

Posible papel de la biliverdina como iniciador de la regeneración hepática

J. Castell y M. J. Gómez-Lechón

Centro de Investigación
de la Ciudad Sanitaria «La Fe»
Valencia-9

(Recibido el 15 de abril de 1982)

J. CASTELL and M. J. GOMEZ-LECHON. *Possible Role of Biliverdin as Trigger of Hepatic Regeneration*. Rev. esp. Fisiol., 39, 183-192. 1983.

Biliverdin has been proposed as the biological signal that triggers liver regeneration after partial hepatectomy, since a transitory increase of plasma levels is found shortly after partial hepatectomy. We have carried out a detailed study to establish the feasibility of such a hypothesis. When biliverdin is administered i.p., it binds to albumin. This became evident by electrophoresis and affinity chromatography. Biliverdin disappears from the peritoneal cavity following a 1st order kinetics ($t^{1/2} = 40$ min, $K = 0.0175$ min⁻¹). Biliverdin reductase activity in the peritoneal exudate was high ($1.04 \mu\text{mol Bv min}^{-1}/\text{mg protein}$), and very small amounts of biliverdin in comparison to the administered dose were found in plasma. However, unconjugated bilirubin level was high in plasma and the conjugated bilirubin in bile flux reached its maximum 90 min after administration. On the basis of blood elimination of biliverdin when administered intravenously ($t^{1/2} = 11$ min, $K = 0.068$ min⁻¹), a series of experiments was designed to reproduce the levels of plasma biliverdin as found shortly after partial hepatectomy. Our results showed a total absence of liver regeneration. There is, however, increase of the mitotic index if biliverdin is administered intraperitoneally. This effect is not directly related to biliverdin but to unspecific (?) stimulation of peritoneal cavity since the same effect was obtained after administration of unrelated substances (diatomaceous earth, killed bacteria). The mitotic figures did not incorporate ³H-thymidine, and it is suggested that those cells came from a G₀ blocked quiescent cell population in liver. We therefore conclude that biliverdin is not the physiological trigger of liver regeneration.

La biliverdina ha sido implicada en el proceso regenerativo del hígado subsecuente a una hepatectomía parcial. OKAZAKY *et al.* (15) detectaron la presencia fugaz de biliverdina en el suero de ratas hepatectomizadas, poco después de la intervención. En opinión de estos autores ésta podía ser la señal que desencadenase el proceso regenerativo, dado que otros

procesos bioquímicos de los denominados precoces en el curso evolutivo de la regeneración — inducción de ornitín decarboxilasa, cAMP intracelular y cAMP dependiente de proteinkinasa (9) — eran inducidos igualmente en ratas sanas (11) tras la administración de biliverdina intraperitoneal.

En el presente trabajo se ha analizado

la verosimilitud de esta hipótesis, estudiando el metabolismo del pigmento cuando se administra exógenamente por vía intraperitoneal o parenteral, y el mecanismo de su eliminación. A la vista de los resultados, se infundieron los animales con biliverdina para provocar un aumento de los niveles plasmáticos similares a los detectados tras la hepatectomía, y se estudiaron los efectos sobre el índice mitótico.

Material y métodos

Se han utilizado ratas Sprague Dawley de 200 ± 10 g alimentadas *ad libitum*, y con un ritmo circadiano de 8-20 h luz y 20-8 h oscuridad. Los reactivos fueron de pureza analítica.

Purificación de biliverdina. La biliverdina (Bv) de origen comercial (Sigma) fue purificada previamente a partir de su dimetil éster (Bv Me₂).

Se disolvieron 500 mg de Bv en 200 ml de metanol absoluto en un matraz. Se eliminó el oxígeno disuelto burbujeando con N₂ durante 3-5 min. Se añadió 20 ml de F₃B al 20 % en metanol y se calentó suavemente a reflujo por espacio de 3 min al abrigo de la luz. Completada la reacción (verificada por cromatografía capa fina en sílice, eluyente metanol:1, Cl₃CH:9; Rf. de Bv = 0,05; Rf. BvMe₂ = 0,9), se evaporó a sequedad en rotavapor, se disolvió en Cl₃CH y se extrajo con H₂O/HCO₃Na. La fase orgánica, de intenso color verde, se secó sobre SO₄Na₂ anhidro, se concentró hasta unos 5 ml y se le adicionó lentamente éter de petróleo 40-60°. El dimetil éster de Bv precipitó con la formación de cristales muy finos de color verde brillante. Se recrystalizaron con cloroformo/éter de petróleo 60°. Rendimiento 85 %. Los datos físicos y espectroscópicos (infrarrojo y resonancia magnética nuclear) del producto permiten identificarlo como el isómero IX α (2).

Para el compuesto se determinó un $E_{373} = 47,5 \times 10^3$ y $E_{660} = 14,5 \times 10^3$.

Solución patrón de biliverdina. Para la utilización de biliverdina en los ensayos se preparó periódicamente biliverdina libre a partir del éster. Se disolvieron 10 mg de BvMe₂ en 0,5 ml de Cl₃CH y 50 ml de metanol, a los que se adicionó 20 ml NaOH 0,1 M, y se mantuvo en agitación a 37° C al abrigo de la luz. Una vez finalizada la hidrólisis (capa fina sílice, eluyente Cl₃CH 9, metanol 1, Rf. Bv = 0,05, BvMe₂ = 0,9) se ajustó el pH a 4 con tampón fosfato 1 M pH 4, y se extrajo con Cl₃CH. La fase orgánica se secó con SO₄Na₂ y se evaporó a sequedad en rotavapor. El precipitado se lavó con Cl₃CH, metanol y H₂O. Finalmente, se desecó sobre P₂O₅ al abrigo de la luz (rendimiento 95 %).

La solución patrón se preparó disolviendo biliverdina en un pequeño volumen de NaOH 1 M, diluyendo con H₂O y neutralizando con ClH 0,1 N. La solución, bien cerrada y al abrigo de la luz, es estable varios días en nevera. La concentración se estimó a partir de los coeficientes de extinción molar determinados para el dimetil éster.

Administración de biliverdina a ratas y su valoración en muestras biológicas. La biliverdina purificada fue suspendida en suero fisiológico y disgregada por ultrasonidos hasta formar una suspensión fina que no sedimentara espontáneamente (tamaño de partícula $\approx 4 \mu\text{m}$). Para la administración intravenosa, se disolvió en suero fisiológico, como se indica arriba, y se perfundió utilizando una bomba infusora Sage Instruments (Orion) modelo 355.

Para la valoración en suero o líquido peritoneal, se tomó una muestra de 1 ml a la que se añadió 2 ml de metanol, se agitó y se mantuvo en frío 10 min. Se centrifugó y decantó el sobrenadante. El sedimento se extrajo de nuevo con 1 ml

de metanol que se añadió al anterior. De esta manera se recupera el $95 \pm 2\%$ de biliverdina presente.

Al sobrenadante total se le añadió 4 ml de Cl_3CH , se agitó y se centrifugó separándose dos fases. La fase superior conteniendo el pigmento fue leída a 660 nm. La respuesta fue lineal entre 1 y 50 $\mu\text{g/ml}$ plasma.

Biliverdina unida a Sepharose 4L. La Sepharose activada por BrCN (20 ml) (aprox. 12 $\mu\text{eq/ml}$) (5), se hizo reaccionar con exceso de hexametilén diamina (4,6 g) diluida en 40 ml H_2O y ajustada a pH 10 con ClH , y se la mantuvo en agitación a 4°C por espacio de 16-24 h. El gel fue lavado abundantemente con H_2O . Se hicieron reaccionar 5 ml de hexametilén-Sepharose con 20 μmoles de biliverdina libre (14 mg), pH 5,5, añadiendo un exceso molar de N-ciclohexil N'[B(N-metilmormolino)-etil] carbodimida-p-toluen sulfonato 1 g, y se mantuvo en agitación suave durante una noche. Finalmente, se lavó con H_2O . La Sepharose posee un intenso color verde. El grado de sustitución se estimó por la medida de 660 nm del color liberado por el gel tras la hidrólisis con NaOH 0,1 N por espacio de 2 horas (grado de sustitución 2,5 $\mu\text{moles/ml}$ gel).

Otras técnicas. La bilirrubina total y directa se valoró utilizando kits comerciales (Bilistrate). Los antiseros antialbúmina de rata y antisuero total de rata se obtuvieron en conejo siguiendo pautas tradicionales de inmunización. Para los análisis inmunológicos (Outcherlony, Grabar-Williams, etc.) se siguieron protocolos establecidos (13, 17). La actividad biliverdín reductasa se valoró según se ha descrito (16). La electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó de acuerdo con técnicas ya establecidas (10, 14).

La determinación del índice mitótico (I.M.) se hizo en cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina. El recuento

de células en mitosis se realizó sobre un total de 100 campos diferentes (400 aumentos, 150 células por campo), en tres cortes de hígado provenientes de lóbulos distintos. Sobre estas mismas preparaciones se estimó el índice de marcaje nuclear (I.M.N.), y se expresó como porcentaje de núcleos que habían incorporado H^3 timidina. Se consideraron positivos aquellos núcleos con más de diez marcas en la autorradiografía.

Para las autorradiografías se cubrieron los cortes de hígado sin teñir (4 μm), obtenidos por técnicas convencionales, con la película AR-10 (Kodak). Se mantuvo en la oscuridad a 4°C durante 15 días y, finalmente, se revelaron y se tiñeron con azul de metileno.

Resultados

Cinética de absorción peritoneal de biliverdina. Cuando la biliverdina se administra en suspensión muy fina obtenida por ultrasonidos, en la cavidad peritoneal de la rata se produce, por efecto de la irritación, un aumento de la secreción de líquido peritoneal. La biliverdina se solubiliza y es absorbida, desapareciendo de la cavidad. A los animales se les inyectó 5 mg de Bv en 5 ml de suero salino por 100 g de peso. Posteriormente, por punción a diversos tiempos, se obtuvieron muestras de 0,2 ml en las que, una vez centrifugadas, se valoró su contenido en el pigmento. La figura 1 muestra la desaparición de Bv a lo largo del tiempo, un descenso ajustable a una curva de tipo exponencial y una cinética de primer orden cuya constante ha sido estimada en $K = 0,0175 \text{ min}^{-1}$, $t^{1/2} = 40 \text{ min}$ (fig. 1 b).

Cinética de fijación, «binding», de biliverdina a las proteínas del líquido peritoneal. Los datos del experimento anterior son el resultado de dos procesos, el de solubilización de la Bv y el de su eliminación de la cavidad. Para establecer cuál

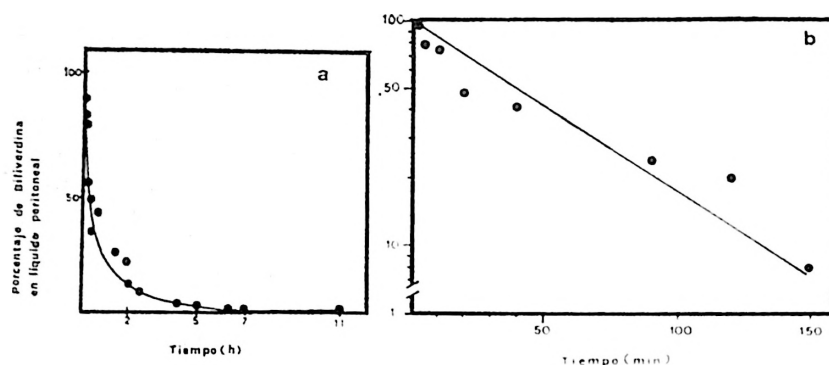


Fig. 1. Absorción peritoneal de la biliverdina.

Ratas de 200 ± 10 g fueron inyectadas i.p. con biliverdina en suspensión en suero fisiológico. Por punción a distintos tiempos se obtuvieron muestras de líquido peritoneal en las que se valoró el contenido de biliverdina (fig. 1 a). Representado en escala semilogarítmica, el proceso se adapta a una cinética de primer orden. Vida media estimada 40 min (fig. 1 b).

de los dos procesos era limitante y, al tiempo, evaluar cuál es la capacidad máxima de eliminación, se estudió *in vitro* la velocidad de solubilización y, por tanto, de fijación a la proteína. Se le inyectó al animal 5 ml de una suspensión 0,1 % de sílice en suero salino en la cavidad peritoneal, se le sometió a un ligero masaje y se extrajo por punción el líquido peritoneal, que una vez centrifugado fue utilizado para el experimento. A 5 ml de exudado peritoneal (2,44 mg proteína/ml) se le añadió 50 mg de biliverdina. Se mantuvo a 37°C con agitación moderada y, a distintos tiempos, se tomaron alícuotas en las que se valoró, una vez centrifugadas (5 min $\times$ 3.000 g), la cantidad de Bv que había pasado al sobrenadante y, por tanto, se había solubilizado.

La figura 2 recoge los datos del experimento a lo largo del tiempo. Puede decirse que, a los 10 min, se ha alcanzado prácticamente el valor de saturación (3.200 $\mu\text{g/ml}$). La capacidad de solubilización para la biliverdina fue de 2 $\mu\text{moles/mg}$ proteína.

Identificación de la proteína a la que se fija la biliverdina. Al ponerse en contacto la biliverdina con el líquido perito-

neal tanto *in vivo* como *in vitro* se solubiliza por la proteína presente. Dicha solución fue estudiada posteriormente para identificar a qué fracción sérica se une.

La Bv solubilizada se centrifugó 30 min $\times$ 100.000 g, y se sometió a una gel filtración a través de Ultrogel AC-44. Se separaron dos picos de absorción a 660 nm, el primero de los cuales migra con la fracción de PM 60-80.000, y representa el 65 % del contenido total de biliverdina. Una alícuota fue sometida a elec-

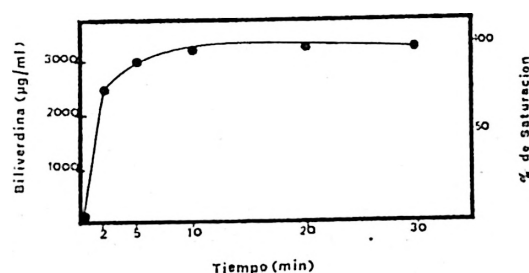


Fig. 2. Cinética de solubilización de biliverdina.

La biliverdina, inicialmente en suspensión, se solubiliza asociándose a la albúmina del exudado peritoneal. La saturación se alcanza tras 10 minutos de agitación y el valor máximo alcanzado es de 2 $\mu\text{moles/mg}$ proteína.

troforesis en acrilamida, en condiciones no desnaturizantes y en presencia de SDS. En condiciones no desnaturizantes, la biliverdina migró mayoritariamente asociada a la banda de albúmina, cuya movilidad electroforética se incrementó sensiblemente. En condiciones desnaturizantes (SDS 0,1 %), el pigmento se disoció, migrando independientemente en la electroforesis.

Para confirmar el papel de transporte de la albúmina para el pigmento, éste fue unido covalentemente a Sepharosa 4B y, a través de la columna de afinidad, se hizo pasar líquido peritoneal total y el pico 1.º de la columna de ultrogel. En ambos casos la columna retuvo mayoritariamente albúmina que pudo ser disociada de la columna por agentes caotrópicos (SCNNa 3M). La proteína, una vez dializada frente a suero salino, fue identificada por inmunoelectroforesis tipo Grabar-Williams frente a suero antiproteínas plasmáticas de rata y frente a suero antialbúmina, y cuantificada por electroforesis. Más del 95 % de la proteína retenida en la columna fue albúmina acompañada por otras α_1 -globulinas (figura 3).

Niveles plasmáticos tras la administración de biliverdina. Para determinar la capacidad de eliminación de biliverdina sérica por el organismo se inyectó una única dosis de Bv solubilizada en albúmina (700 $\mu\text{g}/100$ g de peso corporal) por la vena de la cola. La representación gráfica del log. de la desaparición de Bv frente al tiempo se ajusta a una recta ($r = -0,98$), lo que indica se trata de una cinética de primer orden. La vida media estimada es de 11 min, $K = 0,068 \text{ min}^{-1}$ (fig. 4).

Cuando la administración fue i.p. (10 mg Bv/100 g peso) no existió un aumento importante de los niveles de Bv en sangre (1,5-3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a los 10 min), en contra de lo razonablemente esperado, sino un aumento de los niveles de bilirrubina to-

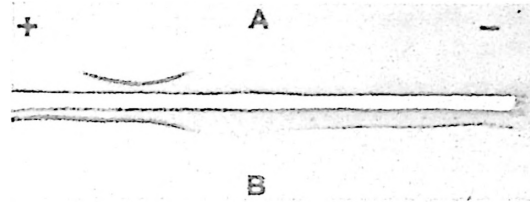


Fig. 3. Asociación de la biliverdina a la albúmina.

El exudado peritoneal se hizo pasar a través de una columna de afinidad de biliverdina-hexametilén diamina-sepharose. Se lavó la columna con salino y finalmente con SCNNa 3M. El pico recogido se dializó, se concentró y se examinó por inmunoelectroforesis Grabar-Williams frente a suero antialbúmina de rata. A, eluido de la columna de afinidad. B, líquido peritoneal con biliverdina. El arco de precipitación correspondiente a la albúmina tiene mayor movilidad electroforética y es de color verde.

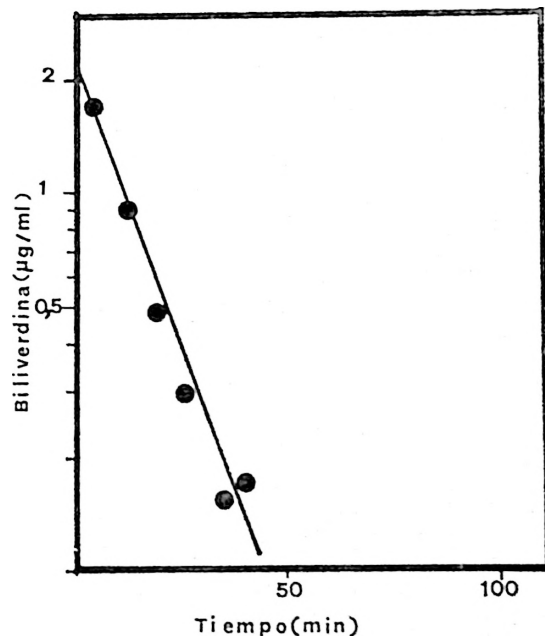


Fig. 4. Eliminación de la biliverdina plasmática.

Animales inyectados con una monodosis de 700 $\mu\text{g}/100$ g peso de biliverdina solubilizada en albúmina por vía venosa. Se tomaron muestras de sangre y se siguió la disminución del nivel plasmático. Cada valor representa la media aritmética de dos experimentos. La cinética es de primer orden. Vida media, 11 minutos.

tal alcanzando a los 20 min una meseta de 50 $\mu\text{g/ml}$ plasma y decreciendo hasta valores similares al inicial, 90 min después de la administración. Los valores de bilirrubina conjugada permanecieron, a lo largo del experimento, dentro de los límites normales (fig. 5).

Simultáneamente se estimó la bilirrubina excretada por bilis y recogida en una porción del duodeno previamente aislada mediante ligaduras situadas 5 mm antes y después de la desembocadura del conducto biliar. La aparición de bilirrubina diglucuronato en bilis, identificada por cromatografía (1), sigue una curva creciente, alcanzando su máximo a los 90 min (fig. 6).

Actividad biliverdín reductasa en exudado peritoneal y plasma. Dada la importante diferencia de los niveles de biliverdina plasmática alcanzados tras la administración por vía venosa o intraperitoneal, en comparación a los niveles de bilirrubina no conjugada, se consideró oportuno evaluar la actividad Bv-reductasa en la fracción celular (macrófagos) y en el sobrenadante del exudado peritoneal.

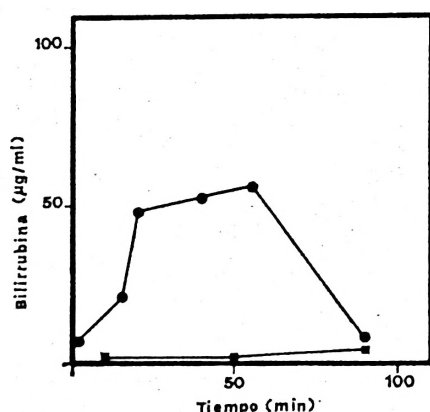


Fig. 5. *Bilirrubina total y conjugada en sangre.* Los niveles de biliverdina no conjugada (●-●) aumentan paulatinamente después de la inyección i.p. de biliverdina. Los valores de la bilirrubina conjugada (■-■) se mantuvieron dentro de los límites normales.

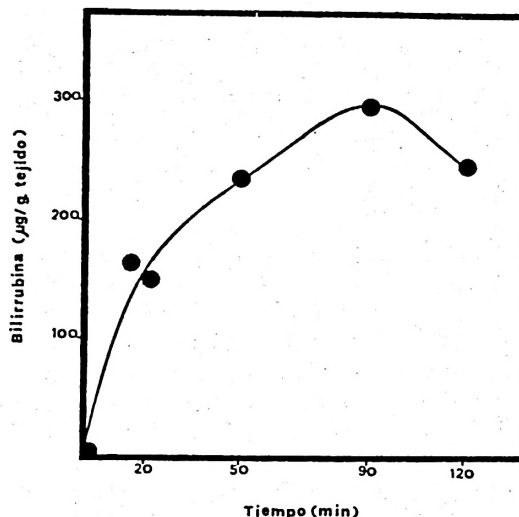


Fig. 6. *Bilirrubina conjugada en bilis.* Tras la administración intraperitoneal de biliverdina hay un aumento del contenido de bilirrubina conjugada en bilis que alcanza su máximo a los 90 minutos.

La actividad en la fracción celular del exudado (macrófagos) fue de 1,04 $\mu\text{moles Bv}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg}$ proteína en comparación a los obtenidos en la fracción no celular del exudado (0,17 $\mu\text{moles Bv}\cdot\text{min}^{-1}/\text{mg}$ proteína).

Biliverdina y regeneración hepática. Tras una hepatectomía parcial del 90 % hay un aumento significativo y transitorio de los niveles de biliverdina plasmática (fig. 7). Si se administra Bv por vía i.p. aparecen mitosis en el hígado (tabla I). Ambos hechos han permitido proponer a la biliverdina como el estímulo desencadenante del proceso regenerativo hepático (11, 15). Para verificar la validez de esta hipótesis se perfundieron ratas con biliverdina por vía i.v. escogiendo, a la vista de los datos farmacocinéticos estudiados, el curso y la velocidad de perfusión, de manera que la curva de los niveles plasmáticos de biliverdina reprodujera la obtenida tras la hepatectomía del 90 % (tabla II, experimentos 1 y 2), que

Tabla I. *Índice mitótico (%/∞) de los hepatocitos después de hepatectomía parcial o administración intraperitoneal de biliverdina.*

Los hígados fueron obtenidos a tiempos variables, fijados en formol, procesados y teñidos. El índice mitótico se estimó por recuento de 100 campos, 150 células por campo.

	Índice mitótico (%/∞)									
Tiempo (h)	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28
Hepatectomía parcial	0,9	—	—	—	1	—	6,5	19	17	15,8
Biliverdina	0,3	1,3	3,6	1,5	1,2	0,1	0,5			

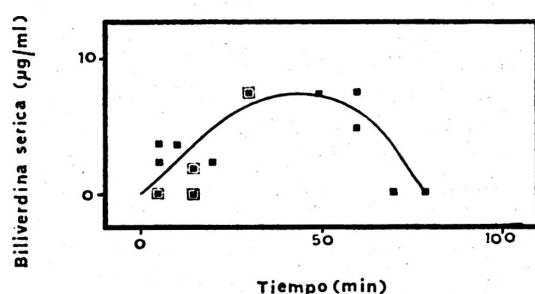


Fig. 7. *Nivel sérico de biliverdina tras la hepatectomía parcial.*

La biliverdina sérica fue determinada a tiempos variables después de la hepatectomía del 90 %. Se detectó un máximo de 8 µg/ml suero a los 40-50 minutos después de la intervención.

excediese el valor máximo de ésta, 8 µg/ml plasma (experimento 3), o que mantuviese los niveles plasmáticos durante más tiempo (experimento 4). Se inyectó a las ratas colchicina (1 mg/kg peso) dos horas antes del sacrificio y en las preparaciones de hígado se evaluó el índice mitótico. No hubo mitosis en ninguno de los animales perfundidos ni aun superando con exceso los niveles encontrados tras la hepatectomía parcial (tabla II).

Tabla II. *Índice mitótico de los hepatocitos después de infusión de biliverdina (7 mg).*

Experimento	N.º de ratas	Dosis inicial µg	Velocidad de infusión µg/min	Índice mitótico %/∞
1	2	0	49	< 0,1
2	1	0	50	< 0,1
3	2	1.400	40	< 0,1
4	4	1.400	20	< 0,1

Del estudio de la tabla I se desprende que el tiempo al que aparecen las mitosis es aparentemente insuficiente para completar un ciclo celular (6), lo que sugiere que dichas células deben estar detenidas en algún punto del ciclo, distinto de G₀. Para estudiar esta posibilidad, se inyectó a los animales, después de la administración de biliverdina, un pulso de 4 h de 150 µCi de timidina (act. específica 5 Ci/mMol). Los cortes del hígado fueron procesados para autorradiografías y, una vez revelados, se estudiaron las marcas radiactivas. En la tabla III se recogen los datos del índice de marcaje de núcleos. Como control se utilizó un hígado regenerante de 24 h. Las figuras mitóticas que aparecen en los hígados de animales inyectados con biliverdina no presentan marcas radiactivas y, por tanto, no han incorporado timidina. En el control, los núcleos en mitosis de cortes de hígado regenerante presentaban numerosas marcas radioactivas.

Tabla III. *Índice mitótico e índice de marcaje nuclear después de inyección intraperitoneal de xenobióticos.*

	Índice mitótico (%/∞)	I. marcaje nuclear
Tierra de diatomeas ^a	3,27	3,7
Bacterias muertas (2,7-10 cel/ml) ^a	6,85	3,7
Hemina ^a	6,22	—
Biliverdina ^a	3,6	4,1
Hepatectomía 70 % ^b	47	130

^a Medido a las 14 h después de la administración (máximo).

^b Medido a las 24 h después de la hepatectomía.

Dado que este efecto sólo es observable al inyectar por vía i.p. la biliverdina, pero no por vía i.v., se pensó en la posibilidad de que se tratase de un efecto indirecto de la administración. Para comprobarlo se inyectó por vía i.v. diversos agentes capaces de provocar una irritación peritoneal inespecífica: bacterias muertas, hemina, tierra de diatomeas. Los índices mitóticos a sus tiempos máximos fueron del mismo orden de los obtenidos con biliverdina (tabla III).

Discusión

Eliminación y metabolismo de la biliverdina exógena. La biliverdina es un metabolito generado en condiciones fisiológicas en el citoplasma por la heme oxigenasa microsomal dependiente del citocromo P-450. Acoplado al sistema oxigenasa está el biliverdin reductasa, de manera que el metabolito acumulable de la degradación del heme es la bilirrubina (16).

La administración i.p. de biliverdina a ratas provoca un aumento del exudado. El pigmento insoluble a pH de 7, se solubiliza asociándose a las proteínas del exudado peritoneal, fundamentalmente a albúmina, como lo demuestran electroforesis en acrilamida en condiciones no desnaturizantes. La identidad de la proteína se estableció, por una parte, por inmunoelectroforesis con suero antialbúmina y suero antisuero total de rata, y, por otra, a través de una cromatografía de afinidad, en la que biliverdina unida a hexametilén-Sepharose, retuvo mayoritariamente la albúmina al pasar a través de ella suero de rata.

Tras la inyección intraperitoneal, los niveles de biliverdina plasmática sólo aumentaron ligeramente. Por el contrario, los valores de bilirrubina no conjugada (diferencia entre total y conjugada) sí aumentaron. Esto sugiere que la biliverdina

no llega de manera efectiva al circuito sanguíneo y por tanto al hígado.

La actividad biliverdín reductasa presente en el exudado peritoneal reduce la biliverdina de manera que sólo llega a sangre bilirrubina no conjugada. Paralelamente al aumento de bilirrubina, hay un aumento importante de secreción biliar. La mayor parte de la biliverdina aparece como bilirrubina conjugada en la bilis 90 minutos después de la administración.

La cinética de fijación de la biliverdina a la albúmina y por tanto su solubilización fue sensiblemente más rápida que la de su desaparición de la cavidad peritoneal, por lo que éste no es el paso limitante en su eliminación. El paso limitante en la eliminación de la biliverdina de la cavidad peritoneal parece ser el de su conversión a bilirrubina.

Tras una administración intravenosa de biliverdina hay un aumento rápido de los niveles plasmáticos, que disminuyen de acuerdo con una cinética exponencial de primer orden. La eliminación de biliverdina es, en este caso, fundamentalmente hepática y los niveles plasmáticos de bilirrubina libre y conjugada permanecen dentro de los valores del control.

Biliverdina y regeneración hepática. Existen numerosas evidencias en favor de que el estímulo que inicia la proliferación de los hepatocitos tras la hepatectomía parcial es un factor de tipo humoral, y que puede estimularse la división celular en un hígado de animal sano inyectándole fracciones más o menos purificadas del suero de un animal hepatectomizado (9).

La aparición transitoria de un pico de biliverdina en plasma, tras una hepatectomía del 90% (fig. 5), ha servido de base a OKAZAKY *et al.* (15) para formular una hipótesis sobre el papel iniciador de la biliverdina en el proceso regenerativo.

Dicha hipótesis adolece de ciertas im-

precisiones conceptuales que unidas a la evidencia experimental presentada en este trabajo la hacen, en nuestra opinión, inverosímil. En opinión de OKAZAKY *et al.* (15), un metabolito que está presente en sangre, y requiere del hígado para ser eliminado, puede ser el responsable del control del tamaño del órgano. Una reducción de éste impediría al hígado residual eliminarlo de manera que aumentando su tasa por encima de un cierto valor crítico, actuaría como señal desencadenante de la entrada en el ciclo celular de los hepatocitos. Tal papel ha sido postulado para la biliverdina.

Hemos estudiado el mecanismo y la farmacocinética de eliminación de biliverdina, y a la vista de esos datos se realizaron experimentos en los que se infundió a un animal sano por vía i.v. una cierta dosis de Bv, con una velocidad de infusión tal que los niveles plasmáticos reproduciesen o sobrepasasen los valores detectables tras una hepatectomía parcial y se estudiaron los efectos sobre el hígado. Los resultados fueron negativos. No se consiguió en ningún caso un aumento significativo del I.M. (tabla II), por lo que cabe concluir que la biliverdina no puede ser el agente que induce a los hepatocitos a entrar en el ciclo de división.

Dichos resultados concuerdan con observaciones anteriores nuestras (8) en ratas unidas en parabiosis. Cuando a una de ellas se le inyectó biliverdina i.p., sólo se detectó un aumento precoz del índice mitótico en el hígado de la rata inyectada pero no en el de su compañera. En situación experimental similar, la hepatectomía parcial provoca aumento del índice mitótico en ambos animales. Esto contrasta con el hecho descrito (15) y comprobado por nosotros, de un pequeño aumento del índice mitótico (3-5 %/100) tras la administración i.p. de biliverdina que, sin embargo, aparece antes de lo que cabría esperar para una célula que recorra un ciclo celular completo (tabla I). Este hecho, junto a la inexistencia de marcas

radioactivas en los núcleos en mitosis tras un pulso suficientemente largo de H³-timidina sugieren según los criterios de GELFANT (6) la existencia de células detenidas en G₂.

En efecto, mientras en el control rata hepatectomizada todas las mitosis tienen marcas radioactivas, y el índice de marcaje nuclear es mayor que el índice mitótico (tabla III), en los experimentos con biliverdina el índice es igual o inferior a mitótico.

Estos argumentos apoyan la existencia en hígado de células que entran en mitosis sin pasar por la fase de síntesis, es decir, detenidas en G₂, fenómeno que ya ha sido descrito en otros tejidos (4, 12). El estímulo por el que este proceso se pone en marcha parece a su vez independiente del xenobiótico utilizado (tabla III).

Concluyendo, los datos experimentales aquí presentados sugieren que la acción de la biliverdina sobre la regeneración hepática observada por OKAZAKY *et al.* (15) no es atribuible a los niveles que la biliverdina alcanza en el plasma, sino probablemente un efecto artefactual de la vía de administración.

Resumen

La biliverdina ha sido detectada en plasma de manera transitoria poco después de una hepatectomía subtotal. En base a ello ha sido propuesta como la señal biológica que desencadena el proceso regenerativo en el hígado tras la hepatectomía parcial. Se ha estudiado la verosimilitud de esta hipótesis sobre la base de los datos obtenidos del metabolismo de la biliverdina administrada exógenamente. (Eliminación de la cavidad peritoneal: $t^{1/2} = 40$ min, $K = 0,0175 \text{ min}^{-1}$; eliminación del torrente circulatorio: $t^{1/2} = 11$ min, $K = 0,068 \text{ min}^{-1}$). No existe aumento del índice mitótico al infundir biliverdina intravenosa de forma tal que se reproduzcan los niveles plasmáticos similares a los detectados tras la hepatectomía subtotal. Si se detecta aumento cuando la administración es intraperitoneal. Dicho efecto, sin

embargo, no es atribuible a la biliverdina, dado que la administración de otros xenobióticos por vía i.p. produce el mismo efecto. Las mitosis detectadas provienen de células detenidas en G₂.

Bibliografía

1. BARROWMAN, J. A., BONNET, R. y BRAY, P. J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **444**, 333-337, 1976.
2. BONNET, R. y MC DONAGH, A. F.: *J. Chem. Soc. Perkins Trans.*, **1**, 881-888, 1973.
3. CASTELL, J., GÓMEZ-L., M. J., GARCÍA, M. D. y COLOMA, J.: 15th Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Belgrado, 1980 (n.º 165).
4. CHOIE, D. D. y RICHTER, G. W.: *Cell. Tiss. Kinet.*, **11**, 235-239, 1978.
5. CUATRECASAS, P.: *J. Biol. Chem.*, **245**, 3059-3069, 1970.
6. GELFANT, S.: *Cancer Res.*, **37**, 3845-3862, 1967.
7. GÓMEZ-L., M. J., GARCÍA, M. D., CAMAÑAS, A. y BÁGUENA, J.: 15th Meeting of the European Association for the Study of the Liver. Belgrado, 1980 (n.º 166).
8. GÓMEZ-L., M. J., GARCÍA, M. D., CAMAÑAS, A. y BÁGUENA, J.: *Gastroent. Hepat.*, **4**, 121-124, 1981.
9. GÓMEZ-L., M. J. y CASTELL, J.: *Gastroent. Hepat.*, **5**, 279-289, 1982.
10. LAEMLI, V. K.: *Nature*, **227**, 680-685, 1970.
11. MATSUI, I., OTANI, S. y MORISAWA, S.: *Life Sci.*, **24**, 2231-2235, 1979.
12. MALAMUD, D., GONZÁLEZ, E. M., CHIU, A. y MALT, R.: *Cancer Res.*, **32**, 1226-1229, 1972.
13. NOWOTNY, A.: *Basic Exercises in Immunochimistry*. Springer Verlag. Berlín, 1979.
14. ORNSTEIN, L.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 321-349, 1964.
15. OKAZAKY, K., NISHIMURA, H., ARIZONO, H., NISHIMURA, N. y SUSUKI, Y.: *B.B.R.C.*, **81**, 512-520, 1978.
16. TENKUNEN, R., ROSS, M. E., MARVER, H. S. y SCHMID, R.: *Biochemistry*, **9**, 298-303, 1970.
17. WILLIAMS, C. A. y GRABAR, P.: *J. Immunol.*, **74**, 158-160, 1955.