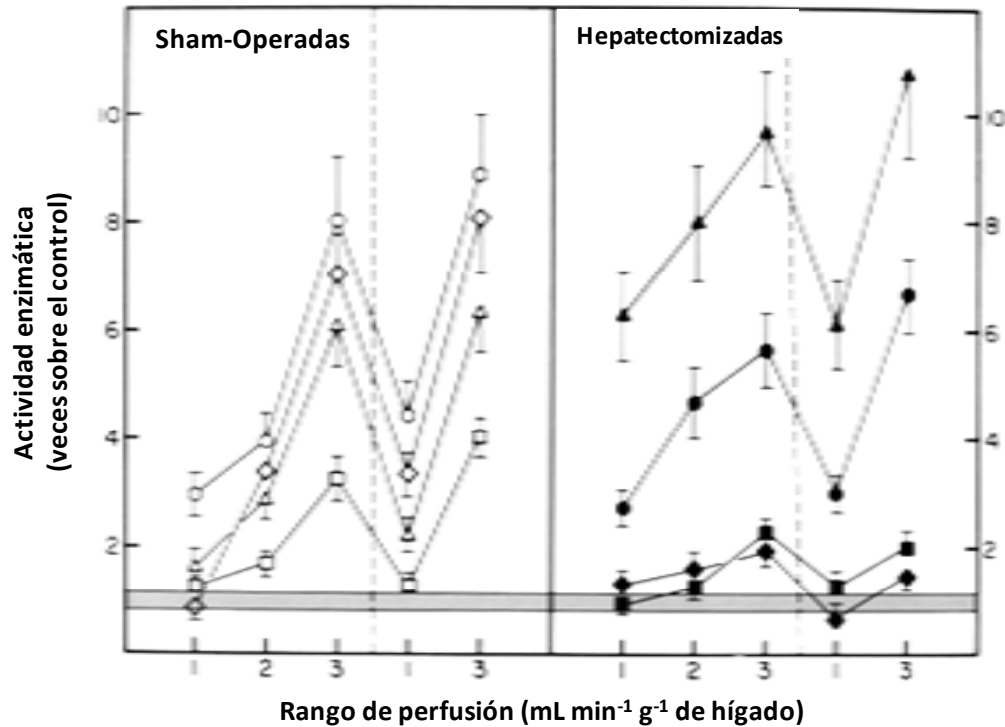
**Evaluación Estructural y Funcional de los Hígados Aislados de Animales Controles y de aquellos Sujetos a HP.** En concordancia con estudios previos, el estudio histo-patológico de los hígados perfundidos *in vitro* solo mostraron un aumento progresivo en la cantidad de líquido extracelular, con la presencia de algunos hepatocitos acidofílicos (**Figura 5-1**). Estos cambios fueron menos marcados en los hepatocitos de hígados controles, o en hígados de animales con HP, pero perfundidos a velocidades de flujo menores (**Figura 5-3**), por lo que no se encontró una clara evidencia de daño estructural. Cuando se varió la velocidad de flujo de perfusión, se afectó la producción hepática de urea. Tanto en hígados controles como en los que provenían de animales con HP, la producción de urea se estimuló aumentando el flujo, sin que se observaran diferencias significativas entre los dos grupos experimentales (**Figura 5A**). La magnitud de lipoperoxidación aumentó cuando el flujo también se incrementó, pero este evento también fue reversible y regresó a la línea basal cuando la velocidad de flujo también retornó a la basal. A pesar de que la lipoperoxidación de los hígados remanentes fue más alta inicialmente que en los tejidos controles, cuando se aumento la velocidad de flujo de perfusión, dicha lipoperoxidación fue significativamente menor en los animales con HP, que aquella encontrada en los hígados provenientes de animales controles (**Figura 5B**).

**Figura 3. Curso Temporal de la Liberación de Enzimas de Hígado Perfundidos y de Rebanadas Hepáticas Obtenidas de Animales Controles.**



Las actividades enzimáticas están expresadas como el promedio  $\pm$  error estándar de 6 animales diferentes. Los perfusados y las muestras del medio de incubación se tomaron cada 20 min. En el panel A, la velocidad de flujo fue de  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de hígado. Cada enzima aquí medida está representada por los símbolos en la parte superior del panel A.

**Figura 4. Efectos de Cambiar la Magnitud del Flujo sobre la Liberación de Enzimas de Hígado Perfundidos Obtenidos de Animales Controles y de aquellos Sujetos a HP.**



Las actividades enzimáticas están expresadas como el promedio  $\pm$  error estándar de 6 observaciones por punto experimental y como veces sobre las actividades controles. La línea sombreada corresponde al flujo basal, que en este caso fue  $0.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de hígado. Las actividades enzimáticas se midieron en perfusados de hígados aislados para las siguientes enzimas: LDH (rombos), ALT (círculos), OCT (triángulos), y para la GDH (cuadrados). Las líneas punteadas verticales indican el periodo de ajuste del flujo a una velocidad de  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de hígado. Nota. Todas las actividades enzimáticas aumentaron significativamente, excepto la GDH a valores menores a  $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de hígado.



**Liberación de Enzimas por Hígados Perfundidos bajo Condiciones *Ex-vivo*.** Ya que la magnitud del flujo influenciaba la tasa de liberación de enzimas, probablemente a través de fuerzas físicas moduladas por el endotelio vascular, se determinó la posibilidad de reproducir este efecto en condiciones *ex-vivo*, es decir, en condiciones donde la influencia de factores extra-hepáticos se elimina. Para esto, se llevó a cabo una resección de un 70% de la masa hepática, pero *in vitro*, y se logró reproducir patrones muy similares de liberación de enzimas, como se muestra en la **(Figura 6)**.

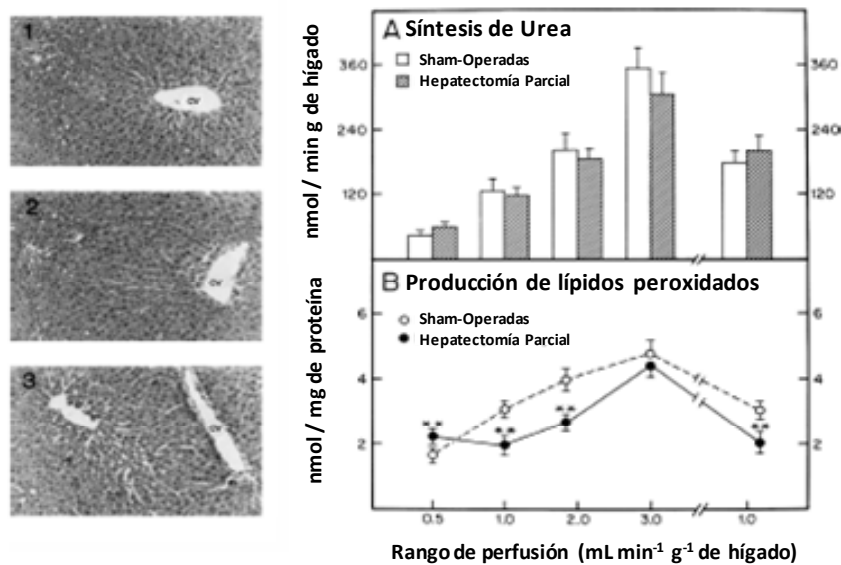
Tomando en cuenta estos resultados, se podría decir que la HP induce una liberación selectiva de enzimas hepáticas hacia la circulación, que no se relaciona con daño del hígado en regeneración, dependiente de las fuerzas físicas generadas por la presión hidrostática, e independiente de factores extra-hepáticos.

**Efectos de la Inhibición de la Síntesis de Proteínas sobre la Liberación de Enzimas Hepáticas Inducida por una HP del 70%.** Las enzimas LDH, ALT, AST, GDH, y OCT, son las que demostraron patrones más regulares en respuesta a la HP y a los efectos del flujo hidrostático. De las cinco enzimas que se probaron, prácticamente todas dieron un pico máximo de actividad sérica a las 24 h posteriores a la HP. Sin embargo, ninguna de ellas se modificó por el tratamiento *in vivo* con cicloheximida, que es un inhibidor efectivo de la síntesis de proteínas en células eucariontes **(Figura 7A)**.

**Efecto de la Inhibición en la Síntesis *de novo* de Proteínas sobre la Liberación de Enzimas *In vitro* en Hígados Aislados.** A pesar de que la cicloheximida no indujo ningún cambio en la liberación de enzimas inducida por HP, la inhibición de síntesis proteica cambió el patrón de liberación enzimática en respuesta a un incremento en la velocidad de flujo, cuando se administró cicloheximida a animales sometidos a HP

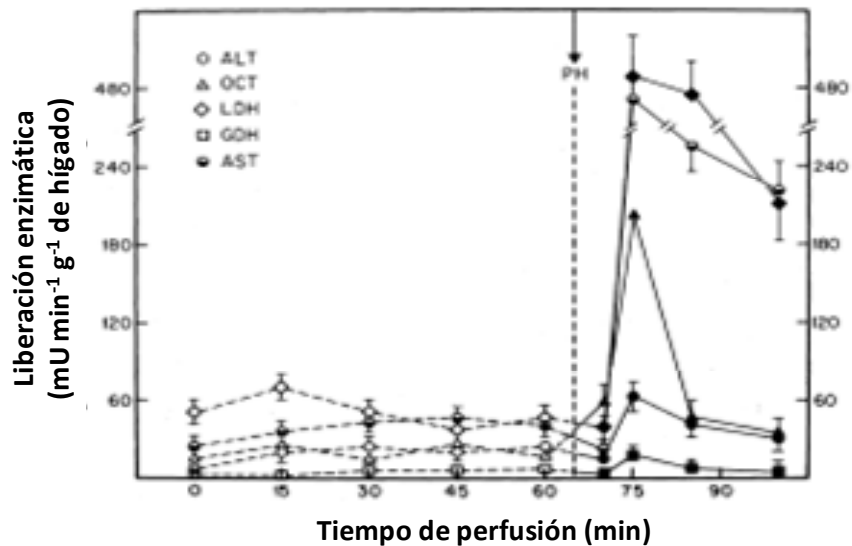
(Figura 7B y C). En estos últimos, la liberación de las transaminasas mostró una tendencia a disminuir, pero la liberación de OCT si disminuyó significativamente y la GDH aumentó (Tabla 4). Solo bajo estas condiciones, pudimos encontrar que la liberación relativa de la GDH fue mayor que la de OCT (Figura 7B y C).

**Figura 5. Evaluación Histológica, Producción de Urea y Lipoperoxidación en Hígados Aislados de Animales Controles y con HP del 70% Sujetos a Incrementos en la Magnitud del Flujo de Perfusión.**



Se muestran micrografías representativas de hígados controles con una tinción de hematoxilina-eosina, para (1) perfundido con 1 ml, y (2) con 3 ml • min<sup>-1</sup> • g<sup>-1</sup> de hígado. La micrografía numerada como (3) corresponde a una muestra de hígado de animales con HP y perfundidos a una velocidad de 3 ml • min<sup>-1</sup> • g<sup>-1</sup> de hígado. E los paneles A y B, los resultados están expresados como el promedio ± error estándar de 6 observaciones por punto experimental. En panel A, la producción de urea se determinó en los perfusados, mientras que en el panel B, la cantidad de lípidos peroxidados se determinó en biopsias de tejido hepático. Significado estadística: \*p<0.01 comparado con el grupo control.

**Figura 6. Efectos de una HP “Ex-vivo” sobre la Liberación de Enzimas de Hígados Aislados en Animales Controles.**

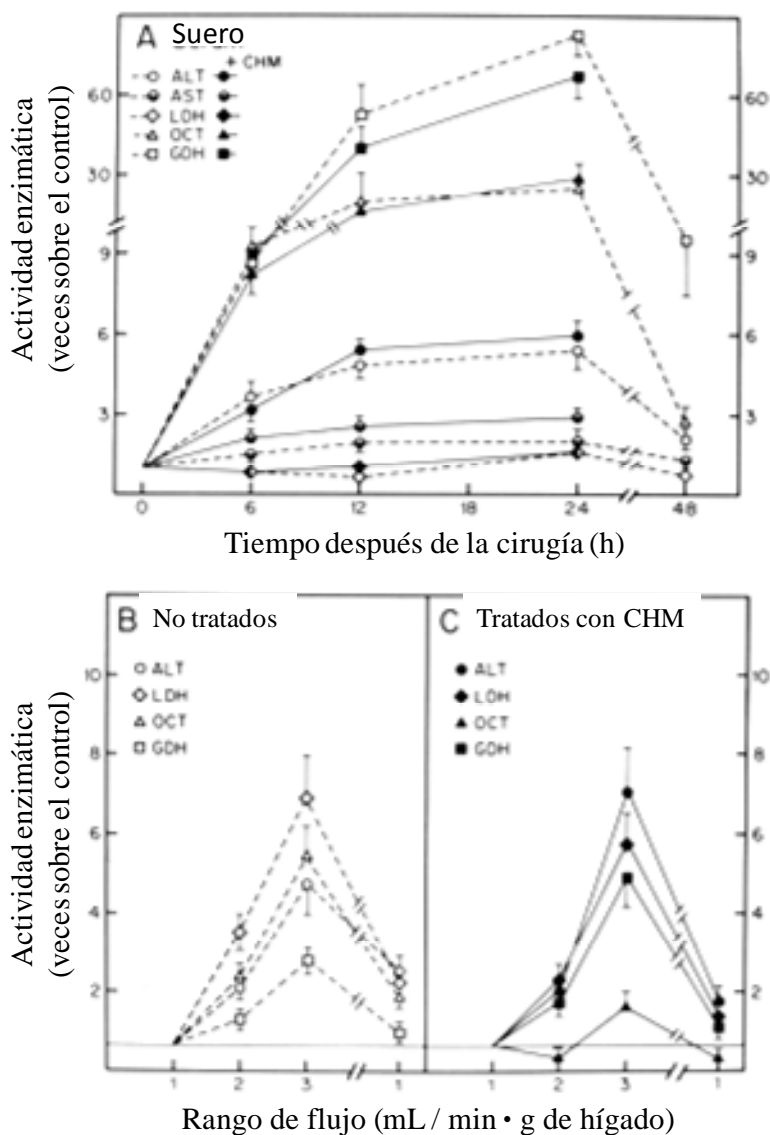


Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  error estándar de 5 observaciones por punto experimental. Los hígados controles se perfundieron a un flujo de  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de hígado por un periodo de estabilización de una hora; entonces, se realizó la remoción del 70% del hígado perfundido (indicado por la flecha) y se continuó la perfusión por otros 60 min.

**Efectos del Calcio y de las Modificaciones sobre el Glucocáliz Endotelial en Hígados Perfundidos de ambos Grupos Experimentales.** Añadiendo calcio (1.8 mM) al medio de perfusión, se indujo un aumento en la liberación de enzimas como respuesta a un aumento en la velocidad del flujo (**Parte superior de Figura 8**). El calcio aumentó significativamente la liberación de las enzimas citoplásmicas, ALT, LDH, y AST (**Tabla 3**). En forma opuesta, la liberación de OCT se disminuyó significativamente por calcio, y la de la GDH también disminuyó, pero en una menor magnitud (**Figura 8, superior**). Cuando se utilizaron bloqueadores de los canales con entrada para el calcio

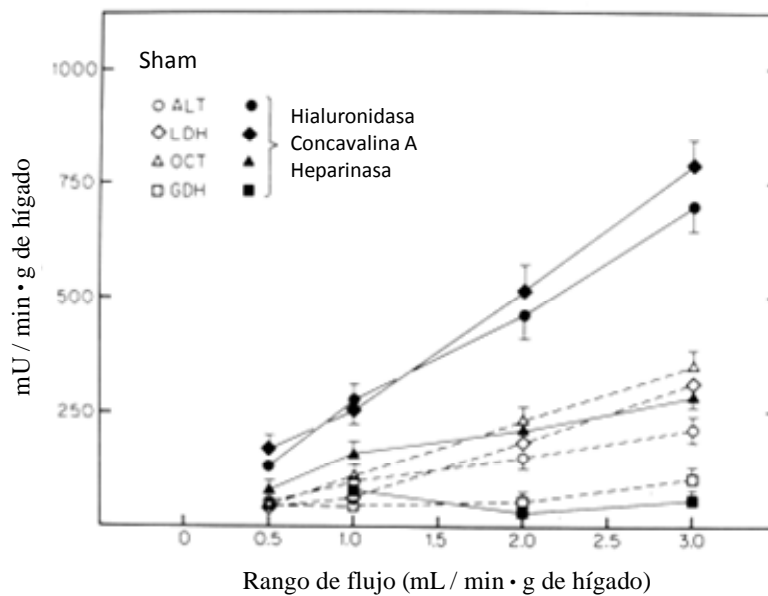
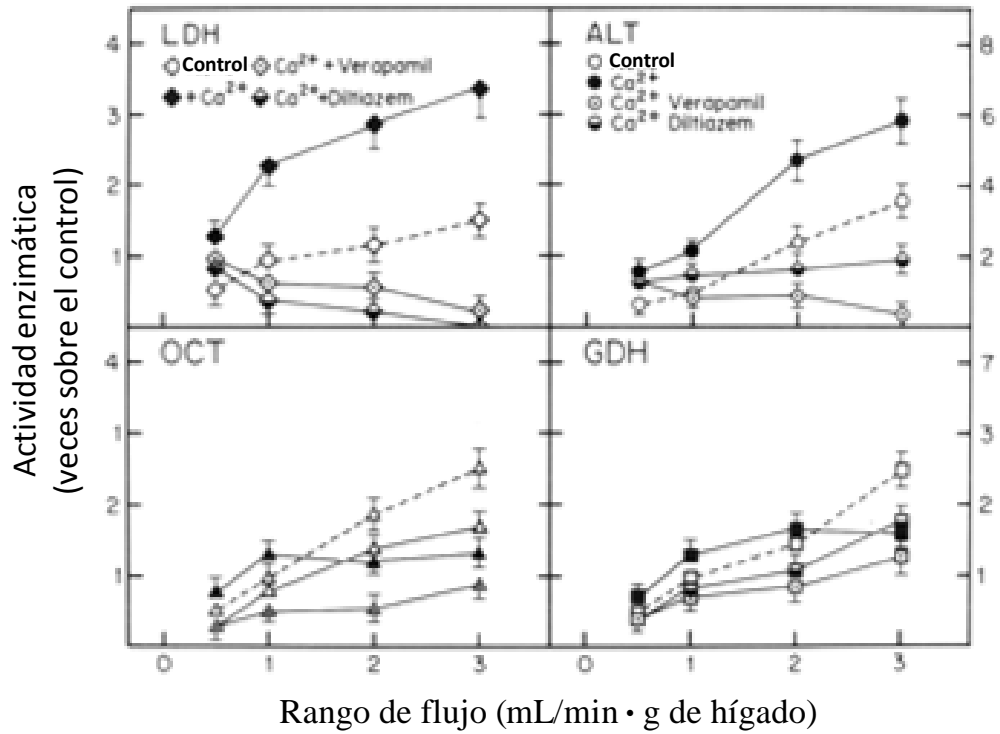
extracelular, se encontraron efectos muy similares (**Figura 8, panel superior**). En la presencia de calcio, los bloqueadores verapamil y diltiazem redujeron en forma importante la liberación de ALT y la de LDH; la OCT también se disminuyó en su liberación. Las liberación de AST y de GDH también respondieron negativamente al bloqueo de la entrada de calcio (**Figura 8, Tabla 3**). De este modo, el calcio si favoreció la liberación de enzimas (principalmente las citoplásmicas), por lo que decidimos explorar el papel del glucocáliz endotelial sobre el control de la liberación de enzimas (**Figura 8, panel inferior**). En una primera aproximación, se agregaron enzimas que degradan los residuos de carbohidratos constituyentes de las glucoproteínas presentes en el glucocáliz. De las enzimas usadas, solo la condroitinasa no tuvo ningún efecto sobre la liberación de enzimas. La adición de hialuronidasa, heparinasa y de ferritina-concanvalina A, que se une a los residuos de ácido siálico, indujeron cambios diferenciales en la liberación de enzimas (**Figura 8**). Con la combinación de los modificadores del glucocáliz encontramos un incremento drástico en la liberación de las enzimas citoplásmicas (LDH y ALT) y la de la AST (Figura 8 y Tabla 3). Sorprendentemente, la liberación de las enzimas mitocondriales, OCT y GDH, mostraron el efecto contrario, al disminuir por la presencia de los modificadores del glucocáliz endotelial (**Figura 8, panel inferior; Tabla 3**).

**Figura 7. Efecto de la Administración de Cicloheximida sobre el Perfil de Actividades Séricas de las Enzimas en Animales Sujetos a HP del 70%.**



Las actividades enzimáticas están expresadas como promedios  $\pm$  error estándar de 6 determinaciones individuales por punto experimental. En el panel A, se muestran las actividades enzimáticas en los sueros de animales controles: LDH:  $585 \pm 82$ , ALT:  $25 \pm 3$ , AST:  $112 \pm 17$ , OCT  $3.5 \pm 0.4$ , y GDH:  $1.6 \pm 0.3$  UI  $\cdot$  L<sup>-1</sup>. Los símbolos vacíos representan a las ratas sujetas a HP del 70%, mientras que los símbolos sólidos son los animales con HP y tratados con 1.8 mg/kg de peso con cicloheximida. Liberación de enzimas a partir de hígados perfundidos sin (panel B) o con (panel C) *in vivo* tratamiento con cicloheximida.

**Figura 8. Efectos del Calcio, de Antagonistas de sus Canales y de los Modificadores del Glucocáliz Endotelial sobre la Liberación de Enzimas en Hígados Aislados de Animales Controles.**



Los resultados de las actividades enzimáticas están expresado como promedio  $\pm$  error estándar y como veces sobre los controles de los valores para LDH, ALT, GDH, and OCT. Las adiciones al medio de perfusión fueron: calcio (2 mmolas/L), verapamil (30  $\mu$ mol/L) o diltiazem (15  $\mu$ mol/L). Los símbolos para los grupos experimentales se indican en la parte superior de la figura. Los mismos símbolos valen para las actividades de OCT (triángulos) y para la GDH (cuadrados). En el panel inferior, la

**Efectos del Cambio en la Dirección de la Perfusión en Hígados Aislados de Animales Controles y los Sometidos a HP.** Los experimentos hasta aquí realizados nos dieron suficiente evidencia de la participación de componentes endoteliales en el control de la liberación de enzimas hepáticas; otro componente importante en el fenómeno de la mecano-transducción es la orientación o vector de la aplicación de la fuerza mecánica. Para esto, cambiamos la dirección del flujo de perfusión hacia un vector retrógrado, perfundiendo ahora de la vena cava a la porta (**Figura 9**). Bajo estas condiciones, en hígados controles se encontró una disminución en la liberación de ALT, mientras que se estimuló la liberación de las enzimas mitocondriales, OCT y GDH, cuando se compara con la perfusión a través de la vena porta (**Figura 9 y Tabla 4**). Otra vez en forma opuesta, la perfusión retrógrada en hígados aislados provenientes de animales sujetos a HP, promovió una alta liberación de las enzimas mitocondriales (**Figura 9 y Tabla 4**).

**Efecto de Incrementar el Estrés por Fricción y la Presión por Estiramiento sobre la Liberación de Enzimas Hepáticas.** Para examinar el efecto de incrementar el estrés por fricción sobre la liberación de enzimas hepáticas, se adicionó dextrán al 10% en la solución de perfusión (**Figura 10**). Tanto la ALT como la OCT fueron las enzimas que más respondieron al aumento en la viscosidad del medio de perfusión en hígados de animales controles (**Figura 10**). La ALT se liberó dos a tres veces más en la

presencia de dextrán, cuando la velocidad de flujo se incrementó 1 a 3 ml • min<sup>-1</sup> • g<sup>-1</sup> de hígado. La actividad de OCT aumentó linealmente cuando se incrementó la velocidad de flujo y se encontró que la relación OCT/ALT siempre fue más alta, independientemente de las condiciones experimentales (**Figura 10B**). En lo que se refiere a los hígados provenientes de animales sujetos a HP, los efectos que indujo el aumento de estrés por fricción fueron aún más dramáticos (**Figura 10B**); aquí las elevaciones de actividades enzimáticas fueron más rápidas en respuesta a un incremento en la velocidad del flujo, y no se encontraron diferencias entre la liberación de la OCT y de la ALT, a diferencia de lo que ocurrió con hígados controles (**Figura 10 y Tabla 4**). Por otro lado, al aumentar la magnitud de estrés por fricción (viscosidad), se logra obtener la tasa máxima de liberación de enzimas, principalmente demostrado en animales sujetos a una HP del 70% (**Figura 10 y Tabla 4**).

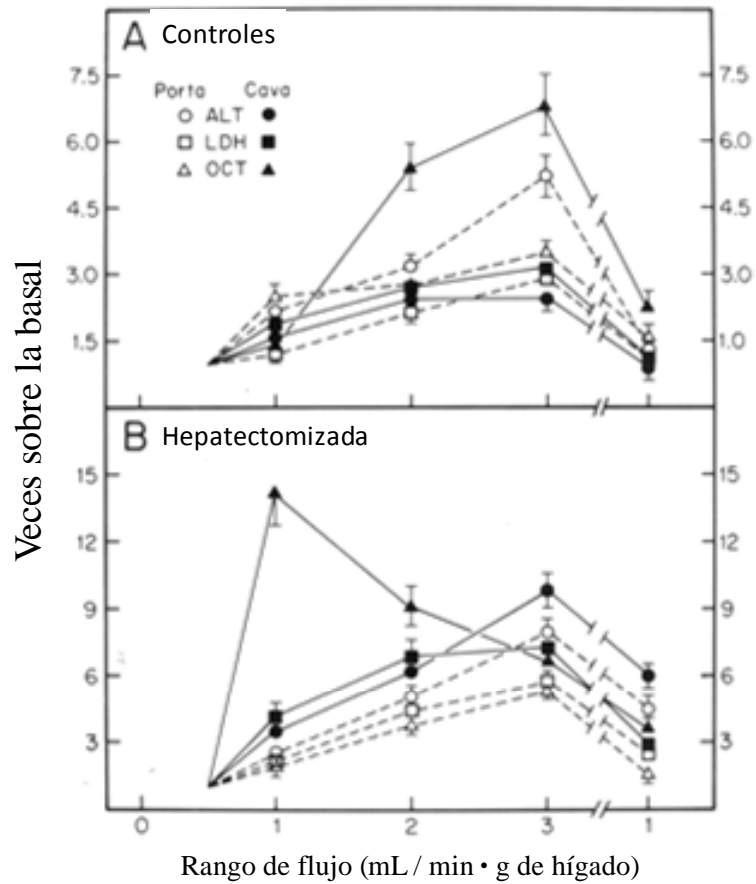


**Tabla 3. Cálculo de la Tasa de Liberación de Enzimas Hepáticas de Hígados Aislados en Animales Controles bajo Diferentes Condiciones Experimentales.**

Grupo Experimental	Cantidad de enzimas liberadas ( $\text{mU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de hígado)				
	TGP	LDH	TGO	OCT	GDH
<b>Controles</b>					
Basal	$28 \pm 5$	$48 \pm 7$	$20 \pm 3$	$57 \pm 9$	$10 \pm 2$
Aumentando el flujo	$107 \pm 19^*$	$288 \pm 54^*$	$38 \pm 5^*$	$260 \pm 39^*$	$19 \pm 3^*$
Más Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ )	$174 \pm 16^{***}$	$708 \pm 148^{***}$	$49 \pm 6^*$	$134 \pm 21^{***}$	$15 \pm 2$
Más $\text{Ca}^{2+}$ y verapamil	$12 \pm 3^{***}$	$44 \pm 8^{**}$	$16 \pm 2^{**}$	$89 \pm 15^{**}$	$8 \pm 2^{**}$
Más $\text{Ca}^{2+}$ y diltiazem	$55 \pm 9^{***}$	$22 \pm 4^{***}$	$31 \pm 6$	$93 \pm 16^{**}$	$12 \pm 2$
Más modificadores del glucocáliz	$626 \pm 75^{***}$	$1735 \pm 225^{***}$	$71 \pm 10^{***}$	$91 \pm 14^{**}$	$7 \pm 1^{**}$

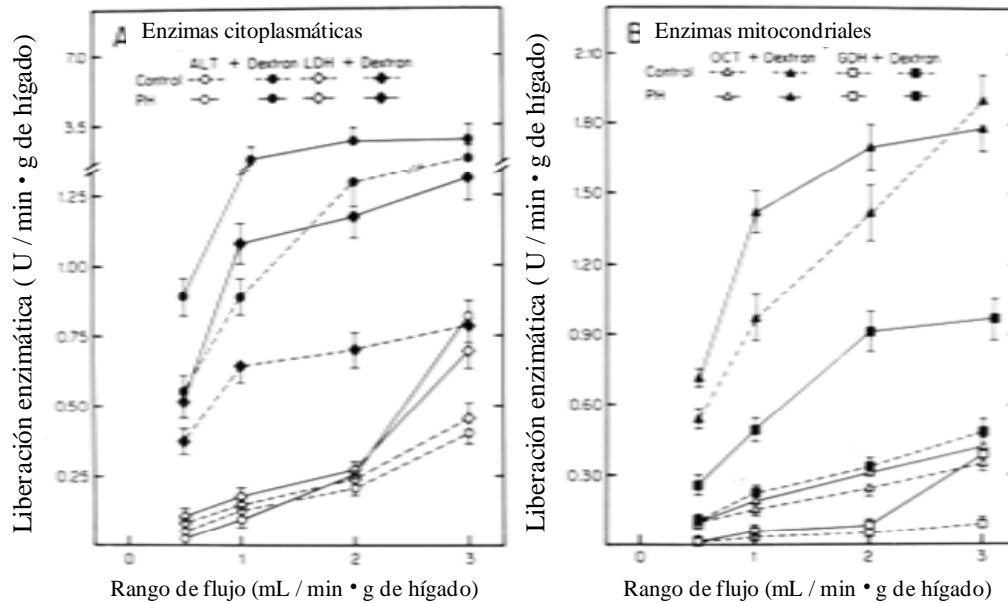
Las actividades enzimáticas están expresadas con el promedio  $\pm$  error estándar de 6 observaciones independientes por punto experimental usando el hígado perfundido como modelo experimental. Se calcularon las actividades enzimáticas a partir de la Figura 8. Estadística:  $*p < 0.01$  contra la condición basal, y  $**p < 0.01$  vs. aumento del flujo de perfusión.

**Figura 9. Efecto del Cambio de Dirección del Flujo de Perfusión sobre la Liberación de Enzimas por Hígados Aislados de Animales Controles y con HP del 70%.**



Las actividades enzimáticas están expresadas con el promedio  $\pm$  error estándar de veces sobre los valores controles con un flujo basal de  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de hígado para las actividades de LDH, ALT, GDH, and OCT, en animales controles y aquellos con HP. Las actividades enzimáticas se midieron en perfusados tanto de la vena porta (símbolos vacíos) o de la vena cava (símbolos sólidos).

**Figura 10. Efectos del Incremento en el Estrés por Fricción sobre la Liberación de Enzimas a partir de Hígados de Animales Controles y con HP.**



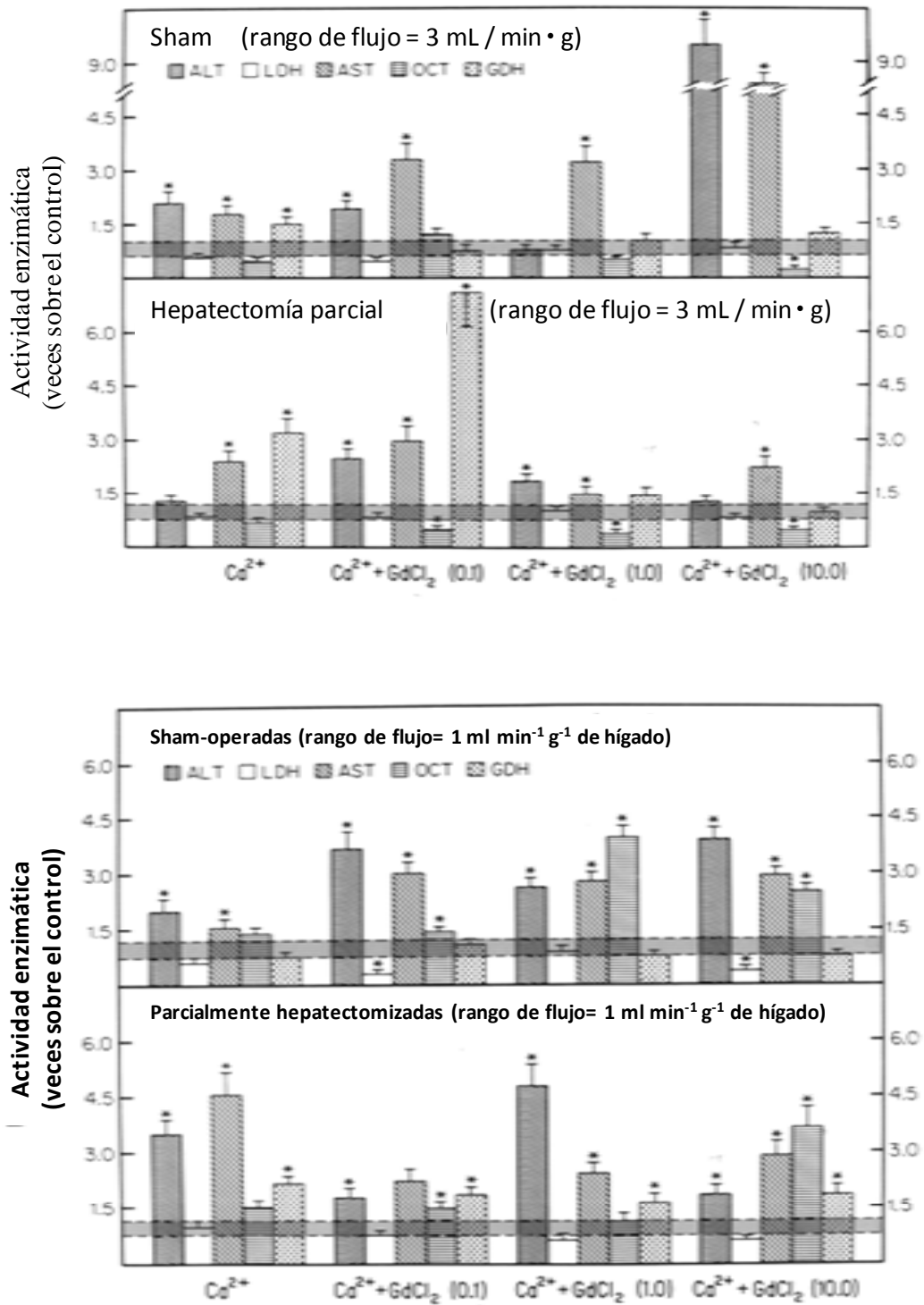
Los resultados son el promedio  $\pm$  error estándar de 6 observaciones individuales por punto experimental para las actividades de ALT, LDH, GDH, y OCT. Después de un periodo basal, (símbolos vacíos), los hígados se perfundieron con 10% de dextrán (símbolos sólidos).

**Efectos de Inhibir los Canales Iónicos Sensibles a Estiramiento (Mecanoreceptores) Utilizando Cloruro de Gadolinio sobre la Liberación de Enzimas Hepáticas.** Con el uso de concentraciones crecientes de gadolinio (0.1 a 10  $\mu\text{M}$ ) en el medio de perfusión, se aumentó la liberación de ALT, AST, y OCT, pero al mismo tiempo se disminuyó la liberación de LDH, sin afectarse significativamente la liberación de GDH, en hígados controles (**Figura 11, panel superior**), cuando se utilizó la velocidad fisiológica de flujo ( $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de hígado). El gadolinio también promovió un patrón similar sobre la liberación de enzimas hepáticas en hígados

obtenidos de animales sujetos a HP (**Figura 11, panel superior**); sin embargo, su efecto fue menos pronunciado en la liberación de GDH. Cuando la velocidad de flujo se incrementó gradualmente, el gadolinio aumentó aún más las actividades de la ALT, y de la AST en los perfusados, pero sin afectar la OCT y GDH y afectando en forma opuesta (disminución) la liberación de LDH, en hígados controles (**Figura 11, panel inferior; Tabla 4**). Además, el gadolinio no alteró la liberación de ALT y la LDH como respuesta al aumento del flujo, pero sí aumentó la liberación de las enzimas mitocondriales, OCT y GDH (**Figura 11 y Tabla 4**).

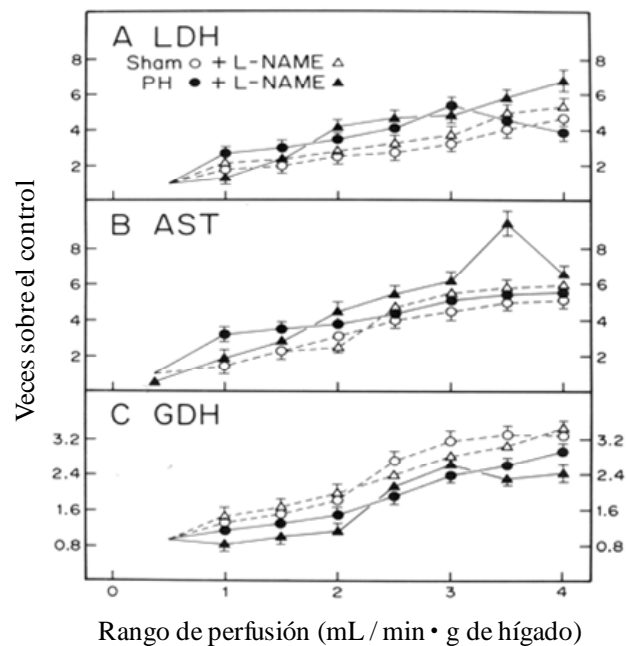
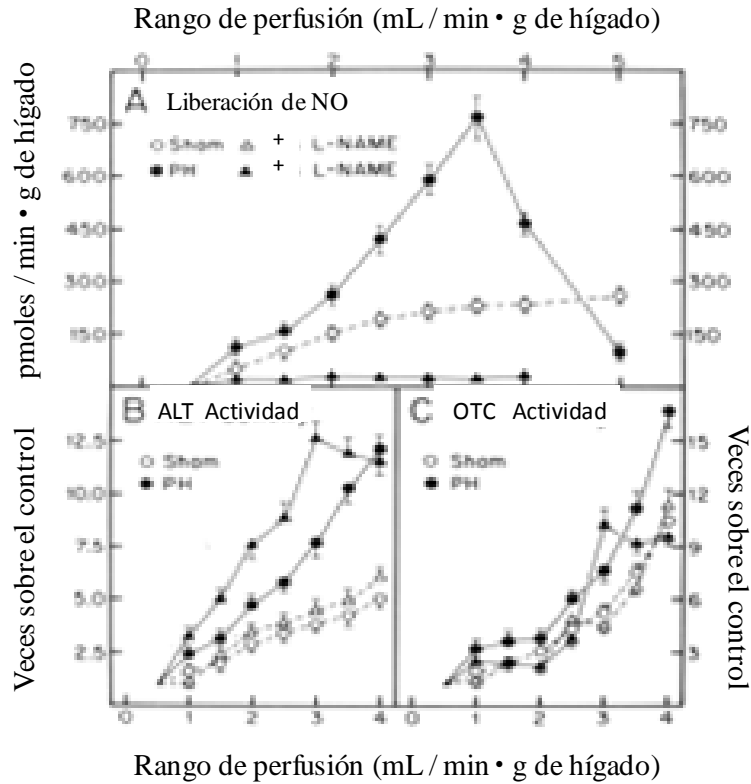
**Efectos de la Inhibición de la Actividad de la NO sintasa sobre la Liberación de Enzimas Hepáticas inducidas por la Magnitud del Flujo.** En ambos grupos experimentales, el aumentar la velocidad del flujo de perfusión promovió un aumento importante y significativo en la producción hepática de NO, la cual se observó exacerbada en órganos provenientes de animales sujetos a HP del 70% (**Figura 12, panel superior**). De tal manera, que los animales sujetos a HP presentaron una producción y liberación máxima de NO en un rango de flujo de 3 a 4 ml • min<sup>-1</sup> • g<sup>-1</sup> de hígado, y después decreció dramáticamente. A pesar de que el L-NAME añadido al medio de perfusión sí ejerció un fuerte efecto inhibitorio sobre la producción de NO, no se modificaron significativamente los patrones de liberación de enzimas hepáticas, se observó una pequeña elevación, como respuesta al ir aumentando la magnitud del flujo de perfusión impuesto en los hígados aislados de ambos grupos experimentales (**Figura 12, Tabla 4**).

**Figura 11. Efectos del Calcio y del Gadolinio (Inhibidor de los Canales Sensibles a Estiramiento) sobre la Liberación de Enzimas a partir de Animales Controles y aquellos con HP.**



Los resultados de las actividades enzimáticas se expresan como promedio  $\pm$  error estándar del número de veces sobre los controles (línea basal) para las actividades de LDH, ALT, AST, GDH, y OCT (barra sombreada). Las adiciones aquí fueron: calcio (2 mmolas/L), y cloruro de gadolinio (0.1 a 10  $\mu$ mol/L). Los símbolos para cada enzima estudiada se encuentra en la parte superior del panel A.

**Figura 12. Efectos de Inhibir la Producción de NO sobre la Liberación de Enzimas de Hígados Aislados a partir de Animales Controles y aquellos con HP.**



En el panel A (superior), los resultados en la liberación de NO se expresan como promedio  $\pm$  error estándar de 6 determinaciones individuales por punto experimental. En los paneles superiores B y C, las actividades enzimáticas se expresan como promedio  $\pm$  error estándar de veces sobre la línea basal de los controles (a una velocidad de flujo de  $0.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de hígado) para ALT y OCT, respectivamente. En los paneles inferiores (A-C), se usaron las mismas condiciones para evaluar la liberación de LDH, AST, y GDH, en la presencia (símbolos sólidas) o en ausencia (símbolos sólidos) de  $20 \mu\text{M}$  L-NAME.



**Tabla 4. Cálculo de la Liberación de Enzimas Hepáticas a partir de Animales Controles y de Ratas con HP del 70% bajo Diversas Condiciones Experimentales.**

Grupo Experimental	Cantidad de enzimas liberadas ( $\text{mU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de hígado)				
	ALT	LDH	AST	OCT	GDH
<b>Controles</b>					
Basal	$28 \pm 5$	$48 \pm 7$	$20 \pm 3$	$57 \pm 9$	$10 \pm 2$
Aumento del flujo	$125 \pm 20^*$	$211 \pm 36^*$	$43 \pm 5^*$	$227 \pm 41^*$	$19 \pm 3^*$
Perfusión retrógrada	$67 \pm 12^*$	$230 \pm 37^*$	$30 \pm 4$	$376 \pm 62^*$	$25 \pm 3^*$
Más calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ )	$174 \pm 26^*$	$708 \pm$ $148^{***}$	$49 \pm 6^*$	$134 \pm 21^*$	$15 \pm 2$
Más $\text{Ca}^{2+}$ y gadolinio	$386 \pm 65^{***}$	$290 \pm 61^*$	$123 \pm 18^{***}$	$188 \pm 33^*$	$10 \pm 2$
Más 10% dextran <sup>***</sup>	$2.16 \pm$ $0.12^{***}$	$0.98 \pm$ $0.06^{***}$	$1.98 \pm$ $0.24^{***}$	$3.86 \pm$ $0.56^{***}$	$0.95 \pm$ $0.20^{***}$
Más L-NAME	$149 \pm 27^*$	$258 \pm 44^*$	$53 \pm 10^*$	$204 \pm 39^*$	$17 \pm 3$
<b>Hepatectomía parcial</b>					
Basal	$39 \pm 6$	$72 \pm 14$	$30 \pm 4$	$114 \pm 19$	$15 \pm 3$
Aumento del flujo	$304 \pm 61^*$	$410 \pm 74^*$	$90 \pm 13^*$	$593 \pm 99^*$	$23 \pm 4$
Más cicloheximida	$485 \pm 86^*$	$333 \pm 66^*$	$122 \pm 21^*$	$479 \pm 72^*$	$48 \pm 8^{***}$
Perfusión retrógrada	$378 \pm 61^*$	$518 \pm 88^*$	$130 \pm 25^*$	$4780 \pm$ $1053^{***}$	$46 \pm 8^{***}$
Más calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ )	$365 \pm 66^*$	$492 \pm 93^*$	$203 \pm 33^{***}$	$400 \pm 74^*$	$72 \pm 11^{***}$
Más $\text{Ca}^{2+}$ y gadolinio	$555 \pm 105^*$	$369 \pm 64^*$	$190 \pm 32^{***}$	$296 \pm 50^{***}$	$76 \pm 13^{***}$
Más 10% dextran <sup>***</sup>	$4.57 \pm$ $0.51^{***}$	$1.87 \pm$ $0.28^{***}$	$2.70 \pm$ $0.35^{***}$	$2.43 \pm$ $0.22^{***}$	$1.94 \pm$ $0.37^{***}$
Más L-NAME	$478 \pm 100^*$	$364 \pm 66^*$	$135 \pm 23^*$	$791 \pm 74^*$	$27 \pm 5$

Las actividades enzimáticas están expresadas con el promedio  $\pm$  error estándar de 6 observaciones independientes por punto experimental en hígados perfundidos. Se calcularon las actividades enzimáticas a partir de las Figuras 9 a 12. Estadística: \* $p < 0.01$  contra la condición basal, y \*\* $p < 0.01$  vs. aumento del flujo de perfusión.

## ***DISCUSIÓN***

En la práctica clínica, una liberación neta de enzimas puede ser indicativa de daño hepático, a pesar de que el contenido hepático de estas actividades enzimáticas puede permanecer normal, o incluso puede aumentar en el órgano (93, 94, 95). Con el daño hepático que se produce con la administración de tetracloruro de carbono las actividades enzimáticas en suero y en hígado varían de acuerdo a la enzima estudiada (96), pero frecuentemente la liberación de enzimas mitocondriales se retarda en relación a las citoplásmicas (93). Las actividades de la MDH y de la AST que se encontraron en los perfusados de hígados aislados, son principalmente debidas a sus isoenzimas citoplásmicas (97). De tal manera, la liberación de enzimas puede depender de alteraciones en la membrana plasmática, alteraciones mitocondriales y/o cambios en la regulación del volumen celular (98,99). Además, el aumento en la actividad sérica de las enzimas también dependería en la susceptibilidad del tipo de célula hepática que se daña en el hígado (100,101,102). Las marcadas elevaciones de las actividades séricas de TGP y TGO se encuentran en enfermedades hepáticas avanzadas, y el cociente de las actividades citoplásmicas AST/ALT (El cociente *de Ritis*) parece estar asociado al tipo de daño hepático producido y a su evolución. Además, las variaciones de GDH reflejan necrosis celular que ocurre en forma preferencial en la zona centro-lobular del hígado. Las actividades de AST y LDH, así como, la producción de urea, se han usado para discriminar entre hígados viables y no-viables en la preservación de los tejidos (102,103,104); sin embargo, los niveles aumentados de transaminasas después de perfundir a hígados potencialmente transplantables, pudieran no ser indicativas de deterioro, ni de daño en el órgano preservado.

La liberación de enzimas por el hígado en regeneración, inducido por HP en ratas, presentó diferentes patrones de liberación bajo condiciones *in vivo* e *in vitro*. Por otro lado, se ha caracterizado la liberación de enzimas en modelos de regeneración hepática inducida por la administración de tóxicos. Por ejemplo, se encontró que los niveles séricos de las actividades para la ALT y la AST reflejan la progresión de la necrosis celular inducida por el tetracloruro de carbono en ratas (93), en este mismo estudio también se observó una disociación entre el potencial proliferativo y la liberación masiva de enzimas. De hecho, se puede observar un segundo aumento de enzimas hepáticas en suero que se pueden diferenciar de la necrosis celular provocada por la administración del tóxico, y que parece más bien estar relacionada con una regeneración hepática compensatoria. Esta sugestión se confirmó con datos más recientes que demuestran que el índice mitótico de los hepatocitos está en paralelo con la extensión de la necrosis, mientras que los niveles séricos de ALT y de AST aumentan rápidamente sin correlacionar ni con necrosis celular, ni con regeneración tisular. En ratas sujetas a una HP del 70% de la masa hepática, la predominante liberación de enzimas mitocondriales (OCT y GDH), comparada con las enzimas mitocondriales, contrasta con lo reportado en otros modelos de daño hepático y regeneración (Figura 1). Esta situación, aparentemente única, no se acompañó de una disminución de dichas enzimas en el hígado, con la excepción para la actividad de la LDH (Tabla 1). La liberación selectiva de enzimas por el hígado en regeneración parece depender de la cantidad de tejido removido (Figura 2), pero la predominancia en liberar enzimas mitocondriales fue independiente de la cantidad de hígado reseca. Este fenómeno inducido por la HP de un aumento transitorio en las actividades séricas de algunas enzimas hepáticas, está reportado previamente, pero solo recientemente se adscribió a ser debido a una necrosis progresiva en el hígado remanente, posterior a una HP del 70% . De hecho, los cambios

hemodinámicos que se traducen en un incremento en el flujo sanguíneo portal, a través del hígado remanente, podrían inducir un daño progresivo al activar a las células de Kupffer del hígado remanente posterior a HP (103,104). Sin embargo, un trasplante hepático parcial que presenta una buena sobrevida y que muestra una adecuada función hepática en pacientes, también se acompaña de un aumento abrupto de ALT, que se normaliza en semanas. Por lo tanto, a pesar de que las enzimas hepáticas se pueden liberar masivamente a la circulación (después de HP), por un periodo extenso de tiempo, las señales tempranas de regeneración aún permiten que se dé una restauración exitosa del hígado removido.

Con los datos presentados en el presente estudio, confirmamos que la liberación de enzimas por el hígado en regeneración inducido por HP en ratas, es un proceso selectivo, con una predominancia clara a liberar enzimas de localización mitocondrial. La liberación de estas enzimas alcanza un pico máximo de actividad que coincide claramente con el pico de síntesis de DNA y, además, se demuestra la ausencia de alteraciones estructurales y funcionales del hígado remanente (Figura 5). Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que las enzimas son diferencialmente liberadas posterior a una HP del 70% *in vivo*, este fenómeno es reproducible en un modelo *in vitro* cuando se modifica la relación flujo/masa en hígados aislados y perfundidos (Figuras 3 y 4). El efecto del aumento en la velocidad de flujo sobre la liberación de enzimas hepáticas fue reversible (Figura 4), y también demostramos que aumentando la velocidad de flujo en hígados intactos, es posible mimetizar lo que ocurre en órganos aislados de animales con HP. Los experimentos con hígados aislados eliminan la posible participación de factores extra-hepáticos, así mismo, demuestran que las enzimas estudiadas son exclusivamente provenientes del hígado. Con el uso de hígados

perfundidos, rebanadas hepáticas y hepatocitos aislados, se demostró la existencia de dos mecanismos que pueden controlar la liberación de enzimas hepáticas: un mecanismo dependiente de la magnitud del flujo y otro independiente de éste. Sin embargo, existen diferencias cuando comparamos lo que ocurre *in vivo* e *in vitro* en relación con la liberación de enzimas, en animales íntegros con HP. Por ejemplo, mientras que la actividad sérica de la GDH aumenta en gran proporción después de la HP, esta enzima se libera en una baja proporción en las preparaciones *in vitro*. Esta discrepancia se puede deber a que en los animales sometidos a HP, la eliminación de la GDH del suero sanguíneo fuese más lenta, lo que estaría de acuerdo con la variabilidad reportada para la vida-media de las enzimas en sangre. Usando el modelo presentado, la liberación de enzimas inducida por el aumento de flujo resultó ser independiente de factores extra-hepáticos, ya que se pudo reproducir en una condición *ex-vivo*, removiendo los lóbulos hepáticos (Figura 6); por lo tanto, estos hallazgos van de acorde a la idea de que las fuerzas mecánicas pueden controlar la liberación de enzimas tanto por el hígado normal, como en regeneración; y las células endoteliales podrían estar jugando un papel importante **(105,106,107)**.

La regeneración hepática y la liberación de enzimas del parénquima de hígado se han asociado a isquemia del tejido, reperfusión y a cambios hemodinámicos. Por ejemplo, episodios cortos de isquemia en hígados en regeneración, inducidos por HP, promueven niveles séricos altos de actividades para ALT y AST, sin que se afecte negativamente la capacidad hepática para regenerar . La existencia de un mecanismo dependiente del flujo que controla parcialmente la liberación específica de enzimas hepáticas, podría estar relacionado a estas fuerzas, probablemente ejercidas sobre el endotelio vascular y/o sobre otras estructuras, las cuales se conocen como mecano-transductores **(108,109)**.

No se conoce la razón para esta selectividad en la liberación de enzimas hepáticas a la circulación sistémica. Es posible que la dilatación sinusoidal puede estar involucrada en este fenómeno, lo cual explicaría los cambios en la lipoperoxidación en el tejido hepático debidos a aumentos en el flujo *in vitro*. De hecho, el aumento en la síntesis de DNA coincide con un incremento selectivo de la lipoperoxidación hepática en el órgano en regeneración (106), lo cual también podría estar íntimamente involucrado con el proceso proliferativo. Así mismo, cambios controlados en la lipoperoxidación que afectan la permeabilidad de membranas (Figura 5), podrían participar en la selectividad de la liberación de enzimas.

El flujo sanguíneo a través de la vena porta juega un papel primordial en el proceso de regeneración hepática inducida por HP (107), ya que el flujo sanguíneo se fuerza a través del tejido hepático remanente, lo cual resulta en un aumento dramático en el cociente flujo sanguíneo/masa hepática (107,108). El estrés por fricción inducido por el flujo portal, resulta en un aumento en la producción de NO, el cual podría participar en la iniciación del proceso regenerativo hepático (108,1110). Los resultados de este estudio dan suficiente evidencia de que la liberación de enzimas hepáticas es controlada en forma importante por eventos ligados a la mecano-transducción que actúan sobre las células endoteliales hepáticas. Los resultados indican que la cantidad de enzimas liberadas parece ser independiente de la síntesis *de novo* de proteínas para las enzimas que aquí se estudiaron, ya que sus actividades no se alteraron significativamente por el tratamiento *in vivo* con cicloheximida, que es un inhibidor conocido de la síntesis proteica en células eucariontes (Figura 7); sin embargo, este tratamiento sí afectó la liberación de enzimas hepáticas por hígados aislados, como respuesta a un aumento en la velocidad de perfusión (Figura 7, Tabla 4). Estos datos concuerdan con el efecto que

tienen las fuerzas mecánicas de alta frecuencia y amplitud sobre la síntesis de proteínas y el efecto inhibitorio en la degradación proteica **(110)**, particularmente observando la activación que a través de un evento de mecano-transducción, ocurre sobre la MAP cinasa p38 **(110)**. Por lo tanto, el incremento en el estrés por fricción debido al aumento en la tasa de flujo que ocurre posterior a una HP, podría aumentar la síntesis de algunas proteínas, probablemente relacionadas con el glucocáliz del endotelio, que son los llamados mecano-receptores.

Con la perfusión retrógrada (de la vena cava a la porta) y la degradación de los residuos de carbohidratos presentes en la glucoproteínas que constituyen a los mecano-receptores, se encontró un efecto diferencial sobre la liberación de las enzimas hepáticas. La perfusión retrógrada favorece la liberación de enzimas mitocondriales en mayor proporción que las citoplásmicas en el hígado aislado (Figura 9, Tabla 4). De hecho, se ha reportado que la dirección o el momento vectorial como componente del flujo de perfusión puede afectar la respuesta biológica; por ejemplo, la retro-perfusión en el seno coronario lleva a la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) e induce la expresión de una enzima con actividad antioxidante, la hemo-oxigenasa-1, así como la del factor de crecimiento, el VEGF **(111,112)**. Esto último no ocurre cuando la perfusión se lleva a cabo en el “sentido fisiológico”, por lo que la retro-perfusión se está usando como un tratamiento para inducir la regeneración y recuperación del corazón dañado **(112)**. En lo que se refiere a modificar los componentes del glucocáliz, encontramos que este evento aumenta la liberación de enzimas hepáticas citoplásmicas, ejerciendo un efecto contrario sobre las mitocondriales (Figura 8, Tabla 3). El ácido hialurónico o los agregados de proteoglicanos situados en el glucocáliz están involucrados en los mecanismos de mecano-transducción celular que llevan al estrés por



fricción en las células endoteliales **(113,114)**; además, la eliminación de los residuos de heparán sulfato, ácido siálico, pero no los del condroitín-sulfato, bloquean la producción de NO en el endotelio, y no afectan la producción de la prostaglandina PGI<sub>2</sub> **(105)**. Estos datos sugieren entonces que el glucocáliz endotelial tiene un papel preponderante en el control de la liberación de enzimas hepáticas, ya que estas células endoteliales están localizadas en regiones positivas al estrés por fricción, donde se alinean en su eje longitudinal en una forma paralela a la dirección del flujo sanguíneo **(115)**.

Los mecanismos moleculares involucrados en la mecano-transducción no se han explorado en detalle, pero se sabe que los factores de crecimiento y sus vías de señalamiento parecen jugar un papel importante, como se ha descrito para el EGF **(116,117)**, y para el TGF- $\beta$  **(116)**, en células epiteliales. En este estudio, solo exploramos la participación potencial de la movilización intracelular de calcio, así como la producción de NO, en el fenómeno del aumento en la liberación de enzimas hepáticas como respuesta al flujo. De hecho, las células endoteliales expresan diferentes receptores, canales iónicos, los cuales están directa o indirectamente involucrados con moléculas “señaladoras” como son las proteínas G y las MAP cinasas **(117,118)**, calcio **(119,120,121)**, AMP cíclico **(122)**, producción de NO y expresión de la NO sintetasa en endotelio **(122)**, entre otros.

Las fuerzas por “estiramiento” (tensión) aumentan las concentraciones intracelulares de calcio **(121,123)**, sugiriendo que esta respuesta debe recaer en la entrada de calcio extracelular a través de canales sensibles al estiramiento **(124)**. Estudios previos sugieren que la fuerza mecánica aplicada a las células interacciona con las integrinas, lo cual lleva a la activación de canales iónicos mecano-sensibles que disparan la entrada

del calcio a la célula y consecuentemente interviene en la modulación de la estructura del cito-esqueleto o en su contractilidad (**124,125,126**). Cuando las células del músculo liso vascular se someten a un estrés mecánico, se aumenta el influjo de calcio del espacio extracelular y también se estimula la salida de calcio del retículo endoplásmico; ambos efectos se inhiben parcialmente por antagonistas de los canales de calcio, como el verapamil o por el cloruro de gadolinio (**126,127**). Nuestros datos demostraron en un forma clara que la liberación de enzimas hepáticas depende de la entrada del calcio extracelular, probablemente mediada por canales endoteliales sensibles al estiramiento. Además, fue también notorio que los efectos de calcio sobre la liberación de enzimas es diferencial; esto es, que las enzimas citoplásmicas fueron más afectadas que las enzimas mitocondriales en su respuesta al aumento en el estrés por fricción (Figuras 8 y 11, Tablas 3 y 4). De hecho, el efecto del diltiazem que es un inhibidor específico de los canales de calcio controlados por nucleótidos cíclicos (AMP, GMP), también confirma nuestra hipótesis de la participación del calcio.

Se ha sugerido que el glucocáliz endotelial, o al menos algunos de sus componentes, funcionan como mecano-transductores para un estrés por paso de fluido. Nuestros datos indican que la producción de NO se estimuló al incrementar la velocidad de flujo en hígados aislados, efecto mucho más exacerbado en los hígado provenientes de animales con HP *in vivo* (Figura 12); esto correlaciona con todo el flujo portal que tiene que fluir a través del lecho vascular del hígado remanente (después de la HP), aumentando el estrés por fricción y promoviendo la liberación de NO, efectos que se han invocado como controladores putativos del proceso regenerativo hepático. Sin embargo, nuestros datos demuestran que la producción y liberación de NO juega un papel menor en el

control de la liberación de enzimas hepáticas, como respuesta al aumento en el estrés por fricción (Fig. 12 y Tabla 4).

En un interesante y reciente artículo, se pretende establecer la “universalidad” de las respuestas físicas al estiramiento (tensión mecánica); aquí, se señala que aplicando fuerzas de estiramiento a células aisladas se logra poner en movimiento una serie de eventos físicos progresivos que propician la aparición de señales químicas en la célula. Estas señales no están limitadas exclusivamente al disparo de vías de señalización de moléculas transductoras, sino que más bien son un factor importante o esencial en el proceso de mecano-transducción que, como consecuencia, demuestra poca especificidad molecular en el inicio de los eventos mecano-transductores (126). En otras palabras, las células deberán responder en una forma molecularmente inespecífica a las fuerzas mecánicas aplicadas (126). Sin embargo, existen muy pocos sistemas biológicos capaces de “ajustarse” a los principios físicos que aplican en un modelo básico de las propiedades elásticas de una red de polímeros (como sería la célula). Esto lleva entonces a sugerir que ningún modelo reológico simple puede explicar las respuestas celulares al fenómeno de mecano-transducción (126,127).

Basados en las consideraciones ya discutidas, es obvio que la liberación de enzimas hepáticas, mediada por eventos ligados a la mecano-transducción, sí parece tener cierto tipo de especificidad que permite una liberación selectiva de enzimas, lo cual es mucho más claro cuando se analizan los patrones de liberación de enzimas por el hígado en regeneración y su dependencia al aumento en las fuerzas mecánicas aplicadas a la circulación portal. En este contexto, se ha reportado que el hígado remanente, posterior a una HP del 70% de la masa, puede regenerar incluso si se reduce el flujo sanguíneo

portal; sin embargo, una reducción de la velocidad de flujo sanguíneo retarda realmente la progresión de la regeneración hepática inducida por HP en ratas (128).

## ***CONCLUSIONES GENERALES***

La modificación del cociente velocidad de flujo/masa hepática tanto *in vivo* como *in vitro*, induce un aumento en la liberación de enzimas hacia la circulación sanguínea o al medio de incubación, a partir de hígados sanos o de los hígados remanentes, posterior a una HP del 70% de la masa. Esto último nos reveló la existencia de un mecanismo dependiente de la magnitud del flujo que influye en la liberación de enzimas. Esta salida de enzimas es un proceso reversible y selectivo, y no está asociado a daños estructurales ni funcionales del tejido hepático. Fue obvio también, que las enzimas localizadas en la matriz mitocondrial hepática son más liberadas que las citoplásmicas. Esta liberación masiva de enzimas que responden al aumento en las fuerzas físicas inherentes a la perfusión constante de un fluido con cierto grado de viscosidad, parece ser independiente de la participación de factores moleculares extra-hepáticos.

El aumento en la magnitud del estrés por fricción, que se induce por el flujo, parece ser un componente muy importante de los mecanismos involucrados en el control de la liberación de enzimas hepáticas. Este estudio demuestra por primera vez que las fuerzas físicas que actúan sobre las células endoteliales, pueden ser elementos esenciales para estimular la liberación de enzimas a partir del hígado sano, y aquí la movilización de calcio que depende de su entrada del espacio extracelular, a través de sus canales sensibles al estiramiento, parece constituir la principal respuesta celular, mientras que la producción de NO juega un papel mucho menor. Este fenómeno se amplifica en gran

portal; sin embargo, una reducción de la velocidad de flujo sanguíneo retarda realmente la progresión de la regeneración hepática inducida por HP en ratas (128).

## ***CONCLUSIONES GENERALES***

La modificación del cociente velocidad de flujo/masa hepática tanto *in vivo* como *in vitro*, induce un aumento en la liberación de enzimas hacia la circulación sanguínea o al medio de incubación, a partir de hígados sanos o de los hígados remanentes, posterior a una HP del 70% de la masa. Esto último nos reveló la existencia de un mecanismo dependiente de la magnitud del flujo que influye en la liberación de enzimas. Esta salida de enzimas es un proceso reversible y selectivo, y no está asociado a daños estructurales ni funcionales del tejido hepático. Fue obvio también, que las enzimas localizadas en la matriz mitocondrial hepática son más liberadas que las citoplásmicas. Esta liberación masiva de enzimas que responden al aumento en las fuerzas físicas inherentes a la perfusión constante de un fluido con cierto grado de viscosidad, parece ser independiente de la participación de factores moleculares extra-hepáticos.

El aumento en la magnitud del estrés por fricción, que se induce por el flujo, parece ser un componente muy importante de los mecanismos involucrados en el control de la liberación de enzimas hepáticas. Este estudio demuestra por primera vez que las fuerzas físicas que actúan sobre las células endoteliales, pueden ser elementos esenciales para estimular la liberación de enzimas a partir del hígado sano, y aquí la movilización de calcio que depende de su entrada del espacio extracelular, a través de sus canales sensibles al estiramiento, parece constituir la principal respuesta celular, mientras que la producción de NO juega un papel mucho menor. Este fenómeno se amplifica en gran

magnitud en el hígado en regeneración, inducido por una HP en ratas, y la selectividad de las enzimas liberadas podría estar de alguna manera relacionada con el control de la progresión del proceso proliferativo. De ser cierto lo antes establecido, los niveles séricos de actividades enzimáticas constituirían parte de un sistema complejo de comunicación inter-órganos.

## ***PERSPECTIVA CLÍNICA***

Nuestros resultados pueden tener relevancia clínica, en el sentido de que la actividad de estas enzimas de “escape” en suero, especialmente las de localización mitocondrial, pueden reflejar el estatus proliferativo del hígado de rata o de humano, el cual puede tener un uso diagnóstico, no solamente en pacientes que sufren enfermedad hepática, sino también en la evaluación de la viabilidad del trasplante hepático. Hasta ahora en la práctica clínica, la liberación de enzimas de “escape” se ha considerado un parámetro indicativo de daño celular, reflejando alteraciones en la membrana plasmática, disfunción mitocondrial o cambios en la regulación del volumen celular, sin embargo, la actividad de estas enzimas pudiera reflejar el status proliferativo y no el deterioro del órgano.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Villalobos J. J. Gastroenterología. Editorial Méndez Editores, S.A. de C.V. Cuarta edición. Volumen II., 1993.
2. Arias I., Popper H., Schachter D., and Shafritz D.A. The liver: Biology and Pathobiology. Ed. Raven Press, New York, 1982.
3. Davenport, H.W., Physiology of the Digestive Tract, 5a ed., Year Book, 1982
4. Bismuth H. Surgical anatomy and anatomical surgery of the liver. World J. Surg. 1982; 6:3
5. Emery JL. Degenerative changes in the left lobe of the liver in the newborn. Arch. Dis. Child. 1952; 27:558.
6. Sasse D. Liver structure and innervation. In : Thurman RG, Kauffman FC, Jungermann K, eds. Regulation of Hepatic Metabolism, Intra-and Intercellular Compartmentation. New York, London: Plenum Press, 1986;3-53.
7. Sasse D. Liver architecture. Enzyme 1992; 46:8-32.
8. Blouin, A. Morphometry of liver sinusoidal cells. In: Kupffer Cells and Other Liver Sinusoidal Cells. Edited by E. Wisse and K.L. Knook, pp. 61-71 Elsevier/Amsterdam.1977.
9. Wisse E., Knook D.L., Decker K. Cells of the Hepatic Sinusoid. Ed. The Kupffer Cell Foundation. P.O. Box 5815, 2280 HV RIJSWIJK, The Netherlands. Volumen II, 1989.
10. Bouwens L, De Bleser P, Vanderkerken K, Geerts B, Wisse E. Liver cell heterogeneity: Functions of nonparenchymal cells. Enzyme 1992; 46:155-168.
11. Rohr, H.P., Luthy, J., Gudat, F., Oberholzer, M., Gysin, C., Stalder, G., and Bianchi, L. Stereology: A new supplement to the study of human liver biopsy specimens. In: Progress in Liver Diseases, Vol. V, edited by H. Popper and F. Schaffner, pp. 24-34. Grune & Stratton, New York. 1976.
12. Loud, A. V.: A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cells. J Cell Biol 1968; 37: 27-46.
13. Weidel, E.R. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. Int Rev Cytol;26:235-302. 1969.
14. Sasse D. Liver architecture. Enzyme 1992;46:8-32.
15. Braet F, de Zanger R, Baekeland M et al. Structure and dynamics of the fenestrae-associated cytoskeleton of rat liver sinusoidal endothelial cells. Hepatology 1995; 21: 180.

16. Deaciuc IV, Bagby GJ, Niesman MR et al. Modulation of hepatic sinusoidal endothelial cells function by Kupffer cells: an example of intercellular communication in the liver. *Hepatology* 1994; 19:464.
17. Hardison WGM. Hepatocellular tight junctions. Role of canalicular permeability in hepatobiliary transport. In: Tavoloni N, Berk PD, eds. *Hepatic Transport and Bile Secretion*. New York: Raven Press, 1993;571-585.
18. Vidal-Vanaclocha F. Pathobiology of hepatic sinusoidal endothelium. 1996.
19. MacPhee PJ, Schmidt EE, Groom AC. Organization and flow in the liver microcirculation. In: Messmer K, Menger MD, eds. *Liver Microcirculation and Hepatobiliary Function*. Basel, Karger, *Prog Appl Microcirc* 1993;19: 52-73.
20. Laskin DL. Role of hepatic macrophages in inflammation and tissue injury. 1996.
21. Friedman S.L. Pathobiology of hepatic stellate cell. 1996.
22. Burt AD, Path MRC, Le Bail B, Balabaud C, Bioulac-Sage P. Morphological investigation of sinusoidal cells. *Semin Liv Dis* 1993; 13:21-38.
23. Kawada N, Tran Thi TA, Klein H, Decker K. The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances-Possible involvement of endothelin-1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. *Eur J Biochem* 1993;213: 815-23, 1993.
24. Oda M, Kaneko H, Suematsu M, Suzuki H, Kazemoto S, Honda K, Yonei Y, Tsuchiya M, A new aspect of the hepatic microvasculature: Electron microscopic evidence for the presence of Ito cells around portal and hepatic venules as pericytes. In: Messmer K, Menger MD, eds. *Liver Microcirculation and Hepatobiliary Function*. Basel, Karger, *Prog Appl Microcirc* 1993;19:25-39.
25. Gressner AM, Ramadori G, eds. *Molecular and cell biology of liver fibrogenesis*. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, 1992;352.
26. Gressner A.M. Liver fibrosis: Perspectives in pathobiochemical research and clinical outlook. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991; 29:293-311.
27. Balabaud C. Human pit cell. *Hepathology*. 2006.
28. Ramadori G, Rieder H, Knittel T. Biology and pathobiology of sinusoidal liver cells. In: Tavoloni N, Berk PD, eds. *Hepatic Transport and Bile Secretion; Physiology and Pathophysiology*. New York: Raven Press, 1993;83-102.
29. Bouwens L, Wisse E. Pit cells in the liver . *Liver* 1992; 12:3.
30. Bouwens L, De Bleser P, Vanderkerken K, Geerts B, Wisse E. Liver cell heterogeneity: functions of nonparenchymal cells. *Enzyme* 1992; 46:155-168.



31. Burt AD, Path MRC, Le Bail B, Balabaud C, Bioulac-Sage P. Morphological investigation of sinusoidal cells. *Semin Liv Dis* 1993; 13:21-38.
32. Puschel GP, Jungermann K. Integration of function in the hepatic acinus: Intercellular communication in neural and humoral control of liver metabolism. *Prog Liver Dis* 1994;12:19-46.
33. Sasse D. Liver structure and innervation. In: Thurman RG, Kauffman FC, Jungermann K, eds. *Regulation of Hepatic Metabolism, Intra-and Intercellular Compartmentation*. New York, London: Plenum Press, 1986;3-53
34. Bisell DM, Choun MO. The role of extracellular matrix in normal liver. *Scand. J Gastroenterol* 1988;23 (suppl 151): 1.
35. Bisell DM. Cell-matrix interaction and hepatic fibrosis. *Prog Liver Dis* 1990;9:143-155.
36. Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993;328:1828-1835.
37. Iredale JP, Murphey G, Hembrey RM, Friedman SL, Arthur MJ. Human hepatic lipocytes synthesize tissue inhibitor of metalloproteinase-1. Implications for regulation of matrix degradation in liver. *J Clin Invest* 1992;90:282-287.
38. Roeb E, Graeve L, Hoffmann R, Decker K, Edwards DR, Heinrich PC. Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene expression by cytokines and dexamethasone in rat hepatocyte primary cultures. *Hepatology* 1993;18:1437-1442.
39. Verrill HL, Pickard NA, Gruemer HD. Mechanism of cellular enzyme release. Alterations in membrane fluidity and permeability. *Clin. Chem* 1977; 23:2219-2225.
40. Batt AM, Ferrari L. Manifestations of chemically induced liver damage. *Clin Chem* 2000; 41: 1882-1887.
41. Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clin Chem* 2000; 46: 2027-2049.
42. Bradley et. cols. Measurement of hepatic blood flow in man. *Surgery*, 1974 May;75(5):783-9.
43. Saric J, Faugon H, Beliard R, Perissat J, Balabaud C, Dubuisson L, Bioulac P. Liver arterialization improves hepatocytes ultrastructure in rats with portacaval shunts. *Dig Dis Sci*.1981 Mar; 26(3):225-31.
44. Saad WE. Percutaneous management of postoperative anastomotic biliary structures. *Tech Vasc Interv Radiol* 2008; 11(2):143-53.

45. Davies PF. Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2009 Jan; 6(1) : 16-26.
46. Pan S. Molecular mechanisms responsible for the atheroprotective effects of laminar shear stress. *Antioxid Redox Signal*.2009 Mar 23.
47. Belin De Chantemele EJ, Vessieres E, Dumont O, Guihot AL, Toutain B, Loufrani L, Henrion D. Reactive oxygen species are necessary for high flow (shear stress)-induced diameter enlargement of rat resistance arteries. *Microcirculation* 2009.Apr 7:1-11.
48. Helmke BP, Davies PF. The cytoskeleton under external fluid mechanical forces: hemodynamic forces acting on the endothelium. *Ann Biomed Eng* 2002 Mar; 30 (3):284-96.
49. Walsh T, Donnelly T, Lyons D. Impaired endothelial nitric oxide bioavailability: A common link between aging, hypertension, and atherogenesis? *J Am Geriatr Soc*. 2009 Jan;57(1):140-5.
50. Gundersen Y, Saetre T, Scholz T, Carlsen H, Kjekshus H, Smiseth OA, Lilleaasen P, Aasen AO. The NO donor sodium nitroprusside reverses the negative effects on hepatic arterial flow induced by endotoxin and the NO synthase inhibitor L-NAME. *Eur Surg Res* 1996; 28(5):323-32.
51. Kato GJ, Wang Z, Machado RF, Blackwelder WC, Taylor 6 th JG, Hazen SL. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors in sickle cell disease: abnormal levels and correlations with pulmonary hypertension desaturation, haemolysis, organ dysfunction and death. *Br J Haematol* 2009; Mar 17.
52. Woods HF, Krebs HA. 1971. Lactate production in the perfused liver. *Biochem J*. 1971; 125: 129-139.
53. Guder WG, Habicht A, Kliessl J. 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. *Z Clin Chem Clin Biochem*.1975; 13: 311.
54. Schmidt E, Schmidt FW. Release of enzymes from the liver. *Nature* 1967; 213:1125-1126.
55. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver: Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol*. 1931; 12: 186-202.
56. Inderbitzin D, Stude P, Sidler D, Beldi G, Djonov V, Keogh A, Candinas D. Regenerative capacity of individual liver lobes in the microsurgical mouse model. *Microsurgery*.2006; 26(6):465-9.

57. Ibirogba SB, Spearman CW, Mall A, Shepherd E, Lotz Z, Tyler M, Kahn D. Restoration of liver mass after partial hepatectomy-implications for living donor liver transplantation. *S Afr J Surg* 2005 Aug; 43(3):70-2.
58. Paluszkiewicz R, Zieniewicz K, Kalinowski P, Grzelak I, Hevelke P, Krawczyk M. Safety of living donor in pediatric liver transplantation-analysis of 100 consecutive donors. *Hepatogastroenterology*. 2008 Nov-Dec; 55(88):2166-70.
59. Alwayn IP, Verbese JE, Kim S, Roy R, Arsenault DA, Greene AK, Novak K, Laforme A, Lee S, Moses MA, Puder M. A critical role for matrix metalloproteinases in liver regeneration. *Surg Res* 2008 Apr; 145(2):192-8.
60. Sakamoto T, Liu Z, Murase N, Ezure T, Yokomuro S, Poli V, Demetris AJ. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology*. 1999 Feb;29(2):403-11.
61. Schoen Smith JM, Lauth WW. The role of prostaglandins in triggering the liver regeneration cascade. *Nitric oxide*. 2005 Sep; 13(2):111-7.
62. Schoen Smith JM, Lauth WW. Nitric oxide and prostaglandins potentiate the liver regeneration cascade. *Can J Gastroenterol*.2006 May; 20(5):329-34.
63. <http://www.inegi.org.mx/inegi/default.aspx?s=est&c=11094>
64. Wilkinson JH. Clinical significance of enzyme activity measurements. *Clin Chem*. 1970; 16: 882-890.
65. Seglen PO. Preparation of rat liver cells. 3. Enzymatic requirements for tissue dispersion. *Exp Cell Res*. 1973; 82: 391-398.
66. Pagani F, Panteghini M. Biological variations in serum activities of three hepatic enzymes. *Clin Chem*. 2001; 47: 355-356.
67. Panis Y, McMullan DM, Emond JC. Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. *Surgery*.1997; 121:142-149.
68. Bengmark S, Engevik L, Olsson R. Changes in ornithine carbamoyl transferase activity in serum and in liver after partial hepatectomy in rats. *Scand. J. Gastroenterol.*, 1968; 3: 264-266.
69. Almersjo O, Bengmark S, Hafstrom LO, Olsson R. Enzyme and function changes after extensive liver resection in man. *Ann. Surgery* 1969; 169: 111-119.
70. Kanta J, Bartos F Relationship of liver damage and liver regeneration after carbon tetrachloride treatment in rats. *Sb.Ved. Pr. Lek. Fak Karvov University Hradcki Kralove* 1991; 34: 237-242.

71. Dinman BD, Bernstein IA. Acute carbon tetrachloride hepatotoxicity. Enzymatic activity and structural concomitants during the regenerative phase. *Arch Environ Health* 1968; 16: 777-786.
72. Oikawa I, Novikoff PM. Catalase-negative peroxisomes: transient appearance in rat hepatocytes during liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Pathol.* 1995; 146: 673-687.
73. Greco M, Moro L, Pellicchia G, DiPede S, Guerrieri F. Release of matrix proteins from mitochondria to cytosol during the prereplicative phase of liver regeneration. *FEBS Lett.* 1998; 27: 179-182.
74. Mann FC. The portal circulation and the restoration of the liver after partial removal. *Surgery* 1949; 8: 225-238.
75. Chen K-D, Li Y-S, Kim M, Li S, Yuan S, Chien S, Shyy JY-J. Mechanotransduction in response to shear stress, roles of receptor tyrosine kinases, integrins, and Shc. *Biol. Chem.* 1999; 274: 18393-18400.
76. Chiquet M. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biol.* 1999; 18: 417-426.
77. Wang DM, Tarbl JM. Modeling intestinal flow in an artery wall allows estimation of wall shear stress on smooth muscle cells. *J Biochem Eng.* 1995; 117: 358-363.
78. Harder DR. Pressure-dependent membrane depolarization in cat middle cerebral artery. *Circ Res.* 1984; 55: 197-202.
79. Albinsson S, Hellstrand P. Integration of signal pathways for stretch-dependent growth and differentiation in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293: C772-C782.
80. Chen CS, Tan J, Tien J. Mechanotransduction at cell-matrix and cell-cell contacts. *Annu Rev Biomed Eng.* 2004; 6: 275-302.
81. Janmey PA, McCulloch CA. Cell mechanics: Integrating cells responses to mechanical stimuli. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2007; 9: 1-34.
82. Aikawa R, Nagai T, Kudoh S, Zou Y, Tanaka M, Tamura M, et al. Integrins play a critical role in mechanical stress-induced p38 MAPK activation. *Hypertension* 2002; 39: 233-238.
83. White CR, Frangos JA. The shear stress of it all: the cell membrane and mechanochemical transduction. *Phil Trans R Soc B.* 2007; 362: 1459-1467.
84. Pahakis MY, Kosky JR, Dull RO, Tarbell JM. The role of endothelial glycocalyx components in mechanotransduction of fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 355: 228-233.

85. Habib N, Houssin D, Carol C, Cardoso J, Boisseau C, Calmus Y, et al. Experimental reduction of portal hypertension by mechanical increase of portal flow. *Lancet* 1991; 337: 16-17.
86. Zhong Z, Jones S, Thurman RG. Glycine minimizes reperfusion injury in a low-flow, reflow liver perfusion model in the rat. *Am. J. Physiol.* 1996; 270: G332-G338.
87. Carnovale CE, Scapini C, Alvarez ML, Favre C, Monti J, Carrillo MC. Nitric oxide release and enhancement of lipid peroxidation in regenerating rat liver. *J Hepatol.* 2000; 32: 798-804.
88. Gutman D, Bergmeyer HU. Urea. En: *Methods of Enzymatic Analysis* (Editado por Bergmeyer HU, Bergmeyer J, and Grassl H). New York, Academic Press. pp 1791-1799.
89. Suárez J, Rubio R. Regulation of the glycolytic flux by coronary flow in guinea pig heart. Role of vascular endothelial cell glycocalyx. *Am. J. Physiol.* 1991; 261:H1994-H2000.
90. Dull RO, Mecham I, McJames S. 2007. Heparan sulfate mediate pressure-induced increase in lung endothelial hydraulic conductivity via nitric oxide/reactive oxygen species. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2007; 292: L1452-L1458.
91. Hortelano S, Dewez B, Genaro AM, Díaz-Guerra MJM, Bosca L. Nitric oxide is released in regenerating liver after partial hepatectomy. *Hepatology* 1995; 21: 776-786.
92. Peltenburg HG, Hermens WT, Willems GM, Flendrig JG, Schmidt E. Estimation of the fractional catabolic rate constants for the elimination of cytosolic liver enzymes from plasma. *Hepatology* 1989; 10: 833-839.
93. Zimmerman HJ, Kodera Y, West M. Rate of increase in plasma levels of cytoplasmic and mitochondrial enzymes in experimental carbon tetrachloride hepatotoxicity. *J. Lab. Clin. Med.* 1965; 66: 315-323.
94. Fiever CJ, Gigandet MP, Ansel HC. Hemolysis of erythrocytes by primary pharmacological agents. *Am. J. Hosp. Phram.* 1971; 28: 961-966.
95. Miyake S. 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* 1979; 33: 343-358.
96. Guder WG, Habicht A, Kliessl J. 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. *Chem. Klin. Biochem.* 1975; 13: 311-318.

97. Iu S, Harvey PR, Makowka L, Petrunka CN, Ilson RG, Strasberg SM. Markers of allograft viability in the rat. *Transplantation* 1987; 44: 562-569.
98. Smrekova R, Vajdova K, Kukan M, Ulicna O, Lutterova M, Wsolova L, et al. A rapid, simple, and cost-effective method for screening liver preservation solutions in the rat. *Transplantation* 2000; 70: 430-436.
99. Woods HF, Krebs HA. 1971. Lactate production in the perfused liver. *Biochem. J.*, 1971; 125: 129-139.
100. Weber M, Bircher J, Hacki W, Strelbel H, Scholl E, Pedrinis E, et al. Substitution of the liver: III. Functional capacity of the homologously perfused pig livers. *Biomedicine* 1973; 8: 304-310.
101. Zhong Z, Connor H, Mason RP, Qu W, Stachlewitz RF, Gao W, et al. Destruction of Kupffer cells increases survival and reduces graft injury after transplantation of fatty livers from ethanol-treated rats. *Liver Transpl. Surg.* 1996; 2: 383-387.
102. Xia R, Emond JC. Orthotopic partial liver transplantation in the rat: a model of 70% hepatectomy and reduced size liver transplantation. *Transplantation* 1993; 56: 1041-1043.
103. Bradham CA, Schemmer P, Stachlewitz RF, Thurman RG, Brenner DA. Activation of nuclear factor-kappa B during orthotopic liver transplantation in rats is protective and does not require Kupffer cells. *Liver Transpl. Surg.* 1999; 5: 282-293.
104. Maruyama H, Harada A, Kurokawa T, Kobayashi H, Nonami T, Nakano A, et al. Duration of liver ischemia and hepatic regeneration after hepatectomy in rats. *J. Surg. Res.* 1995; 58: 290-294.
105. Karwatowska-Prokopczuk EG, Ciabattini G, Wenn-Malm A. Effects of hydrodynamic forces on coronary production of prostacyclin and purines. *Am. J. Physiol.* 256; 1989; : H1532-H1538.
106. Carnovale CE, Scapini C, Alvarez ML, Favre C, Monti J, Carrillo MC. Nitric oxide release and enhancement of lipid peroxidation in regenerating rat liver. *J. Hepatol.* 2000; 32: 798-804.
107. Kahn D, Van Hoorn-Hickman R, Terblanche J. Liver blood flow after partial hepatectomy in the pig. *J. Surg. Res.* 1984; 37: 290-294.
108. Wang HH, Lauth WW. Evidence of nitric oxide, a flow-dependent factor, being a trigger of liver regeneration in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1998; 76: 1072-1079.
109. Kasra M, Goel V, Martin J, Wang S, Choi W, Buckwalter J. Effect of dynamic hydrostatic pressure on rabbit intervertebral disc cells. *J. Orthop. Res.* 2003; 21: 597-603.

110. Häussinger D, Schliess F, Dombrowski F, vom Dahl S. Involvement of p38 MAPK in the regulation of proteolysis by liver cell hydration. *Gastroenterology* 1999; 116: 921- 935.
111. Weigel G, Kajana I, Bergmeister H, Riedl G, Glogar H-D, Gyöngyösi M, et al. Beck and back: a paradigm change in coronary sinus interventions-pulsatile stretch on intact coronary venous endothelium. *J. Thor. Card. Surg.* 2007; 133: 1581-1587.
112. Nishida T, Shimokawa H, Oi K, Tatewaki H, Uwatoku T, Abe K, et al. Extracorporeal cardiac shock wave therapy markedly ameliorates ischemia-induced myocardial dysfunction in pigs in vivo. *Circulation* 2004; 110: 3055-3061.
113. Mochizuki S, Vink H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Spaan JA, et al. Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 2003; 285: H722-H726
114. Dewey Jr CF, Bussolari SR, Gimbrone Jr MA, Davies PF. The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J. Biomech. Eng.* 1981; 103: 177-185.
115. Tschumperlin DJ, Dai G, Maly IV, Kikuchi T, Laiho LH, McVittie AK, et al. Mechanotransduction through growth-factor shedding into the extracellular space. *Nature* 2004; 429: 83-86.
116. Neu CP, Khalafi A, Komvopoulos, Schmid TM, Reddi AH. Mechanotransduction of bovine articular cartilage superficial zone protein by transforming growth factor  $\beta$  signaling. *Arth. Rheum.* 2007; 56: 3706-3714.
117. Li C, Xu Q. Mechanical stress-initiated signal transductions in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal.* 2000; 12: 435-445.
118. Zampetaki A, Zhang Z, Hu Y, Xu Q. 2005. Biomechanical stress induces IL-6 expression in smooth muscle cells via Ras/Rac1-p38 MAPK-NF-kappaB signaling pathways. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288: H2946-H2954.
119. Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Nagai R, Aikawa R, Uozumi H, Yazaki Y. Role of ion channels and exchangers in mechanical stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ. Res.* 1998; 82: 430-437.
120. Asano M, Nakajima T, Iwasawa K, Asakura Y, Morita T, Nakamura F, et al. Eicosapentaenoic acid inhibits vasopressin-activated  $Ca^{2+}$  influx and cell proliferation in rat aortic smooth muscle cell lines. *Eur. J. Pharmacol.* 1999; 379: 199-209.
121. Ji G, Barsotti RJ, Feldman ME, Kotlikoff MI. Stretch-induced calcium release in smooth muscle. *J. Gen. Physiol.* 2002; 119: 533-544.

122. Kurpinski K, Park J, Thakar RG, Li S. Regulation of vascular smooth muscle cells and mesenchymal stem cells by mechanical strain. *Mol. Cell. Biomech* 2006; 3: 21-34.
123. Chen CN, Chang SF, Lee PL, Chang K, Chen LJ, Usami S, et al. Neutrophils, lymphocytes, and monocytes exhibit diverse behaviors in transendothelial and subendothelial migrations under coculture with smooth muscle cells in disturbed flow. *Blood* 2006; 107: 1933-1942.
124. Munevar S, Wang YL, Dembo M. 2004. Regulation of mechanical interactions between fibroblasts and the substratum by stretch-activated  $Ca^{2+}$  entry. *J. Cell Sci.* 2004; 117: 85-92.
125. Glogauer M, Arora P, Yao G, Sokholov I, Ferrier J, McCulloch CA. Calcium ions and tyrosine phosphorylation interact coordinately with actin to regulate cytoprotective responses to stretching. *J. Cell Sci.* 1997; 110: 11-21.
126. Li C, Xu Q. Mechanical stress-initiated signal transductions in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Cell Signal.* 2007; 19: 881-891.
127. Trepap X, Deng L, An SS, Navajas D, Tschumperlin DJ, Gerthoffer WT, et al. Universal physical response to stretch in the living cell. *Nature* 2007; 447: 592-596.
128. Marks C, Markey C, Dyer R, Vaupel MR. An electron microscopy study of the effects of portacaval shunts on the ultrastructure of the rat liver after partial hepatectomy. *Am. J. Surg.* 1975; 129: 156-162.

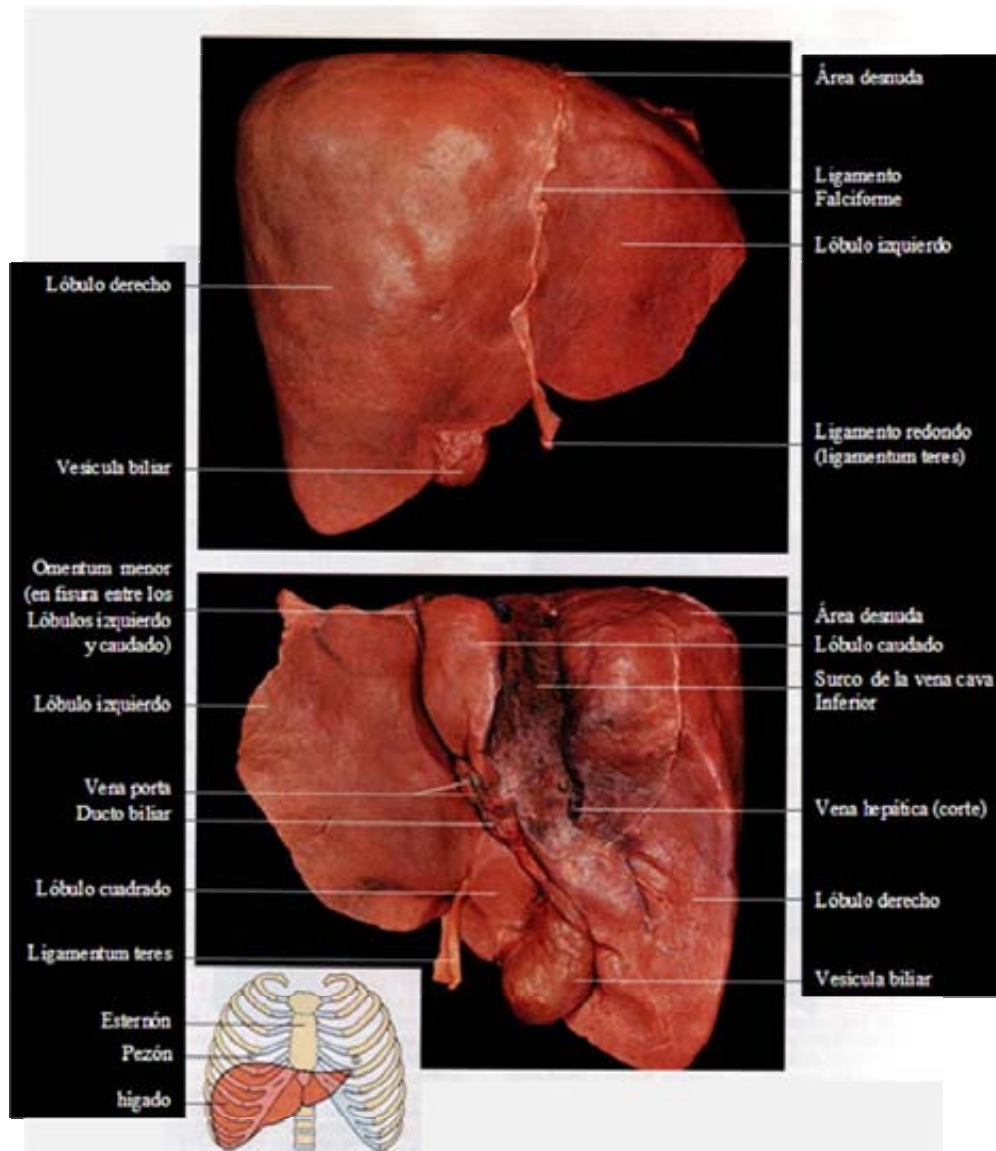


## *ANEXO I*

### **ABREVIATURAS**

HP	Hepatectomía parcial
NO	Óxido nítrico
CIAE	Canales iónicos activados por estiramiento
TGO	Glutamato-oxalacetato transaminasa
TGP	Transaminasa glutámico pirúvica
ALT	Alanino aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
OTC	Ornitín transcarbamilasa
LDH	Lactato deshidrogenasa
GDH	Glutámico deshidrogenasa

## ANEXO II



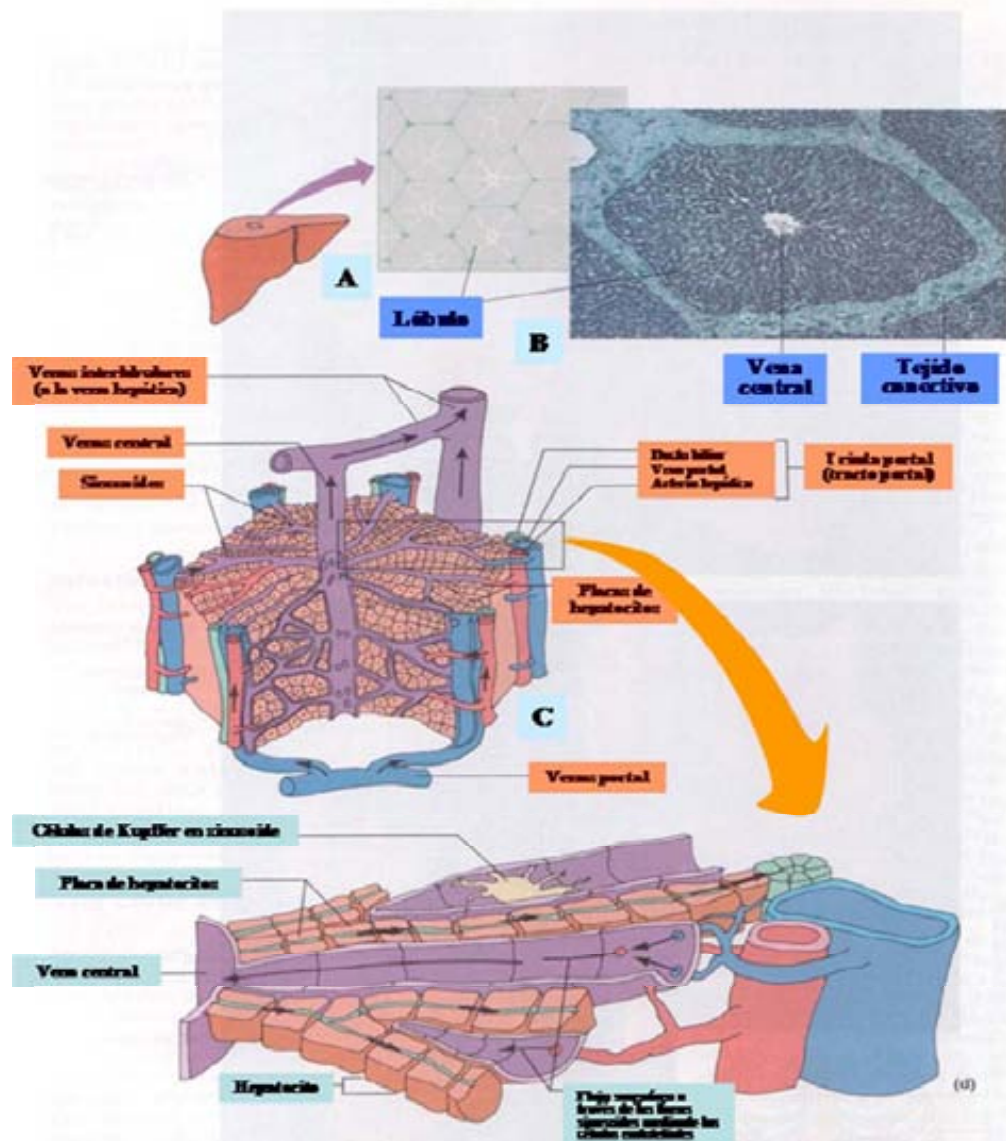
**Figura 1.** Localización anatómica del hígado.

*Adaptado de Marieb E N. Human Anatomy and Physiology. Third Edition. The Benjamin & Cummings Publishing, 1995. p 819.*

### FIGURA 1. LOCALIZACIÓN ANATÓMICA DEL HÍGADO

En la figura se muestra la localización macroscópica del hígado y dos disecciones en corte coronal que muestran las principales estructuras del hígado.

(Adaptado de Marieb E.N. Human Anatomy and Physiology. Third Edition. The Benjamin & Cummings Publishing, 1995. p.819)



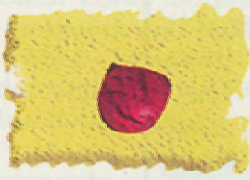
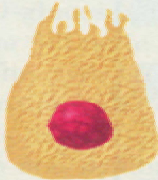


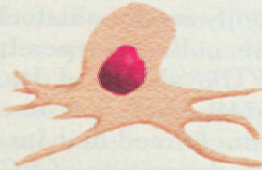
**Figura 2.** Anatomía microscópica del hígado.

*Adaptado de: Marieb E.N. Human Anatomy and Physiology. Third Edition. The Benjamin & Cummings Publishing, 1995. p 819.*

## FIGURA 2. ANATOMÍA MICROSCÓPICA DEL HÍGADO

En la figura se muestra la localización del acino hepático, así como sus relaciones anatómicas con los sinusoides; se puede apreciar la circulación portal y hepática en el hepatocito.

(Adaptado de Marieb E.N. Human Anatomy and Physiology. Third Edition. The Benjamin & Cummings Publishing, 1995. p.819)

	<b>HEPATOCITOS</b> Colágenas tipos I y III Fibronectinas Colágena tipo IV Laminina Entactina Perlecano
	<b>CÉLULAS DUCTALES</b> Colágenas tipos IV Laminina Entactina Perlecano
	<b>CÉLULAS DE ITO</b> Colágenas tipos I, III y IV Tenascina Undulina Laminina Entactina Perlecano
	<b>CÉLULAS ENDOTELIALES</b> Trombospondina Undulina Colágena tipo IV Laminina Entactina Perlecano
	<b>CÉLULAS DE KUPFFER</b> TGF- $\beta$

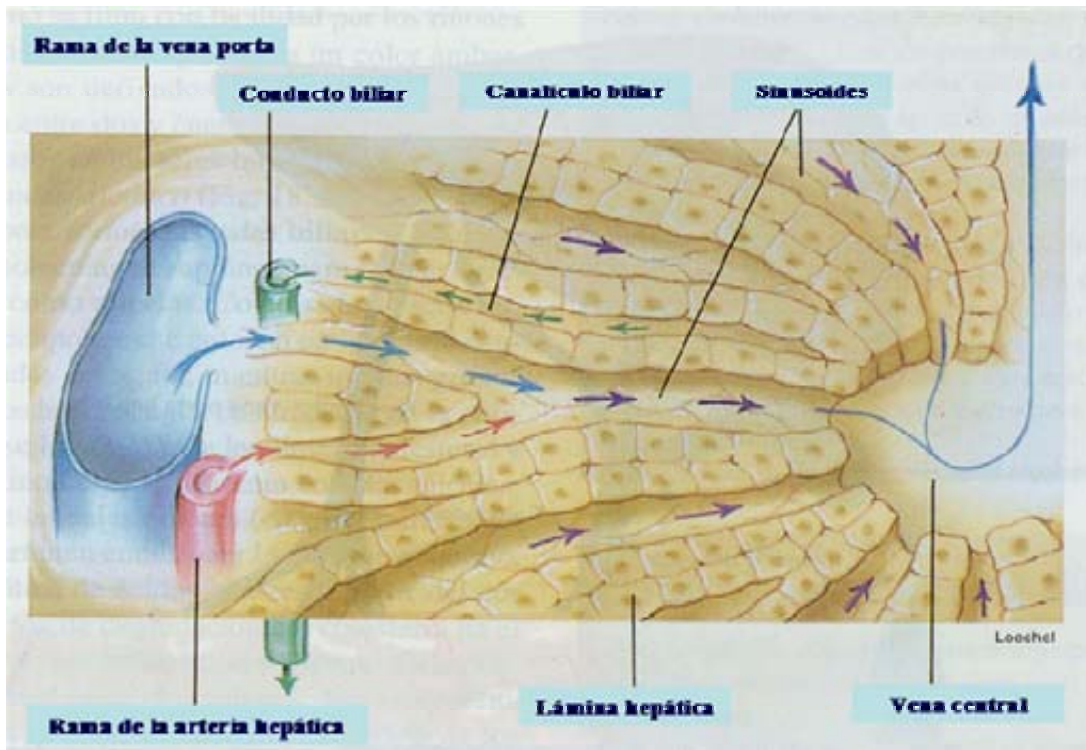
**Figura 3.** Tipos celulares en el hígado.

Adaptado de: *FASEBJ* 1995; 9:1401-1410

**FIGURA 3. COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN LOS DIFERENTES TIPOS CELULARES QUE CONFORMAN AL HÍGADO.**

La figura muestra los datos publicados por diversos autores, los cuales usaron una variedad de métodos (inmunohistoquímica, biología molecular, cultivo de tejidos, etc) tanto en hígados normales como regenerando y cirróticos. La figura indica el potencial de un tipo celular para secretar los componentes de la ECM más que la distribución de los tipos celulares en el hígado normal.

(The FASEB Journal. Vol 9. Noviembre 1995. pag. 1401-1410)



**Figura 4.** Irrigación arterial y venosa en el acino hepático.

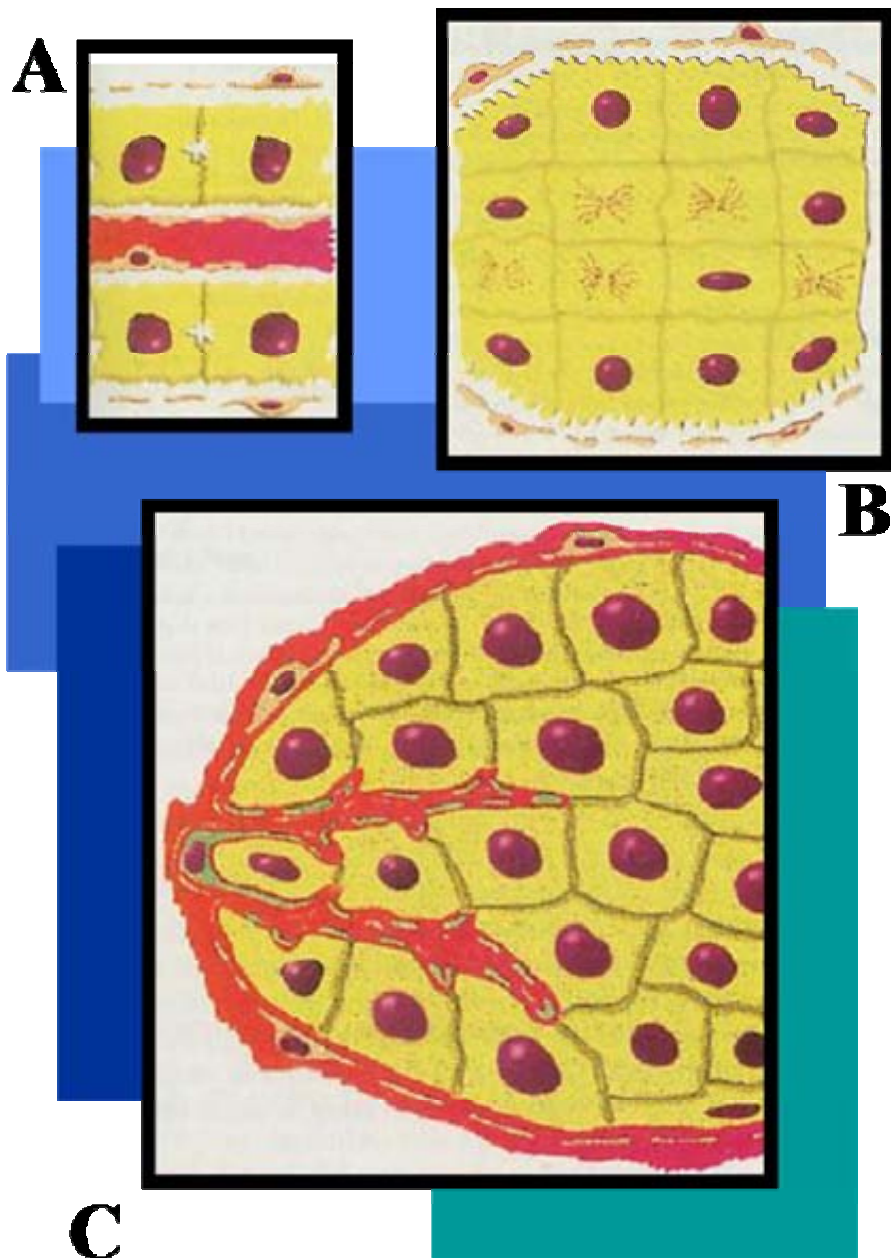
*Adaptado de Marieb E N. Human Anatomy and Physiology. Third Edition. The Benjamin & Cummings Publishing, 1995. p 819.*

## **FIGURA 4. IRRIGACIÓN ARTERIAL Y VENOSA EN EL ACINO HEPÁTICO**

En la figura se muestran a los sinusoides hepáticos y su íntima relación con el flujo sanguíneo.

(Adaptado de Marieb E.N. Human Anatomy and Physiology. Third Edition. The Benjamin & Cummings Publishing, 1995. p.819)





**Figura 5.** Vascularización en el lóbulo hepático. A) hígado normal. B) hepatocito en regeneración. C) hepatocito después de la mitosis (10-12 días post-hepatectomía).

Adaptado de: *FASEB J* 1995, 9:1401-1410











**FIGURA 5. VASCULARIZACIÓN EN LA REGENERACIÓN.**

La figura muestra la vascularización normal en el lóbulo hepático: (a), en el hepatocito normal (b) en regeneración (c) Después de la mitosis (10-12 días post-hepatectomía)

(The FASEB Journal. Vol 9. Noviembre 1995. pag. 1407)

FIGURA 6. COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR HEPÁTICA



## COLÁGENAS

COMPONENTES	CADENAS	PESO MOLECULAR	ASOCIACIÓN	AGREGADO	LOCALIZACIÓN EN EL HÍGADO
Colágena Tipo I	$\alpha 1(I), \alpha 2(I)$	310,000			Cápsula, triada portal, vena central, como fibras delicadas a través del espacio de Disse.
Colágena Tipo III	$\alpha 1(III)$	310,000			Cápsula, triada portal, vena central, ocasionalmente filamentos a través del espacio de Disse.
Colágena Tipo V	$\alpha 1(V), \alpha 2(V), 3\alpha(V)$	310,000			Componentes menores, distribución similar a la colágena tipo I, triada portal, venas centrales, abundante en el espacio de Disse.
Colágena Tipo VI	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), 3\alpha(VI)$	300,000			Fibrillas de anclaje, presentes en la triada portal.
Colágena Tipo VII	$\alpha 1(VII)$	590,000			Estructuras de anclaje en los ductos.

Los pesos moleculares son únicamente aproximaciones. Muchos componentes presentan Splicing alternativo y glicosilación variable, lo que resulta en una variabilidad significativa. Adaptado de: *FASEB J* 1995; 9:1401-1410.

TABLA 6-B. COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR HEPÁTICA

## GLICOPROTEÍNAS

COMPONENTES	CADENAS	PESO MOLECULAR	ASOCIACIÓN	AGREGADO	LOCALIZACIÓN EN EL HÍGADO
Fibronectina	Dímero	450,000		Depósitos globulares y filamentos finos	Distribución similar a la colágena tipo I, abundante en el espacio de Disse.
Tenascina	Hexámero	1'240,000		Depósitos granulares	Cápsula, triada portal, venas centrales, raro en el espacio de Disse.

## MEMBRANAS BASALES

COMPONENTES	CADENAS	PESO MOLECULAR	ASOCIACIÓN	AGREGADO	LOCALIZACIÓN EN EL HÍGADO
Laminina	Trímero	800,000			Presente en todas las membranas basales.
Entactina	Cadena simple	148,000			Presente en todas las membranas basales.
Colágena Tipo IV	Trímero 6 cadenas $\alpha$	450,000			Presente en todas las membranas basales y como depósitos discontinuos en el espacio de Disse.
Perlecano	Cadena simple	450,000			Presente en todas las membranas basales. También encontrada en el espacio de Disse.

Los pesos moleculares son únicamente aproximaciones. Muchos componentes presentan Splicing alternativo y glicosilación variable, lo que resulta en una variabilidad significativa. Adaptado de: *FASEB J* 1995; 9:1401-1410.

## FIGURA 6. LA MATRIZ EXTRACELULAR HEPÁTICA

En la figura se muestra una recopilación de los datos más sobresalientes sobre los componentes mayoritarios de la matriz extracelular hepática.

(The FASEB Journal. Vol 9. Noviembre 1995. pag. 1405).