

**EXPRESIÓN DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO
VASCULAR (VEGF) DURANTE LA
REGENERACIÓN HEPÁTICA.**

Méd. Vet. Laura B. ANDRINI



Facultad de Ciencias Médicas



Universidad Nacional de La Plata

EXPRESIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF) DURANTE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA.

Tesis Doctoral

Méd. Vet. Laura B. ANDRINI

Directora: Prof. Dra. Ana Lía Errecalde

Codirectora: Prof. Dra. Ana María Inda

A mis amores Agustina y Jorge

Agradecimientos

El trabajo de tesis es un logro personal muy importante, pero sin duda es el producto del esfuerzo de muchas personas... es por esta razón que mi agradecimiento está dirigido a todos los que hicieron posible concretar este sueño:

Al decano de la Facultad de Ciencias Médicas de la U.N.L.P por darme la posibilidad de realizar esta tesis ofreciéndome las instalaciones y mi lugar de trabajo.

A mi directora Ana Lía y a mi codirectora Ana, a ellas mis amigas que hicieron posible después de tantos intentos que llevara a cabo éste proyecto y poder de esta manera concretar un sueño muy anhelado, gracias de corazón a las dos.

A Susana Formoso, mi querida compañera, por sus impecables cirugías y por la pasión con la que trabaja por nuestro Bacterio, a ella que a pesar de sus malos momentos le puso el corazón y la vocación.

A Javiera por sus numerosas inmunoquímicas.

A Jorge Ronderos por su buena onda y por su apoyo en el área de la estadística.

A mis amigas: Adriana, Cecilia, Ayelén y Susana que supieron acompañarme a lo largo de esta carrera tanto con sus aportes científicos como así también con afectuosas palabras de aliento.

A mis compañeros docentes y no docentes de esta cátedra: al Dr. Carlos Martín, Marcos Barbi, Walter, Angélica y Vladimir gracias por la colaboración y buena onda.

A María Elena por su ayuda desinteresada.

A mi amiga Marcela, mi gran compañera de trabajo, a ella que en éste proyecto fue sin duda la que tuvo que ver con mi primera formación como investigadora, gracias por tu apoyo y amistad incondicional.

A mi familia, a mi madre y a mi tío Juan Carlos, a mi gran amiga Claudia y a mis amigos de toda la vida. Con ellos quiero compartir éste sueño.

Muchas Gracias

INDICE

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
• Ciclo celular	4
• Puntos de control del ciclo celular	11
• Ritmos biológicos	19
• Ritmos circadianos y proliferación celular	22
• Regeneración hepática	24
• Regulación de la respuesta regenerativa	26
• Efectos de las neoplasias sobre poblaciones celulares normales	31
• Efectos de la hepatectomía sobre el crecimiento tumoral	32
• Angiogénesis	33
• VEGF	38
• Actividad biológica del VEGF	39
OBJETIVOS	42
MATERIALES Y METODOS	44
• Animales	45
• Técnica quirúrgica	47
• Trasplante seriado subcutáneo del tumor	49
• Sacrificio de animales y recolección de las muestras	51
• Técnica histológica	51
• Técnicas inmunohistoquímicas	52
• Establecimiento de los índices	54
• Análisis estadístico	58
• Diseños experimentales	58
RESULTADOS	60
• Experimento I	61

• Experimento II	63
• Experimento III	64
• Ratones hepatectomizados no portadores del tumor	65
• Ratones hepatectomizados portadores del tumor	66
DISCUSIÓN	67
CONCLUSIONES	78
TABLAS	81
GRÁFICOS	88
BIBLIOGRAFÍA	99

RESUMEN

Para que se produzcan procesos de proliferación celular, tanto en tejidos normales como tumorales, es necesaria la presencia de vasos sanguíneos. La formación de estos se realiza a través de un complicado proceso denominado angiogénesis y es estimulado fundamentalmente por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que es el más específico y potente, tanto para la angiogénesis como para la vasculogénesis. La aparición de una neoplasia ocurre como consecuencia de una alteración en el ciclo celular normal que lleva a una proliferación excesiva, y teniendo en cuenta que, uno de los aspectos críticos para el desarrollo de tumores sólidos es la formación de una fuente de irrigación sanguínea, tanto el conocimiento del crecimiento tisular como el de los procesos involucrados en la angiogénesis son fundamentales para enfrentar una de las principales causas de muerte en el hombre y en los animales domésticos, el cáncer. Por otro lado en la regeneración hepática, la formación de nuevos capilares a partir de la microvasculatura existente es un requerimiento fundamental, lo que convierte al hígado remanente a una hepatectomía parcial, en un excelente modelo experimental para estudiar algunos de los mecanismos involucrados en la cronobiología de la angiogénesis. En el presente trabajo de tesis se analiza la evolución de la expresión del VEGF, la síntesis de ADN y la actividad mitótica (AM) a lo largo de un periodo circadiano en los hepatocitos del ratón macho adulto durante la regeneración hepática y el efecto que ejerce la portación de un tumor maligno sobre dichos índices. Se utilizaron 252 ratones machos adultos que fueron sometidos a una hepatectomía parcial, la mitad de los cuales fueron además injertados con un tumor maligno. Estos animales se usaron para la realización de 3 experimentos: 1) estudio de la expresión del VEGF en ratones hepatectomizados portadores y no portadores del tumor; 2) estudio de la ADNs en ratones hepatectomizados portadores y no portadores del tumor y 3) estudio de la AM en ratones hepatectomizados portadores y no portadores del tumor. En cada experimento, los ratones fueron divididos en lotes de 6 a 8 animales y sacrificados cada 4 horas a lo largo de un período circadiano desde las 26 hasta las 50 horas poshepatectomía. En todos los casos se tomaron muestras de la porción triangular del lóbulo derecho del hígado que fueron procesadas con las técnicas histológicas adecuadas según los experimentos diseñados. Tanto para la detección de la expresión del VEGF como para la ADNs se

utilizaron técnicas inmunohistoquímicas y para la evaluación de la AM se utilizó H-E. A partir de los registros individuales se estableció el índice de expresión del VEGF, ADNs y AM expresado en porcentaje. A partir de estos índices individuales se calculó la media aritmética \pm error estándar de cada lote y de cada grupo. Estos datos se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza (Anova), en caso de que las diferencias fueran significativas se realizó el Test de Tuckey. Los resultados correspondientes a los ratones hepatectomizados no portadores muestran la existencia de curvas circadianas tanto para la expresión del VEGF con un valor máximo a las 08/46 (hora del día/hora poshepatectomía) de 2.6 ± 0.1 ; en la ADNs con un valor máximo a las 16/30 de 3.4 ± 0.3 y en la AM cuyo valor máximo se produjo a las 12/50 de 2.3 ± 0.01 . La presencia del tumor injertado ES2 genera cambios detectables en las curvas circadianas de la expresión del VEGF, en la ADNs y AM de los animales hepatectomizados, provocando modificaciones en la distribución espacial y temporal de los valores correspondientes a los mismos.

El valor máximo de expresión del VEGF se encontró a las 16/30, 8 horas después (00/38) se observó el de ADNs. Por su lado el valor máximo de AM se produjo 8 horas más tarde al mismo a las 08/46. Finalmente, se puede concluir que los factores de crecimiento producidos por las células del tumor maligno ES2, de ratones machos de la cepa C3HS hepatectomizados que son liberados a la circulación general, podrían reconocer al tejido regenerante con una alta tasa proliferativa como una metástasis y serían entonces los responsables de alterar el microambiente del tejido hepático determinando de esta forma cambios en la cronobiología de la síntesis de ADN, de la actividad mitótica y de la expresión del VEGF.

Palabras claves: VEGF- Regeneración hepática-tumor-ADNs-Actividad Mitótica

INTRODUCCIÓN

La división celular es una propiedad fundamental de los organismos vivos. Es el principal mecanismo de crecimiento de órganos y tejidos y depende del funcionamiento exacto de dos complejos metabólicos: el que lleva a la duplicación de estructuras celulares y el que lleva al almacenamiento de energía. La proliferación celular que lleva al crecimiento normal depende del balance entre el índice mitótico y la muerte celular programada o apoptosis. Este equilibrio puede alterarse, como ocurre después de un daño o destrucción celular, situación en la que muchos tejidos reaccionan desarrollando una tasa mitótica alta, que persiste durante todo el proceso de reparación.

Para que se produzcan procesos de proliferación celular, tanto en tejidos normales como tumorales, es necesaria la presencia de vasos sanguíneos **(73, 76)**. La formación de nuevos vasos sanguíneos, también es crucial en otros procesos como el desarrollo embrionario, las funciones reproductivas y la cicatrización de heridas **(17, 74)**. Por ejemplo, en la regeneración hepática, la formación de nuevos capilares a partir de la microvasculatura existente es un requerimiento fundamental. Este complicado proceso se denomina angiogénesis y es estimulado fundamentalmente por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que es el factor de crecimiento más específico y potente, tanto para la angiogénesis como para la vasculogénesis. **(181)**.

Por otra parte, la importancia de aceptar que la formación de una neoplasia ocurre como consecuencia de una alteración en el ciclo celular normal que lleva a una proliferación excesiva, y teniendo en cuenta, que uno de los aspectos críticos para el desarrollo de tumores sólidos es la formación de una fuente de irrigación sanguínea, tanto el conocimiento del crecimiento tisular como el de los procesos involucrados en la angiogénesis son fundamentales para enfrentar una de las principales causas de muerte en el hombre y en los animales domésticos, el cáncer.

Ciclo Celular

El crecimiento y desarrollo de los organismos vivos dependen del crecimiento y la multiplicación de sus células. En los organismos unicelulares, la división celular implica una verdadera reproducción, ya que por este proceso, a partir de una célula se originan dos células hijas. Por el contrario, los organismos multicelulares derivan de una sola célula (el cigoto), y la repetida

multiplicación de ésta y de sus descendientes determina el desarrollo y crecimiento del individuo **(48)**.

La reproducción celular está regulada exactamente, de tal manera que la formación de células nuevas compensa la pérdida de aquellas que mueren por apoptosis **(40, 202)** o por algún otro mecanismo, para poder así mantener un equilibrio adecuado u homeostasis celular.

El ciclo celular (CC) puede ser considerado como una serie de fenómenos en los cuales se sintetiza el material que luego se distribuirá en las células hijas. Se lo define como el conjunto de reacciones que se desarrollan en la célula para que ésta pueda dividirse en dos hijas **(4)**.

La duración del mismo varía según el tipo celular, y su regulación surge del efecto que factores externos, como la temperatura y los nutrientes disponibles, poseen sobre un reloj interno de base genética **(202)**.

En general, todas las células pasan por dos períodos en el curso de su vida: uno de interfase (no división aparente o reposo) y otro de división o mitosis **(4)**:

- **Interfase:** es un período de intensa actividad biosintética, durante el cual, la célula incrementa su tamaño y duplica el complemento cromosómico en preparación para la división celular. La mayoría de las células pasan la mayor parte de su vida en interfase.

La interfase comprende las etapas G1, S y G2 **(33)**

- ✓ **G1:** en esta etapa se activa la síntesis de ARN y proteínas, por lo que aumenta el número y tamaño de la mayor parte de los organelos. Este período es el más variable pudiendo durar días, meses o años. Las células que no se dividen (como las nerviosas o las del músculo esquelético) o que se dividen poco (como los linfocitos) permanecen largos períodos en G1, que en estos casos se denomina G0 porque las células se retiran del ciclo celular **(48, 167)**
- ✓ **S (síntesis de ADN):** es el momento en el que se duplican los cromosomas, ya que se produce la replicación del ADN y la síntesis de las proteínas como las histonas que forman parte de la cromatina.

La duración aproximada de esta etapa es de 6 a 8 horas. Sin embargo su extensión puede variar, no sólo entre distintas especies, sino también entre diferentes momentos del desarrollo de una especie, por ejemplo es más corta durante la segmentación embrionaria. La replicación de ADN se inicia a partir de complejos de prerreplicación formados durante el comienzo de la fase G1. Esto trae como consecuencia una única iniciación por ciclo en cada origen, lo que permite mantener la cantidad adecuada de cromosomas de la especie **(4, 117)**.

- ✓ **G2:** en esta etapa la célula sintetiza todas las proteínas necesarias para la división celular. Tiene una duración de 3 a 4 horas **(32)**.
- **Mitosis (o período M):** durante esta fase se produce la división de las células somáticas. Al final de ésta, la célula se divide en dos células hijas cromosómicamente idénticas a la original **(139)**. Toda la mitosis tiene una duración aproximada de una hora. Termina cuando la célula se divide en dos por el proceso de citocinesis (división citoplasmática).

Pese a que la mitosis es una secuencia continua de procesos, es tradicional dividirla en 5 fases:

1. la profase, en esta fase los cromosomas replicados inician su condensación y comienza a formarse el huso mitótico.
2. prometafase, en ella se rompe la envoltura nuclear, permitiendo a los microtúbulos entrar en contacto con los cromosomas y unirse a los cinetocoros de ellos.
3. la metafase, ocurre cuando las cromátides hermanas, de cada cromosoma, permanecen adheridas en el centrómero y se alinean en el plano ecuatorial de la célula.
4. la anafase, es la etapa en la que las dos cromátides hermanas, de cada cromosoma replicado, se separan sincrónicamente y viajan hacia los polos de la célula.
5. la telofase, en esta fase se reorganiza la envoltura nuclear alrededor de cada uno de los dos conjuntos de cromosomas separados en la anafase, y se forman dos núcleos.

6. a estas cinco fases de la mitosis, debemos agregar el proceso de citocinesis o división citoplasmática, por el cual la célula se divide en dos mediante un anillo contráctil de actina y miosina **(32, 139, 152)**.

Existe un estado en el cual la célula se considera fuera del ciclo celular, esta fase se denomina G0. Las células en G0 no se reproducen en condiciones fisiológicas normales. Algunas poblaciones celulares, como la mayor parte de las neuronas, permanecen toda su vida en G0. Otras, como los hepatocitos y las células epiteliales de los adenómeros glandulares, permanecen en G0 durante días, semanas o incluso años (67), pero pueden reiniciar su ciclo frente a ciertos estímulos como la pérdida de masa celular. Algunas células pueden salir del ciclo en G2, y reingresar en él iniciando la mitosis en un tiempo breve **(68,98)**.

En la segunda mitad del siglo XX se describieron dos modelos o teorías para explicar el CC:

- Teoría del dominó o de las cascadas regulatorias. Según este modelo, desarrollado por genetistas, el CC es una secuencia lineal de eventos donde la iniciación de cada paso depende del cumplimiento del anterior, ya que el producto de un paso es el substrato con el que se iniciará el siguiente.
- Teoría del reloj o *Master timing*. Según este modelo, planteado por fisiólogos y embriólogos, el CC es el resultado de la expresión de una maquinaria bioquímica que oscila entre la mitosis y la interfase, independientemente de la finalización de otros eventos.

Inicialmente estos dos modelos sobre el mecanismo del CC parecían incompatibles, sin embargo, en la actualidad se habla de una complementariedad entre las dos teorías, ya que ambas explican la regulación del CC en distintos momentos de la vida de un individuo. Durante las etapas iniciales del desarrollo embrionario el mecanismo que controla el CC es el postulado por la primera de estas teorías, mientras que durante la reproducción de las distintas poblaciones celulares en estadios ontogénicos más avanzados, la realidad se acerca a la propuesta del segundo modelo **(122, 155, 156)**.

Durante las últimas décadas mucho se estudió acerca de los mecanismos moleculares que determinan la progresión a través del CC. Los modelos originalmente estudiados fueron las levaduras y el embrión temprano del anfibio *Xenopus*, ya que a pesar de los mil millones de años de evolución divergente, todas las células eucariotas utilizan esencialmente las mismas moléculas para controlar los procesos que ocurren durante el CC **(122)**.

Este complejo control es ejercido por una pequeña cantidad de proteínas quinasas heterodiméricas formadas por una porción reguladora denominada ciclina y una catalítica conocida como quinasa dependiente de ciclina (Cdk).

Las concentraciones de las subunidades ciclinas reguladoras aumentan y disminuyen en fase con el CC. Las Cdks sólo tienen actividad enzimática cuando se asocian con una ciclina. A diferencia de lo que ocurre con las ciclinas, la concentración de las Cdks no se modifica durante el ciclo, en cambio su actividad, al ser dependiente de ellas, varía a lo largo del mismo.

Cada subunidad catalítica puede asociarse con diferentes ciclinas. La naturaleza del complejo Cdk-ciclina determina cuáles serán las proteínas fosforiladas **(125)**.

La importancia de estos complejos Cdk-ciclina en la proliferación celular comenzó a vislumbrarse en la década de 1970 cuando fue descubierto en embriones de anfibios el factor promotor de la mitosis (FPM). Este factor regula la iniciación de la mitosis en todas las células eucariontes. Durante cada CC la actividad del FPM oscila periódicamente, siendo máxima al inicio de la mitosis y mínima o nula en las otras fases. El FPM está formado por dos proteínas de distinto peso molecular, una de 34 Kda, llamada p34 y la otra de 45 Kda, llamada p45 **(155)**. La p34 es una Cdk codificada por el gen *cdc2* (del inglés: *cell division cycle*). La p34 al activarse fosforila a moléculas cruciales para la división celular como la histona H1, proteína implicada en el empaquetamiento tridimensional del ADN, y las proteínas lámina, que forman la lámina nuclear y cuya fosforilación es responsable de la fragmentación de la membrana nuclear.

Esta Cdk se ha encontrado en todos los organismos eucariotas, aunque en las distintas especies se la ha denominado de diferentes maneras tales como Cdc2, Cdc28, Cdc28h **(152, 155, 211)**. A principios de la década de 1980, se descubrió la otra fracción del FPM a la que se denominó ciclina B.

Esta ciclina es la responsable de la activación del gen P34 **(155)**. Al principio de la interfase la Cdk2 está desfosforilada, pero cuando se asocia con la ciclina, se induce la fosforilación de la tirosina 15 y la treonina 16 y se produce un pre-FPM. Luego de la entrada en mitosis este pre-FPM se activa a FPM mediante la desfosforilación de la tirosina 15. El FPM también activa enzimas que degradan a las ciclinas y de esa manera se autorregula **(213)** ya que la disminución de la actividad de éste y la salida de la mitosis dependen de la degradación de la ciclina B **(125)**. La destrucción de ésta y de otras ciclinas se produce mediante un proceso denominado la poliubiquitinización. Las proteínas a punto de ser destruidas se marcan con numerosas moléculas de ubiquitina para ser reconocidas por los proteasomas, estructuras multiproteicas cilíndricas que contienen abundantes proteasas, en los que se lleva a cabo su rápida degradación **(125)**.

Más recientemente se descubrió el factor promotor de la fase S (FPS), que fosforila y regula las proteínas necesarias para la síntesis del ADN. Este factor es un heterodímero compuesto por una Cdk que es Cdc28 y una ciclina. Experimentos posteriores demostraron que en realidad Cdc28 se une a tres ciclinas denominadas ciclinas de G1, formando tres complejos, que constituyen los factores promotores de la fase S **(125)**.

En la mayoría de las células de mamíferos las principales Cdk activas han sido denominadas Cdk1, 2, 4 y 6 según el orden de su descubrimiento **(125)**. Las células de los mamíferos poseen distintos tipos de ciclinas, siendo las más importantes las denominadas A, B, D y E **(152, 161, 213)**. Las dos últimas son fundamentales para que la célula duplique su ADN y las primeras para que entre en mitosis. Cuando las ciclinas provocan la entrada en la fase S se denominan ciclinas de G1, mientras que cuando producen la entrada a la fase M se denominan ciclinas de G2.

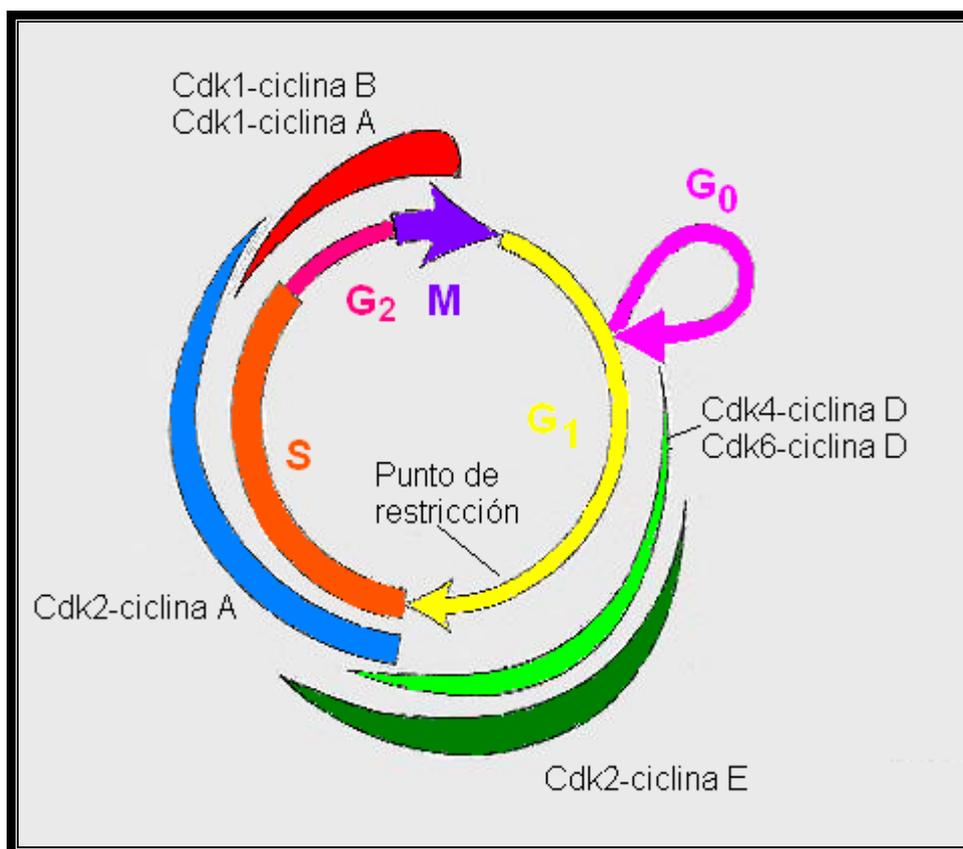
La ciclina D es indispensable para que la célula atraviese el punto de restricción R, ubicado al final de la fase G1 del CC. En el hombre existen tres ciclinas de tipo D emparentadas y las cantidades relativas de las tres en diversos tipos celulares son diferentes, por eso nos referimos a ellas en forma colectiva como ciclina D **(125)**. El aumento en la concentración de la ciclina E también es necesario para que ocurra la transición G1-S.

La ciclina A actúa cuando se inicia la fase S, uniéndose a Cdk1, la ciclina B también se une al Cdk1 actuando en la fase G2. La formación de estos dos complejos es indispensable para la progresión del CC **(228)**. Las ciclinas A y B regulan a su vez la entrada en mitosis **(161)**.

Se conocen, en los mamíferos, tres clases de complejos Cdk-ciclinas que controlan el paso a través del CC: los de G1, de fase S y mitótico. Los complejos de G1 preparan a las células para la fase S mediante la activación de factores de transcripción que causan la expresión de las enzimas necesarias para la ADNs (Fig.1). Al final de G1 estos complejos inducen la degradación del inhibidor del complejo de fase S, lo que estimula el ingreso a esta fase **(125)**.

Los complejos de fase S fosforilan sitios reguladores en las proteínas que forman los complejos de prerreplicación del ADN. Esto activa la iniciación de la replicación de éste e impide la aparición de nuevos complejos de prerreplicación, para que cada cromosoma sólo se replique una vez durante el transcurso del CC.

Los complejos mitóticos, que solo actúan una vez que se ha completado la ADNs, inducen la condensación cromosómica y los demás cambios que ocurren en la célula para que se inicie la mitosis. Luego de que todos los cromosomas se unen en forma correcta con los microtúbulos del huso, los complejos mitóticos activan al complejo promotor de la anafase (CPA). Este complejo multiproteico dirige la proteólisis, mediada por ubiquitina, de los inhibidores anafásicos, lo cual permite el inicio de la anafase. El CPA también dirige la degradación proteolítica de las ciclinas mitóticas, con lo que se desencadenan la telofase y la citocinesis **(125)**.



Esquema del ciclo celular de una célula de mamíferos, en el que se indican los momentos en que actúan los distintos complejos ciclinas-CDKs.

Puntos de control del ciclo celular.

En los organismos multicelulares el preciso control del CC, durante el desarrollo y el crecimiento, es decisivo para determinar el tamaño y la forma de cada tejido. La replicación celular está controlada por una compleja red de mecanismos de señalización que integran señales extracelulares referidas a la identidad y la cantidad de células vecinas, y señales intracelulares sobre el tamaño celular y programa de desarrollo.

Existen puntos de control que verifican el progreso de la célula a través del CC, para reducir al mínimo la aparición de errores en los diferentes acontecimientos. Durante estos puntos la célula toma la decisión de continuar o no en el ciclo. El primer punto es el denominado R o de restricción que ocurre al final de G₁. Otro punto de control funciona durante las fases S y G₂, para impedir la activación del FPM antes de que se complete la síntesis de ADN. Por último existe un control al principio de la mitosis, para evitar la activación del CPA y la iniciación de la anafase, antes que el huso mitótico se forme por

completo y los cromosomas estén fijados de manera adecuada a los microtúbulos del huso **(125)**.

En mamíferos, el control en G1 está ejercido por una proteína citoplasmática denominada p53 (la denominación se debe a que su masa molecular es de 53 Kda), que funciona como un factor de transcripción actuando también como un sensor de los estímulos externos generados por los factores de crecimiento. La proteína p53 es codificada por un gen llamado P53, que pertenece a la categoría de los genes supresores de tumores. Se trata de un factor de transcripción que estimula la expresión de un gen que codifica una proteína inhibidora de las Cdk llamada p21, la cual se une a los complejos ciclina-Cdk bloqueando su acción, por lo que las células, al no replicar su ADN, quedan detenidas en la fase G1. Finalmente, si se comprueba que el daño en el ADN no se corrigió, p53 vuelve a actuar, pero ahora en la fase G2, para provocar la muerte de la célula progenitora y con ella la desaparición del riesgo que implica para el organismo el ADN alterado **(48, 92, 93, 122, 134, 157)**.

El segundo punto de control, que ocurre en G2, inmediatamente antes de la mitosis, también llamado período de control G2-S, tiene una importancia aparentemente menor a la de G1. En éste, la célula verifica la corrección de la síntesis del material genético **(48, 122, 157)**. En mamíferos, este punto de restricción está secuencialmente controlado por una serie de ciclinas: A, D y E que se unen a Cdks **(191, 225)**, p53 también actúa en el control de este punto.

Se ha descrito un tercer punto de control de la progresión del CC, ubicado durante la anafase de la mitosis. De alguna manera, este control se percibe cuando el huso mitótico no se ha formado del modo adecuado y las células quedan detenidas en la mitosis sin finalizarla **(157)**, p53 no interviene en este punto de control.

Además de los mecanismos de regulación intrínsecos mencionados anteriormente, existen mecanismos extrínsecos que controlan el CC mediante señales procedentes de otras células, como son los factores de crecimiento y otras moléculas señalizadoras, las cuales pueden estimular o inhibir la proliferación celular **(46, 91, 104, 133)**.

Se denominan factores de crecimiento a macromoléculas polipeptídicas que presentan acciones específicas, potentes, sobre la regulación del crecimiento, diferenciación y motilidad de determinadas células blanco **(45, 46,**

91, 132, 133). Estos factores pueden actuar en distintos momentos del CC. Algunos, denominados “factores de competencia”, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), actúan en el pasaje de G0 a G1; mientras que otros, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento insuliniforme (IGF), conocidos como “factores de progresión” desencadenan el pasaje de G1 a S (**1, 45, 46**).

Los factores de crecimiento son primeros mensajeros que interactúan con receptores glicoproteicos de membrana que traducen la señal. Los receptores para estas sustancias son quinasas que por lo general fosforilan en el aminoácido tirosina (TK). Los factores de crecimiento alcanzan acciones fisiológicas a bajas concentraciones, pudiendo unos pocos picogramos poseer funciones biológicas (**1,46**).

Un único factor de crecimiento puede tener diferentes funciones cuando actúa sobre distintas poblaciones celulares, ya que la regulación del crecimiento no es una propiedad de un factor determinado, sino que depende de una compleja serie de interacciones (**4, 45,46, 133, 200**).

Por lo general, los factores de crecimiento actúan mediante mecanismos paracrinos, autocrinos o yuxtacrinos. Sin embargo, algunos pueden ser transportados por sangre, como por ejemplo el IGF, el PDGF y el factor de crecimiento transformante beta (TGF β) que originan formas latentes por unirse a proteínas séricas y a los gránulos plaquetarios. Otros, como los miembros de la familia de los factores de crecimiento fibroblásticos (FGF), pueden interactuar con componentes de la matriz favoreciendo la creación de un microambiente especial para ejercer su efecto (**46**).

Los grupos más importantes entre las diversas familias de factores de crecimiento que se conocen son:

- **Superfamilia del Factor de crecimiento transformante beta (TGFbeta).**

La familia del TGFbeta, comprende 5 tipos y sus correspondientes subtipos.

Los TGFbeta 1, 2 y 3 se localizan en diferentes tejidos de mamíferos, siendo los gránulos alfa de las plaquetas el sitio de mayor

abundancia de estos factores, siguiendo en magnitud de concentración el hueso. Los TGFbeta 4 y 5 no se han aislado en mamíferos **(86)**.

Hasta el momento se han detectado 9 tipos de receptores para estos factores. Los tipos I y II son los receptores más ampliamente difundidos, son glicoproteínas de transmembrana que funcionan como quinasas de serina y treonina **(86)**.

Los TGFbeta son los factores inhibidores de la proliferación celular más importantes. Esta inhibición se ha demostrado *in vitro* sobre diversos tipos de epitelios, endotelios y fibroblastos **(3, 169)**. Actúan especialmente mediante mecanismos autocrinos, tal como se observó en epidermis. También se ha demostrado *in vitro* que poseen acciones estimulantes sobre la diferenciación de algunas células y sobre la síntesis de colágeno, fibronectinas y proteoglicanos. **(43)**.

In vivo, se demostró que la mayoría de los ratones nulos para TGFbeta1 mueren durante la vida prenatal, los que llegan a nacer presentan inflamaciones de distintos órganos y mueren al cumplir 3 semanas de vida **(118)**.

Dentro de esta superfamilia encontramos también a la familia del decapentapléptico (DPP), la cual incluye alrededor de 20 sustancias que intervienen en el desarrollo ontogénico de los metazoos **(70)**; la familia del MIS (sustancia inhibitoria de Müller), la cual es producida por las células de Sertoli fetales e induce la apoptosis de los conductos de Müller en el embrión masculino **(27)** y la familia de las activinas e inhibinas, las cuales constituyen un grupo de péptidos diméricos aislados del licor folicular de los folículos ováricos que poseen capacidad para regular la producción de FSH por la hipófisis **(162)**, aunque hoy se conoce que las activinas también tienen funciones muy importantes durante el desarrollo embrionario y la reparación de heridas.

- **Familia del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF).** El PDGF fue aislado en 1974 a partir de los gránulos alfa de las plaquetas sanguíneas. Las 3 formas más comunes son: AA, AB y BB. Los receptores para PDGF son TK diméricas que inician cascadas de reacciones que culminan con la estimulación de protooncogenes nucleares como c-fos y c-myc **(81)**.

In vitro poseen efectos sobre diversas poblaciones celulares. Se sabe que estimulan la proliferación y detienen la diferenciación de células tan diversas como miocitos del músculo liso y células de Ito **(81)**.

In vivo se ha comprobado su intervención en procesos de regeneración y reparación, como por ejemplo en la regeneración muscular y cutánea **(28)**.

- **Familia de los factores de crecimiento fibroblásticos (FGF).**

Dentro de esta familia se incluyen varios miembros como el FGF1, el FGF2 y el FGF7 (también llamado KFG o factor de crecimiento para queratinocitos) **(63)**. El prototipo de la familia es FGF-2 o bFGF. Este actúa no solo mediante la unión a receptores TK, sino también por acción directa sobre el núcleo, que al internalizarse forma complejos FGFR-FGF que actuarían como factores de transcripción. Además, la secreción de FGF-2 no se produce por exocitosis, como ocurre con los demás factores, sino que la célula lo libera al ser destruida o cuando presenta ciertas alteraciones **(189)**.

In vitro se ha comprobado que los FGFs poseen efectos mitogénicos, quimiotácticos y estimulantes sobre la diferenciación celular **(10)**. Dentro de las células que son blanco de su acción se encuentran: condrocitos, hepatocitos, osteoblastos, mioblastos, melanocitos, células indiferenciadas del sistema nervioso central, epitelio esofágico, etc **(63)**. *In vivo* se han corroborado algunas de las funciones que estos factores poseen *in vitro*. Se destacan los efectos sobre el desarrollo embrionario y, en el caso específico de KGF, el efecto mitogénico sobre los epitelios.

- **Familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF).**

Esta familia está constituida por un grupo de péptidos que incluye a: EGF, TGFalfa (Factor de crecimiento transformante alfa), int 2, *Vaccinia growth factor*, anfiregulina, beta regulina y la subfamilia de las neuroregulinas **(227)**.

La homología entre el EGF y el TGFalfa es de un 55% **(186)**. Ambos comparten un receptor, c-erbB o EGFR, que es también una TK **(142)**. Los receptores del EGF, conocidos también como ErbB, consisten

en 4 receptores de transmembrana los cuales se unen a receptores tirosina kinasa, entre los que se incluyen: EGF, Amphiregulin, Betacellulin, Heparin-Binding EGF, Epiregulin y Neuregulinas. **(227)**.

El EGFR es abundante en diversas poblaciones celulares, especialmente en los epitelios como el del esófago y el del intestino **(83)**. La producción de EGF es importante en las glándulas submaxilares, glándulas de Brunner y tubos contorneados distales del riñón **(203)**. La expresión del gen de EGF y de EGFR en los tejidos varía con el sexo, la edad y la hora del día **(184)**.

In vitro la presencia de estos péptidos estimula la proliferación de poblaciones epiteliales tales como hepatocitos y células de los túbulos renales **(140)**. También eleva los índices de apoptosis en diversas líneas celulares **(112)**.

In vivo se ha demostrado que el tratamiento de ratones adultos con TGFalfa produce una elevación de la ADNs en los epitelios de lengua, pulmón, esófago, estómago glandular y aglandular, intestino, etc., este fenómeno tiene dependencia con los ritmos circadianos **(112, 184)**.

- **Factor de crecimiento hepatocítico (HGF).**

Este factor tiene localizaciones y acciones múltiples por lo que en un comienzo, al creer que eran sustancias distintas, se lo denominó de diferentes formas tales como hepatopoyetina A, factor *scatter*, factor citotóxico tumoral y factor mitógeno epitelial derivado de fibroblastos. Actualmente se sabe que todos estos nombres se refieren a la misma sustancia a la que se conoce como HGF **(102)**.

El receptor de HGF (HGFR) es el producto del protooncogén c-met. Es una TK que por lo general se encuentra en epitelios y melanocitos y liga al factor producido por células del estroma. En el hígado el HGF es sintetizado por las células de Ito y en el riñón por las endoteliales y mesangiales **(102)**.

El HGF es un modulador pleiotrópico de la proliferación, morfogénesis y desplazamiento epitelial. *In vitro* es el mitógeno más potente para hepatocitos, estimulando también la proliferación de las

células de los túbulos colectores y los proximales renales, y de líneas celulares de melanomas y de carcinomas mamarios **(168)**. También modifica la motilidad de diversos cultivos primarios y de numerosas líneas celulares **(138)**.

In vivo se conoce su importancia en la regeneración hepática que sigue a una hepatectomía subtotal en roedores **(145)**, así como sus acciones en la regeneración renal **(138)**.

- **Factores de necrosis tumoral (TNF).**

Esta familia incluye 2 factores: TNFalfa (o caquexina) y TNFbeta (o linfotoxina) **(219)**.

El TNFalfa es producido por diversas células, entre las que se incluyen a las endoteliales, macrófagos, monocitos, linfocitos, polimorfonucleares neutrófilos, astrocitos y miocitos del músculo liso, en cambio la producción de TNFbeta está más restringida, limitándose a los linfocitos T CD4 y CD8 activados **(219)**.

In vitro el TNFalfa inhibe la producción de colágeno **(35)**, también produce muerte celular en hepatocitos en cultivo y en numerosas líneas celulares (108).

In vivo repara daños tisulares, por lo que su producción es inducida en grandes cantidades por lipopolisacáridos, bacilo de Calmet-Guerin, virus, IFNdelta, células tumorales, toxinas parasitarias, IL2 y fracciones del complemento como C5a. Su administración a dosis elevadas, origina los trastornos típicos de las endotoxinas, incluyendo caquexia, acidosis, inflamación, fiebre, rigores, mialgia, cefalea, injuria tisular, shock, CID (coagulación intravascular diseminada) y muerte **(166, 210)**. En el hígado se asocia a efectos relacionados tanto con la regeneración como con la reparación. Inicia la cascada que lleva a la fibrosis **(9)**, pero cuando se administra en dosis menores a la tóxica, estimula la ADNs y la actividad mitótica del hígado regenerante **(29)**. Durante la regeneración hepática el TNFalfa sería producido por las células de Kupffer **(144)**.

El TNFbeta compite con el TNFalfa por el receptor; su acción principal es inducir muerte celular, también incrementa el efecto

citotóxico de los neutrófilos y la adhesión de plaquetas y leucocitos al endotelio **(219)**.

- **Familia de los Factores de crecimiento semejantes a insulina (IGFs).** Estas sustancias actúan como mediadores de las acciones de la hormona del crecimiento (GH), por lo que en un principio fueron denominadas somatomedinas. Posteriormente se les otorgó el nombre de IGFs por sus semejanzas estructurales y funcionales con la insulina. Hoy se conocen dos miembros en la familia: IGF I e IGF II **(220)**.

Existen dos receptores para IGFs: IGFR-I e IGFR-II. El IGFR-I es una TK muy semejante al receptor de insulina, mientras que el IGFR-II no es una TK, sino que es el receptor de manosa 6-P típico de los lisosomas. La función de IGFR-II como receptor para los IGFs es exclusiva de los mamíferos y sólo sería indispensable durante el desarrollo prenatal **(220)**.

Los niveles séricos de los IGFs se mantienen mediante la producción hepática, los tisulares obedecen a la sumatoria de factores liberados por mecanismos paracrinos y autocrinos, además de aquellos derivados de la síntesis endocrina hepática. La producción hepática es regulada por la GH, pero la de los otros tejidos es coordinada por señales diferentes **(103)**. Existe un grupo de proteínas de unión a los IGFs, las IGFBP, de las que existen 6 tipos. La más importante es la IGFBP-3, que es la encargada de ligar a los factores presentes en plasma **(179)**.

In vitro se demostró que los IGFs son factores de progresión, que para ejercer efectos mitogénicos requieren previamente de la acción de factores de competencia como PDGF que eleva la concentración de IGFR de las células. Estos factores incrementan la proliferación de condrocitos, osteoblastos, músculo liso, epitelio de los túbulos contorneados proximales, queratinocitos, astrocitos, etc. Además impiden la entrada en apoptosis de células hematopoyéticas y estimulan la diferenciación de mioblastos y osteoblastos **(103)**.

In vivo los IGFs son los mediadores de muchas de las acciones de la GH, reemplazando la mayor parte de los efectos de la hormona cuando se inyectan en ratas hipofisectomizadas **(199)**.

- **Familia del Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).**

El miembro representativo de esta familia es el VEGF-A. Este factor es un mitógeno específico de las células endoteliales que interviene tanto estimulando la vasculogénesis como incrementando la permeabilidad vascular **(181)**. VEGF-A es capaz de inducir la formación de nuevos vasos tanto a lo largo del desarrollo y crecimiento normal como durante la reparación fisiológica de los tejidos **(87)**.

Más adelante se describe con mayor detalle.

- **Steel o Factor de crecimiento para mastocitos o para Stem cells.**

Este factor es necesario para el mantenimiento de los melanocitos y de las células primordiales germinativas. Su receptor es el producto del protooncogén c-kit semejante al PDGFRalfa. **(127)**.

Ritmos biológicos

Se puede definir el término ritmo como la variación periódica de un proceso en el tiempo. Se trata de la manifestación de un fenómeno que se repite con el mismo período. Por otra parte, se define como período al intervalo en el que un ciclo se completa.

Muchos procesos fisiológicos tales como la velocidad de crecimiento, la tasa metabólica, etc. cambian según la hora del día, el clima y las estaciones del año. Algunas especies surgen y desaparecen; toda la vida se manifiesta como un movimiento permanente; sin embargo los procesos biológicos presentan ciclos que se repiten con cierta frecuencia. La comprensión de la importancia de la ritmicidad pasa, en gran medida, por la demostración de la generalidad de este fenómeno en prácticamente todos los seres vivos estudiados en diversos niveles de análisis, que van desde el metabolismo celular hasta el comportamiento de las poblaciones.

Los ritmos biológicos (RB) dotados de periodicidad no están subordinados a alguna concientización del tiempo medido por el reloj mecánico, sino que están controlados por relojes biológicos, los que en un buen número de casos ya son conocidos.

Para Pittendrigh (171) el ciclo diario de luz habría sido el agente primario selectivo para que emergieran oscilaciones rítmicas. La obtención de curvas de respuesta de fase en varias especies de animales y vegetales mostraba inequívocamente que algunos factores ambientales, tales como la iluminación o la temperatura tenían efectos importantes sobre la expresión de los ritmos endógenos, produciendo ajustes (sincronizaciones) a través de mecanismos biológicos específicos y dentro de límites bien definidos para cada especie.

Las oscilaciones externas sincronizadoras de la expresión de los ritmos endógenos (como la alternancia luz/oscuridad) fueron denominadas *Zeitgebers*, neologismo alemán que significa “donantes del tiempo” por Aschoff (12), o agentes sincronizadores por Pittendrigh (171).

Potencialmente, muchos ciclos físicos como aquellos de presión atmosférica, de campos electrostáticos y electromagnéticos, serían reconocidos como *Zeitgebers*. Existen evidencias dispersas de los efectos de algunos de éstos sobre los ritmos de roedores (94). Muchas manipulaciones de rutina en animales de laboratorio, tales como el cambio de jaula, la administración de drogas, etc, tienen efectos importantes sobre los RB (153).

También se reconoció la influencia de la disponibilidad de alimento sobre los RB en roedores, marsupiales y otros mamíferos (94). La demostración básica de la cronobiología, según la cual el estado de los organismos varía regularmente a lo largo del tiempo, tiene implicancias importantes sobre las variaciones en los efectos de drogas, tanto en organismos sanos como enfermos. Esta aplicación del conocimiento de los RB se denominó Cronofarmacología. Así se supo que la aplicación de drogas para inducir respuestas satisfactorias y tratar estados patológicos tiene una eficacia diferente según el momento en que se administran los medicamentos a los pacientes (198). También se observó que la toxicidad y la eficacia de más de veinte agentes anticancerígenos dependen de la temporización circadiana en su administración, así como el éxito del tratamiento de algunos tumores puede depender del momento en que se realice la extracción del mismo (148).

En los RB se puede establecer un valor máximo, denominado pico o acrofase, un valor mínimo o valle y un valor medio o mesor. La diferencia entre los valores máximos y mínimos se denomina amplitud y el número de ocurrencias por unidad de tiempo se conoce como frecuencia. El período es la duración en unidades de tiempo de cada ciclo, obviamente es inversamente proporcional a la frecuencia. Con el término fase se designa al valor en un determinado momento.

Los RB se manifiestan en períodos que van desde milisegundos, como los ritmos de disparo de neuronas; hasta siglos, como el movimiento del bambú chino (ciclos de 100 años). Según la frecuencia, los RB se pueden clasificar en:

- ✓ **Ritmos de alta frecuencia:** se repiten en un tiempo que va de un segundo a media hora, como ejemplo podemos mencionar los ciclos respiratorios y cardíacos.
- ✓ **Ritmos de frecuencia media:** Su periodicidad varía entre los 30 minutos y los 2,5 días. Los que están asociados al ciclo luz/oscuridad son conocidos como ritmos circadianos (RC), (del latín: *circa*, próximo; *dies*, día), y su período varía entre 20 y 28 h, de acuerdo a la especie. Dentro de esta frecuencia encontramos también a los ritmos infradianos, ritmos de baja frecuencia, con períodos de más de 28 h, y los ritmos ultradianos, oscilaciones de mayor frecuencia, con períodos menores a 20h.
- ✓ **Ritmos de baja frecuencia:** tienen períodos mayores a los 2.5 días, como los ritmos semanales, circunmensuales y circanuales **(38, 54, 147)**.

Para explicar la compleja expresión de los ritmos intrínsecos de los organismos aplicamos el concepto de intermodulación, ya que una buena sincronización de los eventos produce un mejor aprovechamiento de los recursos energéticos disponibles. La comprensión de las correlaciones e interacciones entre los ritmos circadianos, ultradianos e infradianos es fundamental para comprender la organización temporal de los seres vivos.

Los RB tienen una base genética, habiéndose encontrado genes que los regulan en ratón, hamster, *Drosophila*, nematodos y hongos. En general estos genes son de dominancia incompleta **(217)**. Los ritmos, establecidos

genéticamente, no coinciden exactamente con los ciclos geofísicos, pero el medio externo, mediante los *Zeitgebers*, condiciona esta periodicidad innata y la hace coincidir con los ciclos ambientales **(147)**.

El oscilador primario de los ritmos es el núcleo supraquiasmático, al que llegan las fibras de las neuronas W de la retina, que no intervienen en la visión. Este núcleo se conecta con otras áreas hipotalámicas, incluidas aquellas que regulan la función adenohipofisaria. También se conecta con el ganglio cervical superior, que a su vez envía fibras a la glándula pineal regulando la producción de melatonina, hormona que actúa sobre diversas áreas del sistema nervioso central, incluyendo al núcleo supraquiasmático **(38, 147)**. En general, las hormonas suelen actuar como mediadores tisulares de los RB, por ejemplo la adrenalectomía determina la suspensión de los RC de la actividad mitótica, del número de eosinófilos en sangre y de la concentración hepática de fosfolípidos **(95, 157)**.

Cuando se realizan experimentos cronobiológicos, como ocurre en este plan, es imperativo que el ciclo luz-oscuridad sea controlado, registrado y explicitado ya que este ciclo es considerado el principal sincronizador de los RC, por modificar la fase de los ritmos de muchas especies. Otros sincronizadores, tales como los cambios cíclicos en la temperatura, el nivel de ruido, los olores, la humedad y la disponibilidad de alimento, deben ser mantenidos en niveles relativamente constantes, permitiendo que solamente el ciclo luz-oscuridad actúe como sincronizador. En el caso de una investigación de los RC el intervalo entre medidas debe ser de aproximadamente 4 h **(8)**.

Ritmos Circadianos y proliferación celular.

Las diferentes etapas del CC presentan, en numerosas poblaciones celulares, variaciones circadianas **(23, 93)**. Por ejemplo, el epitelio lingual es una población celular lábil con una elevada actividad mitótica. En el ratón, sus células se renuevan cada 5-6 días **(96)** y como es habitual en los epitelios estratificados, las células proliferantes se encuentran en los estratos basales **(84, 96)**. Se ha demostrado la existencia de células detenidas en el estadio G2 del CC en este epitelio **(66)**. En los queratinocitos linguales se ha demostrado la presencia de un RC **(80)** en la ADNs con un valor máximo a las 04:00 h y un

valor mínimo a las 16:00, mientras que AM presentó un valor máximo a las 12:00 y un valor mínimo entre las 00:00 y las 04:00.

Echave Llanos (**1971**) encontró un RC en la AM en las células de la pars intermedia de la hipófisis.

Por otro lado, también se encontraron evidentes ritmos circadianos en la AM de las siguientes poblaciones celulares: hepatocitos, con un valor máximo a las 12:00 horas y un valor mínimo entre las 00:00 y las 04:00 horas; enterocitos de las criptas duodenales, con un valor máximo a las 12:00 y un mínimo a las 00:00 (**98**); sialocitos de la glándula submaxilar, con un pico a las 12:00 y un valle a las 00:00 hora y en los queratinocitos linguales de la cara dorsal, un valor máximo a las 12:00 y un valor mínimo a las 20:00 horas (**68**).

Coincidiendo con estos resultados, en los renocitos se evidenció un RC de la AM con un valor máximo a las 12:00 horas y un valor mínimo a las 00:00 hora. (**99**). En cuanto a las poblaciones celulares neoplásicas se ha demostrado la presencia de variaciones circadianas en los niveles de actividad mitótica tanto en carcinomas mamarios (**56**), como en algunos hepatomas y carcinomas hepatocelulares (**150**).

Por su parte el hígado está formado por diversas poblaciones celulares, entre las que se encuentran los hepatocitos, que constituyen el 90% de la masa hepática total. El 60% de los núcleos celulares presentes en los preparados de este órgano corresponden a los núcleos de estas células (**5**). Los hepatocitos ejemplifican lo que se denomina una población celular en “reposo proliferativo”, ya que la mayoría de ellos se encuentran en un estado de arresto, fuera del CC, denominado G₀, estadio en el que no se dividen. Sin embargo, frente a la presencia de un estímulo suficientemente importante, como la extirpación de un lóbulo hepático, los hepatocitos presentan una gran respuesta proliferativa (**185**).

En el hígado existen células troncales o *Stem cells*, que posiblemente sean las ubicadas en las paredes de los conductos de Hering. A partir de éstas pueden derivar tanto las células ductales como los hepatocitos, pero sólo proliferan cuando hay un daño extenso de células y matriz, y los hepatocitos pierden su capacidad regenerativa. En cambio, la regeneración masiva del parénquima hepático tras la hepatectomía, se produce por proliferación de los propios hepatocitos, ya que bajo condiciones normales y con una trama

conjuntiva normal, la gran mayoría de éstos tendrán uno o más ciclos de división celular (**113, 144**).

Las respuestas del hígado frente a los estímulos que desencadenan la proliferación se pueden clasificar en:

- ✓ **Respuesta regenerativa:** es la que se produce luego de un daño generalizado, tal como el generado por la isquemia o por tóxicos hepáticos.
- ✓ **Respuesta compensatoria:** produce la hiperplasia de un lóbulo por la pérdida de otro.
- ✓ **Hiperplasia y/o hipertrofia por estímulos exógenos (5).**

La presencia de RC en la actividad mitótica de los hepatocitos del ratón puede evidenciarse desde las 2 semanas de edad, sin embargo esto no se observa en ratas de la misma edad (**24**). En el ratón el ritmo proliferativo se mantiene en los hepatocitos de los animales adultos a pesar de su escasa actividad proliferativa (**205**).

Ya en la tercera semana de vida se pueden observar, en los hepatocitos, mitosis sin citocinesis. En estas divisiones se forman células binucleadas, las cuales, por fusión nuclear, podrían originar la población tetraploide mononucleada que representa el 80% de los hepatocitos del ratón adulto. Además, se pueden encontrar hasta un 10% de células octaploides y existe asimismo un porcentaje muy bajo de hepatocitos con ploidias aún mayores (**5**).

Regeneración hepática.

El hígado de los roedores es un órgano multilobular compuesto de 5 lóbulos lo que permite realizar, con cierta sencillez, hepatectomías parciales removiendo los lóbulos mediano y lateral derecho, con lo que se quita el 68% del órgano, sin alterar a los lóbulos restantes. Los lóbulos seccionados no vuelven a crecer sino que se produce una hiperplasia compensatoria en los no extirpados, por lo que en realidad este proceso no sería una verdadera regeneración sino una hiperplasia compensatoria de los lóbulos remanentes (**69, 144, 145**). La regeneración hepática es un evento que involucra múltiples procesos celulares y una compleja interacción entre citoquinas y factores de

crecimiento. Técnicamente puede ser dividida en tres fases: iniciación, proliferación e inhibición. **(208)**.

La hepatectomía genera rápidos cambios morfológicos en todas las poblaciones celulares del hígado entre las que podemos mencionar a los hepatocitos, células endoteliales sinusoidales, células epiteliales de los conductos biliares y las células estrelladas **(143)**. A los 30' de realizada la misma, ya se observa que los hepatocitos ubicados en la periferia de los lobulillos comienzan a desplazar el ergastoplasma hacia la membrana celular **(144, 145)**. Algunas horas después de la cirugía las células contienen más lípidos y menos glucógeno, mientras que el número de uniones tipo GAP en los hepatocitos desciende unas 100 veces entre las 9 y las 35 horas poshepatectomía **(144, 145)**. Algunos parámetros fisiológicos también comienzan a modificarse, por ejemplo a los 10 minutos de la cirugía se hiperpolariza la membrana celular y entre los 30 y 60 minutos se incrementa la expresión de genes relacionados con el CC como ras y myc **(145, 209)**. Pasadas las 16 horas hay un pico en la fosforilación de histonas, el cual sería mediado por el AMPc **(5)**. Los niveles de algunas enzimas que intervienen en el ciclo celular, como la timidina quinasa, permanecen elevados durante varios días poshepatectomía, incluso algunas, como la colesterol 7 alfa hidroxilasa, alcanzan lo que se denomina una retrodiferenciación, acercándose a los niveles fetales **(5)**.

En la rata, durante las primeras 40 horas poshepatectomía, entre el 90% y el 95% de los hepatocitos duplican su ADN **(144)**. Esta síntesis comienza entre las 15–18 horas posteriores a la cirugía. Schibler observó el pico máximo de ADNs en los hepatocitos a las 24 h postcirugía en ratas y 36 h en ratones, independientemente del momento en que se realizó la cirugía **(185)**. En tanto los índices mitóticos se incrementan alrededor de las 22 h luego de la operación **(5, 144, 145)**.

El hígado humano muestra un curso más variable dependiendo entre otros factores, del estado nutricional y de posibles condiciones patológicas. **(144)**

Los niveles de proliferación descienden significativamente cuando se alcanza el peso hepático original **(69)**.

Durante la primera onda de proliferación muchos de los hepatocitos entran en la fase S del ciclo celular, pero no al mismo tiempo. Estudios realizados con la incorporación de timidita tritiada demostraron que más del 90% de los hepatocitos participan en el proceso regenerativo. La respuesta proliferativa de los hepatocitos comienza en ratas a las 48 h. alrededor de las tríadas portales, progresando hacia el centro del lobulillo hepático alrededor de la vena central, mientras que en los otros tipos celulares se observó en tiempos diferentes. Por ejemplo las células estrelladas y les epiteliales de los conductos biliares proliferan más lentamente y presentan un pico a las 48 h luego de la cirugía. Las células endoteliales comienzan a proliferar al tercer día de la hepatectomía y marcan un pico al 5º día de realizada la misma. **(144)**

La duración del ciclo hepatocítico durante la regeneración hepática es de 33 h en la rata y de 37 h en el ratón **(5)**. Luego de la hepatectomía parcial se observa un aumento de la ploidía, con un descenso en el número de células binucleadas **(5)**. Los fenómenos proliferativos alcanzan a los hepatocitos diploides, tetraploides y octaploides **(144)** aunque, según algunos autores, estas células poliploides estarían detenidas en G2 e intervendrían en la respuesta rápida a tóxicos como el acetato, pero no en la respuesta a la hepatectomía **(5)**.

Con respecto a la existencia de RC en la regeneración hepática, Echave Llanos y col. **(62)**, trabajando con ratones sometidos a condiciones controladas de estandarización, encontraron en la AM de los hepatocitos un RC evidente con picos a las 14:00 h, desde las 24 h hasta las 240 h poshepatectomía. El valor máximo se observó al segundo día, siguiendo en magnitud los índices hallados a las 72 y 96 h luego de la cirugía. Por otra parte, Martín et al. **(131)** demostraron la presencia de RC en la ADNs de los hepatocitos regenerantes.

Regulación de la respuesta regenerativa

Los experimentos realizados por nuestro grupo de trabajo demostraron que el plasma del ratón normal o portador de un tumor tiene efectos inhibidores sobre la actividad mitótica del hígado regenerante **(62)**. Esta modificación se manifestó a las 22 h post-inyección, por lo que se infirió que las sustancias involucradas estarían actuando en la etapa G1 del CC. Por otra parte, el

tratamiento con suero extraído de ratas hepatectomizadas, estimuló la actividad mitótica del hígado normal, incrementando hasta 6 veces la actividad de ADNs. Este aumento en la ADNs comenzó en la región periportal y alcanzó luego a las células de los conductos biliares, pero no se observó cuando lo que se inyectaba era el suero de animales sometidos a falsa hepatectomía **(121)**.

Trabajos recientes demuestran que en la regeneración poshepatectomía intervienen importantes señales nerviosas, endocrinas, autocrinas, yuxtacrinas y paracrinas, muchas de las cuales están mediadas por factores de crecimiento **(144)**. Entre los numerosos factores de crecimiento y citoquinas que poseen acción sobre los hepatocitos podemos mencionar a los siguientes:

- **TGFalfa y EGF:** el ARNm del TGFalfa comienza a incrementarse entre las 3 y las 5 h poshepatectomía y se eleva hasta 9 veces a las 24 h de realizada la misma **(144)**. Esta concentración incrementada se mantiene hasta las 72 h, momento en que los niveles del factor comienzan a descender hasta que dejan de ser detectables a las 96h **(142)**. El efecto es paracrino, autocrino y yuxtacrino ya que el factor es sintetizado por el mismo hepatocito **(140)**.

La expresión del EGFR también se incrementa en los hepatocitos durante la regeneración **(136)**.

Cuando se realiza la hepatectomía, la concentración de EGF aumenta en la circulación periférica tan solo en un 30%, sin embargo el incremento del factor en la sangre portal alcanza el 300%. Esto se explica porque la noradrenalina, que circula en el plasma después de la cirugía, estimula la secreción de EGF por parte de las glándulas de Brunner, y el factor producido por ellas llega rápidamente al hígado a través de la vena porta. Se trata de un factor mitogénico para los hepatocitos **(144)**.

- **HGF:** en el hombre se observó un aumento de los niveles plasmáticos de este factor una hora después de la hepatectomía parcial, existiendo en ocasiones un segundo pico a las 96 h **(136, 144)**. En los roedores se encontró que luego de la hepatectomía se produce un aumento en los niveles de HGF en pulmón, riñón y bazo, que precede al aumento en el

hígado, por lo que se cree que el pico plasmático de HGF que ocurre una hora después de la cirugía, es de origen extrahepático, y está producido por las células del estroma de los órganos mencionados. En el hígado, el HGF es sintetizado por las células de Ito y en menor medida por las de Kupffer, en las que la producción se mantiene elevada durante todo el primer día poshepatectomía (144). El HGF permitiría la ADNs en células sobre las que ya actuaron TNF e IL6 (107, 144).

- **FGF:** los niveles de este factor se elevan 24 h poshepatectomía. (26). La familia de este factor está formada por 23 miembros. Muchos de ellos tienen efectos mitogénicos sobre diversos tipos celulares, incluyendo a los hepatocitos. Por ejemplo los FGF1 y FGF2 son mitogénicos específicos para esta población celular. La expresión de los genes de los receptores de ambos factores se incrementa durante la regeneración hepática (144).
- **TGFbeta:** En ratas, el ARNm de este factor, comienza a elevarse a las tres horas poscirugía, triplicándose su concentración a las 24 h. Desde este momento los valores se mantienen aproximadamente constantes hasta las 72 h (momento del pico), y comienzan a descender a partir de las 96 h. El pico de TGFbeta es posterior a los correspondientes a ADNs, índice mitótico y expresión de la proteína RAS en los hepatocitos (144, 183).

La inyección de TGFbeta 1 o 2 a ratas hepatectomizadas 11 h antes, determina un descenso significativo en la ADNs, que no ocurre en los animales sometidos a una falsa hepatectomía. La inhibición que genera el TGFbeta es dosis dependiente y se revierte con el tiempo (183). Diferentes investigadores sugieren que este factor estaría involucrado en las últimas etapas de la regeneración hepática. (144)

- **TNF:** el tratamiento con TNFalfa, en dosis inferiores a la tóxica, incrementa la actividad mitótica y la ADNs hepáticas 5 días después de la hepatectomía en ratas (29). Este aumento también ocurre en animales con falsa hepatectomía (29). Tanto el TNFalfa como la IL6 son

componentes importantes de los primeros signos de la regeneración hepática **(107)**. Las endotoxinas podrían estimular a las células de Kupffer para que produzcan el TNFalfa involucrado en la regeneración. Este factor estimula la síntesis de IL6, también por parte de las células de Kupffer, inmediatamente después de la hepatectomía. Se supone, entonces, que el rol de TNFalfa es mediado por la IL6. La concentración de TNFalfa permanece elevada durante 24 h **(144)**. En muchas ocasiones el TNFalfa induce apoptosis en las células tumorales. **(144)**

- **Norepinefrina:** Este es un neurotransmisor del sistema nervioso simpático producido por la porción medular de la glándula adrenal que ejerce sus efectos en algunos tipos celulares, entre los que se incluyen a los hepatocitos a través del receptor alfa-1 adrenérgico (AIR). La norepinefrina no es un factor mitogénico directamente para los hepatocitos pero aumenta y sinergiza los efectos mitogénicos del EGF y HGF. Por otro lado, inhibe parcialmente los efectos mitoinhbidores del TGFβ1 sobre los hepatocitos **(144)**.
- **Factores de crecimiento asociados con la angiogénesis:** la restauración de la histología normal del hígado requiere de la formación de una red vascular, necesaria para la provisión de los nutrientes para las distintas poblaciones celulares que presenta dicho órgano. La angiogénesis es un evento precisamente regulado durante la regeneración hepática. La proliferación de las células sinusoidales comienza a los 2-3 días poshepatectomía y la de los hepatocitos a las 48 h, siendo luego invadidos por las células endoteliales para completar la formación de los nuevos capilares sinusoidales y así restaurar el parénquima hepático. Por lo tanto, las células endoteliales son estimuladas por una amplia gama de factores angiogénicos producidos por los hepatocitos durante la regeneración hepática. Dentro de estos podemos mencionar al VEGF, el factor más potente y mejor estudiado; como así también la angiopoyetina 1 y 2 y otros factores con efectos angiogénicos como el TGFalfa, FGF1, FGF2, HGF producidos por las células endoteliales y las estrelladas **(144, 224)**.

Estudios previos han demostrado que la expresión del ARNm del VEGF se incrementa entre las 48 y 72 h poshepatectomía y luego disminuye gradualmente (195). Sin embargo, por métodos inmunohistoquímicos se reveló que la expresión del VEGF comienza 24 h luego de la cirugía, con un pico a las 72 h (78). La mayoría de los hepatocitos marcados positivamente estaban ubicados en las áreas periportales, siendo, entonces, la secreción de VEGF por parte de los hepatocitos proliferantes, un inductor importante de la proliferación de las células endoteliales (195).

El mRNA del VEGF se expresa, después de la hepatectomía parcial (HP), tanto en los hepatocitos como en las células hepáticas no parenquimatosas, sugiriendo que este factor de crecimiento juega un papel significativo en la regeneración hepática (146). Este último concepto también es apoyado por estudios realizados por Ishikawa y col. (101), en los que demostraron que el VEGF deriva tanto de las células parenquimatosas como de las no parenquimatosas del hígado de rata con procesos de necrosis.

Las glándulas endocrinas también deben ser consideradas al momento de analizar la respuesta regenerativa del hígado. La existencia de un probable rol de la hipófisis en la regeneración hepática encontró apoyo en diversos estudios morfológicos. Echave Llanos et al. (61) encontraron cambios ultraestructurales en las células somatotróficas de la pars distalis de ratones hepatectomizados. Estos cambios incluían hipertrofia del aparato de Golgi, dilatación del RE y disminución en el número y la densidad de los gránulos secretorios, todos estos indicios permiten especular que existe un incremento en la síntesis y liberación de hormonas. Por otra parte, Gomez Dumm et al. (85) encontraron que a la medianoche del segundo día poshepatectomía existía una gran vasodilatación acompañada de hiperemia en la *pars distalis*, este evento ocurría alrededor de 4 h previas al primer pico de ADNs. En otros trabajos, se observó que la adrenalectomía incrementa la ADNs en hígado y la tiroidectomía la disminuye (6).

La **denervación parasimpática** produce una disminución en la regeneración. Este efecto no se observa en la denervación simpática (5).

También la hiponutrición y la edad del animal disminuyen la hiperplasia hepatocítica compensatoria que sigue a la hepatectomía **(5)**.

Efectos de las neoplasias sobre poblaciones celulares normales.

A principios del siglo XX Medigeceneau encontró que la portación de tumores modificaba el peso de los órganos de los animales portadores **(141)**. Posteriormente surgieron especulaciones acerca de la posibilidad de que las células tumorales posean mecanismos capaces de alterar cuanti y cualitativamente la proliferación de poblaciones celulares normales. A partir de esta hipótesis se han realizado dos tipos de experimentos: los que estudian los efectos de la inyección de extractos tumorales y los que analizan los efectos que genera la portación de un tumor injertado.

Los estudios que se realizaron administrando extractos tumorales permitieron establecer la existencia de factores inhibidores y estimulantes de la proliferación celular en los mismos. Se observó que el tratamiento con extractos de los carcinomas hepatocelulares ES2 y SS1K produce inhibición de la proliferación de diversas poblaciones celulares, incluyendo hepatocitos, enterocitos de las criptas del intestino delgado y queratinocitos linguales **(60, 64, 65, 67, 165)**. En cambio, la administración de extracto del carcinoma mamario EA34 produjo un efecto mitogénico restringido a la población hepatocítica **(75)**.

La presencia de un tumor injertado genera diversas modificaciones en la actividad proliferativa de las poblaciones celulares normales de los ratones portadores **(22, 175, 41)**. Se ha descrito la estimulación en los hepatocitos del hígado regenerante de ratones portadores de hepatomas **(14)**; la inhibición en la *pars distalis* de la hipófisis de portadores del tumor ES2 **(151)** y la desincronización de los RC de actividad mitótica en la epidermis de ratones portadores del carcinoma mamario EA34 **(13)**. También se observó que los ratones portadores del carcinoma mamario EA31 presentan inhibición y cambios en la curva diaria de actividad mitótica del epitelio lingual y de la población hepatocítica **(41)**. Más recientemente se demostró que la portación del carcinoma mamario EA21 produce un aumento en la actividad mitótica de los enterocitos **(20)**.

En algunos tumores, como el carcinoma hepatocelular SS1K, se producen efectos diferentes si se inyecta un extracto tumoral¹ o si el animal porta la neoplasia **(22)**. La administración del extracto produce una inhibición de la proliferación celular hepatocítica en el hígado regenerante **(149)**, mientras que la presencia del tumor injertado lleva a una estimulación de la respuesta regenerativa, que se manifiesta mediante un pico mitótico más elevado, anticipado y de menor sincronización que el observado en los no portadores **(14)**.

Efectos de la hepatectomía sobre el crecimiento tumoral.

Existen numerosos trabajos que investigan el efecto de la hepatectomía sobre el crecimiento y desarrollo de las neoplasias **(11, 57)**. La importancia de estos estudios radica no sólo en los aportes al conocimiento sobre la biología básica del crecimiento tisular; sino que además tienen aplicación en la oncología clínica, ya que la hepatectomía es un tratamiento quirúrgico comúnmente utilizado en tumores hepáticos primarios o en metástasis hepáticas de tumores primarios localizados en otros órganos. Esta cirugía, entonces, podría alterar el crecimiento de tumores extrahepáticos o hepáticos no ubicados en el área extirpada.

Echave Llanos y Saffe demostraron que los animales hepatectomizados tenían una menor incidencia de aparición de tumores, pero cuando las neoplasias surgieron fueron más grandes y de mayor grado de anaplasia que las encontradas en los animales no operados **(57)**.

De Peyster, que trabajó con animales parabiontes portadores de tumores, observó que al hepatectomizar a uno de ellos, el tumor presente en el otro crecía más que si no se lo hubiera operado **(47)**.

Posteriormente, Lee encontró un incremento en el crecimiento de hepatomas cuando se los injertaba a las 48 h poshepatectomía. Este efecto se observó tanto en la ADNs, evaluada a las 12 h luego de la cirugía, como en el crecimiento del tamaño de los tumores medidos 12 días después de la operación **(119)**. Asaga et al. **(11)** y Sun et al. **(204)** establecieron que si los

¹ Extracto tumoral: es realizado a partir de un pool de tumores extraídos de animales portadores. Se selecciona 1 gramo a partir de zonas no necróticas de los mismos, se coloca en un homogeneizador con 9 ml de agua destilada estéril. Se aplican 10 golpes de émbolo en 30 segundos. Luego se centrifuga a 4000 rpm a 4°C durante 10 min. El sobrenadante constituye el extracto.

tumores se injertan en el momento de la hepatectomía también se produce en éstos un crecimiento mayor que el observado en los tumores injertados en animales no operados.

Sin embargo, en un trabajo de Moreno et al. **(150)**, se demostró que en dos carcinomas hepatocelulares, la actividad mitótica tumoral decrecía al evaluarla el día después de la hepatectomía. Más tarde, Ono M. **(164)** observó que un hepatoma transplantado aumenta su crecimiento después de la hepatectomía, pero luego regresa.

Utilizando el carcinoma hepatocelular ES12a, Barbeito et al. **(19, 21)** encontraron que en los animales hepatectomizados existe una inhibición de la actividad mitótica tumoral, la cual se manifiesta desde el primer hasta el tercer día poscirugía

Angiogénesis

El desarrollo del sistema vascular aparece hacia la tercera semana del desarrollo luego de la gastrulación, cuando el embrión ya no es capaz de satisfacer sus requerimientos nutritivos exclusivamente por difusión **(116)**.

El desarrollo embriológico vascular tiene dos orígenes:

- Desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de un tejido indiferenciado, proceso denominado vasculogénesis.
- Formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes o angiogénesis

El primer islote sanguíneo aparece en el mesodermo que rodea a la pared del saco vitelino en la tercera semana del desarrollo, poco tiempo más tarde en la lámina lateral del mesodermo y finalmente en otras regiones. Estos islotes se originan en células del mesodermo que son inducidas por el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2) a formar hemangioblastos, un precursor común de la formación de vasos y de células sanguíneas. Los hemangioblastos ubicados en el centro de los islotes sanguíneos darán lugar a las células madres hematopoyéticas, mientras que los hemangioblastos periféricos se diferencian en angioblastos, precursores de las células endoteliales. Estos angioblastos proliferan y son inducidos a formar células endoteliales por el VEGF secretado por las células mesodérmicas que los rodean para

posteriormente regular la coalescencia de estas células endoteliales y formar así los primeros vasos sanguíneos **(106)**.

Una vez que el proceso de vasculogénesis establece un lecho vascular primario, la vasculatura adicional se desarrolla mediante angiogénesis. La maduración y el modelado de la vasculatura son regulados por otros factores de crecimiento, como el PDGF y el TGF- β , hasta que se establece el patrón adulto. **(116)**

Se creía que la vasculogénesis, a diferencia de la angiogénesis, ocurría sólo durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, estudios posteriores han sugerido que la vasculogénesis puede ocurrir también durante la vida posnatal **(173)**. Está caracterizada por la movilización de células progenitoras de la médula ósea a sitios que sufren hipoxia y necesitan del desarrollo de nuevos vasos sanguíneos. A partir de éstos se aporta O₂ y nutrientes para el crecimiento tisular durante la embriogénesis y durante la vida adulta. **(173)**.

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos preexistentes y es el resultado de un conjunto ordenado de eventos modulados, in vivo, por una variedad de agentes inhibidores o inductores de la misma **(194, 214)**. Numerosos estudios indican que la angiogénesis es el resultado del balance entre factores pro y antiangiogénicos, particularmente en la disminución de la producción de proteínas inhibidoras. Este proceso es estimulado por el VEGF, que es el factor de crecimiento más específico y potente, tanto para la angiogénesis como para la vasculogénesis **(53, 106)**. Por otro lado, sabemos que los inhibidores de la angiogénesis son definidos como proteínas o fragmentos proteicos formados en el organismo y son capaces de inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos. Al menos 27 proteínas y moléculas de bajo peso molecular han sido descritas para cumplir la función de inhibidores de la angiogénesis. Entre ellos podemos mencionar: - inhibidores endógenos derivados de la matriz extracelular (endostatina, fragmentos de fibronectina, etc.); -células y derivados sanguíneos (factores decrecimiento, citoquinas, interleuquinas, etc.) y otros factores **(177)**.

La angiogénesis es un complejo proceso en el que intervienen células, factores solubles y componentes de la membrana extracelular **(124)** y que se desencadena cuando el vaso existente es expuesto a un estímulo exógeno. Involucra la estimulación de la proliferación y migración de las células

endoteliales; destrucción de la matriz extracelular; atracción de pericitos y macrófagos; estimulación de la proliferación y migración de las células musculares lisas; formación y rearmado de nuevas estructuras vasculares y finalmente, deposición de matriz extracelular nueva **(114, 193)**.

Para iniciar la formación de capilares nuevos, las células endoteliales de los vasos existentes deben degradar la membrana basal e invadir el estroma de los tejidos vecinos. Estos procesos requieren de una cooperación activa entre el sistema activador de plasminógeno y las metaloproteinasas de matriz **(124)**. El plasminógeno activado a plasmina degrada algunos componentes de la matriz extracelular como la fibrina, fibronectina, laminina y puede activar a su vez a algunas metaloproteinasas de matriz como las MMP-1, MMP-3 y MMP-9 **(154)**.

En el adulto, la velocidad de proliferación de las células endoteliales es muy baja comparada con otros tipos celulares del organismo **(105)**. La angiogénesis es necesaria para el desarrollo normal, reproducción y reparación tisular así como también en algunas condiciones patológicas como en el crecimiento tumoral y las metástasis **(193, 106)**.

Bajo condiciones fisiológicas ocurre angiogénesis en cada ciclo del sistema reproductivo femenino y durante la curación de heridas **(17, 214)**. El crecimiento, el desarrollo tumoral y metástasis son dependientes de angiogénesis ya que necesitan de una extensa red de capilares para proveer de nutrientes y oxígeno. Además, los nuevos vasos sanguíneos intratumorales proveen un camino para que las propias células tumorales puedan incorporarse a la circulación y metastizar así a otros órganos **(194)**

Por otro lado, uno de los aspectos críticos para el desarrollo de tumores sólidos es la formación de una fuente de irrigación sanguínea. Cada tumor tiene un patrón único de desarrollo microvascular, que puede ser debido a la producción de factores específicos producidos y/o liberados por las células tumorales **(221)**.

El VEGF es un potente agente mitogénico de las células endoteliales derivadas tanto de vasos arteriales como venosos y linfáticos **(53, 74)**, que estimula la angiogénesis, la reparación y el remodelado capilar **(135)**. Su administración promueve, además, la quimiotaxis sobre los monocitos e induce la formación de fenestraciones en el endotelio de vénulas pequeñas y

capilares, lo que produce el aumento de la permeabilidad, motivo por el cual se lo llamó también factor de permeabilidad capilar (VPF) **(74)**. Ha sido demostrado que tanto las células normales **(74)** como las células tumorales expuestas a hipoxia adquieren la capacidad de regular la expresión del VEGF **(218)**. Esto se debe a que el factor inducido por hipoxia (HIF) media la respuesta homeostática a la disminución de la tensión de oxígeno, activando la transcripción del VEGF **(178)**. También estimula la angiogénesis y previene la apoptosis en las células tumorales, estimulando de este modo el potencial metastásico y acelerando la actividad proliferativa después de alcanzar al órgano blanco **(163, 71)**. Su mecanismo de acción es a través de la inducción de la angiogénesis alrededor del tumor a partir de un lecho vascular existente, en un período temprano del desarrollo del mismo, seguido de una neovascularización que va acompañando al crecimiento del tumor **(71)**.

Existen otros factores de crecimiento angiogénicos como el derivado de los hepatocitos (HGF) que estimula exclusivamente el crecimiento de las células endoteliales pero no el de las células musculares de la pared vascular. Actúa, además, inhibiendo la apoptosis de las células endoteliales y juega un importante papel en la angiogénesis tumoral y en el desarrollo de las metástasis **(165, 166)**. El TGF β 1 estimula la angiogénesis favoreciendo así las metástasis tumorales **(115, 201)**; el EGF estimula no solo la proliferación de las células endoteliales, sino también la migración de las mismas **(158)** y el EGF con afinidad por el receptor de la heparina (HB-EGF) tiene efecto estimulante sobre las células musculares lisas **(159, 88)**. La familia de factores de crecimiento relacionados con la angiogénesis más conocidos, incluyen a la familia del VEGF, angiopoyetina (Ang) y la familia del PDGF **(44)**.

Muchos tumores primarios son capaces de suprimir el crecimiento de sus metástasis presumiblemente por generar factores antiangiogénicos como la angiostatina **(82)**. Otros potentes inhibidores de la angiogénesis y del crecimiento tumoral descritos son el TSP-1 y el TNP-470 **(37, 109, 190)**.

La neovascularización juega un papel crítico en el éxito de la regeneración de los tejidos durante la cicatrización, siendo regulada por distintos factores de crecimiento. Se ha descrito un importante aumento en la expresión del VEGF durante la fase proliferativa de la cicatrización **(160)**. Los

macrófagos pueden contribuir, además, con la liberación de factores angiogénicos **(124)**.

Una diferencia importante entre la angiogénesis fisiológica, producida durante el desarrollo embrionario, y la patológica es que la primera comienza en las células endoteliales que están laxamente unidas entre sí y que presentan una proliferación activa, mientras que la angiogénesis patológica comienza en células que se encuentran aquiescentes y "encapsuladas" dentro de una membrana continua. Otra diferencia importante entre ambos mecanismos es que la angiogénesis patológica frecuentemente es inducida por un grado variable de inflamación, de manera tal que tanto los macrófagos como las plaquetas y los mastocitos son atraídos al sitio de inflamación en parte por acción del VEGF **(39)**.

El hígado presenta una gran capacidad proliferativa después de una HP **(69)** pudiendo regular con precisión su crecimiento, ajustándolo a su tamaño original, lo que se debe a la enorme capacidad replicativa de los hepatocitos. La proliferación de los hepatocitos requiere del estímulo directo de factores de crecimiento como el EGF **(69)**, HGF y TGF α en una fase temprana de la regeneración hepática **(136, 207)**.

En estudios in vitro, se observó que durante la regeneración hepática, los hepatocitos necesitan ser iniciados antes de responder completamente a los factores de crecimiento HGF, TGF α , EGF. Este proceso requiere de las citoquinas TNF e IL-6 además de otros agentes que previenen la citotoxicidad. Por otro lado, inmediatamente después de la HP, se produce un extenso remodelado de la matriz extracelular hepática **(69)**.

La angiogénesis también es importante para la regeneración hepática post HP **(30, 136)**. Estudios realizados en ratas y ratones indican que el RNAm del VEGF está temporal y espacialmente relacionado con este proceso **(74, 176)**. Por otro lado, existe una variedad de factores de crecimiento y citoquinas que inducen la transcripción del RNAm del VEGF **(182)**.

Por todo lo expuesto, tanto el estudio de la densidad de la microvasculatura como la expresión del VEGF, del PD-ECGF, y del antígeno CD34, considerado como un marcador específico del endotelio vascular y por lo tanto de la angiogénesis **(45)**, se han convertido en importantes indicadores de pronóstico para muchos tipos de tumores.

VEGF

El VEGF ha demostrado inducir angiogénesis en una variedad amplia de modelos angiogénicos in vivo. Ha sido reconocido como un factor paracrino durante el desarrollo embrionario y en diversas condiciones patológicas (74).

Es una glucoproteína con un peso molecular de 34-46 KDa producida por varios tipos celulares en respuesta a diversos estímulos. Actúa sobre las células endoteliales vasculares a través de receptores de membrana tirosina-kinasa específicos, regulando de esta manera funciones celulares como proliferación, diferenciación, migración y supervivencia celular (88).

La familia del VEGF incluye diversos factores: **VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F** y el factor de crecimiento placentario (**PIGF**). Estos factores tienen sus respectivos receptores de transmembrana tirosina-kinasa: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1, KDR) y VEGFR-3 (Flt4). (71, 126). Del VEGF existen al menos 7 isoformas que proceden de patrones diferentes de unión del ARNm del VEGF (71, 72). Las 4 isoformas principales son V121, V165, V189 y V206 de los cuales la V165 es la isoforma predominante. Una diferencia importante entre las isoformas es su afinidad por la heparina lo que afecta a su unión con la superficie celular y la matriz extracelular (71).

Tanto el VEGF-B, como el VEGF-D y el PIGF han demostrado estimular la angiogénesis in vivo (36, 196). El VEGF-A junto con el VEGF-B, el VEGF-E y el PIGF, preferentemente, aunque no de forma exclusiva, ejercen sus efectos sobre las células vasculares. A este último se lo ha asociado a la arteriogénesis, mientras que el VEGF-C y el D actúan sobre las células endoteliales linfáticas (126, 172).

El VEGF-A, el B y el E están involucrados en la angiogénesis siendo el VEGF-A el factor más importante para este proceso mientras que el C y el D están involucrados en la linfangiogénesis. Sin embargo no se conoce si el mecanismo de proliferación de las células endoteliales linfáticas es análogo al encontrado en las células endoteliales sanguíneas (126).

Además de las funciones descritas, existe evidencia de efectos sobre otros tipos celulares (72), específicamente sobre las células derivadas de la médula ósea, entre las que podemos mencionar:

- Promover la quimiotaxis de los monocitos
- Inhibición de la maduración de las células dendríticas

- Aumento de la producción de linfocitos B
- Generación de células mieloides inmaduras
- Supervivencia de las células madres hemopoyéticas durante la repoblación hematopoyética
- Efectos mitogénicos sobre las células epiteliales del pigmento de la capa pigmentaria de la retina, células del conducto pancreático y células de Schwann

Actividad biológica del VEGF

El VEGF al unirse a los receptores de transmembrana activa una serie de rutas de transducción de señales dando lugar a una serie de efectos entre los que se incluyen los siguientes **(206)**:

- Proliferación de las células endoteliales
- Migración de las células endoteliales
- Aumento de la permeabilidad vascular de los capilares
- Supervivencia de las células endoteliales inmaduras mediante la prevención de la apoptosis

El VEGF-A (VEGF)

Ha sido demostrado que el VEGF-A induce la angiogénesis en una gran variedad de modelos in vivo. Inicialmente descrito como Factor de la permeabilidad vascular (VPF) **(53, 74, 188)** es el miembro de esta familia mejor estudiado y comprendido. **(71, 72, 128)**. Al menos 6 isoformas diferentes de polipéptidos se conocen del VEGF-A: 121, 154, 165, 183, 189 y 206 **(182)**.

Es una molécula clave para la inducción de la angiogénesis y vasculogénesis provocando proliferación, brotación, migración y formación de los vasos sanguíneos. Induce angiogénesis en una variedad de condiciones fisiológicas y patológicas como por ejemplo durante la embriogénesis, formación del cuerpo lúteo, crecimiento tumoral y cicatrización de heridas **(120)**. Se une sólo a receptores VEGFR1(Flt-1) y VEGFR2(Flt-2). **(72)**.

Recientemente se demostró que el VEGF es requerido para la diferenciación fenotípica de las células endoteliales, en particular la presencia

de fenestraciones endoteliales de los islotes pancreáticos y glomerulares. **(105)**. La sobreexpresión del VEGF-A ha sido demostrada en una variedad de tumores sólidos **(72)**. La presión de O₂ es un importante regulador de la expresión del VEGF-A por lo tanto la hipoxia induce la transcripción del factor-1(HIF) estimulando de esta manera el VEGF-A **(182)**.

El VEGF-A funciona como factor para la supervivencia de las células endoteliales induciendo la activación de factores antiapoptóticos por estas células. También ha sido demostrado que está involucrado en la angiogénesis postnatal regulando la movilización de las células progenitoras sanguíneas desde la médula ósea. Durante la neovascularización de los tumores estimula la incorporación de las células progenitoras a los vasos sanguíneos tumorales **(123, 72)**

La formación de nuevos vasos sanguíneos depende del VEGF-A hasta que son cubiertos por pericitos perivasculares. Estos pericitos secretan VEGF-A que actúa como factor estabilizante y de supervivencia de las células endoteliales. El VEGF-A producido, tanto por los pericitos como por las células musculares de los vasos sanguíneos, actúa de manera yuxtacrina-paracrina estimulando la maduración de los vasos sanguíneos **(126)**.

PIGF o factor de crecimiento placentario

Este factor fue identificado por primera vez en tejido placentario, más tarde se lo estudió en corazón y pulmón. Existen 4 isoformas del PIGF: 1, 2, 3, y 4 mediando sus efectos a través del VEGFR1.

Entre las funciones que se le atribuyen podemos mencionar las siguientes: produce un efecto quimiotáctico sobre los monocitos, promueve la viabilidad de las células endoteliales e interviene en procesos de angiogénesis y arteriogénesis.**(182)**.

VEGF-F

Es el séptimo miembro identificado recientemente de la familia del VEGF en el veneno de serpiente. Comparte en un 50% la estructura primaria del VEGF-A, en particular la isoforma 165 y se une selectivamente al VEGFR-2 **(194)**.

Además de la familia del VEGF, la familia del factor de crecimiento de la angiopoyetina es relativamente específica para el endotelio. Existen 4 miembros de esta familia: Ang-1, Ang-2, Ang-3 y Ang-4. De estos factores el mejor caracterizado para el rol de estimulación de la angiogénesis es la Ang-1 y Ang-2. A diferencia del VEGF-A, la angiopoyetina-1 no participa en las etapas más tempranas de la formación de los vasos sanguíneos, la migración de las células endoteliales o la formación del vaso sanguíneo **(71)**.

OBJETIVOS

1. Estudiar la evolución de la expresión del VEGF a lo largo de un período circadiano en los hepatocitos del ratón macho adulto durante la regeneración hepática.
2. Establecer los índices de síntesis de ADN y de actividad mitótica de los hepatocitos del ratón adulto durante la regeneración hepática.
3. Establecer la posible relación temporal entre el momento de máxima expresión del VEGF, con el pico de síntesis de ADN y el de actividad mitótica durante la regeneración hepática.
4. Describir el efecto que ejerce la portación de un tumor maligno sobre los índices de expresión del VEGF, ADNs y el de AM de los hepatocitos durante la regeneración hepática.

**MATERIALES
Y MÉTODOS**

1. Animales

Se utilizaron ratones de la cepa C3H/S provenientes del bioterio de la Cátedra de Citología, Histología y Embriología "A" de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de La Plata (**Fig.1**). Los animales estuvieron bajo las condiciones y cuidados que rigen en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de Investigación del Consejo Nacional de Investigaciones (Guide for the Care and Use of Laboratory Animal Research of the National Research Council).

La cepa se mantiene por endocría, en el citado bioterio, desde 1966, año en que ingresaron los reproductores, remitidos por el Profesor J. W. Wilson (Department of Biology, Brown University, Providence, Rhode Island, USA).



Fig. 1. Se observa una hembra de la cepa C3H/S y sus crías dentro de una caja metálica.

Los ratones empleados fueron machos adultos de 12 ± 1 semanas de edad. Desde el nacimiento, los animales fueron mantenidos en un cuarto con temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, bajo un régimen de luz artificial (luz fluorescente de 40 vatios, ubicada sobre las cajas), desde las 06:00 h hasta las 18:00 h, alternando con 12 horas de oscuridad (desde las 18:00 h hasta las 06:00 h). Al cumplir los 21 días fueron destetados, se los separó según el sexo y se los colocó en cajas, de a siete animales, en una sala de reserva bajo las condiciones de iluminación y temperatura descriptas.

El agua y el alimento fueron administrados *ad-libitum*. Se utilizó agua clorinada y pellets de alimento balanceado rata/ratón (alimento balanceado N° 3 Ganave). Quince días antes de su utilización en los experimentos, los ratones fueron colocados en cajas individuales, en un cuarto denominado cuarto de ritmos, bajo las condiciones de estandarización para análisis de periodicidad.

1.1. Estandarización para análisis de periodicidad.

Las condiciones requeridas para análisis de periodicidad, establecidas por Halberg et al. (89, 90), son:

- Aislamiento en cajas metálicas individuales en un cuarto *ad-hoc* denominado de ritmos.
- Régimen de alimentación y suministro de agua *ad-libitum*.
- Iluminación con luz artificial fluorescente de 06:00 h a 18:00 h, alternada con 12 h de oscuridad. Tanto el diseño de la caja como la ubicación de la fuente de luz deben asegurar una iluminación directa y uniforme en todo el interior de la caja.
- Reposición de agua y comida a cargo de una sola persona, quien ingresa al cuarto una vez por día a las 06:00 h o a las 17:50 h.
- Temperatura estable entre los 23 y 25 °C.

El aislamiento de los animales permite eliminar los efectos del estrés generados por la competencia alimenticia. Mientras que la iluminación homogénea, en toda la caja, impide que aparezcan sectores sombreados en los que los animales inhiban su actividad alimentaria (59).

2. Técnica Quirúrgica

Hepatectomía parcial (Hep): Se utilizó la técnica de la subhepatectomía (extirpación de alrededor del 70% de la masa hepática total) descrita por Brues et al. (34) y modificada por Echave Llanos et al. (55).

Se anestesia al animal con éter sulfúrico y se lo extiende sobre su dorso, fijándolo mediante ligaduras a los extremos de la tabla operatoria. La anestesia se mantiene mediante la aplicación de gotas de éter sobre una máscara de gasa diseñada *ad-hoc*. Con el ratón así preparado, se rasura la piel del abdomen y se realiza una incisión sobre la línea blanca, que comienza a nivel del apéndice xifoide y se extiende hasta la región umbilical (extensión de aproximadamente 1,5–2 cm) (Fig.2, 3, 4). Se coloca un separador de campo operatorio y se secciona con tijera el ligamento que une el lóbulo izquierdo del hígado con el estómago. Posteriormente, se exteriorizan los lóbulos hepáticos medio e izquierdo y se los apoya sobre una gasa doblada. Se procede, entonces, a ligar el pedículo que posee las ramas de la vena porta, la arteria hepática y el conducto biliar, correspondientes a los lóbulos mencionados, a unos 2 mm del punto en que se separan de las ramas que irrigan a los lóbulos derecho y paragástrico. A continuación, se liga el pedículo de salida de las venas suprahepáticas para los lóbulos mencionados. Se seccionan ambos pedículos y se retiran los lóbulos mediano e izquierdo envueltos en la gasa en la que estaban apoyados. Posteriormente, se quita el separador y se sutura con hilo de algodón.

Concluida la cirugía, los animales se vuelven a colocar en el cuarto de ritmos, en donde permanecerán hasta el momento del sacrificio.



Fig. 2. Se observa un ratón extendido sobre su dorso y fijado a la tabla operatoria. Se le ha realizado la técnica de abertura de la cavidad abdominal para realizar la hepatectomía parcial.



Fig. 3. Una vez realizada la incisión y la apertura a la cavidad abdominal, se exteriorizan los lóbulos hepáticos para la posterior extirpación. Al mismo tiempo se continúa con la anestesia con éter sulfúrico.



Fig. 4. En este momento se secciona con tijera el ligamento que une el lóbulo izquierdo del hígado con el estómago

3. Trasplante seriado subcutáneo del tumor

3.1. Características del tumor ES2:

Es el segundo (2) tumor espontáneo (E) de la cepa C3H/S (S) obtenido en nuestro Laboratorio. Fue hallado en el año 1970 en un ratón hembra de 625 días de edad, portadora de un hepatocarcinoma trasplantado. Fue injertado en hembras de la cepa original y cuatro meses después del trasplante inicial se hizo el primer repique de mantenimiento en hembras adultas de la cepa C3H/S, en la que continúa hasta hoy. Esta neoplasia es un carcinoma hepatocelular indiferenciado de crecimiento rápido que mata a la mitad de los portadores, aproximadamente 15 días después de ser injertado.

Este tumor ha sido caracterizado en nuestro Laboratorio desde el punto de vista morfológico, siguiendo la clasificación propuesta por Reuber en 1966 (174) y desde el punto de vista biológico (149).

Es un tumor encapsulado, de firme consistencia. Al corte se muestra como un tumor sólido, con extensas áreas de necrosis y hemorragias. Microscópicamente presenta células pequeñas, indiferenciadas, con núcleos de tamaño variable, muchos picnóticos, algunos vesiculosos. Se observan,

además, numerosas figuras mitóticas y focos incipientes de necrosis (**Fig. 5**). Esta neoplasia se mantiene por trasplantes seriados

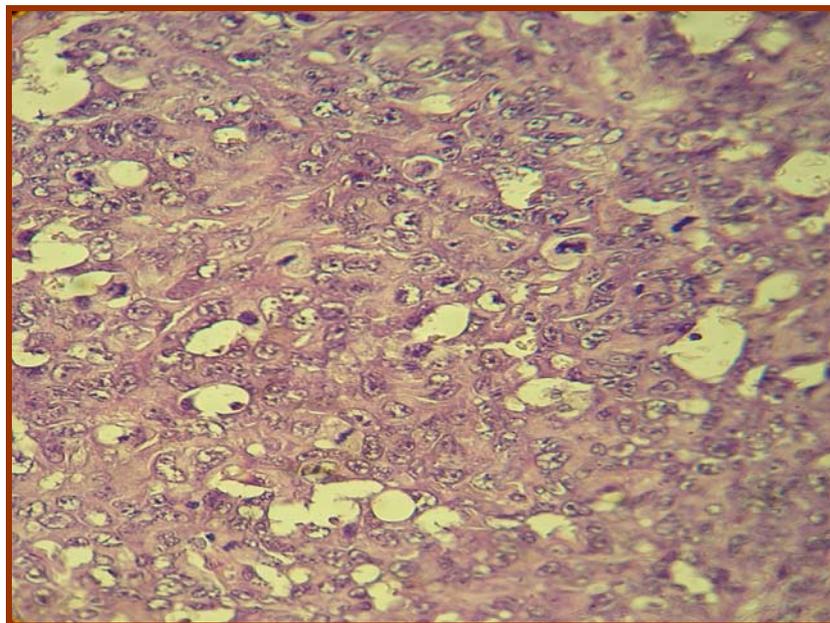


Fig. 5. Imagen microscópica de un corte del carcinoma hepatocelular ES2. (H-E. 400X).

3.2. Injerto del tumor:

El tumor ES2 se mantiene en el bioterio por injerto seriado subcutáneo, siguiendo la técnica descrita por R. Iglesias y adaptada por Moreno (**149**). Para cada pasaje del carcinoma se utilizaron dos dadores con tumores sin úlceras. En los trasplantes para mantenimiento de la línea tumoral se utilizaron por lo menos siete receptores.

Los animales dadores del tumor fueron sacrificados por decapitación y sangría. Los segmentos de la neoplasia se extrajeron con instrumental estéril. Con una tijera curva se disgregaron los trozos de tumor en una cápsula de Petri con solución fisiológica, hasta lograr fragmentos de tejido no detectables macroscópicamente. Posteriormente se agregó solución fisiológica hasta alcanzar una relación de 1: 3 (1 volumen de tumor por cada 3 de solución fisiológica). Se consigue así una suspensión con $2 \cdot 10^6$ células por ml. A cada animal receptor se le inyectaron, en el tejido celular subcutáneo de la región del flanco, 0.2 ml de esta suspensión (**Fig. 6**).



Fig. 6. Ratón C3H/S con el carcinoma hepatocelular ES2 injertado en el flanco y dorso.

Esta técnica se realizó tanto para los trasplantes de mantenimiento como para aquellos utilizados durante los experimentos que componen el presente trabajo. En cada repique de mantenimiento se toman muestras de tumor para su control histológico.

4. Sacrificio de los animales y recolección de las muestras

Los animales fueron sacrificados por decapitación y sangría. Una vez sacrificados los ratones, se realizaron las necropsias. Durante las mismas se extrajo la porción triangular del lóbulo derecho del hígado que se fijó para su procesamiento histológico, luego se realizó una incisión cutánea para exteriorizar el tumor injertado, del que se tomaron muestras de zonas sin necrosis aparente.

Se registró cada animal en una planilla individual, anotándose cualquier posible alteración macroscópica hallada durante la necropsia.

5. Técnica histológica

Las muestras fueron procesadas para la coloración de rutina con hematoxilina y eosina según el protocolo tradicional con los siguientes pasos:

- *Deshidratación.* Se consiguió mediante pasajes en alcoholes de graduación creciente, 70°, 96° (dos pasajes), 100° (dos pasajes).

Como líquido intermediario y aclarante se utilizó xilol (dos pasajes). El tiempo requerido de permanencia en cada uno de los líquidos dependió del espesor y tamaño de la muestra.

- *Impregnación.* Se realizaron 3 baños en parafinas de alto punto de fusión (56°C a 58°C), mantenidas en estufa a temperatura constante. Se utilizaron cassettes para la inclusión final en parafina los cuales fueron identificados con la numeración correspondiente.
- *Corte.* Se realizaron cortes de 5 µm con micrótomo Minott.
- *Desparafinación y rehidratación de los tejidos.* Para este paso, imprescindible para la coloración, se utilizaron xilol (dos baños) y alcoholes de graduación decreciente hasta concluir en agua destilada.
- *Coloración.* Se utilizó la técnica de hematoxilina de Harris y eosina amarilla en solución acuosa. La solución madre de hematoxilina se diluyó en agua destilada (1:4), mientras que la eosina se utilizó al 1% en agua destilada. La coloración se realizó siguiendo la siguiente secuencia: los cortes desparafinados e hidratados fueron colocados en la solución de hematoxilina de Harris durante 3 a 5 minutos. Pasado ese tiempo se sumergieron en agua corriente para producir el virado del colorante. Luego, los cortes fueron colocados en la solución de eosina durante 1 minuto. Posteriormente se procedió a la deshidratación, aclarado y montaje con bálsamo de Canadá y un cubreobjeto.

6. Técnicas inmunohistoquímicas

6.1. Técnica de la Bromodeoxiuridina para la detección de la síntesis de ADN: Para la realización de esta técnica se le inyectó a cada ratón, una hora antes del sacrificio, en el tejido celular subcutáneo de la región del flanco una solución de 5 Bromodeoxiuridina (BrdU) (Sigma) en una dosis de 50 mg/kg de peso corporal. En la necropsia se extrajeron los hígados que se fijaron en formol tamponado durante 24 h. Luego las muestras fueron deshidratadas mediante un tren de alcoholes de concentración creciente, aclaradas con xilol e incluidas en parafina. Los cortes fueron realizados con un micrótomo de deslizamiento a un

espesor aproximado de 5 μm , y se montaron sobre portaobjetos silanizados.

El desparafinado de los cortes se realizó mediante la inmersión de los portaobjetos en xilol. Luego se utilizó nuevamente un tren de alcoholes, pero esta vez de concentración decreciente. Los cortes hidratados se sometieron al tratamiento en microondas (2x5 min., 750 W) en buffer citrato, pH 6, para la recuperación antigénica. Una vez enfriados fueron lavados con Tris² y sumergidos en una solución de agua oxigenada (20 vol.) al 3% para bloquear la peroxidasa endógena y así evitar la marcación inespecífica.

Posteriormente, los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario (Bu20a, 1/100, Dako, USA) durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego se volvieron a lavar en Tris y se utilizó como sistema de detección el Sistema Envision (Dako, USA), durante 30 minutos, también a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Se realizó un nuevo lavado con Tris y por último fueron revelados con DAB **(130)**. Por último se realizó una coloración suave de contraste con hematoxilina, para facilitar la observación de los núcleos no marcados, y los preparados se montaron con un cubreobjeto.

6.2. Técnica para la detección del VEGF: Los cortes histológicos se sumergieron en xilol para su desparafinado, se rehidrataron con alcoholes de concentración decreciente y se lavaron con Tris buffer (TBS), pH 7.4. Luego del bloqueo de la peroxidasa endógena con H₂O₂ 3% durante 15 minutos, se recuperó el epitope mediante calor **(42, 192)**. Los cortes se lavaron nuevamente con TBS y se colocaron en cajas plásticas conteniendo 250 ml de buffer citrato de 0.01 M, pH 6 dentro de un horno a microondas, con plato giratorio, a 750W durante 10 minutos (2 x 5 minutos). Las cajas fueron rellenas con agua destilada luego de cada ciclo para mantener la concentración del buffer. Luego de la exposición al microondas, los preparados se enfriaron en la misma solución durante 20 minutos **(25)**, se lavaron en TBS y se incubaron con

² Tris: Solución madre: ácido clorhídrico 1 N: 37 ml, tris (hidroximetilaminometano): 6.1 g y agua destilada: 50 ml a pH 7.4 \pm 0.2. Para preparar el tris salino buffer usamos 100 ml de la solución madre + 900 ml de solución fisiológica.

el anticuerpo primario VEGF Clon VG1, monoclonal de ratón y anti-humano, isotipo IgG₁ (DakoCytomayion Denmark A/S), a una dilución de 1/80 en una cámara húmeda durante 1 hora, a temperatura ambiente. Se utilizó el Sistema Envision (DAKO, USA) como sistema de detección. La reacción se reveló con 3´3-diaminobenzidina (Sigma) en TBS con 0.03% H₂O₂. Los cortes fueron contrastados con Hematoxilina de Meyer y montados.

7. Establecimiento de los índices

7.1. Índice de ADNs.

La observación de los preparados se realizó con un microscopio binocular, bajo un objetivo con una magnificación de 450 X. El recuento de los núcleos marcados fue manual.

En todos estos casos se analizaron por lo menos 70 campos microscópicos por órgano y por animal, anotándose los núcleos marcados observados en todos los campos y los núcleos totales cada 10 (en cada campo se podían visualizar entre 40 y 60 núcleos) (**Fig. 7**).

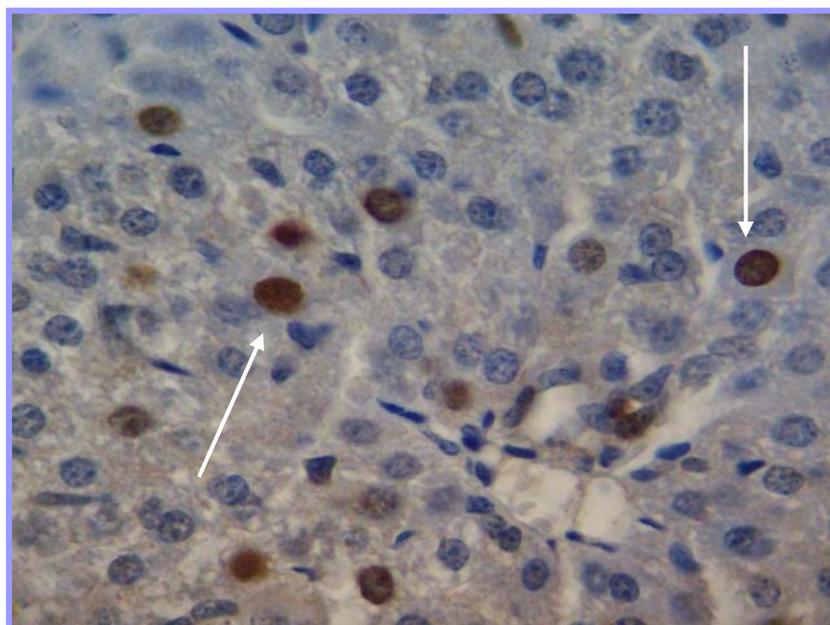


Fig. 7. Corte histológico de hígado. Se observan los núcleos de los hepatocitos inmunomarcados (flechas). DAB-Hematoxilina. 450X

Los preparados se recorrieron en guarda griega, lo cual permitió observar campos consecutivos sin repetir el recuento del mismo campo.

Se descartaron los campos con imágenes artefactuales o con vasos sanguíneos de gran tamaño.

A partir de los registros individuales se calculó el índice de ADNs en porcentaje. Para poder obtener este índice, se observaron no menos de 3000 núcleos totales. Se consideraron positivos todos los núcleos marcados, independientemente de la intensidad del color, ya que cualquier marcación indica incorporación de BrdU y por lo tanto ADNs. A partir de los núcleos totales y el número de núcleos marcados contados por muestra y mediante una operación aritmética sencilla se estableció el número de núcleos marcados:

- $\text{Núcleos positivos} / \text{Núcleos totales} \times 100$

7.2. Índice de expresión del VEGF

La observación de los preparados se realizó con un microscopio binocular, bajo un objetivo con una magnificación de 450 X. El recuento de las células marcadas positivamente fue manual.

Se registraron de cada preparado las zonas que rodean a las venas centrales de los lobulillos hepáticos y a las venas periportales que se encuentran en los tabiques de tejido conjuntivo. En todos estos casos se analizaron por lo menos 70 campos microscópicos por órgano y por animal. En cada uno de estos campos se anotaron las células marcadas positivamente (marcación intracitoplasmática) y los núcleos totales cada 10 (en cada campo se podían visualizar entre 40 y 60 núcleos). A cada una de estas zonas vascularizadas se las contó como una, registrando un total de 70 (**Fig. 8**)

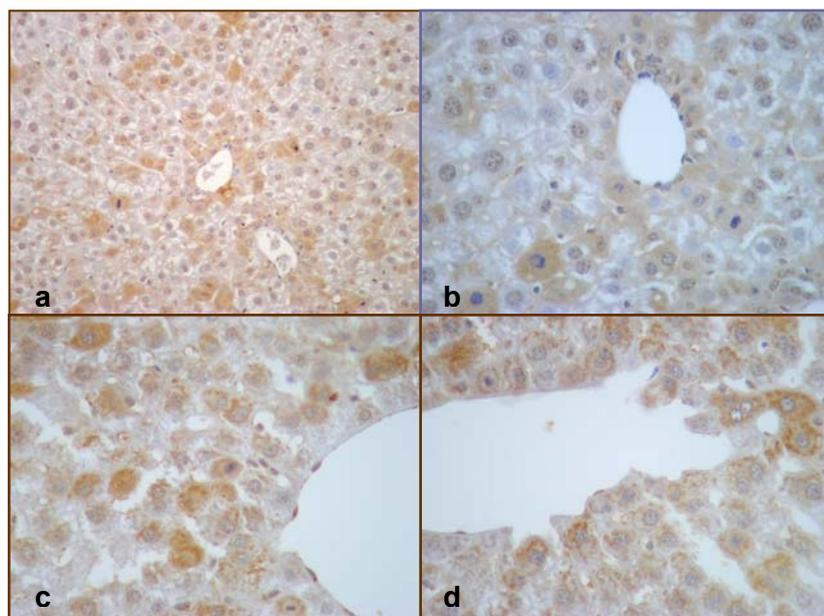


Fig. 8. Corte histológico de hígado. Se observan los hepatocitos inmunomarcados con el anticuerpo VEGF. DAB-hematoxilina. a-200x, b-400x, c-400x y d-400x.

Los preparados se recorrieron en guarda griega bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

A partir de los registros individuales se calculó el índice de expresión del VEGF en porcentaje. Para poder obtener este índice, se observaron no menos de 3000 células. Se consideraron positivos todos los citoplasmas marcados, independientemente de la intensidad del color, ya que cualquier marcación indica expresión del VEGF. A partir de los núcleos totales y el número de citoplasmas marcados contados por muestra y mediante una operación aritmética sencilla se estableció el índice:

- $\text{Células positivas} / \text{Células totales} \times 100$

7. 3. Índice de actividad mitótica

La observación de los preparados se realizó con un microscopio binocular, bajo un objetivo con una magnificación de 450 X. El recuento de las metafases colchicínicas fue manual.

En todos estos casos se analizaron por lo menos 70 campos microscópicos por órgano y por animal, anotándose las metafases

colchicínicas observadas en todos los campos y los núcleos totales cada 10 (en cada campo se podían visualizar entre 40 y 60 núcleos) (**Fig. 9**).

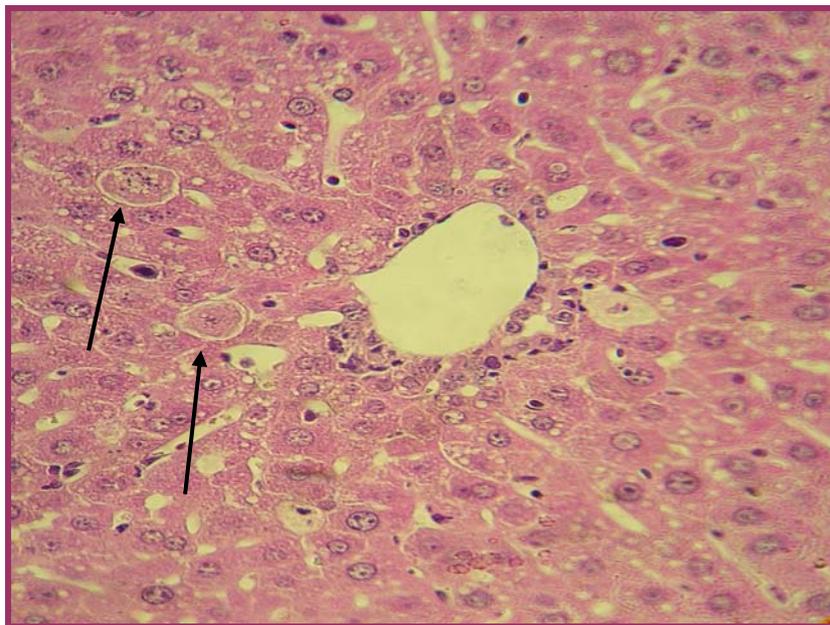


Fig. 9. Corte histológico de hígado. Se observan las metafases colchicínicas (flechas). H-E 450x

Los preparados también se recorrieron en guarda griega bajo las mismas condiciones descritas.

A partir de los registros individuales se calculó el índice mitótico en porcentaje. Para poder obtener este índice, se observaron no menos de 3000 células. A partir de las metafases colchicínicas contadas y los núcleos totales y mediante una operación aritmética sencilla se estableció el número metafases colchicínicas:

- $\text{Metafases colchicínicas} / \text{Núcleos totales} \times 100$

Análisis estadístico

A partir de estos índices individuales se calculó la media aritmética \pm error estándar de cada lote y de cada grupo. Estos datos se analizaron estadísticamente mediante el análisis de varianza (Anova), en caso de que las diferencias fueran significativas se realizó el Test de Tuckey.

Se consideraron significativas a las diferencias (DS) en todos aquellos casos en que p fuera $<$ al 0.05.

8. Diseños Experimentales

8.1. *Experimento I: Estudio de la expresión del VEGF en el hígado en regeneración de ratones adultos intactos y portadores de tumor.*

Se utilizaron 84 ratones machos de la cepa C3H/S, adultos mantenidos en condiciones de estandarización para análisis de periodicidad. Fueron divididos en dos grupos: **grupo A:** ratones que fueron sometidos a la hepatectomía y que no portaron tumor y **grupo B:** ratones hepatectomizados y portadores del tumor. En ambos casos, los animales se distribuyeron aleatoriamente en lotes de 6 a 8 ratones cada uno. A los ratones del grupo B se les injertó con el hepatocarcinoma celular ES2. Al cabo de 10 días los animales de los 2 grupos fueron sometidos a una hepatectomía a las 10 h. El sacrificio por decapitación y sangría se realizó a las 12/26, 16/30, 20/34, 00/38, 08/42, 12/50 y 08/72(hora día/hora poshepatectomía).

Los hígados obtenidos durante las necropsias fueron sometidos a las técnicas de Hematoxilina y Eosina e inmunohistoquímica del VEGF. En todos los casos se contaron los hepatocitos marcados positivamente como ya se mencionó.

8.2. *Experimento II: Establecimiento del pico de síntesis de ADN en el hígado en regeneración de ratones adultos intactos y portadores de tumor.*

Se utilizaron 84 ratones machos de la cepa C3H/S adultos en condiciones de estandarización para análisis de periodicidad. Fueron divididos en dos grupos: **grupo C:** ratones hepatectomizados no portadores y **grupo D:** ratones hepatectomizados portadores del tumor.

A todos los animales se les inyectó intraperitonealmente una solución de -5- bromodeoxiuridina (Sigma) una hora antes del sacrificio en dosis equivalente a 50 mg/kg de peso corporal para determinar la ADNs. La bromodeoxiuridina es un análogo de la timidina capaz de incorporarse al ADN en lugar de la misma durante la fase S del ciclo celular.

Los hígados obtenidos durante las necropsias fueron sometidos a las técnicas de Hematoxilina y Eosina e inmunohistoquímica de la Bromodeoxiuridina. En todos los casos se contaron los núcleos de los hepatocitos marcados positivamente de la manera descripta.

8.3. Experimento III: Estudio de la actividad mitótica en el hígado en regeneración de ratones adultos intactos y portadores de tumor.

Se utilizaron 84 ratones machos de la cepa C3H/S adultos en condiciones de estandarización para análisis de periodicidad. Fueron divididos en dos grupos: **grupo E**: ratones hepatectomizados no portadores y **grupo F**: ratones hepatectomizados portadores del tumor. Para detener las mitosis en metafase, cuatro horas antes del sacrificio, los animales recibieron una inyección intraperitoneal de colchicina (2 µg/g en 0.01 ml de agua destilada) en la fosa ilíaca izquierda. Con la aplicación de este método estatmocinético, se puede determinar la cantidad de células que entran en la fase mitótica del ciclo celular durante las cuatro horas que transcurren desde la inyección de colchicina al momento del sacrificio, ya que ésta actúa provocando la disrupción del huso mitótico, con la consiguiente producción de figuras mitóticas características, debido a que no se forma la placa ecuatorial. Estas metafases características han sido llamadas metafases colchicínicas y son fácilmente distinguibles al MO (223).

Los hígados obtenidos durante las necropsias fueron sometidos a las técnicas de Hematoxilina y Eosina para el conteo de las metafases colchicínicas.

RESULTADOS

Experimento I: Estudio de la expresión del VEGF en el hígado en regeneración de ratones adultos intactos y portadores de tumor.

- **VEGF en ratones hepatectomizados no portadores del tumor:** este grupo de ratones presentó un valor mínimo de expresión del VEGF que se ubicó a las 12/50 (1.6 ± 0.3), y un valor máximo que se encontró a las 8/46 (2.6 ± 0.1). Entre estos dos puntos horarios se observaron diferencias estadísticamente significativas con un $p < 0.05$ (**Tabla 1, gráfico1**).
- **VEGF en ratones hepatectomizados portadores del tumor:** los valores correspondientes a los ratones de este grupo presentaron un valor máximo de expresión del VEGF que se ubicó a las 16/30 (3.7 ± 0.1) con una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.001$ con respecto a los de los lotes de las 12/26, 20/34, 00/38, 04/42, 08/46 y con el de las 12/50. El valor mínimo se observó a las 00/38 (1.2 ± 0.2) (**Tabla 2, gráfico2**).
- Al comparar los resultados de ambos grupos podemos ver que se observan diferencias entre portadores y no portadores ya que el valor máximo de expresión del VEGF en animales portadores del tumor se produjo 16 horas antes que el observado en animales no portadores, presentando en ambos casos diferencias estadísticamente significativas con el resto de los puntos horarios estudiados con un $p < 0.001$. Por otro lado, al comparar los dos grupos podemos observar que los animales portadores del tumor presentaron valores, en promedio, superiores (2.1 ± 0.1) a los observados en los no portadores (1.9 ± 0.1), aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos valores (**Gráfico 3**).
- Cuando evaluamos la expresión del VEGF a las 08/72 se observa un valor de 1.2 ± 0.2 con diferencias estadísticas significativas con respecto al valor máximo de las 08/46 ($p < 0.001$).

En el grupo de ratones portadores del tumor los resultados muestran que el valor de expresión del VEGF de las 08/72 es de 3.02 ± 0.1 , más alto que el observado a las 08/46 de 1.8 ± 0.1 con diferencias estadísticas significativas con una $p < 0.001$ (**Gráficos 4 y 5**).

Experimento II: Establecimiento del pico de síntesis de ADN en el hígado en regeneración de ratones adultos intactos y portadores de tumor.

- **ADNs en ratones hepatectomizados no portadores del tumor:** este grupo de ratones presentó un valor máximo de ADNs a las 16/30 (3.4 ± 0.3) y un valor mínimo a las 00/38 (1.8 ± 0.2) con una diferencia entre ambos estadísticamente significativa ($p < 0.01$). Observamos también diferencias estadísticamente significativas con los valores correspondientes a los animales sacrificados a las 08/46 ($p < 0.05$) y entre estos últimos y los de las 20/34 ($p < 0.01$). (**Tabla 3, Gráfico 6**)
- **ADNs en ratones hepatectomizados portadores del tumor:** los valores correspondientes a los ratones de este grupo presentaron un valor máximo de ADNs que se ubicó a las 00/38 (4.6 ± 0.3) presentando diferencias estadísticamente significativas con las medias de los lotes de las 12/26, 16/30, 04/42, 08/46 y 12/50 con una $p < 0.001$. El valor mínimo se ubicó a las 16/30 (1.1 ± 0.3). (**Tabla 4, Gráfico 7**)
- Si comparamos ambas curvas, de no portadores y portadores del tumor, observamos que el valor máximo de ADNs aparece en los portadores 8 horas después con respecto a los no portadores y presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) con todos los lotes a excepción de los lotes de las 16/30 y 20/34 del grupo de los animales no portadores del tumor (**Gráfico 8**).

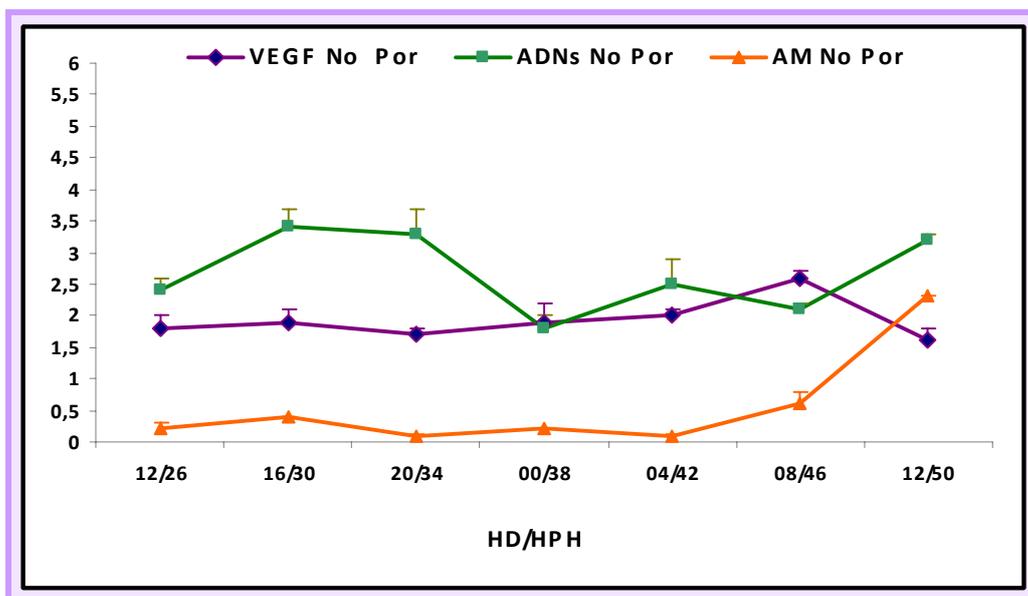
Experimento III: Estudio de la actividad mitótica en el hígado en regeneración de ratones adultos intactos y portadores de tumor.

- **AM en ratones hepatectomizados no portadores del tumor:** los animales de este grupo presentaron un valor máximo de AM a las 12/50 (2.3 ± 0.01) y los valores mínimos a las 20/34 y 04/42 (0.1 ± 0.02 y 0.1 ± 0.02 respectivamente) con diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0.001$ entre las medias de todos los lotes (**Tabla 5, Gráfico 9**).
- **AM en ratones hepatectomizados portadores del tumor:** los ratones de este grupo presentaron un valor máximo de AM en el lote de las 08/46 (3.01 ± 0.3) y un valor mínimo a las 12/26 (0.05 ± 0.05) presentando diferencias entre ambos estadísticamente significativas ($p < 0.001$) al igual que con los lotes de las 16/30, 20/34, 00/38 y 04/42 (**Tabla 6, Gráfico 10**).
- Al comparar ambas curvas podemos observar que el valor máximo de AM en los animales portadores del tumor se encuentra 4 hs adelantado con valores, en promedio (0.9 ± 0.4), superiores a los observados en los animales no portadores (0.6 ± 0.3) y con diferencias entre ambos estadísticamente significativas ($p < 0.0001$). También se observaron diferencias estadísticas del lote de las 08/46 del grupo de animales portadores (valor máximo) con los lotes de ambos grupos a excepción del lote de las 12/50 del grupo de los animales no portadores en donde no se observaron diferencias estadísticamente significativas (**Gráfico 11**).

Ratones hepatectomizados no portadores del tumor

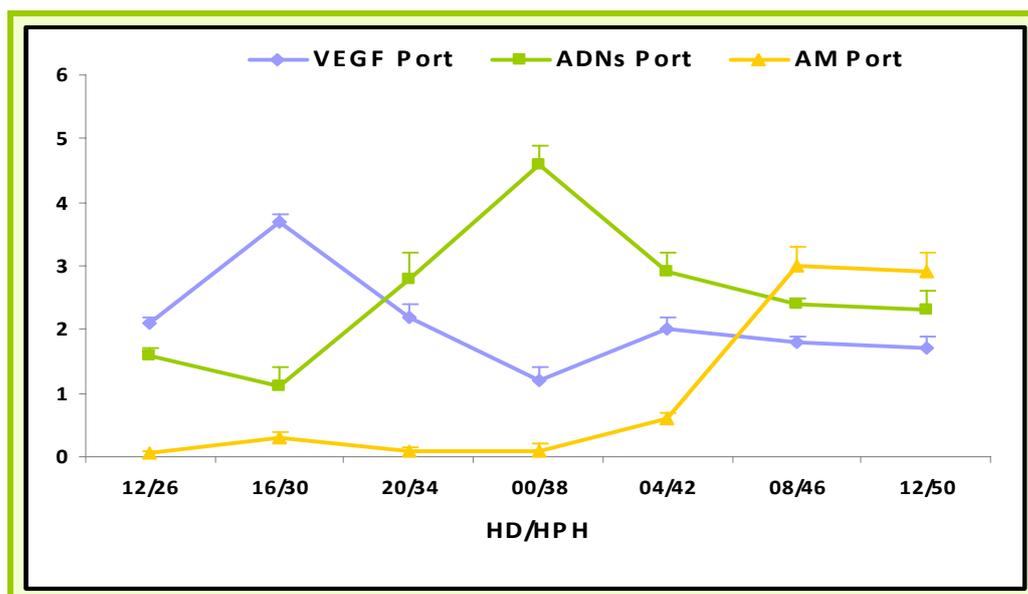
Al observar las tres curvas juntas los resultados nos muestran que:

Los hepatocitos presentaron su valor máximo de ADNs entre las 16/30 y 20/34. El valor máximo de expresión del VEGF se encontró ubicado unas 12 horas posteriores al valor máximo de ADNs (08/46), seguido por el valor máximo de actividad mitótica a las 12/50.



Ratones hepatectomizados portadores del tumor

En el caso de los animales portadores del tumor los resultados hallados muestran que los hepatocitos presentaron el valor máximo de expresión del VEGF a las 16/30, 8 horas después (00/38) se observó el de ADNs. Por su lado el valor máximo de actividad mitótica se produjo 8 horas después, a las 08/46.



DISCUSIÓN

Los hepatocitos constituyen una población celular “en expansión” ya que no prolifera en circunstancias normales **(113)**, y en la que la mayoría de las células en fase S permanecerán como tetra u octaploides sin que ocurran mitosis observables **(84)**. Esto se traduce en que los hepatocitos sólo serán marcados durante la etapa de ADNs y no los observaremos durante la etapa de división celular. Sin embargo posee una mayor plasticidad para reaccionar frente a los estímulos en comparación con otros tipos de poblaciones celulares. En el hígado normal de un adulto, las mitosis son poco frecuentes y pueden observarse 1 por 20.000 hepatocitos, pero, es un órgano con una remarcable capacidad para regenerarse mediante proliferación celular. Diversos estímulos como pueden ser injurias tóxicas, virales o quirúrgicas pueden causar estos efectos **(69)**.

La remodelación hepática seguida a una hepatectomía parcial comprende un set de complejos eventos entre los que se incluyen la activación y secreción de numerosos factores de crecimiento, la proliferación celular y finalmente el restablecimiento de la arquitectura hepática. La reconstrucción de la irrigación sanguínea es parte fundamental de este proceso de regeneración.

Dentro de los factores de crecimiento que pueden intervenir en los cambios producidos durante la regeneración, el **VEGF** es indispensable para la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes, proceso fundamental para que la reparación hepática normal se lleve a cabo **(69)**, aunque no se ha demostrado que este factor estimule directamente la proliferación de los hepatocitos. El VEGF es un factor de crecimiento que estimula la proliferación y migración de las células endoteliales. Estudios recientes han demostrado que se expresa en células epiteliales, incluyendo a los hepatocitos como así también en las células de los carcinomas hepatocelulares **(106)**.

La irrigación sanguínea hepática está representada por dos grandes vasos sanguíneos: la vena porta y la arteria hepática que ingresan al hígado por el hilio, estos vasos se dividen rápidamente en ramas gruesas en el tejido conectivo en donde se ramifican en arteriolas y vénulas que vuelcan la sangre a los sinusoides que terminan en la vena central del lobulillo hepático. Por lo tanto, la regeneración hepática seguida a una cirugía involucra la formación de una compleja red de vasos sanguíneos que es estimulada por el VEGF. En

trabajos previos se demostró un incremento en la producción de este factor por parte de los hepatocitos luego de una hepatectomía y se lo correlacionó con un aumento de sus receptores en las células endoteliales. Concluyéndose que el incremento en la expresión del VEGF y sus receptores indujo la proliferación de las células endoteliales **(31)**.

Diversos autores **(31)**, demostraron que el VEGF es uno de los factores angiogénicos más potentes y juega un rol importante durante la regeneración hepática en ratones. Nuestros resultados muestran que la máxima expresión del VEGF en ratones hepatectomizados se produce a las 46 hs. poshepatectomía en coincidencia con algunos autores como Yehudit Kraizer y col. **(111)** quienes demostraron un incremento luego de una hepatectomía parcial en la expresión del mRNA del VEGF en los hepatocitos a las 24 y 72 hs. posteriores a la operación. Hiroaki Shimizu **(195)** por su parte, demostró la máxima expresión del VEGF en las áreas periportales, entre las 48 y 72 h poshepatectomía y Michalopoulos y col. **(144)** quienes sostienen que las células endoteliales proliferan el tercer día poshepatectomía.

Cuando estudiamos la expresión del VEGF en ratones portadores del hepatocarcinoma ES2 observamos que la portación de dicho tumor produce un adelanto en el pico de máxima expresión del VEGF de unas 16 hs. con respecto a lo observado en animales no portadores. El carcinoma hepatocelular ES2 estaría produciendo factores que estimulan la expresión del VEGF en los hepatocitos durante la regeneración hepática. Entre los factores probables se pueden incluir al FGF-7, Keratinocyte Growth Factor (KGF), Epidermal Growth Factor (EGF) y TGF- α con efectos mitogénicos sobre los hepatocitos. Además, está comprobado que la hepatectomía parcial en roedores provoca cambios de concentraciones de sustancias como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), HGF, el TGF- α y TGF- β , que están implicados en la proliferación celular y causan la hiperplasia compensatoria de los lóbulos remanentes del hígado **(52, 107, 144)**. Algunos de estos factores secretados durante la hiperplasia compensatoria hepática pueden alterar la proliferación de las células tumorales. Además, la concentración de un factor puede aumentar en los tumores, por ejemplo, el TGF- α es sintetizado por numerosos carcinomas hepatocelulares en la rata **(170)**.

Está demostrado que la intensidad de la regeneración se relaciona directamente con el porcentaje de masa hepática extraída, ya que cuando se extirpa el 57% del órgano la regeneración es más rápida que cuando se extrae el 35% (6). En el presente trabajo experimental, en el que extraemos el 70 % de la masa hepática total, el estímulo generado es aún mayor y por lo tanto se desencadena un rápido aumento en la ADNs de los hepatocitos remanentes. Esta ADNs de los hepatocitos del hígado regenerante del ratón presenta variaciones circadianas. Nuestros resultados muestran que, en los hepatocitos del hígado de animales hepatectomizados, la máxima actividad de síntesis se observa entre las 30 y las 34 h poshepatectomía. Este resultado concuerda con los datos presentados por otros autores, como **Michalopoulos** (2005) quién describió que el incremento de la ADNs comienza, en ratas hepatectomizadas, a las 12 h poscirugía, con un pico a las 24 h y **Fujito** (2001) quién observó que la mayor incorporación de BrdU en los hepatocitos del hígado regenerante ocurre entre las 36 y 48 h postcirugía. Por otra parte, **Schibler** (2003) demostró que la máxima actividad de ADNs se observa a las 36 h poshepatectomía, independientemente del momento del día en que se realice la ablación hepática. Está probado que la restauración de la arquitectura normal del hígado requiere de la formación de una red vascular adecuada para proveer nutrientes a los hepatocitos y a los distintos tipos celulares que lo componen. En concordancia con este concepto, nosotros encontramos que durante la regeneración hepática el primer fenómeno que se produce es el aumento en la síntesis de ADN por parte de los hepatocitos, que luego expresan el VEGF para, de esta manera poder estimular la proliferación y migración de las células endoteliales con la consecuente formación de nuevos vasos sanguíneos para restablecer así el complejo lecho vascular hepático.

En los **ratones portadores del tumor**, podemos ver que la ADNs presenta valores muy bajos en las primeras 34 hs. posteriores a la cirugía, mientras que el pico de ADNs se observa a las 38 hs. poshepatectomía.

La presencia de variaciones circadianas en la actividad mitótica de los hepatocitos de los ratones adultos fue un tema controversial durante años. Así en numerosos trabajos no se encontró ritmo circadiano cuando se estudiaron los hepatocitos de las ratas adultas (5). Por el contrario Surur y col. (205) demostraron, en ratones de la misma cepa que los utilizados en este trabajo, la

presencia de ritmos circadianos en la actividad mitótica de los hepatocitos del ratón adulto encontrando el pico mitótico a las 14:00hs. Por otro lado se conoce que la respuesta hiperplásica compensatoria de los hepatocitos tras la hepatectomía posee variaciones circadianas, con máximas actividades mitóticas en la fase de reposo del animal (**58, 59**).

Esta ritmicidad se mantiene hasta 10 días poscirugía (**62**) En el presente estudio al analizar la **AM** se observa un leve incremento a las 16/30 con valores máximos a las 8/46 marcando un pico a las 12/50 HD/HPH. Es probable que el incremento temprano de la proliferación se deba a factores extrahepáticos, en especial HGF (**144**). Estos resultados coinciden con los observados por Barbeito en su trabajo de tesis doctoral (**19**).

Cuando evaluamos a los ratones operados y portadores del tumor observamos un incremento en la **AM** de los hepatocitos con respecto a la observada en los no portadores, con valores en promedio superiores y con un pico que se ubicó a las 08/46 HD/HPH. Estos datos se contraponen con los estudiados por Barbeito (**19**) en los que observó un retraso en el inicio de la respuesta regenerativa en animales portadores del hepatocarcinoma ES12a. Por otro lado, se ha demostrado que el tratamiento con extractos de algunos tumores como el ES2 y el SS1K inhiben la regeneración hepática (**15, 149**).

La regeneración hepática es un fenómeno muy complejo en el cual están involucrados numerosos factores de crecimiento, que podrían estar alterados en los animales portadores de neoplasias, tanto por ser sintetizados por el mismo tumor como por ser estimulada su síntesis por un efecto indirecto del tumor sobre las células normales del organismo. Entre estos factores se encuentra el TNFalfa (**144**) que sería la primer sustancia involucrada en el proceso regenerativo. Está demostrado que el TNFalfa alcanza niveles importantes entre las 2 y 3 h poshepatectomía (**49**). Este factor, en dosis inferiores a la tóxica, estimula tanto la ADNs como la AM del hígado regenerante (**29**). Durante la regeneración hepática sería producido por las células de Kupffer y su acción estaría mediada por la IL6 (**144**). El TNFalfa permite que los hepatocitos salgan de G0 y sean competentes para responder al HGF, el que se incrementa en plasma antes de la primera hora poshepatectomía (**137, 145**). HGF y TNFalfa serían las sustancias que generan el incremento inicial en la ADNs observado en el presente estudio en el grupo

de ratones portadores. Otros factores intervinientes en la regeneración del hígado luego de la hepatectomía son el TGFalfa y el EGF (**136, 144**), quienes comparten el mismo receptor (**51**) y estimulan la proliferación de los hepatocitos (**140**). TGFalfa es producido por las células de algunos carcinomas hepatocelulares de ratas (**170**), por lo que las concentraciones diarias de este factor en los portadores del tumor podrían estar alteradas y por lo tanto desincronizar la respuesta regenerativa del hígado. La concentración del FGF también se incrementa luego de la hepatectomía, aunque no se conoce su intervención real en la regeneración hepática (**129**). Se puede suponer que su acción más importante ocurre sobre el tejido conectivo intersticial. Algunos tumores producen factores de la familia del TGFalfa, los cuales constituyen el primer freno para la regeneración hepática (**144**), los hepatocitos se vuelven refractarios al efecto de este factor durante las primeras 48 h poshepatectomía (**144, 183**), por lo que, al analizar solo el primer día poshepatectomía, no podríamos detectar su efecto.

Existen pocos estudios que investigan el crecimiento regenerativo del hígado en animales que portan tumores. Badrán et al. (**14**) en ratones portadores de otro carcinoma hepatocelular, el SS1K, observaron una estimulación en la AM de los hepatocitos de los portadores al compararla con la hallada en los testigos hepatectomizados no portadores del tumor. Algunos trabajos previos mencionan, que en ratones hepatectomizados, la inyección de células provenientes del tumor de ascitis de Ehrlich y de sarcomas genera un incremento en el índice mitótico de los hepatocitos (**180**). Por otra parte, Ueda et al. (**212**) observaron que cuando se implantaron células del tumor de ascitis AH109A en el tejido subcutáneo de ratas con hepatectomía parcial, ocurre un incremento significativo en la ADNs y en el flujo sanguíneo hepático. Por el contrario existen publicaciones que demuestran que el tratamiento con extractos de tumores hepatocelulares como el ES2 y el SS1K inhiben la regeneración hepática (**15, 149**), otros estudios demostraron en los hepatocitos del hígado regenerante de ratones portadores del tumor ES12a, una desincronización en la curva diaria de ADNs (**79**). En un trabajo más reciente, Altun et al. (**7**) revelaron que la inyección intraperitoneal, en ratones, de células del tumor de ascitis de Ehrlich, inmediatamente luego de la hepatectomía parcial, no genera efectos detectables en el primer y segundo día poscirugía,

pero luego ocurre un rápido aumento en el porcentaje de células regenerantes al compararlo con el encontrado en los animales que no fueron inyectados con células tumorales.

También se ha visto que algunos tumores producen factores de la familia del TGF β que constituyen el primer freno para la regeneración hepática **(144)**. Normalmente los hepatocitos no responden al efecto mitoinhibidor de TGF β durante las primeras horas poshepatectomía siendo entonces las catecolaminas, parcialmente las responsables de esta menor sensibilidad de los hepatocitos al TGF β . El estrés es otro factor que puede alterar la regeneración hepática **(18)**. Esto nos permite suponer que la presencia de un tumor injertado podría modificar la regeneración hepática, como un proceso paraneoplásico en el que actuaría el estrés ya sea mediante un efecto hormonal directo o por modificar la sensibilidad al efecto de TGF β **(144)**. Por otro lado, nuestros resultados coinciden con los encontrados en los hepatocitos del hígado regenerante de animales portadores del carcinoma hepatocelular SS1K, en los que se encontró un adelantamiento del pico mitótico seguido de niveles más bajos de proliferación **(14)**, como así también en los resultados encontrados por otros grupos de trabajo, en los que se demostró que la respuesta regenerativa del hígado se incrementó en los animales portadores de tumores **(197)**.

Como ya mencionamos la angiogénesis es un proceso complejo que implica la migración de células y la proliferación de las células endoteliales para la remodelación de los nuevos vasos sanguíneos **(106)**. El crecimiento de los tumores sólidos, como el analizado en este estudio, necesita de una adecuada red vascular tanto para el suministro de oxígeno y nutrientes como para eliminar los productos residuales, ya que se ha comprobado que la proliferación de células tumorales disminuye al aumentar la distancia que les separa de los vasos sanguíneos **(215,216)**.

Como podemos ver en nuestro trabajo, tanto en los hepatocitos regenerantes de animales portadores como de no portadores se observaron variaciones circadianas en la expresión de VEGF. Por otro lado, la presencia de un tumor trasplantado produce modificaciones en la intensidad y el momento en que se produce la máxima expresión del VEGF. En los animales trasplantados el pico de dicho factor aparece antes y con valores más altos que

el grupo control. Por lo tanto, podemos afirmar que el carcinoma hepatocelular ES2 aumenta y acelera, directa o indirectamente, la expresión de VEGF en los hepatocitos. El tumor podría estimular de forma autocrina o paracrina a que los hepatocitos aumenten su expresión de VEGF para iniciar el proceso de angiogénesis. El concepto de que para el desarrollo de numerosos tumores y su posterior metástasis es necesario la formación de nuevos vasos sanguíneos, hace que el control de la angiogénesis tumoral sea un prometedor camino en la terapéutica contra el cáncer. Para el crecimiento tumoral y para originar metástasis se requiere de un proceso celular y molecular complejo entre las células cancerosas, las células endoteliales y la matriz extracelular. Las células tumorales producen proteínas específicas, como el VEGF, para estimular la angiogénesis.

Se ha postulado otro mecanismo que podría estar involucrado en la génesis de los ritmos circadianos en la proliferación de las células neoplásicas: las variaciones diarias en el flujo sanguíneo. Estos cambios no se encuentran en los tejidos normales pero sí en los tumorales **(96)**, por lo que es probable que la menor o mayor llegada de sangre a las células neoplásicas influya sobre el CC de las mismas. Para el desarrollo de tumores sólidos como los carcinomas hepatocelulares es indispensable la presencia del VEGF, ya que estas son neoplasias muy vascularizadas **(218, 226)**. Las áreas necróticas e hipóxicas de los tumores regulan positivamente la expresión de los genes que es dependiente del VEGF al menos a través de dos mecanismos: activación de la transcripción y aumento de la estabilidad del ARNm del VEGF **(218)**. La angiogénesis tumoral también puede ser estimulada por otros factores de crecimiento como el PDGF y el FGF **(106)**. La mayor o menor afluencia de sangre a la neoplasia está relacionada con una mayor o menor llegada del VEGF y de otros factores al sitio del desarrollo tumoral.

La presencia del VEGF es el estímulo más importante para la neoformación de vasos sanguíneos tanto para poblaciones celulares normales como tumorales **(207)**. La hepatectomía parcial produce la liberación de grandes cantidades de VEGF **(207)**, lo cual genera el desarrollo de una buena red capilar que permite el crecimiento tisular. Por otro lado, cada tumor tiene un patrón único de desarrollo microvascular, que puede ser debido a la producción de factores específicos producidos y/o liberados por las mismas células

tumorales que estimulan a las células endoteliales del tejido anfitrión promoviendo así su propia vasculatura **(207)**.

El VEGF previene la apoptosis de las células tumorales, lo que asociado a su potencial angiogénico, estimula la capacidad metastásica y acelera la actividad proliferativa de los tumores, después de alcanzar el órgano blanco. Su mecanismo de acción se desarrolla a través de la inducción de la angiogénesis alrededor del tumor, a partir de un lecho vascular existente en el tejido normal vecino, en un período temprano de desarrollo del mismo, seguido de una neovascularización que va acompañando al crecimiento tumoral **(194)**.

Se debe mencionar también la posible influencia endocrina sobre algunas de las alteraciones de la proliferación celular encontradas en los hepatocitos de los animales hepatectomizados y portadores del tumor. Es conocido que la presencia del carcinoma hepatocelular SS1K injertado en el ratón genera cambios ultraestructurales en las células somatotróficas de la pars distalis **(16)**, estas modificaciones presentan variaciones circadianas. También la hepatectomía modifica la ultraestructura de la adenohipófisis **(85)**. Se conoce que la STH tiene un efecto promotor sobre la AM hepatocítica **(50)**; y que los ratones transgénicos que sobreexpresan en el hígado STH poseen hiperplasia hepática **(187)**. Por otra parte, la presencia de tumores en la glándula adrenal determina cambios en los RC de los niveles plasmáticos de cortisol **(2)**. Debe considerarse que todas estas modificaciones de origen endocrino no permiten explicar por sí solas los cambios generados por los tumores sobre la proliferación celular, ya que la presencia del mismo tumor posee efectos diferentes según cual sea la población celular estudiada **(22)**, lo que demuestra la importancia del microambiente en que se encuentra la célula.

La magnitud de los efectos locales generados por la presencia del tumor podría relacionarse con la producción de factores de crecimiento por parte de éste, ya que algunos de estos factores pasan a la circulación general **(1, 137)**. Así, una síntesis excesiva de factores tumorales podría modificar los ritmos normales de sus concentraciones plasmática y tisular y, como consecuencia, la estructura temporal de la proliferación.

Como mencionamos anteriormente, la proliferación de las células endoteliales es un requisito indispensable para la neovascularización durante el crecimiento tumoral, por lo que ha cobrado gran interés la identificación de

potenciales mitogénicos endoteliales producidos por las propias células tumorales. También se ha señalado la importancia del microambiente tanto para las células normales como para las tumorales ya que la hipoxia regularía la expresión del VEGF a través de la activación de la transcripción del mismo, y se sabe que el microambiente tumoral es en general hipóxico **(110)**. Por todas estas razones es que en los últimos años se ha empezado a dar gran importancia al estudio de la expresión del VEGF como posible factor pronóstico para muchos tumores. En trabajos previos hemos analizado la expresión del VEGF y su relación con la densidad de la microvasculatura mediante la utilización del CD34 (antígeno endotelial utilizado para la marcación de la densidad de la microvasculatura), en dos líneas de NSCLC (Carcinomas de células no pequeñas de pulmón), adenocarcinoma y carcinoma epidermoide con bajo grado de diferenciación y en cáncer de colon humano, como excelentes marcadores de neoangiogénesis en NSCLC **(97, 100)**.

Sabemos que la regulación de la angiogénesis depende de diferentes factores estimuladores e inhibidores necesarios para la formación de una red vascular, por lo tanto cuando se altera este mecanismo en los tumores se disparan factores estimuladores de la angiogénesis. En condiciones de hipoxia se activan un número importante de factores angiogénicos, entre estos el primero es el VEGF. La elaboración de las primeras drogas antitumorales fueron aquellas que bloqueaban al VEGF, sin embargo el uso de preparaciones anti-VEGF fueron eficientes sólo cuando se las utilizó en combinación con otras sustancias quimioterápicas. Sin embargo el conocimiento de los mecanismos de regulación de la angiogénesis, en particular su activación en el desarrollo de tumores hacen posible la elaboración de nuevos avances en la terapéutica del cáncer **(106)**.

No ha perdido vigencia lo mencionado por Wood **(222)** en su trabajo acerca de que es necesario comprender mejor la estructura temporal del paciente y de la neoplasia para poder tener una mejor oportunidad para optimizar la modalidad diagnóstica y la terapéutica del tratamiento antitumoral.

Al analizar en forma conjunta los resultados encontrados en el presente trabajo podemos resumir que cuando un tejido se encuentra en una situación de proliferación activa, como es el caso del hígado luego de una hepatectomía del 70%, sus células reaccionan inmediatamente sintetizando ADN, luego

expresando VEGF, de manera de garantizar la formación de un lecho vascular suficiente para nutrir a todas las células hijas. Finalmente, cuando las condiciones están dadas, los hepatocitos se dividen produciendo de esta manera el pico de actividad mitótica. Estos tres parámetros se manifiestan con un ritmo circadiano similar al de las poblaciones celulares en situación normal.

Por otro lado, observamos que la presencia en el organismo de un tumor maligno modifica todo este esquema de regeneración. En este caso se produce primero el pico de expresión del VEGF, seguido del pico de ADNs y finalmente del de AM. Además los valores de los mismos son mayores en todos los casos si los comparamos con los de los animales no portadores del tumor. Esta observación nos está indicando que las células tumorales que normalmente sintetizan VEGF para su propio desarrollo, podrían estar influenciando directa o indirectamente la mayor y más rápida expresión del VEGF por los hepatocitos, seguida del pico de ADNs y finalmente de AM. El aumento en los valores de los picos de ADNs y AM correspondientes a los hepatocitos de los animales portadores, podría ser explicado por una estimulación ocasionada por la gran cantidad de factores de crecimiento mitogénicos presentes en todos los tumores malignos que son liberados a la circulación general. Sabemos que todos los tumores malignos liberan factores para regular en forma autocrina o paracrina su propio crecimiento y que muchos de ellos regulan de forma endocrina el crecimiento de sus metástasis ya que está comprobado que en muchos casos, al extraer el tumor primario se produce una disminución en el tamaño de la metástasis, en este caso existe un tejido (el hígado en regeneración) con una tasa de crecimiento anormalmente alta que podría ser reconocido por el tumor primario como una metástasis.

Una vez más queda demostrado que los mecanismos que regulan el crecimiento tisular poseen un elevado grado de complejidad, viéndose modificadas las respuestas ante los distintos tratamientos experimentales a los cuales puede ser sometida una población celular.

CONCLUSIONES

Basándonos en los objetivos propuestos para la realización de este trabajo de tesis, podemos concluir que:

- ✓ Los hepatocitos del hígado de ratones hepatectomizados no portadores del tumor presentaron una curva circadiana evidente, en la que se observó que la máxima expresión del VEGF se encontró a las 08/46 y su valor mínimo a las 12/50 HD/HPH.
- ✓ En los animales hepatectomizados no portadores del tumor ES2 se observó que los hepatocitos presentaron una curva circadiana de ADNs con valores máximos ubicados entre las 30 y 34 horas poshepatectomía y de actividad mitótica con valores máximos a las 50 horas poshepatectomía.
- ✓ Al comparar los tres parámetros estudiados durante la regeneración hepática, los hepatocitos del hígado de animales hepatectomizados no portadores del tumor ES2 presentaron un valor máximo de síntesis de ADN entre las 16/30 y 20/34, mientras que el valor máximo de expresión del VEGF se encontró 12 horas posteriores al mismo (a las 08/46), seguido por el valor máximo de AM a las 12/50 HD/HPH.
- ✓ La presencia del tumor injertado ES2 genera cambios detectables en las curvas circadianas de la expresión del VEGF, en la ADNs y AM de los animales hepatectomizados, provocando modificaciones en la distribución espacial y temporal de los valores correspondientes a los mismos. El valor máximo de expresión del VEGF se encontró adelantado (a las 16/30) y 8 horas después (00/38) se observó el de ADNs. Por su lado el valor máximo de AM se produjo 8 horas más tarde, a las 08/46.

- ✓ Al comparar el pico de máxima expresión del VEGF (08/46) con el de las 8/72 en animales hepatectomizados y no portadores observamos que los valores descienden, pero la portación del tumor ES2 produjo una nueva estimulación en la expresión del VEGF por parte de los hepatocitos.

Finalmente, se puede concluir que los factores de crecimiento producidos por las células del tumor maligno ES2, de ratones machos de la cepa C3HS hepatectomizados que son liberados a la circulación general, podrían reconocer el tejido regenerante con una alta tasa proliferativa, como una metástasis y serían entonces los responsables de alterar el microambiente del tejido hepático determinando de esta forma cambios en la cronobiología de la síntesis de ADN, de la actividad mitótica y de la expresión del VEGF.

TABLAS

Tabla 1: Estudio de la expresión del VEGF en el hígado en regeneración de ratones no portadores del tumor.

	$\bar{x} \pm ES$	<i>n</i>
12/26	1.8 ± 0.2	5
16/30	1.9 ± 0.2	5
20/34	1.7 ± 0.1	5
00/38	1.9 ± 0.3	5
04/42	2 ± 0.1	5
08/46*	2.6 ± 0.1	6
12/50*	1.6 ± 0.3	6
08/72	1.2 ± 0.2	6
\bar{x}	1.8 ± 0.1	
	*p<0.05	

Referencias

\bar{x} : media

ES: error estándar

n: cantidad de ratones

p: probabilidad

Tabla 2: Estudio de la expresión del VEGF en el hígado en regeneración de ratones adultos portadores de tumor.

<i>HD/HPH</i>	$\bar{x} \pm ES$	<i>n</i>
12/26	2.1 ± 0.1	5
16/30*	3.7 ± 0.1	5
20/34	2.2 ± 0.2	5
00/38*	1.2 ± 0.2	5
04/42	2 ± 0.2	5
08/46*	1.8 ± 0.1	6
12/50*	1.7 ± 0.2	6
08/72	3.02 ± 0.1	5
\bar{x}	2.2 ± 0.1	
	*p<0.001	

Referencias:

\bar{x} : media

ES: error estándar

n: cantidad de ratones

p: probabilidad

Tabla 3: Establecimiento del pico de síntesis de ADN en el hígado en regeneración de ratones adultos no portadores de tumor.

HD/HPH	$\bar{x} \pm ES$	<i>n</i>
12/26	2.4 ± 0.1	5
16/30*	3.4 ± 0.3	5
20/34	3.3 ± 0.4	5
00/38*	1.8 ± 0.2	5
04/42	2.5 ± 0.4	5
08/46	2.1 ± 0.07	6
12/50	3.2 ± 0.08	5
\bar{x}	2.7 ± 0.1	
	*p<0.01	

Referencias:

\bar{x} : media

ES: error estándar

n: cantidad de ratones

p: probabilidad

Tabla 4: Establecimiento del pico de síntesis de ADN en el hígado en regeneración de ratones adultos portadores de tumor.

HD/HPH	$\bar{x} \pm ES$	<i>n</i>
12/26	1.6 ± 0.1	5
16/30	1.1 ± 0.3	5
20/34	2.8 ± 0.4	5
00/38*	4.6 ± 0.3	5
04/42	2.2 ± 0.3	5
08/46*	2.4 ± 0.1	6
12/50*	2.2 ± 0.3	6
\bar{x}	2.4 ± 0.2	
	*p<0.001	

Referencias:

\bar{x} : media

ES: error estándar

n: cantidad de ratones

p: probabilidad

Tabla 5: Estudio de la actividad mitótica en el hígado en regeneración de ratones adultos no portadores de tumor.

HD/HPH	$\bar{x} \pm ES$	<i>n</i>
12/26	0.2 ± 0.1	5
16/30	0.4 ± 0.008	5
20/34*	0.1 ± 0.02	5
00/38	0.2 ± 0.02	5
04/42*	0.1 ± 0.02	5
08/46*	0.8 ± 0.2	6
12/50*	2.3 ± 0.01	6
\bar{x}	0.6 ± 0.3	
	*p<0.001	

Referencias:

\bar{x} : media

ES: error estándar

n: cantidad de ratones

p: probabilidad

Tabla 6: Estudio de la actividad mitótica en el hígado en regeneración de ratones adultos portadores de tumor.

HD/HPH	$\bar{x} \pm ES$	<i>n</i>
12/26*	0.05 ± 0.05	5
16/30	0.3 ± 0.1	5
20/34	0.1 ± 0.06	5
00/38*	0.1 ± 0.1	5
04/42	0.6 ± 0.1	5
08/46*	3.01 ± 0.3	6
12/50	2.1 ± 0.3	6
\bar{x}	0.9 ± 0.4	
	*p<0.001	

Referencias:

\bar{x} : media

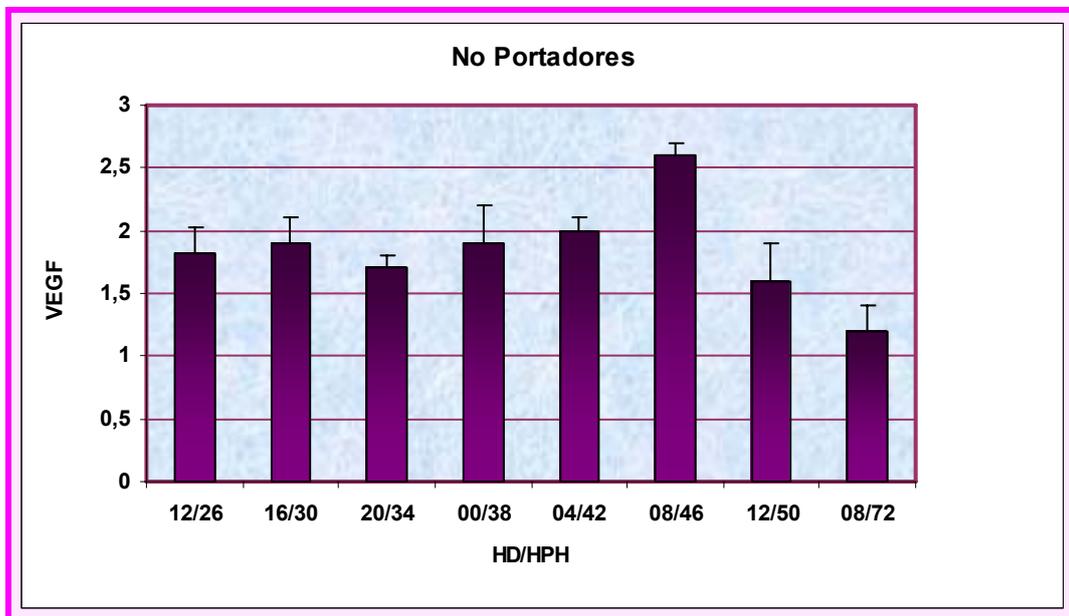
ES: error estándar

n: cantidad de ratones

p: probabilidad

GRAFICOS

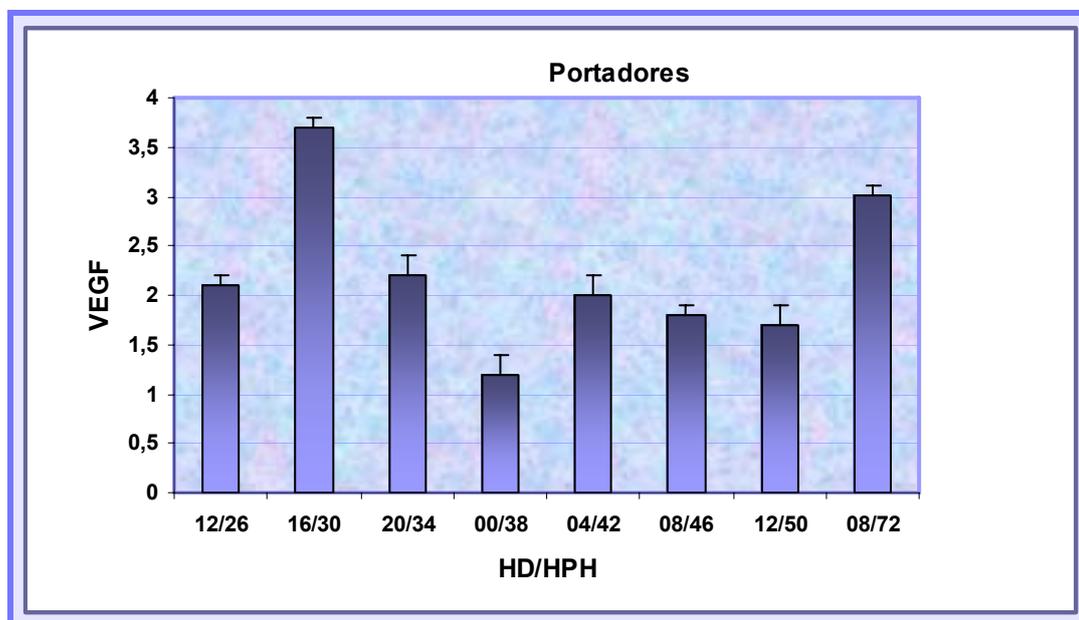
Gráfico 1: Estudio de la expresión del VEGF en el hígado en regeneración de ratones adultos no portadores de tumor.



Referencia:

HD/HPH: hora día/ horas poshepatectomía

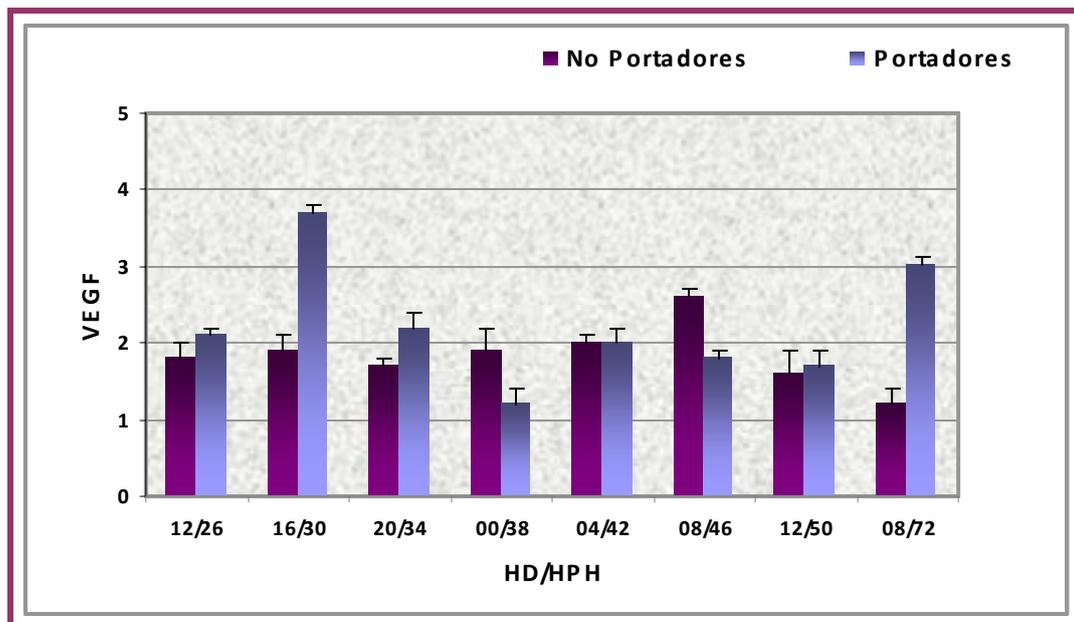
Gráfico 2: Estudio de la expresión del VEGF en el hígado en regeneración de ratones adultos portadores de tumor.



Referencia

HD/HPH: hora día/horas poshepatectomía

Gráfico 3: Estudio de la expresión del VEGF en el hígado en regeneración de ratones adultos intactos y portadores de tumor.



Referencia:

HD/HPH: hora día/horas poshepatectomía

Gráfico 4 y 5: Estudio comparativo de la expresión del VEGF en el hígado en regeneración de ratones adultos intactos y no portadores de tumor en el punto horario de 08/72 y 08/46 horas.

Gráfico 4

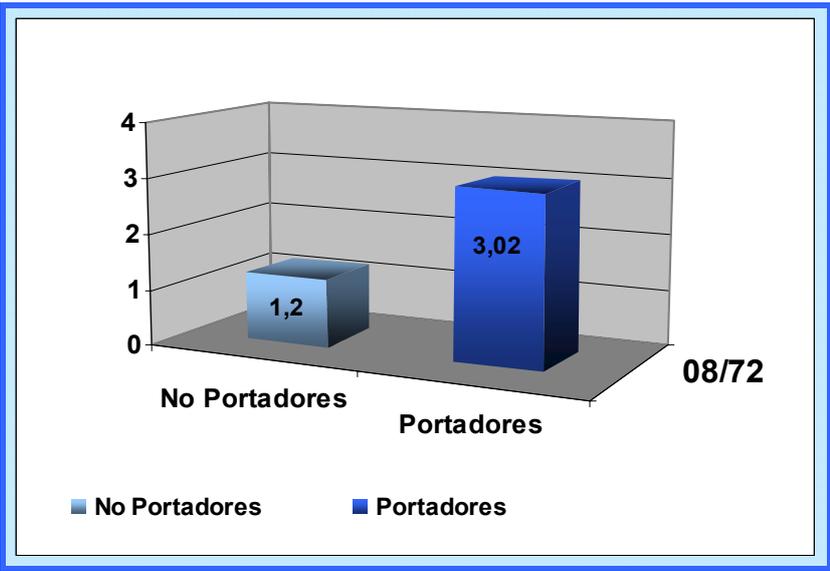


Gráfico 5

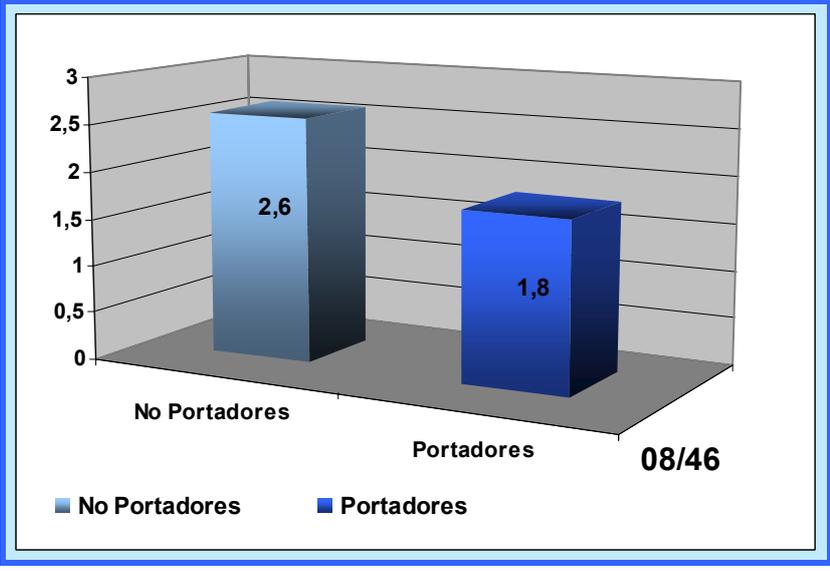
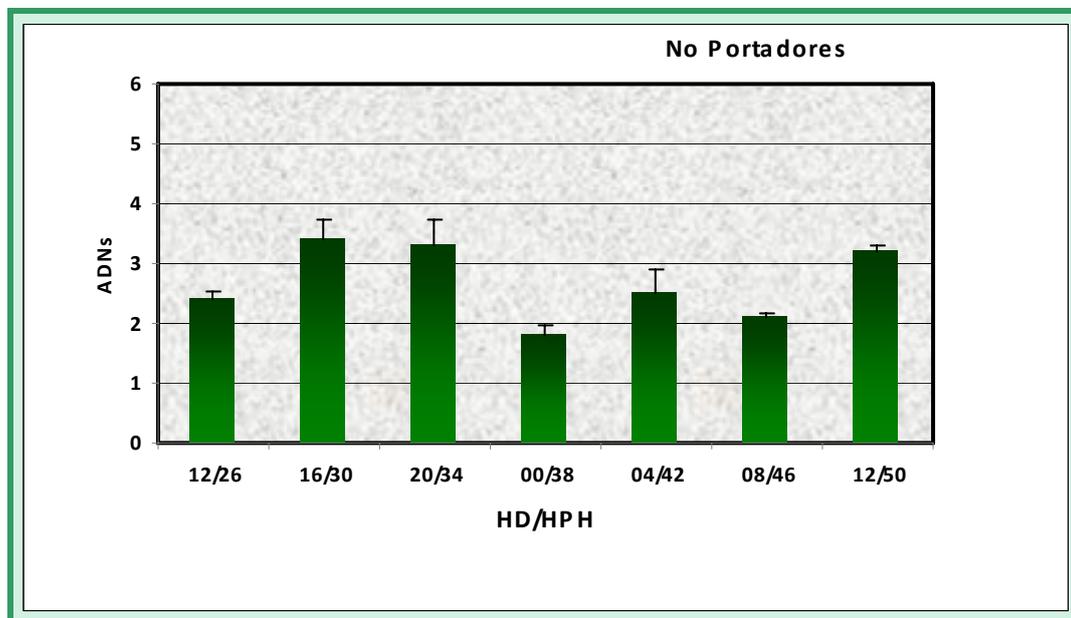


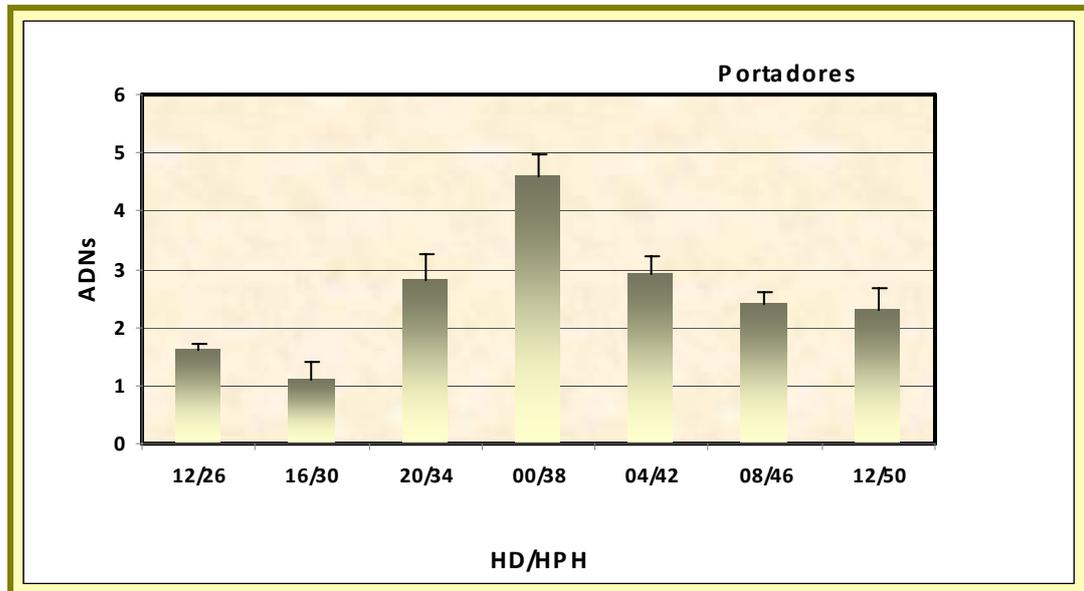
Gráfico 6: Establecimiento del pico de síntesis de ADN en el hígado en regeneración de ratones adultos no portadores de tumor.



Referencia:

HD/HPH: hora día/horas poshepatectomía

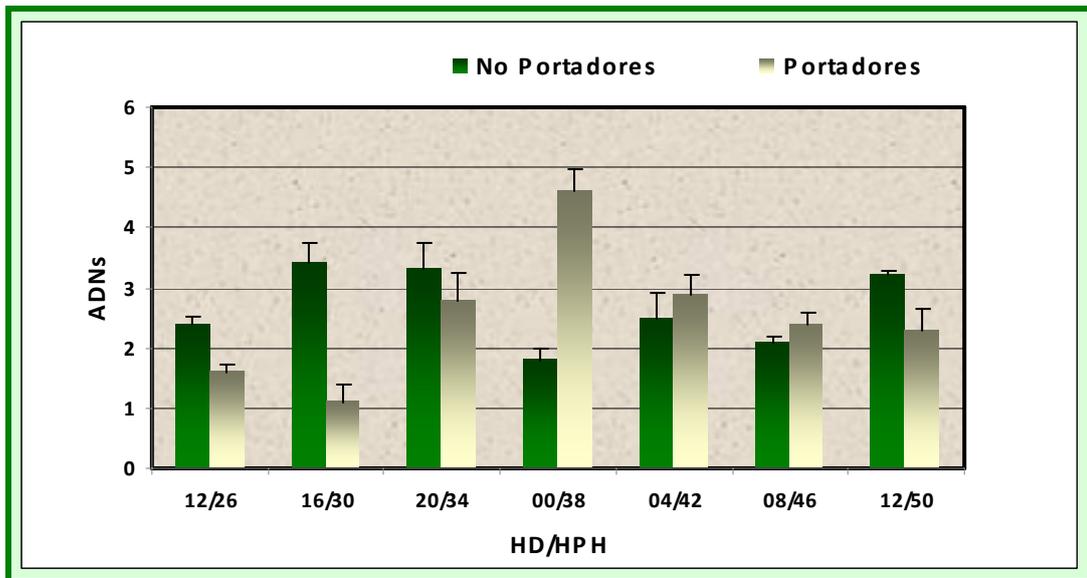
Gráfico 7: Establecimiento del pico de síntesis de ADN en el hígado en regeneración de ratones adultos portadores de tumor.



Referencia:

HD/HPH: hora día/horas poshepatectomía

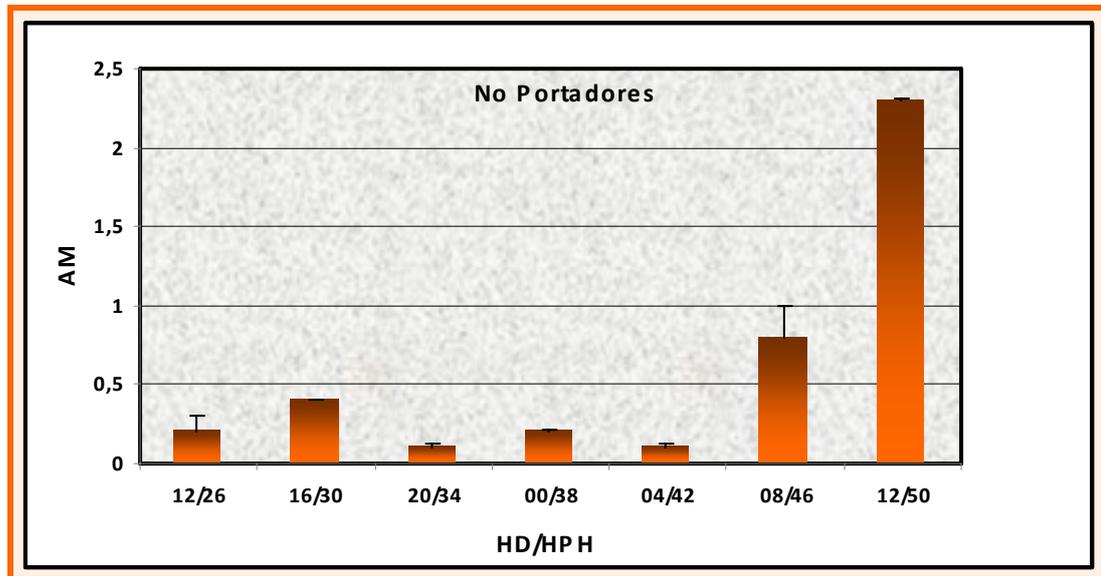
Gráfico 8: Establecimiento del pico de síntesis de ADN en el hígado en regeneración de ratones adultos no portadores y portadores de tumor.



Referencia:

HD/HPH: hora día/horas poshepatectomía

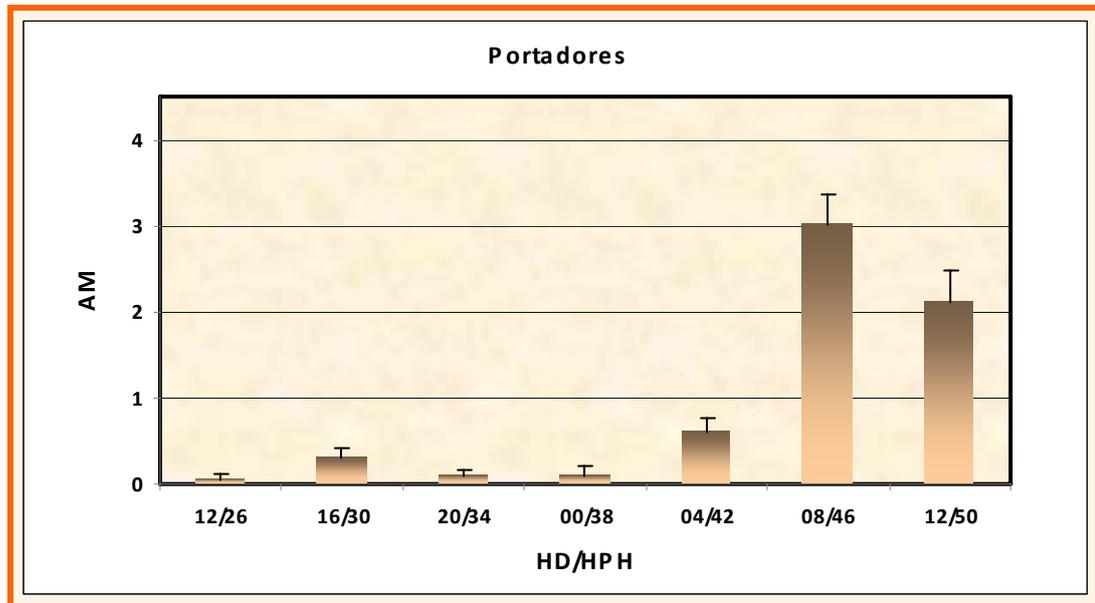
Gráfico 9: Estudio de la actividad mitótica en el hígado en regeneración de ratones adultos no portadores de tumor.



Referencia:

HD/HPH: hora día/horas poshepatectomía

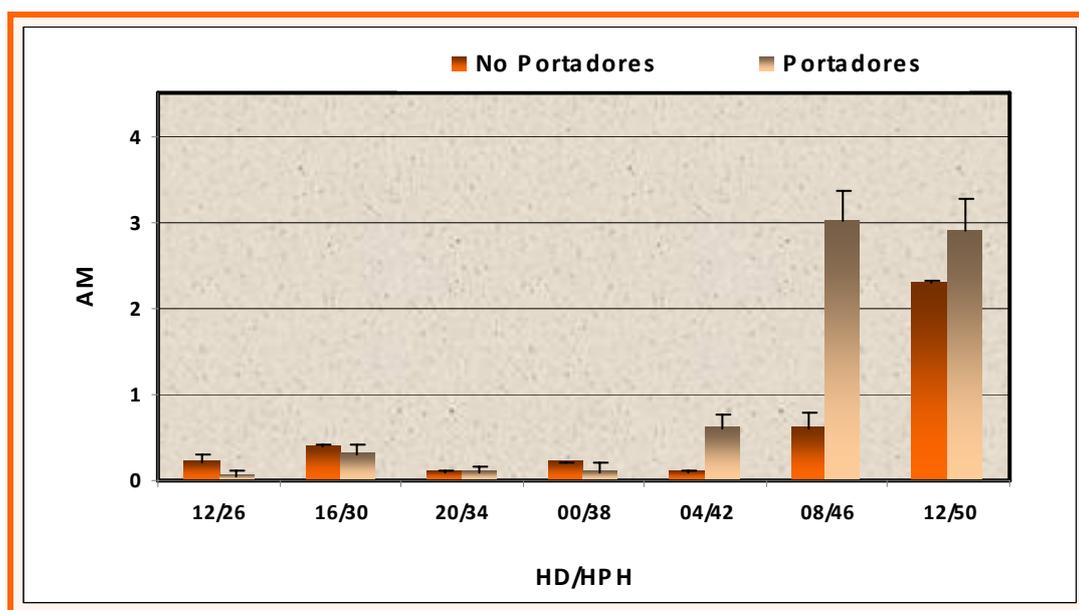
Gráfico 10: Estudio de la actividad mitótica en el hígado en regeneración de ratones adultos portadores de tumor.



Referencia:

HD/HPH: hora día/horas poshepatectomía

Gráfico 11: Estudio de la actividad mitótica en el hígado en regeneración de ratones adultos no portadores y portadores de tumor.



Referencia:

HD/HPH: hora día/horas poshepatectomía

BIBLIOGRAFIA

1. **AARONSON S.** (1991). Growth factors and cancer. *Science*. 254:1146-1153.
2. **ABRAHANSEM J.; SMAALAND R.; SANDBERG S.; AAKVAAG A. AND LOTE K.** (1993). Circadian variation in serum cortisol and circulating neutrophils are markers for circadian variation of bone marrow proliferation in cancer patients. *Eur J Haematol* 50: 206-212.
3. **ALBARENQUE S.; SHINOZUKA J.; SUSUKI K.; NAKAYAMA H. AND DOI K.** (2000). Kinetics and distribution of Transforming Growth Factor β -1 mRNA in the dorsal skin of hypotrichotic WBN/ILA-Ht rats following topical application of T-2 toxin. *Exp Toxicol Pathol* 52: 297-301.
4. **ALBERTS B., BRAY D., HOPKIN K., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K. AND WALTER P.** (2006). *Introducción a la Biología Celular*. 2da. Edición. Editorial Médica Panamericana.
5. **ALISON M.** (1986). Regulation of hepatic growth. *Physiol Rev* 66: 499-541.
6. **ALTUN S. AND OZALPAN A.** (1998). Relationship between the hepatectomy rate and regeneration. *1 st Tip Fak. Mecmuasi* 61: 485-491.
7. **ALTUN S. AND OZALPAN A.** (2004). Interactive regeneration of liver and growth of Ehrlich ascites tumor in mice. *Biología, Bratislava*. 59: 375-382.
8. **AMÉLIA A. AND BENEDITO-SILVA.** (1997). Aspectos metodológicos de la cronobiología. Cap. 11. Ed: Marques, N.; Menna-Barreto, L. Y Golombek, D.A. Editorial Universitaria de Buenos Aires.
9. **ANNONI G.; WEINER F. AND ZERN M.** (1992). Increased TGF β 1 gene expression in human liver disease. *J Hepatol* 14: 259-264.
10. **ASADA M.; SHINOMIYA M.; SUZUKI M.; HONDA E., SUGIMOTO R., IKEKITA M. AND IMAMURA T.** (2009). Glycosaminoglycan affinity of the complete fibroblast growth factor family. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790, 40-48.
11. **ASAGA T.; SUSUKI K.; UMEDA M.; SUGIMASA Y.; TAKEMIYA S. AND OKAMOTO T.** (1991). The enhancement of tumor growth after partial hepatectomy and the effect of the sera obtained from hepatectomized rats on tumor growth. *Jpn J Surg* 21: 669-675.
12. **ASCHOFF, J.** (1954). *Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik*. *Naturwissenschaften*. 41: 49-56.

13. **BADRÁN A.; CATALANO V. AND MORENO F.** (1993). Epidermic mitotic activity in normal and Es34 mammary carcinoma bearing mice. *Com Biol* 11: 152.
14. **BADRÁN A.; MORENO F. AND ECHAVE LLANOS J.** (1984). Liver regeneration in mice bearing a transplanted hepatoma. *Rev Esp Oncol* 31: 591-600.
15. **BADRÁN A.; MORENO F. AND ECHAVE LLANOS J.** (1986). Effect of the plasma of tumor bearing on liver growth. *Com Biol* 9: 133-142.
16. **BADRÁN A.; NASH R. AND ECHAVE LLANOS J.** (1971). Ultraestructure of STH cells of the pars distalis of the hypophysis of mice bearing transplanted hepatomas. *Z Zellforsch.* 118: 525-531.
17. **BAO P., KODRA A., TOMIC-CANIC M., GOLINKO M., EHRLICH H. AND BREM H.** (2009). The role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *J Surg Res.* Vol 153, Issue 2: 347-358.
18. **BARBASON H.; HERENS C.; ROBAYE B.; MILIS G.; SULON J.; BOUZAHZAK B. AND VAN CANTFORT J.** (1995). Importance of cell kinetics rhythmicity for the control of cell proliferation and carcinogenesis in rat liver. *In Vivo.* 9: 539-548.
19. **BARBEITO C.** (1999). Hepatectomía del portador de tumor: análisis de la evolución de la actividad mitótica normal y neoplásica. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. U.N.L.P.
20. **BARBEITO C.; ALBARENQUE S.; REYNA J.; FLAMINI M.; ANDRÉS LAUBE P. AND BADRÁN A.** (2002). Mitotic activity of the duodenal crypt enterocytes in mice transplanted with EA21A mammary carcinoma. *Cell Biol Int.* 26: 123-125.
21. **BARBEITO C.; GARCIA M.; FLAMINI M.; ANDRINI L. AND BADRÁN, A.** (2001). Effect of partial and sham hepatectomy on the growth of a hepatocellular carcinoma. *J Exp Cancer Res.* 20: 525-530.
22. **BARBEITO C.; GARCIA M.; SAVIGNONE C.; CATALANO V.; FLAMINI M.; BADRÁN A. AND MORENO F.** (1997). Mitotic activity of the epidermis, tongue, kidney convolute tubules and submaxillary gland epithelia in SS1K tumor bearing mice. *Ciencias Morfológicas.* 3: 9-18.

23. **BARBEITO C.; MORENO F. AND BADRÁN A.** (1995). Mitotic activity evolution of the acidophilic cells from the pars distalis of 14 days old male mouse. *Ciencias Morfológicas*. 1: 25-32.
24. **BARBEITO C.; SAVIGNONE C.; BADRÁN A. AND MORENO F.** (1996). Hepatocytic mitotic activity of 14 days female mice. *Com Biol*. 14: 291.
25. **BATTIFORA H.; ALSABEH R. AND JENKINS K.A.** (1995) Epitoperetrieval (unmasking) in immunohistochemistry. *Adv Pathol Lab Med* 8: 101-118.
26. **BECK L.; AMMAN A.; AUFDEMORTE T.; DEGUZMAN L.; XU Y.; LEE W.; MCFATRIDGE L. AND CHEN T.** (1997). In vivo induction of bone by recombinant human transforming growth factor beta1. *J Bone Miner Res*. 6: 961-967.
27. **BERHINGER R.** (1994). The in vivo roles of mullerian-inhibiting substance. *Cur Top Dev Biol* 29: 171-187.
28. **BETSHOLTZ C.; KARLSSON L. AND LINDAHL P.** (2001) Developmental roles of platelet-derived growth factors. *Bioessays*. 23:494-507.
29. **BEYER H.; STANLEY M. AND THEOLOGIDES A.** (1990). Tumor necrosis factor alfa increases hepatic DNA and RNA and hepatocytic mitosis. *Biochem Int* 22: 405-410.
30. **BOCKHORN M., GORALSKI M., PROKOFIEV D., DAMMANN P., GRUNEWALD P., TRIPPLER M., BIGLARNIA A., KAMLER M., NIEHUES E., FRILLING A., BROELSCH C. AND SCHLAAK J.** (2007). VEGF is Important for Early Liver Regeneration After Partial Hepatectomy. *J Surg Res*. Vol 138, Issue 2: 291-299.
31. **BOCKHORN M.; SCHÓLLMANN S.; OPITZ B.; SOTIROPOULOS G.; SHEU S.; NIEHAUS E.; TRIPPLER M.; FRILLING A., BROELSCH C. AND SCHLAAK J.** (2007). Vascular endothelial growth factor does not improve liver regeneration and survival after 90% subtotal liver resection. *Hepatology Research* 37; 353-359.
32. **BROACH J. AND LEVINE A.** (1997). Oncogenenes and cell proliferation. *Curr Op in Genet Dev*. 7: 1-6.
33. **BROOKS R.; FANTES P.; HUNT T. AND WHEATLEY D.** (1989). The cell cycle. *J Cell Sci Supp* 12: 1-7.

34. **BRUES A.; DRURY D. AND BRUES M.** (1936). A quantitative study of cell growth in regenerating liver. *Arch Pathol* 22: 658-673.
35. **BUCK M.; HOUGLUM K. AND CHOJKIER M.** (1996). Tumor necrosis factor-alfa inhibits collagen alfa1 gene expression and wound healing in a murine model of caquexia. *Am J Pathol* 149: 195-204.
36. **BYSOVA T.; GOLDMAN C.; JANKAU J.; CHEN J.; CABRERA G.; ACHEN M.; STACKER S.; CARNEVALE K.; SIEMIONOW M.; DEITCHER S. AND DI CORLETO P.** (2002). Adenovirus encoding vascular endothelial growth factor-D induces tissue-specific vascular patterns in vivo. *Blood* 99, 4434-42.
37. **CAO Y., VEITONMAKI N., KEOUGH K., CHENG H., LEE L. AND ZURAKOWSKI D.** (2000). Elevated levels of urine angiostatin and plasmonogen/plasmin in cancer patients. *Int J Mol Med*, 5: 547 – 551.
38. **CARDINALI D.** (1988). Los relojes biológicos. *Ciencia Hoy*. 1: 11-19.
39. **CARMELIET P.** (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Med* 6: 389-395.
40. **CARSON D. AND RIBEIRO J.** (1993). Apoptosis and disease. *Lancet*, 341: 1251-1254.
41. **CATALANO V.; BARBEITO C.; SAVIGNONE C.; BADRÁN A. Y MORENO F.** (1996). Actividad mitótica del hígado y la lengua en el ratón portador de un carcinoma mamario injertado. *Anal Veter* 16: 18-22.
42. **CATTORETTI G.; PILERI S. AND PARRAVICINI C.** (1993). Antigen unmasking on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J. Pathol* 171: 83-98.
43. **CHIN D.; BOYLE G.; PARSONS M. AND COMAN W.** (2004). What is transforming growth factor-beta (TGF- β). *The British Association of Plastic Surgeons*. 57, 215-221.
44. **CONWAY E., COLLEN D. AND CARMELIE, P.** (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 49, 507-21.
45. **CROSS J.** (2001). Genes regulating embryonic and fetal survival. *Therigenology*. 55:193-207.
46. **CROSS M. AND DEXTER M.** (1991). Growth factors in development transformation and tumorigenesis. *Cell* 64: 271-280.

47. **DE PEYSER F.; JOBGEN E. AND PETRAVICIUS M.** (1961). Humoral accelerating effect of regeneration liver on distant tumor take and growth in rats. *Surg Forum*. 12: 149-150.
48. **DE ROBERTIS (h) E.; HIB J. Y PONZIO R.** (2005). *Biología celular y molecular de Eduardo D.P. De Robertis*. 15^o edición. Editorial: El Ateneo. Buenos Aires. ISBN: 950-02-0384-1
49. **DECKER K. AND OBOLENSKAYA M.** (1995). Cytokines, nitric oxide synthesis and liver regeneration. *J Gastroenterol and Hepatol*. 10: 12-17.
50. **DI STEFANO H. AND DIERMEIER H.** (1996). Effects of hypophysectomy and growth hormone on ploidy distribution and mitosis activity of rat liver. *Proc Soc Exp Biol Med*. 92: 590-594.
51. **DICKSON R. AND LIPPMAN M.** (1995). Growth factors in breast cancer. *Endocr Rev*. 16: 559-589.
52. **DIELH A. AND RAI R.** (1996). Regulation of liver regeneration by pro-inflammatory cytokines. *J Gastroenterol Hepatol*. 11: 466– 470.
53. **DUFOUR J. AND CLAVIEN P.** (2010). VEGF Signaling. Signaling pathways in liver diseases. 10.1007/978-3-642-00150_28. 421-437
54. **DUNLAP J.** (1993). Genetic analysis of circadian clocks. *Annu Rev Physiol*. 55: 683-728.
55. **ECHAVE LLANOS J.** (1967). Experimental sources of variation in the study of liver regeneration. *Epatologia*. 13: 117-132.
56. **ECHAVE LLANOS J. AND BADRÁN A.** (1963). 24-hour rhythm in the mitotic activity of a grafted mammary carcinoma in female C3H/Mza mice on normal and inverted lighting regimens. *J Roy Micr Soc* 82: 75-80.
57. **ECHAVE LLANOS J. Y SAFFE I.** (1962). Acción de la regeneración hepática sobre la incidencia y características de los hepatomas espontáneos en ratones C3H Mza machos. *Rev Arg Cancerol* 4: 1-6.
58. **ECHAVE LLANOS J.; ALOISSO M.; SOUTO M.; BALDUZZI R. AND SURUR J.** (1971). Circadian variations of DNAs, mitotic activity and cell size of hepatocyte population in young immature male mouse growing liver. *Virchows Arch Zeelpathol* 8: 309-317.
59. **ECHAVE LLANOS J.; BADE E. AND BORDIN C.** (1963). Standardization for periodicity analysis and scatter of values in the study of hepatic regeneration. *Acta Physiologica Latino Americana*. 13: 385-387.

60. **ECHAVE LLANOS J.; BADRÁN A. AND MORENO F.** (1986). Inhibiting effect of a hematoma extract on the mitotic rate of regenerating liver. *Virchows Arch (Cell Pathol)* 51: 17-27.
61. **ECHAVE LLANOS J.; GOMEZ DUMM C. AND NESSI A.** (1971). Ultraestructure of STH cells of the pars distalis of the hypophysis of hepatectomized mice. *Zellforsch* 113: 29-38.
62. **ECHAVE LLANOS J.; MORENO F. AND BADRÁN A.** (1985). The growth of hepatocytes and sinusoid litoral cells during liver regeneration. *Com Biol* 4: 151-158.
63. **ENSOLI B., SGADARI C., BARILLARI^A G. AND MONINI^A P.** (2003). The fibroblast growth factors. *The Cytokine Handbook (Fourth Edition)*, Pages 747-781
64. **ERRECALDE A.** (1994). Especificidad de población celular de las variaciones de actividad mitótica ante la acción de factores titulares y plasmáticos. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Médicas. U.N.L.P.
65. **ERRECALDE A. AND ECHAVE LLANOS J.** (1993). Effect of Es2 tumor extract and plasma tumor bearing animals on the mitotic activity of the enterocytes of young mice. *J Exp Clin Cancer Res* 12: 75-79.
66. **ERRECALDE A.; GARCIA A.; INDA A. AND BADRÁN A** (1998). G2 restriction point within populations of hepatocytes and tongue keratinocytes in young growing mice. *Cell Biol Int* 22: 359-362.
67. **ERRECALDE A.; INDA A.; GARCÍA A. Y BADRÁN A.** (1996). Células ciclantes y no ciclantes. *Ciencias Morfológicas de La Plata*, Año 2, Volumen II, N° 3, 31-38.
68. **ERRECALDE A; INDA A. Y GARCÍA A.** (1995). Ritmos circadianos en la proliferación celular. *Ciencias Morfológicas*, 1, 33-39.
69. **FAUSTO N.; CAMPBELL J. AND RIEHLE K.** (2006). Liver regeneration. *Hepatology*, Vol.43, N° 2, Suppl 1.
70. **FERGUSON E.** (1996). Conservation of dorsal-ventral patterning in arthropods and chordates. *Curr Opin Genet Dev.* 6: 424-431.
71. **FERRARA N.** (2001). Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 280: C1358 - C1366.

72. **FERRARA N.** (2003). Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical progress. *Endocrine Reviews* 25(4): 581-611.
73. **FERRARA N.** (2010). Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 21: 21-26.
74. **FERRARA N. AND DAVIS-SMYTH T.** (1997.) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Rev.* 18: 4 - 25.
75. **FLAMINI M.; GONZALEZ N.; BARBEITO C.; BADRÁN A. AND MORENO F.** (1996). Estudio sobre un factor de origen tumoral estimulante de la mitosis hepatocítica. *Anal Veter* 16: 14-17.
76. **FOLKMAN J.** (1971). Tumor Angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285: 1182 – 1186.
77. **FUJITO J.; MARINO M.; WADA H.; JUNGLUTH A.; MACKRELL P.; RIVADENEIRA D.; STAPLETON P. AND DALY J.** (2001). Effect of TNF gene depletion on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Surgery* 129: 48-54.
78. **FURNUS C.; INDA A.; ANDRINI L.; GARCIA M.; GARCIA L.; BADRÁN A. AND ERRECALDE A.** (2003). Chronobiology of the proliferative events related to angiogenesis in mice liver regeneration after partial hepatectomy. *Cell Biol Int.* 27: 383-386.
79. **GARCÍA M.** (2005). Estudio de la síntesis de ADN de poblaciones celulares hepáticas, duodenales, linguales y del tumor ES12a en ratones. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP.
80. **GARCÍA M.; BARBEITO C.; ANDRINI L. AND BADRÁN A.** (2001). Circadian rhythm of DNA synthesis and mitotic activity in tongue keratinocytes. *Cell Biol Int.* 25: 179-183.
81. **GARCÍA-OLIVAS R.; VILARÓ S.; REINA M. AND CASTEL S.** (2007). PDGF-stimulated cell proliferation and migration of human arterial smooth muscle cells. Colocalization of PDGF isoforms with glycosaminoglycans. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 1915-1929.
82. **GATELY S.; TWARDOWSKI P.; STACK M.; PATRICK M.; BOGGIO L.; CUNDIFF D.; SCHNAPER H.; MADISON L.; VOLPERT O.; BOUCK N.; ENGHILD J.; KWAAN H. AND SOFF G.** (1996). Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human

- plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin. *Cancer Res* 56: 4887 – 4890.
83. **GATTONE V.; SHERMAN D.; HINTON D.; FU-WEN N.; TOPHAM, R. AND KLEIN R.** (1992). Epidermal growth factor in the neonatal mouse salivary gland and kidney. *Biol Neonate* 61: 54-67.
84. **GENESER F.** (2000). *Histología*. Tercera edición. Ed: Médica Panamericana.
85. **GOMEZ DUMM C. AND ECHAVE LLANOS J.** (1971). Ultrastructure of circulatory changes in the pars distalis of the hypophysis of hepatectomized mice. *Virchows Arch Zellpathol.* 8: 179-185.
86. **GORDON K. AND BLOBE G.** (2008). Role of transforming growth factor- β superfamily signaling pathways in human disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1782, 197-228.
87. **GRUENEWALD F., PROTA A., GIESE A. AND BALLMER-HOFER K.** (2010). Review “Structure-function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in Angiogenic Signaling”. *Biochimica et Biophysica Acta* 1804. 567-580.
88. **GSCHWIND A., FISCHER O. AND ULLRICH A.** (2004). The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4, 361.
89. **HALBERG F.** (1957). Young NH-mice for the study of mitosis in intact liver. *Experientia.* 13: 502-505.
90. **HALBERG F.; PETERSON R. AND SILBER R.** (1959). Relation of twenty four hour periodicities in blood corticosterone, mitosis in cortical adrenal parenchyma and total body activity. *Endocrinology.* 64: 222-230.
91. **HARALSON M.** (1993). Extracellular matrix and growth factors: an integrated controlling tissue repair and progression to disease. *Lab Inv* 4: 369-372.
92. **HARTWELL L. AND KASTAN M.** (1994). Cell cycle control and cancer. *Science.* 266: 1821-1824.
93. **HARTWELL L. AND WEINERT T.** (1989). Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science.* 246: 629-634.

94. **HASTINGS J.; RUSAK B. AND BOULOS Z.** (1991). Circadian rhythms: the physiology of biological timing. En: *Neural and Integrative Animal Physiology*. C. L. Ed: Prosser. New York, Wiley-Liss, Inc. 435-546.
95. **HERENS, C.; BOUZHARAH B. AND BARBASON H.** (1998). Mitotic control in rat hepatocarcinogenesis: the genetic effects. En: *Biological clocks mechanism and applications*. Ed: Tovitov, Y. Elsevier Science B.V.
96. **HORI K.; ZHANG Q.; LI H.; SAITO S. AND SATO, Y.** (1996). Timing of cancer chemotherapy based on circadian variations in tumor tissue blood flow. *Int J Cancer*. 26: 360-364.
97. **INDA A.; ANDRINI L.; GARCÍA M.; GARCÍA A.; FERNÁNDEZ BLANCO A.; FURNUS C.; GALLETI S.; PRAT G. AND ERRECALDE A.** (2007). Evaluation of angiogenesis with the expresión of VEGF and CD34 in human non-small cells lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 26, 3.
98. **INDA A.; GARCÍA A. AND ERRECALDE A.** (1996). G2 Population in Mouse Duodenum. *J Exp Clin Cancer Res.*, 15, 1.
99. **INDA A.; GARCIA A.; ERRECALDE A. AND BADRAN A.** (1997). Effect of Tissue and Plasma plasma factors on kidney proliferation. *Biocell* 21(1): 13-18.
100. **INDA A., GARCÍA M., ANDRINI L., GARCÍA A., FERNANDEZ BLANCO A., FURNUS C., GALLETI S., BRANDONI J., MARTINEZ J., PRAT G. AND ERRECALDE A.** (2009). Evaluation of angiogenesis with the expression of VEGF-C and CD34 in human colon cancer. *Current Chemical Biology*, Vol 3 (3): 302 – 305.
101. **ISHIKAWA K.; MOCHIDA S.; MASHIBA S.; INAO M.; MATSUI A.; IKEDA H.; ONO A.; SHIBUYA M. AND FUJIWARA K.** (1999). Expression of vascular endothelial growth factor in nonparenchymal as well as parenchymal cells in rat liver after necrosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 254: 587 - 593.
102. **JIANG W., MARTIN T.; PARR C.; DAVIES G.; MATSUMOTO K. AND NAKAMURA T.** (2005). "Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies". *Critical Reviews in Oncology Hematology* 53, 35-69.
103. **JONES J. AND CLEMONS D.R.** (1995). Insuline-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*. 16: 3-34.

104. **JONES, S.M. AND KAZLAUSKAS, A.** (2001). Growth factor-dependent signaling and cell cycle progression. *FEBS Letters*. 490:110-16.
105. **KAMBA T., TAM B.; HASHIZUME H.; HASKELL A.; SENNINO B.; MANCUSO M.; NORBERG S.; O'BRIEN S.; DAVIS R.; GOWEN L.; ANDERSON K.; THURSTON G.; JOHO S.; SPRINGER M.; KUO C. AND MCDONALD D.** (2006). VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ. Physiol*. 290, H560-576.
106. **KARAMYSHEVA A.** (2008). Mechanisms of Angiogenesis. *Biochemistry (Moscow)*. Vol. 73, N° 7 751-762.
107. **KIMURA K.; SAKAIDA I.; TERAJ S.; MATSUMURA Y.; UCHIDA K. AND KIWAMU O.** (1997). Inhibition of tumor necrosis factor – alfa production retards the liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 231: 557–560.
108. **KIMURA K.; BOWEN C.; SPIEGEL S. AND GELMANN E.** (1999). Tumor necrosis factor-alpha sensitizes prostate cancer cells to gamma-irradiation induced apoptosis. *Cancer Res*. 59: 1606-1614.
109. **KONNO H.** (1999). Antitumor effect of the angiogenesis inhibitor TNP-470 on human digestive organ malignancy. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 43 suppl S85 – S89.
110. **KOYANAGI S.; KURAMOTO Y.; NAKAGAWA H.; ARAMAKI H.; OHDO S.; SOEDA S. AND SHIMENO H.** (2003). A molecular mechanism regulating circadian expression of vascular endothelial growth factor in tumor cells. *Cancer Research* 63, 7277-72883.
111. **KRAIZER Y.; MAWASI N.; SEAGAL J.; PAIZI M.; ASSY N. AND SPIRA G.** (2001). Vascular endothelial growth factor and angiopoietin in liver regeneration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 287, 209-215.
112. **LABORDA J.** (2000). The role of the Epidermal Growth Factor-like protein dlk in cell differentiation. *Histol Histopathol*.15:119-129.
113. **LACONI E.** (2000). Differential growth: from carcinogenesis to liver repopulation. *Am J Pathol*. 156: 389-392.

114. **LAHAM R. AND SIMONS M.** (1999). Therapeutic angiogenesis in myocardial ischemia. In: Angiogenesis and cardiovascular disease, Simons WA (ed.) Oxford University Press. 175 - 193.
115. **LAMSZUS K.; FUCHS A.; SHI E.; CHOWDHURY S.; YAO Y.; POLVERINI P.; LATERRA J.; GOLDBERG I. AND ROSEN E.** (1997). Scatter factor stimulates tumor growth and angiogenesis in human breast cancer in the mammary fat pads of nude mice. *Lab. Invest.* 76: 339 – 353.
116. **LANGMAN** (Sadler, W) *Embriología Médica. Con orientación clínica.* 9ª. Edición: Médica Panamericana, 2004.
117. **LASKEY R.; FAIRMAN M. AND BLOW J.** (1989). S phase of the cell cycle. *Science.* 246: 609-614.
118. **LAU A.; SHOU W.; GUO Q. AND MATZUK M.** (1997). Transgenic Approacheds to study the functions of the transforming growth factor-beta superfamily members. En: *Inhibin activin and follistatin regularory functions in system and cell biology.* Ed: Aono, T.; Sugino, H. and Vale, W. 222-243.
119. **LEE J.** (1971). Effects of partial hepatectomy in rats on two transplantable hepatomas. *Am J Pathol.* 65: 347-356.
120. **LEE S.; CHEN T.; BARBER C.; JORDAN M., MURDOCK J.; DESAI S.; FERRARA N.; NAGY A.; ROOS K. AND IRUELA-ARISPE M.** (2007). Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell* 130, 691-703.
121. **LEVI J. AND ZEPPA R.** (1972). The response of normal rat hepatocyte when exposed to humoral (regenerating) factor. *J Surgical Res.* 12: 114-119.
122. **LEWIN B.** (2001). *Genes VII.* Marbán, libros. Madrid.
123. **LI B.; SHARPE E.; MAUPIN A.; TELERON A.; PYLE A.; CARMELIET P. AND YOUNG P.** (2006). VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumour neovascularization. *Faseb J* 20, 1495-7.
124. **LIEKENS S.; DE CLERQ E. AND NEYTS J.** (2001). Angiogenesis regulators and clinical applications. *Biochem. Pharmacol.* 61: 253 - 270.
125. **LODISH H.; BERK A.; ZIPURSKY S.; MATSUDAIRA P.; BALTIMORE D. AND DARNELL J.** (2002). *Biología celular y molecular.* IV Edición. Ed: Médica Panamericana.

126. **LOHELA M.; BRY M.; TAMMELA T. AND ALITALO K.** (2009). VEGFs and receptors involved in angiogenesis versus lymphangiogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* 21: 154-165.
127. **LOVELAND K. AND SCHLATT S.** (1997). Stem cell factor and c-kit in the mammalian testis: lessons originating from mother nature's gene knockouts. *J Endocrinol.* 153: 337-344.
128. **LYONS J.; SCHWIMER J.; ANTHONY C.; THOMSON J.; CUNDIFF J.; CASEY D.; MACCINI C.; KUCERA P.; WANG Y.; BOUDREAUX J. AND WOLTERING M.** (2010). The role of VEGF pathways in human physiologic and pathologic angiogenesis. *Journal Surgical Research* 159, 517-527.
129. **MARDSEN E.; HU Z.; FUJIO K.; THORGERSSON S. AND EVARTS, R.** (1992). Expression of acidic fibroblast growth factor in regenerating liver and during hepatic differentiation. *Lab Inv.* 67: 427-433.
130. **MARTÍN C. AND BADRÁN A.** (1998). Evaluation of antibody cross-reactivity in mouse tissues: study of a panel of antibodies reacting to human antigens. *Appl Immunohistochem.* 6 (2): 84-88.
131. **MARTÍN C.; SURUR J.; GARCÍA M. AND BADRÁN A.** (2000). DNA synthesis and nucleolar organizer regions circadian rhythm in mouse regenerating liver hepatocytes. *Biocell.* 24: 151-155.
132. **MARX J.** (1986). The Ying and Yang of the cell growth control. *Science.* 232: 1094-1095.
133. **MARX J.** (1988). Autocrine growth factors and cancer. *Nature.* 313: 745-747.
134. **MARX J.** (1993). How p53 suppresses cell growth. *Science.* 262: 1644-1645.
135. **MASUDA Y.; SHIMIZU A.; MORI T.; ISHIWATA T.; KITAMURA H.; OHASHI R.; ISHIZAKI M.; ASANO G.; SUGISAKI Y. AND YAMANAKA N.** (2001). Vascular endothelial growth factor enhances glomerular capillary repair and accelerates resolution of experimentally induced glomerulonephritis. *Am J Pathol.* 159: 599 - 608.
136. **MASUHARA M.; YASUNAGA M.; TANIGAWA K.; TAMUTA F.; YAMASHITA S.; SAKAIDA I. AND OKITA, K.** (1996). Expression of hepatocyte growth factor, transforming growth factor alpha and transforming

- growth factor beta1 messenger RNA in various human liver diseases and correlation with hepatocyte proliferation. *Hepatology*. 24: 323-329.
137. **MATSUMOTO K. AND NAKAMURA T.** (1992). Hepatocyte growth factor: molecular structure roles in liver regeneration and other biological functions. *Crit Rev Oncog*. 3: 27-54.
138. **MATSUMOTO K. AND NAKAMURA T.** (2001). Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney int*. 59:2023-2038.
139. **MC INTOSH J. AND KOONCE M.** (1989). Mitosis. *Science*. 246: 622-628.
140. **MEAD J. AND FAUSTO N.** (1989). TGFalfa may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86: 1558-1562.
141. **MEDIGRECENEAU F.** (1910). On the relative sizes of the organs of rats and mice bearing new growths. *Proc Roy Soc. (London), serie B*. 82: 286-291.
142. **MENDELSON, J. AND BASELGA J.** (2003). Status of Epidermal Growth Factor Receptor Antagonists in the Biology and Treatment of Cancer. *J Clin Oncol*. 21: 2787-2799.
143. **MICHALOPOULOS G.** (2009). Liver regeneration: Alternative epithelial pathways. *Int J Biochem Cell Biol*, doi: 10.1016/j.biocel.2009.09.014. Article in press.
144. **MICHALOPOULOS G. AND DEFRANCES M.** (2005). Liver regeneration. *Adv. Biochem Engin/Biotechnol* 93: 101-134.
145. **MICHALOPOULOS G. AND ZARNEGER R.** (1992). Hepatocytic growth factor. *Hepatology*. 15: 149-155.
146. **MOCHIDA S.; ISHIKAWA K.; INAO M.; SHIBUYA M. AND FUJIWARA K.** (1996). Increased expression of vascular endothelial growth factor and its receptors, flt-1 and KDR/flk-1, in regenerating rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 226 (1):176 –9.
147. **MOORE-EDE M.; CZEIESLER C. AND RICHARDSON G.S.** (1983). Circadian timekeeping in health and disease. Part 1: Basic properties of circadian pacemakers. *N Eng J Med*. 8: 169-176.
148. **MORENO C.; FISCHER F. Y MENNA-BARRETO L.** (1997). Aplicaciones de la cronobiología. En: *Cronobiología. Principios y aplicaciones*. Cap. 12.

- Ed: Marques, N.; Menna-Barreto, L. Y Golombek, D.A. Editorial Universitaria de Buenos Aires.
149. **MORENO F.** (1984). Ensayo de efectos promotores e inhibidores con extractos totales de hepatomas injertados sobre el crecimiento del hígado. Trabajo de Tesis para obtener el Título de Doctor en Medicina.
 150. **MORENO F.; BADRÁN A. AND ECHAVE LLANOS J.** (1985). Mitotic activity of a fast and a slow growing hepatocarcinomas during liver regeneration in the host. *Com Biol.* 4: 409-416.
 151. **MORENO F.; BARBEITO C.; BADRÁN A. AND ECHAVE LLANOS J.** (1992). Proliferation of pituitary adenocytes on ES2 tumor-bearing mice. *Com Biol.* 1: 336.
 152. **MORENO S.** (1992). Así comienza la mitosis. *Investigación y ciencia.* Abril: 62-69.
 153. **MROSOVSKY N. AND SALMON P.** (1990). Triazolam and phase-shifting acceleration reevaluated. *Chronobiol. Int.* 7: 35-41.
 154. **MURPHY G.; STANTON H.; COWELL S.; BUTLER G.; KNAUPER V.; ATKINSON S. AND GAURILOVIC J.** (1999). Mechanisms for pro matrix metalloproteinases activation. *APMIS* 107: 38 - 44.
 155. **MURRAY A. AND KIRSCHNER M.** (1989). Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature.* 339: 275-280.
 156. **MURRAY A. AND KIRSCHNER M.** (1989). Dominoes and Cloks: the union of two views of the cell cycle. *Science.* 246: 614-621.
 157. **MURRAY A. AND KIRSCHNER M.** (1991). What controls the cell cycle. *Sci Am.* March: 34-41.
 158. **NAKAMURA M. AND NISHIDA T.** (1999) Differential effects of epidermal growth factor and interleukin 6 on corneal epithelial cells and vascular endothelial cells. *Cornea* 18: 452 – 458.
 159. **NISHIDA M.; MISHAGAWA J.; YAMASHITA S.; HIGASHIYAMA S.; NAKATA A.; OUCHI N.; TAMURA R.; YAMAMORI K.; KIHARA S.; TANIGUCHI N. AND MATSUZAWA Y.** (2000). Localization of CD9, and enhancer protein for proheparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, in human atherosclerotic plaques: possible involvement of juxtacrine growth mechanism on smooth muscle cell proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc.* 20: 1236 – 1243.

160. **NISSEN N.; POLVERINI P.; KOCH A.; VOLIN M.; GARNELLI R. AND DI PIETRO L.** (1998). Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol.* 152: 1444 - 1452.
161. **O' FARREL P.; EDGARD B.; LAKICH D. AND LEHNER C.** (1989). Directing cell division during development. *Science.* 246: 635-640.
162. **OGAWA K.; KUROHMARU M.; SHIOTA K.; TAKASHI M.; NISHIDA T. AND HAYASHI Y.** (1991). Histochemical localization of inhibin and activin alfa, betaA and betaB subunits in rat gonadas. *J Vet Med Sci,* 53: 207-212.
163. **OHTA Y.; SHRIDHAR V.; BRIGHT K.K.; KALEMKERIAN G.P.; DU W., CARBONE M.; WATANABE Y. AND PASS H.I.** (1999). VEGF and VEGF type C play an important role in angiogenesis and lymphangiogenesis in human malignant mesotelioma tumors. *Br J Cancer* 8: 54 – 61.
164. **ONO M.; TANAKA N. AND ORITA K.** (1986). Complete regression of mouse hepatoma transplanted after partial hepatectomy and the immunological mechanism of such regression. *Cancer Res* 46: 5049-5053.
165. **OTTINO A. AND ECHAVE LLANOS J.** (1990). Efecto inhibitor del extracto de hepatocarcinoma transplantado SS1k y del plasma de los portadores sobre la actividad mitótica de los hepatocitos y células tumorales del hígado del ratón joven. *Patología (Mex.).* 28:155-160.
166. **PAIK J.; LEE J.Y. AND HWANG D.** (2002) Signaling pathways for TNF α -induced COX-2 expression: mediation through MAPkinases and NF κ B, and inhibition by certain nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Adv Exp Med Biol.* 507:503-508.
167. **PARDEE, A.** (1989). G1 Events and regulation of cell proliferation. *Science.* 246: 603-608.
168. **PARR C. AND JIANG W.G.** (2001). Hepatocyte Growth Factor activators, inhibitors and antagonists and their implication in cancer intervention. *Histol Histopathol.* 16:251-268.
169. **PASCHE B.** (2001). Role of Transforming Growth Factor β in cancer. *J Cell Physiol.* 186:153-168.
170. **PEREZ TOMAS R., MAYOL X., CULLERE X., RUIZ DIAZ C. AND DOMINGO J.** 1992. Transforming growth factor alpha expression in rat experimental hepatocarcinogenesis. *Histol Histopathol.* 7: 457-462.

171. **PITTENDRIGH C.** (1965). On the mechanism of the entrainment of a circadian clock by light cycles. En: *Circadian Clocks*. Ed: J. Aschoff. Amsterdam, North-Holland Publ. Co. 277-297.
172. **PLATE K.** (2001). From angiogenesis to lymphangiogenesis. *Nature Med.* 7:151-152.
173. **RAFII S. AND LYDEN D.** (2003). Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 9, 702-12.
174. **REUBER M.** (1966). Histopathology of transplantable hepatic carcinoma induced by chemical carcinogens in rats. *Gann Morphographs.*, 1: 43 – 54.
175. **REYNA J.; BARBEITO C., MORENO F. Y BADRÁN A.** (1997). Actividad mitótica de los enterocitos de las criptas duodenales en ratones portadores del tumor ES12a. *Medicina (Bs. As.).* 57: 708-712.
176. **REYNAERT H.; CHAVEZ M. AND GEERTS A.** (2001). Vascular endothelial growth factor and liver regeneration. *Journal of Hepatology* 34: 759-761.
177. **RIBATTI D.** (2009). Endogenous inhibitors of angiogenesis. A historical review. *Leukemia Research* 33; 638-644.
178. **ROFSTAD E. AND DANIELSEN T.** (1999). Hypoxia-induced metastasis of human melanoma cells: involvement of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Br. J. Cancer* 80: 1697 – 1707.
179. **ROSEN C.; DONAHUE L. AND HUNTER S.** (1994). Insuline-like growth factor and bone: the osteoporosis connection. *P.S.E.B.M.* 206: 567-572.
180. **ROSENE G.** (1968). Alteration of tumor cell and hepatic parenchymal cell mitotic rates in tumor-injected partially hepatectomized mice. *Cancer Res.* 28: 1469-1477.
181. **ROSKOSKI Jr. R.** (2008). VEGF receptor protein-tyrosine kinases: Structure and regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 375, 287-291.
182. **ROY H., BHARDWAJ S. AND YLÄ-HERTTUALA S.** (2006). Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Letters* 580, 2879-2887.
183. **RUSSELL W.; COFFEY R.; OUELETTE A. AND MOSES, H.** (1988). Type beta TGF reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85: 5126-5130.

184. **SCHEVING L.; TSAI T. AND SCHEVING L.** (1987). Circadian-dependent response in DNA synthesis to epidermal growth factor in spleen, bone marrow, and lung and mitotic index of corneal epithelium in ad-libitum fed and fasted CD2F1 mice. *Prog Clin Biol Res.* 227: 181-191.
185. **SCHIBLER U.** (2003). Liver regeneration clock on. *Science.* 302: 234-235.
186. **SCOTT GOUSTIN A.; LEGF E.; SHIPLEY G. AND MOSES H.** (1986). Growth factors and cancer. *Cancer Res.* 46: 1015-1029.
187. **SELL S. AND KNOLL B.** (1992). Transgenic mouse models of hepatocarcinogenesis. En: *The role of cell types in hepatocarcinogenesis.* Ed: Sirica, A.E. 300-321.
188. **SENGER D.; GALLI S.; DVORAK A.; PERRUZZI C.; HARVEY V. AND DVORAK H.** (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983-5.
189. **SHARMA P.; RAJALINGAM D.; KUMAR T AND SINGH S.** (2008). A light scattering study of the interaction of fibroblast growth factor (FGF) with its receptor. *Biophysical Journal: Biophysical Letters*, L71-L73.
190. **SHEIBANI N. AND FRAZIER W.** (1999). Thrombospondin-1, PECAM-1 and regulation of angiogenesis. *Histol Histopathol.*, 14: 285 – 294.
191. **SHERR C.** (1996). Cancer cell cycles. *Science.* 274: 1672-1677.
192. **SHI S.; KEY M. AND KALRA K.** (1991). Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Citochem.* 39: 741-748.
193. **SHIBUYA M.** (1995) .Role of VEGF-flt receptor system in normal and tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res.* 67: 281 - 316.
194. **SHIBUYA M.** (2008). Vascular endothelial growth factor-dependent and independent regulation of angiogenesis. *BMB Reports.* Apr 30; 4 1 (4) 278-286. Mini Review.
195. **SHIMIZU H., MIYAZAKI M., WAKABAYASHI Y., MITSUHASHI N., KATO A., ITO H., NAKAGAWA K. , YOSHIDOME H., KATAOKA M. AND NAKAJIMA N.** (2001). Vascular endothelial growth factor secreted by replicating hepatocytes induces sinusoidal endothelial cell proliferation during regeneration after hepatectomy in rats. *Journal of Hepatology* 34, 683-689.

196. **SILVESTRE J.; TAMARAT R.; EBRAHIMIAN T.; LE-ROUX A.; CLERGUE M.; EMMANUEL F.; DURIEZ M.; SCHWARTZ B.; BRANELLEC D. AND LEVY B.** (2003). Vascular endothelial growth factor-B promotes in vivo angiogenesis. *Circ Res* 93, 114-23.
197. **SIZIKOV A.** (1979). Liver regeneration in tumor-bearing animals under the action of x-ray radiation. *Vopr Onkol.* 25: 47-51.
198. **SMOLENSKY M. AND REINBERG A.** (1990). Clinical chronobiology: relevance and applications to the practice of occupational medicine. En: *Shifwork. Occupational Medicine: State of Art Reviews.* Ed: A.J. Scott. 5: 239-272.
199. **SONNTAG W.; LYNCH C.; THORNTON P.; KHAN A.; BENNET S. AND INGRAM R.** (2000). The effects of growth hormone and IGF-1 deficiency on cerebrovascular and brain aging. *J Anat.* 97: 577-585.
200. **SPORN M. AND ROBERTS A.** (1988). Peptide growth factors are multifunctional. *Nature.* 332: 217-218.
201. **STEARNS M.; GARCÍA F.; FUDGE K.; RHIM J. AND WANG M.** (1999). Role of interleukin 10 and transforming growth factor beta 1 in the angiogenesis and metastasis of human prostate primary tumor lines from orthotopic implants in severe combined immunodeficiency mice. *Clin Cancer Res.* 5: 711 – 720.
202. **STELLER H.** (1995). Mechanism and genes of cellular suicide. *Science,* 267: 1445-1449.
203. **STERN L., FALCONE R.; KEMP C.; BRAUN M.; ERWIN C. AND WARNER B.** (2000). Salivary Epidermal Growth Factor and intestinal adaptation in male and female mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 278:G871-877.
204. **SUN J.; TOSHINORI I. AND ZHANG F.** (1996). Enhancement of tumor growth after partial hepatectomy and blood transfusion. *Chung hua Shung Liu Tsa Chic.* 18: 113-115.
205. **SURUR J.; MORENO F.; BADRÁN A. AND ECHAVE LLANOS J.** (1985). Variations in DNS synthesis and mitotic indices in hepatocytes and sinusoid litoral cells of adult intact male mouse along a circadian time span. *Chronobiol Int.* 2: 161-168.

206. **TAMMELA T.; ENHOLM B.; ALITALO K. AND PAAVONEN K.** (2005). The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 65, 550-63.
207. **TANIGUCHI E.; SAKISAKA S.; MATSUO K.; TANIKAWA K. AND SATA M.** (2001). Expression and role of vascular endothelial growth factor in liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Histochem Cytochem.* 49: 121 - 130.
208. **TARLÁ M.; RAMALHO F.; ZAMBELLI RAMALHO L.; CASTRO e SILVA T.; FERRACIOLI BRANDAO D.; FERREIRA J.; CASTRO e SILVA O. AND ZUCOLOTOS.** (2006). A molecular view of liver regeneration. *Acta Cir Bras.* 21 Suppl 1.
209. **THOMPSON N.; MEAD J.; BRAUN L.; GOYETTE M.; SHANK P. AND FAUSTO N.** (1986). Sequential protooncogene expression during rat liver regeneration. *Cancer Res.* 46: 3111-3117.
210. **TIZARD I.R** (1998). *Inmunología veterinaria.* Quinta edición. Ed: Interamericana Mc Graw-Hill. México.
211. **TSAI L.; LEES E.; FAHA B.; HARLOW E. AND RIABOWOL K.** (1993). The Cdk2 kinase is required for the G1 – to – S transition in mammalian cells. *Oncogen.* 8: 1593-1602.
212. **UEDA T.; USAMI M.; OYANAGI H. AND SAITO Y.** (1993). Experimental study of liver regeneration and tumor growth following partial hepatectomy. *Nippon Geka Gakkai Zasshi.* 94: 714-721.
213. **VAN DEN HEUVEL S. AND HARLOW E.D.** (1993). Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science.* 262: 2052-2053.
214. **VAN DER BILT J. AND BOREL RINKES L.** (2004). Surgery and angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1654, 95-104.
215. **VARTANIAN R. AND WEIDNER N.** (1996). Correlation of intratumoral endothelial cell proliferation with microvessel density (tumor angiogenesis) and tumor cell proliferation in breast carcinoma. *Am J Pathol.* 144: 1188-94.
216. **VERMEULEN P.; GASPARINI G.; FOX S.; TOI M.; MARTIN L.; McCULLOUGH P.; PEZZELLA F.; VIALE G.; WEIDNER N.; HARRIS A. AND DIRIX L.** (1996). Quantification of angiogenesis in solid Human tumors: an

- international consensus on methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer*. 32 A: 2474-84.
217. **VITATERNA M.; KING D.; CHANG D.; KORNHAUSER J.; LOWREY P.; MC DONALD D.; DOVE W.; PINTO L.; TUREK F. AND TAKAHASHI J.** (1994). Mutagenesis and mapping of a mouse gene clock essential for circadian behavior. *Science*. 264: 719-725.
218. **VON MARSCHALL Z.; CRAMER T.; HOCKER M.; FINKENZELLER G.; WIEDENMANN B. AND ROSEWICZ S.** (2001). Dual mechanism of vascular endothelial growth factor upregulation by hypoxia in human hepatocellular carcinoma. *Gut*. 48: 87 - 96.
219. **WALLACH D. AND KOVALENKO A.** (2009). 12th international TNF conference: the good, the bad and the scientists. *Cytokine & Growth Reviews* 20, 259-269.
220. **WALLIS M.** (2009). "New insulin-like growth factor (IGF)-precursor sequences from mammalian genomes: the molecular evolution of IGFs and associated peptides in primates" *Growth Hormone & IGF Research*. 19, 12-23.
221. **WILSON M. AND SINHA A.** (1997). Human prostate tumor angiogenesis in nude mice: metalloprotease and plasminogen activator activities during tumor growth and neovascularization of subcutaneously injected matrigel impregnated with human prostate tumor cells. *Anat. Rec.*, 249: 63 – 73.
222. **WOOD P. AND HRUSHESKY W.** (1996). Circadian timing of cancer chemotherapy. En: *Critical reviews in eukariotic gene expression*. 2^o edition. Ed: Willims and Wilkins. Baltimore. 177-202.
223. **WRIGHT N. AND ALISON M.** (1980). The metaphase arrest technique. A critical review. *Cell Tissue Kinet.*, 13: 643-663.
224. **XIN X.; YANG S.; INGLE G.; ZLOT C.; RANGELL L.; KOWALSKI J., SCHWALL R.; FERRARA N. AND GERRITSEN M.E.** (2001). Hepatocyte growth factor enhances vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro and in vivo. *Am. J. Pathol.* 158: 1111 - 1120.
225. **YEH E., LEW B. AND MEANS A.** (2006). The loss of PIN1 deregulates cyclin E and sensitizes mouses embryo fibroblasts to genomic instability. *J Biol Chem*. 281: 241-251.

- 226. YOSHIJI H.; KURIYAMA S.; YOSHI J.; YAMAZAKI M.; KIKUKAWA M.; TSUJINOUE H.; NAKATANI T. AND FUKUI, H. (1998).** Vascular endothelial growth factor tightly regulates in vivo development of murine hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology*. 28: 1489-1496.
- 227. ZENG F., SINGH A. AND HARRIS R. (2009).** “The role of the EGF family of ligands and receptors in renal development, physiology and pathophysiology”. *Experimental Cell Research* 315, 602-610.
- 228. ZINDY F; LAMAS E.; CHENIVERSE X.; SOBCJAK J.; WANG J.; FESQUET D.; HENGLEIN B. AND BRECHOT C.H. (1992).** Cyclin A is required in S phase in normal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 182: 1144-1154.