

Alteraciones funcionales en la regeneración hepática experimental

A. Aznar Aznar *
 T. Martínez López **
 C. Gutiérrez Ortega ***
 J. González Alvarez ****

RESUMEN

Se hace un estudio en 124 ratas machos, 40 del grupo testigo y 84 a las que se practica una hepatectomía del 70%, según técnica de Higgins y Anderson. La mortalidad y pérdida de peso fueron mayores en el grupo experimental (10,9% de mortalidad y 30,18% de pérdida de peso) que en el grupo testigo (8,6% y 3,27%, respectivamente). Los resultados analíticos fueron prácticamente normales en la serie testigo, mientras que las ratas sometidas a hepatectomía parcial presentaron disminución de las proteínas plasmáticas, debida a descenso de la albúmina con aumento relativo de las globulinas y alteración de la relación albúmina/globulina. También se apreciaron alteraciones en las transaminasas, LDH, CPK, alpha-amilasa y fosfatasa alcalina y otras menos intensas en las cifras de bilirrubina, uremia y glucemia. Se resalta el hecho de que estas alteraciones funcionales no se producen de modo uniforme, sino por medio de ondas o fases en las que la alteración funcional es mayor.

SUMMARY

A study of 124 male rats, 40 in a witness group and 80 in the experimental group is made. The animals in the experimental group were submitted to 70% hepatectomy following the technique of Higgins and Anderson. Mortality and weight loss were higher in the experimental group, and the analytic results were practically normal in the witness series while rats undergoing subtotal hepatectomy showed a fall in plasma proteins owing to a decrease in albumin with a relative increase of globuline fractions and a change in albumin/globulin. Changes were also observed in transaminase, LDH, CPK, amilase and alkaline phosphatase levels and less intensely in bilirubine urea and glucose. We point out that these functional alterations are not produced in a uniform way but in waves, of phases in which functional alteration is greater.

INTRODUCCION

El hígado está dotado de un gran poder de regeneración y de una enorme reserva funcional. Esto hace posible que se pueda practicar una hepatectomía del 70-80% y que sea tolerada perfectamente tanto en el hombre (38)

como en los más diversos animales de experimentación (32).

Pero no todos los hígados tienen la misma capacidad de regeneración y reserva funcional (29). Así, el hígado cirrótico tiene menor capacidad de regeneración después de una hepatectomía parcial (23), y lo mismo ocurre cuando se asocia una oclusión de la circulación venosa hepática al proceso desencadenante de la regeneración (34).

Estos hechos cobran especial relevancia si se tiene en cuenta que en algunas series el 70% de los pacientes intervenidos por carcinoma hepatocelular presentan cirrosis hepática concomitante, lo que puede conducir al fra-

caso por fallo funcional hepático. Okamoto y cols., 1984 (33).

Por todo ello, es de gran interés para el cirujano profundizar en el conocimiento de las alteraciones funcionales que se producen durante el proceso regenerativo y que le podrán ayudar a afrontar con mayor probabilidad de éxito el postoperatorio de las grandes resecciones hepáticas.

MATERIAL Y METODO

Se utilizaron 124 ratas machos, blancas, pertenecientes a la cuarta generación filial del cruce entre ratas Wistar y ratas de raza Sprague-Daw-

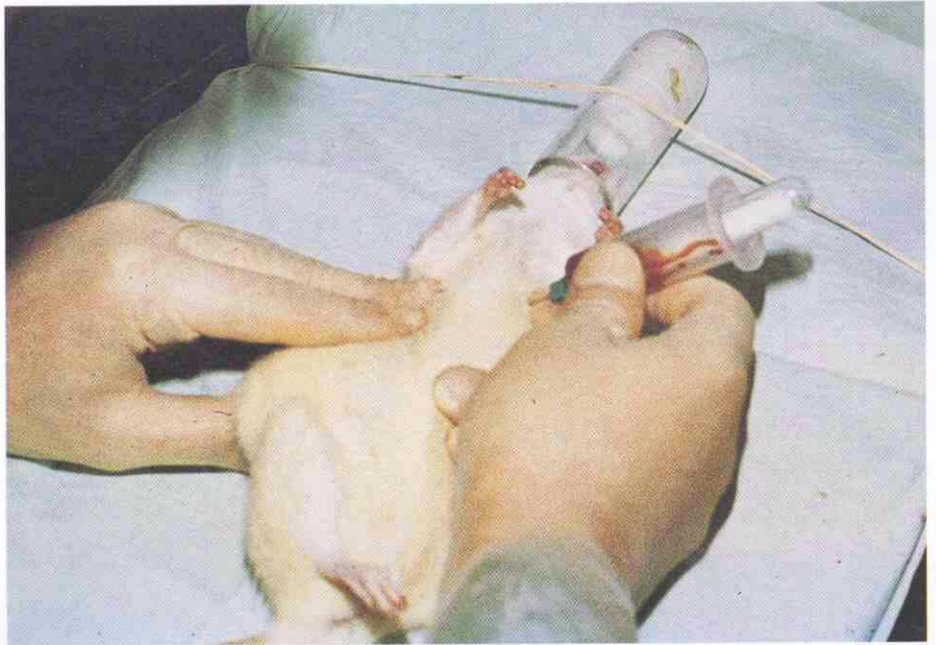
* Comandante Médico.
 ** Comandante Veterinario. Departamento de Medicina y Cirugía Experimental.
 *** Licenciado en Ciencias Biológicas. Departamento de Medicina y Cirugía Experimental.
 **** General Subinspector Médico. Servicio de Cirugía Infantil. Departamento de Medicina y Cirugía Experimental. Hospital Militar Central «Gómez Ulla». Madrid.

ley; de una edad aproximada de 80-90 días y pesos comprendidos entre 270 y 350 g. Estas ratas habían sido mantenidas desde su nacimiento en condiciones ambientales preestablecidas y alimentación standar, con temperatura ambiente de 20-23° C y fotoperiodicidad de 12 horas.

En 5 animales se practicó extracción de sangre por punción cardiaca, con sistema Venojet dotado de doble aguja siliconada y tubo de vacío con anticoagulante incorporado (Fig. 1) y se sacrificaron por sobredosisificación anestésica, obteniéndose muestras de hígado para su pesaje.

Con las 119 ratas restantes se hicieron dos grupos: el grupo testigo, formado por 35 ratas distribuidas en 7 series de 5 ratas cada una, y el grupo experimental, con 84 ratas distribuidas en 14 series de 6 ratas cada una.

Los animales del grupo experimental fueron sometidos a una hepatectomía del 70% (Figs. 2 y 3), según técnica de Higgins y Anderson (1931) (20), y se sacrificaron a los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 y 30 días, respectivamente. Una vez anestesiada la



Extracción de sangre por punción cardiaca. Véase cómo el latido cardiaco hace propulsar la sangre dentro del sistema Venojet.

rata, se obtenía muestra de sangre por punción cardiaca (Fig. 1) para estudio analítico y a continuación se practicaba la necropsia disecándose el hígado en regeneración para su pesaje y estudio.

Los 35 animales de la serie testigo fueron sometidos a una laparotomía y manipulación suave del hígado (operación simulada), y más tarde se sacrificaban con la misma técnica que en la serie experimental a los 1, 2, 3, 4, 5, 8 y 10 días, respectivamente.

Todas las ratas se pesaban al principio y final de la experiencia, del mis-

mo modo que las piezas de hígado obtenidas en la necropsia.

En las muestras de sangre se practicaban las siguientes pruebas de laboratorio: proteínas totales, proteinograma, fosfatasa alcalinas, LDH, CPK, transaminasas, GOT y GPT, alpha-amilasa, triglicéridos, colesterol, creatinina, glucemia, uremia, bilirrubina, calcio y ácido úrico.

RESULTADOS

De los 124 animales utilizados murieron 12 (9,6%), 9 del grupo experimental (10,9%) y 3 del grupo testigo (8,6%).



Fig. 2. Detalle de la técnica de Higgins y Anderson para hacer exteriorizar el 70% del hígado.



Fig. 3. Técnica de Higgins y Anderson. La ligadura está preparada para efectuar la hepatectomía del 70%.



Fig. 5. Detalle del hígado en regeneración a los 3 días de la hepatectomía.

La pérdida de peso alcanzó hasta un 30,18% en la serie experimental, con un máximo a los 4 días de la intervención y empezando a recuperarse luego, para alcanzar el peso original entre los 15 y 20 días. En la serie testigo la pérdida de peso fue menor, del 3,27%, y su recuperación fue más rápida y precoz que en la otra serie.

Las ganancias de peso del hígado en regeneración han sido expresadas en tantos por ciento y con ellas se ha elaborado la gráfica 1. En ella se aprecia cómo la ganancia de peso cursa en dos ondas o fases, en las cuales el poder regenerativo es mayor, y cómo a los 10-15 días se ha alcanzado prácticamente el peso inicial del hígado. Ver figuras 4 y 5.

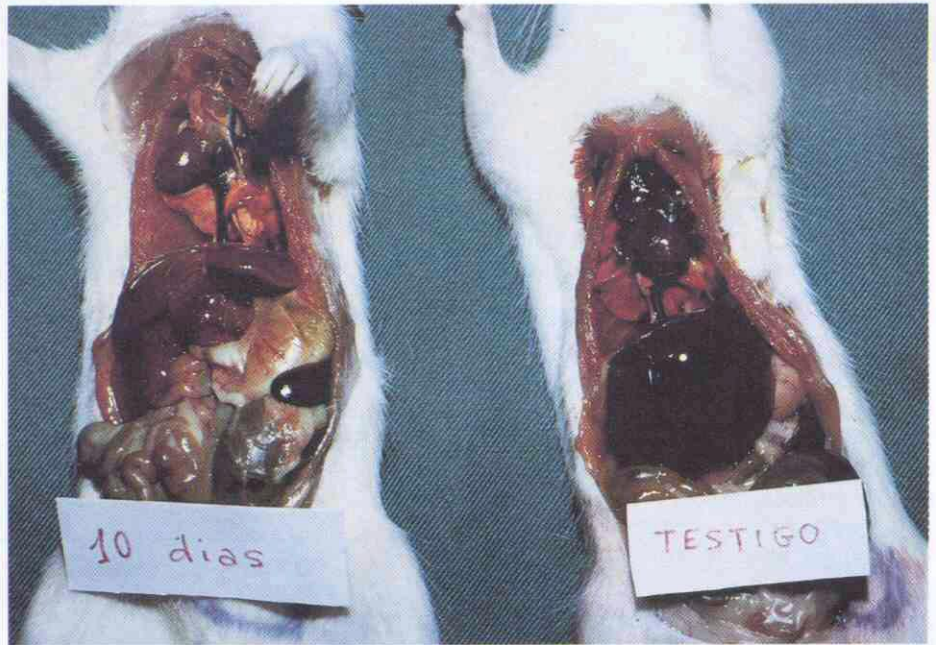
RESULTADOS ANALITICOS

En la serie testigo los resultados fueron prácticamente normales en todas las pruebas realizadas desde el primer día de postoperatorio, por lo que pasaremos a analizar las alteraciones aparecidas en el grupo experimental.

Con los resultados obtenidos en la determinación de proteínas se ha elaborado la gráfica 2. Las proteínas totales disminuyen mucho a las 24 horas, bajando una media de 2,4 g. con respecto a los animales de la serie testigo, lo que representa un 34%. A las 48 horas continúa descendiendo para iniciarse la recuperación a los 3 días. A los 10 días, las cifras obtenidas empiezan a acercarse a la normalidad.

Esta disminución en los niveles de proteínas se debe fundamentalmente a un descenso de la albúmina, descenso que es más intenso a los 1-2 días, para recuperarse a los 3 y sufrir un nuevo descenso a los 5-6 días (ver gráfica 2). La relación albúmina/globulina se altera invirtiéndose y presentándose dos fases paralelas a las apuntadas en los valores de albúmina.

El proteinograma se ha reflejado en la gráfica 3, donde con el descenso de la albúmina se aprecia un aumento re-



Regeneración hepática. Obsérvese cómo a los 10 días de la hepatectomía el hígado ha recuperado prácticamente el volumen y peso iniciales.

lativo de las globulinas, en especial de la globulina beta, que es paulatino hasta el cuarto día, para ir descendiendo luego, acercándose a los valores normales, a partir de los 10 días. La globulina gamma presenta un marcado aumento con un pico a los 2 días y un nuevo descenso a los 4-5 días, para volver a incrementarse a los 8 días. La alpha sub-1 también aumenta con un pico a las 24 horas y otro a los 4 días y la alpha sub-2 es la que menos se altera.

Las transaminasas también se alteraron en la serie experimental (gráfica 4), especialmente la GOT, que a las 24 horas alcanzó valores de 518 ± 106 tendiendo después a la normalización y cursando con nuevos picos de mayor alteración a los 4 y a los 10 días. La GPT también presentó un pico de mayor alteración a las 24 horas con valores de 355 ± 79 y un segundo pico a los 4 días con valores de 78 ± 22 .

La LDH ascendió mucho a partir del momento de la intervención, alcanzando valores de 1.699 ± 329 a las 24 horas, para descender luego suavemente pero manteniéndose con valores altos hasta el final de la experiencia, 910 ± 80 a los 10 días y 641 ± 134 a los 30 días (gráfica 5).

La CPK también sufrió un gran incremento durante toda la experiencia, manteniéndose los valores entre 1095 y 2230 U. Algo parecido ocurrió con la alpha-amilasa, que ascendió a 5.182 ± 137 U a las 24 horas, manteniéndose elevada hasta prácticamente los 30 días.

La fosfatasa alcalina también se elevó cursando la alteración de modo bifásico con un pico a los 1-2 días con valores de 998 ± 55 y otro a los 4 días con una media de 980 ± 148 (Fig. 5).

Las alteraciones del calcio sólo mostraron una disminución de la calcemia durante los primeros días en algunos casos, pero manteniéndose siempre dentro de la normalidad en otros.

El 60% de los casos presentaron una elevación discreta de la bilirrubina a las 24 horas, normalizándose rápidamente.

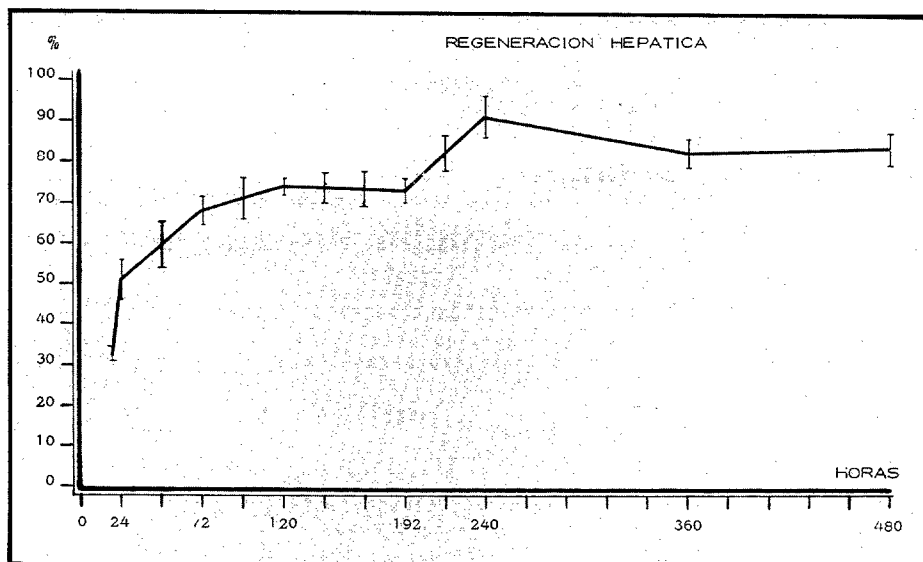
El colesterol y los triglicéridos prácticamente no se alteraron, al igual que el ácido úrico y creatinina, que se mantuvieron siempre dentro de los límites normales. Las glucemias fueron prácticamente normales, aunque algo bajas, durante los cuatro primeros días (57 a 73 mg/dl.). No así la urea, que ascendió discretamente a las 24 horas, para normalizarse a partir de los dos días.

DISCUSION

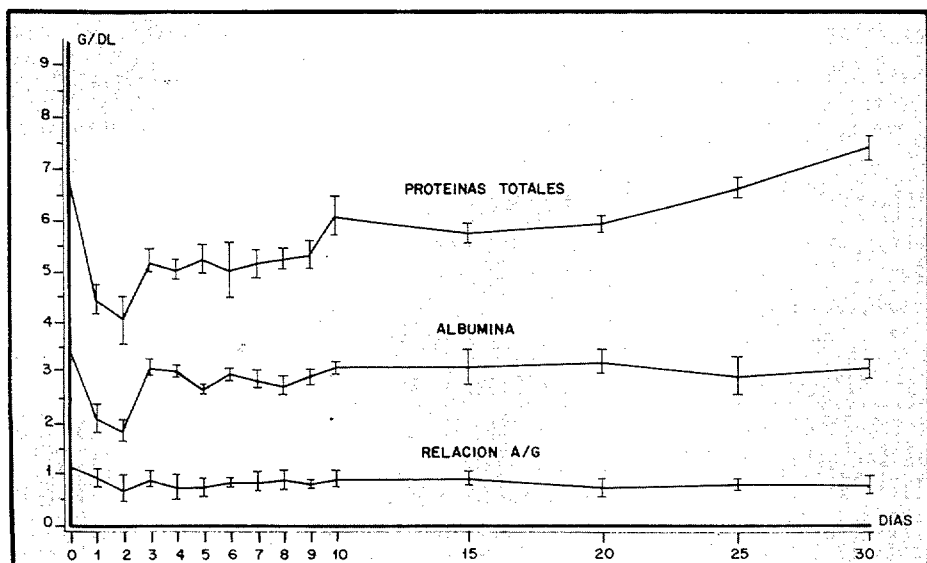
La mortalidad del 10,9% para el grupo experimental frente a un 8,6% en el grupo testigo es más elevada debido al hecho de la mayor agresividad de la intervención unido al incremento del efecto tóxico de los anestésicos, al privar al animal de un 70% de su hígado (14), lo que está en consonancia con los resultados obtenidos en estudios anteriores (7, 6).

La regeneración hepática puesta de

manifiesto por el incremento de peso del 30% del hígado respetado se mantiene en la línea de los resultados obtenidos por Higgins y Anderson, 1931 (20); Weinbren, 1959 (41); Sigel, 1967 (37), presentando el comportamiento bifásico ya descrito con anterioridad (51, 8).



Gráfica 1. Ganancia de peso del hígado durante la regeneración hepática expresada en tantos por ciento.



Gráfica 2. Evolución de las proteínas totales, albúmina y relación albúmina/globulina durante la regeneración hepática.

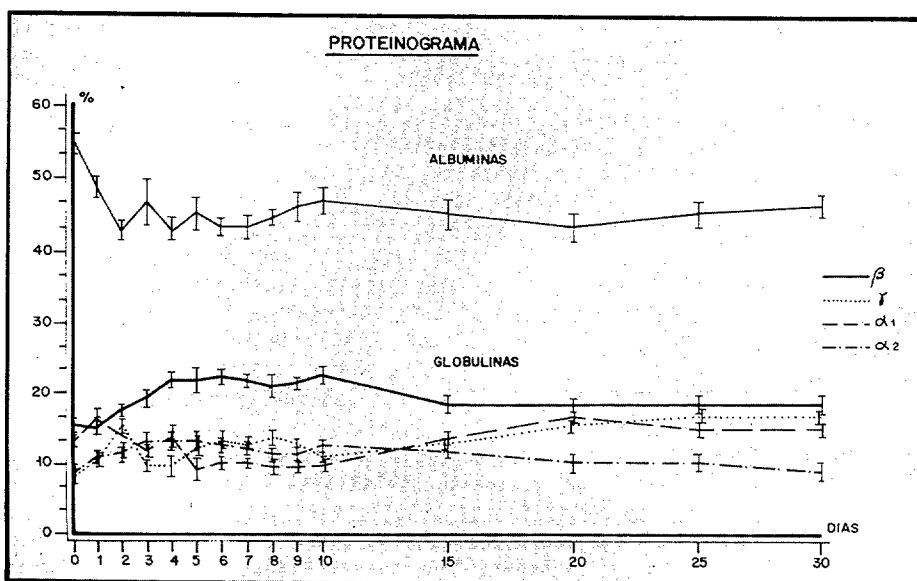
tin, en 1938 (15), y ha sido confirmada después por numerosos autores, viéndose que es más intensa durante las primeras horas de la regeneración, llegando a ser, según Roberts y White, 1949 (36), de 1,2 g/100 ml., lo que representa un 20% de lo normal, y manteniéndose sensiblemente baja a las 48 horas.

En nuestra experiencia, la disminución de las proteínas plasmáticas es todavía más intensa, 2,4 g. (34%), manteniéndose a las 48 horas y pudiéndose comprobar, por la mayor duración del seguimiento, que este descenso actúa a modo de ondas o fases con picos de mayor alteración a los 2 y 5 días de postoperatorio. Esta disminución se debe fundamentalmente a la seroalbúmina con aumento relativo de la globulina beta y gamma y aumento bifá-

El proceso regenerativo hepático provoca alteraciones funcionales y metabólicas intensas que han sido descritas también en clínica humana y que se normalizan a las 6 semanas de la hepatectomía (4, 22, 26). En la rata estas alteraciones se traducen por una pérdida de peso que oscila entre el 15% (5) y el 25% (Becker, 1963) (10).

De todas las alteraciones funcionales la más llamativa es la disminución de la síntesis de proteínas plasmáticas. En el proceso regenerativo hay un incremento de la síntesis de proteínas específicas hepáticas (2, 27) en detrimento de la síntesis de proteínas plasmáticas, que descienden al principio de la regeneración hepática y se mantienen durante varios días por debajo de las cifras normales (15, 24, 30, 36).

Esta disminución de las proteínas plasmáticas fue detectada por Chanu-



Gráfica 3. Proteinograma. Evolución de las albúminas y globulinas a lo largo del proceso de regeneración hepática.

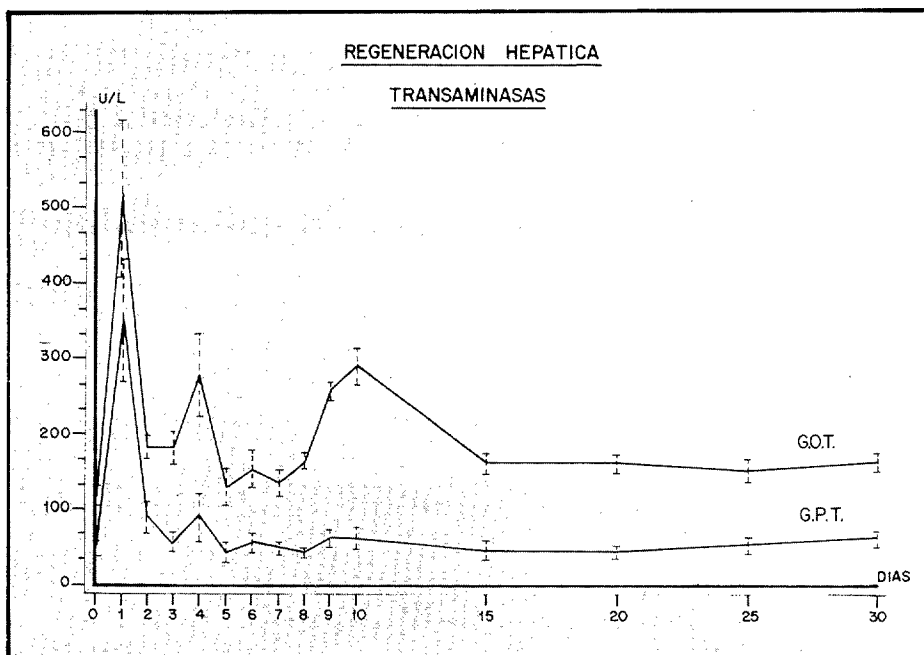
sico de la globulina α_1 . La α_2 es la que menos se altera. Estos resultados están en la línea de los descritos por los diversos autores que se han ocupado del problema (11, 15). Estas alteraciones se traducen por una inversión de la relación albúmina-globulina, semejante a la observada en la obstrucción venosa hepática experimental (3).

Esta incapacidad para producir proteínas plasmáticas en cantidad adecuada también afecta a la producción de fibrinógeno (16, 17), protrombina (1, 19) y otros factores de la coagulación (25), que se alteran de modo bifásico, tal como fue apuntado por nosotros (8).

La disminución de las proteínas plasmáticas ha sido atribuida por algunos autores al propio traumatismo quirúrgico, o bien a la falta de ingestión de alimentos en cantidades adecuadas durante el postoperatorio, e incluso a la hemodilución de las muestras de sangre obtenidas, pero estudios posteriores han demostrado que esto no es cierto (9, 30). El hecho de que no se produzca esta disminución en el grupo testigo habla a favor de esta última aseveración.

En cuanto a la función de almacenamiento de carbohidratos por el hígado, en los estudios morfológicos se ha detectado una pérdida de glucógeno citoplasmático durante las primeras horas (5, 6, 18), pero este hecho no tiene traducción clínica, siendo las cifras de glucemia prácticamente normales aunque algo bajas en algunos casos. Lo mismo ocurre con el acumulo de lípidos intracitoplasmáticos descrito durante la regeneración hepática (6, 40), sin que aparezcan alteraciones significativas del colesterol y triglicéridos en sangre, como hemos podido comprobar.

Las alteraciones de la bilirrubina detectadas durante los primeros días de postoperatorio estarían en relación con una disminución de la capacidad del hígado en regeneración para extraer la bilirrubina sanguínea, conjugarla y excretarla; alteración que ha sido descrita como muy manifiesta al principio del postoperatorio, pero que pronto empieza a recuperarse (42) y que también se presenta después de la oclusión venosa hepática (35, 39).

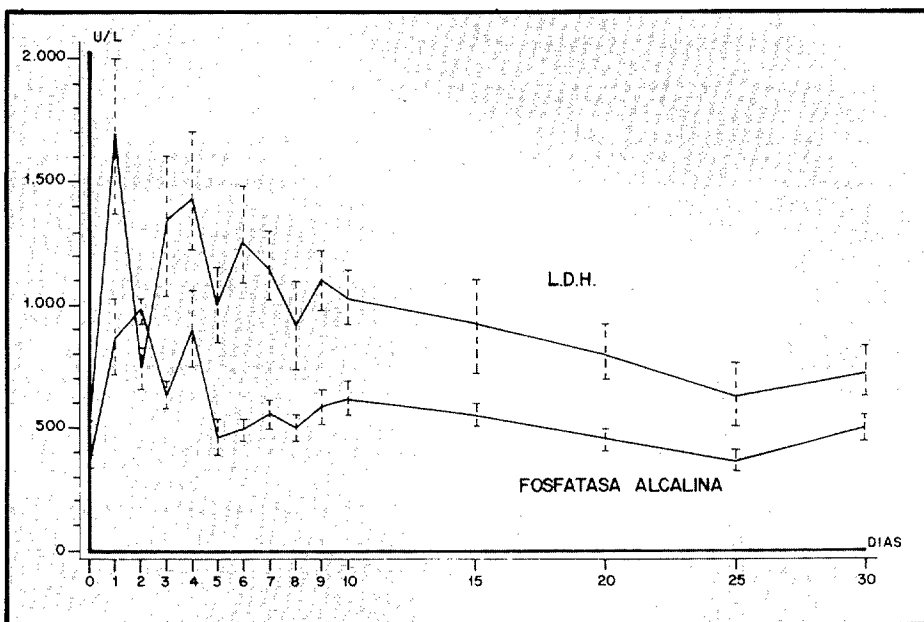


Gráfica 4. Modificaciones de las transaminasas durante el proceso regenerativo hepático.

Otras funciones, como es la destrucción de sustancias tóxicas producidas en otros lugares, son más difíciles de detectar. Lo que sí hemos encontrado es un aumento de las fosfatasas alcalinas, hecho que ya había sido descrito con anterioridad; tanto después de una hepatectomía parcial (13) como tras la oclusión venosa hepática (34). Algo parecido ocurre con las transaminasas, LDH y CPK (21, 31, 39) y con la urea, que se elevó durante los primeros días (35).

Pero lo realmente curioso de nuestra experiencia es el demostrar que cuando se observa el fenómeno durante un tiempo más prolongado se com-

prueba cómo estas alteraciones funcionales no se producen de modo uniforme, sino que lo hacen por ondas o fases en las que la alteración funcional es mayor. Esto que se ha puesto en evidencia con las alteraciones de la fosfatasa alcalina, de las transaminasas, de las proteínas plasmáticas y de la LDH estaría en consonancia con las alteraciones de la coagulación sanguínea que se producen simultáneamente (8) y que se corresponden con las alteraciones morfológicas y estructurales puestas en evidencia por microscopía óptica (5), microscopía electrónica (6) e histofotometría (7), y que han sido descritas con anterioridad.



Gráfica 5. Evolución de la LDH y fosfatasa alcalina durante la regeneración hepática.

BIBLIOGRAFIA

1. ANDERSON, G. F., y BARNHART, M. I.: «Prothrombin synthesis in the dog». *Amer J. Physiol.*, 206: 929, 1964.
2. ANDERSON, W. M.; GRUNDHOLM, A.; SELLS, B. H.: «Modification of ribosomal proteins during liver regeneration». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 62: 669, 1975.
3. ARMSTRONG, C. D.; RICHARDS, V.: «Results of long term experimental obstruction of the hepatic veins in dogs». *Arch. Surg.*, 48: 472, 1944.
4. ARONSEN, K. F.; ERICSSON, B.; PIHL, B.: «Metabolic changes following major hepatic resection». *Ann. Surg.*, 169: 102, 1969.
5. AZNAR AZNAR, A.; LLANES MENENDEZ, F.; LOPEZ ALONSO, A.; DOÑATE GIMENO, G., y MARTINEZ LOPEZ, T.: «Regeneración hepática. Estudio experimental en la rata». *Rev. Quir. Esp.*, 10: 263, 1983.
6. AZNAR AZNAR, A.; LLANES MENENDEZ, F.; LOPEZ ALONSO, A.; MARTINEZ LOPEZ, T.; MADERA GONZALEZ, J. C.: «Alteraciones ultraestructurales en la regeneración hepática experimental». *Medicina Militar*, 39: 17, 1983.
7. AZNAR AZNAR, A.; LLANES MENENDEZ, F.; LOPEZ ALONSO, A.; MARTINEZ LOPEZ, T.; BENTURA REMACHA, M. L.: «Aplicación de la histofotometría al estudio de la regeneración hepática». *Rev. Quir. Esp.*, 10: 321, 1983.
8. AZNAR AZNAR, A.; LLANES MENENDEZ, F.; LOPEZ ALONSO, A.; DOÑATE GIMENO, G.; LLANO BENEYTO, R.: «Regeneración hepática y alteraciones de la coagulación sanguínea. Estudio experimental en la rata». *Rev. Quir. Esp.*, 11: 33, 1984.
9. BARBIROLI, B.; POTTER, V. R.: «DNA synthesis and interaction between controlled feeding schedules and partial hepatectomy in rats». *Science*, 172: 738, 1971.
10. BECKER, F.: «Restoration of liver mass following partial hepatectomy: Surgical hepatotrophy. I. Influence of blood flow». *Am. J. Path.*, 43: 497, 1963.
11. BOCKUS, H. L.: «Gastroenterología». *Salvat Editores, S. A. Barcelona*, pág. 100, 1971.
12. BRAUN, G. A.; MARSH, J. B.; DRABKIN, D. L.: «Synthesis of plasma albumin and tissue proteins in regenerating liver». *Metabolism*, 11: 957, 1962.
13. BUCHER, N. L. R.: «Experimental aspects of hepatic regeneration». *New Engl. J. Med.*, 277: 687, 1967.
14. COOPERMAN, L. H.; WOLLMAN, H.; MARSH, M. L.: «Efectos de la anestesia en el hígado». *Surg. Clin. N. Am.*, 57: 421, 1977.
15. OHANUTIN, A.; HORSTENSTEIN, J. C.; COLE, W. S.; LUDEWIG, A.: «Blood plasma proteins in rats following partial hepatectomy and laparotomy». *J. Biol. Chem.*, 123: 217, 1938.
16. FORMAN, W. B.; BARNHART, N. I.: «Celular site for fibrinogen synthesis». *Jama*, 187: 128, 1964.
17. HAMASHIMA, Y.; HARTER, J. G.; COONS, A. H.: «The localization of albumin and fibrinogen in human liver cells». *J. Cell. Biol.*, 20: 271, 1964.
18. HARKNESS, R. D.: «Changes in the liver of the rat after partial hepatectomy». *J. Physiol.*, 117: 267, 1952.
19. HELGELAND, L.; LALAND, S.: «The localization of prothrombin in ratliver cell fractions». *Biochim. Biophys. Acta.*, 62: 200, 1962.
20. HIGGINS, G. M.; ANDERSON, R. M.: «Experimental pathology of the liver. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal». *Arch. Path.*, 12: 186, 1931.
21. KLING, S.; ALLEN, P. B. R.: «The effects of gradual, complete occlusion of the hepatic veins». *Surg. Forum.*, 9: 550, 1959.
22. LIN, T. Y.; CHEN, C. C.: «Metabolic function and regeneration of cirrhotic and non-cirrhotic liver after hepatic lobectomy in man». *Ann. Surg.*, 162: 959, 1965.
23. LIN, T. Y.; LEE, C. S.; CHEN, C. C.; LIAU, K. Y.; LIN, W. S. J.: «Regeneration of human liver after hepatic lobectomy studied by repeated liver scanning and repeated needle biopsy». *Ann. Surg.*, 190: 48, 1979.
24. MADDEN, S. C.; WHIPPLE, G. H.: «Plasma proteins their source, production and utilization». *Physiol. Rev.*, 20: 194, 1940.
25. MANN, F.; SHONYO, E. S.; MANN, F.: «Effect of removal of the liver on blood coagulation». *Amer. J. Physiol.*, 164: 111, 1951.
26. McDERMOTT, W. V., Jr.; GREENBERG, N. J.; ISSELBACHER, K. J.; WEBER, A. L.: «Major hepatic resection: Diagnostic, techniques and metabolic problems». *Surgery*, 54: 56, 1963.
27. MILLER, L. L.; BALE, W. F.: «Synthesis of all plasma protein fractions except gamma globulins by the liver. The use of zone electrophoresis and lysine-e-C¹⁴ to define the plasma proteins synthesised by the isolated perfused liver». *J. Exp. Med.*, 99: 125, 1954.
28. MILLER, L. L.; BLY, C. G.; WATSON, M. L.; BALE, W. F.: «The dominant role of the liver in plasma protein synthesis. A direct study of the isolated perfused rat liver with the aid for lysine-e-C¹⁴». *J. Exp. Med.*, 94: 431, 1951.
29. MOODY, F. G.; LEYTON, F. R.; JOAGIN, S. A.: «Estimation of the functional reserve of human liver». *Ann. Surg.*, 180: 592, 1974.
30. MUNRO, M. P.; AVERY, A.: «Influence of hepatectomy on relative concentrations of proteins components of dof plasma as determined by electrophoresis». *Am. J. Physiol.*, 146: 673, 1946.
31. NAGASUE, N.; INOKUCHI, K.: «Enzymatic and hemodynamic changes after short term hepatic outflow occlusion in the dog». *Surg. Gynecol. Obstet.*, 144: 179, 1977.
32. OHSAWA, J.; MIZUMOTO, R.; HONJO, I.: «Resectability and regeneration of liver in postsinusoidal block». *Jap. J. Surg.*, 6: 60, 1976.
33. OKAMOTO, E.; KYO, A.; YAMANAKA, N.; TANAKA, N.; KUWATA, K.: «Prediction of safe limits of hepatectomy by combined volumetric and functional measurements in patients with impaired hepatic function». *Surgery*, 95: 586, 1984.
34. OU, Q. J.; HERMANN, R. E.: «The role of hepatic veins in liver operations». *Surgery*, 95: 381, 1984.
35. PARKER, R. G. F.: «Occlusion of the hepatic veins in man». *Medicine*, 38: 369, 1959.
36. ROBERTS, S.; WHITE, A.: «Studies on the origin of the serum proteins». *J. Biol. Chem.*, 180: 505, 1949.
37. SIGEL, B.; BALDIA, L. B.; DUNN, M. R.; MENDUKE, H.: «Humoral control of liver regeneration». *Surg. Gynecol. Obstet.*, 124: 1023, 1967.
38. STONE, H. H.; LONG, W. D.; SMITH, R. B.; HEYNES, C. D.: «Physiologic considerations in major hepatic resections». *Am. J. Surg.*, 117: 78, 1969.
39. TAVILL, A. S.; WOOD, E. J.; KREEL, L.; JONES, E. A.; GREGORY, M.; SHERLOCK, S.: «The Budd-Chiari syndrome: correlation between hepatic scintigraphy and the clinical, radiological and pathological findings in nineteen cases of hepatic venous outflow obstruction». *Gastroenterology*, 68: 509, 1975.
40. VAN LANKER, J. L.: «Molecular and cellular mechanisms in disease». *Edit. Springer Verlag*, pág. 898, 1976.
41. WEINBREN, K.: «Regeneration of the liver». *Gastroenterology*, 37: 657, 1959.
42. WEINBREN, K.; BILLING, B. H.: «Hepatic clearance of bilirubin as an index of cellular function in the regenerating rat liver». *Brit. J. Exp. Path.*, 37: 199, 1956.