

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGIA

INFLUENCIA DE LA VAGOTOMIA EN LA

REGENERACION HEPATICA

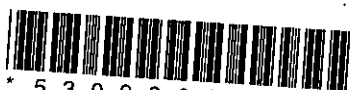
TESIS DOCTORAL

JOSE DANIEL SANCHEZ LOPEZ

Madrid, 1998

23459

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGIA



* 5 3 0 9 8 6 3 6 8 7 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

X-53-390662-2

INFLUENCIA DE LA VAGOTOMIA EN LA
REGENERACION HEPATICA

AUTOR: José Daniel Sánchez López

DIRECTORES : José Luis Balibrea Cantero
José Ignacio Landa García

Madrid, 1998



A Esperanza y Daniel

A mis padres y mis hermanos

"...y por robar el secreto del fuego a los Dioses del Olimpo y entregárselo a los hombres, Prometeo fue encadenado en el Monte Caúcaso y condenado a que un águila devorase su hígado; el hígado se regeneraba cada día, proporcionando alimento al águila y eterna tortura a Prometeo..."

MITOLOGIA GRIEGA



Prometeo

(perteneciente a la Trilogía "*Sísifo, Tántalo y Prometeo*"). TIZIANO, 1549

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de uno u otro modo han contribuido a la realización de este trabajo.

En primer lugar, al Profesor D. José Luis Balibrea Cantero, Catedrático de Cirugía de la Facultad de Medicina y Director del Departamento de Cirugía de la Universidad Complutense de Madrid, por aceptar la dirección de esta Tesis y por darme todas las facilidades para la consecución de la misma.

Al Dr. D. José Ignacio Landa García, Profesor Asociado de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense, codirector de esta Tesis, por su continua atención y estímulo, y por haberme brindado la oportunidad y los medios necesarios para la realización de este proyecto de investigación.

A ambos, mi más sincero agradecimiento por su esfuerzo en crear y mantener en todos nosotros el espíritu investigador, parte fundamental de nuestra práctica profesional.

A los Dres Alfredo Abad, Dionisio Ballesteros, Carlos Morales, Alfredo Ibarra y en especial al Dr. Juan Alcalde, a quienes debo mi formación como cirujano, por todos sus consejos y enseñanzas en el aspecto profesional y humano.

Al Dr. Luis Ortega, médico adjunto del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario "San Carlos", por su desinteresada colaboración en el estudio histológico de las piezas.

Al personal del Centro de Investigación Experimental del Hospital Universitario "12 de Octubre", por su valiosa ayuda en el cuidado de los animales durante la fase experimental.

A mis compañeros de residencia y a todos los miembros del Servicio de Cirugía General "A" del Hospital Universitario "12 de Octubre", con quienes inicié mi andadura en el camino de la Cirugía, por la amistad que me han brindado durante mis años de formación.

INDICE

INDICE

I.	INTRODUCCION	2
II.	OBJETIVOS	19
III.	REGENERACION HEPATICA: ESTADO ACTUAL	21
	<i>FACTORES REGULADORES DEL CRECIMIENTO HEPATICO</i>	<i>27</i>
	HGF	27
	EGF y TGF- α	30
	TNF- α e Interleukina-6	34
	<i>OTROS FACTORES DE CRECIMIENTO CON EFECTOS PARACRINOS</i>	<i>36</i>
	<i>NOREPINEFRINA</i>	<i>38</i>
	<i>INSULINA Y GLUCAGON</i>	<i>39</i>
	<i>OTRAS SUSTANCIAS</i>	<i>40</i>
	<i>PROTOONCOGENES</i>	<i>41</i>
	<i>GASTRINA</i>	<i>43</i>
	<i>SOMATOSTATINA</i>	<i>44</i>
IV.	MATERIAL Y METODOS	49
	<i>MATERIAL</i>	<i>49</i>
	Animales de experimentación	49
	<i>METODOS</i>	<i>53</i>
	Diseño experimental	53
	Protocolo preoperatorio y anestésico	53
	Protocolo quirúrgico	53
	Protocolo de cuidados postoperatorios	55
	Necropsia y extracción del remanente hepático y el estómago	56

Estudio histológico	57
Células G	57
Índice proliferativo	60
Análisis estadístico	66
Estadística descriptiva	66
Estadística analítica	66
V. RESULTADOS	68
<i>MORBIMORTALIDAD DEL EXPERIMENTO</i>	68
<i>POBLACION DE CELULAS G EN EL ANTRO GASTRICO</i>	69
<i>INDICE DE REGENERACION HEPATICA</i>	83
Regeneración hepática basal (hepatectomía parcial)	84
Regeneración hepática estimulada (hepatectomía total)	89
VI. DISCUSION	105
VII. CONCLUSIONES	131
VIII. BIBLIOGRAFIA	133

I. INTRODUCCION

INTRODUCCION

El fenómeno de la regeneración hepática , presumiblemente un mecanismo evolutivo para proteger a los animales de los resultados catastróficos de las lesiones hepáticas producidas por las toxinas alimentarias, ha sido objeto de curiosidad durante muchos años. Los antiguos griegos reconocen este fenómeno en el mito de Prometeo. Tras robar el secreto del fuego a los dioses del Olimpo y entregárselo a los humanos, Prometeo fue condenado a que un águila comiese parte de su hígado diariamente; el hígado se regeneraba por completo al día siguiente, proporcionando al águila alimento y eterna tortura a Prometeo.

La existencia de unos factores hepatotróficos se empezó a sospechar ya en el siglo pasado, con las primeras descripciones de la llamada "intoxicación por carne" en perros a los que se les había practicado una fistula de Eck ¹.

A partir de 1955, con los primeros trasplantes de hígado experimentales, quedó demostrada la necesidad de revascularizar los injertos con flujo esplácnico, para poder así mantener su trofismo² . Años más tarde, entre 1964 y 1965, STARZL y MARCHIORO, con sus experimentos de "transposición porto-cava" demostraron la existencia de estos factores hepatotróficos en el territorio portal, que fueron identificados inicialmente como la insulina y el glucagón producidos por el páncreas ³.

Durante los siguientes treinta años, otros factores hepatotróficos más o menos identificados y diferentes teorías sobre el flujo portal, más o menos demostradas, no han terminado de aclarar el enigma de la regeneración hepática.

La gastrina es una hormona producida en las células G del antro gástrico, que además de intervenir en la regulación ácido-gástrica, tiene importantes efectos tróficos demostrados a diferentes niveles del tracto digestivo. Todavía, hoy día, ignoramos el papel fisiológico de muchos de estos efectos tróficos de la gastrina y la justificación de la existencia de receptores hormonales en lugares inexplicables y alejados del antro gástrico.

En 1976, pensando que la gastrina podría tener efectos tróficos también sobre el hígado, JOHNSON⁴ intenta por primera vez su demostración, mediante estímulos con pentagastrina, sin conseguirlo. En 1977, MC GREGOR y WAY⁵ describen, por primera vez, que la gastrina podría actuar como un factor hepatotrófico. Utilizando ratas Wistar realizan un modelo de hipergastrinemia crónica mediante antro retenido y lo comparan con animales controles o con antrectomía, demostrando un aumento del peso del hígado en los animales con hipergastrinemia debido a hiperplasia celular.

Desde estas fechas se han realizado diferentes estudios, intentando demostrar el papel de la gastrina en la regeneración hepática, resultando en conjunto bastante contradictorios.

Se postula que la vagotomía produce hipergastrinemia en el hombre y en los animales de experimentación. Si la teoría de MC GREGOR y WAY sobre el efecto trófico de la hipergastrinemia sobre el hígado fuera cierta, la vagotomía debería favorecer la regeneración hepática.

Sin embargo, en 1977 LAMAR y col. ⁶ y en 1983 KATO y col. ⁷ publican la disminución de la regeneración hepática post-vagotomía, lo que parece cerrar esta posibilidad. En los últimos años, algunos trabajos con resultados contradictorios han añadido nuevo interés para la investigación.

En 1990, RASMUSSEN y col. ⁸ demuestran en ratas Wistar que, aunque la fundectomía (que provoca ligera hipergastrinemia) no influye en la regeneración hepática post-hepatectomía, la antrectomía produce retraso en la regeneración y el estímulo con pentagastrina la aumenta. También observan un aumento de los niveles portales de gastrina durante las primeras horas post-hepatectomía. Concluyen sugiriendo que la gastrina tiene efectos tróficos sobre el hígado, aunque no pueden afirmar si estos efectos están mediados por la insulina, el glucagón o el factor epidérmico del crecimiento.

En 1993 OHTAKE y col. ⁹, demuestran en ratas parcialmente hepatectomizadas y sometidas previamente a vagotomía un descenso en la regeneración hepática, tomando como parámetros el peso del hígado y el índice mitótico, durante los primeros siete días post-resección, consiguiendo la normalización de los citados índices a los catorce días. Concluyen con la posibilidad de que la vagotomía produzca un retraso en la regeneración

hepática. Sin embargo, este mismo autor publica, un año después ¹⁰, que el omeprazol administrado durante tres días, a través de la hipergastrinemia que induce en ratas, favorece la regeneración hepática, llegando a aconsejar su utilización en pacientes sometidos a resecciones hepáticas.

El último estudio sobre el tema es el realizado por CHEN y col. ¹¹ en 1994, en el cual demuestra, también en ratas, que la hipergastrinemia causada por omeprazol o fundectomía no tiene influencia en la regeneración hepática.

De la revisión de la literatura sólo hemos obtenido resultados contradictorios. Sin embargo, dada la importancia de conocer si la vagotomía/hipergastrinemia tiene una influencia en la regeneración hepática, hemos desarrollado el presente trabajo experimental.

Conocemos que las células G, productoras de gastrina, se encuentran limitadas en el antro gástrico, donde tienen establecidas importantes relaciones hormonales y celulares. En la regulación ácida gástrica, que es el aspecto fisiológico que mejor conocemos, existen interrelaciones de la gastrina en la estimulación ácida de las células parietales, sinérgicas con la histamina y la acetilcolina, y antagónicas con la somatostatina. Se postula que, cuando se interrumpe la vía de la acetil-colina a través de una vagotomía, se produce una hipergastrinemia que trata de compensar la caída del estímulo ácido de esa vía, hipergastrinemia que se mantendría crónicamente para mantener la secreción ácida y a la que incluso se responsabiliza de las recidivas ulcerosas.

Sin embargo, pese a conocer que existen importantes efectos tróficos del nervio vago e importantes interrelaciones celulares y hormonales, no existen evidencias en la literatura que demuestren qué ocurre después de una vagotomía.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado recientemente que cuando se realiza una vagotomía en cobayas, se producen tres situaciones celulares diferentes de forma evolutiva ^{12,13} (Figura 1).

Inicialmente, en la primera semana o **fase de reacción aguda**, se produce un aumento de células G, quizás como respuesta a la disminución ácida post-vagotomía.

A medio plazo, alrededor de los 30 días post-vagotomía, **fase de adaptación**, encontramos las tres poblaciones celulares prácticamente en sus valores basales o iniciales pre-vagotomía.

Posteriormente, a partir de los 60 días, se inicia la **fase crónica**, en la que encontramos nuevamente una elevación significativa de células G productoras de gastrina, que no se acompaña esta vez de elevación de células D, probablemente porque al perderse el efecto trófico del vago sobre los mastocitos, éstos disminuyen, disminuyendo el ambiente histaminérgico que ésta vez sí se compensaría con una hipergastrinemia mantenida.

En el trabajo publicado en 1993 por OHTAKE y col. ⁹ en el que se valora el

efecto de la vagotomía sobre la regeneración hepática en ratas parcialmente vagotomizadas, ambas intervenciones (vagotomía y hepatectomía parcial) se realizan de modo simultáneo; por tanto, no se puede valorar el efecto de la hipergastrinemia sobre la regeneración hepática. Los otros modelos publicados, que ofrecen resultados contradictorios, se pueden explicar partiendo del hecho de que tanto la fundectomía como la estimulación farmacológica (pentagastrina u omeprazol) producen elevaciones de gastrina variables e insuficientemente elevadas. Sin embargo, en el trabajo inicial de MC GREGOR y WAY⁵, que utilizan un modelo de hipergastrinemia por antro retenido, las elevaciones de la gastrina inducida son muy elevadas. Todos estos aspectos sobre estudios publicados previamente sobre el tema serán comentados en la discusión del trabajo.

Hay otro aspecto muy importante que considerar respecto a la acción de la gastrina como factor hepatotrófico, y es el siguiente: ¿A través de qué mecanismos ejerce esta hormona gastrointestinal su presumible acción estimuladora del trofismo hepático?

El desarrollo de los hepatocitos está controlado por varios tipos de factores de crecimiento, entre los que se reconocen el EGF (*Epidermal Growth Factor*), el IGF I y II (*Insulin-like growth factor I y II*), el TGF- α (*Transforming growth factor- α*), el TGF- β (*Transforming growth factor- β*), el HBGF-I (*heparin binding growth factor I*), la IL-1- β (*Interleukin-1- β*), el hHGF (*human hepatocyte growth factor*), el glucagón y la insulina¹⁴. Todos estos factores estimulan la síntesis de DNA y la división celular en

el hepatocito en cultivos celulares libres de suero y son considerados como mitógenos primarios. Posteriormente se han identificado un segundo grupo de factores capaces de estimular el crecimiento de los hepatocitos en presencia de un mitógeno primario; a este segundo grupo se les ha denominado mitógenos secundarios o co-mitógenos e incluyen la neurotensina ¹⁵, vasopresina ¹⁶ y angiotensina II ¹⁷.

Se ha demostrado recientemente que la gastrina puede actuar como un co-mitógeno o mitógeno secundario de hepatocitos en cultivo en presencia de EGF (*Epidermical Growth Factor*). El mecanismo a través del cual se produce esta "actuación sinérgica" parece estar relacionado con la regulación que el EGF ejerce sobre los receptores de gastrina en la membrana del hepatocito, receptores que estructuralmente son muy semejantes a los receptores centrales de colecistokinina tipo B (CCK-B) ¹⁸.

Tras las observaciones iniciales sobre su capacidad para inducir la maduración del tejido oftálmico, el EGF se reconoce como el prototipo de mitógeno para numerosos tejidos epiteliales¹⁹. El EGF es un polipéptido producido en las glándulas submandibulares, en el riñón y en las glándulas de Brunner duodenales; es segregado de manera exocrina a la saliva, jugo duodenal y hacia la orina; en sangre pueden observarse trazas de este péptido, donde se piensa que procede de las plaquetas ^{20,21}.

Varios trabajos recientes han centrado su atención en el papel del EGF en las fases precoces de la regeneración hepática que sigue a una hepatectomía parcial en ratas.

El modelo experimental más utilizado para el estudio de la regeneración hepática es el diseñado por HIGGINS y ANDERSON ²², que consiste en una hepatectomía de los lóbulos medio y lateral izquierdo del hígado de la rata, lo que supone una extirpación de aproximadamente 2/3 del parénquima hepático; por otro lado, estudios con resecciones hepáticas con animales de mayor tamaño han demostrado que la respuesta regenerativa del hígado es proporcional a la cantidad de hígado extirpado, y que resecciones pequeñas (incluso inferiores al 10%) suponen un estímulo suficiente para el inicio del proceso regenerativo y finalizan en la restauración completa del hígado a su tamaño original ²³.

Por otro lado, se ha demostrado que tras el estímulo que supone la resección hepática (incluso de alrededor del 10%) se produce una elevación en sangre de EGF de alrededor del 30% sobre los niveles basales y, lo que parece de mayor importancia, se induce la expresión de receptores para EGF en la membrana plasmática del hepatocito ²⁴. El estudio llevado a cabo por RASMUSSEN y col. ²⁵ demuestra que la administración de EGF de manera exógena a ratas parcialmente hepatectomizadas induce un aumento en la regeneración hepática, y que este aumento es dosis-dependiente (la administración de EGF en dosis de 6 y 24 nmol/kg/día durante 48h produjo un aumento en la regeneración hepática, mientras que dosis de 48 nmol/kg/día no tuvieron ningún efecto después de 24 y 48 horas de tratamiento). Otros estudios observan incluso efectos inhibitorios de la proliferación celular (en diferentes epitelios) tras la administración de dosis muy elevadas de EGF en ratas (600 nmol/kg/día) ²⁶. Similares resultados se han obtenido en diferentes estudios "in vitro" ²⁷. No se ha dado aún una explicación definitiva

a éste fenómeno del efecto inhibitorio o ausente sobre la proliferación celular tras la administración de dosis elevadas de EGF, aunque tras el trabajo publicado por EARP y col. ²⁴ parece que éste hecho se justifica en los hepatocitos en regeneración por un "agotamiento" en el número de receptores de EGF disponibles, que depende en último término de factores como el sexo y la edad de la rata ²⁸. Permanece aún sin aclarar por qué una baja ocupación de los receptores de EGF induce una marcada aceleración en la regeneración de los hepatocitos. En cualquier caso, todos los trabajos citados confieren al EGF una crucial importancia en las fases tempranas de la regeneración hepática .

Avanzando en nuestra hipótesis de investigación, encontramos publicaciones recientes que demuestran una interesante interrelación entre el EGF y la gastrina. Se conoce que en las glándulas de Brunner del duodeno existen células G productoras de gastrina, aunque en menor concentración que en el antro gástrico. Por otro lado, dos estudios recientes sobre secreción gástrica de EGF en humanos y publicados por KONTUREK y col. ^{29,30} han puesto de manifiesto la imbricación que existe entre la secreción de EGF hacia la luz gástrica y su acción como elemento protector ante determinadas situaciones que inducen una disminución del pH intraluminal. Ambos trabajos demuestran que la mucosa gástrica es capaz de segregar importantes cantidades de EGF en respuesta a la administración de pentagastrina (un análogo de la gastrina).

Un trabajo clave en la comprensión de esta interrelación gastrina/EGF es el publicado por YAO y col. en 1995 ²⁶. Conocido el efecto regulador de la gastrina sobre la mucosa gástrica, duodenal y del colon en la rata ³¹ y también los efectos tróficos de

^esta hormona sobre cánceres' de colon en la rata y en humanos^{32,2}; este estudio es el primero que valora el efecto de la gastrina sobre el desarrollo de hepatocitos normales de la rata. Utilizando un modelo de cultivo celular de hepatocitos normales (con capacidad de síntesis de albúmina y enzimas hepáticas) observan que la gastrina es capaz de estimular la proliferación de estos hepatocitos solamente en presencia de EGF, actuando, por tanto, como un co-mitógeno o mitógeno secundario según la terminología utilizada por MICHALOPOULOS ²³. El EGF es capaz de estimular la regeneración de los hepatocitos en ausencia de otros mitógenos y se considera por ello un mitógeno primario. Por tanto, la gastrina actuaría como un mitógeno primario sobre unos tejidos (mucosa gastroduodenal y colónica) y como un co-mitógeno sobre otros (hepatocitos y células de las criptas intestinales ³³). Los resultados del citado estudio sugieren que el mecanismo por el cual la gastrina actúa como un mitógeno secundario solamente en presencia de EGF se debe a una regulación del receptor de gastrina (aumento en la capacidad de unión) por parte del EGF en la superficie del hepatocito.

Desde la caracterización de la molécula de somatostatina en 1973 por parte de BRAZEAU y col. ³⁴ hasta nuestros días, son múltiples los efectos biológicos, fundamentalmente de tipo inhibitorio, de los que se ha responsabilizado a esta hormona.

A nivel hipofisario inhibe la secreción de la hormona del crecimiento (GH) y de la tirotrina (TSH). En el tubo digestivo inhibe la secreción de prácticamente todos los péptidos gastrointestinales además de disminuir la motilidad del tubo digestivo e interferir selectivamente en la absorción de ciertos azúcares y la absorción intestinal de modo

general. A nivel pancreático inhibe tanto la secreción exocrina como endocrina. Asimismo, se han descrito una serie de efectos biológicos de la somatostatina con manifiesto interés terapéutico, como la reducción del flujo esplácnico y la secreción de renina, aldosterona, parathormona (PTH) y calcitonina. Más recientemente se ha observado su efecto citoprotector en modelos de pancreatitis aguda y de lesiones por isquemia-reperfusión hepática e intestinal ³⁵.

Las interesantes acciones biológicas de la somatostatina nativa han sugerido, tanto a nivel clínico como experimental, una gran variedad de posibles aplicaciones diagnósticas y terapéuticas; estas aplicaciones se ven limitadas, sin embargo, por la baja estabilidad metabólica del péptido natural, su vida plasmática media corta (menor de 3 minutos) que restringe su administración a la vía endovenosa en perfusión continua, la fugacidad de sus efectos biológicos y el rebote de la secreción hormonal que se observan al interrumpir su administración endovenosa ³⁶. Este hecho ha motivado que, durante los últimos años, se hayan sintetizado un sinfín de análogos de la somatostatina, comprobándose que para tener una actividad biológica completa (fijación y activación del receptor), sólo es necesario el fragmento de cuatro aminoácidos Phe7-Trp8-Lys9-Thr10 y el puente disulfuro, teniendo un efecto meramente estructural el resto de aminoácidos integrantes de la molécula; la reducción del número de aminoácidos estructurales conlleva una mayor resistencia frente a la degradación enzimática ³⁷.

Mediante diversas modificaciones estructurales del hexapéptido cíclico A-Cys-Phe-D Trp-Lys-Thr-Cys-B, BAUER y col. ³⁸ obtienen en 1982 el octapéptido SMS 201-

995 (octreótido), que conserva el fragmento biológicamente activo y el puente disulfuro y que presenta un aminoácido fenilalanina en su forma D en el extremo proximal y una treonina, a la que se le ha sustituido el grupo ácido por un radical alcohol en el otro extremo del puente disulfuro. La D fenilalanina parece ejercer un efecto protector sobre el puente disulfuro, es decir, le confiere una mayor estabilidad frente a la degradación enzimática. En este mismo sentido parece actuar el D triptófano del fragmento biológicamente activo, confiriéndole además una mayor potencia biológica.

En estudios realizados en voluntarios sanos ³⁹, se comprobó que el octreótido tiene un $t_{1/2}$ plasmático de 113 minutos cuando se administra por vía subcutánea. Este mayor $t_{1/2}$ se acompaña de una duración de acción prolongada y una curva monofásica. Tras la administración endovenosa, el $t_{1/2}$ plasmático es de 43 minutos y su concentración sérica presenta una curva biexponencial. La octreótida se absorbe rápida y completamente tras su inyección subcutánea con un $t_{1/2}$ de absorción que oscila entre 5 y 11 minutos. La concentración plasmática máxima se alcanza a los 30 minutos tras administración subcutánea. La octreótida se transporta fijada en un 65% a proteínas plasmáticas, especialmente a lipoproteínas y en menor proporción a la albúmina. El volumen de distribución es de 0.27/kg y el aclaramiento de 160 ml/min. Un 32% de la dosis subcutánea administrada se elimina de forma inalterada por vía urinaria y otra proporción considerable por vía biliar.

En cuanto a su mecanismo íntimo de acción, la somatostatina y su análogo sintético parecen actuar a nivel de la célula diana modificando los niveles de AMPc o de

GMPc, a través de su estímulo o inhibición de la adenilato ciclasa , y/o modulando la permeabilidad de los iones calcio ^{40,41}.

OGAWA y col. ⁴² identificaron receptores tisulares para somatostatina. Estos autores señalaron la existencia de una proteína soluble que ligaba la somatostatina en las fracciones citosólicas de varios tejidos de rata, como hígado, intestino delgado, adenohipófisis, estómago, cerebro , glándulas submaxilares, útero, riñón y pulmones; en el hombre fueron identificados en el hígado y en la adenohipófisis .

La acción de la somatostatina puede ser directa o mediada a través de la modulación del nivel plasmático de otras enterhormonas o péptidos. Se atribuye un papel muy importante a las prostaglandinas y otros metabolitos del ácido araquidónico como mediadores en las acciones de la somatostatina a nivel del sistema nervioso, páncreas, hígado, intestino y otras localizaciones ³⁵.

A nivel gástrico, la somatostatina inhibe la secreción ácida y también la liberación de gastrina. La secreción de gastrina está mediada por neuronas colinérgicas que producen inhibición de la secreción de somatostatina por parte de las células D antrales, provocando de esta forma la liberación de gastrina por un mecanismo de desinhibición, y por terminaciones nerviosas no colinérgicas, que estimulan directamente la secreción de gastrina por liberación del neurotransmisor bombesina (*gastrin releasing peptide*, GRP) ⁴³. Por otra parte, existe un mecanismo de retroalimentación por el cual la acidificación gástrica (pH<3) estimula la secreción de somatostatina, que a su vez frena

la liberación de gastrina ⁴⁰.

Centrándonos en los efectos de la somatostatina, o su análogo octreótida, sobre la actividad regeneradora del hígado, encontramos que el primer trabajo a este respecto es el publicado por PRUTHI y col. ⁴⁴ en 1993. Estos autores utilizan un modelo experimental en ratas, a las que se les realiza una hepatectomía del 70% previa administración, durante los 2 días anteriores, de octreótido en dosis de 1.5µg/kg/hr a través de una bomba de infusión continua. Observan en este grupo de animales una reducción del 33% en el peso del hígado remanente a las 72 horas de la hepatectomía y una disminución del 67% en la respuesta hiperplásica de los hepatocitos (síntesis de DNA) a las 24 horas, cuando los comparan con un grupo de animales control a los que se administró de igual modo un volumen similar de solución salina al 0.9%. Observaron asimismo que la acción inhibitoria del análogo de la somatostatina era máxima durante los periodos de máxima síntesis de DNA (entre las 24 y 36 horas tras la hepatectomía) y que este potente efecto inhibitorio era rápidamente revertido al finalizar la administración del octreótido, sufriendo los hepatocitos un "efecto rebote" de hiperplasia celular, demostrando la bien documentada capacidad compensatoria de los hepatocitos para restablecer el tamaño normal del hígado ^{22,45}.

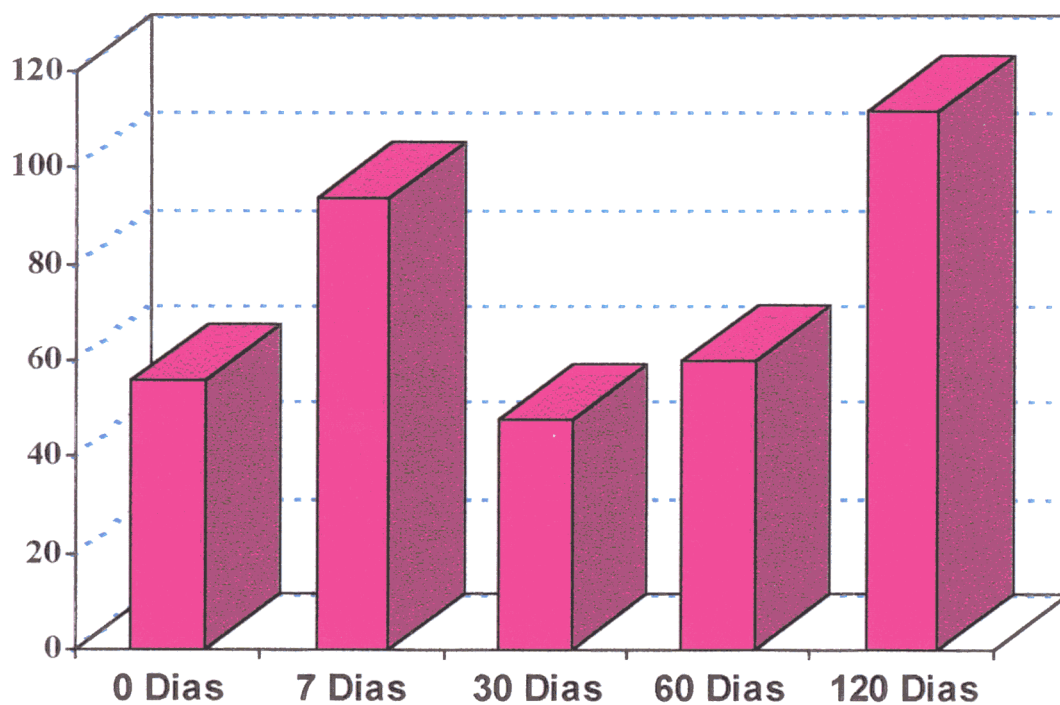
Los citados autores exponen dos posibles hipótesis para explicar el mecanismo de acción de la octreótida sobre la regeneración hepática. Por un lado, podría inhibir directamente la proliferación de los hepatocitos. VIGUERIE y col. ⁴⁶ demostraron la capacidad de la octreótida para suprimir la proliferación de células pancreáticas

directamente y tras la estimulación con factor de crecimiento epidérmico en cultivos libres de suero. Otros estudios similares han demostrado la capacidad de la somatostatina y sus análogos de inhibir directamente la síntesis de DNA y la proliferación de una amplia variedad de tipos celulares, como linfocitos, células foliculares del tiroides y glándulas mucosas gástricas y del intestino delgado ^{47,48}. Asimismo, un interesante trabajo publicado recientemente por RAPER y col. ⁴⁹ sugiere que un mecanismo importante para el control de la regeneración hepática pueda ser una "respuesta inteligente" de los hepatocitos, disminuyendo su capacidad de respuesta a la acción de la somatostatina, a través de una disminución de la captación de la misma, asociada a un aumento en su degradación intracelular.

Otro posible mecanismo para explicar el efecto antiproliferativo de la octreótida sobre los hepatocitos sería la supresión o inhibición de ciertos factores tróficos extrahepáticos. La insulina y el glucagón se han mostrado como potentes estimuladores de la síntesis de DNA y de la proliferación de hepatocitos *in vivo* e *in vitro* ^{50,51,52}. Por otro lado, la somatostatina y sus análogos han demostrado ser potentes inhibidores de la liberación de insulina y glucagón a partir de las células de los islotes pancreáticos ⁵³.

FIGURA 1

EVOLUCION DE LA POBLACION DE CELULAS G EN EL ANTRO GASTRICO DEL COBAYA TRAS VAGOTOMIA TRONCULAR



II. OBJETIVOS

OBJETIVOS

- 1.- Comprobar si la vagotomía troncular produce hiperplasia de células G a corto (7 días) y largo plazo (120 días) como expresión de hipergastrinemia compensadora en el antro gástrico de la rata Wistar.

- 2.- Conocer el índice de regeneración hepática basal y tras resección hepática (porcentaje de núcleos y núcleos por mm^2) por medición del PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) en ratas previamente vagotomizadas a corto y largo plazo y compararlas con un grupo control sin vagotomía.

- 3.- Conocer si el octreótido (análogo sintético de la somatostatina) influye en estos índices de regeneración en ratas normales y vagotomizadas a corto y largo plazo.

III. REGENERACION HEPATICA: ESTADO ACTUAL

REGENERACION HEPATICA. ESTADO ACTUAL

Aunque la extraordinaria capacidad regenerativa del hígado era sugerida ya en la antigüedad en la leyenda de Prometeo, los investigadores no prestaron atención a éste fenómeno hasta la aparición del microscopio. Los primeros datos sobre la estructura y organización de los hepatocitos no surgieron hasta mediado el siglo XIX. El primer autor en introducir la idea de la regeneración hepática fue Cruveilhier en 1833; pocos años más tarde, en 1846, Budd afirmó que la recuperación tras las que se consideraban enfermedades hepáticas fatales debía ser consecuencia de la capacidad del hígado para regenerar el tejido dañado⁵⁴. Las siguientes observaciones sobre éste fenómeno fueron realizadas por autores alemanes en la última década del siglo XIX, al estudiarse la recuperación de diferentes animales de laboratorio tras hepatectomía parcial e intoxicación por cloroformo^{55,56}. Los estudios patológicos comenzaron detallando las fases del fenómeno regenerativo del hígado humano en necropsias; las bases histológicas de la regeneración hepática fueron descritas en los albores del siglo XX.

Ya en los tiempos modernos, el mejor modelo experimental para el estudio de la regeneración hepática fue el presentado por HIGGINS y ANDERSON²²; tras la resección de dos tercios del parénquima hepático de la rata (lóbulos medio y lateral izquierdo) sin lesión del resto del parénquima observaron un crecimiento de los lóbulos residuales hasta llegar a completar el volumen previo del órgano, en un proceso de unos 5-7 días de duración. La hepatectomía parcial ha sido el método

experimental más utilizado para el estudio de la regeneración hepática, ya que comparado con otros métodos que utilizan agentes tóxicos (como el tetracloruro de Carbono) no está asociado a lesión tisular ni a una respuesta inflamatoria, y el inicio del estímulo regenerativo puede ser claramente precisado en el tiempo (realización de la hepatectomía parcial)²³³.

En el mamífero, el hígado es único en su capacidad de regeneración estructural y funcional. El hepatocito adulto, además de sus prodigiosas capacidades metabólicas, es una célula completamente diferenciada y con una capacidad reproductiva quiescente; su vida media supera la de las células mesenquimales, endoteliales, hematopoyéticas o de cualquier otro origen epitelial⁵⁷. En condiciones normales pueden observarse mitosis en 1:10000 a 1:100000 hepatocitos, y no más de una o dos veces durante el ciclo vital de la célula; sin embargo, tras una situación en la que exista una pérdida de masa tisular (p. ej. hepatectomía parcial, transplante de un hígado de menor tamaño) o un daño parenquimatoso difuso (p. ej. toxinas, lesiones virales), el hepatocito retoma su gran capacidad regenerativa. Ya que las estructuras portales no tienen capacidad regenerativa, lo que verdaderamente sucede tras la pérdida de tejido hepático es una hiperplasia compensadora de los hepatocitos circundantes⁵⁸.

Varios estudios sobre resecciones hepáticas realizado por FRANCAVILLA⁵⁹ en animales de mayor tamaño que la rata, como perros o primates, han demostrado que la respuesta regenerativa es proporcional a la cantidad de parénquima hepático reseca, y que incluso pequeñas resecciones por debajo del 10% del parénquima

hepático inician dicha respuesta, que finaliza con la restauración del tamaño y volumen previos del órgano. Por otro lado, éstos autores demostraron que cuando se transplanta a un perro pequeño el hígado de un perro de mayor tamaño, el volumen del hígado transplantado decrece gradualmente hasta hacerse proporcional al tamaño del animal receptor. En otro trabajo, realizado en 1993 por STARZL ⁶⁰, el hígado de un primate transplantado en un paciente humano creció rápidamente de tamaño (en una semana), hasta alcanzar el tamaño de un hígado humano. Estos estudios demuestran que la masa hepática se encuentra bajo un estricto control, y que los factores que controlan el tamaño del hígado pueden tener influencia tanto positiva como negativa sobre el mismo.

Contrariamente a otros tejidos con capacidad regenerativa, la regeneración hepática no depende de un reducido grupo de células progenitoras (stem cells). Tras una hepatectomía parcial, la regeneración del parénquima hepático es llevada a cabo por la proliferación de todas las poblaciones celulares que componen el órgano intacto: hepatocitos, células del epitelio biliar, células de Kupffer y células de Ito (con capacidad para segregar diversas sustancias hepatotróficas) ⁶¹.

Los hepatocitos son las primeras células en iniciar el proceso regenerativo. Múltiples parámetros, como el estímulo de la luz diurna y las pautas de alimentación, afectan a la duración del intervalo entre la hepatectomía parcial y el inicio de la síntesis de DNA en los hepatocitos ⁶². Este intervalo es de 10 a 12 horas en ratas, y el pico de síntesis de DNA en los hepatocitos aparece a las 24 horas, observándose otra elevación de menor intensidad entre las 36 y las 48 horas. En el caso del modelo

experimental más utilizado, la hepatectomía de 2/3, se necesitan 1.66 ciclos proliferativos por cada hepatocito del hígado residual para restaurar *ad integrum* la masa hepática; de este modo, la mayoría de los hepatocitos (95% en ratas jóvenes) de los lóbulos residuales participan en uno ó dos eventos proliferativos.

El proceso de proliferación de los hepatocitos se inicia en las áreas de los lobulillos que rodean las triadas portales (hepatocitos periportales), extendiéndose hacia las áreas pericentrales en 36 a 48 horas; el resto de los elementos celulares inician el proceso regenerativo unas 24 horas después de la hepatectomía, presentándose un pico en la síntesis de DNA a las 48 horas o más tarde ⁶³. La cinética del proceso regenerativo y la aparición de factores de crecimiento producidos por los hepatocitos en proliferación sugiere que son los propios hepatocitos los que producen los estímulos mitogénicos para la proliferación del resto de grupos celulares.

La extraordinaria capacidad clonogénica de los hepatocitos ha sido puesta de manifiesto en numerosos estudios. Uno de ellos, publicado por OVERTURF y col., en 1996 ⁶⁴, muestra cómo alrededor de 1000 hepatocitos son suficientes para generar nódulos de células normales, colonizar y restaurar completamente el hígado de la rata dañado por un modelo experimental de tirosinemia hereditaria del tipo A. Los hepatocitos procedentes de la primera generación eran transplantados en otros animales, demostrando su capacidad para restaurar de nuevo un hígado lesionado según el mismo modelo experimental. Aplicando modelos matemáticos, concluyen que un único hepatocito puede multiplicarse un número mínimo de 34 veces, dando

lugar a 1.7×10^{10} células; si el hígado normal de la rata tiene una media de 3×10^8 hepatocitos, puede calcularse que un único hepatocito de rata tiene capacidad clonogénica suficiente para generar cerca de 50 hígados de rata normales ⁶⁵, suficientes para alimentar "casi eternamente" al águila de Prometeo.

Los estudios *in vitro* también han demostrado que bajo la influencia de HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) y EGF (*Epidermal Growth Factor*) los hepatocitos son capaces de diferenciarse, llevar a cabo múltiples ciclos proliferativos, expandirse de forma clonal y rediferenciarse para formar hepatocitos maduros e incluso estructuras pseudo-ductales ⁶⁶. Estos hallazgos demuestran que los hepatocitos maduros no son células terminalmente diferenciadas, sino que pueden proliferar casi sin límite para asegurar su propia supervivencia. Este hecho parece en principio inesperado, dada la alta ploidía y la complejidad funcional de los hepatocitos maduros.

Pocos aspectos de la regeneración hepática han acaparado tanto interés como el conocer qué es lo que "dispara" la respuesta regenerativa. Varios trabajos iniciales, realizados desde los años 60 a los 80 ^{67,68,69,70} mostraron que cuando se transplantaba tejido hepático o hepatocitos aislados a lugares extrahepáticos, también éstas células entraban en fase de síntesis de DNA tras la hepatectomía parcial del hígado del huésped. En parejas de ratas sometidas a circulación parabiótica, la hepatectomía de uno de los miembros de la pareja induce un proceso de regeneración en el hígado intacto del otro miembro, observándose un efecto máximo cuando el hígado de un animal es resecaado en su totalidad.

Estos trabajos aportan evidencias convincentes de la aparición de una o varias señales mitogénicas en la sangre durante el proceso de regeneración hepática, y cualquier hipótesis de trabajo para explicar el mecanismo del inicio de la regeneración hepática debe tener en cuenta estos estímulos mitogénicos transportados por el torrente circulatorio, que inducen cambios en los hepatocitos precozmente tras la hepatectomía parcial.

FACTORES REGULADORES DEL CRECIMIENTO HEPÁTICO

Las sustancias reguladoras del crecimiento hepático fueron clasificadas por MICHALOPOULOS ^{17,71} en: mitógenos completos, mitógenos indirectos ó co-mitógenos y factores inhibidores del crecimiento o chalonas. Los mitógenos completos son sustancias que en medios de cultivo libres de suero son capaces de estimular la síntesis de DNA en hepatocitos y son en su mayoría polipéptidos tales como las citokinas. Los co-mitógenos son moléculas que no poseen efecto directo sobre los hepatocitos en cultivo, pero son capaces de aumentar el efecto mitogénico de los mitógenos completos o inhibir el efecto mitoinhibitorio de los factores inhibidores del crecimiento celular.

HGF (Hepatocyte Growth Factor)

La presencia de un factor estimulador de la regeneración hepática en la sangre de animales parcialmente hepatectomizados era sospechada desde hace más de 30 años ^{72,67,68,69,70}.

En 1984, tres trabajos, de modo casi simultáneo comunicaron la presencia de factores estimuladores de la síntesis de DNA en cultivos de hepatocitos ^{73,74,75}. Sin embargo, la caracterización molecular del más potente estimulador hepatotrófico fue realizada por NAKAMURA y col. en 1984, purificándolo a partir de las plaquetas de más de 2000 ratas ⁷⁶ y evidenciando que se trataba de una sustancia desconocida hasta entonces.

El HGF y su receptor (c-Met) parecen ser factores clave durante la regeneración hepática ⁷³, y la delección homocigótica de los genes de una o ambas proteínas se asocia a mortalidad embrionaria, debido en parte a una depresión en el desarrollo hepático. Varios estudios en humanos ⁷⁷ han demostrado que las concentraciones de HGF aumentan de modo sustancial tras la disminución de la masa hepática. Estudios similares en la rata, llevados a cabo por MICHALOPOULOS ⁷⁸ demuestran que las concentraciones plasmáticas de HGF se multiplican por más de 20 una hora después de una hepatectomía parcial, disminuyen lentamente durante las primeras 24 horas pero manteniéndose elevadas durante más de 72 horas, retornando posteriormente a valores normales. La hipótesis de trabajo, en éste estudio, asume que el rápido y precoz incremento de HGF es el estímulo mitogénico que conduce a los hepatocitos hacia la fase de síntesis de DNA.

El HGF induce la expresión de varios genes que aparecen de modo precoz en el proceso de regeneración hepática (LRF-1 e IGFBP1) ⁷⁹, lo que sugiere que el HGF puede ser uno de los estímulos conductores de los rápidos cambios en la expresión genética tras una hepatectomía parcial.

En base a lo anteriormente expuesto, parece razonable postular que el aumento en plasma de un potente mitógeno de los hepatocitos una hora después de la hepatectomía parcial sea responsable de conducir a los hepatocitos hacia la síntesis de DNA 23 horas más tarde. De cualquier modo, las causas de éste importante aumento en los niveles plasmáticos de HGF tras la hepatectomía parcial no están aún claros; aunque el hígado participa mayoritariamente en el aclaramiento plasmático

del HGF circulante, la tasa de eliminación hepática de HGF no cambia de modo tan intenso tras una hepatectomía parcial como para justificar la magnitud del aumento plasmático de HGF ⁸⁰.

MICHALOPOULOS y su grupo demostraron en 1991 ⁸¹ que la expresión del RNA mensajero para el HGF aumenta en las células hepáticas de Ito 3 a 6 horas después de una hepatectomía parcial, y el aumento se mantiene durante 24 horas. Este hecho no explica el aumento del HGF plasmático 1 hora después de la hepatectomía parcial, pero indudablemente debe colaborar en el mantenimiento de elevadas concentraciones de éste factor a lo largo del proceso regenerativo.

Si el HGF es el estímulo mitogénico inicial para los hepatocitos en el proceso de regeneración hepática, la inyección portal de HGF en ratas normales debería estimular la síntesis de DNA en los hepatocitos. Este hecho realmente ocurre, aunque el número de hepatocitos que avanzan hacia la fase S es relativamente pequeño y limitado a los espacios periportales. Resultados similares se han obtenido tras la inyección portal de EGF (*Epidermal Growth Factor*) y TGF- α (*Transforming Growth Factor- α*) ⁸². Esto sugiere que los hepatocitos del hígado intacto no se encuentran preparados para responder a los estímulos mitogénicos sin que previamente sucedan una serie de eventos primarios que colocan a los hepatocitos en disposición de responder a los estímulos proliferativos ⁶³. Un experimento muy interesante en éste aspecto es el realizado por LIU y col. ⁸³, en el cual la inyección portal de HGF estaba precedida de la infusión de una pequeña cantidad de colagenasa; en éste caso, el efecto mitogénico del HGF se amplificaba de modo

extraordinario al compararlo con un grupo control sin colagenasa, induciendo la síntesis de DNA en más del 60% de los hepatocitos. La infusión aislada de colagenasa no mostraba ningún efecto.

Estos hechos añaden un factor importante al papel del HGF como mitógeno hepático, en cuanto a que parecen mostrar que la degradación de la biomatriz hepática, en la cual se confiere un papel destacado a la urokinasa ⁸⁴, pudiera ser ese "interruptor" que coloca a los hepatocitos en situación de responder al estímulo mitogénico inducido por el HGF u otros factores de crecimiento. Se ha demostrado que la biomatriz hepática contiene elevadas cantidades de HGF ⁸⁵ que pueden ser liberadas rápidamente a la circulación plasmática en situaciones de agresión de la misma (hepatectomía parcial, toxinas hepáticas...).

Parecen necesarios - por tanto- nuevos estudios sobre la interacción entre el HGF, la urokinasa y otras sustancias con capacidad degradatoria de la biomatriz hepática para definir de manera más precisa el papel de todos éstos factores en las fases precoces del proceso de regeneración hepática.

EGF (Epidermal Growth Factor) y TGF- α (Transforming Growth Factor α)

Reconocido inicialmente por su capacidad para inducir la maduración del tejido oftálmico, el EGF es el prototipo de mitógeno para numerosos tejidos de origen epitelial ⁸⁶. Es sintetizado en las glándulas de Brunner duodenales y en las

glándulas salivares, y se ha demostrado que tanto la sialadenectomía como la resección duodenal producen retrasos en la regeneración hepática ^{17,19}.

La acción del EGF se encuentra modulada por hormonas a través de modificaciones de su receptor en la membrana plasmática del hepatocito ²⁴.

Tras una hepatectomía parcial, las concentraciones plasmáticas de EGF aumentan de modo muy discreto (menos del 30% sobre los niveles basales) ⁸⁷, pero sin embargo es indiscutible que el EGF juega un importante papel como mitógeno hepático tras una hepatectomía parcial. El mecanismo por el cual desarrolla éste importante efecto parece basarse en un incremento en la disponibilidad hepática de EGF tras la hepatectomía parcial. El EGF llega al hígado desde las glándulas de Brunner - donde se segrega de manera continua- a través de la circulación portal ⁸⁸. El EGF es capturado por el hígado en el primer paso hepático y depositado en la matriz periportal ⁸⁹. Una disminución en la masa hepática de 1/3 por una hepatectomía parcial multiplica la concentración de EGF, disponible a través de la circulación portal, por un factor de 3 (por unidad de peso). Por otro lado, se ha demostrado que la norepinefrina, una sustancia que también aumenta de modo importante tras una hepatectomía parcial (ver más adelante), estimula la secreción de EGF en las glándulas de Brunner ⁹⁰, condicionando un aumento en la cantidad de EGF que alcanza el hígado tras una resección hepática parcial. Por otro lado, RUBIN y col. ⁹¹ han observado que de modo precoz tras una hepatectomía parcial sucede la tirosín-fosforilación del receptor de EGF, lo que constituye un argumento más sobre

el papel mitogénico precoz que el EGF desarrolla en el proceso de regeneración hepática.

Como se comentó anteriormente, la acción del EGF está modulada por un amplio número de hormonas a través de modificaciones en su receptor. El número de receptores de EGF, presentes en elevada densidad en la membrana plasmática del hepatocito, parecen estar regulados por el ritmo secretorio de la hormona del crecimiento y de manera distinta en cada sexo ⁹².

Los trabajos de KONTUREK y col. ^{29,30} han puesto de manifiesto la relación que existe entre el EGF y la gastrina. En éstos estudios, realizados en humanos, éste autor demuestra que la pentagastrina (un análogo sintético de la gastrina) induce un potente estímulo para la secreción de EGF a partir de las glándulas de Brunner. Los trabajos posteriores de YAO ¹⁸, realizados en ratas, demuestran que la gastrina (G-17), en presencia de EGF, tiene un efecto proliferativo de los hepatocitos *in vitro*, aparentemente debido a un mecanismo de aumento de afinidad de los receptores de gastrina inducido por el EGF. Este autor concluye su estudio afirmando que debe considerarse a la gastrina como un mitógeno secundario.

El TGF- α (*Transforming Growth Factor- α*) es un potente mitógeno para los hepatocitos en cultivo y probablemente representa un estímulo importante de la regeneración hepática *in vivo* ⁹³. El TGF- α es un péptido de 50 aminoácidos que comparte secuencia y receptor con el EGF y con otros miembros de la familia del

mismo ⁷⁶. El TGF- α es biológicamente más efectivo, aunque su afinidad por el receptor es sólo una cuarta parte de la del EGF ⁷⁵.

Si el EGF está involucrado en los inicios del proceso de regeneración hepática, el TGF- α parece jugar su papel en momentos posteriores. El RNAm para el TGF- α se expresa en los hepatocitos entre 2 y 3 horas después de una hepatectomía parcial, alcanzando un pico entre las 12 y las 24 horas y permaneciendo elevado durante el menos 48 horas después de la resección hepática ⁹⁴. El TGF- α producido por los hepatocitos parece actuar a través de un mecanismo autocrino. Se ha demostrado que el aumento de los niveles de TGF- α en los hepatocitos bajo el estímulo de promotores de albúmina conduce a niveles elevados y mantenidos de síntesis de DNA, y eventualmente a la aparición de tumores ⁹⁵.

La importancia que los hechos descritos pueden tener sobre el proceso de regeneración hepática permanecen aún poco claros, pues un reciente estudio realizado en ratas muestra cómo tras la delección homocigótica del gen productor de TGF- α , la regeneración hepática se desarrolla de modo normal ⁹⁶. Este hecho, sin embargo, puede deberse a un aumento compensador de otras sustancias de la familia de ligandos del receptor de EGF.

TNF- α (Tumour Necrosis Factor- α) e IL-6 (Interleukina- 6)

Varias líneas de trabajo parecen converger en la evidencia de que el TNF- α y la IL-6 constituyen importantes componentes de las vías iniciales de estímulo de la regeneración hepática. Los estudios realizados por CORNELL y col. en 1981 ⁹⁷ sugirieron que la endotoxina- uno de los estímulos claves para la producción de TNF- α por las células de Kupffer- podría estar involucrada en el proceso de regeneración hepática.

Trabajos más recientes, utilizando un modelo experimental de tratamiento con anticuerpos anti-TNF- α previamente a la hepatectomía parcial, demostraron una disminución en la síntesis de DNA y una abolición de las elevaciones de Jun-kinasa, del RNAm codificador de c-jun y de la actividad nuclear de AP1 ⁹⁸.

Los componentes que contienen el elemento gadolinio (que de modo paradójico produce un aumento del RNAm del TNF- α en las células de Kupffer) estimulan la inducción de IL-6 y de c-jun, C/EBP β y C/EBP Δ , así como los niveles nucleares de AP1 ⁹⁹. Estos hechos ocurren de modo precoz durante la repuesta regenerativa, sugiriendo que el TNF- α desempeña un importante papel durante la respuesta proliferativa inicial.

En un trabajo reciente de YAMADA y col. ¹⁰⁰ se demuestra que tras una hepatectomía parcial la síntesis de DNA disminuye drásticamente en ratones con

deficiencia del receptor para TNF- α tipo I. Este defecto se ve corregido con la administración de Interleukina-6, lo que sugiere que el papel del TNF- α es el de regular la secreción de Interleukina-6.

La Interleukina-6 es segregada por las células de Kupffer, y ésta secreción es estimulada por el TNF- α . Es conocido que la IL-6 es un importante estimulante de la síntesis de proteínas de fase aguda por los hepatocitos, formando parte de la respuesta inflamatoria ¹⁰¹. Varios estudios han demostrado que las concentraciones plasmáticas de IL-6 aumentan después de una hepatectomía parcial, alcanzando niveles elevados alrededor de las 24 horas ^{99,102}, aunque otros trabajos observan un efecto mito-inhibitorio de la IL-6 en cultivos primarios de hepatocitos ¹⁰³. Por último, parece demostrado que la IL-6 actúa como mitógeno primario en cultivos de células del epitelio biliar ¹⁰⁴.

En un estudio reciente realizado por CRESSMAN ¹⁰⁵ la síntesis hepatocitaria de DNA durante la regeneración hepática aparecía suprimida en ratones con delección homocigótica del gen de la IL-6.

La revisión de los conocimientos actuales sobre el TNF- α y la IL-6 en las fases iniciales de la regeneración hepática demuestra que los mecanismos que disparan el proceso regenerativo no discurren de modo normal en ausencia de estas citokinas. En concreto, parece que la IL-6 es esencial e irremplazable por otras citokinas que utilizan parcialmente sus mecanismos estimulatorios.

OTROS FACTORES DE CRECIMIENTO CON EFECTOS PARACRINOS

El Factor de crecimiento ligado a la heparina (*Heparin Binding Growth Factor-I*, HBGF-1), también conocido como *acidic fibroblast growth factor* (FGF) es un importante regulador del desarrollo y la regeneración hepática ¹⁷. En concentraciones picomolares estimula la síntesis de DNA en el hepatocito, mientras que a niveles nanomolares inhibe la proliferación de hepatocitos inducida por EGF ⁷⁵. Tras una hepatectomía parcial, la expresión del RNAm para HBGF 1 - presente tanto en los hepatocitos como en las células no parenquimatosas- precede al aumento en la expresión de los genes codificadores del TGF- α .

El HBGF-1 atenúa el efecto del TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*), un potente inhibidor de la proliferación de los hepatocitos (ver más adelante). La síntesis de DNA por el hepatocito estimulada por HBGF-1 es mucho más resistente a la inhibición por TGF- β que la síntesis de DNA estimulada por EGF ¹⁰⁶.

En 1989, KAN y col. ¹⁰⁷ demostraron que la administración de HBGF-1 consigue una abolición casi completa del efecto inhibitorio sobre la proliferación hepatocitaria del TGF- β en hepatocitos en cultivos estimulados por EGF.

Parece ser, por tanto, que ésta citokina juega un doble papel en la regeneración hepática: por un lado, estimula la síntesis de DNA previamente o

coincidiendo con los estímulos de EGF/TGF- α y por otro, previene de las influencias inhibitorias locales (TGF- β).

La hipótesis postulada por éste mismo autor sugiere que el HBGF-1 expande la población de células en regeneración a través de un receptor de alta afinidad; la respuesta celular posterior al EGF/TGF- α produce una variación en el fenotipo de dicho receptor, convirtiéndolo en uno de baja afinidad, cuya ocupación por el HBGF-1 produce una inhibición de la proliferación celular. Recientemente, éste modelo ha sido puesto en duda por la observación de que la transcripción del RNAm para el HBGF-1 alcanza niveles elevados 24 horas después de la hepatectomía, lo que hace poco probable su participación en los eventos iniciales del proceso regenerativo ²³.

Otro factor de crecimiento no caracterizado completamente es el HSS (*Hepatic Stimulatory Substance*). Parece estar relacionado con el HBGF en cuanto a peso molecular y el común requerimiento de heparina para estimular el crecimiento de hepatocitos en cultivos primarios. Al contrario que otros mitógenos, parece ser específico para el hígado ¹⁰⁶. Aunque no parece ser un mitógeno primario para los hepatocitos en cultivo, actúa sinérgicamente con el EGF.

Otros factores de crecimiento, recientemente descubiertos y secuenciados, como el VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) ¹⁰⁸ y el ALR (*Augmentor of Liver Regeneration*) ¹⁰⁹ parecen ser importantes en el desarrollo de las células

endoteliales durante el proceso de regeneración hepática, aunque esté aún por determinar su verdadero papel en éste proceso.

En último lugar, la Hepatopoyetina B es reconocida como un mitógeno completo o primario, aunque menos activo que el EGF o HGF, con los que parece actuar sinérgicamente. Por la escasez de aminoácidos en su molécula, no es considerada como una citokina, sino un glicolípido ¹⁷.

NOREPINEFRINA

En cultivos primarios de hepatocitos, la norepinefrina amplifica la señal mitogénica tanto del EGF como del HGF, actuando sobre el receptor α_1 adrenérgico ¹¹⁰. La norepinefrina aumenta rápidamente en plasma en la primera hora después de una hepatectomía parcial ¹¹¹. Además, induce la secreción de EGF por las glándulas de Brunner del duodeno, facilitando, por tanto, mayores cantidades de EGF para el estímulo mitogénico de los hepatocitos ⁷¹. La norepinefrina también anula el efecto mitoinhibitorio del TGF- β en cultivos de hepatocitos aislados en las fases precoces del proceso regenerativo ¹¹². El prazosín (un bloqueante específico del receptor adrenérgico α_1) y la denervación simpática disminuyen de manera importante la síntesis de DNA a las 24 horas de la hepatectomía, aunque ésta retorna a valores normales alrededor de las 48 a las 72 horas ¹¹¹. La dependencia de la regeneración hepática de la norepinefrina parece por tanto deberse a todas estas razones.

INSULINA Y GLUCAGON

Los islotes pancreáticos producen insulina de modo continuo, y ésta alcanza el hígado a través de la circulación portal. Los trabajos iniciales de STARZL y col.³ demostraron que tras la realización de una derivación porto-cava se produce atrofia hepática, y que la infusión de insulina en el hígado previene o regenera la atrofia a través de un proceso que implica la replicación hepatocitaria. La insulina, sin embargo, no tiene efectos mitogénicos sobre los hepatocitos cuando se inyecta en animales normales.

La proliferación de hepatocitos en cultivo se ve aumentada por la insulina en presencia de factores de crecimiento, sin embargo, la insulina por sí misma no es un mitógeno primario para los hepatocitos.

Las observaciones descritas llevan a MICHALOPOULOS, en una revisión del pasado año²³ a plantear la teoría de que la insulina - como ocurre con la interleukina-6 - actúa en el proceso regenerativo iniciando unas vías de estimulación sin las cuales la señal mitogénica no avanza de modo normal; éste hecho no implica, para el citado autor, que los cambios en las concentraciones plasmáticas de insulina "*per se*" inicien los acontecimientos del proceso mitogénico. Las concentraciones de insulina en plasma decrecen de manera rápida después de una hepatectomía parcial, mientras que las de glucagón aumentan²³. MICHALOPOULÓS considera éste hecho como parte de la respuesta homeostática por la cual las concentraciones plasmáticas de glucosa se mantienen en un nivel adecuado durante el proceso regenerativo.

OTRAS SUSTANCIAS ESTIMULADORAS DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

La triyodotironina ¹¹³ y los derivados del ácido retinoico ¹¹⁴ han demostrado tener capacidad estimuladora de la síntesis de DNA por los hepatocitos "*in vivo*", pero no son efectivos en cultivos primarios. Un efecto similar se ha observado con el uso de nitrato de plomo, barbitúricos, antiepilépticos, diazepam y agentes hipolipemiantes ¹¹⁵. Estas sustancias no producen lesión tisular; a pesar de ello, inducen un aumento del peso del hígado (del 180% al 250%) a través de una combinación de eventos que incluyen síntesis de DNA por el hepatocito e hipertrofia celular ¹¹⁶. En éstos procesos no se aprecian cambios en el TGF- α o en el RNAm para el HGF, aunque OHMURA y col. ¹¹⁴ han observado un aumento en la producción de RNAm para TGF- α .

El aumento de peso del hígado producido por éstas sustancias parece estar en relación con una disminución de los receptores para insulina y EGF, lo que hace a los hepatocitos relativamente resistentes a los efectos mitogénicos del HGF y EGF ¹¹⁷.

PROTOONCOGENES

Durante los últimos 15 años, desde que las funciones del producto del primer protooncogen descubierto (*c-src*) fueron aclaradas, existe el convencimiento de que los productos de los protooncogenes se encuentran integrados dentro del "sistema de señales intracelular" ¹¹⁸.

Los estudios realizados en ratas muestran que la hepatectomía parcial se asocia a cambios rápidos en la expresión genética, que suceden de modo muy precoz tras la cirugía, y que demarcan el paso de los hepatocitos desde la fase G₀ a la fase G₁ ¹¹⁹. Este proceso fundamental en el fenómeno regenerativo debe considerarse la consecuencia de la cooperación entre protooncogenes, funcionando en cascada, y la interacción con los factores de crecimiento ¹²⁰.

La expresión de protooncogenes tras una hepatectomía parcial en la rata puede dividirse en 3 fases: una *fase precoz* (0 a 4 horas tras la intervención), una *fase intermedia* (8-14 horas) y una *fase tardía* (24-72 horas). Los protooncogenes C-fos, c-jun y c-myc pertenecen a la primera fase. El RNAm codificado por el C-fos aumenta de modo casi inmediato tras una hepatectomía parcial, alcanza un máximo a los 30 minutos (3 veces sobre el valor basal) y se normaliza alrededor de las 2 horas. La expresión del gen p53 sucede en la fase intermedia. Los genes de la familia c-ras se activan en la fase tardía y su expresión coincide con la síntesis de DNA y la proliferación de los hepatocitos ⁵⁸.

La expresión de los protooncogenes C-fos, c-jun y c-myc depende de la naturaleza del estímulo proliferativo: la hepatectomía parcial y la infusión de tetracloruro de carbono aumentan tanto la expresión del C-fos como del c-jun, y la administración de etileno o nitrato de plomo "disparan" la expresión únicamente del c-jun. Por el contrario, la hiperplasia inducida por acetato de ciproterona no se asocia con la expresión de ninguno de éstos protooncogenes pertenecientes a la fase precoz

121

En los últimos años, los modernos métodos de estudio y trabajo en biología molecular han permitido descubrir un número creciente de protooncogenes que participan en las diversas fases del proceso regenerativo ¹²², aunque una de las principales cuestiones aún sin resolver es en qué medida los protooncogenes están involucrados en los mecanismos de la regeneración hepática, o si deberían considerarse solamente como marcadores de éste proceso. Se desconoce también si su estructura molecular sufre alteraciones durante la regeneración hepática y cómo se alteran sus funciones y regulación en las enfermedades hepáticas.

Otra cuestión pendiente es la interacción de los protooncogenes con los factores de crecimiento y cuáles son las señales moleculares que inician, mantienen y finalizan el proceso de regeneración. A éste respecto, un interesante trabajo publicado recientemente por FAN y col. ¹²³ describe un grupo de protooncogenes relacionados con los procesos de proliferación, remodelación y finalización de la respuesta regenerativa, en base a una regulación de la apoptosis o muerte celular inducida por los mismos.

GASTRINA

La gastrina es una hormona producida por las células G del antro gástrico. Es conocida su intervención como regulador de la secreción ácida gástrica y sus importantes efectos tróficos demostrados a diferentes niveles del tracto digestivo. Aún hoy en día se desconoce el papel fisiológico de muchos de éstos efectos tróficos y la justificación de la existencia de receptores de gastrina en lugares inexplicables y alejados del antro gástrico.

Los primeros trabajos que intentaron valorar los efectos tróficos de la gastrina sobre el hígado fueron realizados por JOHNSON y col. en 1976 ⁴. Este autor utilizó un modelo experimental de estimulación con pentagastrina sin conseguir efectos tróficos sobre el hígado. Desde entonces hasta la fecha han sido numerosos los estudios al respecto, utilizando diferentes modelos experimentales y obteniendo, en muchos casos, resultados contradictorios ^{5,6,7,8,9,10,11}.

El primer trabajo en el que se demuestra un efecto trófico de la gastrina sobre los hepatocitos normales *in vitro* es el publicado por YAO y col. en 1995 ¹⁸; utilizando un modelo de cultivo de hepatocitos normales de ratón demuestran que la incorporación de gastrina-17 a los cultivos induce una respuesta proliferativa de los hepatocitos, aunque éste hecho sólo sucede en presencia de EGF. Los autores concluyen sugiriendo la incorporación de la gastrina al grupo de sustancias conocidas como "mitógenos secundarios".

La interacción entre gastrina y EGF había sido ya estudiada por KONTUREK en 1989 ²⁹. Esta relación ha sido confirmada por el mismo autor en un trabajo publicado en 1996 ³⁰, en el que demuestra que el estómago es capaz de segregar importantes cantidades de EGF y que la pentagastrina actúa como un potente estímulo para ésta secreción.

Por todo lo descrito anteriormente parecen existir evidencias, que pretendemos ampliar con éste trabajo, de que la gastrina puede ser considerada como un factor hepatotrófico y ser incluido dentro del grupo de mitógenos secundarios o co-mitógenos, según la terminología utilizada por MICHALOPOULOS ⁷¹.

SOMATOSTATINA

En 1968, KRULICH, DHARIWAL y Mc CANN ¹²⁴ extraen a partir de hipotálamos de oveja y rata una fracción que era capaz de inhibir la secreción de GH (hormona del crecimiento) en cultivos de células hipofisarias de rata *in vitro*. Al año siguiente, HELLMAN y LERNMARK ¹²⁵ introducen el concepto de la acción supresora por parte de las células D (hoy reconocidas como productoras de somatostatina) sobre la actividad endocrina pancreática ¹²⁶. El aislamiento y caracterización de la somatostatina vino en 1973 de la mano de BRAZEAU y col. ³⁴.

La amplia distribución de la somatostatina por el organismo ¹²⁷ se acompaña de una multitud de efectos biológicos fundamentalmente de tipo inhibitorio. En el tubo digestivo inhibe la secreción de prácticamente todos los péptidos gastrointestinales

además de disminuir la motilidad del tubo digestivo e interferir selectivamente la absorción de ciertos azúcares y la absorción intestinal de modo general. Asimismo se han descrito una serie de efectos biológicos de la somatostatina nativa con manifiesto interés terapéutico, como la reducción del flujo esplácnico y de la secreción de renina, aldosterona, parathormona y calcitonina. Más recientemente se ha observado su efecto citoprotector en modelos de pancreatitis aguda y en lesiones por isquemia-reperfusión hepática e intestinal ³⁵.

Todas éstas acciones biológicas de la somatostatina nativa se ven limitadas en su aplicación terapéutica por las adversas características farmacocinéticas de la misma: baja estabilidad metabólica, vida plasmática media corta (de menos de 3 minutos, lo que restringe su administración a la vía endovenosa en perfusión continua), la fugacidad de sus efectos biológicos y el rebote de la secreción hormonal que se observan al interrumpir su administración intravenosa ³⁶.

Mediante diversas modificaciones de la molécula inicial, BAUER y col. ³⁸ obtuvieron en 1982 el octapéptido SMS 201-995 (octreótido), con una mayor estabilidad metabólica y mayor potencia biológica que la somatostatina nativa. Sus características farmacocinéticas (vida media de 113 minutos en administración subcutánea y transporte fijado a proteínas plasmáticas), así como su menor coste económico, han hecho que el octreótido pase a sustituir a la somatostatina nativa en sus aplicaciones clínicas.

El mecanismo íntimo de acción de la somatostatina y sus análogos sintéticos se centra en la modificación de los niveles de AMPc o de GMPc en la célula diana, a través del estímulo o inhibición de la adenilato-ciclasa y/o modulando la permeabilidad a los iones calcio ^{40,41}.

A nivel gástrico, la somatostatina inhibe la secreción ácida y también la liberación de gastrina. La secreción de gastrina está mediada por neuronas colinérgicas que mantienen una acción inhibitoria de la secreción de somatostatina por las células D antrales, provocando de esta forma la liberación de gastrina por un mecanismo de desinhibición, y por neuronas no colinérgicas que estimulan directamente la secreción de gastrina por liberación del neurotransmisor bombesina ⁴³. Por otra parte, existe un mecanismo de retroalimentación por el cual la acidificación gástrica ($\text{pH} < 3$) estimula la secreción de somatostatina, que a su vez frena la liberación de gastrina.

Dentro del amplio espectro inhibitorio de ésta hormona, se han descrito su acción frenadora de la secreción de EGF ¹²⁸ y de TNF- α ¹²⁹, reconocidos mitógenos primarios de los hepatocitos.

Un trabajo publicado por PRUTHI y col en 1993 ⁴⁴ estudia el efecto del octreótido sobre la actividad regeneradora del hígado. Utilizando el modelo clásico de hepatectomía parcial observan tras la administración de octreótido una disminución del 33% en el peso del remanente hepático a las 72 horas y una disminución del 67% en la síntesis de DNA hepatocitario a las 24 horas, cuando lo

comparan con un grupo control sin octreótido. También describen que la acción inhibitoria del octreótido es máxima durante los períodos de máxima síntesis de DNA (entre las 24 y las 36 horas tras la hepatectomía), y que éste potente efecto supresor podía ser rápidamente revertido al suspender la administración de octreótido, sufriendo los hepatocitos un "efecto rebote" de hiperplasia celular, demostrando la bien documentada capacidad compensatoria de los hepatocitos para restablecer el tamaño normal del hígado ^{22,45}.

La reconocida acción inhibitoria de la somatostatina y sus análogos sobre la secreción de insulina y glucagón ⁵³ parece mostrarse como otro de los mecanismos por los cuales el octreótido es capaz de disminuir la capacidad regeneradora del hígado tras una hepatectomía parcial.

En base a los efectos biológicos demostrados de la somatostatina y sus análogos: reducción del flujo esplácnico, inhibición de insulina y glucagón y disminución de la secreción de mitógenos hepáticos primarios (TNF- α y EGF) y co-mitógenos (gastrina ?) el octreótido puede ser reconocido como un importante inhibidor de la regeneración hepática, hecho que intentaremos valorar en éste trabajo.

IV. MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL

Animales de experimentación

Se ha elegido como modelo animal de experimentación la rata Wistar. Se han utilizado un total de 50 animales, todas ellas hembras adultas y de un peso de 180 ± 20 gramos procedentes del Área de Reproducción del Centro de Investigación del Hospital Universitario "12 de Octubre de Madrid.

Las condiciones de hábitat, nutrición y manejo fueron homogéneas para todos los animales incluidos en el estudio.

Inicialmente se utilizaron 10 animales con el fin de familiarizarnos con la anatomía digestiva de la rata, la técnica quirúrgica a emplear y poder estandarizar los métodos de fijación y tinción requeridos para las distintas poblaciones celulares .

Los animales del estudio se distribuyeron en 3 grupos (Tabla I):

* **Grupo A** (n=10): ratas control no vagotomizadas a las que se realiza una hepatectomía parcial según la técnica que se describe posteriormente.

Este grupo se subdivide en :

* **Grupo As** (n=5): Ratas sometidas a hepatectomía parcial + administración de 0.25 ml de suero salino subcutáneo en el momento posterior a la hepatectomía y a las 12 horas siguientes.

* **Grupo Ao** (n=5): Ratas sometidas a hepatectomía parcial + administración de 0.25 mcgr de octreótido subcutáneo (Sandostatín®, Sandoz) en el momento posterior a la hepatectomía y a las 12 horas siguientes.

* **Grupo B** (n=10): Ratas sometidas a vagotomía troncular bilateral infradiaphragmática y piloroplastia de Heineke-Mickulicz 7 días previamente a la hepatectomía parcial.

Durante el periodo postoperatorio fallecieron 2 animales de este grupo por las causas que posteriormente se describen.

Este grupo se subdivide en :

* **Grupo Bs** (n=4): Sometidas a hepatectomía parcial + administración de 0.25 ml de suero salino subcutáneo en el momento posterior a la hepatectomía y a las 12 horas siguientes.

* **Grupo Bo** (n=4): Sometidas a hepatectomía parcial + administración de 0.25 mcgr de octreótido subcutáneo (Sandostatín®, Sandoz) en el momento posterior a la hepatectomía y a las 12 horas siguientes.

* **Grupo C** (n=20): Ratas sometidas a vagotomía troncular infradiafragmática y piloroplastia de Heineke-Mickulicz 120 días previamente a la hepatectomía parcial.

Durante el periodo postoperatorio fallecieron 12 animales de este grupo por las causas que se describen en el apartado "Morbimortalidad del Experimento".

Este grupo se subdivide en :

* **Grupo Cs** (n=4): Sometidas a hepatectomía parcial + administración de 0.25 ml de suero salino subcutáneo en el momento posterior a la hepatectomía y a las 12 horas siguientes.

* **Grupo Co** (n=4): Sometidas a hepatectomía parcial + administración de 0.25 mcgr de octreótido subcutáneo (Sandostatín®, Sandoz) en el momento posterior a la hepatectomía y a las 12 horas siguientes.

TABLA I
GRUPOS DEL ESTUDIO

GRUPO	Tiempo Vagotomía	Subgrupo Xs (Salino)	Subgrupo Xo (Octreótido)
A	NO	n= 5	n= 5
B	7 días	n= 4	n= 4
C	120 días	n= 4	n= 4

METODOS

El estudio se realizó de acuerdo con la normativa vigente sobre experimentación animal, aprobada en el Real Decreto 223 del 14 de Marzo de 1988 (B.O.E. 18 de Marzo de 1988).

Diseño experimental

PROTOCOLO PREOPERATORIO Y ANESTESICO

Los animales fueron aislados durante 24 horas antes del estudio instaurándoles dieta líquida, a base de agua, durante las 12 horas previas a ambas intervenciones.

Como agente anestésico se utilizó el éter, introduciendo a los animales en una campana cerrada. Se administró también a cada animal una dosis de 0.1 mg de sulfato de atropina (Atropina®, Palex) por vía intraperitoneal.

PROTOCOLO QUIRÚRGICO

A) Técnica de la vagotomía

Una vez anestesiado el animal, se procede a la desinfección de la zona quirúrgica con povidona yodada (Betadine®, Sarget).

Se empleó para ambas intervenciones instrumental de microcirugía. Para la realización de la vagotomía infradiafragmática se empleó el método descrito por SNOWDON y EPSTEIN (217). Se practica una laparotomía media; tras la liberación del esófago abdominal se mantiene tracción sobre el mismo para permitir la identificación de los troncos vagales, que se asilan y se seccionan (Figura 2).

Como procedimiento de drenaje gástrico se practica una piloroplastia según técnica de Heineke-Mickulicz, suturando los bordes en un solo plano con poliglactín de 5/0 (Vicryl®, Ethicon). La expresión manual de la cámara gástrica permite comprobar la eficacia de la piloroplastia y la no existencia de fugas.

Asimismo, en todos los animales se asoció una miotomía extramucosa del esófago distal de alrededor de 0.5 cm de longitud (técnica de Heller), para evitar la formación de bezoares a este nivel, basándonos en experiencias previas con la técnica de la vagotomía troncular en la rata.

A continuación se procede al lavado de la cavidad peritoneal con suero fisiológico y al cierre de la laparotomía en 2 planos con sutura continua de poliglactín de 2/0 (Vicryl®, Ethicon).

B) Técnica de la hepatectomía

Los animales de los grupos estudio (B y C), vagotomizados 7 y 120 días antes

y los pertenecientes al grupo control son sometidos a hepatectomía parcial.

Siguiendo el mismo protocolo preoperatorio y anestésico se realiza en una misma sesión una hepatectomía parcial del lóbulo lateral izquierdo mediante ligadura de la base del mismo con catgut nº 0 según técnica propia, lo que supone la exéresis de alrededor del 10-15% del hígado de la rata (Figura 3).

Como se comentó anteriormente, cada grupo de estudio se divide en dos subgrupos. En el primero de ellos (Xs) se administra una dosis subcutánea de 0.25 ml de suero salino inmediatamente después de la intervención y a las 12 horas de la misma. En el segundo (Xo) se administra en tiempos similares una dosis subcutánea de 0.25 mcgr de octreótido (Sandostatín®, Sandoz).

El fragmento de tejido hepático resecado se fija en una solución de formol al 10% y se identifica el recipiente con los datos correspondientes al animal del estudio.

PROTOCOLO DE CUIDADOS POSTOPERATORIOS

Una vez concluidas ambas intervenciones, y con el fin de identificar a los animales a lo largo del estudio, se realizaron distintos cortes en las orejas de cada animal de acuerdo con una clave previamente establecida y se aislaron por grupos (según la fecha de la vagotomía) en diferentes jaulas.

Todos los animales se mantuvieron en dieta absoluta durante las 12 horas siguientes a la intervención, instaurándose dieta líquida a base de agua durante las 12 horas siguientes. A partir de las 24 horas tras la intervención, en el caso de la vagotomía, se instauró una dieta normal.

Necropsia y extracción del remanente hepático y del estómago

A las 24 horas de la hepatectomía, todos los animales del estudio fueron sacrificados, extrayéndose el remanente hepático y el estómago en su totalidad.

Una vez anestesiado el animal, se practicó la relaparotomía prolongando la incisión hasta el tórax. Inmediatamente después se realizó la extracción del remanente hepático liberándolo de sus fijaciones vasculares. Igualmente se practicó la extracción del estómago en bloque, mediante una sección transversal a nivel del tercio medio esofágico y primera porción duodenal.

Con el fin de realizar una limpieza de la cavidad gástrica, se introdujo un catéter de venopunción (Abbocath® 16-G, Abbot) a través de la luz del esófago, irrigando la luz gástrica con suero salino a baja presión, hasta conseguir un flujo limpio, sin restos alimentarios.

El remanente hepático se fijó en una solución de formol al 10%, mientras que el estómago fue seccionado longitudinalmente a lo largo de la curvatura mayor y extendido

en "alas de mariposa", fijándolo sobre un soporte y sumergiendo el mismo en una solución de formol al 10%

ESTUDIO HISTOLOGICO

CELULAS G

Fijación y tinción

Todas las piezas se fijaron en una solución de formol al 10%, para su posterior inclusión en parafina, previa deshidratación con alcoholes a concentraciones crecientes. Con un microtomo convencional se realizaron cortes de 5 micras de espesor.

La desparafinización se realizó con xileno y el consiguiente paso de la muestra dos veces por alcohol absoluto y una por etanol al 50%.

El método de tinción se llevó a cabo mediante la técnica peroxidasa-antiperoxidasa (PAP)¹³⁰, siguiendo el esquema expuesto a continuación:

- 1.- Se bloquea la peroxidasa endógena tisular (células sanguíneas, etc) tratando las secciones con H₂O₂ al 0.3%, en metanol al 100% durante 30 minutos a temperatura ambiente.

- 2.- Se lavan los cortes con *buffer* fosfato salino (PBS) 1/15 M, pH 7.4, tras lo cual se bloquea la tinción inespecífica de fondo (tejido conectivo) colocando sobre cada sección unas gotas de suero normal no inmune de cerdo (DAKO Labs) al 10% durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 3.- Posteriormente, se procede a la incubación de las secciones con los antiseros producidos contra la hormona a estudiar, en éste caso, la gastrina. Se ha utilizado una dilución de 1/300 para el antisuero antigastrina, que no presenta reacción cruzada con otros péptidos relacionados estructuralmente con la gastrina-17 y la gastrina-34. La incubación se mantiene durante 12-24 horas en frigorífico (0-4°C)
- 4.- En el siguiente paso, se lavan las secciones con PBS y se añade suero no conjugado anti-conejo (animal del que se obtuvieron los anticuerpos). Se utilizó suero de cerdo anticonejo (DAKO Labs) a una dilución 1:100, durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Se vuelve a lavar con PBS y se hacen reaccionar las secciones con el complejo peroxidasa-antiperoxidasa (PAP, DAKO Labs) a una dilución 1:100, durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 6.- La reacción se visualiza revelándola con 3-3-Diaminobenzídina tetrahidrocloridrato (DAB), Sigma LABS). El revelado se realiza bajo control microscópico, controlando el tiempo de iniciación que no debe sobrepasar los 10

minutos (generalmente 2-3 minutos).

- 7.- La reacción se detiene lavando varias veces las secciones con agua destilada. Posteriormente, los núcleos celulares se contratiñen con hematoxilina de Harris y, tras su deshidratación, se montan según la técnica histológica habitual.

Lectura microscópica

Todas las muestras del estudio fueron contabilizadas por la misma persona, que desconocía el origen de cada muestra.

Las mediciones se realizaron con un sistema semiautomático de análisis de imagen Cue-2® de Olympus con Software Microimage®. Este sistema está dotado de una cámara de vídeo acoplada a un microscopio Olympus BH-2®; de esta forma la imagen es captada a bajos aumentos (objetivo 10X, ocular 5X) y transferida a un monitor en el que mediante un cursor se miden las distancias entre las distintas estructuras conforme al método descrito por AHERNE ¹³¹ para la medición de densidades numéricas de estructuras particuladas. Describimos dicho método a continuación:

- 1.- Consideramos la mucosa antral de la rata.
- 2.- Escogemos un punto (P) al azar dentro de la mucosa.
- 3.- Se mide la distancia (X) desde éste punto al centro de la célula G más cercana (C₁).

- 4.- Se traza una perpendicular a la línea que une dicha célula (C_1) con el punto P, eliminándose todas las células que quedan en el semiplano que contiene al punto P.
- 5.- Medimos otra distancia (Y) desde la célula C_1 hasta la siguiente célula G más próxima.
- 6.- Esta operación se repite sucesivamente n veces. En nuestro caso, hemos medido 10 pares de distancias, que es lo recomendado por AHERNE..
- 7.- Se aplica la siguiente ecuación:

$$A_c = \pi / 2n \sum_1^n (X_i^2 + \frac{1}{2} Y_i^2)$$

Dicha ecuación nos expresa la unidad de área de mucosa por célula (A_c); su inversa ($D = 1/A_c$) será el número de células por unidad de área (nº de células / mm^2 de superficie mucosa).

En todos los casos sólo se contabilizaron aquellas células en las que se observaba el núcleo, descartándose por tanto los fragmentos de citoplasma.

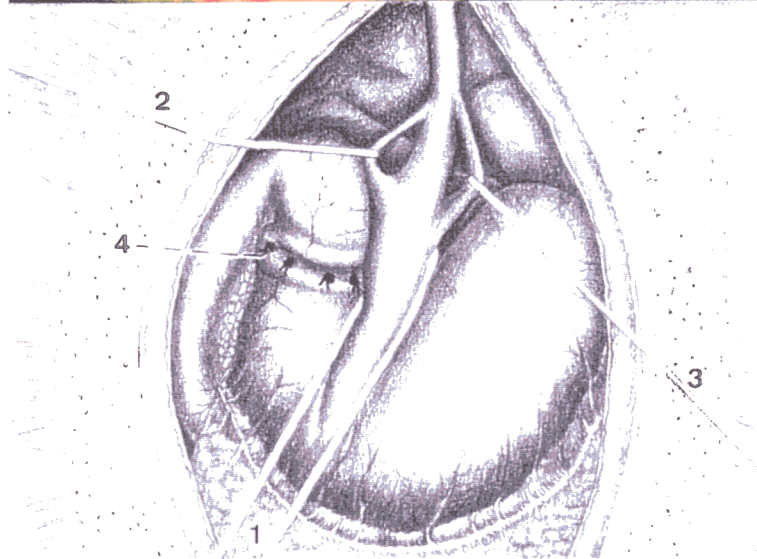
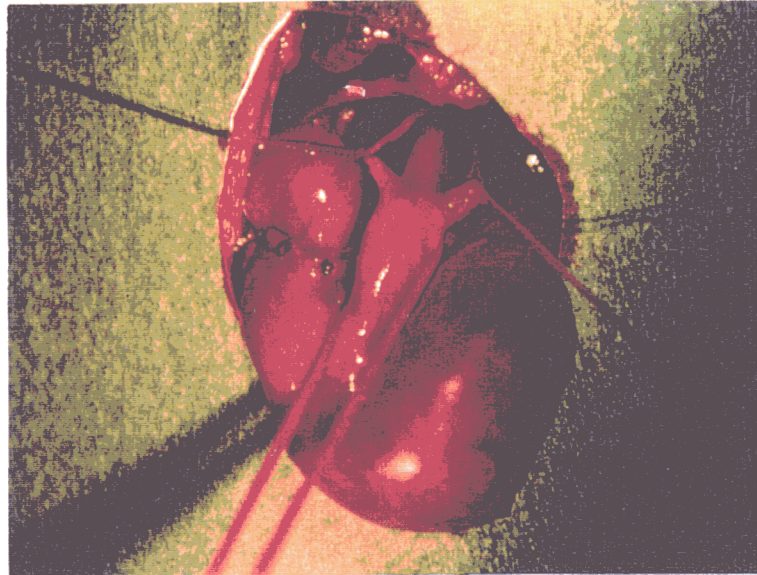
INDICE PROLIFERATIVO

El índice proliferativo se ha valorado cuantificando los núcleos hepatocitarios, teñidos por técnicas de inmunohistoquímica (peroxidasa-antiperoxidasa) con anticuerpos frente a PCNA (*antígeno nuclear de proliferación celular*). Hemos utilizado anticuerpo de DAKO Labs a una dilución de 1/100. Se ha medido la densidad nuclear de núcleos

positivos respecto a los núcleos totales por unidad de área con el mismo sistema semiautomático de análisis de imagen y la misma metodología para la medición de densidades celulares que hemos descrito anteriormente (Figuras 4 y 5).

El PCNA es una molécula de 36 kDa que actúa como cofactor de la DNA-polimerasa δ , tanto en la fase S como en la síntesis de DNA asociada a la reparación del mismo. La molécula de DNA tiene una vida media muy larga, de forma que al salir de la fase M las células pueden tener niveles detectables de DNA durante largos períodos. Además se pueden encontrar pequeñas cantidades en células en reposo y su expresión también se puede inducir por factores de crecimiento celular tanto *in vivo* como *in vitro*

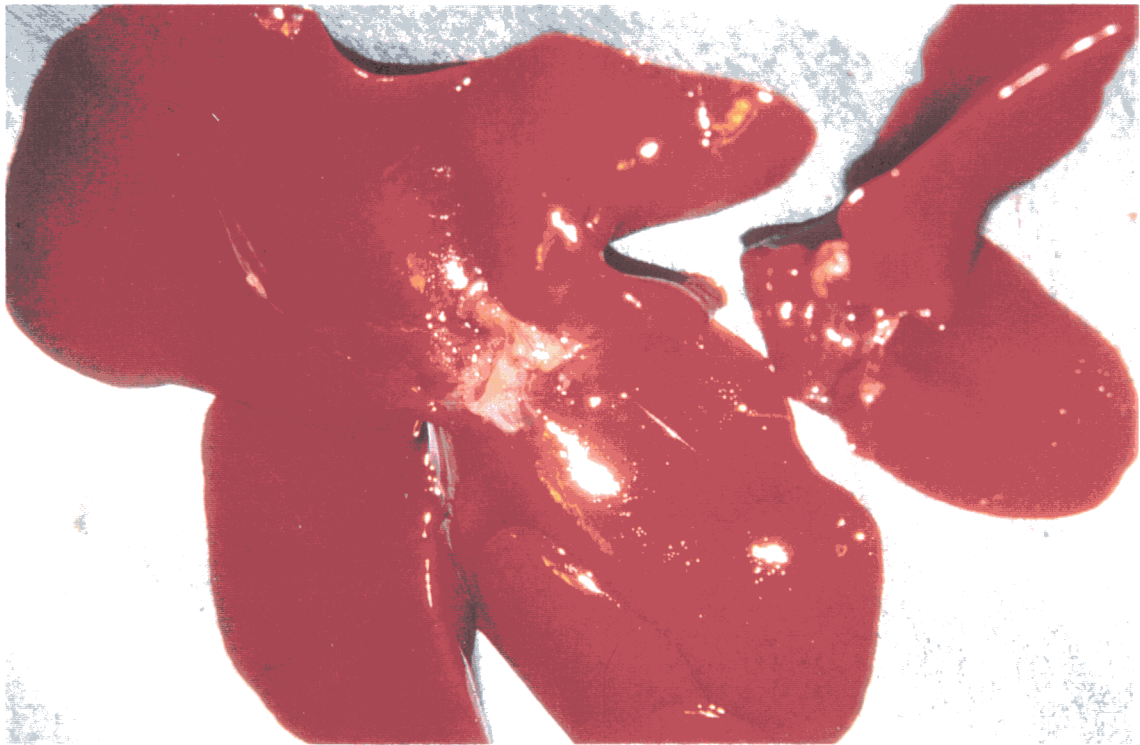
FIGURA 2



TECNICA DE LA VAGOTOMIA

- 1.- Tracción esofágica
- 2-3.- Nervios vagos aislados
- 3.- Píloroplastia

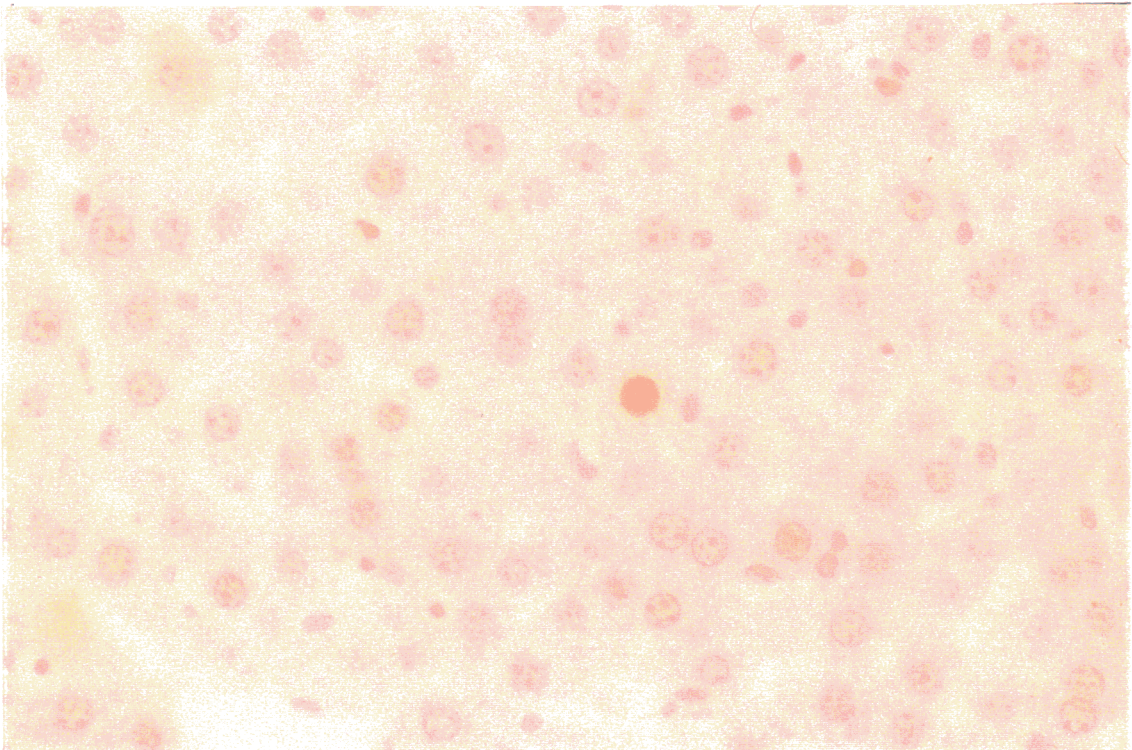
FIGURA 3



TECNICA DE LA HEPATECTOMIA

Hepatectomía parcial del lóbulo lateral izquierdo de la rata (técnica propia)

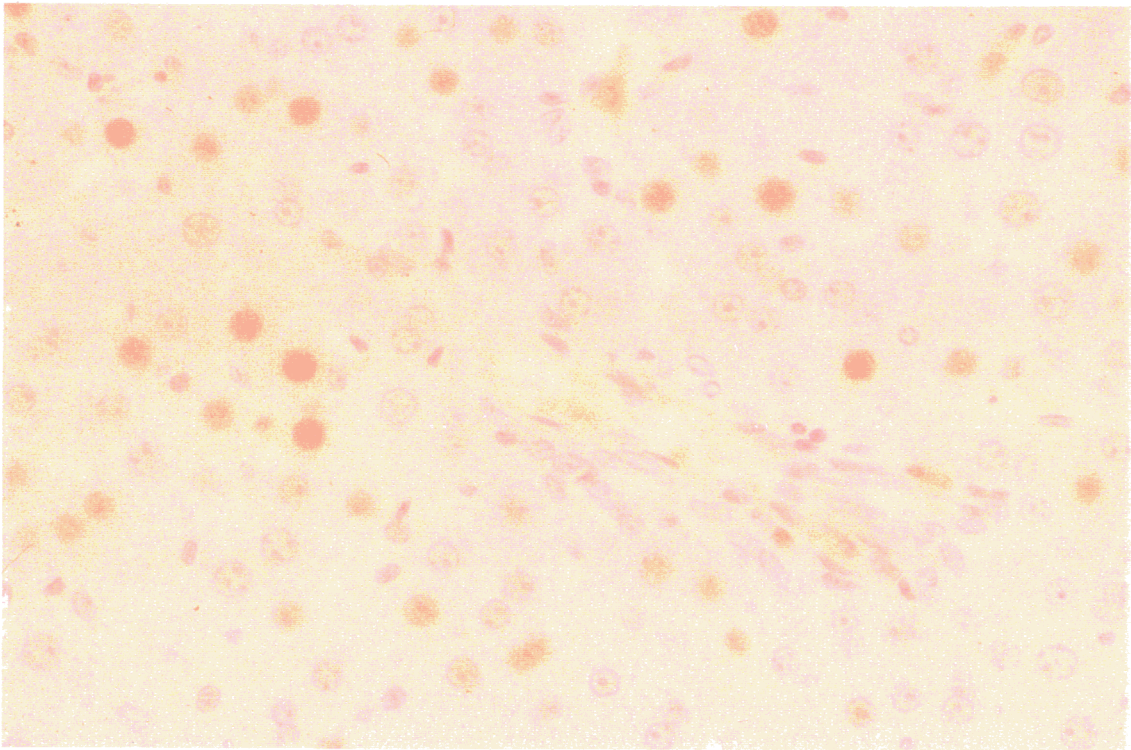
FIGURA 4



INMUNOHISTOQUIMICA

Hígado normal basal. Escaso índice proliferativo. Sólo se observa un núcleo hepatocitario teñido. (PAP anti-PCNA 50x).

FIGURA 5



INMUNOHISTOQUIMICA

Hígado tras hepatectomía parcial . Alto índice proliferativo. Numerosos hepatocitos muestran tinción positiva. (PAP anti-PCNA 50x).

ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados obtenidos se procesaron mediante la aplicación *SPSS / PC*® for *Windows*, versión 6.0. La representación gráfica se obtuvo con el programa *Microsoft Power Point*®, versión 6.0, de Microsoft Corp.

ESTADISTICA DESCRIPTIVA

Los datos experimentales se expresan en cada grupo de estudio por su tamaño muestral, medidas de centralización (media aritmética) y medidas de dispersión (desviación típica y error estándar). Los resultados finales se expresan como media aritmética ± 2 errores estándar (95% del intervalo de confianza para la media).

ESTADISTICA ANALITICA

Dado que los grupos del estudio estaban compuestos por entre 8 y 10 animales y que las desviaciones respecto a la normalidad son difíciles de detectar en estos casos, el análisis estadístico se realizó mediante el test o prueba U de Mann-Withney, de carácter no paramétrico, que no presupone ningún tipo de distribución de probabilidad para los datos y que permite detectar si existen diferencias, en cuanto a las medidas de centralización, entre dos muestras independientes. Se asumió la existencia de significación estadística cuando $P < 0.05$.

V. RESULTADOS

RESULTADOS

MORBIMORTALIDAD DEL EXPERIMENTO

De los 40 animales intervenidos en el presente estudio, 14 de ellos fueron excluidos del mismo por fallecer durante el periodo postoperatorio de la vagotomía troncular. Ningún animal falleció tras la hepatectomía parcial.

De los 14 animales que fallecieron, 2 de ellos pertenecían al grupo B (vagotomía de 7 días) y 12 al grupo C (vagotomía de 120 días); no falleció ninguno de los animales del grupo control no sometidos a vagotomía. Este dato refleja la elevada mortalidad de la técnica de la vagotomía troncular con piloroplastia y miotomía de Heller en la rata, y será discutido más adelante.

Las causas de la muerte, tras el estudio necrópsico fueron las siguientes:

CAUSA	Nº ANIMALES	GRUPO B	GRUPO C
Hemorragia	5	1	4
Evisceración	5	0	5
Obstrucción	2	0	2
Desconocida	2	1	1

POBLACION DE CELULAS G EN EL ANTRO GASTRICO

Para cada uno de los grupos estudiados se ha medido la población de células G por mm² de superficie mucosa en el antro gástrico del animal de experimentación según la técnica que se describe en el apartado *Material y Métodos*.

Asimismo, subdividimos cada grupo de estudio en dos subgrupos, dependiendo de si se administró suero salino u octreótido tras la hepatectomía parcial (24 horas antes del sacrificio)

ANIMALES GRUPO CONTROL

Este grupo de animales sanos no sometidos a vagotomía previa, pertenecen al grupo control o testigo (A); los valores obtenidos se utilizan como datos de referencia para la comparación estadística con los valores del resto de las series. Los datos de dicho grupo se encuentran reflejados en las tablas II y III.

Grupo suero salino

Obtuvimos un total de 80.22 ± 10.2 células G por mm² de superficie mucosa.

Grupo octreótido

Los valores de células G por mm² de superficie mucosa fueron 80.10 ± 22.3 .

ANIMALES GRUPO B (7 días post-vagotomía)

Grupo suero salino

Se obtuvieron unos valores de células G de 455.58 ± 129.92 por mm^2 de superficie mucosa (Tabla IV).

Grupo octreótido

Obtuvimos para este grupo un total de 185.80 ± 111.1 células G por mm^2 de superficie mucosa (Tabla V).

ANIMALES GRUPO C (120 días post-vagotomía)

Grupo suero salino

Se contabilizaron 157.14 ± 89.12 células G por mm^2 de superficie mucosa (Tabla VI).

Grupo octreótido

Los valores obtenidos fueron 131.99 ± 24.48 células G por mm^2 de superficie mucosa; los resultados se reflejan en la Tabla VII

ANALISIS ESTADISTICO : POBLACION DE CELULAS G EN EL ANTRO GASTRICO.

En primer lugar hemos realizado la comparación (aplicando el test U de Mann-Whitney) de la población de células G entre los dos subgrupos (salino y octreótido) de cada grupo de estudio para valorar la influencia que la administración de octreótido 24 horas antes del sacrificio puede tener sobre la densidad de la población de células G productoras de gastrina.

Respecto al grupo B (7 días post-vagotomía) hemos encontrado una diferencia estadísticamente significativa en la densidad de células G entre los dos subgrupos (suero salino y octreótido), con una $P=0.019$, lo que parece indicar que en la fase aguda de hiperplasia de células D la administración de octreótido - incluso 24 horas antes del sacrificio- puede disminuir la citada reacción hiperplásica de las células G productoras de gastrina (Figura 6).

Para los demás grupos de estudio no hemos encontrado diferencias estadísticas, siendo la P de 0.99 para el grupo control y de 0.62 para el grupo C (120 días post-vagotomía) (Figuras 7 y 8).

Al comparar la población de células G de los grupos B (7 días post-vagotomía) y C (120 días post-vagotomía) con el grupo control no sometido a vagotomía hemos encontrado lo siguiente:

La población de células G en el grupo B (7 días post-vagotomía) se encuentra muy elevada cuando la comparamos con el grupo control, resultando una $P=0.007$.

La población de células G en el grupo C (120 días post-vagotomía) presenta también una elevación estadísticamente significativa al compararla con el grupo control, siendo la $P=0.02$. La representación gráfica de éstos datos aparece en la Figura 9.

En resumen, los **datos obtenidos reflejan una importante influencia de la vagotomía, tanto a corto plazo (7 días), como a largo plazo (120 días) sobre la elevación en la población de células G antrales de la rata; por otro lado, la administración de octreótido 24 horas antes del sacrificio influye significativamente sobre la densidad de células G únicamente en la fase "aguda" de la hiperplasia celular y no en la fase crónica.**

TABLA II

POBLACION DE CELULAS G ANTRALES

RATAS GRUPO CONTROL SIN VAGOTOMIA (GRUPO A)

Administración de suero salino tras la hepatectomía

CASO	Células G/mm ² de superficie mucosa
As-1	87.64
As-2	69.97
As-3	91.64
As-4	66.07
As-5	85.79
MEDIA	80.22
DESVIACION TIPICA	11.42
ERROR ESTANDAR	5.10

TABLA III
POBLACION DE CELULAS G ANTRALES
RATAS GRUPO CONTROL SIN VAGOTOMIA (GRUPO A)
 Administración de octreótido tras la hepatectomía

CASO	Células G/mm² de superficie mucosa
Ao-1	121.96
Ao-2	83.69
Ao-3	65.94
Ao-4	60.42
Ao-5	68.52
MEDIA	80.10
DESVIACION TIPICA	24.93
ERROR ESTANDAR	11.15

TABLA IV

POBLACION DE CELULAS G ANTRALES
 RATAS GRUPO B (7 días post-vagotomía)
 Administración de suero salino tras la hepatectomía

CASO	Células G/mm ² de superficie mucosa
Bs-1	404.12
Bs-2	618.33
Bs-3	487.45
Bs-4	312.43
MEDIA	455.58
DESVIACION TIPICA	129.92
ERROR ESTANDAR	64.96

TABLA V

POBLACION DE CELULAS G ANTRALES

RATAS GRUPO B (7 días post-vagotomía)

Administración de octreótido tras la hepatectomía

CASO	Células G/mm ² de superficie mucosa
Bo-1	245.30
Bo-2	311.99
Bo-3	105.93
Bo-4	80.00
MEDIA	185.80
DESVIACION TIPICA	111.11
ERROR ESTANDAR	55.55

TABLA VI

POBLACION DE CELULAS G ANTRALES
RATAS GRUPO C (120 días post-vagotomía)
 Administración de suero salino tras la hepatectomía

CASO	Células G/mm² de superficie mucosa
Cs-1	89.74
Cs-2	96.53
Cs-3	160.25
Cs-4	282.07
MEDIA	157.14
DESVIACION TIPICA	89.13
ERROR ESTANDAR	44.56

TABLA VII
POBLACION DE CELULAS G ANTRALES
RATAS GRUPO C (120 días post-vagotomía)
Administración de octreótido tras la hepatectomía

CASO	Células G/mm² de superficie mucosa
Co-1	139.64
Co-2	96.49
Co-3	139.10
Co-4	152.74
MEDIA	131.99
DESVIACION TIPICA	24.49
ERROR ESTANDAR	12.24

FIGURA 6

POBLACION DE CELULAS G EN EL GRUPO B

(7 días post-vagotomía)

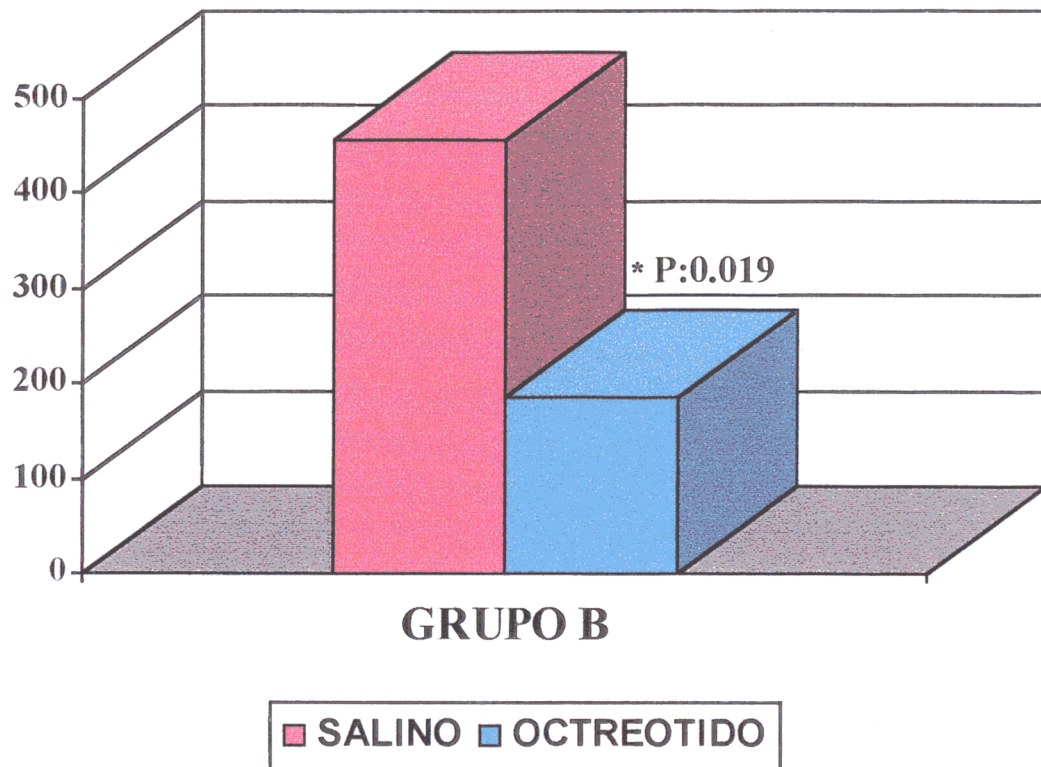


FIGURA 7

POBLACION DE CELULAS G EN EL GRUPO CONTROL

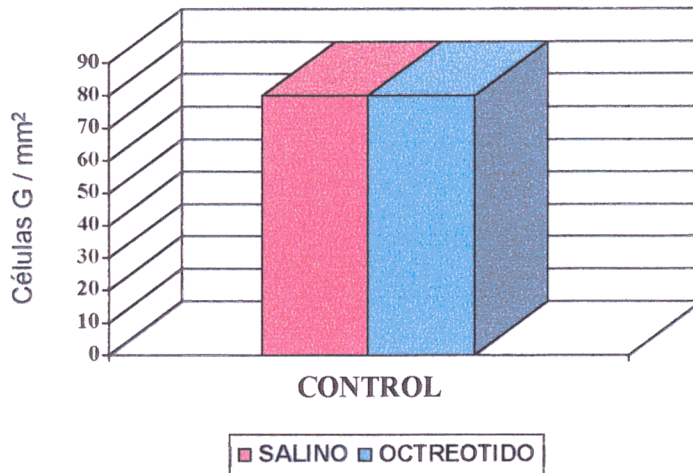


FIGURA 8

POBLACION DE CELULAS G EN EL GRUPO C

(120 días post-vagotomía)

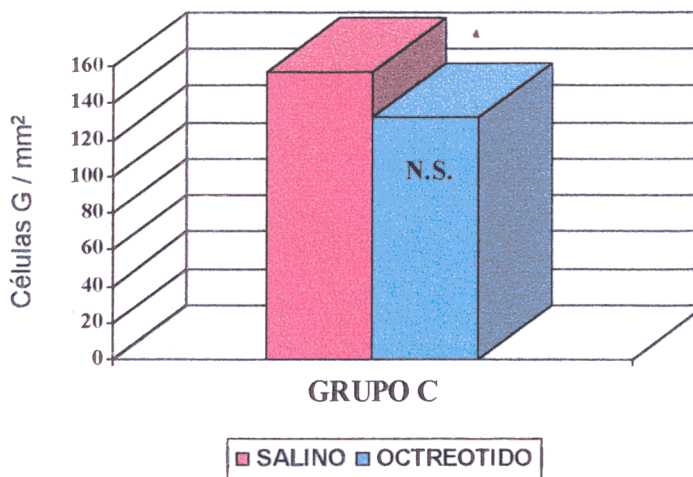
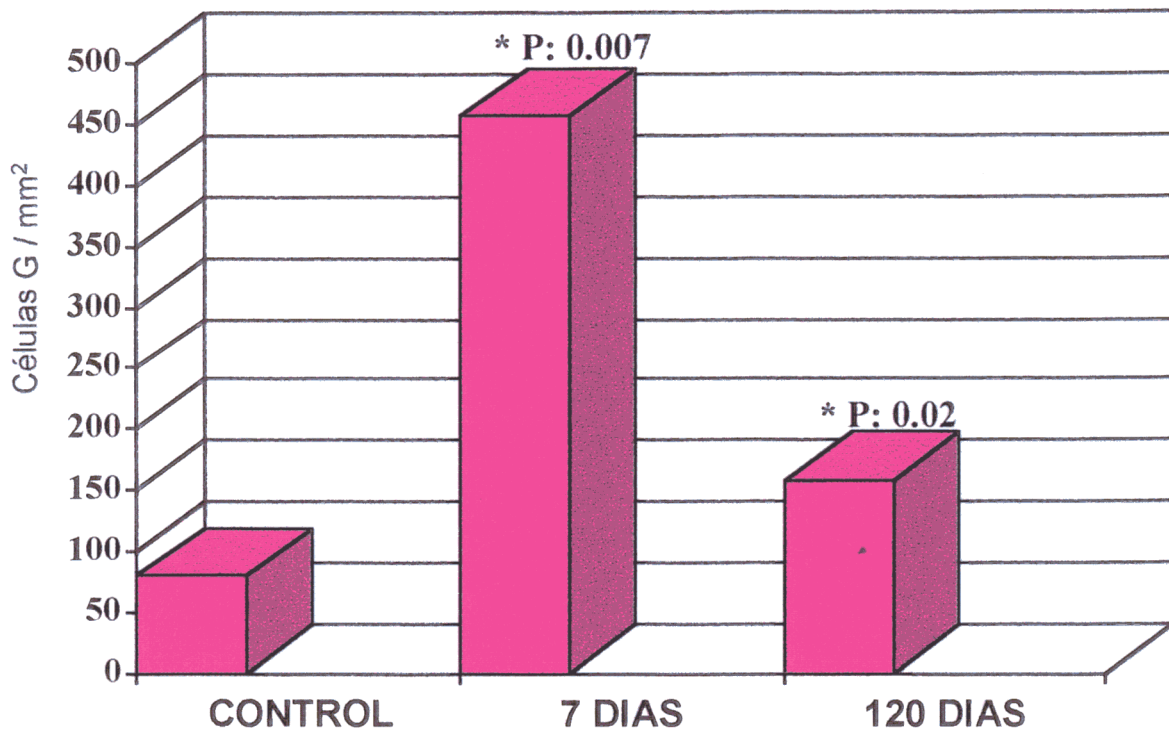


FIGURA 9**EVOLUCION DE LA POBLACION DE CELULAS G TRAS
VAGOTOMIA TRONCULAR
(Administración de suero salino)**

INDICE DE REGENERACIÓN HEPÁTICA

Se utilizó para la determinación del índice de regeneración hepática basal (en hepatectomía parcial) y estimulado (en remanente hepático a las 24 horas) la determinación del PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), como se describe en el apartado *Material y métodos*.

Como unidades de medida se han utilizado la determinación del porcentaje de núcleos PCNA +, el número de núcleos PCNA + por mm² de superficie mucosa y el número total de núcleos por mm²; éste último parámetro no es útil para valorar la homogeneidad de las muestras de tejido hepático procedentes de los diferentes grupos de animales utilizados en el estudio.

Los valores obtenidos para los diferentes parámetros evaluados, tanto para la muestra de hepatectomía parcial como para el remanente hepático a las 24 horas en los subgrupos con administración de suero salino u octreótido se reflejan en las Tablas VIII a la XVI.

ANALISIS ESTADISTICO: REGENERACION HEPATICA

REGENERACION HEPATICA BASAL (HEPATECTOMIA PARCIAL)

En primer lugar, como test de homogeneización de la muestra, hemos aplicado para cada grupo el test de bondad de ajuste a una normal (test de Kolgomorov-Smirnov), en base al número total de núcleos por mm² de las muestras de hepatectomía parcial. El resultado del citado test demuestra que las muestras son homogéneas y proceden de una misma población.

Cuando comparamos el porcentaje de núcleos PCNA + de las muestras del grupo B (7 días post vagotomía) con los valores del grupo control sin vagotomía no encontramos diferencias significativas (P=0.35). Lo mismo sucede al comparar el grupo C (120 días post vagotomía) con el grupo control, donde obtenemos una P=0.55. Si el parámetro que comparamos entre los diferentes grupos y el grupo control es el número de núcleos PCNA + por mm² tampoco encontramos diferencias significativas (grupo C: P=0.99; grupo A: P=0.40) (Figuras 10 y 11).

En resumen, los resultados obtenidos sobre el índice de regeneración hepática basal, medido en términos del porcentaje de núcleos PCNA + de las muestras procedentes de hepatectomía parcial indican que **la vagotomía no influye sobre el índice de regeneración hepática sobre el hígado intacto (hepatectomía parcial).**

TABLA VIII

PCNA EN HEPATECTOMIA PARCIAL

RATAS GRUPO CONTROL SIN VAGOTOMIA (GRUPO A)

CASO	% NUCL. PCNA +	NUCL. PCNA + /mm ²	TOTAL NUCL. /mm ²
A-1	4.92	73.55	1492.03
A-2	4.86	73.55	1513.05
A-3	3.90	52.53	1344.93
A-4	1.81	31.52	1733.70
A-5	2.59	42.02	1618.12
A-6	2.98	42.02	1407.97
A-7	2.18	31.52	1460.51
A-8	2.15	31.52	1460.51
A-9	1.29	21.01	1618.12
A-10	1.08	21.01	1943.84
MEDIA	2.77	42.02	1557.19
D. TIP.	1.37	19.18	177.90
E.E.	0.43	6.06	56.25

D.TIP.: Desviación típica; E.E.: Error estándar para la media.

TABLA IX
PCNA EN HEPATECTOMIA PARCIAL
RATAS GRUPO B (7 días post-vagotomía)

CASO	% NUCL. PCNA+	NUCL. PCNA + /mm²	TOTAL NUCL. /mm²
B-1	2.65	31.52	1187.32
B-2	5.66	63.04	1113.77
B-3	2.51	42.02	1670.65
B-4	4.67	52.53	1124.28
B-5	2.40	31.52	1313.41
B-6	3.33	42.02	1260.87
B-7	3.36	42.02	1260.87
B-8	2.34	31.52	1344.93
MEDIA	3.36	42.02	1284.51
D. TIP.	1.20	11.23	176.86
E.E.	0.42	3.97	62.53

D.TIP.: Desviación típica; E.E.: Error estándar para la media.

TABLA X

PCNA EN HEPATECTOMIA PARCIAL

RATAS GRUPO C (120 días post-vagotomía)

CASO	% NUCL. PCNA +	NUCL. PCNA + /mm ²	TOTAL NUCL /mm ²
C-1	1.61	21.01	1302.90
C-2	2.61	42.02	1607.61
C-3	3.73	52.53	1407.97
C-4	1.87	31.52	1681.16
C-5	1.44	21.01	1450.00
C-6	3.20	42.02	1313.41
C-7	2.11	31.52	1492.03
C-8	3.00	42.02	1397.47
MEDIA	2.44	35.45	1456.56
D. TIP.	0.81	11.14	133.37
E.E.	0.28	3.93	47.15

D.TIP.: Desviación típica; E.E.: Error estándar para la media.

FIGURA 10

PCNA EN LA MUESTRA BASAL

(HEPATECTOMIA PARCIAL)

Porcentaje de núcleos PCNA +

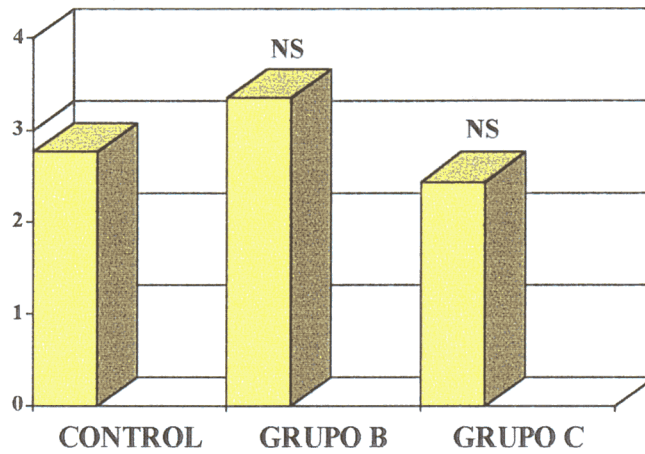
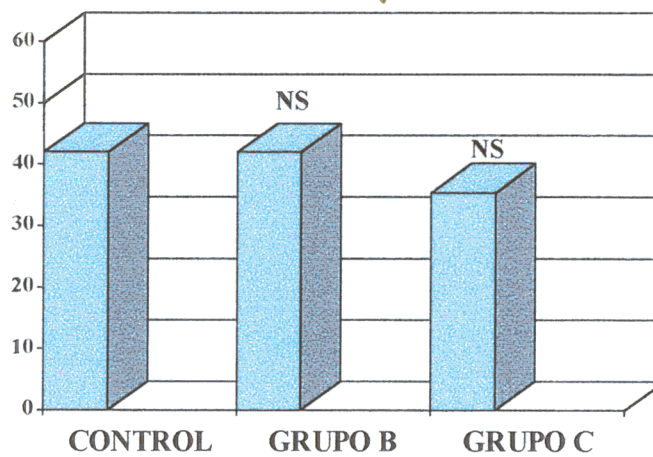


FIGURA 11

PCNA EN LA MUESTRA BASAL

(HEPATECTOMIA PARCIAL)

Núcleos PCNA + por mm²



REGENERACION HEPATICA ESTIMULADA (HEPATECTOMIA TOTAL)

Como en el apartado anterior, inicialmente hemos valorado la homogeneidad de los grupos de estudio en base al número total de núcleos de las muestras (resto del hígado) aplicando el test de Kolgomorov-Smirnov. Los resultados del mismo confirman que las muestras se ajustan a una teórica distribución normal.

En primer lugar hemos comparado el índice de regeneración hepática (porcentaje de núcleos PCNA +) en el grupo control en la muestra basal (hepatectomía parcial) y en el remanente hepático (a las 24 horas). Hemos observado un aumento significativo en el porcentaje de núcleos que expresan el PCNA (2.77 ± 0.86 versus 5.03 ± 0.92), obteniendo una $P=0.02$ (Figura 12). Cuando el parámetro que comparamos es el número de núcleos PCNA + /mm² (42.02 ± 19.1 versus 75.6 ± 15.5) obtenemos igualmente diferencias significativas, con una $P=0.03$ (Figura 13). Estos resultados confirman que la resección de un 10% -15% de tejido hepático es en este estudio un estímulo suficiente para el inicio del proceso de regeneración hepática en la rata Wistar.

Cuando comparamos el porcentaje de núcleos PCNA + en el grupo B sin octreótido (7 días post-vagotomía) con el grupo control de animales no vagotomizados (y sin octreótido) observamos significativas diferencias, resultando una $P=0.02$ (Figura 14). Si comparamos en los mismos animales el número de núcleos PCNA + por mm² obtenemos una $P=0.004$ (Figura 15). Lo mismo sucede al

comparar el porcentaje de núcleos PCNA + y el número de núcleos PCNA + /mm² entre el grupo C sin octreótido (120 días post-vagotomía) con el mismo grupo control, donde obtenemos unos valores para la P de 0.03 y 0.002 respectivamente (Figuras 16 y 17).

Para valorar el efecto de la administración de octreótido sobre el índice de regeneración hepática hemos comparado para cada grupo el valor del porcentaje de núcleos PCNA + y el número de núcleos PCNA + por mm² en los animales que recibieron tratamiento con octreótido durante 24 horas con los que recibieron suero salino durante el mismo período de tiempo. Encontramos, tanto para el grupo B (7 días post-vagotomía), como para el grupo C (120 días post-vagotomía) y para el grupo control sin vagotomía diferencias significativas (Porcentaje de núcleos PCNA + : grupo B: P=0.002; grupo C: P=0.01; grupo control: P=0.02); (Número de núcleos PCNA + por mm²: grupo B: P=0.03; grupo C: P=0.004; grupo control: P=0.004) (Figuras 18 a 23).

Como resumen, y según los resultados presentados en este estudio, podemos concluir que la vagotomía a corto (7 días) y largo plazo (120 días) produce un aumento en la regeneración hepática medida como porcentaje de expresión del PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) en los núcleos en regeneración y como número absoluto de núcleos por unidad de superficie que expresan el citado antígeno en las muestras estudiadas.

Por otro lado, se observa en todos los grupos de estudio una **significativa disminución en el índice de regeneración hepática tras la administración de octreótido** subcutáneo en dosis de 0.25 mcgr en el momento posterior a la hepatectomía parcial y a las 12 horas. **Esta inhibición de la regeneración hepática se observa tanto en los dos grupos de estudio** (grupo B: vagotomía 7 días antes; grupo C: vagotomía 120 días antes) **como en el grupo de animales control no sometidos a vagotomía.**

TABLA XI

PCNA EN REMANENTE HEPATICO

RATAS GRUPO CONTROL SIN VAGOTOMIA (GRUPO A)

Administración de suero salino tras la hepatectomía

CASO	%NUCL. PCNA +	NUCL. PCNA+ /mm ²	TOTAL NUCL. /mm ²
As-1	5.29	84.05	1586.60
As-2	4.92	73.55	1492.03
As-3	6.03	73.55	1218.84
As-4	3.31	52.53	1586.60
As-5	5.62	94.56	1681.16
MEDIA	5.03	75.64	1513.04
D. TIP.	1.04	15.58	177.53
E.E.	0.46	6.96	79.39

D.TIP.: Desviación típica; **E.E.:** Error estándar para la media.

TABLA XII

PCNA EN REMANENTE HEPATICO

RATAS GRUPO CONTROL SIN VAGOTOMIA (GRUPO A)

Administración de octreótido tras la hepatectomía

CASO	% NUCL. PCNA +	NUCL. PCNA + /mm ²	TOTAL NUCL. /mm ²
Ao-1	2.40	31.52	1313.41
Ao-2	2.53	42.02	1660.15
Ao-3	2.27	31.52	1386.96
Ao-4	2.17	31.52	1450.00
Ao-5	2.75	42.02	1523.55
MEDIA	2.42	35.72	1466.81
D. TIP.	0.22	5.75	133.03
E.E.	0.10	2.57	59.49

D.TIP.: Desviación típica; **E.E.:** Error estándar para la media.

TABLA XIII

PCNA EN REMANENTE HEPATICO

RATAS GRUPO B (7 días post-vagotomía)

Administración de suero salino tras la hepatectomía

CASO	% NUCL. PCNA +	NUCL. PCNA + /mm ²	TOTAL NUCL. /mm ²
Bs-1	12.96	147.10	1134.78
Bs-2	11.92	136.59	1145.29
Bs-3	17.45	388.76	2227.54
Bs-4	8.65	94.56	1092.75
MEDIA	12.74	191.75	1400.09
D. TIP.	3.63	133.28	552.10
E.E.	1.81	66.64	276.05

D.TIP.: Desviación típica; E.E.: Error estándar para la media.

TABLA XIV

PCNA EN REMANENTE HEPATICO

RATAS GRUPO B (7 días post-vagotomía)

Administración de octreótido tras la hepatectomía

CASO	% NUCL. PCNA +	NUCL. PCNA + /mm ²	TOTAL NUCL. /mm ²
Bo-1	1.78	31.52	1765.22
Bo-2	4.96	84.05	1691.67
Bo-3	2.08	31.52	1513.05
Bo-4	2.73	42.02	1534.06
MEDIA	2.88	47.27	1626.00
D. TIP.	1.43	25.00	122.34
E.E.	0.71	12.50	61.17

D.TIP.: Desviación típica; **E.E.:** Error estándar para la media.

TABLA XV

PCNA EN REMANENTE HEPATICO

RATAS GRUPO C (120 días post-vagotomía)

Administración de suero salino tras la hepatectomía

CASO	%NUCL.PCNA	NUCL.PCNA ⁺ /mm ²	TOTAL NUCL./mm ²
Cs-1	11.60	136.59	1176.81
Cs-2	5.19	84.05	1618.12
Cs-3	6.03	73.55	1218.84
Cs-4	23.84	378.26	1586.60
MEDIA	11.66	168.11	1400.09
D. TIP.	8.60	142.78	234.54
E.E.	4.30	71.39	117.27

D.TIP.: Desviación típica; E.E.: Error estándar para la media.

TABLA XVI

PCNA EN REMANENTE HEPATICO

RATAS GRUPO C (120 días post-vagotomía)

Administración de octreótido tras la hepatectomía

CASO	% NUCL PCNA+	NUCL PCNA+ /mm ²	TOTAL NUCL /mm ²
Co-1	1.98	31.52	1586.60
Co-2	2.54	31.52	1239.86
Co-3	3.78	52.53	1386.96
Co-4	1.40	31.52	2238.05
MEDIA	2.42	36.77	1612.86
D. TIP.	1.01	10.50	440.34
E.E.	0.50	5.25	220.17

D.TIP.: Desviación típica; E.E.: Error estándar para la media.

FIGURA 12

REGENERACION HEPATICA ESTIMULADA

GRUPO CONTROL

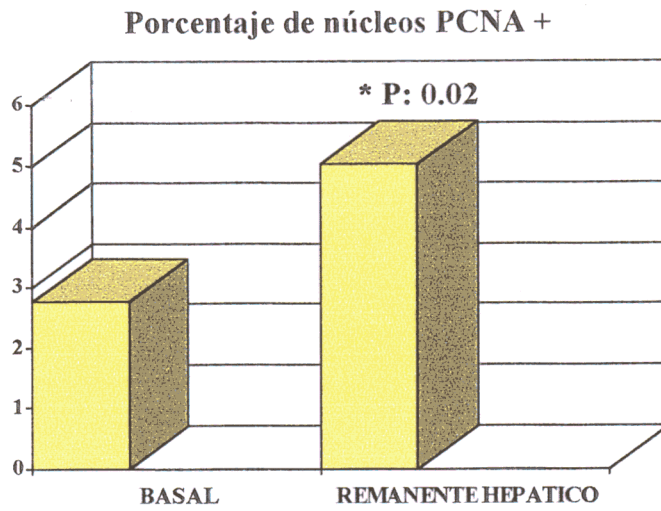


FIGURA 13

REGENERACION HEPATICA ESTIMULADA

GRUPO CONTROL

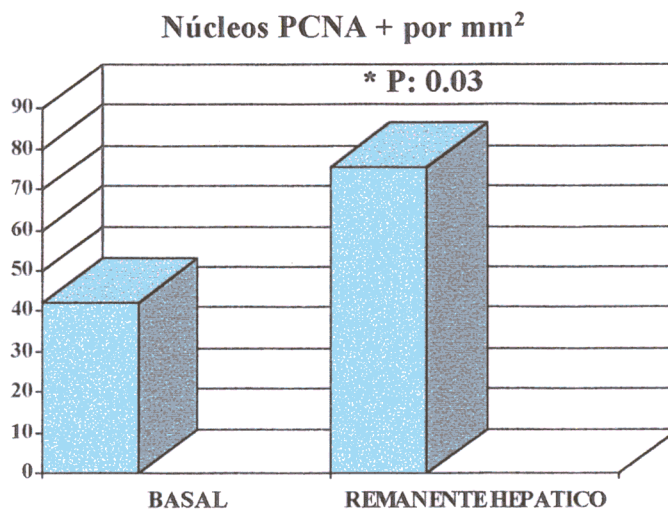
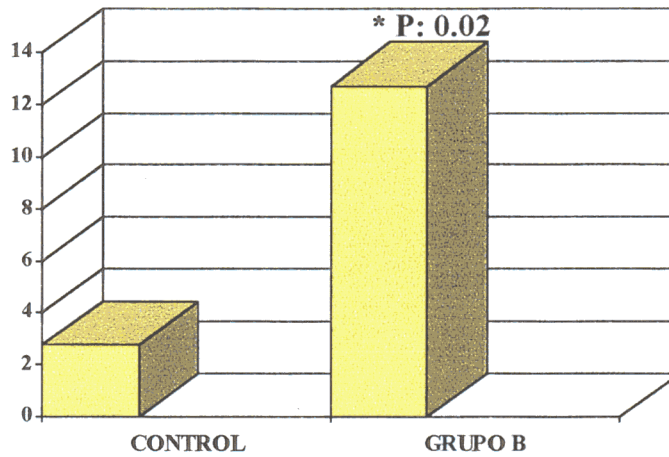


FIGURA 14**PCNA GRUPO B / GRUPO CONTROL**

Administración de suero salino tras la hepatectomía
(Datos en porcentaje de núcleos PCNA +)

**FIGURA 15****PCNA GRUPO B / GRUPO CONTROL**

Administración de suero salino tras la hepatectomía
(Datos en número de núcleos PCNA + por mm²)

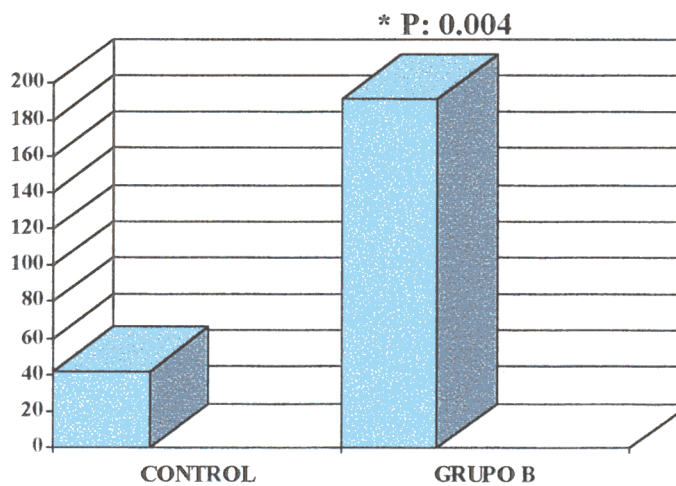
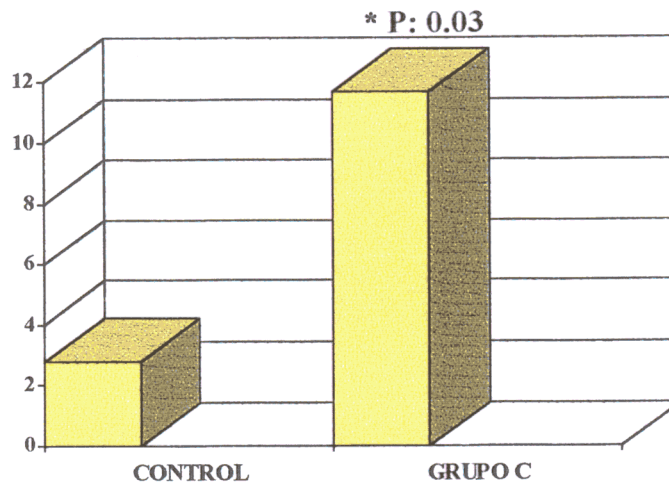


FIGURA 16**PCNA GRUPO C / GRUPO CONTROL**

Administración de suero salino tras la hepatectomía
(Datos en porcentaje de núcleos PCNA +)

**FIGURA 17****PCNA GRUPO C / GRUPO CONTROL**

Administración de suero salino tras la hepatectomía
(Datos en número de núcleos PCNA + por mm²)

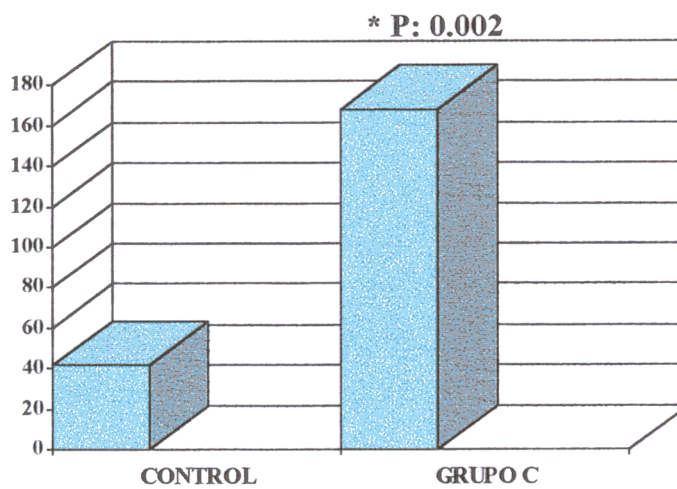


FIGURA 18

OCTREOTIDO Y REGENERACION HEPATICA

GRUPO CONTROL

Porcentaje de núcleos PCNA +

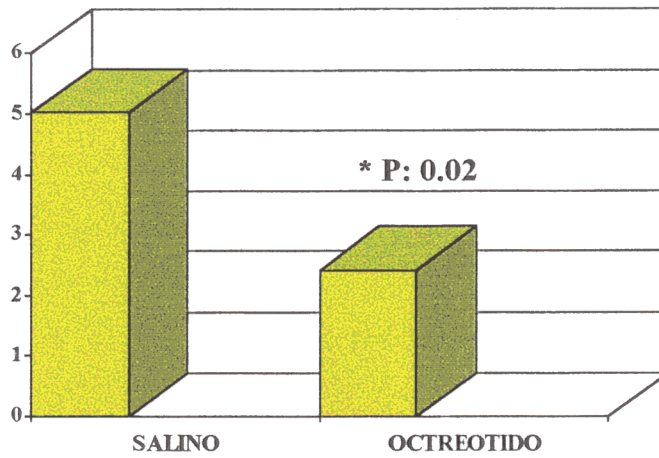


FIGURA 19

OCTREOTIDO Y REGENERACION HEPATICA

GRUPO CONTROL

Núcleos PCNA + por mm²

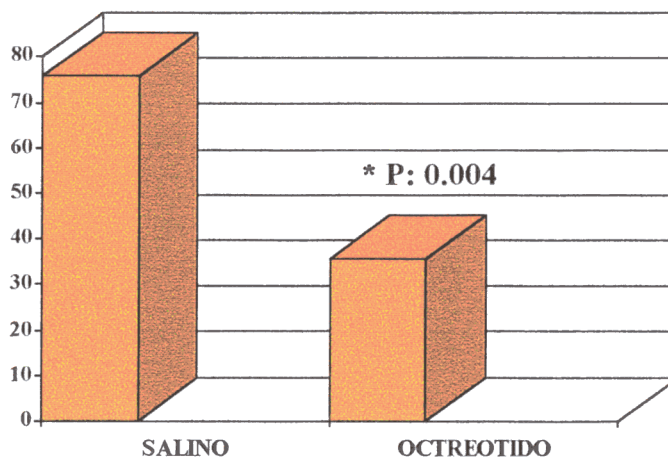


FIGURA 20

OCTREOTIDO Y REGENERACION HEPATICA

GRUPO B (7 días post-vagotomía)

Porcentaje de núcleos PCNA +

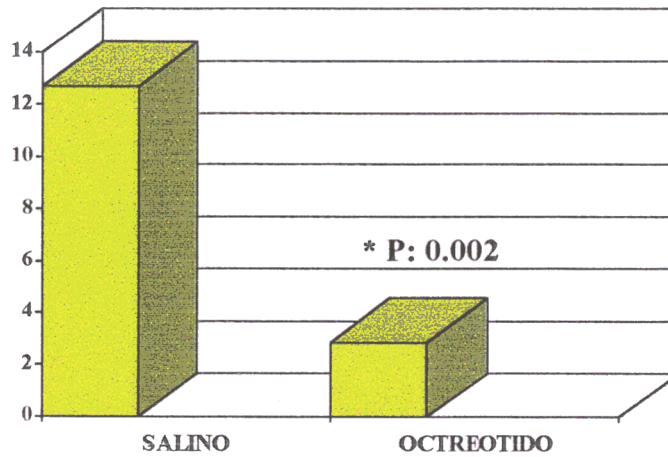


FIGURA 21

OCTREOTIDO Y REGENERACION HEPATICA

GRUPO B (7 días post-vagotomía)

Núcleos PCNA + por mm²

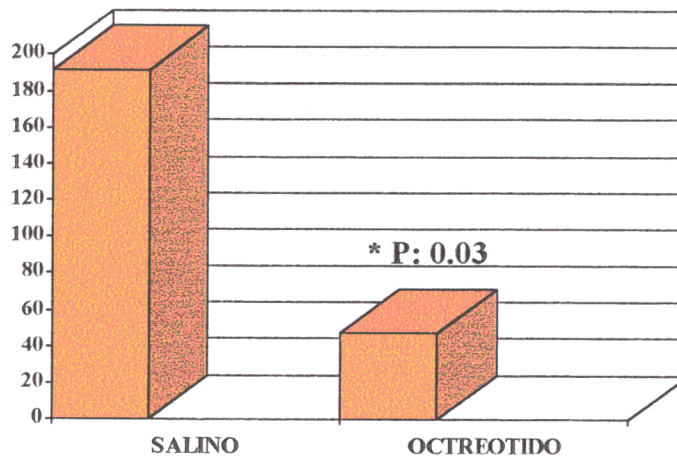


FIGURA 22

OCTREOTIDO Y REGENERACION HEPATICA

GRUPO C (120 días post-vagotomía)

Porcentaje de núcleos PCNA +

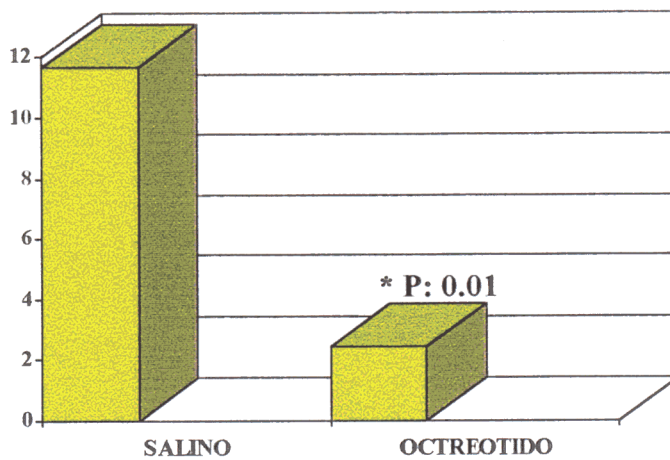
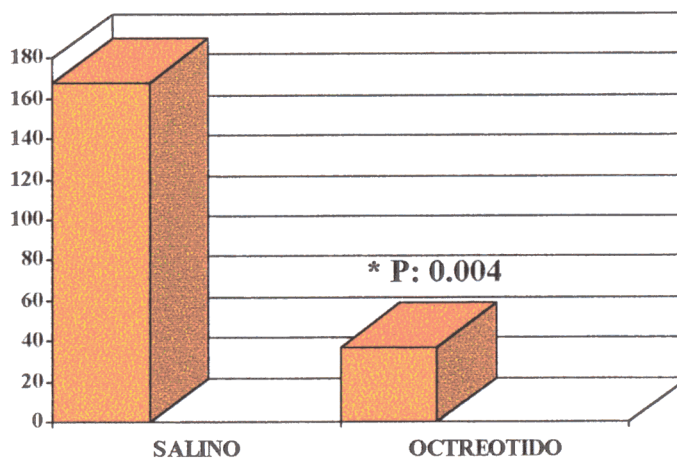


FIGURA 23

OCTREOTIDO Y REGENERACION HEPATICA

GRUPO C (120 días post-vagotomía)

Núcleos PCNA + por mm²



VI. DISCUSSION

DISCUSION

Este modelo experimental se ha basado en el hallazgo que observamos en trabajos previos realizados por nuestro grupo ¹³ acerca de los cambios en la densidad celular del antro gástrico tras la realización de una vagotomía troncular en el cobaya, y en base a otros trabajos publicados al respecto que utilizan diferentes modelos experimentales y especies animales ^{134,135,136,137}.

En éstos trabajos previos se demuestra que la vagotomía troncular causa una hiperplasia de células G en el antro gástrico de los animales de experimentación. En el caso de la rata, se observa una hiperplasia de células G antrales a corto y largo plazo, que se acompaña de una hipergastrinemia mantenida ^{135,137}.

La mayoría de los autores están de acuerdo en que los pacientes sometidos a vagotomía presentan habitualmente niveles elevados de gastrina sérica, tanto basales ¹³⁸ como estimulados por la comida ¹³⁹ o por hipoglucemia insulínica ¹⁴⁰, así como concentraciones aumentadas de gastrina tisular en la mucosa antral ¹⁴¹. Además, dicha hipergastrinemia se ha demostrado tras los distintos métodos de vagotomía: troncular, selectiva y selectiva proximal o suprselectiva ^{138,140}. Similares hallazgos han sido observados en ratas después de vagotomía troncular ^{135,142} y en perros después de vagotomía troncular ¹⁴³ y de vagotomía suprselectiva ¹⁴⁴. Incluso se identificaron 2 fases en el aumento de la gastrina postvagotomía: una elevación precoz de gastrina, al triple aproximadamente de los valores basales, observada 2

días después de la vagotomía, y una segunda fase de hipergastrinemia mantenida - aunque a niveles más bajos- después de aquella ¹³⁷.

No ha sido un objetivo de éste estudio investigar en nuestros animales la presencia de hipergastrinemia post-vagotomía dado el conocimiento plenamente establecido que poseemos de éste fenómeno. Además, existen dudas razonables sobre las determinaciones de gastrina circulante mediante radioinmunoensayo ¹⁴⁵, siendo un hecho más objetivable el aumento de la población de células del antro gástrico productoras de gastrina-17 y gastrina-34..

Dado que la vagotomía altera los mecanismos fisiológicos de la secreción ácida gástrica, se deben producir profundos cambios en su función endocrina y esto se debería traducir en modificaciones en la densidad de sus poblaciones celulares. Parece lógico pensar que la causa por la que se determinan niveles elevados de gastrina sea la hiperplasia y/o hipertrofia de las células que la producen, es decir las células G, compensatoria y adaptativa a los cambios ambientales que produce la vagotomía.

En 1980, ARNOLD y LANKISCH ¹⁴⁶ demostraron que la alteración del tamaño poblacional de las células G es un índice de su actividad funcional. Además, algunos artículos describieron la hiperplasia de ciertas organelas dentro de las células G en asociación con hipergastrinemia ^{142,147}. Por otro lado, se obtuvo la evidencia del control vagal directo e indirecto sobre la población de células G ¹⁴⁸.

Todos éstos hechos afianzaron la hipótesis de que las células G representan una población dinámica, capaz de alterar tanto su número como su actividad secretora ante una gran variedad de estímulos ¹⁴⁹.

Sin embargo, la estimación exacta y precisa de la densidad de células G antrales requiere un examen de muestras de mucosa grandes puesto que su distribución no es uniforme dentro de las diferentes áreas del antro y entre los distintos individuos. Por ello DELANEY y col., en 1978 ¹⁵⁰, afirmaron que solamente las biopsias de 4 cm o mayores rendían una estimación razonable de la masa de dichas células. De hecho, KEUPPENS y col. ¹⁵¹ obtuvieron resultados similares en el hombre con una diferencia dos a tres veces mayor en biopsias pequeñas adyacentes del mismo antro, comprobando que los valores representativos más aproximados se obtuvieron de las biopsias de mayor tamaño. Otros autores han encontrado variaciones similares en la rata ¹⁵² y en el gato ¹⁵³.

Resulta evidente que no se pueden realizar estudios que analicen la totalidad del antro gástrico en el hombre para establecer las modificaciones de la población de células G post-vagotomía.

Los autores partidarios de las biopsias endoscópicas que han investigado éste fenómeno se basan en las observaciones de los grupos de POLAK ¹⁵⁴ y CRIVELLI ¹⁵⁵ que informaron de una distribución regular y constante en la densidad de células G en biopsias antrales de pacientes que padecían úlcera duodenal, por lo que opinan que las muestras endoscópicas son también válidas y que no existen diferencias con

los resultados obtenidos en las muestras quirúrgicas, pero eso sí, establecen su relevancia basándose en muestras múltiples.

Por todo ello nos parecen mucho más fiables los datos obtenidos de los estudios que analizan la totalidad del antro gástrico, seccionándolo en tiras estrechas, que las muestras endoscópicas que obtienen pequeñas fracciones tisulares en lugares que no siempre son los más adecuados. De ésta forma no se confina en estudio a un área en particular; el antro completo se excinde en tiras y el contaje celular se realiza en toda la longitud de las tiras seccionadas. Todo ello permite la observación del mayor número posible de células endocrinas y esto resulta esencial para una estimación adecuada de la densidad de las mismas. Otros autores confirman nuestra preferencia ^{136,156}.

Respecto al método de cuantificación de las poblaciones celulares endocrinas, existe una considerable variedad en las técnicas utilizadas por los diferentes autores, según lo relacionen atendiendo al área o volumen de las fracciones tisulares estudiadas. Asimismo dependerá del método de procesamiento del tejido, ya que los diferentes procedimientos que utilizan fijadores y baños pueden producir contracciones artefactuales en los tejidos, que pueden alterar el contaje celular; por ésta razón algunos autores utilizan un factor de corrección al expresar sus datos en relación a la superficie de mucosa fresca.

En nuestro estudio, para la medición de la densidad de células G en el antro gástrico de la rata, hemos utilizado el método descrito por AHERNE ¹³¹ para la

medición de densidades numéricas de estructuras particuladas, que nos expresa el número de células G por unidad de área (en nuestro caso, por mm^2 de superficie mucosa). Para el estudio del índice proliferativo hepático hemos utilizado el mismo método de contaje, determinando el número total de núcleos celulares por mm^2 de superficie tisular y el número de núcleos con tinción positiva para el PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) por mm^2 . En base a éstos dos parámetros obtenemos el porcentaje de núcleos que expresan el PCNA en la muestra a estudiar.

Respecto al análisis estadístico, hemos utilizado la prueba U de Mann-Withney, de carácter no paramétrico, dado el conocimiento estadístico que indica que cuando las muestras son pequeñas ($n \leq 10$) las desviaciones respecto de la normalidad son difíciles de detectar, y ello puede tener efectos desastrosos en la interpretación de los datos, por lo que la utilización de pruebas basadas en una distribución normal debe ser muy cautelosa. Por ésta razón, para muestras de pequeño tamaño debe utilizarse una prueba no paramétrica que no presuponga ningún tipo de distribución de probabilidad para los datos. Ya que las series de animales de nuestro estudio se componen de grupos de menos de 10 individuos, el análisis estadístico se realizó utilizando, en vez de la prueba paramétrica de la t de Student, la de Mann-Withney que permite determinar si existen diferencias, en cuanto a las medidas de centralización, entre dos muestras independientes.

A continuación describimos los resultados obtenidos en el contaje de células G en los distintos grupos de nuestro estudio, y los comparamos con los aportados por otros autores en sus modelos experimentales.

El grupo control (grupo A) de ratas no sometidas a intervención quirúrgica fue utilizado para obtener los valores basales que nos sirvieran de referencia para analizar las variaciones en la población de células G que pudiera producir la vagotomía. Asimismo este grupo control, al igual que los demás grupos del estudio (grupos B y C) se subdividió en dos subgrupos de igual número de animales, según se administrara suero salino u octreótido en el momento posterior a la hepatectomía parcial.

En éste grupo control , al contabilizar la población de células G por mm^2 de superficie mucosa, obtuvimos para el subgrupo de suero salino un total de 80.22 ± 10.2 células G por mm^2 , y de 80.10 ± 22.3 para el grupo de octreótido. No encontramos diferencias significativas entre los dos subgrupos ($P=0.99$), lo que muestra que la administración de octreótido subcutáneo tras una hepatectomía parcial en ratas no vagotomizadas no altera, como era de esperar, la población de células G antrales en la rata.

Sin embargo, al comparar los datos del grupo B (7 días post-vagotomía) con los del grupo control, observamos unos valores para aquel grupo de 455.58 ± 129.92 células G por mm^2 de superficie mucosa, lo que supone una diferencia estadísticamente muy significativa ($P=0.007$) y demuestra nuevamente el conocido fenómeno de la hiperplasia de células G antrales en la fase aguda (7 días) post-vagotomía en la rata.

Llama la atención en hecho de que, al comparar los dos subgrupos (salino y octreótido) dentro de éste grupo B, encontramos una diferencia estadísticamente significativa ($P=0.019$) entre ambos en lo que a densidad de células G antrales se refiere. Parece, por tanto, que la administración de octreótido subcutáneo en la rata, durante la fase aguda post-vagotomía (7 días) condiciona una disminución en la población de células G antrales. No hemos encontrado explicación para éste fenómeno, aunque todo parece indicar que durante el "pico" de hiperplasia celular que se produce en los primeros días tras una vagotomía existe una aumentada sensibilidad de las células G - probablemente por un estado de inmadurez celular- a la acción supresora de la somatostatina. En cualquier caso, éste fenómeno debe ser estudiado en profundidad y será indudablemente objeto de estudios ulteriores por nuestro grupo de investigación.

Cuando comparamos los datos obtenidos sobre la densidad de células G antrales en el grupo crónico post-vagotomía (grupo C, vagotomía 120 días), observamos que pese al descenso de los valores respecto a la fase aguda, persiste un aumento estadísticamente significativo ($P=0.02$) en la densidad de células G del antro gástrico al compararlos con los del grupo control. No hemos observado diferencias en la población de células G entre los dos subgrupos de éste grupo C (salino *versus* octreótido tras la hepatectomía parcial), por lo que parece objetivarse que la administración de octreótido subcutáneo no tiene influencia sobre la población de células G antrales en los animales vagotomizados a largo plazo.

En resumen, podemos afirmar que en nuestro estudio la vagotomía realizada a corto (7 días) y largo plazo (120 días) induce un aumento significativo en la densidad



de células G productoras de gastrina en el antro gástrico de la rata; éste aumento es más acusado en las ratas sacrificadas a los 7 días de la vagotomía, momento en el cual la administración de octreótido subcutáneo 24 horas antes del sacrificio parece tener un efecto inhibitor sobre la población de células G. La hiperplasia de células G en el grupo crónico, sacrificado a los 120 días de la vagotomía, persiste elevada en niveles estadísticamente significativos respecto al grupo control, aunque éstos niveles se encuentran por debajo de los que aparecen en el grupo sacrificado a los 7 días de la vagotomía. En el grupo crónico (120 días de vagotomía), la administración de octreótido subcutáneo 24 horas antes del sacrificio no parece tener influencia sobre la población de células G antrales.

Los resultados descritos coinciden con los observados por diferentes autores que utilizan el mismo animal de experimentación y similares modelos experimentales^{135,137}.

Respecto al animal de experimentación utilizado en éste estudio, hemos utilizado la rata por ser la especie sobre la cual se han desarrollado la gran mayoría de trabajos referentes al tema. Uno de los problemas que acusa éste animal a la hora de desarrollar nuestro modelo experimental es el elevado índice de mortalidad que presenta tras la vagotomía, sobre todo en el grupo de animales vagotomizados a largo plazo (120 días antes del sacrificio). Este hecho ha sido también observado y descrito por otros autores¹⁵⁷.

La elevada mortalidad de la vagotomía ha condicionado en nuestro estudio la aparición de grupos de animales en número menor al deseado en el diseño del modelo inicial (grupos de 10 animales). En cualquier caso pensamos que - como veremos más adelante -, el análisis de los resultados obtenidos arroja unas conclusiones objetivas que creemos no se modificarían al aumentar el número de animales en los grupos del estudio, hecho que por otro lado hubiera sido deseable por parte de nuestro grupo de investigación.

Respecto a la valoración de los resultados obtenidos sobre el índice de proliferación hepática en los diferentes grupos hemos observado lo siguiente:

Cuando hemos comparado el porcentaje de núcleos PCNA+ de las muestras de hepatectomía parcial del grupo B (7 días post-vagotomía) con los valores del grupo control sin vagotomía no encontramos diferencias significativas entre ambos ($P=0.35$). Lo mismo sucede al comparar el grupo C (120 días post-vagotomía) con el grupo control, obteniendo una $P=0.55$. Si el parámetro que comparamos entre los dos grupos de estudio y el grupo control es el número de núcleos PCNA+ por mm^2 tampoco encontramos diferencias significativas (grupo C: $P=0.99$; grupo A: $P=0.40$).

Es decir, en nuestro estudio observamos que la vagotomía en la rata no modifica el índice de proliferación de los hepatocitos sobre el hígado intacto, medido en base al porcentaje de núcleos PCNA+ y el número de núcleos PCNA+ por mm^2 de las muestras.

Estos resultados contrastan con los obtenidos por Mc GREGOR y WAY en un trabajo publicado en 1977 ⁵ ; éstos autores, utilizando un modelo de hipergastrinemia crónica mediante transposición del antro gástrico en el colon de la rata, observan a los 2 y 3 meses un aumento en el peso del hígado, así como del duodeno, colon, yeyuno e íleon. Por otro lado, estos resultados contrastan de modo destacado con los presentados en los trabajos previos de JOHNSON ⁴, quien no observa ningún efecto sobre el trofismo hepático de las inyecciones repetidas de pentagastrina.

Parece evidente que, como modelo de hipergastrinemia crónica, el utilizado por Mc GREGOR y WAY, realizando una transposición del antro gástrico en el colon, debería ser más eficaz que las inyecciones repetidas de pentagastrina utilizado por JOHNSON. Por otro lado, Mc GREGOR y WAY utilizan como parámetro de proliferación hepática simplemente el peso del hígado, comparándolo con el peso medio del hígado de un grupo de animales control no sometidos al modelo de hipergastrinemia crónica. Además, como método de estudio de la estructura hepática utilizan únicamente la apariencia histológica, concluyendo que la "similaridad histológica" de las muestras de hígado de los grupos estudio y control "parece sugerir" que el aumento del peso del hígado se debe a un fenómeno de hiperplasia más que a otras posibles causas (infiltración grasa, etc.).

Continuando con la valoración de los datos obtenidos en nuestro trabajo, describimos a continuación los resultados sobre el índice de regeneración en el

remanente hepático 24 horas después de la hepatectomía parcial en los diferentes grupos de estudio y los comparamos con los del grupo control.

En primer lugar, nosotros no hemos utilizado el modelo clásico de resección hepática descrito por HIGGINS y ANDERSON ²² para el estudio de la regeneración hepática porque pensamos que era muy agresivo para los animales supervivientes de la vagotomía, técnica que como ya hemos comentado tiene una gran mortalidad en la rata ¹⁵⁷. Realmente, la resección de un 10%-15% de parénquima hepático es estímulo suficiente para iniciar el proceso de regeneración hepática, como así ha sido descrito por MICHALOPOULOS ²³, por lo que hemos preferido la resección del lóbulo lateral izquierdo de la rata como único gesto estimulador, lo que supone la exéresis de alrededor de un 10% del total del parénquima hepático.

Cuando hemos comparado, en el grupo control, el índice de regeneración hepática (porcentaje de núcleos PCNA+ y número de núcleos PCNA+ por mm²) entre la muestra basal (hepatectomía parcial) y el remanente hepático a las 24 horas hemos observado un aumento significativo para ambos parámetros (porcentaje de núcleos PCNA+: P=0.02; número de núcleos PCNA+/mm²: P=0.03). Estos resultados validan el hecho constatado de que la resección de un 10% del tejido hepático en la rata Wistar constituye un estímulo regenerativo suficiente y es un modelo adecuado para valorar el efecto de un posible mitógeno hepático, como consideramos que es la gastrina.

Cuando hemos comparado en el remanente hepático el porcentaje de núcleos PCNA+ en el grupo B (7 días post-vagotomía) con el grupo control de animales no vagotomizados observamos diferencias significativas (12.74 ± 3.63 versus 5.03 ± 1.04 ; $P=0.02$). Si el parámetro que comparamos es el número de núcleos PCNA+ por mm^2 obtenemos una $P=0.004$ (191.75 ± 133.28 versus 75.64 ± 13.92).

Lo mismo sucede al comparar ambos parámetros del grupo C (120 días post-vagotomía) con los obtenidos para el grupo control, donde obtenemos una $P=0.03$ para el porcentaje de núcleos PCNA+ (11.66 ± 8.60 versus 5.03 ± 1.04) y de 0.002 para el número de núcleos PCNA+ por mm^2 (168.11 ± 142.78 versus 75.64 ± 13.92).

Según estos resultados podemos afirmar que, en nuestro estudio, la vagotomía a corto plazo (7 días) y a largo plazo (120 días) producen un aumento en la regeneración hepática medida como porcentaje de expresión del PCNA en los núcleos en regeneración y como número absoluto de núcleos por unidad de superficie que expresan el citado antígeno en las muestras estudiadas.

Hemos utilizado como índice de regeneración hepática el PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) por su establecida eficacia como parámetro de actividad regenerativa, similar e incluso superior en rentabilidad a otros parámetros tradicionalmente utilizados como la incorporación tisular de timidina tritiada, según se ha descrito en un reciente trabajo¹⁵⁸.

El trabajo inicial de LAMAR y HOLLOWAY de 1977 ⁶ describe un efecto inhibitorio de la vagotomía sobre la regeneración hepática. Estos autores, en su modelo experimental, realizan una vagotomía cervical en la rata e inmediatamente después llevan a cabo una hepatectomía parcial del 66%, por lo que no es posible valorar el efecto de una hipergastrinemia mantenida sobre la regeneración hepática. Realmente los resultados de éste trabajo no permiten una valoración más allá de la confirmación del reconocido efecto trófico que el nervio vago ejerce sobre el hígado y el resto de los órganos del tubo digestivo.

Un comentario similar merece el trabajo publicado por KATO y col. en 1983⁷. Estos autores, intentando evaluar el efecto de la vagotomía y de la denervación simpática sobre la regeneración hepática en la rata, realizan ambos gestos quirúrgicos (denervación simpática/vagotomía y hepatectomía parcial) en el mismo acto operatorio. Observan una disminución en la regeneración hepática en los animales vagotomizados medida como porcentaje de peso del hígado y síntesis de DNA (incorporación de H³-timidina) entre las 24 y 72 horas tras la hepatectomía. Por otro lado, tras la denervación simpática, llevada a cabo por sección bilateral de los nervios esplácnicos a nivel infradiafragmático, observan un discreto aumento en la síntesis de DNA en varios momentos tras la hepatectomía parcial. Concluyen los autores afirmando que la vagotomía inhibe y retrasa la síntesis de DNA, y por tanto la proliferación de los hepatocitos, tras una hepatectomía parcial, mientras que la esplanicectomía tiende a estimular éste proceso. Afirman además que la inervación parasimpática parece jugar un importante papel en la regulación del fenómeno de la regeneración hepática. Bajo nuestro punto de vista, tanto el diseño experimental

como las conclusiones obtenidas en éste trabajo no son discutibles, aunque bien es cierto que al realizar la denervación vagal y la hepatectomía parcial simultáneamente es imposible valorar el efecto que la hipergastrinemia post-vagotomía puede tener sobre la regeneración hepática.

El primer estudio publicado en la literatura que utiliza un modelo de hipergastrinemia para valorar el efecto de la gastrina sobre la regeneración hepática en la rata es el realizado por RASMUSSEN y col. en 1990 ⁸. Estos autores demuestran en ratas Wistar que aunque la fundectomía (que provoca ligera hipergastrinemia, pues el fundus gástrico de la rata actúa principalmente como reservorio y presenta una limitada capacidad secretora) no influye en la regeneración hepática post-hepatectomía, la antrectomía produce retraso en la regeneración y los estímulos con pentagastrina a dosis de 300 µgr/kg/8 horas por vía subcutánea durante 4 días la aumentan. Además, observan un aumento en los niveles portales de gastrina durante las 6, 12 y 18 horas tras una hepatectomía del 70% en la rata. Los autores concluyen sugiriendo que la gastrina tiene efectos hepatotróficos, aunque no pueden afirmar si éstos efectos se deben a una acción directa de la gastrina sobre los hepatocitos o a un efecto indirecto mediado por la insulina, el glucagón o incluso por el factor de crecimiento epidérmico, tras revisar los trabajos publicados poco antes por OLSEN ⁸⁸ y RAPER ¹⁵⁹.

Prosiguiendo con la revisión y los comentarios a los trabajos publicados en la literatura encontramos el estudio de OHTAKE realizado en 1993 ⁹. Este autor realiza una hepatectomía parcial en la rata según el modelo de HIGGINS y ANDERSON ²²

y seguidamente lleva a cabo la sección de la rama hepática del tronco vagal izquierdo. En otro grupo de animales, tras la hepatectomía parcial realiza la denervación simpática del hígado por sección de los nervios esplácnicos alrededor de la arteria hepática propia y compara la actividad regenerativa del remanente hepático de ambos grupos con la de un grupo control sometido únicamente a hepatectomía parcial. Observan una disminución significativa en la regeneración hepática en el grupo de animales vagotomizados cuando lo comparan con el grupo control sin vagotomía, tomando como parámetro el peso del remanente hepático expresado como porcentaje del peso corporal. Esta diferencia entre ambos grupos desapareció a los 14 días después de la cirugía. Por otro lado, no observaron diferencias significativas en la respuesta regenerativa hepática en los animales sometidos a denervación simpática, al compararlos con el grupo control.

Los autores concluyen afirmando que la inervación vagal ejerce un efecto estimulador de la regeneración hepática, aunque la vagotomía no parece ser un mecanismo supresor de dicho proceso regenerativo, sino más bien produciría un efecto de retraso de la regeneración hepática, pues la actividad proliferativa se iguala a la de los animales no vagotomizados a los 14 días tras la cirugía.

Por tanto, nos encontramos de nuevo ante un trabajo en el que no se valora el efecto de la hipergastrinemia post-vagotomía, ya que ambos actos quirúrgicos (la hepatectomía y la denervación vagal) se realizan de manera consecutiva. Es más, parece probable que la demostrada hipergastrinemia que sucede tras la vagotomía troncular en la rata contribuya en cierto modo al estímulo en la actividad proliferativa

del remanente hepático que hace que en el citado estudio no se observen diferencias significativas entre el grupo de animales vagotomizados y el grupo control a los 14 días tras la intervención.

Curiosamente, éste mismo autor publica un año después, en 1994 ¹⁰ un trabajo en el que valora el efecto del omeprazol sobre la regeneración hepática en ratas. Administra omeprazol intramuscular en dosis de 0.1 y 0.2 mg/kg/día a ratas sometidas a hepatectomía parcial y compara a corto plazo (3 días) la actividad proliferativa del remanente hepático en base al peso del mismo y su índice mitótico. Observa un aumento significativo de ambos parámetros en los dos grupos de estudio cuando lo compara con el grupo control al que no se administró omeprazol. Asimismo, determina los valores de gastrina sérica por radioinmunoensayo y observa un incremento significativo de la gastrinemia en el grupo de animales a los que se administró omeprazol a dosis de 0.2 mg/kg/día durante tres días.

Concluye éste autor afirmando que, aunque farmacológicamente el omeprazol, debido al anillo imidazólico, ha demostrado tener capacidad para inhibir los procesos de oxidación en los microsomas del hepatocito ^{160,161} (y por tanto podría inhibir la regeneración hepática), en éste estudio se observa que el omeprazol estimula la regeneración hepática, y que éste efecto debe estar mediado por la gastrina. En el citado trabajo se llega incluso a recomendar la administración de omeprazol en los pacientes sometidos a resección hepática en base a sus efectos inhibidores de la secreción ácida gástrica y de estimulación de la regeneración hepática.

Contrastan con los resultados de los trabajos de OHTAKE los obtenidos por AONO en su estudio publicado en 1995 ¹⁶². Este autor compara la regeneración hepática en ratas parcialmente hepatectomizadas tras la administración durante 3 y 7 días de omeprazol o famotidina por vía intramuscular. Observa que tanto el peso del hígado expresado en porcentaje del peso corporal como el índice mitótico en el remanente hepático de los animales sometidos a tratamiento con omeprazol a dosis de 0.4 mg/kg/día disminuyen de modo significativo cuando los compara con los mismos parámetros de un grupo de animales control a los que se había administrado un volumen equivalente de suero salino intramuscular. Además, aprecia una elevación significativa de la gastrina sérica en los animales tratados con omeprazol. Por el contrario, no observa ningún efecto en la administración de famotidina a dosis de 0.8 mg/kg/día sobre los citados índices de regeneración hepática ni sobre los niveles séricos de gastrina. Este autor concluye su trabajo afirmando que las dosis elevadas de omeprazol (0.4 mg/kg/día *versus* 0.1 y 0.2 mg/kg/día administrados a los animales en el trabajo publicado por OHTAKE) suprimen la regeneración hepática.

Por tanto, observamos resultados opuestos entre los dos trabajos anteriormente comentados, utilizando un modelo experimental y unos parámetros de regeneración hepática similares. Pensamos que el origen de éstos resultados contradictorios, como sugiere AONO en las conclusiones de su trabajo, puede radicar en las dosis de omeprazol administradas a los animales (0.4 mg/kg/día), el doble de la administrada a los animales por OHTAKE. Aunque la dosis máxima de omeprazol de 0.4 mg/kg/día induce una elevación de los niveles de gastrina sérica, es posible que la administración de ésta elevadas cantidades se exprese además en una

inhibición colateral de la proliferación hepática en base al ya citado efecto inhibitor del omeprazol y demás imidazoles sobre el proceso oxidativo de los microsomas hepáticos y las monooxigenasas del citocromo P-450 ^{160,161,163}.

El último estudio publicado en la literatura en el que se valora el efecto de la hipergastrinemia sobre la regeneración hepática en la rata es el publicado por CHEN y col. ¹¹. Este autor utiliza como modelo de hipergastrinemia la fundectomía y el tratamiento con omeprazol a dosis de 400 μ .mol/kg/día. 4 semanas después realiza en los animales una hepatectomía parcial de aproximadamente el 50 % del hígado. Los animales fueron sacrificados 60 horas después de la hepatectomía y se determinaron los niveles séricos de gastrina por radioinmunoensayo así como el peso y el contenido en DNA del remanente hepático. Todos éstos valores fueron comparados con los de un grupo control no sometido a fundectomía ni a tratamiento con omeprazol.

Los resultados del trabajo muestran la presencia de hipergastrinemia en ambos grupos de estudio (fundectomía y tratamiento con omeprazol), hipergastrinemia que, por otro lado no parece tener ningún efecto en la regeneración hepática (peso y contenido en DNA del remanente hepático). Los autores concluyen afirmando que la hipergastrinemia endógena no parece tener efecto alguno sobre la regeneración hepática, aunque no justifican en ningún modo su hallazgo ni plantean comentarios a los diferentes trabajos previos con resultados totalmente opuestos.

Como comentario al citado estudio, pensamos que el hecho de no encontrar un aumento en la regeneración hepática puede basarse en el momento en que realizan la hepatectomía a los animales del estudio (4 semanas), momento en el cual - según muestran los resultados de un trabajo realizado en cobayas por nuestro grupo de investigación ¹³ - existe un período de adaptación de los grupos celulares del antro gástrico, con disminución significativa de la población de células G, de forma paralela a una disminución adaptativa de la población de células D productoras de somatostatina. Esta alteración transitoria de las poblaciones celulares durante el proceso de adaptación a la situación post-vagotomía podría ser responsable de los resultados obtenidos por CHEN al no apreciar un aumento de la regeneración hepática en los grupos de animales de su estudio. Por último, ya se ha comentado la baja fiabilidad de la técnica de radioinmunoensayo para la determinación de los niveles de gastrina sérica ¹⁴⁵.

Respecto a la valoración del efecto de la administración de octreótido subcutáneo en los diferentes subgrupos de los animales del estudio hemos observado lo siguiente:

La administración de octreótido subcutáneo en el momento posterior a la hepatectomía parcial (24 horas antes del sacrificio de los animales) produjo en todos los grupos del estudio una disminución significativa de la regeneración hepática, medida como porcentaje de núcleos que expresaban el PCNA y como número de núcleos PCNA+ por mm² de superficie de la muestra.

Para el grupo control de animales no vagotomizados, la administración de octreótido subcutáneo desde el momento inmediatamente posterior a la hepatectomía parcial y a dosis de 0.25mcgr/12 horas redujo de manera estadísticamente significativa los parámetros antes citados al compararlo con un grupo control al cual se administró por vía subcutánea un volumen equivalente de suero salino (porcentaje de núcleos PCNA+ : 5.03 ± 0.92 versus 2.42 ± 0.2 ; $P= 0.02$; número de núcleos PCNA+ /mm² : 75.64 ± 13.92 versus 35.72 ± 5.14 ; $P= 0.004$).

Igualmente, la administración de una dosis similar de octreótido subcutáneo desde el momento posterior a la hepatectomía parcial produjo una inhibición significativa de los parámetros de proliferación hepática en los grupos B (vagotomía 7 días) y C (vagotomía 120 días) al compararlos con sus respectivos subgrupos de suero salino. En concreto, para el grupo B, el porcentaje de núcleos PCNA+ descendió de 12.74 ± 3.62 a 2.88 ± 1.42 ($P=0.002$) y el número de núcleos PCNA+ por mm² bajó de 191.75 ± 133.28 a 47.27 ± 25 ($P=0.03$). Para el grupo C el porcentaje de núcleos PCNA+ pasó de 11.66 ± 8.6 a 2.42 ± 1 ($P= 0.01$) y el número de núcleos PCNA+/mm² descendió de 168.11 ± 142.78 a valores de 36.77 ± 10.5 ($P=0.004$).

En resumen, los resultados arrojados por nuestro estudio muestran un importante efecto inhibitor del octreótido - administrado a dosis de 0.25 mcgr/12 horas durante las 24 horas posteriores a la hepatectomía parcial - sobre los parámetros de regeneración hepática utilizados en nuestro modelo experimental. Este efecto inhibitor de la proliferación hepática se observa tanto en el grupo control de

animales no sometidos a vagotomía, como en los dos grupos de estudio de animales vagotomizados a corto (7 días) y largo plazo (120 días).

Desde la caracterización de la molécula de somatostatina por BRAZEAU y col. en 1973 ³⁴ hasta nuestros días, son múltiples los efectos biológicos, fundamentalmente de tipo inhibitor, de los que se ha responsabilizado a ésta hormona y sus análogos sintéticos. Son ampliamente conocidos sus efectos a nivel hipofisario, pancreático y en diferentes localizaciones del tubo digestivo. Esto ha llevado a proponer una amplia serie de posibles indicaciones terapéuticas para ésta hormona, sobre todo a partir de la caracterización de su análogo sintético, el octreótido, con ventajosas características farmacocinéticas que facilitan su utilización clínica ³⁸.

Los posibles mecanismos por los cuales el octreótido puede ejercer su efecto como inhibidor de la regeneración hepática son varios. En primer lugar, es conocida la acción reductora de la somatostatina y sus análogos sobre el flujo esplácnico, fenómeno que probablemente conduciría a una disminución en la respuesta regenerativa del remanente hepático tras una resección parcial. Además, se ha demostrado el efecto supresor que la somatostatina ejerce sobre determinados factores tróficos extrahepáticos, en concreto sobre la insulina y el glucagón ⁵³, hormonas que han demostrado ser potentes estimuladores de la síntesis de DNA y de la proliferación de los hepatocitos *in vivo* e *in vitro* ^{50,51,52}.

Un interesante trabajo en el que se valora el efecto del octreótido sobre la regeneración hepática en la rata es el publicado por PRUTHI y col. en 1993 ⁴⁴. En este estudio se observa una disminución del 33% del peso del remanente hepático tras 72 horas de administración de octreótido subcutáneo en infusión continua a dosis de 1.5 mcgr/kg/hora, así como un descenso del 67% en la síntesis de DNA hepatocitario a las 24 horas, cuando se compara con un grupo control de animales a los que se administró un volumen equivalente de solución salina fisiológica. El modelo de hepatectomía parcial utilizado en este experimento fue la clásica resección del 70% del parénquima hepático. Los autores de este trabajo concluyen sugiriendo que el efecto inhibitorio del octreótido sobre la regeneración hepática debe ser indirecto, ya que trabajos previos realizados en cultivos de hepatocitos libres de suero no demostraron un efecto inhibitor directo ¹⁶⁴.

Este efecto indirecto del octreótido sobre la regeneración hepática es para los autores consecuencia de la inhibición de determinados factores hepatotróficos, siendo la insulina probablemente el más importante de ellos.

Parece lógico pensar que el efecto inhibitor del octreótido no esté basado únicamente en la supresión de los niveles de insulina. Es probable que esta acción supresora se ejerza sobre otras sustancias con más o menos reconocido efecto trófico sobre el hígado.

En este sentido, OLSEN y col. publican en 1994 ¹²⁸ un trabajo en el que pretenden valorar el efecto de la somatostatina nativa sobre la secreción de EGF

(*Epidermal Growth Factor*) a partir de las glándulas de Brunner del duodeno de la rata. Utilizando un modelo de estimulación de la secreción de EGF con una perfusión de secretina, demuestran la capacidad de la somatostatina de inhibir intensamente la secreción de EGF.

Conociendo el efecto estimulador del EGF (al que se considera como un mitógeno primario) sobre la regeneración hepática ³³, disponemos por tanto de un nuevo argumento para explicar el efecto inhibitorio de la somatostatina y sus análogos sintéticos sobre la proliferación hepática.

Por otro lado, la somatostatina ha demostrado su capacidad para disminuir los niveles circulantes de TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*), al que se considera un importante mitógeno hepático. Trabajos recientes han demostrado, utilizando un modelo experimental de tratamiento con anticuerpos anti-TNF- α previamente a la hepatectomía parcial en la rata, una disminución en la síntesis de DNA en el remanente hepático ⁹⁸. Igualmente, otros trabajos han observado un efecto inhibitorio de la somatostatina sobre los niveles de esta citokina en modelos de obstrucción intestinal en ratas ³⁵.

La inhibición de la gastrina por parte de la somatostatina y sus análogos es un hecho ampliamente documentado. La secreción de gastrina a nivel antral está mediada por neuronas colinérgicas que producen inhibición de la secreción de somatostatina por parte de las células D del antro gástrico, provocando de esta forma la liberación de gastrina por un mecanismo de desinhibición, y por terminaciones

nerviosas no colinérgicas que estimulan directamente la secreción de gastrina por liberación del neurotransmisor bombesina ⁴³. Por otra parte, existe un mecanismo de retroalimentación por el cual la acidificación gástrica ($\text{pH} < 3$) estimula la secreción de somatostatina, que frena a su vez la liberación de gastrina ⁴⁰.

En resumen, podemos concluir que la inhibición de la regeneración hepática por parte de la somatostatina es un hecho demostrado. El mecanismo por el cual se lleva a cabo este efecto parece tener un origen multifactorial, basado principalmente en el efecto supresor de esta hormona sobre la liberación de factores hepatotróficos como la insulina, el EGF y el $\text{TNF-}\alpha$. Considerando a la gastrina como un factor estimulador de la regeneración hepática *in vivo* - según los resultados obtenidos en este estudio -, la inhibición de la secreción de gastrina podría ser otro de los mecanismos que intervienen en este efecto supresor de la somatostatina sobre la regeneración hepática. Si este efecto inhibitorio se realiza únicamente de modo directo sobre la secreción de gastrina o contribuye un mecanismo indirecto (a través de la disminución en los niveles de EGF u otras sustancias con capacidad trófica sobre el hígado) es un hecho aún poco claro.

En base a todo lo expuesto y a la vista de los resultados obtenidos podemos afirmar que en nuestro estudio se demuestra un efecto hepatotrófico de la hipergastrinemia endógena producida por un modelo de vagotomía troncular en la rata, lo que convertiría a la gastrina en un nuevo factor hepatotrófico a añadir a los ya conocidos; en cualquier caso, consideramos que se necesitan más estudios para

confirmar este hecho y determinar el verdadero papel que esta hormona juega en el complejo proceso de la regeneración hepática.

VII. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- La vagotomía produce una hiperplasia significativa de células G a corto plazo (7 días) y largo plazo (120 días) en el antro gástrico .
- 2.- Tanto el porcentaje de núcleos que expresan el PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) como el número de núcleos PCNA + por mm² de superficie se elevan de forma significativa a las 24 horas tras una hepatectomía parcial del 10-15%.
- 3.- La vagotomía troncular aumenta de modo significativo la capacidad regenerativa del hígado a los 7 y 120 días, determinada por una elevación en la expresión del PCNA a las 24 horas de la hepatectomía parcial.
- 4.- El octreótido (análogo sintético de la somatostatina) inhibe la regeneración hepática en ratas normales y en ratas vagotomizadas a los 7 y 120 días, determinada por una disminución en la expresión del PCNA a las 24 horas de la hepatectomía parcial.
- 5.- El mecanismo probable a través del cual la vagotomía aumenta la regeneración hepática podría ser la hiperplasia de células G antrales (hipergastrinemia post-estímulo) directamente o a través del EGF (*Epidermal Growth Factor*) ante el estímulo de la resección hepática. En este sentido, la somatostatina, demostrado inhibidor de la gastrina, inhibe la regeneración hepática por diversos motivos, a los que se podría añadir la inhibición de la gastrina.

VIII. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

-
- 1.- FUKASAWA M, FUTAGAWA S. Eck fistula syndrome. *Ryoikibetsu Shokogun Shirizu* 1995; 7:220-225.
 - 2.- STARZL TE, PORTER KA, FRANCAVILLA J, BENICHON J, PUTNAM CV. A hundred years of the hepatotrophic controversy. *Ciba Found Symp* 1978; 55:111-138.
 - 3.- STARZL TE, WATANABE K, PORTER KA et al. Effects of insulin, glucagon and insulin/glucagon on liver morphology and cell division after complete portocaval shunt in dog. *Lancet* 1976; 1: 821-825.
 - 4.- JOHNSON LR. The trophic action of gastrointestinal hormones. *Gastroenterology* 1976; 70: 278-288.
 - 5.- Mc GREGOR JL, WAY LW. Chronic hypergastrinemia produces hypertrophy of the liver and intestine in rats. *Surg Forum* 1977; 27: 411-413.
 - 6.- LAMAR C, HOLLOWAY LS. The effect of vagotomy on hepatic regeneration in rats. *Acta Hepato-gastroenterology* 1977; 24: 7-10.
 - 7.- KATO H, SHIMAZU T. Effect of autonomic denervation on DNA synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy. *Eur J Biochemistry* 1983; 134: 473-478.
 - 8.- RASMUSSEN TN, JORGENSEN PE, ALMDAL T. Effect of gastrin on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Gut* 1990; 31: 92-95.

- 9.- OHTAKE M, SAKAGUCHI T, YOSHIDA K et al. Hepatic branch vagotomy can suppress liver regeneration in partially hepatectomized rats. *HPB Surgery* 1993; 6: 277-286.
- 10.- OHTAKE M, AONO T, SAKAGUCHI T et al. Liver regeneration is enhanced by omeprazol in rats following partial hepatectomy. *Br J Surg* 1994; 81: 1179-1180.
- 11.- CHEN D, DING XQ, REHFELD JF et al. Endogenous gastrin and cholecystokinin do not promote growth of rat liver. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29: 688-692.
- 12.- ALCALDE J, YUSTE P, LANDA JI, ORTEGA L, MARCOS JL, BALIBREA JL. Efectos de la vagotomía sobre la población de mastocitos mucosos gástricos en el cobaya. *Cir Esp* 1994; 55: 10-13.
- 13.- LANDA JI, ALCALDE J, YUSTE P, ORTEGA L, RAMIA JM, CARRILLO A, BALIBREA JL. Influencia de la vagotomía troncular sobre las células G y D en el antro gástrico del cobaya. *Cir Esp* 1995; 58: 212-215.
- 14.- KOCH KS, LU XP, BRENNER DA, FEY GH, MARTINEZ-CONDE A, LEFFERT HL. Mitogens and hepatocyte growth control *in vivo* and *in vitro*. *In Vitro Cell Dev Biol* 1990; 26: 1011-1023.
- 15.- HASEGAWA K, KAR S, CARR BJ. Stimulation of hepatocyte DNA synthesis by neurotensin. *J Cell Physiol* 1994; 158: 215-222.
- 16.- RUSSELL WE, BUCHER NLR. Vasopressin modulates liver regeneration in the Brattleboro rat. *Am J Physiol* 1983; 245: 321-324.
- 17.- MICHALOPOULOS GK. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *FASEBJ* 1990; 4: 176-186.

- 18.- YAO CZ, BOLD RJ, ISHIZUKA J, TOWNSEND CM, THOMPSON JC. Growth of mouse hepatocytes is stimulated by gastrin. *J Cell Physiol* 1995; 163: 532-537.
- 19.- SELDEN AC, HODGSON HJF. Growth factors and the liver. *Gut* 1991; 32: 601-603.
- 20.- MARTI V, BURWEN SJ, JONES AL. Biological effects of epidermal growth factor, with special emphasis on the gastrointestinal tract and liver: an update. *Hepatology* 1989; 9: 126-138
- 21.- OKA Y, ORTH D. Human plasma epidermal growth factor / β -urogastrone is associated with blood platelets. *J Clin Invest* 1983; 72: 249-259.
- 22.- HIGGINS GH, ANDERSON RM. Experimental pathology of the liver. I. restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Path* 1931; 12: 186.
- 23.- MICHALOPOULOS GK, De FRANCES MC. Liver regeneration. *Science* 1997; 276: 60-66.
- 24.- EARP HS, O'KEEFE EJ. Epidermal growth factor receptor number decreases during rat liver regeneration. *J Clin Invest* 1981; 67: 1580-1583.
- 25.- RASMUSSEN TN, JORGENSEN PE, ALMDAL T, KIRKEGAARD P, SKOV OLSEN P. Stimulatory effect of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27: 372-374.
- 26.- MOORE GPM, PANDRETTO BA, ROBERTSON D. Effects of epidermal growth factor on hair growth in the mouse. *J Endocrinol* 1981; 88: 293-299.

- 27.- SAND TE, BRONSTAD G, DIGERNES V et al. Quantitative aspects of the effects of insulin, epidermal growth factor and dexametasone on DNA synthesis in cultured rat hepatocytes. *Acta Endocrinol* 1985; 109: 369-377.
- 28.- SAWADA N. Hepatocytes from old rats retain responsiveness of c-myc expression to EGF in primary culture but do not enter S phase. *Exp Cell Res* 1989; 181: 584-588.
- 29.- KONTUREK SJ, BIELANSKI W, KONTUREK JW, OLEKSY J, YAMAZAKI J. Release and action of epidermal growth factor on gastric secretion in humans. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24: 485-492.
- 30.- KONTUREK PC, ERNST H, KONTUREK J et al. Salivary and gastric luminal release of epidermal growth factor under basal conditions and after pentagastrin stimulation in healthy subjects and in duodenal ulcer patients before and after eradication of helicobacter pylori. *J Physiol Pharmacol* 1996; 47: 187-194.
- 31.- JOHNSON LR. New aspects of the trophic action of gastrointestinal hormones. *Gastroenterology* 1977; 72: 788-792.
- 32.- ISHIZUKA J, TOWNSEND CM Jr, BOLD RJ et al. Effects of gastrin on 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate, intracellular calcium and phosphatidilinositol hydrolysis in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1994; 54: 2129-2135.
- 33.- CONTEAS CN, MAJUMDAR APN. The effects of gastrin, epidermal growth factor and somatostatin on DNA synthesis in a small intestinal crypt cell line (IEC-6). *Proc Soc Exp Biol Med* 1987; 184: 307-311.

- 34.- BRAZEAU P, VALE W, BURGUS R, LING N et al. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 1973; 179: 77-79.
- 35.- LANDA JI, BALIBREA JL. Nuevos efectos de la somatostatina. En: *Nuevas aplicaciones de la somatostatina en la clínica quirúrgica*, Madrid, Ed. Garsi; 1994: 28-56.
- 36.- TORTOSA F. Sandostatin® (octreótida), estructura molecular y efectos biológicos. En: *SMS 201-995 en gastroenterología y cirugía digestiva*; Barcelons, Sandoz Farma SAE; 1992: 27-40.
- 37.- VEBER DF, HOLLY FW, NUTT RF et al. Highly active cyclic and bicyclic somatostatin analogues of reduced ring size. *Nature* 1979; 280: 512-514.
- 38.- BAUER W, BRINER V, DOEPFNER W et al. SMS 201-995: a very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. *Life Sci* 1982; 31: 1133-1140.
- 39.- DEL POZO E, NEUFELD M, SCHLÜTER K et al. Endocrine profile of a long-acting somatostatin derivative SMS 201-995. Study in normal volunteers following subcutaneous administration. *Acta Endocrinol (KBH)* 1986; 111: 433-439.
- 40.- SCHUBERT ML, SHAMBUREK RD. Control of acid secretion. *Gastroenterol Clin North Am* 1990; 19: 1-25.
- 41.- GERICH JE, PATTON GS. Somatostatin: physiology and clinical application. *Med Clin North Am* 1978; 62: 375.
- 42.- OGAWA N, THOMPSON T, FRIESEN HG. Characteristics of a somatostatin-binding protein. *Can J Physiol Pharmacol* 1978; 56: 48.

- 43.- SCHUBERT ML, SAFFOURI B, WALSH JH et al. Inhibition of neurally mediated gastric secretion by bombesin antiserum. *Am J Physiol* 1985; 248: 456-462.
- 44.- PRUTHI RS, FAROUK M, TSAI WH, MICHALOPOULOS G, MEYERS WC. The effect of octreotide on hepatic regeneration in rats. *Surgery* 1993; 113: 84-89.
- 45.- KARRAN SJ, LEACH KG, BLUMGART LH. Assesment of liver regeneration in the rat using gamma camera. *J Nucl Med* 1974; 15: 10-16.
- 46.- VIGUERIE N, TAHIRI-JOUTI N, AYRAL AM. Direct inhibitory effects of a somatostatin analogue, SMS 201-995 on AR4-2J cell proliferation via pertussis toxin-sensitive GTB-binding protein-independent mechanism. *Endocrinology* 1989; 124: 1017-1025.
- 47.- SREEDHARAN SP, KODAMA KT, PETERSON KE, GOETZL EJ. Distinct subsets of somatostatin receptors on cultured human lymphocytes. *J Biol Chem* 1989, 264: 949-952.
- 48.- LEHY T, DUBRASQUET M, BONFILS S. Effect of somatostatin on normal and gastrin-stimulated cell proliferation in the gastric and intestinal mucosae of the rat. *Digestion* 1979; 19: 99-109.
- 49.- RAPER SE, KOTHARY PC, KOKUDO N, DEL VALLE J. Hepatectomy impairs hepatic processing of somatostatin-14. *Am J Surg* 1993; 165: 89-95.
- 50.- BUCHER NLR, SWAFFIELD MN. Regeneration of liver in rats in absence of portal splanchnic organs and a portal blood supply. *Cancer Res* 1973; 35: 3189-3194.

- 51.- WHITTEMORE AD, KASUYA M, VOORHEES AB Jr, PRICE JB Jr. Hepatic regeneration in absence of portal viscera. *Surgery* 1975; 77: 419-426.
- 52.- FARIVAR M, WANDS JR, ISSELBACHER KJ, BUCHER NLR. Effect of insulin and glucagon in fulminant murine hepatitis. *N Engl J Med* 1976; 295: 1519.
- 53.- PLESS J, BAUER W, BRINER V et al. Chemistry and pharmacology on SMS 201-995, a long-acting octapeptide analogue of somatostatin. *J Clin Invest* 1987; 79: 175-178.
- 54.- BUDD G. *On the diseases of liver*. Philadelphia, Lea & Blanchard 1846: 220.
- 55.- Von POOWYSSOZKI W. Untersuchungen über die regeneration des lebergewebes. *Beitr Path Anat Physiol* 1886; 1: 259-360.
- 56.- PONFICK E. Experimentelle beiträge zur pathologie der leber. *Virchows Arch Pathol Anat* 1890; 119: 193-240.
- 57.- SCHAFFNER F. Structural and functional aspects of regeneration of human liver. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 1282-1286.
- 58.- FAUSTO N. Hepatic regeneration. In: Zakim D & Boyer TD, eds: *Hepatology*, 2nd ed; London, WB Saunders; 1990: 49-65.
- 59.- FRANCAVILLA A. Regulation of liver size and regeneration: importance of liver transplantation. *Transplant Proc* 1988; 20: 494-497.
- 60.- STARZL TE. Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet* 1993; 341: 65-71.

- 61.- GRESSNER AM. Cytokines and cellular crosstalk involved in the activation of fat-spring cells. *J Hepatol* 1995; 22: 28-36.
- 62.- YANAGI S, POTTER VR. Sequential changes in ornithine decarboxylase, thymidine kinase and other enzyme activities in regenerating liver in rats on controlled feeding schedules. *Life Sci* 1977; 20: 1509-1519.
- 63.- RABES HM, LOIRSCHING R, TUCZEK V, ISELER G. Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy. *Cell Tissue Kinet* 1976; 9: 517-532.
- 64.- OVERTURF K. Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nature Genet* 1996; 12: 266.
- 65.- GROMPE M, OVERTURF K, AL-DHALIMY M, FINEGOLD M. Pharmacological correction of neonatal lethal hepatic dysfunction in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nat Genet* 1995; 10: 403-460.
- 66.- BLOCK GD. Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF-alpha in a chemically defined (HGM) medium. *J Cell Biol* 1996; 132: 1133-1149.
- 67.- LEONG GF, GRISHAM JW, ALBRIGHT ML, HOLE BV. Effect of partial hepatectomy on DNA synthesis and mitosis in heterotopic partial autografts of rat liver. *Cancer Res* 1964; 24: 1496-1501.
- 68.- MOOLTEN FL, BUCHER NLR. Regeneration of rat liver: transfer to humoral agent by cross circulation. *Science* 1967; 158: 272-274.

- 69.- FISHER B, SZUCH P, LEVINE M, FISHER ER. A portal blood flow as the humoral agent in liver regeneration. *Science* 1971; 171: 575-577.
- 70.- JIRTLE RL, MICHALOPOULOS GK. Effects of partial hepatectomy on transplanted hepatocytes. *Cancer Res* 1982; 42: 3000-3004.
- 71.- MICHALOPOULOS GK. Liver regeneration and growth factors: old puzzles and new perspectives (editorial). *Lab Invest* 1992; 67: 413-415.
- 72.- BUCHER NLR. Regeneration of mammalian liver. *Int Rev Cytol* 1963; 15: 245-300.
- 73.- MICHALOPOULOS GK, HOUCK KA, DOLAN ML, LUETTEKE NC. Control of hepatocyte replication by two serum factors. *Cancer Res* 1984; 44: 4414-4419.
- 74.- NAKAMURA T, NAWA K, ICHIHARA A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 122: 1450-1459.
- 75.- RUSSEL WE, Mc GOWAN JA, BUCHER NLR. Partial characterization of an hepatocyte growth factor from rat platelets. *J Cell Physiol* 1984; 119: 183-192.
- 76.- NAKAMURA T, TERAMOTO H, ICHIHARA A. Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 6489-6493.
- 77.- TOMIYA T et al. Serum hepatocyte growth factor levels in hepatectomized and non-hepatectomized surgical patients. *Gastroenterology* 1992; 103: 1621-1624.

- 78.- LINDROOS PM, ZARNEGAR R, MICHALOPOULOS GK. Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology* 1991; 13: 743-750
- 79.- WUEIR et al. Rapid induction of mRNAs for liver regeneration factor and insulin-like growth factor binding protein-1 in primary cultures of rat hepatocytes by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor. *Hepatology* 1994; 20: 955-960.
- 80.- APPASAMY R et al. Hepatocyte growth factor, blood clearance, organ uptake, and biliary excretion in normally and partially hepatectomized rats. *Lab Invest* 1993; 68: 270-276.
- 81.- ZARNEGAR R, De FRANCES MC, KOST DP, LINDROOS P, MICHALOPOULOS GK. Expression of hepatocyte growth factor in RNA in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 177: 559-565.
- 82.- WEBBER EM, GODOWSKI PJ, FAUSTO N. *In vivo* response of hepatocytes to growth factors requires an initial primary stimulus. *Hepatology* 1994; 19: 489-497.
- 83.- LIU ML, MARS WH, ZARNEGAR R, MICHALOPOULOS GK. Uptake and distribution of hepatocyte growth factor in normal and regenerating adult rat liver. *Am J Pathol* 1994; 144: 129-140.
- 84.- MARS WM et al. Immediate early detection of urokinase receptor after partial hepatectomy and its implications for initiation of liver regeneration. *Hepatology* 1995; 21: 1695-1701.

- 85.- MATSUMOTO A, YAMAMOTO N. Sequestration of a hepatocyte growth factor in extracellular matrix in normal adult rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 174: 90-95.
- 86.- NOGUCHI S, OHBA Y, OKA T. The role of transcription and messenger RNA stability in the regulation of epidermal growth factor receptor gene expression in regenerating mouse liver. *Hepatology* 1992; 15: 88-96.
- 87.- JONES DE et al. Epidermal growth factor secreted from the salivary gland is necessary for liver regeneration. *Am J Physiol* 1995; 268: 872-878.
- 88.- OLSEN PS, BOESBY S, KIRKEGAARD D et al. Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatology* 1988; 8: 992-996.
- 89.- St HILAIRE RJ, HRADEK GT, JONES AL. Hepatic sequestration and biliary secretion of epidermal growth factor. Evidence for a high capacity uptake system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 797-801.
- 90.- OLSEN PS, POULSEN SS, KIEKEGAARD D. Adrenergic effects on secretion of epidermal growth factor from Brunner's glands. *Gut* 1985; 26: 920-927.
- 91.- RUBIN RA, O'KEEFE J, EARP HS. Alteration of epidermal growth factor-dependent phosphorylation during rat liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 776-778.
- 92.- ANDUS T, BAUER J, GEROK W. Effects of cytokines on the liver. *Hepatology* 1991; 13: 364-375.

- 93.- RUSSELL WE, DEMPSEY PJ, SITARIC S et al. Transforming growth factor alpha concentrations increase in regenerating rat liver: evidence for a delayed accumulation of mature TGF-alpha. *Endocrinology* 1993; 133: 1731-1738.
- 94.- MEAD JE, FAUSTO N. Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1558-1562.
- 95.- WEBBER EM, WU JC, WANG L, MERLINO G, FAUSTO N. Overexpression of transforming growth factor-alpha causes liver enlargement and increased hepatocyte proliferation in transgenic mice. *Am J Pathol* 1994; 145: 398-408.
- 96.- RUSSELL WE. Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor-alpha targeted mice. *Mol Carcinog* 1996; 15: 183-189.
- 97.- CORNELL RP. Endotoxin-induced hyperinsulinemia and hyperglucagonemia after experimental liver injury. *Am J Physiol* 1981; 241: 428-435.
- 98.- DHIEL AM et al. Tumor necrosis factor-alpha induces c-jun during the regenerative response to liver injury. *Am J Physiol* 1994; 267: 552-561.
- 99.- RAI RM. Kupffer cell depletion by gadolinium chloride enhances liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Am J Physiol* 1996; 270: 909-918.
- 100.- YAMADA T, KIRILLOVA J, PESCHON JJ, FAUSTO N. Loss of the gene encoding mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is an early event in liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 10351-10355.

- 101.- GAULDIE J, RICHARDS C, BAUMANN H. IL-6 and the acute phase reaction. *Res Immunol* 1992; 147: 755-759.
- 102.- MATSUNAMI H et al. Serial changes of h-HGF and IL-6 in living-related donor liver transplantation with special reference to their relationship to intraoperative portal blood flow. *Transplant Proc* 1992; 24: 1971-1972.
- 103.- KORDULA T et al. Effects of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor on the acute phase response and DNA synthesis in cultured rat hepatocytes. *Lymphokine Cytokine Res* 1991; 10: 23-26.
- 104.- MATSUMOTO K, FUJII H, MICHALOPOULOS GK et al. Human biliary epithelial cells secrete and respond to cytokines and hepatocyte growth factors in vitro: interleukin-6, hepatocyte growth factor and epidermal growth factor promote DNA synthesis *in vitro*. *Hepatology* 1994; 20: 376-382.
- 105.- CRESSMAN DE et al. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6 deficient mice. *Science* 1996; 274: 1379-1383.
- 106.- STEER CJ. Hepatic regeneration and growth regulation: therapeutic possibilities. In: *New and evolving therapies for hepatic and biliary disease*. In: AASLO (post-graduate course book). 1993; 89-112.
- 107.- KAN M, HUANG J, MANSSON PE et al. Heparin-binding growth factor type I (acidic fibroblast growth factor): a potential biphasic autocrine and paracrine regulator of hepatocyte regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7432-7436.
- 108.- MOCHIDA S, ISHIKAWA K, INDO M, SHIBUYA M, FUJIWARA K. Increased expression of vascular endothelial growth factor and its receptors, flt-1 and KDR/flk-1, in regenerating rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226: 176-179.

- 109.- HAGIYA M et al. Cloning and sequence analysis of the rat augmenter of liver regeneration (ALR) gene: expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8142-8146.
- 110.- CRUISE JL, HOUCK KA, MICHALOPOULOS GK. Induction of DNA synthesis in cultured rat hepatocytes through stimulation of alpha 1 adrenoreceptor by norepinephrine. *Science* 1985; 227: 749-751.
- 111.- CRUISE JL, KNECHTLE SJ, BOLLINGER RR, KUHN C, MICHALOPOULOS GK. Alpha-1 adrenergic effects and liver regeneration. *Hepatology* 1987; 7: 1189-1194.
- 112.- HOUCK KA, MICHALOPOULOS GK. Altered responses of regenerating hepatocytes to norepinephrine and transforming growth factor type β . *J Cell Physiol* 1989; 141: 503-509.
- 113.- SHORT J, WEDMORE R, KIBERT L, ZEMEL R. Triiodothyronine: on its role as a specific hepatomitogen. *Cytobios* 1980; 28: 165-177.
- 114.- OHMURA T et al. 9-cis retinoic acid is a direct hepatocyte mitogen in rats. *Life Sci* 1996; 58: 211-216.
- 115.- CHU R, LIN Y, RAO MS, REDDY JK. Cooperative formation of higher order peroxisome proliferator-activated receptor and retinoid X receptor complexes on the peroxisome proliferator responsive element of the rat hydratase-dehydrogenase gene. *J Biol Chem* 1995; 270: 29636-29639.
- 116.- AUGENLICHT LH, ARGYRIS TS. Stimulation of immature male rat liver growth by phenobarbital and 3-methylcholanthrene. *Exp Mol Pathol* 1975; 22: 1-10

- 117.- GUPTA C, HATTORI A, BETSCHART JM, VIRJI MA, SHINOZUKA H. Modulation of epidermal growth factor receptors in rat hepatocytes by two liver tumor-promoting regimens, a choline-deficient and a phenobarbital diet. *Cancer Res* 1988; 48: 1162-1165.
- 118.- FRIEDMAN SL. The cellular basis of hepatic fibrosis: mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328: 1828-1837.
- 119.- De HEMPTINNE B, LORGE F, KESTENS PJ, LAMBOTTE L. Hepatocellular hyperpolarizing factors and regeneration after partial hepatectomy in the rat. *Acta Gastroenterol Belg* 1985; 48: 424-431.
- 120.- HUNTER T. Cooperation between oncogenes. *Cell* 1991; 64: 249-270.
- 121.- CONI P, SIMBULA G, De PRATI AC et al. Differences in the steady-state levels of c-fos, c-jun and c-myc messenger RNA during mitogen-induced liver growth and compensatory regeneration. *Hepatology* 1993; 17: 1109-1116.
- 122.- HABER BA, MOHN KL, DIAMOND RH, TAUB R. Induction patterns of 70 genes during nine days after hepatectomy define the temporal course of liver regeneration. *J Clin Invest* 1993; 91: 1319-1326.
- 123.- FAN G, KREN BT, STEER CJ. Regulation of apoptosis-associated genes in the regenerating liver. *Seminars in liver disease* 1998; 18: 123-140.
- 124.- KRULICH L, DHARIWAL APS, Mc CANN SM. Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary *in vitro*. *Endocrinology* 1968; 83: 783-790.
- 125.- HELLMAN B, LERNMARK K. Inhibition of the *in vitro* secretion of insulin by an extract of pancreatic alpha-1 cells. *Endocrinology* 1969; 84: 1484-1487.

- 126.- IGLESIAS P, DÍEZ JJ, GÓMEZ-PAN A. Somatostatina nativa: efectos biológicos a nivel gastrointestinal. En: *SMS 201-995 en gastroenterología y cirugía digestiva*; Barcelona, Sandoz Farma SAE; 1992: 1-25.
- 127.- FORSSMANN WG, HELMSTAEDTER V, METZ J, MÜHLMANN G, FEURLE GE. Immunohistochemistry and ultrastructure of somatostatin cells with special reference to the gastropancreatic (GEP) system. *Metabolism* 1978; 27: 1179-1191.
- 128.- OLSEN PS, KIRKEGAARD P, POULSEN SS, NEXO E. Effect of secretin and somatostatin on secretion of epidermal growth factor from Brunner's glands in the rat. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 2186-2190.
- 129.- LANDA JI, LLANOS K, GRAU M et al. Septic shock in rats: tumour necrosis factor-prostaglandin E₂ modulation under intravenous somatostatin perfusion. *Br J Surg* 1993; 80: 42.
- 130.- FALINI B, TAYLOR CR. New developments in immunoperoxidase techniques and their application. *Arch Pathol Lab Med* 1983; 107: 105-117.
- 131.- AHERNE WA, DUNNILL MS: *Morphometry*; Londres, Edward Arnold; 1982: 137-142.
- 132.- WASEEM NH, LANE DP. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form. *J Cell Sci* 1990; 96: 121-129.
- 133.- KELMAN Z. PCNA: Structure, functions and interactions. *Oncogene* 1997; 14: 629-640.

- 134.- DUNN DH, DECANINI CO, EISENBERG MM, DELANEY JP. Mechanism for gastrin cell hyperplasia after truncal vagotomy. *Surg Forum* 1979; 16: 376-379.
- 135.- DELINCE P, WILLEMS G, De GRAEF J. Antral gastrin cell proliferation after vagotomy in rats. *Digestion* 1978; 18: 27.
- 136.- DUNN DH, DECANINI CO, EISENBERG MM, BONSACK M, DELANEY JP. Gastrin cell populations after highly selective vagotomy in the dog. *Surgery* 1979; 137: 111.
- 137.- MULLHOLLAND MW, BONSACK M, DELANEY JP. Proliferation of gastric endocrine cells after vagotomy in the rat. *Endocrinology* 1985; 117: 1578-1584.
- 138.- JAFFE BM, CLENDINNEN BG, CLARKE RJ, WILLIAMS JA. Effect of selective and proximal gastric vagotomy on serum gastrin. *Gastroenterology* 1974; 66: 944-953.
- 139.- STADIL F, REHFELD JF, CHRISTIANSEN PM, KRONBORG O. Gastrin response to food in duodenal ulcer patients before and after selective or highly selective vagotomy. *Br J Surg* 1974; 61: 884-888.
- 140.- STADIL F, REHFELD JF. Gastrin response to insulin after selective, highly selective and truncal vagotomy. *Gastroenterology* 1974; 66: 7-15.
- 141.- HUGUES WS, HERNÁNDEZ AJ. Antral gastrin concentration in patients with vagotomy and pyloroplasty. *Gastroenterology* 1976; 71: 720-722.
- 142.- ALUMET J, EL-MUNSHID HA, HAAKANSON R et al. Gastrin cell proliferation after chronic stimulation: effect of vagal denervation or gastric surgery in the rat. *J Physiol* 1980; 298: 522-527.

- 143.- WALSH JH, CSENDES A, GROSSMAN MI. Effect of truncal vagotomy on gastrin release and Heidenhain pouch acid secretion in response to feeding in dogs. *Gastroenterology* 1972; 63: 594-600.
- 144.- BAUER H, HOLLE F, OKUKUBO F et al. The effect of selective proximal vagotomy with and without pyloroplasty on serum gastrin levels and acid secretion after feeding and sham feeding in dogs. *World J Surg* 1977; 1:223-230.
- 145.- DICKINSON CJ. Relationship of gastrin processing to colon cancer. *Gastroenterology* 1995; 109:1384-1388.
- 146.- ARNOLD R, LANKISCH PG. Somatostatin and the gastrointestinal tract. *Clin Gastroenterol* 1980; 9: 733-753.
- 147.- MIGAYAMI H, WATANABE Y, SAWADA Y et al. Ultrastructures of G cells and the mechanism of gastrin release before and after selective vagotomy with piloroplasty. *Arch Histol Jap* 1977; 40: 51-62.
- 148.- UVNÄS-WALLENSTEN K, EFENDIC S, WET R. Vagal release of somatostatin in the antral lumen of cats. *Acta Physiol Scand* 1977; 99: 126-128.
- 149.- MAGALLANES F, QUIGLEY TM, EISENBERG MM, BONSAK M, DELANEY JP. The relationship of luminal pH and distention to antral G-cells numbers. *J Surg Res* 1981; 30: 349-353.
- 150.- DELANEY JP, MICHEL HM, EISENBERG MM, BONSAK ME. Quantitation of antral gastrin cell populations in the dog. *Gastroenterology* 1978; 74: 708-712.

- 151.- KEUPPENS F, WILLEMS G, VAN STEENKISTE Y, WOUSSEN-COLLE MC. Estimation of the antral and duodenal gastrin cell population removed by gastrectomy from patients with peptic ulcer. *Surg Gynecol Obstet* 1978; 146: 400-406.
- 152.- LEHY T, VOILLEMOT N, DUBRASQUET M, DUFOUGERAY F. Gastrin cell hyperplasia in rats with chronic antral stimulation. *Gastroenterology* 1975; 68: 71-82.
- 153.- COWLEY DJ, GANGULI PC, POLAK JM, ELDER JB, PEARSE AGE. The G-cell population of the pyloric antrum of the cat. *Digestion* 1975; 12: 25-31.
- 154.- POLAK JM, BLOOM SR, PEARSE AGE, WELBOURN RD. Endocrine quantitation of clinical gastric biopsies. *Gut* 1975; 16: 406-411.
- 155.- CRIVELLI O, PERA A, FERRARI et al. G-cell counts in antral endoscopic biopsies by immunofluorescence. *Scand J Gastroenterol* 1977; 12: 721-726.
- 156.- LEHY T. Self-replication of somatostatin cells in the antral mucosa of rodents. *Cell Tissue Kinet* 1982; 15: 495-505.
- 157.- NELSON RL, BRILEY S, VAZ OP, ABCARIAN H. The effect of vagotomy and piloroplasty on colorectal tumor induction in the rat. *J Surg Oncol* 1992; 51: 281-286.
- 158.- ASSY N, GONG Y, ZHANG M, PETTIGREW NM, PASHNIAK D. Use of proliferating cell nuclear antigen as a marker of liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Lab Clin Med* 1998; 131: 251-256.
- 159.- RAPER SE, BURWEN SJ, BAKER ME, JONES AL. Translocation of epidermal growth factor to the hepatocyte nucleus during rat liver regeneration. *Gastroenterology* 1987; 92: 1243-50.

- 160.- LEWIS JH. Hepatic effects of drugs used in the treatment of peptic ulcer disease. *Am J Gastroenterol* 1987; 92: 1243-1250.
- 161.- KANASHIMA R, NAGASUE N, FURUSAWA M, INOKUCHI K. Inhibitory effect of cimetidine on liver regeneration after two-thirds hepatectomy in rats. *Am J Surg* 1983; 146: 293-298.
- 162.- AONO T. The liver regenerative response elicited by antisecretory agents in partially hepatectomized rats: a comparison between omeprazole and famotidine. *Surg Today* 1995; 25: 816-821.
- 163.- CHENERY RJ, AYRTON A, OLDHAM HG, NORMAN SJ, STRANDRING P. The interaction of omeprazole with rat liver cytochrome P₄₅₀-mediated monooxygenase reactions *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 1407-1414.
- 164.- CHOU CK, HOL T, TING LP et al. Selective suppression of insulin-induced proliferation of cultured human hepatoma cells by somatostatin. *J Clin Invest* 1987; 79: 175-178.

