

Instituto de España

BASES CELULARES Y MOLECULARES DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA



María Cascales Angosto

Madrid 2008

Prólogo

FEDERICO MAYOR ZARAGOZA

*Académico de Número de las Reales Academias Nacionales
de Farmacia y Medicina*

Una vez más, la Doctora María Cascales Angosto, Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia, hace gala de su experiencia investigadora y de una notable capacidad docente y de divulgación científica presentándonos esta nueva obra *Bases Moleculares y Celulares de la Regeneración Hepática*, tema al que ha dedicado gran parte de su vida profesional como investigadora del CSIC, y que hoy publica con gran esmero el Instituto de España, donde ella hace años ocupó los cargos de Tesorera y Vicepresidenta.

Fue en 2001 cuando apareció otro volumen de la Doctora Cascales sobre *Mecanismos de Hepatotoxicidad*, editado por la Real Academia de Doctores de España como consecuencia de la celebración de un curso monográfico. Hoy desarrolla uno de los temas de aquel libro, *la regeneración hepática*, no sólo porque el estudio de los procesos regenerativos del hígado supone un tema de indudable interés, sino también porque es mucho lo que se ha avanzado en los últimos años en el conocimiento de los mecanismos moleculares y celulares involucrados en este proceso, en base a las modernas tecnologías de biología molecular y a los análisis en modelos experimentales genéticamente modificados.

El hígado, el órgano principalmente encargado del metabolismo de fármacos y xenobióticos, posee una extraordinaria capacidad de regeneración en respuesta a la pérdida de su propia masa, bien por hepatectomía parcial o por lesión hepatocelular severa causada por agentes hepatotóxicos o víricos. La adquisición de esta capacidad es de gran trascendencia y

se ha alcanzado a través de la evolución para asegurar la funcionalidad hepática requerida por el organismo. En todos los casos de pérdida de masa hepática, los hepatocitos remanentes experimentan una rápida transición al estado proliferativo, lo que significa que se incorporan al ciclo celular, replican su DNA y se dividen para restaurar las células perdidas y la capacidad funcional del hígado.

Muchos agentes se encuentran implicados en el proceso regenerativo. La misión de alguno de ellos es «preparar» las células para la proliferación, haciéndolas «competentes» para responder a los factores de crecimiento que inducen la mitosis. La terminación del proceso se debe a algunas citoquinas que inhiben la división celular.

La repoblación celular del hígado regenerante puede derivar de tres fuentes: división de los *hepatocitos remanentes*, diferenciación de las *células ovals* y a partir de *células troncales de la médula ósea*. Como regla general, la división de los hepatocitos preexistentes es la vía más rápida y eficiente para la reparación del hígado y la restauración de su funcionalidad. Las células ovals procedentes de células «madre» hepáticas, se dividen y diferencian en hepatocitos en caso de bloqueo de la división de los hepatocitos remanentes. Las células de la médula ósea pueden generar hepatocitos en hígado trasplantado, pero la frecuencia de la generación de hepatocitos por esta ruta es muy baja y en muchos casos apenas apreciable. Sin embargo, en hígado trasplantado, las células troncales de la médula ósea son una fuente importante de células hepáticas no parenquimáticas, como las células de Kupffer y las células endoteliales.

Se han hecho grandes progresos —y se continuarán haciendo— en estudios con células troncales mediante el escrutinio cuidadoso de resultados experimentales para la identificación de estas células. Los avances en este campo se relacionan estrechamente con el conocimiento de mecanismos de proliferación, diferenciación y transdiferenciación, unidos al de las interacciones de las células y los componentes de la matriz extracelular en tejidos normales y lesionados. El énfasis que se está dando a las células «madre» de la médula ósea oscurece a veces el hecho de la notable capacidad regenerativa del hígado, principalmente como resultado de la división de los hepatocitos maduros. La capacidad proliferativa de los hepatocitos quiescentes y altamente diferenciados excede con mucho a la de cualquier célula diferenciada de otros tejidos. Para los estudiosos de células «madre» puede sonar a paradoja el hecho reconocido de que las células troncales más eficientes en el hígado son los propios hepatocitos.

PRÓLOGO

Las resecciones quirúrgicas en humanos tienen lugar en casos de trasplante o de eliminación de tumores. El trasplante de un hígado pequeño a un receptor de mayor tamaño es un ejemplo de deficiencia funcional hepática. El pronóstico para la recuperación después de hepatectomía o trasplante de hígado depende de cómo se regenera el hígado después de la operación, de tal modo que el conocimiento de los mecanismos que gobiernan la regeneración hepática es de importancia fundamental en clínica para prevenir el fallo hepático postoperativo y para mejorar la recuperación del paciente.

Por cuanto antecede, este libro de la Profesora Cascales constituye una excelente revisión de los avances científicos más recientes referentes a la proliferación hepatocelular en respuesta a la agresión, abordándose aspectos tales como los sistemas celular y vascular del hígado, el ciclo celular, proteasas y matriz extracelular, vías y mecanismos involucrados en la regeneración hepática, citoquinas y factores de crecimiento, células «madre» hepáticas y, por último, envejecimiento y regeneración.

Felicito muy sinceramente a la Doctora María Cascales Angosto por su intensa y continuada actividad en el amplio campo de las Ciencias Farmacéuticas y tengo la seguridad que esta publicación será un importante apoyo para la enseñanza en Facultades de Biología, Farmacia, Medicina y Veterinaria, donde será de gran utilidad tanto a profesores como estudiantes. Auguro un gran éxito a esta obra muy documentada y llena de aportaciones de última hora, muchas de ellas de la propia autora.

Enero de 2008.

1. Anatomía hepática.

Sistemas celular y vascular

INTRODUCCIÓN

El hígado, la glándula de mayor tamaño en el organismo, juega un papel primordial en la homeostasis metabólica, al ser el lugar primario donde se regula el metabolismo energético que incorpora y procesa los nutrientes y los distribuye de manera controlada en los tejidos extrahepáticos. Además el hígado sintetiza proteínas esenciales, enzimas y cofactores necesarios para la digestión y para las funciones normales del organismo. También el hígado es el lugar principal para la destoxificación y eliminación de una gran variedad de compuestos exógenos y endógenos.

El hígado de los mamíferos constituye el 3 al 5% del peso corporal y posee cuatro lóbulos: izquierdo, medio, derecho y caudado. Los tres últimos están compuestos, a su vez, por dos sublóbulos. El hígado recibe un doble aporte de sangre, la arterial con elevada presión, a través de la arteria hepática y la venosa con menor presión, a través de la vena porta que procede del drenaje venoso esplénico. La arteria hepática es la vía que aporta oxígeno, mientras que la vena porta transfiere al hígado las sustancias nutritivas procedentes del tracto gastrointestinal, para su metabolismo y eliminación. El eflujo de la sangre se verifica a través de una vena común, la vena hepática. La circulación y la excreción biliar se encuentran compartimentalizadas para facilitar el intercambio entre sangre y hepatocitos. La arteria hepática asciende directamente del eje celíaco y se divide en dos ramales gástrico y gastroduodenal siguiendo, a través del ligamento hepatoduodenal, como propia arteria hepática, antes de bifurcarse e introducirse en los segmentos del hígado. La vena porta drena el efluente venoso del tracto digestivo y del bazo. En los mamíferos, la vena porta representa el único canal venoso que atraviesa otro órgano, el hígado,

antes de retornar al corazón. Al igual que la arteria hepática, la vena porta se bifurca en ramales que se distribuyen en los segmentos hepáticos. Por último, la sangre arterial y la venosa portal confluyen en el sinusoides, capilar recubierto por un endotelio que posee poros o fenestras, por los que circula el plasma sanguíneo, desde donde drena, a través de la vena hepática, en el interior de la vena cava inferior [1, 2].

La organización estructural del hígado refleja sus notables funciones. Este órgano segmentado, único en el organismo y dotado de funciones específicas, se encuentra interpuesto como un guardián, entre el tracto digestivo y el resto del cuerpo. Debido a esta interposición, el hígado, al recibir el doble aporte de sangre, venosa y arterial, importa, además del oxígeno, una gran variedad de xenobióticos y endobióticos entre los que se incluyen los nutrientes, sustancias tóxicas exógenas y las derivadas del sistema digestivo. Por tanto, una de las mayores funciones del hígado es la incorporación eficiente de aminoácidos, carbohidratos, lípidos y vitaminas y su almacenamiento, conversión metabólica y liberación a la sangre y a la bilis. Igualmente importante es la biotransformación hepática, que convierte las sustancias hidrofóbicas en derivados hidrosolubles que pueden ser excretados por bilis u orina. Debido a sus funciones metabólicas y secreciones en la sangre, el hígado se califica como órgano metabólico y como glándula endocrina. Al mismo tiempo su capacidad de producción y secreción de bilis le atribuye la misión de una glándula exocrina.

En el hígado coexisten diversos tipos de células que se clasifican en parenquimáticas (hepatocitos) y no parenquimáticas (ductulares, conjuntivas y sinusoidales). Las sinusoidales se dividen en: células endoteliales, células de Kupffer, células Pitt y células perisinusoidales (lipocitos o células Ito, *fat storing cells*).

LA UNIDAD FUNCIONAL HEPÁTICA

El concepto del lóbulo clásico definido como unidad funcional por sus características estructurales, se conoce desde hace más de un siglo. La estructura del lóbulo de Kiernan [3] era hexagonal con los tractos porta-les en las esquinas del hexágono y con una vena hepática en el centro. El lóbulo portal descrito por Mall [4] tenía un tracto portal en el centro y vénulas centrales en la periferia. Definiendo la unidad funcional sobre la base del flujo microcirculatorio en el interior del hígado, Rappaport *et al.* [5] escribieron el acino hepático. Los conceptos de lóbulo clásico,

1. ANATOMÍA HEPÁTICA. SISTEMAS CELULAR Y VASCULAR

lóbulo portal y acino pueden explicar con éxito algunos de los procesos fisiológicos y patológicos en el hígado, pero ninguno de ellos puede explicarlos todos. Parece cierto que el lóbulo clásico posee las bases estructurales y metabólicas del gradiente porto-central de los procesos metabólicos, el flujo vascular y el drenaje biliar. Sin embargo, no explica los gradientes laterales o portal-portal entre tractos portales adyacentes. El lóbulo clásico puede considerarse que está compuesto por unidades más pequeñas con el acino como candidato conceptual (Figura 1).

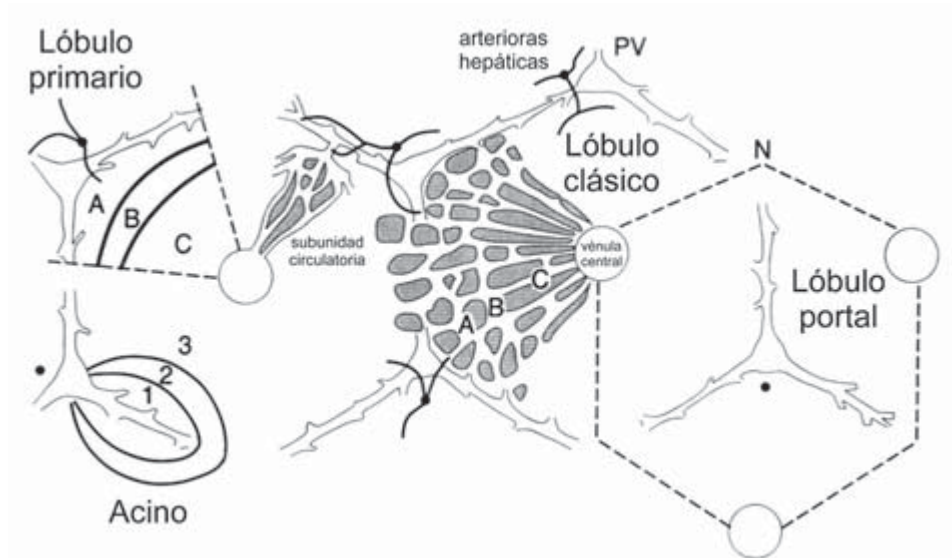


FIGURA 1. Lóbulo clásico, lóbulo portal, lóbulo primario, subunidad hepática microcirculatoria y acino (6).

Placa de células hepáticas

El elemento estructural de la organización hepática tisular es la placa individual de células hepáticas. Cada placa está formada por una simple capa de células, del grosor de una célula, que se extiende desde el espacio porta hasta la vénula hepática. Cada placa posee un número de hepatocitos entre 15 y 25 y una longitud aproximada de 400 μm . En estas placas se encuentran, además de los hepatocitos, las células endoteliales cubriendo los sinusoides, las células de Kupffer en el interior de los sinusoides, los lipocitos en el espacio de Disse, las células Pit localizadas o embebidas por las células endoteliales y las células del conducto biliar.

La función hepática se lleva a cabo en el interior de la placa. Es en esta estructura donde se verifican los contactos hepatocito-hepatocito, como también los contactos hepatocito-matriz extracelular. Las células se perfunden con sangre de la vénula porta y de la arteriola hepática. La sangre fluye a partir de estas estructuras vasculares a través de las fenestras de los sinusoides y drena en la vena hepática. Debido a la perfusión unidireccional las primeras células expuestas a la sangre estarán en contacto con las concentraciones más elevadas de solutos entrantes: oxígeno, sustratos, hormonas, etc. La eliminación de estos solutos por incorporación a las células y la adición de productos metabólicos por secreción de dichas células, resultará en la modificación progresiva de la composición de la sangre sinusoidal a medida que vaya atravesando la placa de células hepáticas. Por tanto, en el terminal distal del sinusoide, cerca de las vénulas hepáticas, el microambiente que rodea las células será muy diferente de aquel de entrada a las vénulas portales [7, 8] (Figura 2).

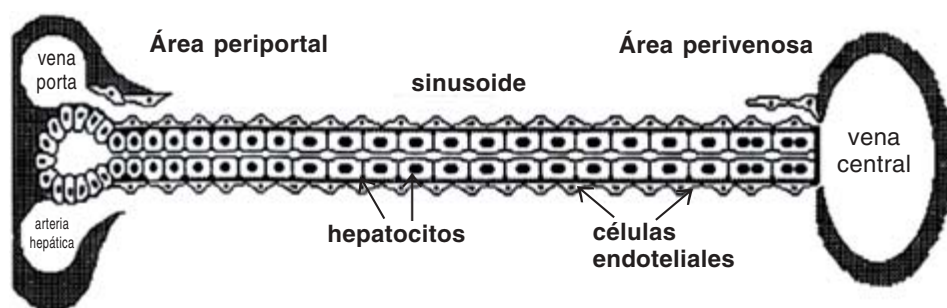


FIGURA 2. Distribución de los hepatocitos y las células endoteliales entre la triada portal y la vena central. La triada portal y la vena central están rodeadas por una matriz que difiere de la membrana basal vascular.

CIRCULACIÓN HEPÁTICA

Después de que William Harvey en 1649 introdujese el concepto del movimiento circular de la sangre, el mayor desafío para la aceptación de este concepto era la peculiar configuración anatómica de la circulación hepática [9, 10]. En base a sus experimentos, Harvey rebatió el concepto de Galeno, de flujo y reflujo en el sistema portal y trató de acomodar una nueva ciencia fisiológica que reemplazara el razonamiento puramente dialéctico basado en los 1.500 años anteriores. Aunque el inmediato impacto de este descubrimiento fue desviar el centro de la circulación desde el

1. ANATOMÍA HEPÁTICA. SISTEMAS CELULAR Y VASCULAR

hígado al corazón, la circulación hepática continúa hoy desconcertando a los estudiosos.

El hígado de los mamíferos recibe un suministro doble de sangre. El 80% de la sangre que entra en el hígado es sangre venosa poco oxigenada, suministrada por la vena porta, mientras que el 20% restante es sangre arterial bien oxigenada y suministrada por la arteria hepática. Estos vasos sanguíneos entran por el espacio porta, lugar por donde los conductos biliares eferentes y los linfáticos salen del órgano. El riego venoso del hígado cursa independiente de bilis y linfa para drenar en la vena cava inferior cerca del diafragma.

El doble suministro de sangre, desde la arteria hepática y la vena porta, es único en el organismo. El flujo sanguíneo hepático se aproxima a 1,5 litros por minuto.

La arteria hepática es la que aporta oxígeno y un flujo de sangre con elevada presión, procedente de la circulación sistémica, mientras que la vena porta procedente del drenaje venoso esplénico, con menor presión, es la que transfiere las sustancias nutritivas absorbidas por el tracto gastrointestinal, para su metabolismo y eliminación. La arteria hepática asciende directamente del eje celíaco y se divide en dos ramas, gástrica y gastroduodenal, siguiendo a través del ligamento hepatoduodenal como propia arteria hepática, antes de bifurcarse e introducirse en los segmentos del hígado. La vena porta drena el efluente venoso del tracto digestivo y del bazo. En los mamíferos, la vena porta es el único canal venoso que atraviesa otro órgano antes de retornar al corazón. Al igual que la arteria hepática, la vena porta se bifurca en ramales que se distribuyen en los segmentos hepáticos. Por último, la sangre arterial y la venosa confluyen en el sinusoides, capilar recubierto por las células endoteliales que poseen poros o fenestras, a través de los que fluye el plasma sanguíneo, y de ahí drenan, vía vena hepática, en el interior de la vena cava inferior (Figura 3).

Dentro del hígado, las ramas de distribución de la vena porta y de la arteria hepática cursan en paralelo, y después de repetidas ramificaciones los ramales terminales de estos vasos (vénulas portales y arteriolas hepáticas) suministran sangre a los sinusoides hepáticos. Los sinusoides son los principales vasos implicados en el intercambio transvascular entre la sangre y las células parenquimáticas. Ramas de arteriolas hepáticas suministran sangre también a la cápsula del hígado y a los conductos biliares, donde alimentan un plexo peribiliar de capilares, los cuales a su vez dre-

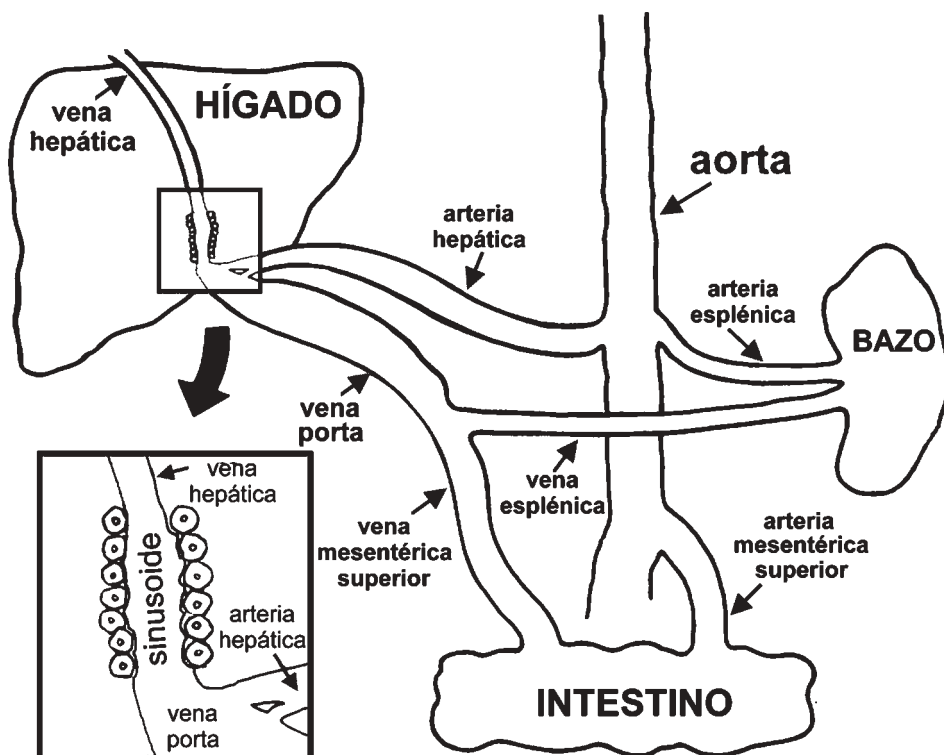


FIGURA 3. *Circulación hepatoesplénica. El hígado recibe un suministro doble de sangre. El 80% vía vena porta, es sangre venosa y poco oxigenada y el 20% restante, vía arteria hepática, es sangre arterial bien oxigenada. La arteria hepática aporta oxígeno y un flujo de sangre con elevada presión, mientras que la vena porta procedente del drenaje venoso esplénico, con menor presión, transfiere sustancias nutritivas absorbidas por el tracto gastrointestinal. La arteria hepática asciende directamente del eje celíaco y se divide en dos ramas gástrica y gastroduodenal, siguiendo a través del ligamento hepatoduodenal como propia arteria hepática, antes de bifurcarse e introducirse en los segmentos del hígado. La vena porta drena el efluente venoso del tracto digestivo y del bazo. Al igual que la arteria hepática, la vena porta se bifurca en ramales que se distribuyen en los segmentos hepáticos. Por último, la sangre arterial y la venosa confluyen en el sinusoide, capilar recubierto por las células endoteliales que poseen poros o fenestras, a través de los que fluye el plasma sanguíneo, y de ahí drena, vía vena hepática, en el interior de la vena cava inferior*

nan en los sinusoides. La sangre portal y arterial fluyendo a través de los sinusoides se recoge en pequeñas ramas de venas hepáticas (vénulas hepáticas centrales o terminales) a través de las cuales la sangre se dirige, a través de las venas hepáticas más grandes, a la vena cava inferior.

Subunidades microcirculatorias

La unidad funcional hepática es la mínima cantidad de tejido requerida para realizar las funciones del órgano. Una restringida área del tejido hepático ha sido considerada como la unidad funcional. Esta unidad comprende un sinusoides con su contiguo tejido hepático y las inmediatas conexiones aferentes y eferentes, vascular, biliar, linfáticas y neurales. Sin embargo, esta unidad se considera demasiado restringida, porque no todos los sinusoides reciben conexiones directas de la arteria hepática y la periferia de la unidad bisegmentaría las células parenquimáticas en las cuales los sinusoides adyacentes están separados por placas parenquimáticas de una célula de grosor. También hay que considerar las interacciones entre unidades de tejido con conexiones comunes aferentes (vénula portal de entrada) y eferentes (vénula central). Esto se ha resuelto con la identificación de la *subunidad microcirculatoria hepática* que es una expansión del concepto antes mencionado.

Mediante microscopía electrónica de barrido y microscopía con fluorocromos *in vivo*, se ha demostrado en diversas especies una unidad microcirculatoria piramidal con su base en el perímetro del lóbulo clásico y su ápice en la vena central [11]. Lechos vasculares similares irrigados por una vénula de entrada se han mostrado en hígado humano [12]. Esta unidad piramidal, denominada *subunidad microcirculatoria hepática*, está irrigada por una sola vénula de entrada que alimenta un grupo de aproximadamente 19 sinusoides. La vénula de entrada se colocaliza con un canal de Hering, el cual drena bilis de la misma área piramidal. Siguiendo el paso de un fluorocromo, estos autores observaron una onda dinámica de intensidad, el «frente de influjo» que llena la unidad piramidal a través de la vénula de entrada. El fluorocromo se acumula entonces en los conos de las placas hepáticas y en una fase más tardía puede observarse un modelo difuso de canalículo biliar. Estos investigadores creen que la subunidad hepática microcirculatoria representa la unidad básica funcional del hígado y describen un flujo «contracorriente» entre la vénula de entrada y el canal de Hering. La sangre llega a los hepatocitos por la vénula de entrada y la bilis drena por el canal de Hering en dirección opuesta desde el mismo territorio piramidal. Las evidencias que indican que los hepatocitos periportales son los primeros responsables de la incorporación y secreción de las sales biliares en condiciones normales, sostienen el concepto de «contracorriente» [11] (Figura 4).

De esta manera, el sistema continuo (muralia) de placas hepáticas anastomosadas y los espacios sinusoidales (laberinto hepático de Elias) [13],

ha dado origen a una organización de áreas bien demarcadas de parénquima hepático asociado con vénulas de suministro y canales biliares de drenaje que se ramifican siguiendo un modelo regular. La subunidad hepática microcirculatoria es el grupo más pequeño de hepatocitos alrededor de un conducto y vénula de entrada.

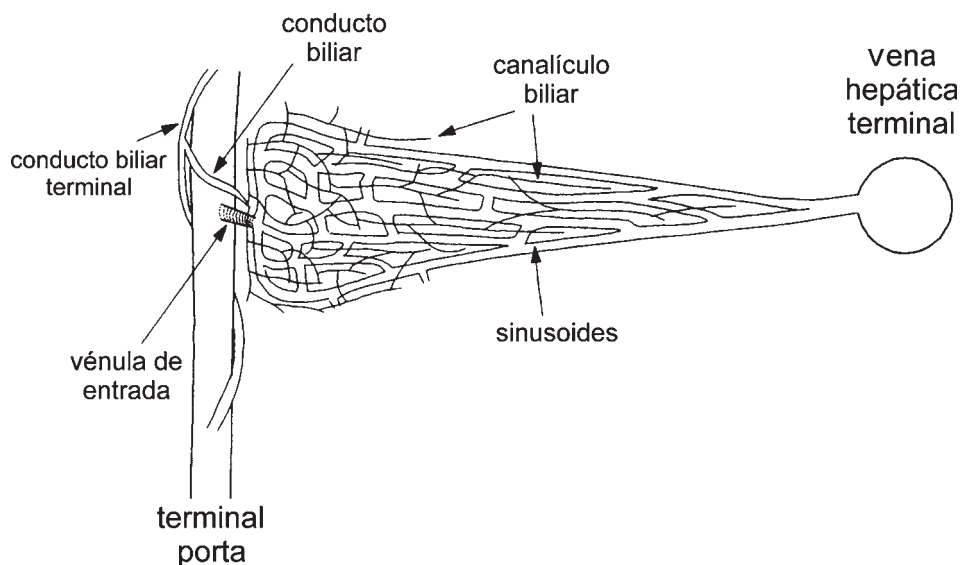


FIGURA 4. Unidad microcirculatoria piramidal: el terminal porta origina una vénula de entrada que alimenta a 19 sinusoides. La vénula de entrada se localiza a lado de un canal de Hering (no se muestra), que drena la bilis de la misma área piramidal. El conductillo biliar conecta el conducto biliar terminal con el canal de Hering [7, 11].

SISTEMAS PORTAL, VENOSO HEPÁTICO Y ARTERIAL. SINUSOIDE

El *sistema venoso portal* en humanos consiste en sistemas conductores y sistemas distribuidores. Como el nombre sugiere, el sistema conductor es el responsable de llevar sangre hasta la esquina más alejada del hígado. Para conseguir esto, el sistema conductor muestra frecuentes ramificaciones y gran versatilidad en la longitud y número de las ramas y número de órdenes de ramificación, que se acomodan a la forma del órgano, para asegurar un suministro uniforme de sangre al parénquima. El sistema distribuidor es el responsable del intercambio de sustancias entre la sangre y los elementos hepáticos y por lo tanto del mantenimiento de las interfases

1. ANATOMÍA HEPÁTICA. SISTEMAS CELULAR Y VASCULAR

de la microarquitectura. Para conseguir esto, el sistema distribuidor sigue una estricta pauta de ramificación. Las ramas terminales del sistema conductor dan lugar a ramas de primer orden del sistema distribuidor en una secuencia ordenada, pero de dirección arbitraria. Cada una de estas ramas suministra a una masa definida de parénquima. Cada rama de primer orden da lugar a once sucesivas ramas de segundo orden en ángulos rectos. Las ramas de segundo orden corresponden a las venas portales que se ven al microscopio ordinario. Las ramas de tercer orden son vénulas portales que surgen de las de segundo orden y corresponden a las ramas septales que se ven en los septa vasculares interlobulares.

El *sistema venoso hepático* se ha considerado durante mucho tiempo como un compartimento de drenaje pasivo para los sistemas portal venoso y el arterial hepático y no ha recibido tanta atención como el portal. La sangre drena desde los sinusoides hasta las venas hepáticas y desde aquí hacia las venas sublobulares que por último se unen a las venas hepáticas terminales. Se ha observado que el sistema venoso hepático no sigue el mismo orden de ramificación que el venoso portal. Mientras las ramas portales de primer orden de distribución, daban lugar a once ramas de distribución de segundo orden, las venas hepáticas no siguen el mismo ejemplo. Esto da lugar a la posición de seis venas portales alrededor de una vena central y a la formación del clásico lóbulo hexagonal. De la misma manera la reconstrucción de los lóbulos en tres dimensiones muestra la orientación de los lóbulos basada en venas hepáticas localizadas centralmente y su relación con el modo de ramificación del sistema venoso portal.

El *sistema hepático arterial* es el responsable del 25% del flujo sanguíneo hepático. Existe discusión acerca del modo de terminación del sistema arterial hepático. ¿Terminan las arterias hepáticas en los sinusoides vía arteriolas hepáticas? ¿Existe una anastomosis arterio-portal? Y si las arteriolas terminan en los sinusoides, ¿lo hacen cerca del tracto portal o caminan hasta el interior de los lóbulos como arteriolas intralobulares?

La interpretación de las observaciones publicadas por diferentes autores sobre este tema es complicada, por las variaciones en la anatomía de las especies, el flujo sanguíneo en el momento de la observación, la dinámica de los esfínteres y el tipo de anestesia. Se han descrito esfínteres en tres sitios distintos del lecho sinusoidal: los *esfínteres aferentes* en el lugar de incorporación de la vénula de entrada a los sinusoides; los *esfínteres eferentes* en el lugar de comunicación de los sinusoides con la vena central; y los que se encuentran en el lugar de unión de los sinusoides intersinusoidales con

los sinusoides radiales. Se han identificado también en las arteriolas hepáticas *esfínteres precapilares*, que consisten en músculo liso.

Son pocos aún los estudios acerca del suministro arterial en hígado humano y todavía no está claro si existen atajos en forma de anastomosis arterio-portal tal como se han detectado en rata y no han podido ser detectados en humanos. Saxena *et al.* [7] concluyen que existe una enorme variación entre las especies y entre las diferentes partes del hígado. La última consideración es si las arteriolas mantienen alguna relación para penetrar en los canales ductulares biliares, que conducen a los canales de Hering. Tal disposición puede ayudar a preservar el suministro de sangre a una zona proliferativa importante en hígado severamente lesionado.

Los sinusoides son las vías de intercambio transvascular entre la sangre y el hepatocito. La estructura del sinusoide hepático es única, para permitir el máximo acceso de los hepatocitos a la sangre circulante. Está compuesta por células endoteliales, células de Kupffer y células perisinusoidales. Las células endoteliales tapizan la superficie del sinusoide y presentan el citoplasma atenuado en sus extremos donde se encuentra una serie de poros agrupados en forma de tamiz denominados fenestras, estructuras dinámicas cuyos diámetros (50-150 nm) están afectados por la presión sanguínea del lumen, y también por sustancias vasoactivas, fármacos y toxinas. De esta manera las fenestras regulan el paso de compuestos de gran tamaño, como los quilomicrones, a la vez que permiten el paso del plasma y de grandes proteínas. Ocasionalmente existen fenestras más grandes que proporcionan lugar para la inserción de células de Kupffer fagocíticas a la superficie luminal del endotelio. La fagocitosis de partículas por las células de Kupffer es rápida y ocurre entre 18-23 segundos después que la partícula se ha puesto en contacto con la superficie celular. Las células de Kupffer no sólo fagocitan, ellas son también fuente de una serie de sustancias vasoactivas que pueden influenciar el flujo sanguíneo sinusoidal y los procesos de intercambio mediante su acción sobre las células que tapizan el sinusoide. Las células de Kupffer generan también mediadores beneficiosos y tóxicos, que participan en mecanismos de defensa no específica del hospedador, como también en la lesión hepática. La fagocitosis y la liberación de estas diversas sustancias se cree que están moduladas en parte por endotoxinas procedentes del intestino, porque las células de Kupffer son las responsables de la eliminación de estos productos bacterianos, presentes en la sangre portal. Por tanto, la disfunción de las células de Kupffer y la endotoxina se han implicado en la fisiopatología de la enfermedad hepática.

1. ANATOMÍA HEPÁTICA. SISTEMAS CELULAR Y VASCULAR

Los lipocitos se localizan en el espacio perisinusoidal de Disse. Estas células contienen gotitas de grasa y son el almacenamiento de la vitamina A. Las delgadas protuberancias de estas células cursan a través del espacio perisinusoidal y abrazan la superficie luminal del endotelio. En hígado sano de mamíferos, poca o ninguna lamina y colágeno basales se asocian al endotelio sinusoidal. Como resultado, la pared sinusoidal es una estructura muy permeable que permite la continuidad del plasma entre la sangre y el hepatocito. En ciertos casos de lesión hepática, el material de la membrana basal y las fibrillas de colágeno se acumulan en el espacio perisinusoidal, dando origen a la «capilarización» de los sinusoides y a la alteración del intercambio transvascular.

El espacio perisinusoidal de Disse se considera por algunos investigadores que funciona como un espacio linfático que canaliza plasma a los verdaderos vasos linfáticos que cursan en el tracto portal. Esta hipótesis no puede considerarse válida porque las conexiones anatómicas entre el espacio de Disse y el tracto portal no han sido aún identificadas [14]. Además, el flujo plasmático en el espacio de Disse tendría que ocurrir frente a un gradiente de presión, si se asume la igualdad de la presión entre el espacio sinusoidal y el de Disse debida a la porosidad de la pared sinusoidal. Sin embargo, tal flujo retrogrado ha de ocurrir mediante la influencia del roce de los leucocitos sobre el lecho endotelial para crear un efecto de bomba de rodaje. Otra explicación, que tiene que ser explorada, es la producción de linfa por el plexo peribiliar en el espacio portal.

Células sinusoidales

Las células sinusoidales se dividen en endoteliales y perisinusoidales. Entre estas últimas están las células de Kupffer, las células Pit y los lipocitos (células de Ito, células estrelladas, acumuladoras de grasa). Las células sinusoidales hepáticas juegan un papel crítico en el mantenimiento de la función hepática en circunstancias normales y patológicas. Dentro del lóbulo hepático los diferentes tipos de células sinusoidales tienen una localización particular que se relaciona directamente con sus funciones. Las células endoteliales y las células de Kupffer están en directo contacto con el torrente circulatorio, mientras que las parenquimáticas (hepatocitos) están en contacto con el plasma sanguíneo sólo a través del espacio de Disse.

Las células endoteliales fenestradas forman una barrera física que capacita, mediante las fenestras, el contacto directo de los hepatocitos con

la mayoría de las proteínas plasmáticas en el espacio de Disse, pero previene el contacto directo de los hepatocitos con las células sanguíneas, los quilomicrones, virus y bacterias. Las células endoteliales comprenden el 44% del volumen sinusoidal celular y son las responsables del intercambio de fluidos y su contenido entre el lumen sinusoidal y el espacio de Disse.

Una característica importante de los sinusoides hepáticos es que carecen de membrana basal. El acceso directo al espacio de Disse lo proporciona el abundante número de fenestras en las células endoteliales que tienen un diámetro de 50 a 150 nm. Estas fenestras se componen de anillos de proteínas del citoesqueleto: actina, miosina y proteínas de enlace a la actina. Las fenestras son estructuras dinámicas que se contraen y dilatan en respuesta a señales específicas. Por ejemplo, la serotonina activa la contracción de las fenestras elevando el calcio intracelular que activa, como segundo mensajero, la fosforilación de las cadenas ligeras de la miosina y con ello la contracción. Se conoce muy poco acerca de la formación de las fenestras, pero se sabe que desaparecen en células endoteliales cultivadas recientes y que retornan poco a poco a los pocos días y que aparecen numerosas y pequeñas cuando se añade al cultivo un éster del forbol. Aunque los sinusoides contienen abundantes células endoteliales con muchas fenestras, las células endoteliales adyacentes al terminal venoso carecen de ellas. Se desconoce el mecanismo responsable de esta notable diferencia.

Las funciones reconocidas de las células endoteliales son muy diversas e incluyen: modulación de la circulación hepática, reclutamiento de la masa funcional hepatocelular, adhesión de plaquetas, síntesis y liberación de citoquinas y protección de los hepatocitos del contacto con partículas (virus, etc.) que excedan los 150 nm de diámetro. Las células endoteliales poseen, además, receptores especializados para manosa/N-acetilglucosamina y N-acetilneuramínico, e incorporan por endocitosis la transferrina, la ceruloplasmina, la transcobalamina II, glucosaminoglicanos, lipoproteínas de elevada y baja densidad modificadas, lipasa y otros ligandos.

Los otros tipos de células sinusoidales, son las perisinusoidales e incluyen las células de Kupffer, los lipocitos y las células Pit. Aproximadamente 1/3 del volumen celular sinusoidal deriva de las células de Kupffer y un 1/5 de los lipocitos. Todas las células sinusoidales participan en un sistema de defensa coordinado en el cual las células de Kupffer son las que tienen la misión de fagocitar y presentar antígenos. Los lipocitos son importantes en el metabolismo del colágeno y en el almacenamiento de la vitamina A. Las células Pit pueden mostrar actividad de células naturales

asesinas (NK) y neuroendocrinas. Estas células interactúan entre ellas adaptándose a diversas situaciones de estrés entre las que se incluye la hipoxia y la endotoxemia.

SISTEMA BILIAR

En todas las especies estudiadas, los canales biliares intralobulares comienzan como canalículos biliares, que observados al microscopio electrónico son de 1 a 2 μm de diámetro y están situados entre dos hepatocitos adyacentes, que se unen solo por las membranas apicales de estas células. Los canalículos biliares forman un complejo de ramificaciones y canales que se anastomosan con tortuosos cursos y se encaminan al conducto biliar terminal, a través de conductos biliares denominados colangioloos o canales de Hering. Hering en 1866 [15] dio su nombre a estos canales que constituyen la unión entre el sistema canalicular de los hepatocitos y el árbol biliar. El examen de estos canales ha revelado que están recubiertos por hepatocitos y colangiocitos. Estos canales representan la conexión anatómica y fisiológica del sistema canalicular intralobular de los hepatocitos y el árbol biliar, y se encuentran a lo largo de un dispositivo que se proyecta hacia el parénquima, desde el tracto portal [16].

Se desconoce la naturaleza exacta de los recorridos de los canales de Hering desde los lóbulos hasta la periferia. La cuestión es si existe un colangiolo intralobular, si se extiende el canal de Hering a través del lóbulo, o si se detiene en la proximidad de la placa limitante. Hasta hace poco se pensaba que los canales de Hering no eran aparentes en el interior del parénquima hepático. No se sabe si cada canal de Hering corresponde a un canalículo o forman los canalículos una confluencia antes de entrar en los confines del canal de Hering. Por definición, los canales de Hering son canales tubulares estrechos presentes cerca del tracto portal, parcialmente cubiertos por hepatocitos en una parte y por colangiocitos en la otra (Figura 5). Muchos investigadores han propuesto la existencia de un nicho de células progenitoras en el canal de Hering en la interfase parénquima/mesénquima del tracto portal. Este es el lugar donde, en el desarrollo embrionario, los hepatoblastos bipotenciales forman la placa ductular primitiva que tiene el mismo fenotipo que las células progenitoras en adultos [17].

Se ha postulado que el sistema biliar intralobular consiste en canalículos biliares entre hepatocitos a lo largo de todo el lóbulo y que ellos entran

en los canales de Hering que penetran en el tercio periportal del lóbulo. De esta manera el canal de Hering sirve como contenedor para recolectar la bilis parenquimal y transportarla al terreno del tracto portal (Figura 5). Aquí los canales biliares adquieren un revestimiento de colangiocitos fácilmente observables en tinciones de rutina como estructuras circulares [6]. En hígado humano [18], se ha observado la estructura tridimensional de las reacciones ductulares en necrosis masiva y se sugiere que estas reacciones son proliferaciones de células que tapizan los canales de Hering, lo cual lleva a proponer que estos canales consisten en, o encubren, células progenitoras facultativas.

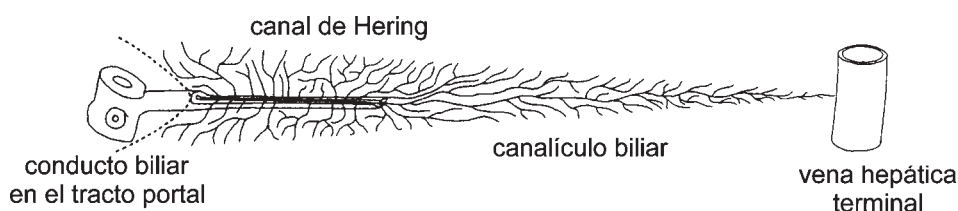


FIGURA 5. Relación del canal de Hering con el parénquima hepático. El conducto biliar terminal en el tracto portal puede dar lugar a un conductillo biliar y a un canal de Hering, que penetra directamente en el parénquima [7, 11].

Recirculación enterohepática

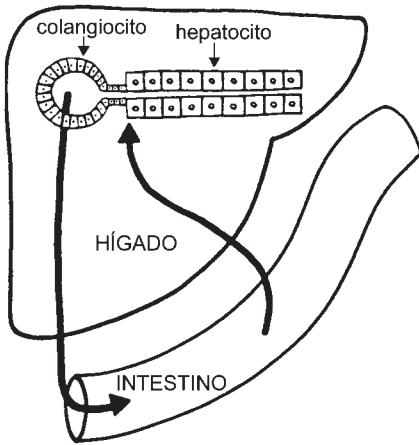
Grandes cantidades de ácidos biliares se secretan en el intestino diariamente, pero solo cantidades relativamente pequeñas se pierden del organismo. Esto ocurre porque el 95% de los ácidos biliares enviados al duodeno retornan al torrente circulatorio en el íleon. La sangre venosa del íleon va directa a la vena porta y de aquí a los sinusoides hepáticos. Los hepatocitos extraen los ácidos biliares de manera eficiente desde la sangre sinusoidal, y en hígado sano poco se escapa a la circulación sistémica. Los ácidos biliares atraviesan los hepatocitos para ser secretados en el canalículo biliar. El efecto neto de esta recirculación enterohepática es que cada molécula de sal biliar se reutiliza unas veinte veces, a menudo dos o tres veces durante una sola fase digestiva.

Es importante destacar que la enfermedad hepática altera estas pautas de recirculación, ya que los hepatocitos de hígado enfermo tienen disminuida su capacidad de extraer los ácidos biliares de la sangre portal lo cual lesiona al sistema canalicular permitiendo que la bilis escape a la circula-

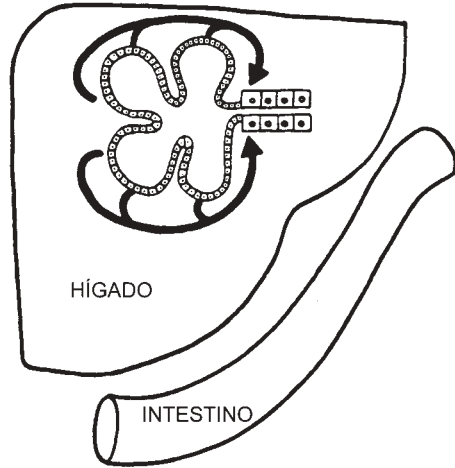
1. ANATOMÍA HEPÁTICA. SISTEMAS CELULAR Y VASCULAR

ción sistémica. El ensayo de la concentración sistémica de los ácidos biliares se utiliza en clínica como indicador sensible de enfermedad hepática.

Ciclo entero-hepático de los ácidos biliares en hígado normal



Ciclo cole-hepático de los ácidos grasos en hígado colestático



Desmet 1992

FIGURA 6. Ciclo enterohepático de los ácidos biliares. (A) en hígado normal, los ácidos biliares secretados por los hepatocitos alcanzan los conductos biliares interlobulares a través de los canalículos biliares. La bilis drena desde el árbol biliar hacia el intestino. Los ácidos biliares son reabsorbidos en el íleon y alcanzan el parénquima hepático a través de la vena porta. (B) en hígado con colestasis de larga duración, los conductos biliares interlobulares han desaparecido. La proliferación ductular proporciona una mayor superficie de epitelio. Los constituyentes biliares reabsorbidos retornan al parénquima vía el plexo vascular peribiliar [19].

HETEROGENEIDAD FUNCIONAL DEL HÍGADO. ZONACIÓN METABÓLICA

Los hepatocitos no son una población celular homogénea ya que contribuyen de manera diferente a los diversos procesos metabólicos dependiendo de su localización intraacinar. Ya en el siglo pasado varios autores describieron el fenómeno de heterogeneidad del parénquima hepático [20-22]. Cien años después con el advenimiento de la histoquímica y la microdissección quedó claro que existe una distribución heterogénea de los enzimas en el interior del lóbulo hepático. Estas observaciones adquirieron una nueva dimensión cuando se propuso que la distribución heterogénea

de enzimas era la causa de la compartimentación de los procesos metabólicos. El modelo conceptual de la organización hepática se definió entonces, no sólo en el sentido anatómico estricto, sino por áreas de especialización metabólica o «zonación metabólica» [23].

El concepto de unidad estructural de hígado que engloba la totalidad de las células hepáticas para formar una unidad funcional se encuentra aún en debate. El lóbulo clásico se caracteriza por una zona de flujo de sangre directamente del tracto portal que forma zonas falciformes de equipotencial hemodinámico. El acino, por el contrario, se define como un influjo lineal de sangre que forma estructuras de tipo granuloso de equipotencial hemodinámico alrededor del eje vascular aferente. De acuerdo con el flujo sanguíneo pueden delimitarse dos regiones, tanto en el acino como en la zona falciforme de los lóbulos: la región periportal (aferente) regada por sangre rica en oxígeno, sustratos y hormonas, y la región perivenosa (eferente) que recibe sangre pobre en oxígeno, sustratos y hormonas, pero rica en CO_2 y otros productos. Por todo ello, anatómicamente, los hepatocitos están distribuidos en tres áreas, definidas por su proximidad a los terminales circulatorios: periportal, mediozonal y perivenosa; mientras que funcionalmente, se considera que los hepatocitos residen en acinos, compuestos por tres zonas metabólicas (Figura 1):

Zona 1: Mayor cantidad de sustratos y oxígeno, cercana al área periportal.

Zonas 2 y 3: Alejadas del área periportal y del aporte vascular.

A nivel del *metabolismo energético oxidativo* el catabolismo de aminoácidos y ácidos grasos a acetil CoA es posible sólo en presencia de oxígeno, por tanto, los hepatocitos periportales se encuentran equipados preferentemente con alanina aminotransferasa, tirosina aminotransferasa y β -hidroxibutiril CoA deshidrogenasa [23]. El catabolismo inicial de la glucosa (en su parte glucolítica), como también la liponeogénesis, son procesos exergónicos posibles en ausencia de oxígeno, por tanto, las células perivenosas son las que poseen predominantemente los enzimas clave de la glucólisis: la glucoquinasa [24], la piruvato quinasa [25] y enzimas generadores de NADPH, todos ellos implicados en la síntesis de ácidos grasos [26]. Un proceso que depende del NADPH, como la ureagénesis a partir de aminoácidos, mecanismo general de destoxificación se localiza también en la zona perivenosa. Todos los hepatocitos catalizan la oxidación final a CO_2 , pero las células periportales al recibir más oxígeno son más capaces verificar el metabolismo oxidativo, ya que contienen un mayor

1. ANATOMÍA HEPÁTICA. SISTEMAS CELULAR Y VASCULAR

número de mitocondrias, y poseen actividades más elevadas de los enzimas del ciclo tricarboxílico y de la cadena respiratoria. La gluconeogénesis es un proceso endergónico que ha de acoplarse al catabolismo oxidativo, de ello que su localización sea predominante en las células de la región periportal, con la localización de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, la fructosa 1,6-bisfosfatasa, la glucosa-6-fosfatasa y la lactato deshidrogenasa [27]. El metabolismo del glucógeno parece estar distribuido de manera homogénea dentro del parénquima hepático ya que todos los hepatocitos pueden sintetizar y degradar glucógeno, pero el tiempo y la velocidad de estos procesos son diferentes en células periportales o perivenosas.

Respecto a la *biotransformación*, el hígado es el órgano que realiza la mayor parte del metabolismo y eliminación de los xenobióticos. Las sustancias extrañas son destoxificadas por oxidación, reducción o hidrólisis y posterior conjugación. La oxidación está, en su mayoría catalizada por monooxigenasas dependientes del NADPH ubicadas en el retículo endoplásmico liso. Este retículo predomina en la región perivenosa y se induce en esta zona por los barbituratos. Por ello, no sólo los enzimas generadores de NADPH, sino también los enzimas consumidores de NADPH, como la citocromo P-450 NADPH reductasa y la glutathion reductasa predominan en las inmediaciones del terminal venoso. Puede, por tanto, concluirse que la biotransformación de los xenobióticos es una función preferente del espacio venoso, y que los hepatocitos ubicados en esta zona muestran una susceptibilidad mayor a la agresión electrofílica de los metabolitos reactivos formados a través de las monooxigenasas microsómicas dependientes del citocromo P-450 o de flavina.

TABLA 1. *Zonación de las principales vías metabólicas en hígado* [27]

<i>Zona Periportal</i>	<i>Zona perivenosa</i>
Metabolismo oxidativo y energético	Glucolisis
Oxidación de ácidos grasos	Lipogénesis
Gluconeogénesis	Monooxigenación (P-450)
Síntesis del colesterol	Conjugación del glutathion
Ureagénesis	Glucuronidación
Producción de ácidos biliares	
Peroxidación del glutathion	

Aunque todos los hepatocitos tienen el mismo genoma, las diferencias zonales se detectan en las pautas de expresión de los genes de la mayoría de los enzimas clave. Esta zonación de la activación genética en el acino hepático se origina por la heterogeneidad en la entrada y transmisión de señales originadas por: (a) sustratos, incluyendo el oxígeno y sus productos, hormonas, mediadores e inervación; (b) interacciones célula-célula, y (c) interacciones célula-matriz extracelular.

Las pautas de expresión zonal pueden ser debidas a diferentes tasas de transcripción, degradación del mRNA, traducción del mRNA o degradación de proteínas. La zonación del mRNA y proteínas en la misma zona acinar, indica que la expresión del gen se regula principalmente a nivel pre-traducciona l o por degradación del mRNA. Pautas zonales desiguales de mRNA y proteínas se deben a que la expresión se regula a nivel traduccional o post-traducciona l.

La expresión de genes de enzimas que controlan la gluconeogénesis: fosfoenol piruvato carboxiquinasa y fructosa 1,6, bis-fosfatasa, como también los enzimas que metabolizan aminoácidos: serina dehidratasa y tiro-sina aminotransferasa, se regulan a nivel pre-traducciona l. Estudios de hibridación *in situ* en hígado de rata, han revelado que el mRNA de los enzimas anteriormente mencionados se encuentra principalmente en la zona periportal, así como también las proteínas y las actividades enzimáticas. También se ha detectado que los mRNA y actividades de estos enzimas se encuentran más elevados al final del período de ayuno y descienden después de la alimentación. Estas alteraciones controladas por los nutrientes en la expresión genética durante un ritmo normal de alimentación y ayuno, se denominan zonaciones metabólicas [28].

Por el contrario, los genes que controlan los enzimas glucolíticos: glu-coquinasa y piruvato quinasa tipo L, se regulan principalmente a nivel traduccional y post-traducciona l durante un ritmo de alimentación normal. Los mRNA de estos enzimas se distribuyen homogéneamente en el parénquima, mientras que las proteínas y actividades enzimáticas muestran una clara predominancia perivenosa. La zonación de estos enzimas es dinámica, con actividades incrementadas con el alimento y disminuidas en el ayuno.

Los genes de los enzimas, clave de la destoxificación del amonio, se regulan también a nivel pre-traducciona l. El mRNA y la proteína del enzima ureogénico carbamiltfosfato sintetasa, se localizan en las zonas periportal y perivenosa proximal. El mRNA y la proteína de la glutamina sintetasa se encuentran exclusivamente en el área perivenosa distal. Curiosamente, ninguno

de los mRNA ni las proteínas de estos dos enzimas varía con el estado nutricional, por lo que esta pauta de expresión se denomina zonación estable.

Las funciones de las células no parenquimáticas también muestran una heterogeneidad a lo largo del acino hepático, lo cual parece ser un requisito para el funcionamiento del órgano. Las fenestras de las *células endoteliales*, que actúan como un filtro entre la sangre y los hepatocitos, poseen poros más pequeños y numerosos en el área perivenosa, con lo cual en esta zona acinar es mayor la capacidad de filtrado. Las *células de Kupffer* son más numerosas y poseen mayor capacidad endocítica y actividad lisosómica en el área periportal, mientras que están dotadas con actividad citotóxica mayor en la zona perivenosa. Los *lipocitos* son más numerosos en la zona periportal, ya que es este el lugar acinar donde se concentra la formación de la matriz y el almacenamiento de vitamina A. Las *células Pit* exhiben actividad de células naturales asesinas sobre células tumorales cuya eliminación ocurre principalmente en el área periportal.

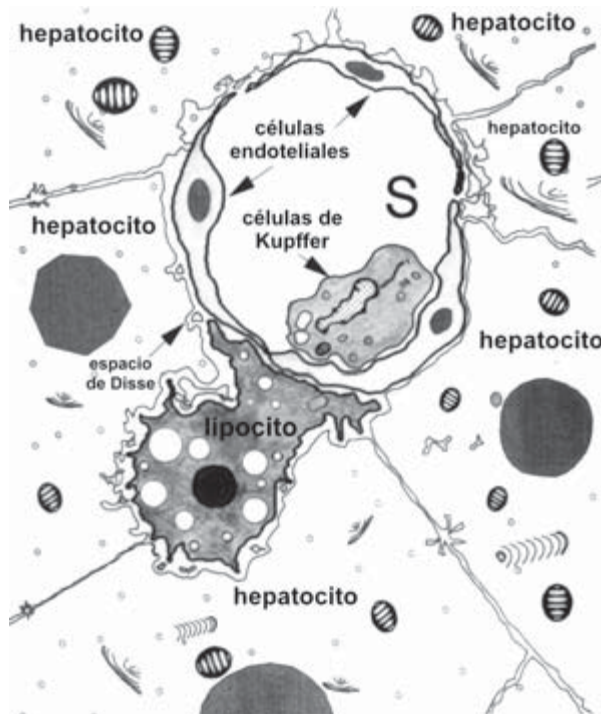


FIGURA 8. Modelo de sinusoide hepático (S) en hígado normal, donde se observan las células endoteliales tapizando el sinusoide, una célula de Kupffer en el sinusoide, un lipocito en el espacio de Disse y los hepatocitos en íntimo contacto con el espacio de Disse [29].

ECOLOGÍA SOCIOLÓGICA DE LAS CÉLULAS HEPÁTICAS

La yuxtaposición de las diversas poblaciones celulares y los componentes de la matriz extracelular, en armonía con la angioarquitectura, da como resultado un delicado sistema bioecológico. Las investigaciones hepatológicas de los últimos años, han proporcionado y continúan proporcionando, asombrosos descubrimientos acerca de las interacciones y la regulación entre los diferentes tipos celulares y los componentes de la matriz del órgano. Estos descubrimientos están llevando a diseñar una nueva ciencia donde se unen la ecología y la sociología de las células hepáticas [28]. Ejemplos se incluyen en las múltiples interacciones del metabolismo celular con el entramado mundo de las citoquinas.

Las interacciones bien coordinadas entre los hepatocitos incluyen las siguientes:

1. Vías metabólicas recíprocas, localizadas en territorios lobulares (acinares) diferentes, para el metabolismo de los carbohidratos y el amonio.
2. Comunicaciones intercelulares a través de canales de unión (*gap junctions*), que muestran su propia heterogeneidad zonal; y
3. Señales intercelulares a través de moléculas de superficie.

Las interacciones de los hepatocitos con las células de Kupffer son tan evidentes que se han publicado volúmenes enteros dedicados a este tema (30). Las interacciones de los hepatocitos con las células endoteliales implican la modulación hepatocelular del fenotipo endotelial y la producción endotelial de prostaglandinas, endotelina y citoquinas, tales como las interleuquinas 1 y 6 (IL-1 y IL-6) y el factor del crecimiento de los hepatocitos (HGF). Las señales emitidas por los lipocitos comprenden la liberación de péptidos estimuladores de las células parenquimáticas, de citoquinas inhibidoras del crecimiento (TGF β), como también de citoquinas estimuladoras de la proliferación (HGF). Las células de Kupffer se adhieren a las células endoteliales mediante la expresión, por las últimas, de receptores de superficie CD4 e ICAM-1, e inician la activación de los lipocitos mediante la expresión del receptor del TGF β , por secreción de un factor estimulador de los lipocitos. La matriz extracelular en el espacio de Disse modula el fenotipo y la función de las células endoteliales, los lipocitos y los hepatocitos. La heterogeneidad zonal de la biomatriz a lo largo del eje portal-central, se relaciona con el concepto del *streaming liver* [31],

y determina la expresión fenotípica y la activación de genes específicos en zonas o compartimentos particulares en el parénquima. Además, la composición de la matriz extracelular en puntos específicos es crucial para la modulación más fina de la señalización intercelular.

Las fibras nerviosas hacen contacto con cada hepatocito e influyen su actividad metabólica. Metabolitos, hormonas y citoquinas procedentes de la sangre sinusoidal afectan la actividad de las células parenquimáticas y sinusoidales, de acuerdo con los gradientes y la densidad de los receptores celulares. Las células del epitelio ductular biliar (los colangiocitos) pueden actuar sobre la función hepatocelular por contacto directo a través del sistema portal peribiliar y del ciclo cole-hepático [32].

Las condiciones patológicas, tales como la fibrosis y la cirrosis, reflejan alteraciones en el equilibrio de las innumerables interacciones celulares, mientras que el crecimiento desmedido de la neoplasia refleja una rotura de las leyes sociales del hígado. Los años venideros nos han de proporcionar una detallada y variada información sobre los mecanismos moleculares de funciones biológicas celulares, tales como la regulación de la expresión génica, los mecanismos de la coleresis y la colestasis, las vías que conducen a la fibrogénesis, la estimulación del crecimiento y la regeneración, los linajes celulares en la carcinogénesis y las etapas cruciales en la lesión y muerte celulares. Son de esperar en un futuro cercano progresos importantes para desentrañar síndromes, tales como las alteraciones que conllevan a la desaparición de los conductos biliares, y los mecanismos implicados en enfermedades autoinmunes y víricas, en el rechazo de los trasplantes y en las enfermedades derivadas del injerto frente a su hospedador. Las poderosas armas de la biología molecular han de ayudar a establecer terapias genéticas adecuadas en enfermedades metabólicas descubiertas y en las por descubrir.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cascales, M. (2001): Sistemas celular y vascular y microanatomía hepática. En *Mecanismos de Hepatotoxicidad* (ed. M. Cascales), pp. 9-41. Real Academia de Doctores. Madrid.
2. Kiernan, F. (1833): The anatomy and physiology of the liver. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, Biol* **123**, 711-770.
3. Mall, F. P. (1906): A study of the structural unit of the liver. *Am J Anat* **5**, 227-308.

4. Rappaport, A. (1954): The structural and functional unit in the human liver (liver acinus) *Anat Rec* **130**, 673-689.
5. McCuskey, R. (1994): The hepatic microvascular system. En: *The liver: Biology and Pathobiology*, 3.^a edición (eds. Arias, I. M.; Boyer, J. L.; Fausto, N.; Jacoby, W. B.; Schachter, D. A., y Shafritz, D. A., pp. 1089-1106. Raven Press, Ltd., Nueva York.
6. Saxena, R.; Theise, N. D., y Crawford, J. M. (1999): Microanatomy of the human liver. Exploring the hidden interfaces. *Hepatology* **30**, 1339-1346.
7. Gumucio, J. J.; Biliar, B. M.; Moseley, R. H., y Berkowitz, C. M. (1994): Liver cell plate. En: *The liver: Biology and Pathobiology*. 3.^a edición (Eds. Arias, I. M.; Boyer, J. L.; Fausto, N.; Jakoby, W. B.; Schachter, D. A., y Shafritz, D. A.), pp. 1143-1163.
8. Riolan, J. (1649): Encheiridium Anatomicum et Pathologicum, citado por Whitteridge, G., en: William Harvey and the circulation of the Blood, p. 181, McDonald, London & American Elsevier, Nueva York, 1971; y citado por Witte, C. L. & Witte, M. H. en: *The liver. Normal and Abnormal functions*, p. 12, 1974.
9. Witte, C. L., y Witte, M. H. (1974): Hepatic circulation. En: *The liver. Normal and abnormal functions*, **part A** (ed. Becker, F. F.) pp. 11-54, Marcel Dekker, Inc, Nueva York.
10. Ekataksin, W., y Wake, K. (1997): New concepts in biliary and vascular anatomy of the liver. *Prog Liv Dis* **15**, 1-30.
11. Matsumoto, T.; Komori, R.; Magara, T.; Ui T., Kawakami, M., *et al.* (1979): A study on the normal structure of the human liver with special referente to its angioarchitecture *Jikeikai Med J* **26**, 1-40.
12. Elias, H. (1949): A re-examination of the structure of the mammalian liver II: the hepatic lobule and its relation to the vascular and biliary systems *Am J Anat* **85**, 379-456.
13. Niiro, G. K., y O'Morchoe, C. C. (1986): Pattern and distribution of intrahepatic lymph vessels in the rat. *Anat Rec* **215**, 351-360.
14. Hering, E. (1865): Uber den Bau der Wirbeltierleber, Sitzber. *Akad Wiss Wien, Math Naturic KL* **54**, 496-515.
15. Roskams, T. A., *et al.* (2004): Nomenclature of the finet branches of the biliary tree: cannals, ductules and ductular reactions in human liver. *Hepatology* **39**, 1739-1745.
16. Cascales, M. y Ferrándiz, F. (1987) (editores): Aspectos bioquímicos y estructurales en disfunciones hepáticas. CSIC. Madrid.

1. ANATOMÍA HEPÁTICA. SISTEMAS CELULAR Y VASCULAR

17. Roskams, T. A. (2006): Different types of liver progenitor cells and their niches. *J Hepatol* **45**, 1-4.
18. Theise, N. D.; Saxena, R.; Portman, B. C.; Thung, S. N.; Yee, H.; Chiriboga, L.; Kumar, A., y Crawford, J. M. (1999): The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* **30**, 1425-1433.
19. Desmet, V. J. (1992): Modulation of liver disease in cholestasis. *J Gastroenterol & Hepatol* **7**, 313-323.
20. Jones, H. C. (1946): On the secretory apparatus of the liver. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 473-481.
21. Jones, H. C. (1853): Further inquiries as to the structure, development and function of the liver. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1-28.
22. Beale, L. S. (1856): The minute anatomy of the liver. *Med Times Gazette* **13**, 82-85.
23. Welsh, F. A. (1972): Changes in the distribution of enzymes within the liver lobule during adaptative increases. *J Histochem Cytochem* **20**, 107-111.
24. Fischer, W.; Ick, M., y Katz, N. (1982): Reciprocal distribution of hexokinase and glucokinase in periportal and perivenous rat liver tissue. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* **363**, 375-380.
25. Guder, W. G., y Schmidt, U. (1976): Liver cell heterogeneity. The distribution of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxy kinase (GTP) in the liver lobule of fed and starved rats. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* **357**, 1793-1800.
26. Gibson, D. M.; Lyons, R. T., Scott, D. F., *et al.* (1972): Synthesis and degradation of the lipogenic enzymes of rat liver. *Adv Enz Reg* **10**, 187-204.
27. Katz, N. R. (1992): Metabolic heterogeneity of hepatocytes across the liver acinus. *J Nutr* **122**, 843-849.
28. Jungermann, K., y Kietzmann, T. (1996): Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr* **16**, 179-203.
29. Gressner, A. M., y Bachem, M. G. (1995): Molecular mechanisms of liver fibrogenesis – A homage to the role of activated fat-storing cells. *Digestion* **56**, 335-346.
30. Billiar, T. R., y Curran, R. D. editores (1992): Hepatocyte and Kupffer cells interactions. Londres CRC Press.
31. Zajicek, G. (1992): Time dimension in histopathology. *Pathol Res Pract* **188**, 410-412.
32. Popp, J. A., y Cattley, R. C. (1991): Hepatobiliary system. En: *Handbook of Toxicologic Pathology* (eds. W. M. Haschek y C. G. Rousseaux), pp. 279-314. Acad Press Inc, Nueva York, Londres.

2. El extraordinario fenómeno de la regeneración hepática

INTRODUCCIÓN

La importancia del hígado en el organismo radica en su papel central en la homeostasis metabólica, ya que es el responsable del metabolismo en general, lo que constituye la síntesis, degradación, almacenamiento y redistribución de los nutrientes. El hígado recibe la sangre procedente del intestino, bazo y páncreas, a través de la vena porta. Su localización estratégica en relación al suministro de nutrientes vía porta, y el perfil característico y único de la expresión génica y biosíntesis proteica de los hepatocitos, le permite funcionar como defensa bioquímica frente a agentes químicos y como reprocesador de los ingredientes dietéticos absorbidos. Los nutrientes que alcanzan el hígado se metabolizan y se transforman en gran número de *proteínas* séricas (albúmina, gran parte de los factores de coagulación, diversos transportadores plasmáticos, proteínas de la fase aguda, enzimas y cofactores, etc.), *lípidos* enviados como lipoproteínas a otros tejidos y *carbohidratos* almacenados en el hígado como glucógeno. La síntesis de la bilis es esencial para la absorción de grasas y nutrientes lipofílicos. El hígado es, además, el órgano principalmente encargado de detoxificar el organismo, eliminando sustancias de desecho y xenobióticos mediante transformación metabólica y excreción biliar. Como regulador importante de la concentración plasmática de glucosa y amonio, el hígado es esencial para la funcionalidad del cerebro. La pérdida de la función hepática conduce a la encefalopatía hepática crónica y eventualmente al coma. La amplia variedad de funciones llevadas a cabo por el hígado, que son demandadas por el resto del organismo, ha tenido que ser asegurada por eventos evolutivos, los cuales han otorgado a este órgano una capacidad extraordinaria de regeneración, en respuesta a la pérdida de

la masa hepática. Esta capacidad es operativa en todos los vertebrados, y se desencadena en casos de trasplante hepático, cuando hígados pequeños se trasplantan en receptores de mayor tamaño de la misma especie.

El hepatocito es la célula del parénquima hepático que se encuentra en el hígado en mayor proporción y la que realiza la mayor parte de las funciones, constituyendo el 80% de las células hepáticas. El otro 20% lo constituyen las células no parenquimáticas, que incluyen las células de Kupffer, los lipocitos (células Ito o estrelladas), las células endoteliales, las células Pit y las células del canalículo biliar. Las células endoteliales recubren los vasos circulatorios intrahepáticos, denominados sinusoides, estructuras que proporcionan una amplia superficie para la absorción de los nutrientes. Las células de Kupffer, los macrófagos residentes en hígado, se encuentran también en los sinusoides y son esenciales para la fagocitosis de partículas extrañas y organismos infecciosos, y para la producción de citoquinas. Los lipocitos poseen varias funciones, entre ellas el almacenamiento de vitamina A y la producción de la matriz extracelular. Todos estos tipos de células hepáticas se activan en casos de lesión hepática y, especialmente los lipocitos, son las células que producen la mayoría de factores que conducen a la fibrosis hepática [1-3].

CAPACIDAD PROLIFERATIVA DEL HÍGADO

El hepatocito adulto de los mamíferos posee larga vida (300-400 días), es muy activo desde el punto de vista transcripcional y en condiciones normales, su capacidad de replicación del DNA es muy baja. Sin embargo, en respuesta a cualquier tipo de lesión, tóxica o vírica, que implique la pérdida de sus propias células, pone en funcionamiento inmediatamente su capacidad proliferativa con una intensidad que depende de la magnitud de la lesión. La extraordinaria capacidad regenerativa del hígado es un proceso surgido a lo largo de la evolución para proteger a los animales de los catastróficos resultados de la necrosis hepática causada por efecto de las toxinas de los alimentos.

El hígado es capaz de modular su masa de acuerdo con los requerimientos funcionales, bien proliferando en condiciones de deficiencia funcional, o bien sufriendo la apoptosis en casos de exceso. En ambos casos el hígado se remodela para preservar su arquitectura y organización histológica. Aunque son los hepatocitos los primeros en responder a la agresión, cada tipo celular de los anteriormente mencionados posee también la

capacidad de entrar en estado proliferativo para restaurar la masa y función hepáticas, de manera que todas las células hepáticas se consideran que poseen características innatas de células madre.

La masa hepática total se encuentra estrictamente regulada por mecanismos promitóticos y apoptóticos. En animales parabióticos, a los que por cirugía se les ha provocado la circulación compartida, si se elimina el 85% de uno de los hígados, se desencadena el crecimiento compensatorio del hígado remanente y del hígado normal del otro animal con el que comparte la circulación [4, 5]. Más aún, cuando estos dos animales se separaron de la circulación compartida, el animal superviviente normal redujo su hígado hipertrofiado hasta un tamaño, que en roedores es el equivalente al 5% de la masa corporal. En humanos, cuando se realiza un trasplante con un hígado de menor tamaño, éste crece rápidamente para acomodarse a las necesidades del receptor [6, 7]. Por el contrario, hígados de gran tamaño trasplantados a receptores pequeños sufren la apoptosis hasta alcanzar la relación normal de masa hepática/masa corporal, que en humanos es aproximadamente 2,5% [6]. Esto demuestra que, tanto en animales como en humanos, la masa hepática se encuentra regulada de manera estricta, merced a la notable capacidad que posee el hígado para crecer o reducir su tamaño en respuesta a las demandas metabólicas después de una lesión hepatocelular o de situaciones de exceso de masa funcional, cosa que puede ocurrir después de una pérdida masiva de peso corporal [8].

Se ha observado que muchas de las citoquinas y factores de crecimiento que son críticos en modelos experimentales de regeneración hepática, se expresan también en humanos [9], lo que indica que los mecanismos que controlan el crecimiento del hígado se mantienen a través de las especies. La mayor diferencia entre las especies se manifiesta en el curso del tiempo en el que se muestra el punto máximo de síntesis del DNA. Así, en roedores, este máximo se registra entre las 24 y las 40 horas y en humanos entre las 180 y las 200 horas después de la hepatectomía. Estas diferencias se han detectado también en el transcurso de la regeneración en casos de trasplante xenogénico de hepatocitos seguido de hepatectomía parcial del hígado enraizado [10]. Aunque las señales de la especie receptora son suficientes para inducir la regeneración en hepatocitos xenogénicos, los hepatocitos trasplantados sufren la mitosis a la velocidad de su especie original. De esta manera, si se trasplantan hepatocitos de una rata a un ratón receptor, el punto máximo de síntesis del DNA se verificará a las 24 horas de la hepatectomía, como si los hepatocitos estuvieran sufriendo la mitosis en la rata. En animales sanos, los hígados trasplantados

sufren la regeneración hepática sin complicaciones con poca mortalidad perioperativa. Las prácticas quirúrgicas hepáticas, realizadas en humanos, describen una mortalidad perioperativa menor del 4% después de la resección hepática en pacientes relativamente sanos o en donantes vivos [11]. Sin embargo, se ha descrito que las complicaciones y la mortalidad se elevan en pacientes con disfunciones hepáticas preexistentes y/o malnutrición. Por ejemplo, el hígado graso no alcohólico acarrea un 10% de mortalidad [12] y la cirrosis asociada con disfunción hepática acarrea un 30-100% de mortalidad, después de la mínima resección hepática u otras cirugías [13]. Por tanto, se considera que un indicio de cirrosis es una importante contraindicación para llevar a cabo un trasplante o resección hepáticas [11].

Aunque la función hepática aparece virtualmente normal después de la hepatectomía parcial, no puede haber supervivencia sin regeneración. En todos los animales estudiados, y esto puede también aplicarse a humanos, el fallo en la restauración de la masa y función hepáticas conduce invariablemente a la muerte. Alteraciones en la regeneración hepática se observan en algunas enfermedades, como hígado graso no alcohólico, cirrosis, infección hepática, malnutrición, etc., con mayor muerte celular, retraso en la mitosis y un retorno más lento a la masa hepática normal. El mejor conocimiento de las señales implicadas en la regeneración normal del hígado y de las limitaciones de la respuesta regenerativa en pacientes con enfermedad hepática ha de conducir a menor mortalidad perioperativa y potenciará el número de pacientes capaces de sufrir la regeneración hepática y sobrevivir a la resección y al trasplante. Las resecciones quirúrgicas en humanos tienen lugar en casos de trasplantes o de eliminación de tumores. Los ejemplos más típicos de deficiencia funcional debida a necrosis celular y tisular sin alteración aparente de la masa hepática, ocurren en casos de muerte masiva de los hepatocitos ocasionada por la acción de agentes hepatotóxicos (fármacos y xenobióticos) o de virus. En todas estas condiciones, los hepatocitos quiescentes experimentan una transición hacia el estado proliferativo, replican su DNA y se dividen para restaurar las células destruidas y la capacidad funcional del hígado. La capacidad funcional es, sin embargo, un parámetro relativo, ya que la regulación del crecimiento tiene su base en la relación masa hepática/masa corporal. El valor óptimo de este cociente indica que el hígado ha alcanzado un estado en el cual puede realizar el trabajo metabólico necesario para atender a las demandas funcionales del organismo. La regulación de la masa y función hepáticas no se manifiesta solamente por el control del crecimiento, ya que

2. EL EXTRAORDINARIO FENÓMENO DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

cuando la masa excede de los requerimientos funcionales del organismo, el hígado ha de perder dicha masa (células), para restaurar el cociente hígado/cuerpo. Esto sucede en casos de hiperplasia o hipertrofia inducida por fármacos estimuladores de la proliferación celular (fenobarbital), una vez que finaliza el tratamiento terapéutico. La eliminación del estímulo del crecimiento causa la muerte celular por apoptosis de los hepatocitos en exceso, hasta la restauración de la masa normal [1-3].

La capacidad extraordinaria del hígado de regenerarse después de sufrir lesión o resección ha fascinado a los hepatólogos de todos los tiempos. La alusión más antigua a este fenómeno se encuentra en la Teogonía de Hesiodo (750-700 A.C.). El Titán Prometeo irritó a Zeus cuando robó fuego del Olimpo para ofrecérselo a los primitivos humanos. Como castigo, fue encadenado a una roca en las montañas del Cáucaso donde Zeus le atormentó enviándole un buitre que le devoraba cada día las entrañas (el hígado). Por la noche, el hígado se regeneraba para permitir que continuase la tortura el día siguiente (Figura 1) [14].



FIGURA 1. Copa de cerámica lacónica en Esparta en la primera mitad del siglo VI A.C. y atribuida a Archesillas II, donde se muestra el castigo de Prometeo. Museo del Vaticano [14].

Los primeros datos sobre la documentación científica de la capacidad hepática de regenerarse no se consiguieron hasta 1890 [15]. A pesar de su gran actividad metabólica, el hígado es un órgano quiescente, en términos de proliferación celular, ya que en condiciones normales menos de un 1%

de hepatocitos se encuentran en estado proliferativo [16, 17]. Este recambio celular tan bajo en hígado sano puede alterarse por lesión tóxica, infección vírica o resección quirúrgica, lo cual origina un cambio súbito hacia un estado proliferativo con el objeto de recuperar la masa hepática original. La recuperación se logra de manera rápida en períodos de cinco a siete días después de la pérdida de las dos terceras partes del hígado por resección quirúrgica. La respuesta regenerativa se inicia con la proliferación de los hepatocitos supervivientes en el interior de la arquitectura acinar del hígado remanente. En el caso de hepatectomía parcial, este fenómeno da como resultado la hipertrofia del hígado remanente. La proliferación cesa una vez que la masa y función hepáticas alcanzan la fracción específica de la especie y la edad de la masa total del organismo.

MODELO EXPERIMENTAL DE REGENERACIÓN HEPÁTICA. HEPATECTOMÍA PARCIAL

El modelo experimental en el que se muestra con más claridad el fenómeno de la regeneración hepática es la hepatectomía parcial del hígado en rata, descrito por Higgins y Anderson en 1931 [18]. En este modelo dos tercios del hígado se eliminan por cirugía y el hígado remanente crece hasta que se restaura la masa hepática original. Una vez restaurada, aproximadamente una semana después de la resección quirúrgica en hígado normal, el proceso regenerativo se detiene.

La resección hepática o hepatectomía parcial reduce la masa hepática pero no lesiona las células, es decir, no produce necrosis hepatocelular. En este modelo la resección quirúrgica elimina masa hepática, al extirpar dos de los segmentos hepáticos, con lo cual los segmentos que permanecen se encuentran sometidos a un incremento en el flujo y presión de sangre portal. La hepatectomía parcial es hasta la fecha el modelo experimental más cercano de regeneración hepática, que no va acompañada de lesión hepatocelular y es por tanto el modelo preferido para estudiar *in vivo* la respuesta regenerativa. En el modelo de hepatectomía más utilizado se separan mediante ligadura los lóbulos izquierdo y medio y posteriormente se escinden. Esto permite la eliminación del 70% de la masa hepática sin producir lesión aparente.

Estrictamente hablando, el término regeneración hepática debe ser aplicado a la neoformación de pérdidas de tejidos u órganos en el adulto, es decir, a la regeneración epigenética. Este fenómeno es prominente en anfi-

bios, que pueden regenerar la cola, miembros e incluso lentes oculares, pero este tipo de regeneración epigenética no se ha observado en mamíferos. Después de la hepatectomía parcial, no se forman nuevos lóbulos ni se forman nuevas arterias hepáticas. En la rata, cuando se eliminan lóbulos hepáticos, los lóbulos remanentes sufren una hiperplasia compensatoria que da lugar a que aumente su masa, hasta que ésta llegue a alcanzar la del hígado original. Lo mismo ocurre en humanos después de hepatectomía parcial o después de recibir un injerto pequeño. Esta hiperplasia compensatoria hepática no es diferente de la que ocurre en la glándula adrenal después de la adrenalectomía unilateral, o de la del tiroides u otras glándulas [1, 2].

REGENERACIÓN HEPÁTICA INDUCIDA POR AGENTES HEPATOTÓXICOS

La propiedad del hígado de regular el número de sus células y su crecimiento es única y especialmente notable porque los hepatocitos son células quiescentes, que en estado normal se dividen muy poco. Sin embargo, a pesar de ello, el hígado no pierde su capacidad proliferativa y su adaptabilidad a demandas metabólicas variables. Son muchas las situaciones en las que tienen lugar alteraciones de la masa hepática. Pérdidas de esta masa ocurren en casos de eliminación quirúrgica del tejido hepático (hepatectomía). Otra pérdida de células hepáticas por necrosis acompañada por una deficiencia funcional, es la causada por hepatotóxicos (Figuras 2 y 3) y por virus. La pérdida de masa hepática inducida por administración de agentes hepatotóxicos (tetracloruro de carbono, tioacetamida, etc.), va unida a una respuesta inflamatoria en la que intervienen los fagocitos residentes (células de Kupffer) y los circulantes (neutrófilos), para eliminar los residuos celulares producto de la necrosis hepatocelular. Esta reacción inflamatoria precede a la respuesta regenerativa que se desencadena inmediatamente después. En la mayoría de los casos, la secuencia de acontecimientos que tiene lugar en el hígado cuando una hepatotoxina ingresa en el organismo puede resumirse de la siguiente manera:

AGENTE HEPATÓXICO (FÁRMACO)→

BIOTRANSFORMACIÓN→

ESPECIE QUÍMICA REACTIVA + ROS→

MUERTE CELULAR (APOPTOSIS Y/O NECROSIS (Figuras 2 y 3)→

INFLAMACIÓN→
TRANSICIÓN DEL ESTADO QUIESCENTE AL PROLIFERATIVO→
PROLIFERACIÓN HEPATOCELULAR→
REGENERACIÓN TISULAR→
RESTAURACIÓN DE LA FUNCIÓN HEPÁTICA

El primer paso en esta secuencia es la biotransformación del tóxico en especies químicas reactivas, producto de la acción de las monooxigenasas microsómicas de función mixta dependientes del citocromo P-450 o de flavinas. Estas especies son las que van a desencadenar la toxicidad. Entre estas especies cabe distinguir: (a) los compuestos electrofílicos, productos de la biotransformación de los hepatotóxicos, tales como el tetracloruro de carbono (CCl_4), la tioacetamida, el acetaminofeno, etc.; (b) radicales libres derivados de sustancias como el tetracloruro de carbono, y (c) especies activas de oxígeno (ROS) formadas por adición de electrones al oxígeno molecular [1-3].

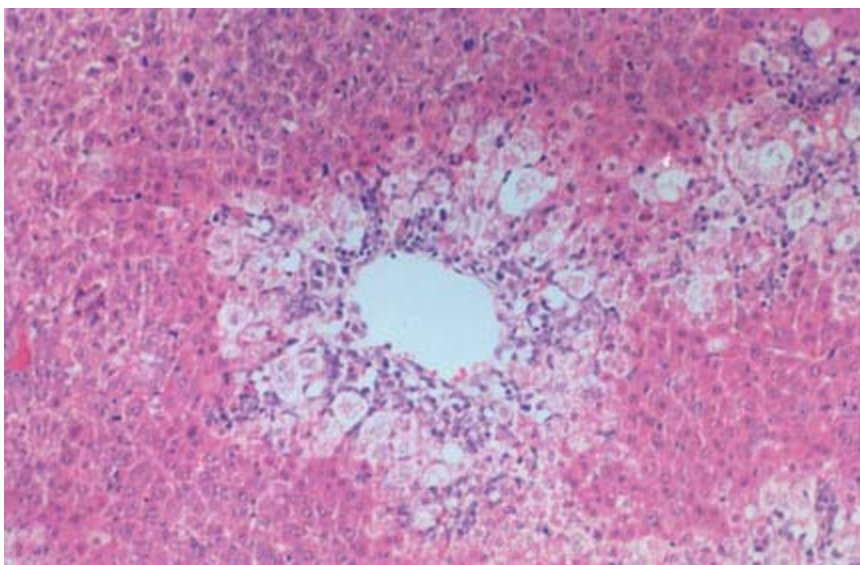


FIGURA 2. Corte de hígado que muestra una zona necrosada que rodea el terminal venoso (necrosis perivenosa) con infiltración de neutrófilos, inducida por administración intraperitoneal de una dosis subletal de tioacetamida (500 mg/Kg) a una rata (Hematoxilina & eosina x 200 aumentos) (Sanz et al., 1998) [19].

2. EL EXTRAORDINARIO FENÓMENO DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

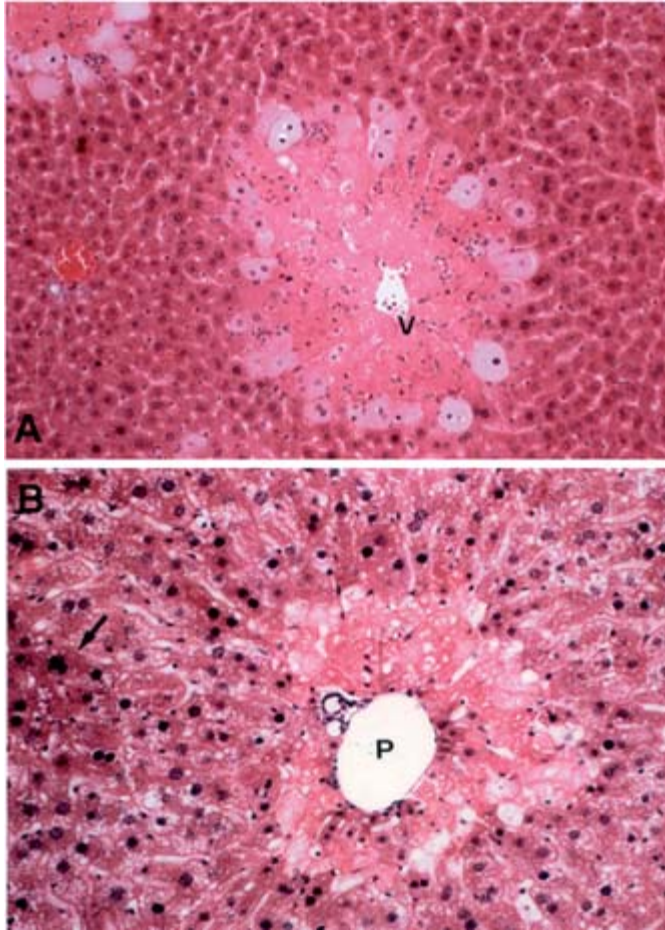


FIGURA 3. Lesión hepática inducida por cocaína en ratas. A: Corte de hígado obtenido a las 24 horas de la administración de una dosis de cocaína (60 mg/kg) a una rata, donde se muestra la zona de necrosis que rodea al terminal venoso (necrosis perivenosa). B: Corte de hígado obtenido a las 24 horas de la administración de una dosis de cocaína (60 mg/kg) a una rata, que sufrió tratamiento previo con fenobarbital durante cinco días en el agua de bebida (1 g/litro), donde se muestra la zona de necrosis que rodea al terminal porta (necrosis periportal). Adyacente al terminal porta aparecen el canalículo biliar y la arteriola hepática. Hematoxilina eosina x 200 (Cascales, resultados no publicados).

La forma básica de la respuesta hepática ante la presencia de un tóxico es la inducción de los sistemas enzimáticos relacionados con su metabolismo, lo cual acelera su biotransformación y con ello su hepatotoxicidad. La generación de especies reactivas promueve la disminución del glutatión

intracelular, la elevación del calcio citoplasmático, la peroxidación lipídica de las membranas y una serie de reacciones encadenadas que traen consigo la desaparición del glucógeno, la disminución del ATP y el descenso del estado energético de la célula hepática. Esta serie de eventos origina, previa activación de proteasas y lipasas, la destrucción de la membrana y la muerte celular. La elevación sostenida del calcio citoplasmático se asocia con la activación de enzimas dependientes del calcio, como la fosfolipasa A_2 , la glucógeno fosforilasa, las endonucleasas, etc., que provocan la ruptura de la membrana plasmática y la fragmentación de la molécula del DNA (apoptosis). Por otro lado, las elevaciones transitorias del calcio intracelular intervienen en la progresión de la división celular en las transiciones $G1 \rightarrow S$ y $G2 \rightarrow M$. Inmediatamente después de la muerte celular se inicia la proliferación hepatocelular para restablecer las poblaciones celulares que han sido destruidas y con ello restaurar la función hepática. En caso de ausencia de proliferación celular, la lesión celular progresa y puede conducir a la muerte del organismo [1-3]. La sincronía de la proliferación hepatocelular postnecrótica depende de la intensidad de la lesión hepática y depende también del agente hepatotóxico utilizado.

POTENCIAL REPLICATIVO DE LOS HEPATOCITOS

La hepatectomía parcial en hígado sano induce la replicación del 95% de los hepatocitos. De esta manera se ha llegado a calcular que con dos rondas de replicación se completa la restauración de la masa hepática. Como en la hepatectomía parcial se eliminan los dos tercios del tejido hepático, para la restauración del tejido original, en teoría se necesitarían 1,66 rondas de división por hepatocito remanente. La mayoría de los hepatocitos en los lóbulos residuales (95% en ratas jóvenes y 75% en ratas viejas), participan en una o dos rondas de proliferación [20]. Sin embargo, estos estudios teóricos no exploran la capacidad replicativa total de los hepatocitos. En casos en los que se han realizado trasplantes seriados de hepatocitos en hígado, se ha demostrado que algunas poblaciones de estas células poseen una capacidad de replicación muy elevada, a diferencia de las células de otros tejidos. Estudios originales en ratones transgénicos con supresión somática del transgen que codifica para la uroquinasa activadora del plasminógeno (uPA), han estimado que la repoblación del hígado puede conseguirse con un número pequeño de hepatocitos trasplantados, que pueden sufrir de 12 a 18 rondas de replicación [21]. En otro modelo de lesión hepática causada por tirosinemia, se ha encontrado que los tras-

plantas seriados de hepatocitos dieron lugar a 69 rondas de replicación, una increíble expansión masiva de células equivalente a la de las células madre hematopoyéticas [22].

Aparentemente la capacidad replicativa de los hepatocitos está regulada, en parte, por la capacidad de sus telómeros cromosómicos para permanecer en un estado competente de replicación. Ratones knockout en el gen de la telomerasa ribonucleica (*mTR*) actuaron aparentemente de forma normal [23], pero después de seis generaciones la disfunción de la telomerasa se manifestó, afectando a tejidos altamente proliferativos como la médula ósea y el intestino. El desarrollo hepático fue normal en estos ratones, pero cuando se cruzaron con el trasgen Alb-uPA que causa incremento del recambio de los hepatocitos, los hígados de las generaciones tardías *mTR*^{-/-} fracasaron en proporcionar suficiente número de hepatocitos con capacidad replicativa para superar el elevado requerimiento de recambio hepatocítico y se observó también un incremento en la apoptosis hepatocelular. Después de hepatectomía parcial los hígados *mTR*^{-/-} mostraron una regeneración retrasada y una progresión reducida hacia la mitosis, lo que dio lugar a la formación de husos mitóticos aberrantes.

Casos en los que se administraron agentes hepatotóxicos tales como retrorsina o galactosamina, que disminuyen la capacidad replicativa de la mayoría de los hepatocitos normales, se activó una población de células denominada células ovales con objeto de restaurar la masa hepática. Estudios sobre repoblación hepática en trasplantes sugieren que células madres procedentes de la médula ósea tienen también capacidad para diferenciarse en linajes hepatocíticos [24].

Utilizando la hepatectomía parcial hasta sus límites se ha observado que el hígado de rata se regeneró cada vez en doce hepatectomías secuenciales [25]. Esto se ha demostrado en los dos modelos de ratón, citados anteriormente, en los cuales los hígados fueron incapaces de mantener la vida del animal por defectos inducidos experimentalmente. En uno de estos modelos, bajo la influencia de un promotor de la albúmina, se expresaron grandes cantidades de uroquinasa. El otro es un modelo de tirosinemia hereditaria tipo I, enfermedad hepática recesiva letal causada por una deficiencia de fumarilacetoacetato hidrolasa. Un número determinado de hepatocitos fueron inyectados en esos hígados, que entraron en crecimiento clonogénico, crearon nódulos, restauraron la masa hepática y salvaron al animal. En el modelo de la tirosinemia se observó que unos 1.000 he-

patocitos fueron suficientes para generar nódulos de células normales, colonizar y salvar el hígado estableciendo la arquitectura normal [21]. Células procedentes de nódulos de primera generación de hepatocitos normales se aislaron y trasplantaron en serie a otro ratón. Estas células obtenidas a través de cuatro generaciones de trasplantes seriados, pudieron también salvar al animal, a pesar de haber sufrido una expansión clonal en otro ratón. Cálculos matemáticos obtenidos a partir de estos modelos han establecido que los hepatocitos maduros pueden replicarse indefinidamente. Un solo hepatocito después de 34 divisiones da lugar a $1,7 \times 10^{10}$ células [25]. Considerando que un hígado normal de rata posee unos 3×10^8 hepatocitos, se calcula fácilmente que un solo hepatocito de rata en estas condiciones experimentales posee suficiente capacidad clonogénica para generar 50 hígados de rata. Estudios en cultivo han demostrado también que los hepatocitos bajo la influencia de los factores de crecimiento HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) y EGF (*Epidermal Growth Factor*), se desdiferencian, sufren múltiples rondas de proliferación, se expanden de manera clonal y se rediferencian para formar hepatocitos maduros o incluso estructuras ductulares. Todos estos hallazgos demuestran el potencial clonogénico ilimitado del hepatocito, y que los hepatocitos maduros no son células diferenciadas terminales ya que pueden proliferar para asegurar su propia preservación.

FACTORES IMPLICADOS EN LA TRANSICIÓN AL ESTADO PROLIFERATIVO

El hígado puede restaurar la pérdida de sus propias células mediante el mecanismo de regeneración hepatocelular, capacidad considerada de relevancia fisiológica en numerosas enfermedades hepáticas, tales como hepatitis aguda, vírica y alcohólica, alteraciones metabólicas o después de cirugía hepática. En el modelo de regeneración hepática producido por hepatectomía parcial en el que se elimina el 70% del hígado en ratas, los hepatocitos remanentes sufren una transición desde el estado quiescente al proliferativo y entran en el ciclo celular de manera sincrónoma. La síntesis del DNA comienza a las 12-16 horas después de la hepatectomía y alcanza su máximo a las 24-48 horas. La iniciación de la mitosis se registra seis a ocho horas más tarde que la síntesis del DNA. Tres días después de la hepatectomía, la masa celular original del órgano se encuentra casi restaurada. Sin embargo, en este momento de la regeneración hepática, la histología del hígado difiere sustancialmente de la normal. Los hepatocitos se

encuentran agrupados formando racimos no vascularizados de 10 a 14 células y la cantidad de matriz extracelular se encuentra claramente disminuida como consecuencia de que la proliferación de los hepatocitos se ha verificado sin una simultánea síntesis de esta matriz. A partir de este momento, la intensidad de la proliferación de los hepatocitos decae y los lipocitos migran al interior de los racimos. Es ahora cuando se comienzan a formar nuevos ramales vasculares y la histología hepática normal se va restableciendo poco a poco de manera que a los 8-10 días de la resección quirúrgica el hígado muestra una arquitectura normal [1-3].

La activación de factores de transcripción preexistentes en forma latente juega un papel primordial en la adquisición de la competencia proliferativa en los hepatocitos, es decir, el paso del estado quiescente normal al estado proliferativo [16, 17]. Esta transición se verifica por inducción de varios genes tempranos inmediatos relacionados con el ciclo celular. El factor de transcripción NF κ B (*Nuclear Factor - κ B*) juega un papel importante en la regeneración hepática en base a una fuerte inducción de la unión del NF κ B al DNA [26]. Se ha demostrado que uno de los inductores más potentes de la activación del NF κ B es el TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*), citoquina cuya intervención en la proliferación celular se ha demostrado en base a los siguientes hallazgos: que los anticuerpos anti-TNF α inhibieron la regeneración hepática posthepatectomía; que se detectó un incremento rápido del mRNA del TNF α durante la proliferación hepática inducida por mitógenos; y que tratamientos repetidos con TNF α recombinante indujeron la proliferación hepática *in vivo* [27].

La notable respuesta del hígado a la agresión tóxica necrogénica, producida por fármacos o xenobióticos, puede ser considerada como el principal mecanismo de defensa. Mediante la inducción de la proliferación de los hepatocitos remanentes el hígado está capacitado para recuperar su masa y celularidad inicial. Durante mucho tiempo se ha creído que la deficiencia en la masa hepatocelular era el agente desencadenante de la expansión de las células remanentes, pero en caso de hígado de ratón transgénico con una supresión somática [21], se inicia la regeneración sin que existan cambios en el peso o en el número de células hepáticas, lo que indica que el agente desencadenante tiene que ser algún indicador de la función hepática y que sólo cuando la masa hepática satisface la demanda de funcionalidad requerida por el organismo, es cuando la proliferación celular cesa en respuesta a la señal que indica que la regeneración está completa.

El modelo de ratones transgénicos puede ser utilizado para el estudio de las señales implicadas en la regeneración hepática y en la naturaleza de la respuesta celular, aunque el estímulo más común para la división, que afecta al parénquima hepático, es la pérdida de las propias células del hígado. La pérdida de las células hepáticas puede deberse a tres causas: infección, intoxicación química o hepatectomía parcial. A pesar de la diferencia entre ellas, la respuesta celular es aparentemente la misma en cualquiera de estos tres casos. Como se indicó anteriormente, el modelo más utilizado para el estudio de la respuesta proliferativa sincrónoma se consigue en ratas por hepatectomía de porciones de hígado que pueden llegar hasta un 70% de la masa total [20]. La regeneración hepática puede inducirse experimentalmente también mediante la administración de agentes químicos hepatotóxicos que producen, según la dosis administrada, diversos grados de necrosis.

La proliferación del parénquima hepático comienza en las zonas periportales y se desplaza posteriormente hacia las áreas perivenosas. De esta manera, en un plazo de dos a tres semanas, el segmento hepático remanente recupera tanto el número de células como el peso originario del hígado. En el curso de esta hiperplasia compensatoria, el 90% de los hepatocitos se divide entre las 24 y las 48 horas después de la hepatectomía [18, 28]. Para entender la regulación del crecimiento hepático después de la hepatectomía parcial es fundamental conocer los cambios, que tienen lugar en la función del hepatocito. La regeneración hepática *in vivo* parece presentar una respuesta bifásica. Durante la primera ronda de división, son los hepatocitos las únicas células hepáticas que se encuentran involucradas en la replicación del DNA (fase S con máximo a las 24 horas) y en la actividad mitótica (fase M con máximo a las 30 horas). La segunda ronda mitótica, que es menos sincrónoma, ocurre más tarde y en ella participan todas las células hepáticas, parenquimáticas y no parenquimáticas. De esta manera las células no parenquimáticas, que constituyen el 20% de las células hepáticas, se replican después que los hepatocitos. Las células de Kupffer, los lipocitos (células estrelladas o células de Ito) y las células de los conductos biliares, replican su DNA a las 48 horas y las células endoteliales son aún más tardías en sufrir la replicación. A los tres días de la resección quirúrgica el hígado ha alcanzado más de la mitad de las células perdidas, y el proceso regenerativo finaliza a los ocho a diez días (Figura 2) [29].

2. EL EXTRAORDINARIO FENÓMENO DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

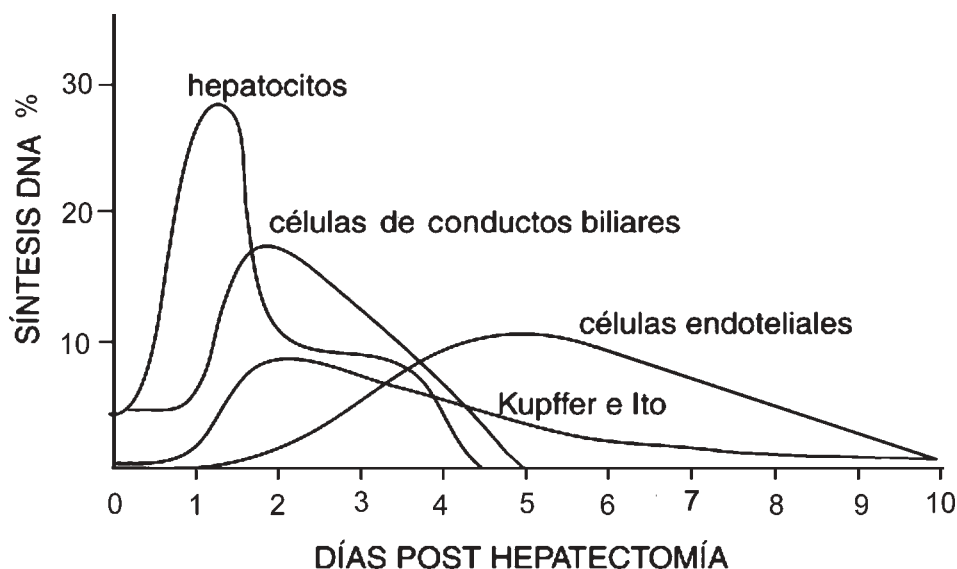


FIGURA 4. Cronología de la replicación de las diferentes células hepáticas después de la hepatectomía parcial. Michalopoulos y De Frances [17].

Después de la administración de una dosis elevada de un hepatotóxico, el hígado sufre un proceso de necrosis hepatocelular infligida por el mecanismo de bioactivación de la toxina (Figuras 2 y 3). Inmediatamente después, y por mecanismos aún no completamente esclarecidos, el hígado responde estimulando la proliferación y con ello la regeneración hepatocelular (Figura 5). A dosis débiles del hepatotóxico, la necrosis afecta sólo a pocas células y la regeneración tiende a iniciarse aproximadamente a las seis horas, desapareciendo a las veinticuatro horas los síntomas de lesión. Es frecuente que reaparezca con posterioridad alguna muestra de lesión remanente y que entre las treinta y seis y las cuarenta y ocho horas tenga lugar una segunda fase de división celular. La regeneración hepática va unida la resistencia a la acción citotóxica de agentes químicos. Por tanto, además de la reposición de las células y de la restauración de la morfología hepatolobular, merced a la resistencia que poseen las nuevas células, el tejido hepático se encuentra capacitado para superar la inminencia de una agresión tóxica en las fases posteriores, evitando, por una parte, la expansión de la lesión y por otra, acelerando el proceso de la recuperación total. La aparición del *fenotipo resistente* en los hepatocitos es una respuesta adaptativa del hígado frente a una amplia variedad de xenobióticos. Esta resistencia es un mecanismo de adaptación clonal (gen *mdr1*) para sobre-

vivir en un ambiente hostil, el cual se encuentra involucrado en la promoción tumoral y en la resistencia a la quimioterapia de muchos cánceres humanos [30].

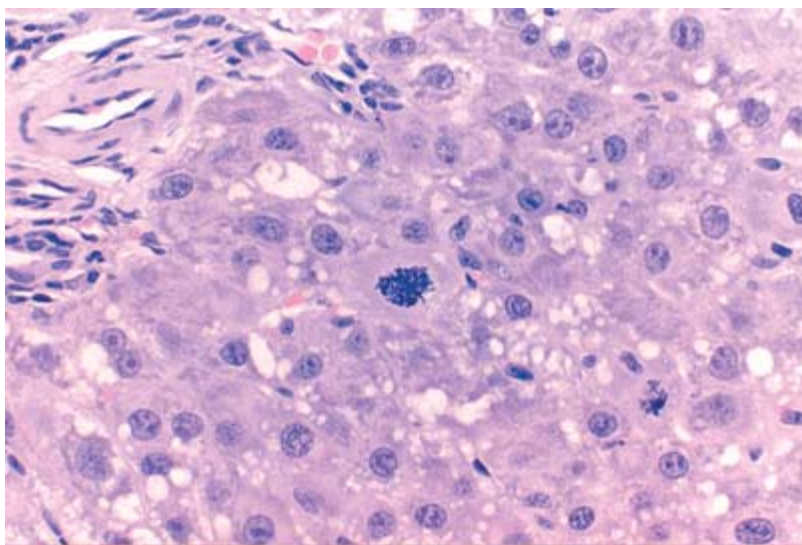


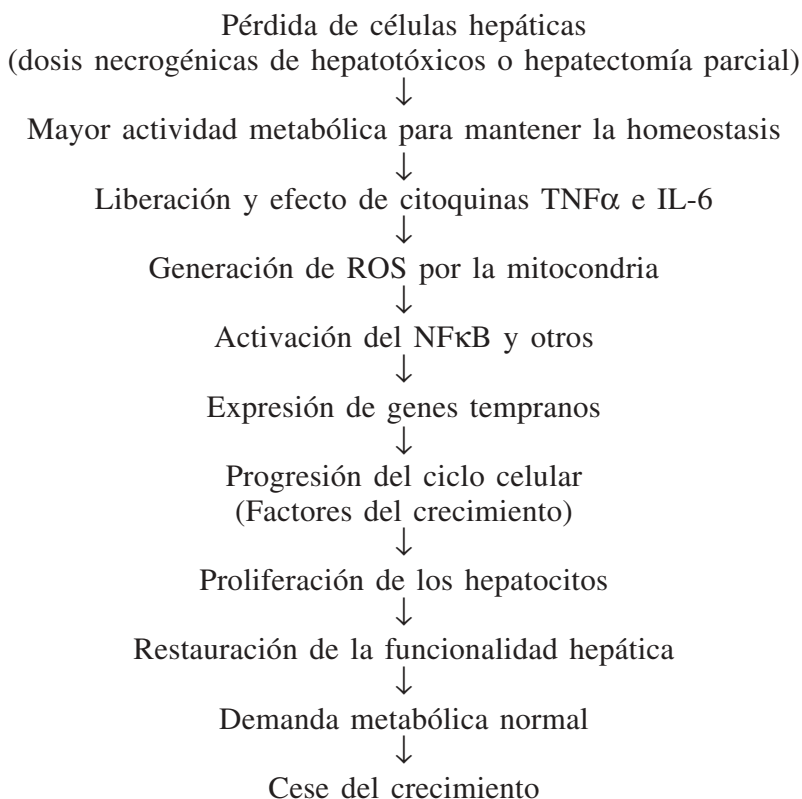
FIGURA 5. Corte de hígado de rata obtenido a las 48 horas de la administración de una dosis subletal de tioacetamida (500 mg/Kg), donde se muestra en el centro un hepatocito en división cerca de la zona de la lesión (ángulo superior izquierda) (Hematoxilina eosina) (Sarrión, 1996) [31].

Otra forma de proliferación hepatocelular es la debida a productos químicos capaces de producir hiperplasia, como es el caso del fenobarbital, cuya administración produce la inducción de las monooxigenasas dependientes del citocromo P-450, con un aumento en el tamaño del hígado, debido a hiperplasia e hipertrofia [32, 33]. Otro fármaco, el clofibrato, induce la proliferación de peroxisomas en ratas y ratones [34]. Estos fenómenos no se asocian con una necrosis detectable microscópicamente, o con alteraciones enzimáticas. La hiperplasia se puede reconocer por un incremento en la mitosis y por cambios en el citoplasma que indican que existe una inducción enzimática. En el caso del fenobarbital, cuando se interrumpe su administración, el exceso de células en el hígado hipertrofiado sufre apoptosis [35].

Se ha descubierto un método utilizado como diagnóstico de rutina que permite detectar células en proliferación y evaluar la regeneración hepática

2. EL EXTRAORDINARIO FENÓMENO DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

en muestras humanas. Este método utiliza anticuerpos monoclonales frente a un *antígeno nuclear de células proliferantes* (PCNA), factor auxiliar de la DNA polimerasa. La detección inmunohistoquímica de este antígeno no depende de la incorporación de marcadores externos, como la bromodeoxiuridina o la timidina tritiada y se ha demostrado que algunos anticuerpos anti-PCNA pueden aplicarse con éxito a tejidos fijados con formol e incluidos en parafina [36].



Esquema que muestra la secuencia de acontecimientos que desencadenan la regeneración hepática en relación con las demandas metabólicas y las señales mitogénicas [37].

CICLO DE DIVISIÓN CELULAR

La proliferación celular en condiciones normales requiere la acción de citoquinas y factores de crecimiento, los cuales promueven la activación ordenada de proteínas reguladoras que controlan la transición a través de la fase G1 del ciclo celular. Después que las células han superado el punto de restricción al final de G1, las células pueden progresar en el ciclo, incluso en ausencia de los factores del crecimiento. Es importante, por tanto, conocer las bases bioquímicas que controlan el paso a través del punto de restricción, cuando se quiere profundizar en los mecanismos del ciclo de división celular. Son muchos los estudios que han atribuido a la proteína retinoblastoma (RB) y al factor de transcripción E2F, el papel de mediadores clave del punto de restricción [38]. La fosforilación de RB al final de la fase G1, promueve la liberación de E2F, el cual, una vez libre, puede regular la transcripción de genes necesarios para la progresión en la fase S. La fosforilación de RB la realizan complejos ciclina/quinasas dependientes de ciclina (CDK) [39]. En muchos tipos celulares es la ciclina D1 la que se expresa durante la fase G1 por acción de los factores del crecimiento, y actúa como

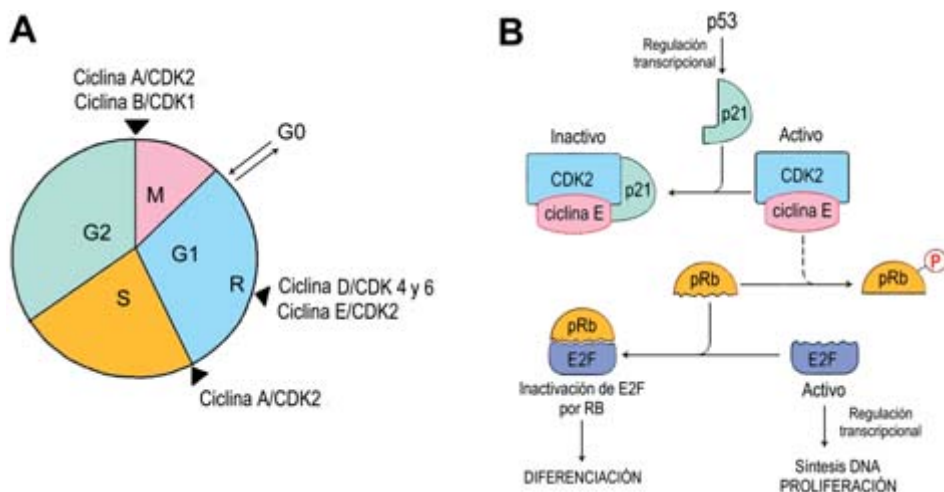


FIGURA 6. Ciclo de división celular. Mecanismos *pRB* (A) Regulación del ciclo celular por ciclinas y proteínas asociadas. R, punto de restricción; CDK, quinasas dependientes de ciclinas; G0, fase quiescente; G1, fase que precede a la síntesis del DNA; S, fase de síntesis del DNA; G2, fase que precede a la mitosis; M, fase de mitosis. (B) Papel de los complejos ciclinas CDK y de los inhibidores de las CDK en la regulación del ciclo. RB proteína retinoblastoma; E2F, factor de transcripción. pRB y p53 proteínas supresoras de tumores.

mediador clave intracelular de las señales extracelulares, tales como las emitidas por mitógenos, que regulan la proliferación. Los complejos de la ciclina D1 con las quinasas CDK4 y CDK6, una vez activados, son capaces de fosforilar a la proteína RB [40] (Figura 6).

En animal adulto, los hepatocitos se encuentran muy diferenciados y realizan numerosas funciones metabólicas esenciales. En hígado normal los hepatocitos raramente se dividen, aunque retienen una capacidad similar a las de las células progenitoras, que se pone de manifiesto en respuesta a agresiones que reduzcan la masa hepática funcional. Es esta una característica de los hepatocitos que los distingue de otros tipos de células parenquimáticas diferenciadas. El control de la proliferación de los hepatocitos en el hígado es un proceso enormemente complejo y todavía no completamente esclarecido, pero estudios recientes en modelos de hepatectomía con animales manipulados genéticamente están tratando de ofrecer una panorámica más clara de los acontecimientos que promueven la entrada en el ciclo celular [8, 9]. La transición G0-G1 y la progresión al inicio de G1 parece que se encuentra mediada por cambios en la matriz extracelular y por citoquinas entre las que se encuentran el TNF α y la IL-6 (*interleukin-6*). La progresión de los hepatocitos al final de G1 requiere la acción de factores del crecimiento e implica la activación de los complejos ciclina/quinasas dependientes de ciclina. Los hepatocitos en cultivo primario proliferan fácilmente en respuesta a mitógenos tales como HGF y EGF. Recientemente se ha demostrado que la ciclina D1 regula la progresión de los hepatocitos en las etapas terminales de G1 en respuesta a mitógenos. También hay que destacar que el control de la proliferación de los hepatocitos por la matriz extracelular puede estar mediado también por la ciclina D1, lo que indica que esta proteína es un mediador del que dependen las señales extracelulares que regulan la proliferación celular. La inducción de la ciclina D1 puede ser el factor limitante en la proliferación de los hepatocitos. La velocidad de progresión a través de G1 en hepatocitos se encuentra también controlada por la proteína p21. Evidencias experimentales proponen que al menos dos componentes que controlan la actividad del complejo ciclina/CDK regulan también la progresión a través de G1: la ciclina D1 promueve la entrada en la fase S, mientras que la p21 retrasa la transición hacia la fase S [41].

La citocinética es el estudio del proceso de crecimiento, proliferación, diferenciación, migración y muerte de las células individuales y de poblaciones de células. Los cambios en la cinética de las células durante la exposición a agentes tóxicos puede ayudar a conocer su mecanismo de acción y la patogénesis. Estos estudios se basan en el ciclo celular, que se define,

como el tiempo entre el final de la mitosis de las células parentales, y el final de la mitosis de las células hijas.

Para conseguir la multiplicación por división, las células de cualquier tejido abandonan el estado quiescente (G0) para entrar en el ciclo celular y proceder a través de una serie de pasos consecutivos que culminan en la mitosis. El ciclo celular se divide en cuatro fases: G1 o fase postmitótica, S o período de síntesis del DNA, G2 o fase premitótica y M o mitosis. La única fase visible al microscopio es la mitosis. G1 es una fase de latencia que precede a la replicación del DNA, y las células en G1 tienen el mismo contenido en DNA que las en G0. Durante G1 se verifican una serie de cambios en la concentración intracelular de iones, en el transporte de proteínas y nutrientes y en la síntesis de enzimas específicos para la síntesis del DNA. Durante la fase S (síntesis del DNA) del ciclo celular, se verifica la replicación del DNA y la síntesis de la mayoría de proteínas e histonas. En un momento dado de una población celular tumoral, algunas células se encuentran al comienzo y otras finalizando la replicación del DNA, de manera que la distribución de las células respecto a su contenido en DNA varía desde el contenido 2C de la fase G0/G1 hasta dos veces este contenido (4C) de la fase G2/M. La fase G2 con dos veces el contenido G0/G1 de DNA es, de nuevo, una fase de latencia que precede a la mitosis sin cambios en el contenido de DNA. En G2 tiene lugar la síntesis de RNA y proteínas como preparación para la mitosis y la reparación de las lesiones de DNA causadas por replicación defectuosa o por agentes genotóxicos. Finalmente, las células entran en mitosis (fase M), se dividen y las células hijas vuelven a la fase G0 (fase quiescente) o a la fase G1. Durante la fase G0/G1 ocurren algunos cambios en la estructura de la membrana celular, la síntesis proteica decrece y cesa la síntesis de RNA. En general, la fase S, dura entre siete y ocho horas, la G₂, entre dos y cuatro horas y la M menos de una hora, mientras que la duración de la fase G₁ es variable (Figura 7).

El estudio, en un tejido dado, de la fracción de células que participa en el ciclo celular, es un concepto importante en el análisis de la población celular. Esta fracción se eleva tras la lesión celular durante la reparación compensatoria, siendo las células en G0 las que se estimulan para participar en el ciclo celular. La fracción celular en crecimiento decrece cuando finaliza la reparación y la restauración de la función del tejido. La mitosis se puede observar por microscopía óptica sobre cortes de tejido teñidos con hematoxilina-eosina (Figura 5) y su evaluación indica, como primera aproximación, el ritmo de proliferación. El índice mitótico muestra la

2. EL EXTRAORDINARIO FENÓMENO DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

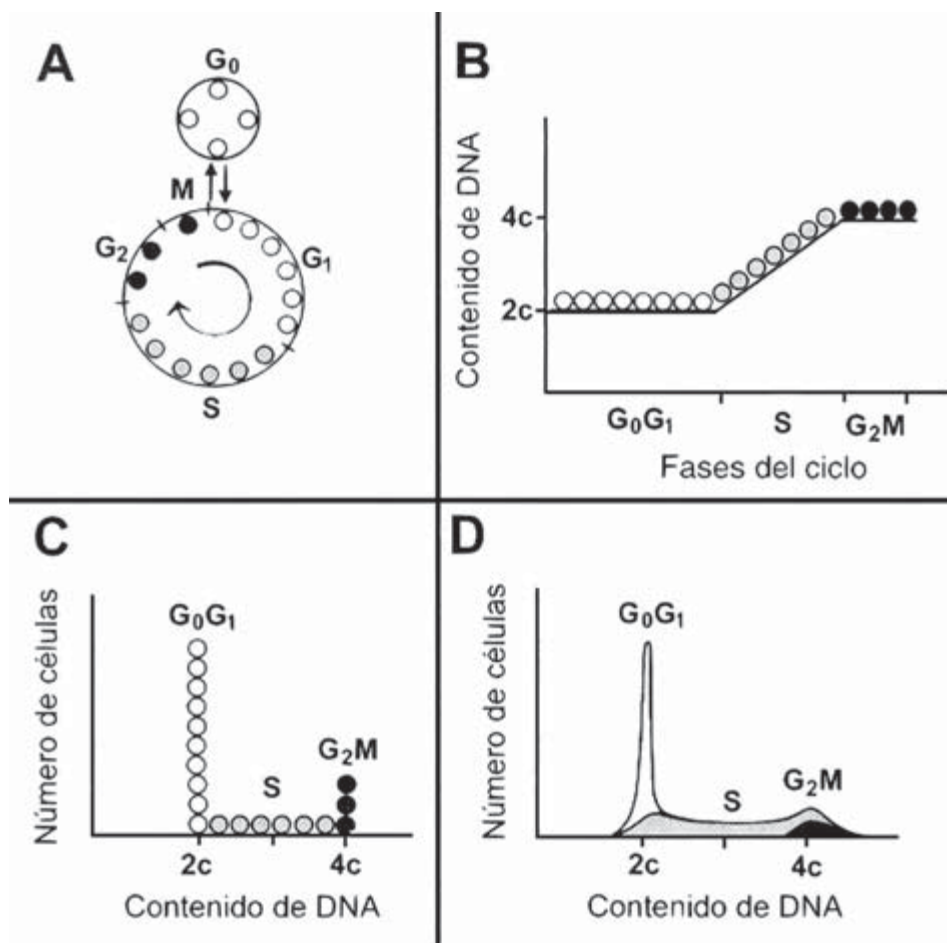


FIGURA 7. Ciclo de división celular. (A) fases del ciclo. (B) Relación entre el contenido de DNA (ordenadas) y la progresión en las fases del ciclo celular (abscisas). (C) Distribución ideal del DNA (histograma) de las poblaciones ilustradas en (B). Distribución analítica del DNA de una gran población de célula, obtenida por citometría de flujo en células tratadas con yoduro de propidio.

proporción de mitosis en la población celular total, en un tiempo concreto. Este parámetro se ha utilizado por nuestro grupo para la localización intraacinar de la mitosis en relación con la zona necrosada [35, 42].

La citometría de flujo está especialmente indicada para el estudio del ciclo celular, usando líneas celulares o suspensiones de células simples, obtenidas por medios físicos o electrónicos. El ciclo celular puede explo-

rarse a lo largo de sus fases, G0/G1, S y G2 + M, marcando cada célula con una tinción específicamente ligada al DNA. Esto permite clasificar las poblaciones celulares en G1, S o G2. Otras tinciones ligadas a ambos, DNA y RNA, como el naranja de acridina, permiten identificar poblaciones en G0. La medida del DNA, célula por célula, en el ciclo celular, es importante en los estudios de células cancerígenas porque las células malignas tienen alterado con frecuencia el contenido en DNA o su citocinética. También las células en regeneración post-necrótica presentan notables alteraciones en la ploidia [35, 43]. Para el análisis del DNA se emplean fluorocromos intercalantes o fluorocromos no intercalantes. Los fluorocromos intercalantes, tales como el yoduro de propidio o el bromuro de etidio, forman complejos con la doble hélice de DNA por intercalación entre los pares de bases. Para los complejos formados con el yoduro de propidio, las longitudes de onda de máxima excitación y emisión son 545 y 623 nm, respectivamente.

Entre los numerosos métodos descritos para la evaluación del DNA, el más utilizado es el de Vindelov *et al.* [44], que utiliza el yoduro de propidio y analiza la distribución del DNA en fracciones de $10 \text{ ó } 50 \times 1.000$ células. Este fluorocromo presenta, sobre otros, las propiedades siguientes: (a) es muy estable y puede ser excitado por un láser de argón standard; (b) produce histogramas con un coeficiente de variación bajo y permite el cálculo de la actividad proliferativa; y (c) emite en la región naranja-roja del espectro, permitiendo así el análisis simultáneo del DNA y de antígenos celulares con anticuerpos marcados con isotiocianato-fluoresceína.

Es posible evaluar los cambios sobre la ploidia originados por diferentes agentes químicos: células con contenido normal de DNA (2C), células con el doble del contenido del DNA normal (4C), y valores intermedios que se asignan a S ($2C \rightarrow 4C$), o fase S. Mediante la citometría de flujo se ha podido detectar el efecto clastogénico, por el incremento de la dispersión del contenido del DNA celular. En células en división, se puede producir una distribución desigual del DNA en las células hijas; esto se puede detectar por un ensanchamiento en el pico obtenido para la fase G1 del ciclo celular. También se puede detectar con rapidez, si se produce una aneuploidia, en la población celular que está expuesta a un agente, supuestamente tóxico [45, 46].

FUNCIONES HEPÁTICAS DURANTE LA REGENERACIÓN

El hígado es un órgano que posee una gran vitalidad y puede continuar realizando sus funciones diferenciadas, aún cuando sus células se encuentran comprometidas en la proliferación durante la regeneración. En una gran mayoría de células, por ejemplo, en los linajes hematopoyéticos, la proliferación no es compatible con la función diferenciada. Por eso, una de las características más notables de los hepatocitos en el hígado regenerante es que estas células, a pesar de tener que replicarse, continúan realizando todas las funciones esenciales indispensables para mantener la homeostasis y atender a las demandas del organismo. Estas funciones incluyen la regulación de la glucosa, la síntesis de numerosas proteínas sanguíneas, la secreción de la bilis, la biodegradación de los compuestos tóxicos, etc. Hay que destacar también, que muy pocas alteraciones se observan cuando sólo el 30% del órgano permanece y de ese 30% el 90% de las células se encuentran comprometidas en la proliferación. Esta notable actividad se debe a una organización compleja de eventos interactivos en los que se encuentra implicada la matriz extracelular, su disolución y resíntesis y el propio alineamiento y clasificación de más de 150 cromosomas en cualquier evento mitótico dado (la mayoría de hepatocitos maduros en rata y humano son poliploides, 4C y 8C) [16, 17].

¿De qué manera es capaz el hígado de realizar sus funciones mientras se encuentra en pleno proceso regenerativo? Algunas pistas de cómo el mantenimiento de la función diferenciada se mantiene durante la regeneración han sido proporcionadas mediante el examen de la respuesta de los genes inmediatos tempranos. Aunque muchos de estos genes se expresan en hígado en regeneración y en otros órganos en crecimiento, aproximadamente un tercio de los genes se expresan a un elevado nivel o específicamente en células hepáticas en crecimiento. Los hepatocitos y las células no parenquimáticas del hígado remanente expresan la mayoría de estos genes, pero la expresión de un subgrupo de genes está limitada a los hepatocitos [47]. Varios de estos genes tempranos inmediatos restringidos al hígado codifican proteínas que se encuentran implicadas en la respuesta gluconeogénica hepática.

La inducción de los genes gluconeogénicos representa una respuesta adaptativa del hígado mediante la cual sólo un tercio del hígado original, compensa produciendo suficiente glucosa para abastecer al organismo completo. Para que ocurra esta respuesta adaptativa los hepatocitos proliferantes han de retener su función diferenciada e incluso incrementar su

capacidad funcional. Los factores de transcripción específicos del hígado actúan regulando la expresión de genes que codifican enzimas específicos (enzimas metabólicos) y proteínas segregadas específicas (albúmina). De esta manera, la respuesta adaptativa del hígado regenerante, que permite el mantenimiento de la homeostasis metabólica se alcanza por una interacción entre los factores de transcripción, que inducen el crecimiento y los factores de transcripción preexistentes específicos del hígado, que regulan las funciones diferenciadas de los hepatocitos.

Después de lesión hepática o situación de estrés, se expresan los genes gluconeogénicos y los de la respuesta de la fase aguda, para restaurar la homeostasis metabólica y limitar la lesión tisular. Los genes gluconeogénicos que codifican la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), se inducen, mientras que los genes que codifican proteínas que se oponen a la gluconeogénesis (glucoquinasa) se inhiben durante la regeneración hepática [48, 49]. Esto va en paralelo con cambios hormonales agudos que se verifican en hígado regenerante, cuando los niveles de insulina caen rápidamente y los de glucagón se elevan [50, 51]. La glucoquinasa se induce por la insulina y se inhibe por el glucagón; la PEPCK y la G6Pasa muestran una regulación opuesta.

Además, la regulación del gen que codifica la proteína 1 de unión al factor insulínico IGF, IGFBP1 (*IGF binding protein 1*), se altera notablemente por cambios en el estado metabólico y por hepatectomía, de forma análoga a los genes gluconeogénicos. El mRNA de la proteína IGFBP1 se induce más de cien veces en hígado en regeneración y también durante el ayuno y la deficiencia de insulina [52]. El gen que codifica IGFBP1 proporciona un medio apropiado para calcular el cambio transcripcional que conduce a la activación de los genes gluconeogénicos durante la regeneración. En hígado normal, el gen *IGFBP1* se regula en estado basal por el factor nuclear hepático endógeno (HNF1), un homeodominio que contiene el factor hepático de transcripción que juega un papel prominente en la regulación de muchos genes hepáticos. El nivel de HNF1 no cambia de forma apreciable durante la regeneración hepática.

La citoquina IL6 se requiere para la regeneración y reparación hepáticas y a nivel transcripcional regula, por mecanismos no del todo conocidos, una gran cantidad de genes durante el crecimiento hepático. Se ha demostrado que existe una intervención directa de la IL6 en la expresión de IGFBP1 ya que los niveles de esta proteína se elevan en transgénicos IL-6, después de la inyección de IL-6 a animales no ayunados, y disminu-

2. EL EXTRAORDINARIO FENÓMENO DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

yen en hígados IL-6^{-/-} posthepatectomía. Tanto en células hepáticas como en no hepáticas, la IL-6 media la activación del promotor del gen IGFBP1, vía un sitio de unión intacto DNA-HNF1 en el promotor (Figura 8) [53, 54]. La inducción, mediada por IL6, de la transcripción de IGFBP1 durante la regeneración hepática depende de la presencia del factor HNF1 y de los factores STAT3 y AP1 (*cfos/cjun*). IL6 actúa a través de la vía STAT3, porque se ha demostrado que el dominante negativo STAT3 bloquea completamente la estimulación mediada por IL6 del promotor IGFBP1 vía sitio HNF1. Los complejos proteicos HNF1/cfos y HNF1/STAT3 se han detectado en hígados de ratón y en células hepáticas y no hepáticas que sobreexpresan STAT/cfos/HNF1. Una regulación similar se observa usando promotores de la G6Pasa y α -fibrinógeno, lo que indica que la transactivación de la expresión de genes hepáticos mediada por HNF1/IL6/STAT3/AP1 es un fenómeno general después de la lesión. Estas evidencias muestran que las dos clases de factores de transcripción, los inductores del crecimiento (STAT3 y AP1) y los específicos del tejido (HNF1) pueden interactuar en una respuesta adaptativa a la lesión hepática para amplificar la expresión de genes hepáticos importantes para conseguir que se mantenga la homeostasis durante la reparación del órgano. Mediante estas vías, el hígado es capaz de mantener la función metabólica a pesar de la pérdida de los dos tercios de su masa funcional.

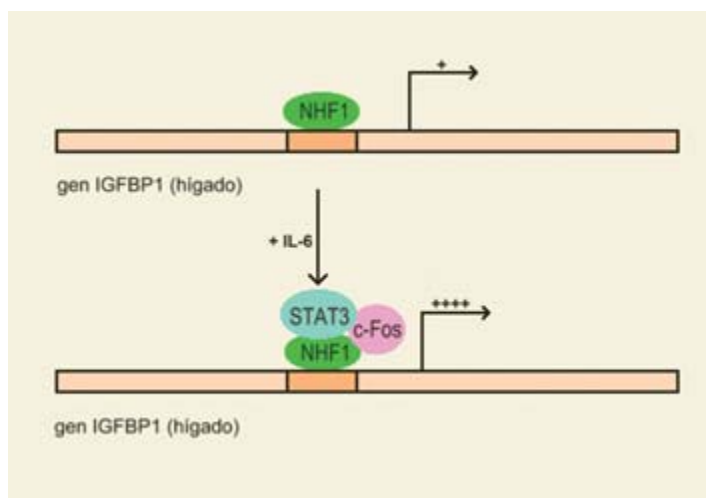


FIGURA 8. Modelo propuesto de interacción cooperativa entre un inductor del crecimiento STAT3 (transductor de señales y activador de la transcripción 3) y el factor nuclear hepático constitutivo HNF1, para regular el nivel de un gen específico hepático (IGFBP1) después de la hepatectomía parcial (Taub, 2003) [53].

Uno de los acontecimientos que se manifiestan inmediatamente después de la hepatectomía es que el receptor de la uroquinasa aparece en la membrana plasmática del hepatocito y la actividad de esta enzima se eleva [55]. La membrana plasmática del hepatocito se hiperpolariza a los 30 minutos de la hepatectomía y se observan grandes cambios morfológicos en el canalículo biliar a las cinco horas. Dentro de los 30 minutos se desencadena la inducción de varios genes nuevos que se denominan genes tempranos inmediatos [53]. Esta inducción es independiente de la síntesis de nuevas proteínas. La IGFBP1, una proteína plasmática ya citada anteriormente, que une IGF1 e IGFII, eleva hasta 100 veces su expresión original [52]. La activación del factor de transcripción STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) se verifica dentro de los 30 minutos, con un máximo a las tres horas que persiste más allá de las cinco horas. El factor nuclear κ B (NF κ B) aparece a los pocos minutos de la hepatectomía [56, 57]. NF κ B y STAT3 al ser activados por estímulos apropiados, se traslocan al núcleo. Muchos de los genes tempranos inmediatos contienen en sus regiones promotoras secuencias reactivas al NF κ B y STAT3. La actividad del factor de transcripción AP1 también se eleva rápidamente como resultado de la nueva síntesis de c-fos y c-jun. LRF-1, otra proteína cremallera de leucina, también se induce y participa en la formación de complejos con jun [58]. La activación de STAT3, NF κ B y AP1 parece que es la parte principal de la cascada intracelular señalizadora que conduce a la síntesis del DNA. La proteína C/EBP α (*CCAAT/enhancer-binding protein alfa*) disminuye, mientras que la C/EBP β se eleva. Otros factores de transcripción asociados al hígado tales como HNF1, HNF2 y HNF3, permanecen sin cambios.

Cambios similares en los factores de transcripción se observan en hepatocitos en cultivo que sufren la expansión clonal [59]. Algunos marcadores fetales aparecen en hígado en regeneración, idénticos a los expresados en hígado fetal. Estos incluyen la alfa fetoproteína, la hexoquinasa (como oposición a la glucoquinasa), e isoenzimas fetales de aldolasa, piruvato quinasa y otros. Otras proteínas relacionadas con el ciclo celular y síntesis del DNA (timidina quinasa), síntesis de la nueva cromatina (histona mRNA), ciclina y quinasas dependientes de ciclina (CDK) y expresión génica relacionada con el ciclo celular, sufren cambios como en otros sistemas de proliferación celular. Se presenta también una acumulación de triglicéridos en hepatocitos desde las 20 hasta las 72 horas de la hepatectomía, asociada con una marcada inducción de enzimas lipogénicos [60]. Todos estos parámetros retornan a la normalidad a los cinco-siete días después de la hepatectomía, que es cuando cesa la proliferación y se res-

taura la arquitectura hepática. De esta manera los hepatocitos se las arreglan para enfrentarse a la mitogénesis, a la vez que proporcionan las funciones diferenciadas a través de sutiles cambios en factores de transcripción asociados al hígado, marcada inducción de otras actividades del DNA asociadas a la mitogénesis y reversión temporal y parcial de un fenotipo casi fetal.

TERMINACIÓN DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

Después de la hepatectomía parcial, los hepatocitos proliferan y forman agrupaciones de 10 a 14 células [61]. Estas agrupaciones distorsionan la arquitectura del hígado normal y están carentes de matriz extracelular. Para restaurar la estructura normal tisular después de la hepatectomía parcial, unos cuatro días después, los lipocitos o células estrelladas comienzan a producir matriz extracelular, para restablecer la conexión entre los hepatocitos y el epitelio sinusoidal.

Algunas proteínas que están implicadas en la integridad estructural del hígado, son necesarias para la regeneración normal, y juegan un papel en la restauración de la arquitectura hepática. Por ejemplo, las deficiencias en conexina-32 [62] y queratina 8 [63] causan un prolongado daño hepático después de la hepatectomía parcial o lesión inducida por agentes químicos. La conexina-32, una de las proteínas de los intersticios de comunicación (*gap junctions*), se requiere también para la mitosis normal, ya que restablece las conexiones celulares durante la división celular. Deficiencias en ciertas proteasas, tales como las activadoras del plasminógeno, también ocasionan una prolongación en el daño hepático, dada su misión en la remodelación del hígado [64].

El tamaño del hígado se encuentra estrictamente regulado y controlado por las necesidades funcionales del organismo, pero las señales que determinan el tamaño del hígado y la finalización del proceso regenerativo están aún sin esclarecer. Sin embargo, existen evidencias experimentales que demuestran que la alteración de esta regulación puede repercutir en la masa hepática. Por ejemplo, la supresión del inhibidor de la CDK (CDKI), la proteína p27 origina un incremento del tamaño del órgano, mientras que la supresión de la ciclina D1 origina una reducción de dicho tamaño [65]. Además, la vía regenerativa posee otros puntos de control que indican la existencia de otros mecanismos reguladores.

Los supresores de la señalización mediada por las citoquinas (SOCS), como el nombre indica, son reguladores negativos importantes de la señalización, ya que previenen la fosforilación de las proteínas STAT3. SOCS interacciona directamente con las quinasas JAK fosforiladas y previene la activación del factor de transcripción STAT3. Se ha demostrado que la señalización mediada por la IL-6 en el hígado causa la activación rápida de SOCS3, lo que se relaciona con la consiguiente inhibición de STAT3 y la terminación de señal de IL-6 [66]. Esto explica por qué la sobreexpresión de IL-6 puede, a veces, inhibir el crecimiento celular y causar lesión hepática [67]. La notable capacidad de regulación de SOCS3 y otros inhibidores de citoquinas por la IL-6 puede bloquear sus propias señales o las de otras citoquinas. Sin embargo, las proteínas SOCS forman parte de un importante mecanismo que previene la señalización incontrolada mediada por citoquinas. Además, la IL-6, por sí misma, ejerce un papel en la finalización de la señal del HGF al inducir la síntesis del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI), el cual bloquea el procesamiento del pro-HGF en HGF activo [68].

Quizá los factores antiproliferativos mejor conocidos en el hígado son el TGF β y los miembros relacionados de la familia TGF β , tal como la activina [69]. El TGF β se produce principalmente por los lipocitos y la activación de su expresión conduce a la fibrosis hepática y a la apoptosis. Sin embargo, por razones inexplicables, los hepatocitos se hacen resistentes al TGF β y pueden proliferar en presencia de este factor durante la regeneración hepática [70]. Hace años se demostró que el incremento de noradrenalina en hígado en regeneración puede ayudar a proteger del TGF β [71]. La proteína TGF β se induce durante la regeneración hepática y su actividad puede ser examinada calculando la de SMAD que ocurre después de la del TGF β . Las proteínas señalizadoras SMAD que se activan por fosforilación están parcialmente activas en hígado en reposo, pero su actividad se eleva en el hígado regenerante. Es interesante destacar que los inhibidores de la vía TGF β -SMAD, SNON y SKI se activan también durante la regeneración, y especialmente SNON se induce principalmente en hepatocitos. SNON y SKI son represores transcripcionales que pueden hacer que algunas células se tornen resistentes al TGF β al unirse éste a SMAD. Los complejos entre SNON, SKI y el SMAD activo se detectan durante la fase proliferativa en hígado regenerante. Los complejos inhibidores disminuyen después de la restitución de la masa hepática, lo cual indica que SMAD persistentemente activo, participa en el retorno del hígado al estado quiescente una vez que ha finalizado la regeneración hepática. La inducción de SNON o SKI ofrece

una explicación potencial a la resistencia al TGF β durante la fase proliferativa de la regeneración hepática [72].

De igual manera, la activina es un agente apoptogénico de la familia del TGF β que bloquea la mitogénesis hepatocítica. La activina muestra actividad señalizadora disminuida durante la regeneración hepática, cuando la expresión de su receptor celular se reduce, pero el nivel del receptor se restaura una vez que finaliza la regeneración hepática [73]. La señalización inducida por el TGF β y la activina está controlada a otros niveles por factores extracelulares, tales como la folistatina, como también por vías señalizadoras intracelulares. La administración de folistatina bloquea la función de la activina, acelera la regeneración hepática e incrementa el tamaño del hígado [74].

PERSPECTIVAS FUTURAS

Se ha avanzado mucho en los últimos años en el conocimiento de los mecanismos implicados en el proceso de regeneración hepática. Este avance se ha basado en parte en el desarrollo de modelos de ingeniería genética en ratones en los cuales se han insertado o inactivado genes específicos. Hoy se sabe que los hepatocitos maduros poseen una asombrosa capacidad proliferativa y que tanto la proliferación como la apoptosis pueden ser desencadenadas por un solo agente, el TNF α . Sin embargo, quedan todavía muchas preguntas sin respuesta. Por ejemplo: la procedencia y los mecanismos que causan el incremento del TNF que inicia la proliferación, de qué manera puede estar el lipopolisacárido (LPS), implicado en esta inducción. Además, ¿por qué los hepatocitos se dividen una o dos veces y la regeneración termina en un determinado momento? Es necesario estudiar las conexiones entre la actividad metabólica hepática y la compleja cascada de activación genética necesaria para la síntesis del DNA. Podría ser que las especies reactivas de oxígeno liberadas por la elevada demanda metabólica de las mitocondrias de los hígados que han perdido un 70% de sus masas, funcionaran como conductoras de proceso mitogénico mediante la activación del NF κ B. En este caso la restauración de la masa hepática y la actividad metabólica normal eliminaría las señales necesarias para la proliferación.

La regeneración hepática presenta un gran interés por la posibilidad de su aplicación a la clínica. El trasplante de los hepatocitos puede ser de una gran utilidad en el tratamiento de enfermedad metabólica hepática y las

perspectivas son hoy mucho más alentadoras. Los hepatocitos en cultivo permanecen viables por largos períodos de tiempo y pueden ser inducidos a proliferar mediante la adición al medio de cultivo de factores del crecimiento. La infusión de factores del crecimiento, precedida por la administración intrahepática de TNF, podría incrementar notablemente el efecto de otros factores del crecimiento como el HGF, TNF α o EGF, especialmente en casos de trasplante de hígados pequeños o trozos pequeños de hígado y en casos de lesión masiva aguda inducida por hepatotóxicos.

ABREVIATURAS

AP1, factor de transcripción heterodimérico formado por las proteínas Fos y Jun; C/EBP, proteína que intensifica la unión a CCAAT; G6Pasa, glucosa-6-fosfatasa; HNF, factor de transcripción nuclear hepático; IGF, factor de crecimiento insulínico; IGFBP, proteína de unión al IGF; LPS, lipopolisacárido; PAI, proteína inhibidora de la activación del plasminógeno; PEPCK, fosfoenol piruvato carboxiquinasa; SMAD, proteínas señalizadoras que se activan, por fosforilación por receptores serina-treonina quinasas, activados, a su vez, por unión con un ligando TGF β o BMP; SNON y SKI, inhibidores de la vía TGF β /SMAD; STAT, transductor de señales y activador de la transcripción; TGF β , factor transformante del crecimiento beta.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cascales, M., y Martín Sanz, P. (1990): Regeneración Hepática. En *Hepato-logía. Nuevas Tendencias* (Editores: Cascales, M. y Rodés, J.) CSIC. Madrid, pp. 107-127.
2. Cascales Angosto, M. (1994): Regeneración hepática post-necrótica y hepatocarcinogenesis. En *Proliferación celular y cáncer*. Editores: Cascales, M. y Villanueva, J. R. Real Academia de Farmacia y Fund. Cien. Asoc. Española Contra el Cáncer. Madrid, pp. 345-378.
3. Cascales (2001): Regeneración hepática, en *Mecanismos de hepatotoxicidad*. Real Academia de Doctores. Madrid, pp. 215-251.
4. Moolten, F. L., Bucher, N. L. (1967): Regeneration of rat liver: transfer of humoral agent by cross circulation. *Science* **158**, 272-274.
5. Fisher, B.; Szuch, P.; Levine, M., Fisher, E. R. (1971): A portal blood factor as the humoral agent in liver regeneration. *Science* **171**, 575-577.

2. EL EXTRAORDINARIO FENÓMENO DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

6. Van Thiel, D. H.; Gavalier, J. S., Kam, I., *et al.* (1987): Rapid growth of an intact human liver transplanted into a recipient larger than the donor. *Gastroenterology* **93**, 414-1419.
7. Francavilla, A.; Zeng, Q., Polimeno, L., *et al.* (1994): Small-for-size liver transplanted into larger recipient: a model of hepatic regeneration. *Hepatology* **19**, 210-216.
8. Zimmers, T. A.; Davies, M. V., Koniaris, L. G., *et al.* (2002): Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* **296**, 1486-1488.
9. Tsubouchi, H.; Niitani, Y., Hirano, S., *et al.* (1991): Levels of the human hepatocyte growth factor in serum of patients with various liver diseases determined by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Hepatology* **13**, 1-5.
10. Weglarz, T. C., Sandgren, E. P. (2000): Timing of hepatocyte entry into DNA synthesis after partial hepatectomy is cell autonomous. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 12595-12600.
11. Choti, M. A.; Sitzmann, J. V., Tiburi, M. F., *et al.* (2002): Trends in long-term survival following liver resection for hepatic colorectal metastases. *Ann Surg* **235**, 759-766.
12. Behrns, K. E.; Tsiotos, G. G., DeSouza, N. F., *et al.* (1998): Hepatic steatosis as a potential risk factor for major hepatic resection. *J Gastrointest Surg* **2**, 292-298.
13. Das, B. C.; Isaji, S., Kawarada, Y. (2001): Analysis of 100 consecutive hepatectomies: risk factors in patients with liver cirrhosis or obstructive jaundice. *World J Surg* **25**, 266- 272; discussion 272-263.
14. Reuben, A. (2004): Prometheus and Pandora. *Hepatology* **39**, 1460-1463.
15. Pontfick, V. A. (1890): Ueber leberresection und leberreaction. *Verhandl Deutsch. Gessellsch Chir* **19**, 28. Koniaris, L. G.; McKillop, I. H.; Schwartz, S. I. & Zimmers, T. A. Liver regeneration. *J. Am. Coll. Surg.* **197**, 634-659 (2003).
16. Fausto, N. (2000): Liver regeneration. *J Hepatol* **32**, suppl. 1, 19-31.
17. Michalopoulos, G. K., y DeFrances, M. C. (1997): Liver regeneration. *Science* **276**, 60-66.
18. Higgins, G. M., y Anderson, R. M. (1931): Experimental pathology of the liver. I. Restoration of liver of white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol Lab Med* **12**, 186-202.
19. Sanz, N.; Díez-Fernández, C.; Fernández-Simón, L.; Álvarez, A. y Cascales, M. C. (1998): Necrogenic and regenerative responses of liver of newly weaned rats against a sublethal dose of thioacetamide. *Biochim Biophys Acta* **1384**, 66-78.

20. Sandgren, E. P.; Palmiter, R. D.; Heckel, J. L., Daugherty, C. C., *et al.* (1991): Complete Hepatic Regeneration after Somatic Deletion of an Albumin-Plasminogen Activator Transgene. *Cell* **66**, 245-256.
21. Overturf, K.; Al-Dhalimy, M.; Tanguay, R., Brantly, M., *et al.* (1996): Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinemia type I. *Nat Gen* **12**, 266-273.
22. Overturf, K.; Al-Dhalimy, M.; Ou, C. M.; Finegold, M., y Grompe, M. (1997): Serial transplantation reveals the stem-cell like regenerative potencial of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol* **151**, 1273-1280.
23. Rudolf, K. L.; Chang, S., Millard, M. *et al.* (2000): Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science* **287**, 1253-1258.
24. Petersen, B. E. (1999): Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* **284**, 1168-1170.
25. Grompe, M.; Lindstedt, S.; Al-Dhalimy, M., Kennaway, N. G., *et al.* (1995): Pharmacological correction of neonatal lethal hepatic dysfunction in a murine model of hereditary tyrosinemia type I. *Nat Gen* **10**, 453-460.
26. Michalopoulos, G. K. (1990): Liver Regeneration: Molecular Mechanisms of Growth Control. *FASEB J.* **4**, 176-187.
27. Fausto, N. (2004): Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* **39**, 1477-1487.
28. Mehendale, H. M. (1991): Role of hepatocellular regeneration and hepatolobular healing in the final outcome of liver injury. *Biochem. Pharmacol.* **42**, 1155-1162.
29. Mangipudy, R. S., Chanda, S. y Mehendale, H. M. (1995): Tissue repair response as a function of dose in thioacetamide hepatotoxicity. *Environmental health perspectives*, **103**, 260-267.
30. Abraham, E. H.; Pratt, A. G.; Gerweck, L., Seneveratne, T., *et al.* (1993): The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel. *Proc Natl Acad Sci (USA)* **90**, 312-316.
31. Sarrión, D. (1997): Alteración en los parámetros de lesión y regeneración hepáticas inducidas por administración de tioacetamida a ratas pretratadas con fenobarbital. Tesis Doctoral Universidad Complutense. Madrid (dirigida por M. Cascales).
32. Andrés, D.; Sarrión, D.; Zaragoza, A.; Bautista, M. y Cascales, M. (2005): Phenobarbital pre-treatment increases thioacetamide induced necrosis and post-necrotic regeneration in rats. *Anal Real Acad Farm* **71**, 635-657.

2. EL EXTRAORDINARIO FENÓMENO DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

33. Zaragoza, A.; Díez-Fernández, C.; Andrés, D., y Cascales, M. (2000): Potentiation of thioacetamide hepatotoxicity by phenobarbital-pretreatment in rats. Inducibility of FAD monooxygenase and age effect. *Chem Biol Interact* **124**, 87-101.
34. Díez-Fernández, C.; Sanz, N.; Álvarez, A.; Wolf, A. y Cascales, M. (1998): The effect of non-genotoxic carcinogens, phenobarbital and clofibrate on the relationship between reactive oxygen species, antioxidant-enzymes expression and apoptosis. *Carcinogenesis* **19**, 715-722.
35. Cascales, M.; Álvarez, A.; Gascó, P., Fernández-Simón, L., *et al.* (1994): Cocaine-induced liver injury in mice elicits specific changes in DNA ploidy and induces programmed death of hepatocytes. *Hepatology* **20**, 992-1001.
36. Kayano, K.; Mitsuru, Y.; Kubota, M., Takenaka, K., *et al.* (1992): Detection of proliferating hepatocytes by immunohistochemical staining for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in patients with acute hepatic failure. *Liver* **12**, 132-136.
37. Fausto, N. (2000): Liver regeneration. *J Hepatol* **32 (suppl 1)**, 19-31.
38. Helin, K. (1998): Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factor. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 28-35.
39. Pines, J. (1995): Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J* **308**, 697-711.
40. Morgan, D. O. (1995): Principles of CDK regulation. *Nature (Lond)* **374**, 131-134.
41. Albrecht, J. H., y Hansen, L. K. (1999): Cyclin D1 promotes mitogen-independent cell cycle progression in hepatocytes. *Cell Growth & Differ* **10**, 397-404.
42. Gascó, P.; Fernández-Simón, L.; Díez-Fernández, C.; Sanz, N. y Cascales, M. (1993): Hepatotoxicidad de la cocaína. Parámetros bioquímicos y morfológicos de lesión hepatocelular en ratón. *Rev Toxicol* **11**, 105-111.
43. Díez-Fernández, C.; Boscá, L.; Fernández-Simón, L.; Álvarez, A., y Cascales, M. (1993): Relationship between genomic DNA and parameters of liver damage during necrosis and regeneration-induced by thioacetamide. *Hepatology* **24**, 460-467.
44. Vindelov, L. L.; Christensen, I. J., y Nissen, N. I. (1983): A detergent trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric. *Cytometry* **3**, 323-327.
45. Andrés, D.; Sarrión, D.; Zaragoza, A.; Bautista, M., y Cascales, M. (2005): Phenobarbital pre-treatment increases thioacetamide induced necrosis and post-necrotic regeneration in rats. *Anal Real Acad Farm* **71**, 635-657.

46. Díez-Fernández, C.; Álvarez, A., y Cascales, M. (1992): Post-necrótic liver regeneration: flow cytometric análisis of physical properties and DNA content. *Anal Real Acad Farm* **58**, 317-325.
47. Haber, B. A.; Chin, S.; Chuang, E., y Taub, R. (1995): High levels of glucose-6-phosphatase gene and protein expression in proliferating liver and diabetes. *J Clin Invest* **95**, 832-841.
48. Haber, B. A.; Chin, S.; Chuang, E. y Taub (1995): High levels of glucose-6-phosphatase gene and protein expression in proliferating liver and diabetes. *J Clin Invest* **95**, 832-841.
49. Mohn, K. L.; Laz, T. M.; Melby, A. E., y Taub, R. (1990): Immediate-early gene expression differs between regenerating liver, insulin stimulated H-35 cells and mitogen-stimulated 3T3 cells; liver specific induction patterns of gene 33, PEPCK and the jun, fos and erk families. *J Biol Chem* **265**, 21914-21921.
50. Rosa, J. L.; Bartrons, R., y Tauler, A. (1992): Gene Expression of regulatory enzymes of glycolysis/gluconeogenesis in regenerating rat liver. *Biochem J* **287**, 113-116.
51. Bucher, N. L. R., y Swaffield, M. N. (1975): Regulation of hepatic regeneration in rats by synergistic action of insulin and glucagon. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**, 1157-1160.
52. Mohn, K. L.; Melby, A. E.; Tewari, D. S.; Laz, T. M., y Taub, R. (1991): The gene encoding rat insulin like growth factor binding protein 1 is rapidly and highly induced in regenerating liver. *Mol Cell Biol* **11**, 1393-1401.
53. Taub, R. (2003): Hepatic regeneration. En: *Hepatology* (Eds. Zakim, D., y Boyer, T.), pp. 31-48. Elsevier.
54. Leu, J. I.; Crissey, M. A.; Leu, J. P.; Filiberto, G., y Taub, R. (2001): Interleukin-6-induced STAT3 and AP1 amplify hepatocyte nuclear factor 1-mediated transactivation of hepatic genes, an adaptative response to liver injury. *Mol Cell Biol* **21**, 414-424.
55. Mars, W. M.; Kim, T. H.; Stolz, D. B.; Liu, M. L., Michalopoulos, G. K. (1996): Presence of urokinase in serum-free primary rat hepatocyte cultures and its role in activating hepatocyte growth factor *Cancer Res* **56**, 2837-2843.
56. Cressman, D. E.; Greenbaum, L. E.; Haber, B. A., y Taub, R. (1994): Rapid activation of post-hepatectomy factor/nuclear factor kappa B in hepatocytes, a primary response in the regenerating liver. *J Biol Chem* **269**, 30429-30445.
57. Cressman, D. E.; Diamond, R. H., y Taub, R. (1995): Rapid activation of STAT3 DNA binding in liver regeneration. *Hepatology* **21**, 1443-1449.

58. Hsu, J. C.; Laz, T.; Mohn, K. L., y Taub, R. (1991): Identification of LRF-1, a leucine-zipper protein that is rapidly and highly induced in regenerating liver. *Proc Natl Acad Sci USA*. **88**, 3511-3515.
59. Block, G. D.; Locker, J.; Bowen, W. C.; Petersen, B. E.; Katval, S.; Strom, S. C.; Riley, T.; Howard, T. A., y Michalopoulos, G. K. (1996): 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* **132**, 1133-1149.
60. Delahunty, T. J., y Rubinstein, D. (1970): Accumulation and release of triglycerides by rat liver following partial hepatectomy. *J Lipid Res* **11**, 536-543.
61. Martínez-Hernández, A., y Amenta, P. S. (1995): The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J* **8**, 1401-1410.
62. Temme, A.; Ott, T.; Dombrowski, F., y Willecke, K. (2000): The extent of synchronous initiation and termination of DNA synthesis in regenerating mouse liver is dependent on connexin-32 expressing gap junctions. *J Hepatol* **32**, 627-635.
63. Mastellos, D.; Papadimitriou, J. C.; Franchini, S.; Tsonis, P. A., y Lambris, J. D. (2001): A novel role of complement: mice deficient in the fifth component of complement (C5) exhibit impaired liver regeneration. *J Immunol* **166**, 2479-2486.
64. Becerra *et al.* (2001): Plasminogen activators direct the reorganization of the liver lobule after acute injury *Am J Pathol* **158**, 921-929.
65. Nelsen, C. J.; Rickheim, D. G.; Tucker, M. M.; Hansen, L. K., y Albrecht, J. H. (2003): Evidence that cyclin D1 mediates both growth and proliferation downstream of TOR in hepatocytes. *J Biol Chem* **278**, 3656-3663.
66. Campbell, J. S., *et al.* (2001): Expression of suppressors of cytokine signalling during liver regeneration. *J Clin Invest* **107**, 1285-1292.
67. Wustefeld, T., *et al.* (2000): Hyperstimulation with interleukin-6 inhibits cell cycle progression after hepatectomy in mice. *Hepatology* **32**, 514-522.
68. Shimizu, M. *et al.* (2001): Mechanism of retarded liver regeneration in plasminogen activator-deficient mice: impaired activation of hepatocyte growth factor after Fas-mediated massive hepatic apoptosis. *Hepatology* **33**, 569-576.
69. Derynck, R., y Zhang, Y. E. (2003): Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature* **425**, 577-583.
70. Koniaris, L. G.; McKillop, I. H.; Schwartz, S. I., y Zimmers, T. A. (2003): Liver regeneration. *J Am Coll Surg* **197**, 634-659.

71. Houck, K. A.; Cruise, J. L., y Michalopoulos, G. K. (1998): Norepinephrine modulates the growth-inhibitory effect of transforming growth factor- β in primary hepatocyte cultures. *J. Cell Physiol.* 135, 551-555.
72. Macias-Silva, M.; Li, W.; Leu, J. I.; Crissey, M. A., y Taub, R. (2002): Up-regulated transcriptional repressors Snon and Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor- β signals during liver regeneration. *J Biol Chem* **277**, 28483-28490.
73. Date, M., *et al.* (2000): Differential regulation of activin A for hepatocyte growth and fibronectin synthesis in rat liver injury. *J Hepatol* **32**, 251-260.
74. Takabe, K., *et al.* (2003): Adenovirus-mediated overexpression of follistatin enlarges intact liver of adult rats. *Hepatology* **38**, 1107-1115.

3. Matriz extracelular y proteasas

INTRODUCCIÓN

El concepto clásico que consideraba a la matriz extracelular como una estructura inerte con la única misión de servir de soporte para que las células descansasen confortablemente mientras realizaban sus funciones, ha sido en la actualidad completamente superado. Hoy este concepto ha cambiado, y se ha llegado a la conclusión que la matriz extracelular es una estructura «viva» en la que sus componentes o los productos de su degradación ejercen funciones importantes, ya que muchos de ellos son capaces de actuar como señalizadores a través de receptores específicos de la membrana plasmática. A su vez, las células que se encuentran en contacto, modulan sus respuestas a los componentes de la matriz extracelular, mediante la regulación de genes que codifican la expresión de receptores a los cuales se unen los componentes de dicha matriz. Las moléculas de la matriz extracelular son polivalentes y poseen múltiples dominios que les permiten interactuar con muy variadas estructuras de la superficie celular o de la propia matriz. El entramado así formado juega un papel fundamental en la organización y función de cada órgano y tejido y actúa a modo de radar sensible que mantiene a las células informadas de lo que ocurre en cada microambiente [1, 2].

La matriz extracelular hepática es una red estructural compleja formada por macromoléculas, que rodea las células del estroma sobre el que descansan la mayoría de las células endoteliales y epiteliales. La matriz no es sólo un esqueleto físico, sino que es también un modulador crucial de los procesos biológicos entre los que se incluyen la inserción celular, el desarrollo hepático, la regeneración e incluso el mantenimiento de la arquitectura normal y el estado diferenciado. La matriz extracelular modula estos fenómenos actuando a distintos niveles: como agonista de fase sólida, como polipéptidos que interactúan con receptores de la superficie celular y en su papel de secuestrar y liberar citoquinas.

La regeneración hepática es un fenómeno biológico notable, que permite al hígado, después de sufrir lesiones agudas que implican pérdida de sus propias células (tratamiento con CCl_4 , tioacetamida o hepatectomía parcial), restaurar su masa y su función. Aunque se han identificado muchos factores del crecimiento y citoquinas como participantes importantes en la iniciación de la regeneración hepática, el papel de la matriz extracelular está siendo actualmente objeto de numerosas investigaciones que tratan de profundizar en el grado de contribución que juega esta matriz en la proliferación de los hepatocitos durante las etapas más tempranas de la regeneración hepática. Con animales manipulados genéticamente se ha conseguido identificar una serie de factores que son cruciales para la regeneración. La regeneración se verifica mediante la proliferación de los hepatocitos maduros diferenciados que han adquirido la capacidad de proliferar por la acción de citoquinas y factores de crecimiento y proteasas extracelulares, que intervienen en el procesamiento de estos factores. Las proteasas liberan citoquinas y factores de crecimiento que están anclados en la matriz extracelular del hígado y requieren ser procesados para su bioactividad. Las señales que gobiernan la finalización de la proliferación hepatocelular están reguladas por serina proteasas y metaloproteasas que proporcionan una interfase entre la cascada proteolítica y la señalización intracelular durante la división de los hepatocitos.

DEGRADACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

Durante la regeneración hepática, la degradación de la matriz extracelular primero y su síntesis después, juegan un papel fundamental en el restablecimiento del fenotipo quiescente y diferenciado de los hepatocitos. Se ha observado que la matriz extracelular modula el fenotipo de los hepatocitos y la adquisición y mantenimiento del estado quiescente, que se basa, en gran parte, en la interacción célula-matriz extracelular. Aunque la regulación de dicha matriz es hoy objeto de numerosos estudios, se sabe que la iniciación de su síntesis se relaciona con punto de máxima expresión del mRNA $\text{TGF}\beta$, el cual es en sí mismo un fuerte estimulador de la síntesis del colágeno. Son diversos los mecanismos que controlan la síntesis y degradación de la matriz extracelular. La degradación está mediada principalmente por las metaloproteinasas, un grupo de proteasas que requieren iones cinc para su actividad [2].

La matriz extracelular en hígado sometido a hepatectomía parcial sufre una rápida reorganización de todos sus componentes. Se ha observado que

este fenómeno es de suma importancia para la proliferación de los hepatocitos en las etapas iniciales de la regeneración hepática. En esta reorganización juega un importante papel el factor del crecimiento de los hepatocitos (HGF), generado por los lipocitos y secuestrado en la matriz extracelular. Este factor pasa de su forma inactiva pro-HGF a su forma activa HGF, por acción de una proteasa, la uroquinasa activadora del plasminógeno (uPA). Se ha demostrado que la infusión de HGF en hígado de rata normal estimula la proliferación sólo en los hepatocitos periportales, sin embargo, cuando el hígado se trata con colagenasa antes de la infusión de HGF, la síntesis del DNA se eleva de manera notable en todas las áreas del lóbulo. Estas evidencias llevan a la conclusión que la degradación de la matriz extracelular combinada con la activación del HGF en las etapas iniciales de la regeneración hepática es la que desencadena la proliferación de los hepatocitos [3-4].

COMPOSICIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR HEPÁTICA

La composición y distribución de la matriz extracelular en la cápsula hepática, en los principales *septa* y en los espacios porta, es similar a la de otros órganos glandulares [5]. Las características especiales de la matriz extracelular del lóbulo hepático la sitúa en un lugar aparte de otros intersticios. Entre las membranas celulares del endotelio fenestrado y los hepatocitos existe un espacio pequeño, el espacio de Disse (Figura 1), también denominado espacio perisinusoidal. El espacio de Disse es equivalente a los intersticios de otros órganos (espacio entre la membrana basamento capilar y la membrana base del parénquima). Entre los principales grupos que construyen los bloques de la matriz extracelular están los colágenos, la elastina, glicoproteínas estructurales y proteoglicanos. En muchos casos, aunque los mismos componentes individuales estén presentes, diferentes concentraciones y asociaciones de estos componentes, originan una única matriz extracelular construida a medida de las necesidades fisiológicas de un órgano o tejido. Un ejemplo de la plasticidad de la matriz extracelular son las membranas base. Estas estructuras tienen al menos cuatro componentes: laminina, entactina, colágeno tipo IV y perlecan. Sin embargo, existen seis cadenas de laminina (de las cuales sólo tres son necesarias para formar una molécula de laminina) y seis tipos de cadenas de colágeno tipo IV (de los cuales sólo tres son necesarias para formar una molécula de colágeno) y proporciones diferentes de estos componentes pueden crear una membrana basal con diferentes propiedades.

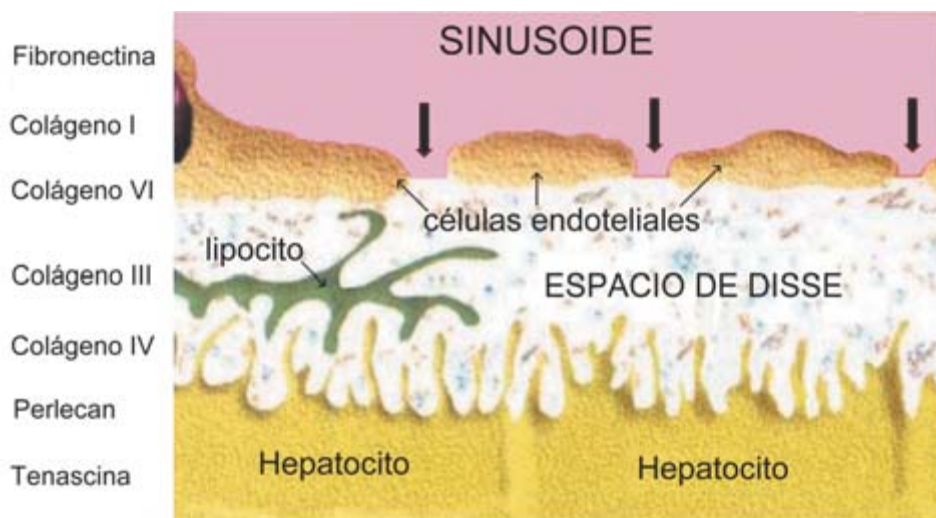


FIGURA 1. *Espacio de Disse en hígado normal. Este pequeño espacio está situado entre las membranas celulares de las células endoteliales y los hepatocitos y representa el intersticio hepático. Las células endoteliales dejan entre ellas abundantes fenestras y carecen de membrana basal. Ocasionalmente se encuentran lipocitos entre los hepatocitos y el endotelio. Una característica del espacio de Disse es carecer de barreras continuas entre el plasma y los hepatocito (Martínez-Hernández y Amenta, 1995) [2].*

La matriz extracelular en hígado, modula no sólo la regeneración hepática, sino también el mantenimiento de la arquitectura normal del hígado y el estado diferenciado de los diversos tipos celulares. En presencia del marco de la matriz intacto, la proliferación de las células hepáticas procede de manera ordenada, que en sus últimas causas ha de establecer una correcta proporción entre células y matriz. Durante los primeros días después de la hepatectomía, la proporción matriz/células disminuye y se forman grupos de hepatocitos en replicación que no están en contacto con los sinusoides. Más tarde, se van formando sinusoides entre los nuevos hepatocitos, restaurándose la arquitectura normal de las placas celulares. Las cadenas de laminina secretadas por los lipocitos van señalizando la vascularización con sinusoides fenestrados entre los grupos hepatocitos neoformados. Mediante un estricto equilibrio entre la proliferación celular y la deposición de la matriz extracelular, el hígado reconstituye con éxito la pérdida de su propia masa. El diálogo puede estar mediado por factores difusibles autocrinos y paracrinos y por elementos de la matriz extracelular, que sirven también se sitio de almacenaje de estos factores. La fiel restauración de la microarquitectura hepática es una de las características

clave que distingue la regeneración hepática después de una lesión aguda de aquella en casos de lesión crónica.

Como consecuencia de la proliferación de los hepatocitos después de la hepatectomía parcial, se forman grupos de células, que contienen de 10-14 hepatocitos, que no tienen acceso a los espacios vasculares. Cuatro días después de la hepatectomía los lipocitos emiten protuberancias entre los hepatocitos de los agrupamientos. Esta invasión de los grupos coincide con la activación en los lipocitos de la expresión genes que codifican varias cadenas de laminina. La penetración de las protuberancias de los lipocitos entre los grupos de los hepatocitos recién divididos, va unida a la aparición de células endoteliales fenestradas, restaurándose de esta manera la proporción normal del sistema vascular. Tan pronto como se restablece la estructura vascular, los genes que codifican la laminina se inactivan. Esta serie de acontecimientos es similar a la que se verifica durante la hepatogénesis cuando los capilares se van convirtiendo en sinusoides. La similitud entre hepatogénesis y regeneración sugiere que las cadenas de laminina secretadas pueden servir de señal para la vascularización de los grupos de hepatocitos recién formados, por los fenestrados sinusoides. La vascularización de estos grupos de hepatocitos contrasta con la relativa a la de los nódulos cirróticos. En este último caso se segrega entactina y probablemente cadenas de laminina, siendo el resultado final la formación de membranas basales y capilares continuos en lugar de sinusoides fenestrados. Se cree que la entactina y las cadenas específicas de laminina juegan un papel importante en la determinación de la superación de la lesión hepática. La definición de los papeles de la entactina y las cadenas de laminina en la vascularización y modulación del fenotipo endotelial, no sólo ha de ayudar a esclarecer muchos aspectos de la regeneración, sino también puede proporcionar mayor conocimiento de los mecanismos implicados en la cirrosis y su posible terapéutica. Un proceso complejo tal como la regeneración hepática presenta múltiples etapas e implica un gran número de señales: ciclinas, protooncogenes, citoquinas, inhibidores, estimuladores e interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular [2, 3].

La matriz extracelular está compuesta por diferentes macromoléculas, entre las que se encuentran las siguientes: fibronectina, colágeno, laminina, vitronectina y proteoglicanos. Las funciones de la matriz extracelular son, además de actuar como soporte físico para las células epiteliales y endoteliales, modular la diferenciación celular, la migración, el crecimiento y la apoptosis. La matriz extracelular del hígado es distinta a la de otros órganos [2], ya que en esos otros órganos, el intersticio actúa como una

barrera de difusión entre el plasma y las células epiteliales y contiene una membrana basal, mientras que en el hígado, la matriz se encuentra en el espacio de Disse o espacio perisinusoidal, espacio entre los hepatocitos y las células endoteliales sinusoidales que carece de una membrana basal verdadera. Se considera que esta disposición facilita el máximo intercambio entre la sangre circulante y los hepatocitos. El espacio de Disse está compuesto por haces de colágeno (tipo I, III y IV), fibronectina, laminina, entactina y perlecan. La proteína más abundante en el espacio perisinusoidal es la fibronectina, que existe en forma soluble en el plasma circulante y en forma insoluble en la matriz extracelular. La fuente principal de la fibronectina circulante del plasma son los hepatocitos y aunque la mayor parte de la fibronectina producida durante la regeneración hepática es la plasmática, los hepatocitos son también capaces de producir fibronectina celular durante la regeneración. Por otro lado, la laminina que consiste en tres cadenas distintas, se detecta normalmente en el espacio perisinusoidal, en los grandes vasos sanguíneos y en los conductos biliares. Estas subunidades de laminina se expresan en hígado normal y en hígado en regeneración.

Los componentes de la matriz extracelular, fibronectina y laminina interaccionan con las células mediante receptores integrina heterodiméricos de la superficie celular, una familia de proteínas transmembrana compuesta por cadenas α y β . El heterodímero integrina $\alpha_5\beta_1$ se une predominantemente a la fibronectina, mientras que el heterodímero integrina $\alpha_v\beta_3$ se une a la vitronectina. Sin embargo, la capacidad de unión de los heterodímeros integrina a los diversos componentes de la matriz extracelular es redundante, ya que la mayoría de las integrinas son capaces de unirse a los diferentes componentes de la matriz extracelular [2, 3].

La estrecha relación observada entre el *status* de la matriz extracelular y la capacidad de los hepatocitos para proliferar está ligada a la diferenciación celular. Durante las rondas de proliferación los hepatocitos preservan sus características morfológicas y funcionales manteniendo su polo biliar. La estabilidad de diferenciación a largo término depende de la regulación coordinada de la expresión génica específica del tejido, de la organización proteica del citoesqueleto y de la deposición de la matriz extracelular.

COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

La matriz extracelular está compuesta principalmente por tres clases de biomoléculas: proteínas estructurales, colágenos y elastina; proteínas específicas no colágeno, fibronectinas y proteoglicanos.

Proteínas estructurales

Colágenos

El colágeno es la proteína más abundante en los vertebrados. Se han identificado 19 tipos diferentes, productos de más de 30 genes [6]. Todos los tipos de colágeno tienen características comunes en su composición química, plegado helicoidal y propiedades estructurales. Todos contienen tres cadenas polipeptídicas alfa, con repeticiones de aminoácidos Gli-X-Y (X = prolina; Y = OH-prolina), que forman hélices dextogiras de poliprolina. Las tres cadenas alfa, a su vez, forman una molécula triple helicoidal levogira, que es el dominio colagenoso. Los colágenos se han subclasificado en base a su organización supramolecular o a su peso molecular, como sigue: fibrilar, asociado a fibrillas, formador de redes, filamentoso, cadena corta y cadena larga. Los del tipo I, III, V, y VI están presentes en la capa de tejido conjuntivo que descansa debajo de la membrana basal mesotelial, que contiene los componentes típicos de la membrana basal. La matriz capsular impregna el tejido lobular y está en directa continuidad con la matriz extracelular en los septa, espacios portales, lóbulos y venas centrales. De esta manera la matriz de colágeno sirve como esqueleto que soporta el parénquima y mantiene la integridad hepática. Se detectan haces de colágeno tipo I como estructura principal de este esqueleto a la cual se insertan otros tipos de colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos. A su vez, las células se insertan a estos otros componentes de la matriz extracelular, de manera que la matriz extracelular forma una estructura integrada. En el espacio de Disse normal se encuentran pequeños haces de colágeno tipo I y fibras de colágeno tipos III y VI y también algo del tipo V [8]. El colágeno tipo V es más abundante en las proximidades de las triadas porta y las venas centrales. La capacidad de estos tipos de colágeno para interaccionar entre ellos mismos es crítica para la formación del esqueleto.

Elastina

La elastina es una proteína hidrofóbica, insoluble no glicosilada, que forma el núcleo central de fibras elásticas cuya vaina externa es una red microfibrilar que contiene fibrilina y otras proteínas [8]. En el hígado la elastina está restringida al tejido conjuntivo subcapsular, regiones porta y paredes arteriales. La elastina no juega un papel destacado en la regeneración.

Proteínas específicas, glicoproteínas no colágeno

Las glicoproteínas no colágeno ejercen su papel principal en la adhesión celular, como ligandos de la matriz celular y como agonistas de la fase sólida. Comparten dominios del factor de crecimiento epidérmico (EGF), capacidad formadora de polímeros y secuencias de aminoácidos específicas que interaccionan con los receptores integrinas [9, 10]. Además de los dos componentes de la membrana basal, laminina y entactina, la fibronectina y la tenascina son los componentes glicoproteicos de la matriz extracelular hepática.

Fibronectinas

Las fibronectinas existen como dos formas química e inmunológicamente distintas: soluble (plasma, CSF, y orina) e insoluble (celular o tisular). Están formadas por dos cadenas polipeptídicas de 250 kDa, conectadas por puentes disulfuro en el terminal carboxílico. Se unen e interaccionan con un número de macromoléculas, bacterias y otros componentes de la matriz extracelular, y con las células vía dominios específicos globulares [11, 12]. Las fibronectinas son ubicuas en la matriz extracelular donde forman filamentos finos o depósitos granulares. A menudo se las encuentra cubriendo la superficie de fibras de colágeno y aparecen adyacentes a la membrana basal [13]. Prevalcen en la matriz extracelular hepática donde se encuentran en el tejido conjuntivo subcapsular, septa, área portal, rodeando las células intersticiales y recubriendo las fibras de colágeno. Son el componente más abundante de la matriz extracelular en el espacio de Disse [10]. Los hepatocitos son la fuente de la fibronectina plasmática circulante, y es probable que las células endoteliales, los lipocitos y los hepatocitos contribuyan a los depósitos celulares de fibronectina.

Tenascina

La tenascina, citotactina II o hexabranhion, es una glicoproteína en forma de araña con seis brazos de 1,9 kDa cada uno. Las subunidades son similares y están unidas por enlaces disulfuro y por el terminal amino, formando un dominio globular central. La tenascina tiene capacidad tanto de unirse a las células como de inhibir tal unión. Se une a la fibronectina y a algunos proteoglicanos, está presente en la matriz capsular y no prevalece en el espacio de Disse, donde aparece sólo adyacente a las regiones portal y venosa [14].

Proteoglicanos

Los proteoglicanos son un grupo heterogéneo de moléculas que contienen un número variable de cadenas laterales de glicosaminoglicano (GAG), unidas covalentemente a una proteína núcleo. Se encuentran en el espacio extracelular sobre la superficie celular y en el espacio intracelular [15]. Aunque las respectivas proteínas que forman el núcleo son producto de genes únicos, los GAG son a menudo los mismos y en el pasado impartieron su nombre al proteoglicano. Así, el proteoglicano principal del cartílago se denominó condroitin sulfato, sin embargo, cuando el mismo GAG está presente sobre diferentes proteínas núcleo, un modificador tal como «superficie celular» o «membrana» se basa hoy en su única proteína núcleo, morfología, distribución y funciones. Por ejemplo, el proteoglicano heparán sulfato de la superficie celular (HSPG) se denomina sindecano (del griego «sindein» unir, juntos), porque conecta las células a la matriz extracelular, y el BM-HSPG se denomina perlecan, debido a sus dominios globulares que les hace tener la apariencia de collar de perlas.

Los GAG son heteropolisacáridos lineales con una repetición de disacárido. El último contiene un aminoazúcar con D-glucosamina o galactosamina y ácidos glucurónico o idurónico, que se unen a N- u O. Los glicosaminoglicanos incluyen: condroitin sulfato, dermatan sulfato, heparan sulfato, queratan sulfato, ácido hialurónico y heparina. Todos ellos, excepto la heparina y el ácido hialurónico, se unen a las proteínas núcleo, formando proteoglicanos. Los proteoglicanos prevalecen en hígado, pero su caracterización y distribución no está tan bien definida como otros componentes de la matriz. Se sabe que el sindecan se intercala en la zona sinusoidal de la membrana celular del hepatocito [15], y el perlecan se sitúa en el espacio de Disse [16].

MEMBRANAS BASALES

Las membranas basales son matrices presentes en la interfase entre las células epiteliales y el intersticio, rodeando individualmente muchas células mesenquimales (adipocitos, células musculares, etc.). Las membranas basales separan las células epiteliales y endoteliales, tal como sucede en el glomérulo renal y en el alveolo. Todas las células endoteliales están recubiertas de membrana basal, excepto aquellas de los sinusoides en el hígado, bazo, nódulos linfáticos y medula ósea [17]. Las células sinoviales, los fibroblastos y los histiocitos carecen de membrana basal o tienen sólo una fracción de su superficie asociada con ella. Las membranas basales se forman por interacción de varios componentes de los cuales cuatro están bien caracterizados.

Laminina

Las lamininas comprenden una familia de proteínas con un número de isoformas. Estas isoformas se forman por cadenas homólogas a las cadenas α , β y γ de lamininas de EHS (tumor murino Engelbreth, Holm, Sworm). Las isoformas de cada clase de cadena son designadas por números arábigos en base a su orden de descubrimiento. La laminina EHS se designa $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\gamma 1$, merosina es $\alpha 2\beta 1\gamma 1$ y s-laminina $\alpha 1\beta 2\gamma 1$. Las formas ensambladas se designan laminina 1, laminina 2 y laminina 3, respectivamente. Los genes que codifican las diferentes cadenas son designados *LAMA1*, *LAMA2*, *LAMA3* y *LAMB1*, etc. La capacidad de la laminina de unirse a las células e incrementar su movilidad y migración ha conducido al descubrimiento de un número de interacciones, incluyendo aquellas con heparina, entactina y colágeno tipo IV [17].

Entactina

La entactina/nidógeno es una glicoproteína muy sulfatada (150 kDa) restringida a la membrana basal. Posee tres dominios globulares en la molécula. Un dominio globular interacciona con la cadena $\beta 1$ cerca del centro del multímero laminina [18].

Colágeno tipo IV

El colágeno tipo IV es el colágeno de la membrana basal [19], y está compuesto por lo menos por seis cadenas α diferentes: $\alpha 1(\text{IV})$ a $\alpha 6(\text{IV})$. Los genes que codifican $\alpha 1(\text{IV})$ y $\alpha 2(\text{IV})$ se han localizado en el cromosoma 13; los que codifican $\alpha 3(\text{IV})$ y $\alpha 4(\text{IV})$ en el cromosoma 2, y los que codifican $\alpha 5(\text{IV})$ y $\alpha 6(\text{IV})$ en el cromosoma X. La forma más común del colágeno tipo IV es el heterotrímero [$\alpha 1(\text{IV})$]₂ $\alpha 2(\text{IV})$, que es ubicua. Se desconoce la naturaleza de la asociación de las restantes cadenas en el colágeno IV. Su distribución en el tejido está restringida cuando se compara a la de las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Las moléculas de colágeno tipo IV interaccionan para formar una red compleja vía interacciones con moléculas adyacentes, tanto lateralmente como en cada término vía enlaces disulfuro [20]. Aunque no existe membrana basal en el espacio de Disse pueden encontrarse depósitos de colágeno tipo IV «libre» en el espacio sinusoidal.

Perlecan

La proteína núcleo del perlecan (500-600 kDa) consiste en cinco a seis dominios globulares con tres cadenas GAG de heparan sulfato, unida covalentemente al NH₂ terminal. La carga negativa característica de la membrana basal se debe, en gran parte, a la presencia del proteoglicano perlecan heparan sulfato de alto peso molecular y baja densidad [21]. Los dominios del perlecan humano poseen secuencias homologas a la molécula de adhesión neural, laminina, EGF y receptor de las lipoproteínas de baja densidad.

Nervios, conductos biliares, vasos venosos y arteriales, todos ellos poseen membranas basales. Por el contrario, en hígado, los sinusoides están desprovistos de membrana basal. Todas las membranas basales contienen al menos los cuatro componentes antes mencionados. Se desconoce aún mucho de la composición de las membranas basales, sólo la distribución de las diferentes isoformas lamininas está bien definida y se sabe que las tres formas de membranas basales hepáticas son heterogéneas [2]. Esta heterogeneidad indica que cambios sutiles en la composición pueden modificar las propiedades funcionales de la membrana basal. Aunque el perlecan y algún tipo de colágeno se encuentran en el espacio de Disse, no se encuentran laminina ni entactina, lo que indica que al menos uno de

estos componentes se necesita para el ensamblaje de la membrana basal. En otras estructuras glandulares (tiroides, páncreas, etc.) existen dos membranas basales: la endotelial y la epitelial. Por tanto, el lóbulo hepático carece de las dos, haciendo que el hepatocito sea la única célula epitelial en el organismo no separada del espacio vascular por membranas basales [7]. ¿Qué ventaja funcional supone la carencia de membrana basal? La respuesta es al parecer, el rápido intercambio bidireccional de macromoléculas entre el plasma y los hepatocitos. La formación de membrana basal en el espacio de Disse es un signo característico de la cirrosis, con el resultante impedimento del intercambio macromolecular, que es el principal causante de alteración de la función hepática.

SÍNTESIS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN HÍGADO

Son tres los tipos celulares que tienen capacidad de sintetizar y secretar los componentes de la matriz extracelular: los hepatocitos, las células endoteliales y los lipocitos. Los hepatocitos contienen mRNA para el colágeno tipo I y se ha demostrado, por inmunohistoquímica electrónica, la presencia de antígenos frente al colágeno tipo I en el interior de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso [2, 8]. Las células sinusoidales endoteliales contienen también colágenos tipos I, III y IV y antígenos frente a la laminina en el interior de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso. La capacidad de los lipocitos para sintetizar y secretar componentes de la matriz extracelular está ampliamente demostrada [22]. Es cierto que en las condiciones utilizadas en cultivos celulares, los lipocitos producen más matriz extracelular que los hepatocitos. Sin embargo, no siempre es prudente extrapolar los resultados obtenidos *in vitro* a lo que sucede *in vivo*. Además, en el hígado, el volumen del citoplasma del hepatocito sobrepasa al del lipocito en varios órdenes de magnitud. Hasta que no se consigan estudios cuantitativos *in vivo*, la única afirmación que se puede hacer es que son tres los tipos celulares que contribuyen a la deposición de la matriz celular sinusoidal. El potencial de las células hepáticas para secretar componentes de la matriz extracelular se muestra en la tabla siguiente.

3. MATRIZ EXTRACELULAR Y PROTEASAS

TABLA I. *Componentes de la matriz extracelular sintetizados por las diferentes células hepáticas [2]*

<i>CÉLULA</i>	<i>Componentes de la matriz extracelular</i>
Hepatocito	Colágeno tipos I, III y IV Fibronectinas Laminina Entactina Perlecan
Células del conducto biliar	Colágeno tipo IV Laminina Entactina Perlecan
Lipocitos	Colágeno tipos I, III y IV Tenascina Undulina Laminina Entactina Perlecan
Células endoteliales	Colágeno tipo IV Trombospondina Undulina Laminina Entactina Perlecan
Células de Kupffer	TGFβ

Los lipocitos son un tipo de células mesenquimáticas en el parénquima hepático, que tienen características únicas respecto a su origen celular, morfología y función. Una de las misiones de los lipocitos quiescentes normales es la de almacenar vitamina A para mantener la homeostasis de esta vitamina en el organismo. Estas células se localizan entre las placas parenquimáticas y las células sinusoidales endoteliales y emiten largos

procesos bien desarrollados que rodean los sinusoides a modo de pericitos. Cuando se activan, en condiciones patológicas tales como fibrosis y cirrosis, se transdiferencian en células miofibroblásticas que carecen de citoplasma, gotas de lípidos y ya no emiten los largos procesos. Los lipocitos son también las células que predominantemente producen los componentes de la matriz extracelular como también las metaloproteinasas que la degradan, lo que indica que juegan un papel importante en la remodelación de la matriz extracelular en condiciones normales y patológicas. Se ha demostrado que los lipocitos tienen un origen neural ya que su modelo de expresión génica es similar a tipos de células neurales, células del músculo liso y miofibroblastos. La morfología y función de los lipocitos se regulan por los componentes de la matriz extracelular como también por citoquinas y factores de crecimiento. La regeneración hepática post hepatectomía puede ser un modelo valioso para esclarecer la función de estas células en la elaboración de la organización del tejido hepático por interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular y por regulación de factores de crecimiento y citoquinas [23].

LA MATRIZ EXTRACELULAR EN HÍGADO EN REGENERACIÓN

La mayor parte de los estudios sobre regeneración hepática se han realizado en rata sometida a la hepatectomía parcial del 70% de la masa hepática. Es posible que la cadena de acontecimientos en este modelo sea similar a lo que ocurre después de una dosis subletal de un agente hepatotóxico (CCl_4 , tioacetamida, paracetamol, etc.). Sin embargo, la lesión inducida por hepatotóxicos es complicada porque a la necrosis de los hepatocitos se une la presencia de células inflamatorias. En estos modelos sólo hay que reparar la zona necrosada, que en la mayoría de los casos es la zona centrilobular o perivenosa.

En las primeras 24 horas, después de la hepatectomía, no se detectan cambios en la matriz extracelular. Como la actividad mitótica es prominente en las zonas periportales, el número de hepatocitos se eleva sin incremento paralelo en la matriz extracelular. Por tanto, la relación células/matriz extracelular se eleva creando la apariencia de una disminución de la matriz. Así como la actividad mitótica continúa, el resultado es la formación de agrupaciones de hepatocitos sin intervención de los sinusoides o de la matriz extracelular. De esta manera, se pierde la relación vascular

normal de los hepatocitos, en la cual dos zonas de su membrana estaban expuestas a los espacios vasculares (Figura 2).

Después de la hepatectomía parcial, las primeras células que sufren la mitosis son los hepatocitos periportales (16 horas), seguidos de los mediozonales, y por último los centrilobulares o perivenosos (48 horas). Este mitótico vaivén refleja probablemente la diferencia de la fase G1, que es más corta en los hepatocitos periportales y de más duración en los centrilobulares. Como resultado de este vaivén en la replicación, los grupos de hepatocitos se forman antes en las zonas periportales que en las perivenosas. Hacia el cuarto día de la hepatectomía parcial, la actividad mitótica disminuye, y coincidiendo con esta disminución, la laminina se hace aparente en el interior de los lipocitos y probablemente como pequeños depósitos extracelulares [24]. A pesar de la síntesis de laminina no se forma membrana basal. Los lipocitos extienden delicadas extensiones de su protoplasma entre los hepatocitos recién formados y coincidiendo con la aparición de estas extensiones celulares las células endoteliales invaden los grupos separando los hepatocitos en las placas celulares con espacios vasculares en dos zonas de su superficie. De esta manera se restaura la vasculatura lobular normal. Al séptimo y octavo día, los lipocitos que contienen laminina enrarecen y hacia el décimo día es cuando se recupera la distribución normal de la matriz. La fibronectina, la tenascina y el colágeno tipos I, III, IV, V y VI se sintetizan y se depositan en los nuevos espacios de Disse formados. El único componente de la membrana basal, no presente en el lóbulo hepático durante la regeneración, es la entactina. Dada la carencia de formación de membrana basal se puede sugerir que la entactina, en base a sus propiedades fisicoquímicas, ejerce un papel esencial en la formación de esa membrana. La coincidencia temporal de la expresión de laminina por los lipocitos, con la aparición física de las protuberancias penetrando entre los grupos de hepatocitos recién formados, indica que los lipocitos y los isotipos específicos de laminina pueden mediar la vascularización de los nuevos hepatocitos por los sinusoides. El comparar los cambios en la matriz extracelular durante la regeneración hepática con aquellos que aparecen en la ontogenesis y la cirrosis está proporcionando nuevos conocimientos del papel específico de los componentes de la matriz extracelular en el lóbulo hepático.

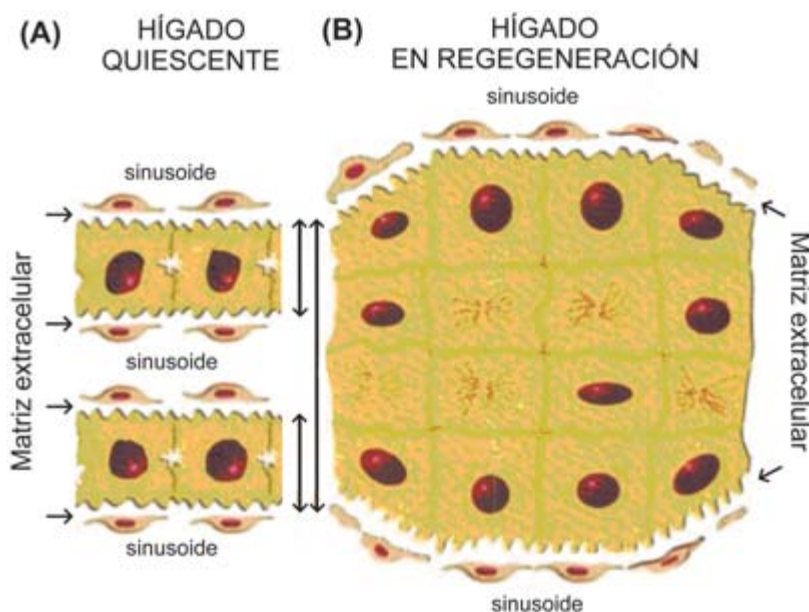


FIGURA 2. Grupo de hepatocitos neoformados y su vascularización. (A) Relación vascular normal en el lóbulo hepático. La mayoría de los hepatocitos tienen un doble acceso al espacio vascular. (B) Como consecuencia de la división de los hepatocitos, se forman agrupaciones de 10-12 células, la mayoría de las cuales no tiene acceso al espacio vascular. Después de la formación de estas agrupaciones, los lipocitos expresan genes de laminina y emiten delicadas extensiones de su citoplasma que penetran entre los grupos de hepatocitos. Posteriormente las células endoteliales intervienen en la formación de los nuevos sinusoides, y de esta manera se reestablece la relación normal entre sistema vascular y sistema celular (días 10-12 posthepatectomía), y la expresión de laminina por los lipocitos se hace indetectable [2].

MATRIZ EXTRACELULAR EN LA CIRROSIS

El primer cambio destacable en la matriz extracelular es la acumulación de fibronectina en el espacio subsinusoidal. A la deposición de fibronectina le sigue la del colágeno tipo I y otros componentes de la matriz extracelular, lo que indica que la fibronectina puede actuar como organizador de la matriz extracelular fibrótica y cirrótica [25]. Con la agresión continuada van acumulándose los componentes de la matriz en el intersticio. En este momento, las células endoteliales pierden las fenestras y sintetizan laminina y colágeno tipo IV y aparecen células con características de miofibroblastos que sintetizan también laminina y colágeno tipo IV. Eventualmente este proceso culmina con la transformación de los

3. MATRIZ EXTRACELULAR Y PROTEASAS

sinusoides hepáticos en capilares continuos con membrana basal y miofibroblastos, y el espacio de Disse se transforma en un intersticio denso y fibroso. Como se mencionó anteriormente, los hepatocitos, las células endoteliales y los lipocitos secretan componentes de la matriz extracelular *in vivo* en lesión crónica y también durante la ontogénesis (Figura 3).

Los tres tipos celulares, hepatocitos, células endoteliales y miofibroblastos contribuyen a la deposición de la matriz extracelular. La superficie del hepatocito se simplifica con una disminución de su superficie. En los estados avanzados de cirrosis, algunos hepatocitos desarrollan su propia membrana basal. Las consecuencias de estos cambios es que el espacio de Disse se convierte en un intersticio similar al de otros órganos y aparecen varias barreras de difusión entre los hepatocitos y el plasma, con la consiguiente eliminación de intercambio bidireccional de las macromoléculas, esencial para la función hepática, la cual es a menudo asumida por los miofibroblastos, que se encuentran en el intersticio cirrótico como modificación o progenia directa de los lipocitos preexistentes. Las diferencias principales entre hígado normal y cirrótico, se muestran en la Figura 3.

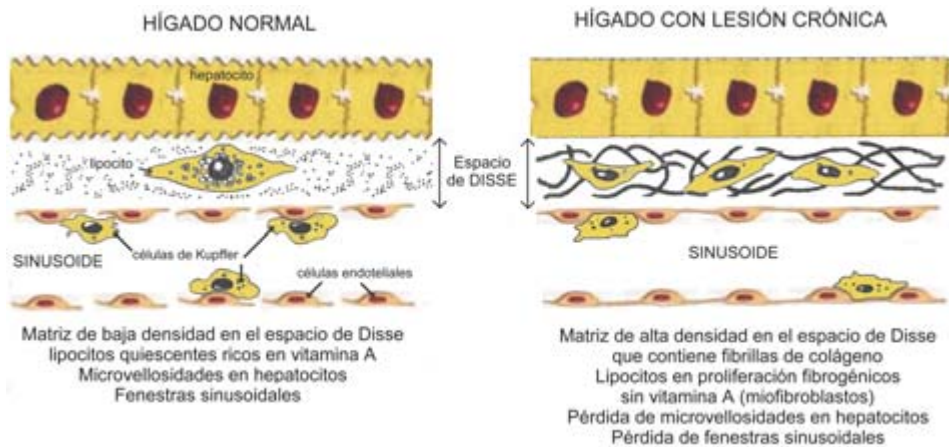
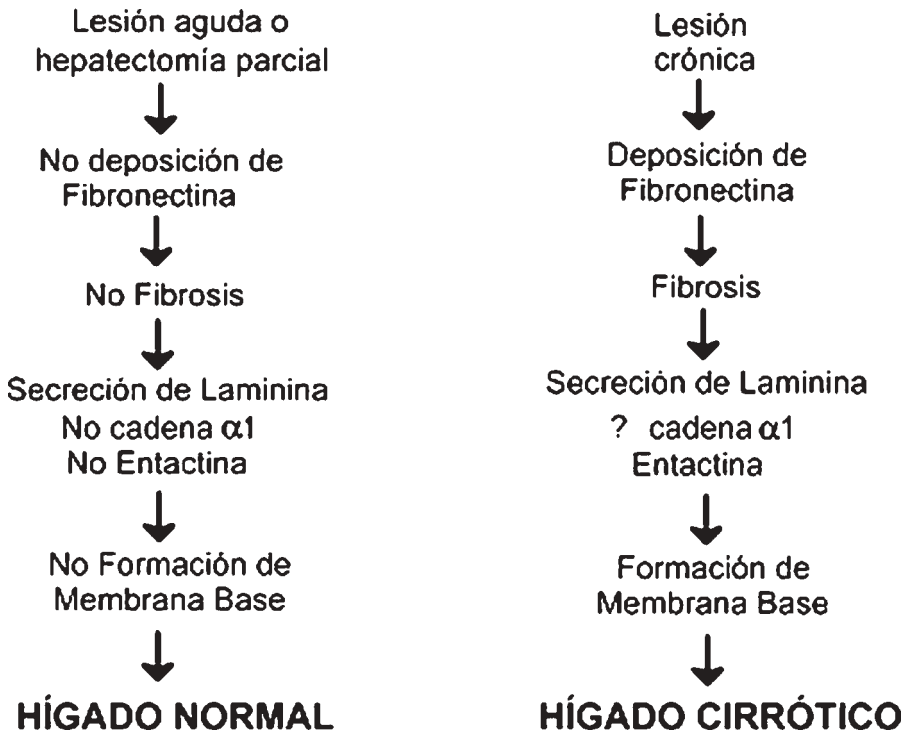


FIGURA 3. *Espacio de Disse en hígado normal y en cirrosis. El espacio de Disse normal se caracteriza por la carencia de membrana basal y por la presencia de una matriz extracelular de baja densidad. Los lipocitos contienen abundantes gotitas de grasa (ácido retinoico) y aparecen entre las células endoteliales y los hepatocitos. En cirrosis tiene lugar una radical transformación. El endotelio no tiene fenestras y presenta una membrana basal continua. Ocasionalmente, embebidas en esta membrana endotelial, se encuentran células con características de miofibroblastos que carecen de gotitas de lípidos. El intersticio (el espacio comprendido entre el endotelio y el hepatocito) contiene una densa matriz extracelular con numerosos haces de colágeno tipo I y IV, fiobronectina, y proteoglicanos (2).*

Es ya un hecho reconocido y demostrado que la división celular, así como la migración de los lipocitos y las células endoteliales se verifica de manera simultánea a la remodelación de la matriz extracelular preexistente. Hay que destacar la plasticidad de la microvasculatura hepática y su intervención en la ontogenesis, regeneración y cirrosis. En la hepatogénesis, los hepatoblastos invaden el *septum* transversal, rompen los capilares continuos existentes e inducen la formación de los sinusoides fenestrados. En la regeneración, las células endoteliales de los sinusoides fenestrados invaden las agrupaciones de hepatocitos neoformados y forman los nuevos sinusoides. En lesión hepática crónica, los sinusoides se transforman en capilares con una membrana basal continua. En experimentos con fragmentos de hígado fetal de rata se ha detectado que inducen el fenotipo sinusoidal en los capilares de la membrana corioalantoidea de codorniz [26]. Por tanto, el fenotipo de la microvasculatura puede ser modulado. Esta capacidad de modulación indica que el estado cirrótico puede ser reversible, lo cual presenta profundas implicaciones terapéuticas. Aunque se sabe que los hepatocitos, los lipocitos y las células endoteliales contribuyen potencialmente a la deposición de matriz extracelular, sería necesario delinear sus contribuciones relativas.

¿Qué mecanismos determinan los diferentes resultados de la lesión aguda *versus* la lesión crónica o de la regeneración *versus* la cirrosis? La respuesta a esta pregunta es: la neoformación de sinusoides fenestrados en la regeneración y formación de capilares en la cirrosis, por degeneración de los sinusoides. Quizá algunas respuestas pueden encontrarse en la laminina y en la entactina. En la cirrosis, pero no en regeneración, se forma membrana basal y se sabe que la entactina está presente en la cirrosis [27], pero no se tiene un conocimiento completo acerca de los isotipos de laminina presentes. La carencia de laminina $\alpha 1$ y de formación de membrana basal en hepatogénesis y regeneración, comparada con la formación prominente de membrana basal en cirrosis es digno de considerar. Puede ser que la respuesta a la lesión crónica incluya la activación de los genes de la entactina y laminina $\alpha 1$. No se sabe aún cuál es el mecanismo que determina el papel benevolente que juegan los lipocitos en la neovascularización en el caso de regeneración, frente a la actividad fibrótica de los miofibroblastos en la cirrosis.

RESPUESTA HEPÁTICA A LA AGRESIÓN



ESQUEMA 1. *Diferencias entre regeneración y cirrosis. Se propone que existen dos diferencias clave, en términos de la matriz extracelular entre la respuesta hepática a la lesión aguda, producida por hepatectomía parcial o hepatotoxicidad y la lesión crónica o cirrosis. En este último caso existe una deposición temprana de fibronectina en el espacio de Disse. La fibronectina actúa como organizador de la matriz extracelular y por tanto de la fibrosis. En la regeneración no existe deposición de fibronectina. La segunda diferencia puede ser la expresión génica de la entactina y la laminina $\alpha 1$, como evento tardío de la lesión crónica. Estos dos componentes de la matriz extracelular son esenciales para el ensamblaje de la membrana basal, característica de los capilares cirróticos [2].*

RECAMBIO DE LA MATRIZ EXTRACELULAR: METALOPROTEASAS Y SUS INHIBIDORES

Es notable la capacidad del hígado de regular su crecimiento, haciendo que los hepatocitos maduros diferenciados se reincorporen al ciclo celular y

frenen su proliferación una vez restaurada su masa y función [28, 29]. La matriz extracelular se remodela junto con la restauración de la masa hepática. En el complejo proceso de la regeneración se distinguen tres fases: iniciación, proliferación y terminación. La iniciación (*priming*) es la preparación de los hepatocitos para hacerlos competentes a la replicación y está controlada por citoquinas proinflamatorias, TNF α e IL-6. Entre los factores de crecimiento los HGF, TGF α y EGF son los encargados de promover que los hepatocitos iniciados superen el punto de restricción localizado en los dos tercios de la fase G1, induciendo la expresión de los reguladores clave como las ciclinas y las CDK, las cuales juegan un papel crítico en la progresión del ciclo celular. Se ha demostrado que la matriz extracelular sufre remodelación en las etapas iniciales de la regeneración [30]. También la inyección o la elevada expresión de colágenasa en hígado intacto, asociada a factores del crecimiento, induce la proliferación de los hepatocitos, lo que indica que la degradación de la matriz extracelular juega un papel importante en la «iniciación» de los hepatocitos. Otros experimentos apoyan la misma idea, ya que en casos de no degradación del colágeno en hígado de ratón se inhibe la respuesta proliferativa de los hepatocitos [31]. En esta remodelación de la matriz se encuentran involucradas las metaloproteinasas de la matriz (MMP). Estudios paralelos *in vitro* han demostrado que el TNF α induce la expresión de la MMP9 en hepatocitos de ratón [32] y que la transcripción de MMP9 implica la activación de la vía del NF κ B. Es interesante conocer cómo se conectan las señales mitogénicas y la degradación de la matriz extracelular para promover la entrada y progresión en el ciclo celular de los hepatocitos diferenciados.

Es un hecho conocido que los hepatocitos *in vitro* sufren una espontánea transición G/G1 durante su aislamiento con colagenasa [33], y que, en cultivos puros a corto plazo, proliferan en presencia de factores del crecimiento sin requerimiento de factores de iniciación. Por estas razones Serandour *et al.* [34] han utilizado un modelo de cocultivo asociando hepatocitos de rata con células biliares epiteliales también de rata. En este sistema se restauran los contactos célula-célula heterotípicos y ambos tipos celulares cooperan para sintetizar y depositar la matriz extracelular. Estos autores han diseñado un nuevo procedimiento de estimulación que permite muchas rondas de división de los hepatocitos sin pérdida de la diferenciación. Así han podido evidenciar una parada tardía en G1 asociada con la deposición de la matriz extracelular y esclarecer el requerimiento de los efectos adicionales del TNF α y señales mitogénicas para superar el bloqueo y controlar la inducción de múltiples rondas de división [34].

La respuesta rápida a la lesión requiere la liberación inmediata de múltiples factores. Existen numerosas evidencias que demuestran que una serie de eventos proteolíticos pericelulares participan en la regulación de la división de los hepatocitos y en la restauración de la masa y funcionalidad originales [29]. Son las MMP de la matriz extracelular las que controlan, tanto la remodelación de la matriz como la bioactividad de los factores del crecimiento [35-37]. Durante la regeneración hepática los hepatocitos proliferan bajo el control de citoquinas proinflamatorias y factores de crecimiento, en paralelo a la remodelación de la matriz extracelular. En el cocultivo de hepatocitos con células biliares, las células mantienen su diferenciación durante varias semanas, son capaces de efectuar la deposición de la matriz extracelular y son incapaces de dividirse en respuesta solo a los factores del crecimiento. Se ha demostrado que los hepatocitos pueden sufrir varias rondas de división sin pérdida de la diferenciación utilizando periodos alternativos de estimulación y privación de $\text{TNF}\alpha$ /EGF. Tres días después de este tratamiento se consiguió que un 35% de los hepatocitos se dividiera. Ambos, hepatocitos mononucleares y binucleares progresaron hacia la mitosis y citoquinesis, originando colonias de expansión plana. El $\text{TNF}\alpha$ promovió la degradación de la matriz extracelular debido a la activación de la MMP9 a través de la vía del $\text{NF}\kappa\text{B}$. También se ha demostrado [34], que la señal de remodelación de la matriz extracelular se requirió para iniciar una nueva ronda de división de los hepatocitos en presencia de mitógeno. Estos resultados indican que la proliferación de los hepatocitos es dependiente de la deposición de la matriz extracelular asociada al estado diferenciado. El análisis de las proteínas del ciclo celular mostró que el EGF por sí solo, indujo la expresión de la ciclina D1, pero no la de la CDK, lo que indica la sensibilidad de las células a la señal mitógena.

La rotura proteolítica puede facilitar la liberación de los factores de crecimiento desde la matriz extracelular y la maduración y activación de dichos factores. Las redes señalizadoras proporcionan la duración precisa del ciclo regulando la expresión temporal de genes y la actividad de las proteínas. La proteólisis extracelular gobernada por MMP/TIMP (inhibidor tisular de la metaloproteinasa), proporciona un nuevo punto de control que funciona en etapas previas a la vía señalizadora mitogénica del HGF durante la regeneración hepática. En resumen, es vital que el ciclo celular mantenga su control para evitar hiperplasias y el desarrollo de células neoplásicas.

La regeneración hepática depende de la restauración ordenada de la masa celular mientras se remodela la matriz extracelular. Las MMP y su

inhibidor TIMP, regulan el recambio de la matriz extracelular y el procesamiento de factores del crecimiento y citoquinas. Se ha demostrado que TIMP1 inhibe la proliferación preneoplásica de hepatocitos atenuando la biodisponibilidad de los factores del crecimiento. Se ha examinado el papel de TIMP1 sobre la división celular de hepatocitos durante la regeneración hepática por análisis de la reacción en cadena de la polimerasa, y se ha detectado la inducción de los mRNA de TIMP1, TIMP3, TIMP4, MMP2, MMP9, MMP13, MMP14 y MMP24. La inducción de TIMP1 coincidió con el máximo de síntesis del DNA en los hepatocitos. Estudios con ratones genéticamente alterados han revelado que la pérdida de función de TIMP1 aceleró la progresión de los hepatocitos en el ciclo celular. Esto se demostró por la expresión temprana de ciclina D1, PCNA e histona fosforilada H3, que marcan la transición G1-S y S-M (Figura 4). Por el contrario la ganancia de función de TIMP1 retrasó la progresión en el ciclo celular. Las actividades de las MMP se elevaron en ausencia de *Timp1*. El examen del HGF y su receptor c-MET, ambos responsables de emitir una señal mitogénica para la división de los hepatocitos, mostraron concentraciones elevadas en hígado regenerante *Timp1*^{-/-}. El HGF se libera de la matriz extracelular y sufre proteólisis para convertirse en su forma activa. El HGF activo se encontró elevado en ratones *Timp1*^{-/-}, lo que condujo a un incremento del c-MET fosforilado (Figura 4), como también a la activación de un efector el p38. En conclusión, TIMP1 es un nuevo regulador negativo de la actividad del HGF durante la regeneración hepática [38].

ANCLAJE DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO A LA MATRIZ EXTRACELULAR HEPÁTICA

La matriz extracelular proporciona el almacén del hígado y comprende un 3% de su área seccional. Alrededor de las triadas portales se encuentra tejido conjuntivo. Fibras reticulares y pequeñas cantidades de membrana basal aparecen entre el endotelio sinusoidal y los hepatocitos. Como ya se ha indicado, los colágenos son las principales proteínas integrantes de la matriz extracelular, colágenos de los tipos I, III y V forman el colágeno fibrilar localizado en el área portal y en la vena central, mientras que el colágeno tipo IV, junto a la laminina y entactina-nidógeno, forman la membrana base. Otras moléculas son las glicoproteínas (laminina, fibronectina, tenascina, nidógeno y SPARC) y proteoglicanos (heparan, dermatan, condroitin sulfato, perlecan, ácido hialurónico y decorina). La red continua de matriz extracelular que rodea las células permite el almacenamiento y

3. MATRIZ EXTRACELULAR Y PROTEASAS

transmisión de señales mediante la unión y liberación de factores de crecimiento, hormonas, enzimas y citoquinas. Los factores de crecimiento que se unen a la matriz extracelular en el ambiente hepático son los siguientes: HGF, VEGF, FGF y TGF β . El proceso de regeneración hepática requiere un remodelamiento activo de la matriz extracelular, el cual se lleva a cabo por una serie de proteasas extracelulares.

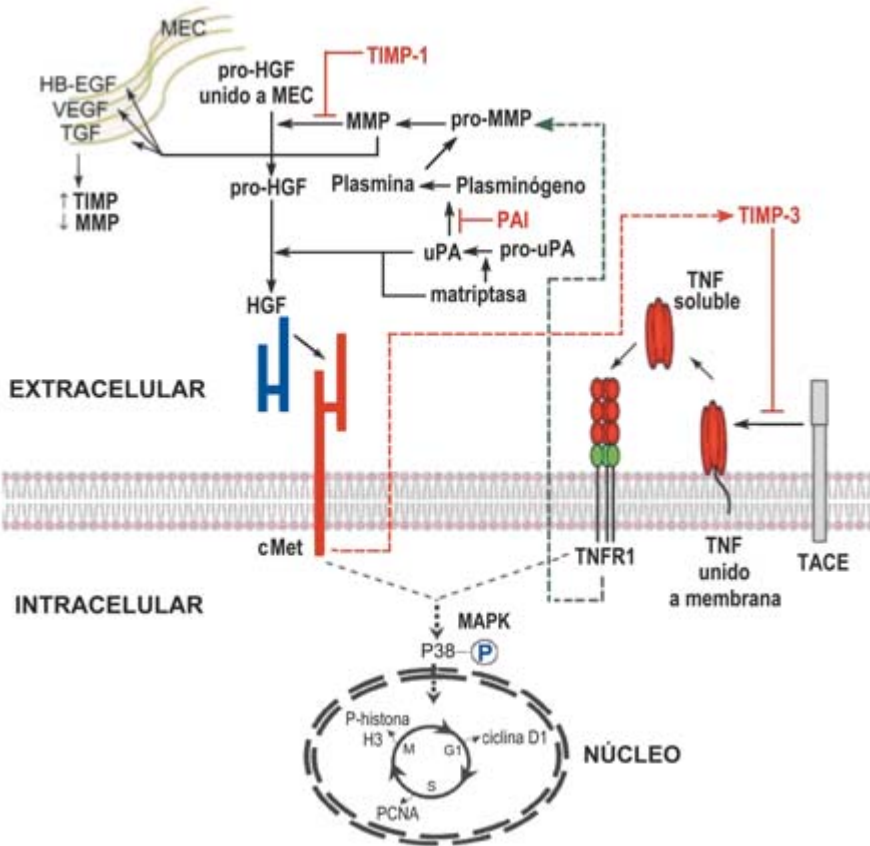


FIGURA 4. **Interfase pericelular de las cascadas proteolíticas y la inducción de señales intracelulares.** Las serina proteasas pueden activar las metaloproteasas de la matriz (MMP) que originan la degradación de la matriz extracelular y la liberación y activación de factores de crecimiento (HGF) y citoquinas en el microambiente celular. La proteólisis se inhibe por PAI, TIMP-1 y TIMP-3. Los factores de crecimiento y citoquinas implicadas en la síntesis del DNA de los hepatocitos pueden inducir o inhibir los TIMP y las MMP. HGF, factor de crecimiento de los hepatocitos; TIMP, inhibidor tisular de la metaloproteasa; MMP, metaloproteasa de la matriz; uPA, uroquinasa activadora del plasminógeno; MAPK, proteína quinasa activada por mitógenos; PAI, inhibidor de la activación del plasminógeno; PCNA, antígeno nuclear de proliferación celular; TNF, factor de necrosis tumoral; TNFR, receptor del factor de necrosis tumoral; TACE (enzima convertidor del TNF alfa) (Mohammed et al., 2005) [38].

CONEXIÓN DE LA CASCADA DE PROTEASAS CON LA SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR

La cascada proteolítica permite una respuesta rápida y controlada, mediante la liberación coordinada de señales de iniciación y terminación. Esta cascada funciona en paralelo para la remodelación de la MEC y el establecimiento de la estructura tisular. Las serina proteasas y las metaloproteasas intervienen en cascadas complejas proteolíticas que requieren mecanismos precisos para la activación, en un momento dado, de enzimas latentes (proenzimas), y en otro momento actúan inhibiendo la forma activa de esos enzimas mediante inhibidores. Estas dos clases de mecanismos están conectados de manera que serina proteasas específicas activan algunas metaloproteasas latentes. Además, la activación de una proteasa se regula espacialmente en el contexto de la arquitectura tisular y a menudo está anclada en la superficie celular. La Figura 4 muestra el diálogo entre las proteasas y su influencia en la señalización celular. Es importante observar la regulación de la señalización celular desde dentro y desde fuera de la célula, en un contexto tridimensional donde la localización extracelular y la modificación de las señales mitogénicas afecta la capacidad proliferativa.

La iniciación de los hepatocitos se verifica por acción del $\text{TNF}\alpha$, que induce la traslocación al núcleo del $\text{NF}\kappa\text{B}$ [39] para desencadenar la producción de IL-6 con la consiguiente activación de STAT3 [40]. La liberación del $\text{TGF}\alpha$ de la superficie celular está mediada por una MMP denominada TACE (*TGF α converting enzyme*). El inhibidor tisular de la MMP3, TIMP3, es el único inhibidor conocido del TACE [41]. Se ha descrito [56] que TIMP3 es esencial para el éxito de la regeneración hepática. El $\text{TGF}\alpha$ acelera la progresión del ciclo celular después de la hepatectomía parcial.

Para la progresión del ciclo celular es necesario superar la transición G1-S, transición estimulada por el HGF vía señalización a través de su receptor MET [45, 54]. Ratones con deleciones en los genes que codifican el HGF o su receptor c-MET, mueren *in utero* con defectos en el desarrollo del hígado [42-44]. El HGF es un potente mitógeno para hepatocitos en cultivo e induce la expresión de genes tempranos durante la regeneración hepática. Después de la hepatectomía parcial, los niveles plasmáticos de HGF se elevan inmediatamente (una hora), pero su mRNA no se sintetiza hasta las tres-seis horas, lo que hace pensar en un mecanismo alternativo que proporciona el incremento plasmático inmediato de HGF. HGF se sintetiza como una sola cadena polipeptídica unida a la matriz extracelular

hepática y ha de ser liberado y activado por rotura proteolítica en dos cadenas peptídicas [45-47]. De esta manera, el EGF inactivo, unido a la matriz extracelular, sirve como reservorio para la disponibilidad inmediata que se libera en el momento de remodelación de la matriz. Los principales enzimas proteolíticos de la matriz extracelular son las MMP, cuya transcripción se induce durante la regeneración hepática. Estas proteasas extracelulares liberan citoquinas y factores de crecimiento que se encuentran anclados en la matriz extracelular hepática o requieren ser procesados para su bioactividad. Las señales cruciales para la regeneración están reguladas por serina proteasas y MMP, que proporcionan una interfase entre las cascadas proteolíticas y la señalización intracelular durante la división de los hepatocitos [48].

La rápida respuesta a la lesión hepática depende de la inmediata liberación de múltiples factores antes de que la nueva síntesis se verifique [29]. Considerando las funciones recientemente reconocidas de las MMP, en regular la bioactividad de los factores del crecimiento, se especula que la proteólisis pericelular participa en la regulación de la división de los hepatocitos. Se ha descrito [37] que TIMP1 es esencial para la regeneración hepática [42], porque proporciona un punto de control durante este proceso. Las alteraciones genéticas de TIMP1 ejercen un impacto directo sobre la progresión del ciclo celular por los hepatocitos, por alteración de la activación del HGF y su intervención en la señalización. De manera que TIMP1 es un nuevo regulador negativo de la actividad del HGF durante la regeneración hepática.

Hasta la fecha no se había descrito un perfil detallado de la expresión de TIMP y MMP después de la hepatectomía parcial. Se ha identificado que tres de la cuatro TIMP se inducen transcripcionalmente. TIMP3 se induce antes (seis horas), coincidiendo con la reducción de la concentración del TNF α y consistente con su papel de regular los niveles de esta citoquina durante la regeneración hepática. La inducción de la expresión de TIMP1 y TIMP4 es más tardía (48 horas). La ganancia de función de TIMP1 retrasa la progresión del ciclo celular después de la hepatectomía parcial, mientras que la reducción o pérdida de función la acelera. La manipulación genética de TIMP1 ejerce impacto en las tres fases del ciclo celular. La sobreexpresión de TIMP1 frena el ciclo celular y la proliferación *de novo* de los hepatocitos.

La actividad de la uroquinasa (uPA) se eleva inmediatamente después de la hepatectomía parcial. La uPA es uno de los iniciadores principales de

la cascada proteolítica de la matriz y es un activador del plasminógeno y del HGF. Kim *et al.* [3] han estudiado la degradación de la matriz en hígado después de la hepatectomía parcial. La activación de la transformación plasminógeno → plasmina, examinada por análisis Western blot, detectó un pequeño incremento inicial en plasmina a los 15 minutos, seguido por una gran elevación entre las tres y las seis horas después de la hepatectomía parcial. Además, el fibrinógeno, el sustrato principal de la plasmina, empezó a degradarse a los 15 a 30 minutos. Se ha detectado una menor distribución del fibrinógeno en la región periportal a los 15 minutos, que se mantuvo en las próximas 24 horas. La distribución de fibronectina en hígado normal se localizó en el espacio perisinusoidal que rodea las regiones periportales y perivenosas. A los cinco minutos de la hepatectomía se encontró una menor distribución de fibronectina en la región periportal. También se observó, en una preparación de matriz extracelular enriquecida, que los niveles protei-

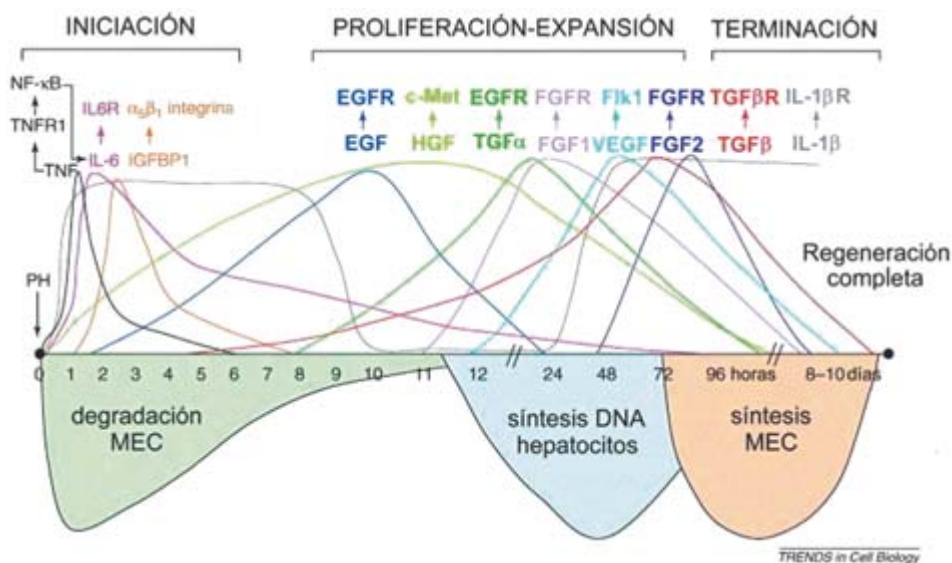


FIGURA 5. **Representación esquemática de las señales que desencadenan y detienen la proliferación celular.** La proliferación de los hepatocitos durante la regeneración hepática implica la inducción inicial de la transición G0-G1 por las citoquinas, seguida por la progresión a través del punto de restricción en G1, inducida por factores de crecimiento. La proliferación de los hepatocitos se detiene por acción de los factores inhibidores TGFβ e IL-1β. Otros factores VEGF y FGF inducen la angiogenesis. La degradación de la MEC (area verde) ocurre en las primeras horas previas a la síntesis del DNA (area azul), y la MEC hepática se reestablece (area rosa) una vez que los hepatocitos han proliferado (Mohammed y Khohka, 2005) [48].

cos de laminina, entactina y fibronectina disminuían inmediatamente después de la hepatectomía y se restauraban más tarde. No se observaron cambios en la vitronectina ni en la cadena alfa (v) de la integrina. Sin embargo, los mRNA de la fibronectina, cadena beta1 de la integrina, y cadena alfa (v) de la integrina se elevaron de manera gradual sobre las 18 horas y disminuyeron después. Los resultados obtenidos por estos autores demuestran que la rápida reorganización de los componentes de la matriz extracelular juega un importante papel en la proliferación de los hepatocitos en las etapas iniciales de la regeneración hepática.

MODIFICACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN POR LAS PROTEASAS EXTRACELULARES

Las serina proteasas y las metaloproteasas poseen sus inhibidores específicos endógenos. Los animales knockout de las serina proteasas activadoras del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y de las activadoras del plasminógeno tipo tisular (tPA), exhiben un retraso en la regeneración hepática, mientras que los animales deficientes en el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI) muestran la regeneración hepática acelerada después de la hepatectomía parcial, lo que demuestra la importancia del sistema activador del plasminógeno. También, otros activadores de serina proteasas HGF (HGFA) y sus inhibidores HAI-1, HAI-2, y la matriptasa (MT-SP1) [49], están surgiendo como factores importantes en la regeneración hepática. Poco se sabe del papel de las metaloproteasas de la matriz (MMP) y de ADAM, de la familia de las desintegrinas y metaloproteasas, durante de respuesta regenerativa. Recientes estudios que utilizan ratones deficientes en inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMP)-1 o -3, apuntan una función de las metaloproteasas en este proceso [38].

Un amplio repertorio de proteínas transmembrana se liberan proteolíticamente desde la superficie celular, por un proceso denominado desprendimiento del ectodominio «*ectodomain shedding*». El procesamiento de los ligandos en la interfase pericelular proporciona puntos clave de control de la proliferación celular. La rotura proteolítica puede funcionar tanto en las señales de activación como de inactivación, bien directamente o mediante modificación de proteínas de enlace. La liberación de factores unidos a la matriz extracelular o el desprendimiento (*shedding*) de factores unidos a membrana, pueden extender sus efectos desde locales hasta sistémicos. El desprendimiento de los receptores de la superficie celular pro-

porciona otro medio de impedir la señalización celular. El procesamiento proteolítico es también un mecanismo inmediato para modificar las señales preexistentes sin necesidad de recurrir a síntesis *de novo*.

En párrafos posteriores se muestra cómo la proteólisis regula las señales individuales que se consideran importantes para la regeneración hepática.

El factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF}\alpha$) es un heterotrímero unido a membrana que se desprende de la superficie celular por el enzima convertidor de $\text{TNF}\alpha$ (TACE/ADAM17) [50]. TIMP-3 es el inhibidor fisiológico de TACE, y su deficiencia origina una actividad incontrolada que conlleva a una elevada concentración de $\text{TNF}\alpha$ hepático. Cuando se eleva TNF se acelera la progresión del ciclo celular en los hepatocitos después de la hepatectomía, pero esto puede conllevar también apoptosis, necrosis y fallo hepático [42]. El papel del TACE en la regeneración hepática no se ha podido estudiar directamente, ya que los ratones *tace*^{-/-} exhiben letalidad perinatal. Así que, el desprendimiento del TNF mediado por la actividad proteolítica de TACE parece ser importante para la iniciación de los hepatocitos, pero igualmente crucial es la inhibición de este enzima. TACE, desprende también de la superficie celular los receptores de TNF (TNFR1, TNFR2). Estos receptores solubles retienen la capacidad de unión para el TNF y pueden, por tanto, alterar la transducción de señales al secuestrar al TNF impidiendo su unión a los receptores de membrana. El desprendimiento del TNFR durante la regeneración hepática tiene probablemente un papel regulador negativo.

La concentración plasmática del factor de crecimiento de los hepatocitos o «*scatter factor*» (HGF), se eleva una hora después de la hepatectomía parcial en ratas. Como se ha observado que el mRNA HGF se sintetiza entre las tres y las seis horas, esto demuestra que existe un mecanismo alternativo responsable de la elevación inmediata del HGF [38]. El HGF se origina como cadena polipeptídica, precursora, pro-HGF, que se une a la matriz extracelular hepática y se libera en casos de remodelación de la matriz. Una vez liberado el pro-HGF sufre proteólisis y se convierte en la forma de dos cadenas, el HGF activo [51]. La regeneración hepática se acelera en ratones *PAI-1*^{-/-} deficientes en el inhibidor de la serina proteasa y por el contrario los ratones *uPA*^{-/-} deficientes en serina proteasa muestran un retraso en la síntesis y activación del HGF [40]. Los ratones *uPAR*^{-/-} no muestran alteraciones en la regeneración, lo que indica que los efectos uPA son independientes de la señalización del uPAR y están probablemente asociados con

su actividad proteasa, lo que ejerce impacto sobre la liberación de HGF. La serina proteasa trombina también activa al HGF, mientras que la matriptasa activa a ambos, HGF y uPA [52].

Aunque no se ha descrito que las MMP intervengan en la activación del pro-HGF, se ha detectado en ratones *Timp-1*^{-/-} una acelerada progresión del ciclo celular después de la hepatectomía parcial, con un incremento paralelo de HGF activo y activación de MET [38]. La ausencia de TIMP-1 produce elevada actividad MMP en hígado quiescente y regenerante, lo cual puede incrementar la liberación del pro-HGF unido a la matriz extracelular. Las pro-MMP se activan en parte por la plasmina generada en la cascada plasminógeno-uPA y así la activación de MMP puede estar alterada en ratones *uPA*^{-/-}, lo que ocasiona la liberación alterada de pro-HGF unido a la matriz extracelular. La rotura proteolítica puede contribuir a las dos vías siguientes: primera, la liberación de HGF desde la matriz extracelular por las MMP, y segunda, la maduración de este factor de crecimiento por varias serina proteasas. El receptor de HGF, MET, puede también desprenderse de la superficie celular por acción de una metaloproteasa sensible a TIMP-3 [53]. El receptor del factor de crecimiento de los hepatocitos, cMET, se libera por rotura mediada por la metaloproteína. La activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR, directamente por el EGF o indirectamente vía el agonista del receptor acoplado a proteínas G-protein (GPCR), el ácido lisofosfatídico (LPA), induce la rotura de cMET, mediante activación de la cascada señalizadora ERK MAP quinasa. La actividad tirosina quinasa del EGFR es un prerequisite para esta estimulación. La rotura de MET mediada por la metaloproteína se inhibió específicamente por TIMP-3. La intensidad del desprendimiento de MET puede ser modulada por interacciones célula-matriz.

Los ligandos factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento transformante alfa (TGF α) de la superfamilia EGF, señalizan a través de la familia de receptores EGF. Una forma de EGF contiene una secuencia N-terminal conductora que confiere unión a la heparina (HB-EGF) y se sintetiza como pro-HBEGF y requiere maduración proteolítica [54]. HBEGF se induce diez horas después de la hepatectomía parcial, con un incremento paralelo en la fosforilación de la tirosina de EGFR. El EGF hepático puede jugar un papel mitogénico durante la regeneración al llegar a estar disponible de manera inmediata para los hepatocitos. La sobreexpresión transgénica de HB-EGF acelera la división de los hepatocitos después de la hepatectomía parcial.

El TGF α se sintetiza en forma de precursor unido a membrana, que se desprende de la superficie celular por proteólisis [55], y su mRNA se eleva inmediatamente después de la hepatectomía. El papel del TGF α en la regeneración hepática es más difícil de discernir ya que los ratones *TGF α ^{-/-}* no presentan regeneración hepática alterada, como otros miembros de la de la superfamilia EGF [56]. Ratones transgénicos que sobreexpresan HB-EGF y TGF α presentan un agrandamiento hepático y mayor proliferación basal de los hepatocitos. ADAM17 es la proteasa primaria que produce el desprendimiento del ligando de EGFR. Los ratones *ADAM17^{-/-}* murieron en los últimos estadios de la gestación o en los primeros después del nacimiento y mostraron varios defectos similares a los ratones *EGFR^{-/-}* [57]. TACE se considera crucial para el desprendimiento del pro-TGF α , aunque otras metaloproteasas pueden también actuar en ausencia de TACE. El precursor pro-HB-EGF es también sustrato de ADAM17, ADAM9, ADAM12, MMP-7 y MMP-3 [55, 58].

Factor de crecimiento vascular endotelial, VEGF. Después de la división celular, los hepatocitos se encuentran en grupos sin acceso a sinusoides (Figura 2). Para restablecer la arquitectura tisular se necesita la síntesis de nueva matriz extracelular y de nuevos vasos. Las nuevas células endoteliales se dirigen hacia los grupos de hepatocitos neoformados para formar sinusoides donde se han de alinear las placas de hepatocitos. El VEGF es un factor que se encuentra implicado en este proceso, y su concentración se eleva y llega a su punto máximo a las 48 horas de la hepatectomía parcial. [59]. La activación del receptor-1 del VEGF induce la secreción de HGF por las células endoteliales sinusoidales, y la proliferación de los hepatocitos [60]. El VEGF existe en varias isoformas, algunas de ellas contienen dominios que se unen a la heparina y a proteoglicanos y heparan sulfato (HSPG), localizados en la superficie celular o en la matriz extracelular [61]. La inmovilización del VEGF en la matriz extracelular estabiliza su conformación activa, lo protege de la inactivación proteolítica y limita su disponibilidad a regiones de invasión celular activa. Por el contrario, la liberación del VEGF desde la matriz extracelular activa la señalización inducida por VEGF [62]. La MMP-9 es una de las metaloproteinasas inducidas durante la regeneración y junto a la plasmina puede modificar la liberación de este factor angiogénico [38].

El factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF-1) pertenece a otra familia de moléculas proangiogénicas potentes, que señala a través de un grupo de receptores tirosina quinasas FGFR1–FGFR4. El FGF-1 es un factor de crecimiento poderoso que se induce inmediatamente después de la

hepatectomía parcial. El perlecán es un importante proteoglicano heparan sulfato (HSPG) que se encuentra en las membranas basales y en la matriz extracelular de todos los tejidos vascularizados. La unión de los FGF al perlecán se cree que limita la difusión y liberación de estos factores para protegerlos de la degradación proteolítica [63]. El perlecán promueve también la activación del receptor del FGF y la mitogenesis [64]. Las MMP-1 y MMP-3 liberan al FGF del perlecán, lo que proporciona un mecanismo para el control de la liberación del FGF a partir de las paredes de los vasos sanguíneos. La MMP-2 puede también liberar el ectodominio de FGFR-1, que retiene la capacidad de unirse al FGF [65]. Al igual que los TNFR solubles el ectodominio del FGFR soluble puede modular la actividad mitogénica y angiogénica del FGF durante la regeneración hepática.

La proteína de enlace al factor insulínico 1, IGFBP-1, es otro mecanismo que controla la disponibilidad de los factores de crecimiento mediante su asociación con proteínas. Las proteínas IGFBP se unen a los factores insulínicos IGF, con afinidad igual o mayor que los receptores IGF, y la degradación de IGFBP da lugar a la liberación de IGF [66]. Las metaloproteasas poseen una capacidad reconocida para degradar IGFBP. Específicamente, MMP-3 y MMP-9 pueden romper IGFBP-1 y este proceso proteolítico se inhibe por TIMP-1 y TIMP-2 [67]. Después de la rotura proteolítica inducida por MMP, el fragmento C-terminal de IGFBP-1, que contiene un motivo de unión a la integrina, adquiere una conformación alterada con afinidad de unión a la integrina.

El factor transformante de crecimiento beta, TGF β , se secreta como un complejo latente de 290 kDa, consistente en una molécula unida a un péptido asociado a la latencia (LAP) y la proteína 1 que se une al TGF β latente (LTBP1). LAP se asocia de manera no covalente con TGF β , pero LTBP1, a su vez, se une covalentemente a LAP [68]. El complejo LTBP-LAP vuelve inactivo a TGF β , previniendo su capacidad de señalización y uniéndolo a la matriz extracelular. Varias proteasas son capaces de activar al TGF β latente, incluyendo la plasmina, la elastasa de leucocitos, MMP-2, MMP-9 y MT1-MMP. TGF β interacciona también con un proteoglicano pequeño denominado decorina, que inhibe la actividad TGF β . MMP-2, MMP-3 y MMP-7 pueden liberar a TGF β de la decorina. Este tipo de regulación proteolítica puede tener impacto significativo en la localización y actividad de TGF β . La producción y actividad elevadas de las MMP durante el proceso regenerativo puede participar en la remodelación de la matriz extracelular y también coordinar la liberación del TGF β . El factor

TGF β es un mediador de la deposición de la matriz que actúa como una de las señales de frenado de la división de los hepatocitos.

La **IL-1 β** es una citoquina asociada a la superficie celular como proteína precursora, que se activa por proteólisis y está implicada en la finalización del crecimiento de los hepatocitos [69]. Esta proteólisis puede ocurrir como proceso intracelular por el enzima convertidor de IL-1 β (ICE) o la caspasa o como proceso extracelular por proteasas, tales como serina proteasas, tripsina, quimiotripsina, elastasa y las metaloproteinasas MMP-2, -3 y -9 [70]. La exposición prolongada de la IL- β a la MMP-3 degrada esta citoquina. La familia de receptores IL-1 también se desprende, y los IL-1R solubles presentan efectos agonistas y antagonistas sobre la actividad IL-1. Así que las dos citoquinas identificadas en la finalización del crecimiento, TGF β e IL-1 β , están sujetas a regulación por proteólisis que modula su actividad.

CONCLUSIONES

Dada la diversidad de moléculas modificadas por proteólisis extracelular, las alteraciones en este proceso han de causar impacto en diversas enfermedades hepáticas. Defectos en la regeneración hepática se muestran en enfermedades tales como fibrosis, cirrosis, hepatitis crónica, toxicidad hepática y hepatocarcinoma. La fibrosis y la cirrosis se asocian con elevación en la actividad de los inhibidores TIMP y con expresión reducida de las metaloproteasas. Se sabe que las metaloproteasas regulan la inflamación y de esa manera juegan un papel en la patogénesis de la hepatitis crónica. Se sugiere que una respuesta mitogénica óptima es necesaria para hacer frente a la hepatotoxicidad, en la cual la proteólisis pericelular puede tener un impacto significativo en el desarrollo del carcinoma hepatocelular. Por tanto, la identificación del papel de las proteasas en la proliferación y supervivencia de los hepatocitos permitirá la mejora de las estrategias en el diseño de los tratamientos clínicos.

ABREVIATURAS

ADAM, desintegrina metaloproteasa, EGF, factor de crecimiento epidérmico; FGF, factor de crecimiento de fibroblastos, Flk1, receptor del VEGF; GAG, glicosaminoglicanos; HGF, factor de crecimiento de hepa-

tocitos (*scatter factor*); HSPG, proteoglicano heparán sulfato; ICE, enzima convertidor de la IL-1 β ; IGF, factor de crecimiento insulínico; IGFBP, proteína de unión al factor insulínico; MEC, matriz extracelular; MET, receptor del HGF, MMP, metaloproteinasas; MT-SPI, matriptasa; NF κ B, factor nuclear kappa B; PAI, inhibidor de la activación del plasminógeno PCNA, antígeno nuclear de proliferación celular; TACE, enzima convertidor del TNF alfa; TGF β , factor de crecimiento transformante beta; TIMP inhibidor tisular de las metaloproteinasas; TNF, factor de necrosis tumoral; tPA, serina proteasas activadoras del plasminógeno tipo tisular; uPA, serina proteasas activadoras del plasminógeno tipo uroquinasa; uPAR, receptor de la uroquinasa activadora del plasminógeno; VEGF, factor de crecimiento vascular endotelial.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cascales, M. (2001): Mecanismos de hepatotoxicidad. Real Academia de Doctores, Madrid, pp. 242-245.
2. Martínez-Hernández, A., y Amenta, P. S. (1995): The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J* **9**, 1401-1410.
3. Kim, T. H.; Mars, W. M.; Stolz, D. B.; Petersen, B. E., y Michalopoulos, G. K. (1997): Extracellular matrix remodelling at the early stages of liver regeneration in the rat, *Hepatology* **26**, 896-904.
4. Rudolph, K. L.; Trautwein, C.; Kubicka, S., Rakemann, T., *et al.* (1999): Differential regulation of extracellular matrix synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats, *Hepatology* **30**, 1159-166.
5. Martínez-Hernández, A., y Amenta, P. S. (1993): Morphology, localization, and origin of the hepatic extracellular matrix. En: *Extracellular Matrix: Chemistry, Biology, and Pathobiology with Emphasis on the Liver* (eds. Zem, M. A., y Reid, L.), pp. 255-327, Marcel Dekker. New York.
6. Olsen, B. R., y Ninomiya, Y. (1993): Collagens. *Guidebook to the extracellular matrix and adhesion proteins* (eds. Kreis, T., y Vale, R.), pp. 32-47. Oxford University Press, Oxford.
7. Schuppan, D. (1990): Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins, *Semin. Liver Dis* **10**, 1-10.
8. Sandberg, L. B.; Soskel, N. T., y Leslie, J. C. (1981): Elastin structure, biosynthesis, and relation to disease states. *N Engl J Med* **304**, 566-579.
9. Ilynes, R. O. (1987): Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* **48**, 549-554.

10. Alhelda, S. M., y Buck, C. A. (1990): Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* **4**, 2868-2880.
11. Oldberg, A., y Ruoslahti, E. (1986): Evolution of the fibronectin gene. Exon structure of cell attachment domain. *J Biol Chem* **261**, 2113-2116.
12. Odermatt, E.; Tatnkun, J. W., y Hynes, R. O. (1985): Repeating modular structure of the fibronectin gene: relationship to protein structure and subunit variation. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 6571-6575.
13. Amenta, P. S.; Clark, C. C., y Martínez-Hernández, A. (1983): Deposition of fibronectin and laminin in the basement membrane of the rat parietal yolk sac: immunohistochemical and biosynthetic studies. *J Cell Biol* **96**, 104-111.
14. Van Eyken, P.; Scio, R., y Desmet, V. J. (1990): Expression of a novel extracellular matrix component tenascin in normal and diseased human liver. *J Hepatol* **11**, 43-52.
15. Iozzo, R. V. (1985): Proteoglycans: structure, function and role in neoplasia, *Lab Invest* **53**, 373-396.
16. MacAthur, J. M.; Bishop, J. R.; Stanford, K. I., Wang, L. *et al.* (2007): Liver heparan sulphate proteoglycans: old molecules provide new insights on lipoprotein metabolism, *Hepatology* **45**, 1078-1080.
17. Iozzo, R. V. (1994): Perlecan: a germ of a proteoglycan. *Matrix Biol* **14**, 203-208.
18. Chung, A. E.; Dong, L. J.; Wu, C. *et al.* (1993): Biological functions of entactin. *Kidney Int* **43**, 13-19.
19. Amenta, P. S.; Gil, J., y Martínez-Hernández, A. (1988): Connective tissue of rat lung. II: Ultrastructural localization of collagen types III, IV, and VI. *Histochem. Cytochem.* **36**, 1167-1173.
20. Yurchenco, P. D., y Ruben, C. C. (1988): Type IV collagen lateral associations in the EHS tumor matrix: comparison with amniotic and in vitro networks. *Am J Pathol* **132**, 278-291.
21. Mynderse, L. A.; Hassell, J. R.; Kleinman, H. K.; Martin, G. R., *et al.* (1983): Loss of heparan sulfate proteoglycan from glomerular basement membrane of nephrotic rats. *Lab Invest* **48**, 292-302.
22. Friedman, S. L.; Roll, F. J.; Boyles, J., y Bissell, D. M. (1985): Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 8681-8685.
23. Sato, M.; Suzuki, S., y Senoo, H. (2003): Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct* **28**, 105-112.
24. Martínez-Hernández, A.; Delgado, F. M., y Amenta, P. S. (1991): The extracellular matrix in hepatic regeneration. Localization of collagen types I, III, IV, laminin and fibronectin. *Lab Invest* **64**, 157-166.

3. MATRIZ EXTRACELULAR Y PROTEASAS

25. Martínez-Hernández, A., y Amenta, P. S. (1993): The hepatic extracellular matrix. I. Components and distribution its normal liver *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **423**, 1-11.
26. Modis, L., y Martínez-Hernández, A. (1991): Hepatocytes modulate the hepatic microvascular phenotype, *Lab Invest* **65**, 661-670.
27. Schwoegler, S.; Neubauer, K.; Kisittel, T.; Chung, A. E., y Ransadlori, C. (1994): Entactin gene expression its normal and fibrotic rat liver and in rat liver cells. *Lab Invest* **70**, 525-536.
28. Fausto, N. (2001): Liver regeneration: from laboratory to clinic. *Liver Transpl* **7**, 835-844.
29. Michalopoulos, G. K., y DeFrances, M. C. (1997): Liver regeneration, *Science* **276**, 60-66.
30. Nishio, T.; Iimuro, Y.; Nitta, T.; Harada, N. *et al.* (2003): Increased expression of collagenase in liver induces hepatocyte proliferation with cytoplasmic accumulation of beta catenin in the rat. *J Hepatol* **38**, 468-475.
31. Issa, R.; Zhou, X.; Trim, N., Millward-Sadler, H. *et al.* (2003): Mutation in collagen-1 that confers resistance to the action of collagenase results in failure of recovery from CCl₄-induced liver fibrosis, persistence of activated hepatic stellate cells and diminished hepatocyte regeneration. *FASEB J* **17**, 47-49.
32. Haruyama, T.; Ajioka, I.; Akaike, T., y Watanabe, Y. (2000): Regulation and significance of hepatocyte-derived matrix metalloproteinases in liver remodeling. *Biochem Biophys Res Commun* **272**, 681-686.
33. Etienne, P. L.; Baffer, G.; Desvergne, B.; Boissard-Rissel, M.; Glaire, D., y Guguen-Guillouzo, C. (1988): Transient expression of c-fos and constant expression of c-myc in freshly isolated and cultured normal rat hepatocytes. *Oncogene Res* **3**, 255-262.
34. Serandour, A. L.; Loyer, P.; Garnier, D.; Courselaud, B., *et al.* (2005): TNF alpha-mediated extracellular matrix remodeling is required for multiple division cycles in rat hepatocytes. *Hepatology*. **41**, 478-486.
35. Egeblad, M., y Werb, Z. (2002): New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **2**, 161-174.
36. Mohammed, F. F.; Smookler, D. S., y Khokha, R. (2003): Metalloproteinases, inflammation and rheumatoid diseases *Ann Rheum Dis* **62**, 43-47.
37. Hojilla, C. V.; Mohammed, F. F., y Khoda, R. (2003): Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. *Br J Cancer* **89**, 817-821.
38. Mohammed, F. F.; Pennington, C. J.; Kassiri, Z.; Rubin, J. S., *et al.* (2005): Metalloproteinase inhibitor TIMP-1 affects hepatocyte cell cycle via HGF activation in murine liver regeneration. *Hepatology* **41**, 857-867.

39. Cressman, D. E.; Greenbaum, L. E.; Haber, B. A., y Taub, R. (1994): Rapid activation of post-hepatectomy factor/nuclear factor kappa B in hepatocytes, a primary response in the regenerating liver. *J Biol Chem* **269**, 30429-30435.
40. Cresman, D. E.; Diamond, R. H., y Taub, R. (1995): Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration. *Hepatology* **21**, 1443-1449.
41. Amour, A.; Slocombe, P. M.; Webster, A., Butler, M., *et al.* (1998): TNF-alfa converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS lett* **435**, 39-44.
42. Mohammed, F. F.; Taylor, S. E. M.; Sánchez, O. H.; Smookler, D. S., *et al.* (2004): Abnormal TNF activity in *Timp-3^{-/-}* mice leads to chronic hepatic inflammation and failure of liver regeneration. *Nat Genet* **36**, 969-977.
43. Bladt, F.; Riethmacher, D.; Isenmann, S.; Aguzzi, A., y Birchmeier, C. (1995): Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud, *Nature* **376**, 768-771.
44. Schmidt, C.; Bladt, F.; Goedcke, S.; Brinkmann, V., *et al.* (1995): Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for the liver development. *Nature* **373**, 699-702.
45. Naldini, L.; Tamagnone, L.; Vigna, E.; Sachs, M., *et al.* (1992): Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J* **11**, 4825-4883.
46. Mars, W. M.; Zarnegar, R., y Michalopoulos, G. K. (1993): Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activator uPA and tPA. *Am J Pathol* **143**, 949-958.
47. Shimomura, T.; Miyazawa, K.; Komiyama, Y.; Hiroda, H., *et al.* (1995): Activation of hepatocyte growth factor by two homologous proteases, blood coagulation factor XIIa and hepatocyte growth factor activator. *Eur J Biochem* **229**, 257-261.
48. Mohammed, F. F., y Khokha, R. (2005): Thinking outside the cell. *Trends Cell Biol* **15**, 555-563.
49. Lee, S. L.; Dickson, R. B., y Lin, C. Y. (2000): Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease, *J Biol Chem* **275**, 36720-36725.
50. Black, R. A., *et al.* (1997): A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells, *Nature* **385**, 729-733.
51. Padiaditakis, P.; López-Talavera, J. C.; Petersen, B.; Monge, S. P., y Michalopoulos, G. K. (2001): The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat, *Hepatology* **34**, 688-693.

3. MATRIZ EXTRACELULAR Y PROTEASAS

52. Shimomura, T.; Kondo, J.; Ochiai, M.; Naka, D. *et al.* (1993): Activation of the zymogen of hepatocyte growth factor activator by thrombin, *J Biol Chem* **268**, 22927-22932.
53. Nath, D.; Williamson, N. J.; Jarvis, R., y Murphy, G. (2001): Shedding of c-Met is regulated by crosstalk between a G-protein coupled receptor and the EGF receptor and is mediated by a TIMP-3 sensitive metalloproteinase, *J Cell Sci* **114**, 1213-1220.
54. Kiso, S.; Kawata, S.; Tamura, S., Inui, Y. *et al.* (2003): Liver regeneration in heparin-binding EGF-like growth factor transgenic mice after partial hepatectomy, *Gastroenterology* **124**, 701-707.
55. Lee, D. C.; Sunnarborg, S. W.; Hindle, C. L., y Myers, T. J. (2003): TACE/ADAM17 processing of EGFR ligands indicates a role as a physiological convertase, *Ann NY Acad Sci* **995**, 22-38.
56. Russell, W. E.; Kaufmann, W. K.; Sitaric, S.; Luetkeke, N. C.; y Lee, D. C. (2003): Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor- α -targeted mice, *Mol Carcinog* **15**, 183-189.
57. Luetkeke, N. C., y Lee, D. C. (1990): Transforming growth factor α : expression, regulation and biological action of its integral membrane precursor. *Semin Cancer Biol* **1**, 265-275.
58. Asakura, M.; Kitakaze, M.; Takashima, S.; Liao, Y., *et al.* (2002): Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med* **8**, 35-40.
59. Kraizer, Y.; Mawasi, N.; Seagal, J.; Paizi, M. *et al.* (2001): Vascular endothelial growth factor and angiopoietin in liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* **287**, 209-215.
60. LeCouter, J., *et al.* (2003): Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1, *Science* **299**, 890-893.
61. Ruhrberg, C. (2003): Growing and shaping the vascular tree: multiple roles for VEGF, *BioEssays* **25**, 1052-1060.
62. Ehrbar, M.; Djonov, V. G.; Schnell, C.; Tschanz, S. A., *et al.* (2004): Cell-demanded liberation of VEGF121 from fibrin implants induces local and controlled blood vessel growth, *Circ Res* **94**, 1124-1132.
63. Ornitz, D. M. (2000): FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development, *BioEssays* **22**, 108-112.
64. Aviezer, D.; Hecht, D.; Safran, M.; Eisinger, M., *et al.* (1994): Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis, *Cell* **79**, 1005-1013.

65. Levi, E.; Fridman, R.; Miao, H. Q.; Ma, Y. S., *et al.* (1996): Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 7069-7074.
66. Martin, D. C.; Fowlkes, J. L.; Babic, B., y Khoskha, R. (1999): Insulin-like growth factor II signaling in neoplastic proliferation is blocked by transgenic expression of the metalloproteinase inhibitor TIMP-1, *J Cell Biol* **146**, 881-892.
67. Coppock, H. A.; White, A.; Aplin, J. D., y Westwood, M. (2004): Matrix metalloprotease-3 and -9 proteolyse insulin-like growth factor binding protein-1. *Biol Reprod* **71**, 438-443.
68. Khalil, N. (2001): Post translational activation of latent transforming growth factor beta (L-TGF-beta): clinical implications, *Histol Histopathol* **16**, 541-551.
69. Black, R. A.; Kronheim, S. H.; Cantrell, M.; Deeley, M. C., *et al.* (1988): Generation of biologically active interleukin-1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor, *J Biol Chem* **263**, 9437-9442.
70. Kostura, M. J.; Tocci, M. J.; Limjuco, G.; Chin, J. *et al.* (1989): Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity, *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 5227-5231.

4. Vías que intervienen en la regeneración hepática

INTRODUCCIÓN

Durante la regeneración hepática posthepatectomía del 70% del hígado, los hepatocitos normalmente quiescentes sufren una o dos rondas de replicación para restaurar la masa hepática por un proceso de hiperplasia compensatoria. Un gran número de genes se encuentran implicados en este complejo proceso, pero en el circuito esencial requerido intervienen una serie de vías que pueden definirse como *iniciadoras*, *inductoras* y *metabólicas*.

Característica de estas vías es la existencia de redundancia entre los componentes intracelulares de cada una de ellas y de una serie de intrincadas interacciones, de tal manera que la pérdida de función de un solo gen no suele conducir al completo bloqueo del proceso regenerativo. Ningún ratón modificado en un solo gen ha mostrado 100% de mortalidad o un bloqueo total de la replicación del DNA después de la hepatectomía parcial de los dos tercios del hígado. En la iniciación de este proceso juega un importante papel el sistema inmune innato, ya que las citoquinas y sus receptores, que participan en estos mecanismos proceden de este sistema. Los hepatocitos, una vez que han sido iniciados por las citoquinas, están preparados para responder a los factores del crecimiento y entrar en el ciclo celular. Posiblemente, la mayor demanda metabólica reconocida por los hepatocitos del hígado regenerante está ligada a la maquinaria que interviene en su replicación, que puede funcionar como un sensor que calibra la respuesta regenerativa de acuerdo con los requerimientos del organismo. Después de la hepatectomía parcial, la respuesta regenerativa se verifica por la replicación de los hepatocitos remanentes. Sin embargo, la repoblación del hígado después de un fallo agudo depende, a veces, de

la diferenciación de células progenitoras. Tales células, están presentes también en enfermedades hepáticas crónicas, pero su contribución a la producción de hepatocitos en estas condiciones no está del todo clara.

El conocimiento relacionado con las vías implicadas en la regeneración hepática ha experimentado muchos cambios. La opinión original era que un solo agente humoral funcionaba como llave capaz de poner en funcionamiento todos los eventos requeridos para el proceso. Posteriormente se consideró que el mecanismo responsable de la regeneración era la activación de una vía que implicaba múltiples componentes. La opinión actual ha llegado a proponer que se necesita la intervención de múltiples vías para que se verifique la regeneración hepática [1-3]. Esta última formulación es una simplificación de una realidad aún más compleja, pues las vías múltiples requeridas no actúan de manera independiente unas de otras. Las interacciones son complejas porque implican modos de operación simultáneos o secuenciales, que se verifican en diferentes tipos de células hepáticas y están presentes en ciertas fases de la regeneración.

REGENERACIÓN HEPATICA POSTHEPATECTOMÍA, CRECIMIENTO COMPENSATORIO

La mayoría de resultados obtenidos recientemente se basan en estudios de hepatectomía parcial en ratones modificados genéticamente. La técnica original de hepatectomía parcial originalmente utilizada por Higgins y Anderson en 1931 [4], ha sido modificada para hacerla más reproducible y se ha observado en ratón que la ligadura y excisión de los lóbulos izquierdo y medio causa, a veces, necrosis en el lóbulo derecho remanente, posiblemente por obstrucción vascular [5]. En terminos biológicos regeneración significa la reconstitución de una estructura que ha sufrido una resección, tal como la restauración completa de un miembro perdido en el que se incluyen músculo, piel, vasos sanguíneos, etc. La regeneración de un miembro comienza con la formación de un blastema en la superficie seccionada, que contiene células desdiferenciadas con amplio potencial de diferenciación [6]. Sin embargo, la «regeneración hepática» después de hepatectomía parcial es un proceso en el cual no se recuperan las partes escindidas. En este caso, el hígado remanente expande su masa para compensar el tejido perdido, de manera que este proceso no supone un crecimiento regenerativo sino un crecimiento compensatorio.

4. VÍAS QUE INTERVIENEN EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

Respecto al origen de las células que reemplazan los hepatocitos perdidos hay que hacer una distinción entre el crecimiento después de la hepatectomía o después de la lesión causada por un agente hepatotóxico o vírico que origina necrosis del parénquima hepático [7, 8]. Después de hepatectomía parcial o de la lesión hepática causada por CCl_4 o tioacetamida, la masa hepática se recupera por replicación de los hepatocitos existentes, sin activación del compartimento de células progenitoras [9, 10]. La pérdida de masa hepática por necrosis inducida por agentes hepatotóxicos lleva consigo una respuesta inflamatoria, en la cual los fagocitos residentes y los circulantes eliminan los residuos celulares, seguida por la respuesta regenerativa. En la regeneración hepática después de la pérdida de células parenquimáticas inducida por otras toxinas, tales como la galactosamina, la replicación y diferenciación se realiza por células progenitoras intrahepáticas [11]. El grado de contribución de estas células a la regeneración hepática es variable según la intensidad de la lesión, la dosis de los agentes hepatotóxicos u otras condiciones experimentales. Es importante mencionar aquí que no se han encontrado evidencias convincentes que apoyen que la médula ósea genere un número significativo de hepatocitos en los procesos de crecimiento fisiológico o patológico *in vivo* [8]. Por el contrario, las células originarias de la médula ósea pueden generar el 20% o más de células endoteliales y otras células no parenquimáticas durante la regeneración hepática [12].

INTENSIDAD Y MOMENTO DE LA REGENERACIÓN

La intensidad y el momento de la regeneración hepática experimentan variaciones relativas a los ritmos circadianos. Un estudio reciente ha identificado un mecanismo mediante el cual estos ritmos controlan la proliferación de los hepatocitos después de la hepatectomía parcial [13, 14]. El valor máximo de replicación del DNA en ratón, después de la hepatectomía parcial se detectó a las 36 horas de la operación, sin contar para nada la hora del día en la que se realizó dicha operación. Sin embargo, la entrada en mitosis de las células que habían replicado su DNA (células en G2), siempre ocurrió a la misma hora del día. Este hallazgo indica la existencia de un reloj circadiano que controla la transición G2/M. Se responsabiliza a la quinasa WEE1 de actuar como regulador circadiano de la división celular. Esta quinasa fosforila la quinasa CDK2, eliminando la actividad del complejo CDK2/ciclina B1 que participa en la mitosis de los hepatocitos. La expresión del gen *wee1* sigue un ciclo circadiano, de

manera que la entrada de las células G2 en mitosis cambia de manera inversa a la concentración de WEE1. Este estudio está de acuerdo con otros realizados en ratones knockout *Forkhead boxM 1b* (*FoxM1b*), que muestran un déficit en la replicación del DNA después de la hepatectomía parcial. FoxM1B regula la entrada en la fase M coordinando la inducción de la ciclina B1 y la activación de la fosfatasa Cdc25B que desfosforila CDK2 [15]. Una contrapartida a estas observaciones es que el momento en el que se inicia la replicación del DNA, que no está bajo el control de los ritmos circadianos, parece ser una propiedad intrínseca de los hepatocitos. Weglarz y Sandgren [16] trasplantaron hepatocitos de rata en hígado de ratón que había sufrido hepatectomía parcial y encontraron que los hepatocitos de rata se replicaban antes que los de ratón en el hígado quimérico resultante. Estos datos indican que el momento de la replicación de los hepatocitos es autónomo, está gobernado por señales intrínsecas y es diferente en cada especie.

INICIACIÓN DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

Una amplia variedad de genes se expresa en las primeras horas después de la hepatectomía parcial (fase de iniciación); muchos de ellos intervienen en las vías activadas por las citoquinas. Las evidencias que demuestran la importancia de las citoquinas durante la fase de iniciación tienen su base en los siguientes datos:

- a) notable elevación en la concentración del mRNA del factor de necrosis tumoral (TNF) y de la interleuquina-6 (IL-6) en hígado y en suero [17];
- b) activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NFκB) y el transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3) [18, 19];
- c) inhibición de la replicación del DNA por anticuerpos anti-TNF [17];
- d) bloqueo de la regeneración hepática en ratones knockout en *IL-6* y receptor TNF tipo I (*TNFR1*) [20, 21]; y
- e) corrección del defecto en *TNFR1* en estos ratones knockout por administración intraperitoneal de IL-6 [21].

La cascada de las citoquinas se inicia mediante la unión del TNF a su receptor, TNFR1, lo que conlleva la activación del NFκB en células no

4. VÍAS QUE INTERVIENEN EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

parenquimáticas (células de Kupffer), producción de IL-6, y activación de STAT3 en hepatocitos (Figura 1). Un objetivo genético importante de STAT3 es el gen *SOCS3*, que actúa previniendo la activación de la señalización inducida por la IL-6, mediante la inhibición de la fosforilación de STAT3 [22].

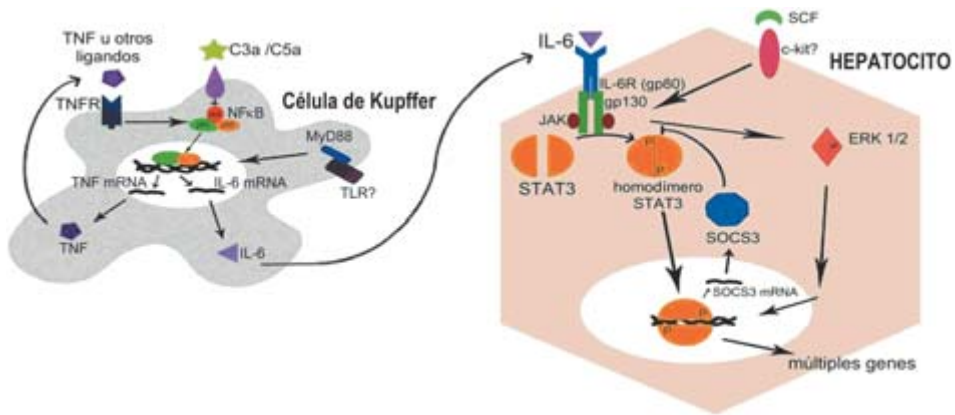


FIGURA 1. **Vías activadas por las citoquinas en la regeneración hepática.** Se muestran interacciones entre las células de Kupffer y los hepatocitos en hígado en regeneración (otras células no parenquimáticas también pueden estar implicadas). El TNF se une a su receptor tipo I en las células de Kupffer, lo que conduce a la activación de NFκB. C3a, C5a y MyD88 pueden también activar al factor NFκB después de la hepatectomía parcial. Los genes *IL-6* y *Tnf* son objetivos de NFκB. La *IL-6* se libera en suero y se une a su receptor, un complejo de dos subunidades gp80 y gp130 en los hepatocitos. La activación de gp130 conduce a la fosforilación de los monómeros STAT3 por las quinasas asociadas a Janus (JAK). STAT3, una vez fosforilado, homodimeriza y se traslada al núcleo, donde induce la transcripción de una serie de genes entre los que se incluye el que codifica a la proteína *SOCS3*, cuya misión es inhibir la fosforilación de STAT3. *SCF* puede también activar a STAT3 después de la hepatectomía. Paralela a la fosforilación de STAT3, la activación de gp130 conduce a una cascada señalizadora que implica la fosforilación de *ERK1/2* y la regulación de la transcripción de múltiples genes necesarios para la regeneración hepática. *TNF*, factor de necrosis tumoral; *NFκB*, factor nuclear-kappa B; *MyD88*, factor mielóide de diferenciación 88; *IL-6*, interleuquina-6; *STAT3*, transductor de señales y activador de la transcripción 3; *SCF*, stem cell factor; *SOCS3*, supresor de la señalización por citoquinas 3 (Fausto, 2006) [1].

Otras evidencias que demuestran la importancia para la regeneración de las vías señalizadoras desencadenadas por las citoquinas, tienen su base en el hecho que algunas de ellas poseen capacidad de iniciar a los hepatocitos quiescentes para la división celular sin hepatectomía parcial. En hígado normal, los hepatocitos se encuentran en estado de reposo proliferativo (fase G0) y exhiben *in vitro* una respuesta mínima a mitógenos

potentes, tales como el factor transformante del crecimiento alfa ($TGF\alpha$), el factor del crecimiento epidérmico (EGF), y el factor del crecimiento de los hepatocitos (HGF). Sin embargo, la infusión de estos factores en ratas pretratadas con una sola inyección de $TNF\alpha$ induce la replicación del 40% de los hepatocitos en hígado normal [23].

Aunque no se discute la existencia de una red de citoquinas, en la que se incluyen los componentes mencionados anteriormente, que se activan inmediatamente después de la hepatectomía parcial, existen discrepancias respecto al papel preciso que juega cada una de ellas. El incremento de $TNF\alpha$ en suero no ha sido siempre observado, parece que es más elevado en ratas que en ratones y aunque los ratones knockout en el gen *TNFR1* que codifica el receptor $TNFR1$, tienen muchas deficiencias después de la hepatectomía parcial, los knockout en el gen *TNF* que codifica el factor TNF, parece que se regeneran normalmente [24]. Estos datos indican que el TNF por sí mismo no es necesario para la regeneración, porque otros ligandos, tales como la linfotoxina alfa ($LT\alpha$), pueden realizar su trabajo, señalizando a través de $TNFR1$. De hecho Knight y Yeoh han demostrado que la replicación del DNA en los hepatocitos después de la hepatectomía parcial se inhibe en ratones doble knockout *LT α /TNF* [25].

Es difícil definir qué papel juega la IL-6 en la regeneración hepática. Se calcula que casi el 40% de los genes tempranos inmediatos, que se expresan en hígado en regeneración, puede depender de la IL-6 [26]. La función primaria reconocida de la IL-6 en la regeneración era la activación de la proliferación, ya que los knockout IL-6 presentaban notables deficiencias en la replicación del DNA después de la hepatectomía parcial, pero datos posteriores han sugerido que la IL-6 también presenta otras actividades, como la antiapoptótica y la de promover la supervivencia de los hepatocitos [27-28]. Los efectos proliferativos de la IL-6 han sufrido un posterior escrutinio, pues algunos grupos han descrito que en ratones knockout IL-6 y en ratones deficientes en gp130 (un componente necesario del receptor de la familia de ligandos IL-6), no aparecen deficiencias en la replicación del DNA después de la hepatectomía parcial [39], lo cual contradice el estudio original antes mencionado [20]. Estas discrepancias pueden reflejar las diferencias en las condiciones experimentales: técnicas quirúrgicas, agentes anestésicos, la raza del animal o el mantenimiento del mismo. Además, parece que la concentración de IL-6 después de la hepatectomía parcial, es crítica en la determinación de sus efectos [29].

4. VÍAS QUE INTERVIENEN EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

El SCF (*stem cell factor*) y la oncostatina M (OSM) son dos moléculas que pueden modular los efectos de la IL-6 durante la regeneración hepática. El SCF restaura la replicación del DNA en ratones knockout *IL-6* después de la hepatectomía [30], y la administración de OSM puede corregir la deficiente regeneración observada en ratones knockout *IL-6* después de la lesión producida por CCl₄ [31]. Por el contrario, la IL-6 no puede restaurar la deficiente regeneración inducida por el CCl₄, que se observa en ratones deficientes del receptor OSM. Los efectos de estas citoquinas son redundantes, ya que cualquiera de ellas, IL-6, SCF y OSM, pueden en algún momento activar a STAT3, a través de vías señalizadoras intracelulares divergentes.

Otro estudio del grupo de Koniaris [32] ha observado efectos paradójicos de la IL-6 sobre la lesión y regeneración hepáticas. Estos autores han encontrado que la IL-6 puede funcionar de manera aguda mejorando la regeneración y reparación hepáticas, pero que exposiciones más crónicas, no sólo eliminan los efectos protectores sino que sensibilizan al hígado para padecer lesión y muerte. Por tanto, en ciertas enfermedades crónicas la IL-6 contribuye incrementando la probabilidad de fallo hepático después de la lesión.

SISTEMA IMMUNE INNATO Y VÍAS ACTIVADAS POR CITOQUINAS

Como las citoquinas, una vez activas, participan en la iniciación de la regeneración hepática, es importante identificar las vías implicadas en esta activación. El lipopolisacárido (LPS), que se libera desde las bacterias entéricas a la circulación portal, es uno de los candidatos más estudiados. De hecho, Cornell *et al.* [33] han encontrado que las ratas con producción restringida de LPS y los ratones poco sensibles a LPS (C3H/HeJ), presentan retraso en la regeneración después de la hepatectomía. La resistencia al LPS de los ratones C3H/HeJ [34], ocurre como consecuencia de una mutación puntual en el gen que codifica el receptor Toll-like4 (TLR4), un miembro de la clase de receptores que se une a varios productos microbianos. La unión de LPS a TLR4 activa múltiples vías señalizadoras intracelulares, algunas de las cuales dependen del factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88), proteína adaptadora que media las señales intracelulares procedentes de varios TLR [35]. En oposición a la hipótesis que propone que el LPS es la clave iniciadora de la regeneración, experimentos en

ratones C3H/HeJ y en ratones knockout en el gen que codifica el receptor Toll-like4, *TLR4*, no mostraron anomalías después de la hepatectomía parcial. Ratones deficientes en *TLR2*, *TLR9* o *CD14*, no presentaron anomalías en la activación de las citoquinas ni en el proceso regenerativo post hepatectomía parcial. Por el contrario, en ratones knockout *Myd88* fracasó la activación del TNF y de la IL-6 [36]. La activación de STAT3 y la expresión de los genes activados por este factor de transcripción, tales como *SOCS3* y los genes de respuesta a la fase aguda, se bloquearon en estos knockout *Myd88*, después de la hepatectomía. La identificación de los ligandos y los receptores que señalizan a través de MyD88, en las fases iniciales de la regeneración posthepatectomía, es hoy en día un desafío para los investigadores ya que conociendo estos factores se identificarán también las vías que inician la cascada de las citoquinas en la regeneración hepática.

Otros componentes del sistema inmune innato se cree que juegan también un papel crítico en la regeneración normal, pues ratones deficientes en los componentes del complemento C3 y C5 muestran deficiencias significativas en la regeneración hepática después de la hepatectomía parcial. En estos animales, la menor activación de las vías de las citoquinas se manifiesta por la falta de elevación en la concentración de TNF e IL-6, y por un desequilibrio en la actividad de NFκB y STAT3. No está aún claro de qué manera convergen estos aspectos de la inmunidad innata, TLR-MyD88 en la señalización y en la cascada del complemento, para iniciar las vías de señalización que inducen la generación de las citoquinas [37].

En un estudio del grupo de Nelson Fausto [38] se han investigado las vías señalizadoras que conducen a la producción de las citoquinas y han considerado que el LPS puede ser un candidato en la estimulación de la producción de citoquinas proinflamatorias después de la resección quirúrgica. Para determinar si LPS interviene en la regulación de TNF e IL-6 durante la fase de iniciación de los hepatocitos, estos autores utilizaron ratones carentes de los genes de los receptores del LPS *TLR4* y *TLR6* del coreceptor LPS el de *CD14* y el de la proteína adaptadora implicada en la mayoría de las vías TLR e IL1R, *MyD88*. En ratones knockout *MyD88* sometidos a hepatectomía parcial, las concentraciones de mRNA TNF hepático y de IL-6 circulantes estuvieron muy disminuidas cuando se compararon con las obtenidas en animales del tipo silvestre heterocigótico. También, en estas condiciones, se bloqueó la activación de STAT3 y de la expresión de tres genes sensibles a STAT3; *SOCS3*, *CD14* y el del amiloide sérico A2. Por el contrario, ratones knockout *TLR4*, *TLR2* y *CD14* no

mostraron deficiencias en la producción de IL-6. Sorprende aún más que ninguno de estos knockouts mostró retraso en la replicación de los hepatocitos. Estos datos indican que el receptor TLR4, como también el TLR2 y el CD14 no tienen misión alguna en la regulación de la producción de citoquinas o en la replicación del DNA después de la hepatectomía. Sin embargo, las vías que dependen de MyD88 parece que son las responsables de la producción de TNF α e IL-6 y de sus vías señalizadoras.

PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR

La red de citoquinas que interviene en la fase iniciadora de la regeneración hepática corresponde al paso de los hepatocitos quiescentes (reposo proliferativo) desde G0 a G1. Una vez que se ha verificado esta transición, la progresión del ciclo celular está dirigida por los factores de crecimiento los cuales, una vez superado el punto de restricción en la fase G1 del ciclo, alcanzan la fase S, de síntesis del DNA. La transición G1/S se asocia con la fosforilación de la proteína RB, con la expresión incrementada del miembro de la familia RB, p107, de las ciclinas D, E y A, y la formación de los complejos CDK4/ciclina D y CDK2/ciclina E [39].

El HGF y la familia de ligandos que se une al receptor EGF (EGFR), son factores de crecimiento que impulsan la progresión del ciclo celular durante la regeneración hepática [40]. HGF se produce por las células mesenquimáticas y actúa sobre los hepatocitos de manera paracrina o endocrina. Sus efectos son múltiples y entre ellos se pueden distinguir los morfogénicos, los motogénicos y los mitogénicos. Se han realizado estudios sobre la regeneración hepática en ratones con supresión específica en hepatocitos del *c-MET*, el gen que codifica el receptor HGF [41]. Borowiak *et al.* [58] han demostrado que la señalización inducida por HGF/c-MET es esencial para la entrada en el ciclo celular después de la hepatectomía parcial, y que es la responsable de la activación de la quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 (ERK1/2). Huh *et al.* [41] han descrito que ratones con hepatocitos deficientes en el gen *c-MET* sufrían mortalidad masiva después de la hepatectomía parcial y así podían examinar el papel de esta vía en otros modelos de lesión hepática. Esto demuestra que la señalización inducida por HGF/c-MET promueve hepatoprotección frente a la apoptosis y facilita la cicatrización de la necrosis hepatocelular inducida por CCl₄. La discrepancia en la supervivencia postoperatoria entre los dos últimos estudios se relaciona probablemente con las diferentes técnicas

quirúrgicas utilizadas por los dos grupos. Hasta el momento, y hasta que se disponga de resultados adicionales, no es posible decidir si la señalización mediada por HGF/c-MET funciona en la mitogénesis, o si su misión es la de mantener la homeostasis de los hepatocitos, facilitando así la replicación celular.

La familia de ligandos que se une a EGFR incluye, además del EGF (factor de crecimiento epidérmico), el TGF α (factor transformante del crecimiento alfa), el factor de crecimiento epidérmico unido a la heparina (HBEGF), y la anfiregulina (AR). TGF α es un factor autocrino, producido por los hepatocitos, activo sobre los mismos hepatocitos [42]. Ejerce sus efectos sobre la motilidad celular y la vascularización, pero su efecto principal es estimular la proliferación. Los ratones transgénicos que hiperexpresan TGF α , manifiestan una proliferación hepatocítica constitutiva que eventualmente puede conducir al cáncer. Aunque en ratones normales la expresión del gen *TGF α* se eleva después de la hepatectomía parcial, en ratones knockout *TGF α* no aparecen defectos en la regeneración hepática [43]. La regeneración normal observada en estos knockouts es probablemente una consecuencia de la compensación efectuada por otros ligandos de EGFR.

Después de la hepatectomía parcial, HBEGF se expresa antes que HGF y TGF α y parece que ejerce un papel único en la regeneración hepática [44]. La hepatectomía parcial del 30% del hígado, en comparación con la del 70%, dio como resultado una replicación del DNA retrasada y poco coordinada, a pesar de la activación de la cascada de las citoquinas [45]. Una sola inyección de HBEGF, 24 horas después de la hepatectomía parcial del 30%, pudo superar este bloqueo entre la iniciación y la progresión del ciclo celular, produciendo una ronda de replicación del DNA. Es curioso observar que este efecto no se produjo cuando se administró HGF o TGF. Además los ratones knockout *HBEGF* mostraron un retraso en la replicación del DNA después de la hepatectomía del 70%, aunque este retraso se compensó parcialmente por un incremento anterior en la expresión del gen *TGF α* en estos animales.

La anfiregulina (AR) también parece contribuir a la regeneración, ya que los ratones carentes de este factor muestran una deficiencia significativa en la replicación del DNA después de la hepatectomía parcial [46, 47]. No se ha realizado una comparación directa entre la AR y otros ligandos del EGFR, pero es probable que los diferentes factores de crecimiento realicen misiones sobre la regeneración hepática, que se solapan parcialmente. La complejidad de la señalización a través del EGFR puede atribuirse

4. VÍAS QUE INTERVIENEN EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

al número de ligandos EGF implicados, a sus especificidades por diferentes receptores heterodiméricos y al matiz de la siguiente activación de las vías señalizadoras intracelulares [46].

Tanto c-MET como EGFR son receptores con actividad tirosina quinasa, los cuales reclutan enzimas y proteínas para fosforilar dominios intracelulares de cada receptor. Muchas vías señalizadoras se activan de esta manera, y una vez activadas regulan multitud de factores de transcripción, inician la traducción y regulan las vías metabólicas (Figura 2). Una vía señalizadora mitogénica interesante, que integra señales procedentes de citoquinas, a la vez que señales procedentes de factores de crecimiento, es la cascada Ras-Raf-MEK, que resulta de la activación de ERK1/2, la cual se relaciona con la replicación del DNA *in vivo* y la proliferación de hepatocitos *in vitro* [48]. Además, los factores de crecimiento HGF y TGF α y las citoquinas TNF e IL-6 estimulan la actividad de ERK1/2 en cultivos primarios y en líneas celulares de hepatocitos [49-50]. Una familia de ligandos de receptores, tirosina, el 1,2-bis [2-(3.5-dicloropiridiloxi)] benzeno (TCPOBOP), y el ácido retinoico, actúan como mitógenos primarios para los hepatocitos *in vivo*, ya que son capaces de inducir la replicación sin previa pérdida de tejido. El TCPOBOP, que se une al receptor constitutivo androstano (CAR), se ha demostrado que estimula la síntesis del DNA en hepatocitos de manera independiente de muchas moléculas que son críticas para la regeneración hepática post hepatectomía, tales como TNF, IL-6, NF κ B, STAT3 y ciclina D1 [51]. Sin embargo, no están del todo definidas las vías a través de las cuales la activación de CAR dirige la replicación de los hepatocitos.

Una serie de estudios de Columbano *et al.* [52], han observado que la proliferación de los hepatocitos en knockouts dobles *TNFR1*^{-/-} y *TNFR2*^{-/-}, que normalmente no responden a la regeneración inducida por cirugía [78, 79], podían ser estimulados por el ligando sintético de CAR, el TCPOBOP. En este caso la proliferación celular se verificaría sin intervención de los factores de transcripción NF κ B y STAT3. Estos datos indican que los agonistas CAR son potencialmente útiles para estimular la proliferación de los hepatocitos durante el trasplante de hígado de donantes subóptimos que normalmente no serían convenientes para el trasplante hepático. La inducción de la vía señalizadora Ras-MAPK por citoquinas (TNF α e IL-6) y factores de crecimiento (TGF α y HGF), es crítica para la activación de factores de transcripción inmediatos tempranos (AP1, C/EBP β , NF κ b y STAT3). Estos factores de transcripción regulan la expresión temporal de la subunidad reguladora de la ciclina 1 (Figura 3), la cual activa sus correspondientes

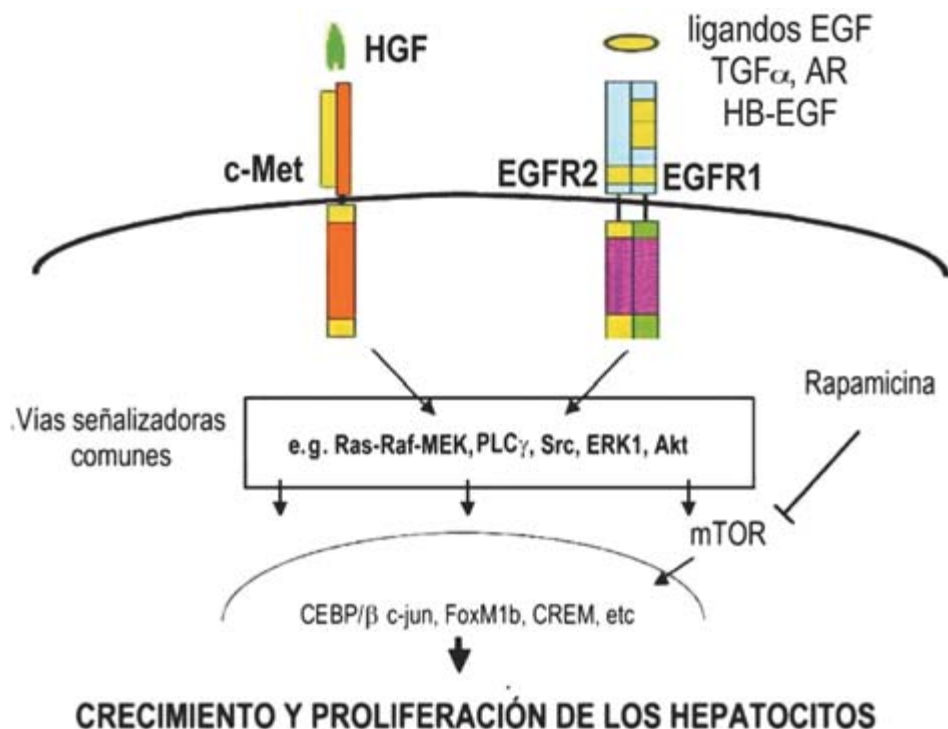


FIGURA 2. *Vías señalizadoras activadas por factores de crecimiento durante la regeneración hepática.* La estimulación de los receptores tirosina quinasa para HGF (c-Met) y de los ligandos EGF, TGF α , HB-EGF y AR (EGFR) activan numerosas vías señalizadoras intracelulares que regulan los factores de transcripción implicados en la regeneración hepática. mTOR y su inhibidor rapamicina modula el control traduccional de estas vías. HGF, factor de crecimiento hepatocítico; EGF, factor de crecimiento epidérmico; TGF α , factor transformante del crecimiento alfa; HB-EGF, EGF unido a la heparina; AR, anfirregulina; mTOR, objetivo de la rapamicina en mamíferos [1].

CDK 4, 6, mediante la formación de un complejo [53, 54]. La progresión hacia la fase S requiere la fosforilación de RB por CDK4/CDK6 en complejo con la ciclina D. La proteína RB fosforilada se disocia del factor de transcripción E2F el cual, una vez libre y activo estimula la transcripción de la ciclina E y otros genes promotores de la fase S [55]. La asociación de la ciclina E con CDK2 conduce a la hiperfosforilación de RB, lo cual estimula la progresión del ciclo celular hacia la fase S. Las proteínas inhibidoras de CDK (CDKI), p21^{Cip1} y p27^{Kip1}, regulan negativamente la actividad CDK mediante la formación de complejos proteicos. La fosforilación de estas proteínas inhibidoras CDKI por el complejo CDK2/ciclina E supone el marcaje para su degradación [81, 82]. La progresión G2/M requiere la ex-

4. VÍAS QUE INTERVIENEN EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

presión de la ciclina B1 y la activación del complejo CDK1-ciclina B, mediante la desfosforilación y activación de CDK1 por las fosfatasas Cdc25B y Cdc25C [55]. La expresión de las kinasas Polo-like y Aurora B tiene también lugar durante la fase G2 del ciclo celular y estas quinasas fosforilan proteínas que son críticas para la progresión de la mitosis [56, 57].

Utilizando ratones transgénicos o knockout se ha demostrado que la activación de factores de transcripción tempranos inmediatos es crítica para la activación transcripcional de los genes ciclina de la fase S y la expresión de proteínas implicadas en la supervivencia de los hepatocitos durante la regeneración hepática inducida por hepatectomía parcial. Estos factores de transcripción tempranos e inmediatos incluyen los genes *c-Myc*, *C/EBP β* , *Crem-1*, *c-Jun* y *STAT3*. La expresión de éstos se requiere para alcanzar niveles normales de las ciclinas D1, E, or B1 después de la hepatectomía parcial (Figura 3), mientras que c-Jun es necesario para la supervivencia de los hepatocitos durante la regeneración [1-3].

Los mitógenos primarios, anteriormente mencionados, tales como el TCPOBOP, inducen la proliferación de los hepatocitos, lo cual produce hiperplasia debido a un incremento de la replicación del DNA y de la masa hepática. TCPOBOP produce una respuesta proliferativa fuerte y rápida en hígado de ratón. Se ha demostrado que la iniciación de la replicación de los hepatocitos en respuesta a TCPOBOP ocurre con más rapidez que cuando se induce por hepatectomía parcial. También se ha demostrado que el tratamiento con TCPOBOP no induce muchos de los eventos iniciales que se creían que eran críticos para la regeneración hepática [58]. Ya se ha comentado que la activación de factores de transcripción latentes (NF κ B, STAT3), eleva la expresión de factores de transcripción inmediatos-tempranos (AP1, c-Myc, LRF1, egr1), e incrementa la síntesis de factores de crecimiento (TGFB α , HGF), todos ellos considerados esenciales para la regeneración hepática, pero ninguno de ellos se induce durante la proliferación de los hepatocitos mediada por CAR u otro receptor nuclear [59, 60] (Figura 4). El adelanto en la replicación del DNA de los hepatocitos, inducido por tratamiento con TCPOBOP, se debe a la estimulación más temprana de la expresión de la ciclina D1 en los hepatocitos proliferantes, lo que indica que el receptor nuclear CAR activa directamente la transcripción de la ciclina D1 sin comprometer a los factores de transcripción tempranos e inmediatos [61]. Sorprendentemente, el tratamiento con TCPOBOP en ratones ciclina D1^{-/-} mostró un retraso en la proliferación de los hepatocitos, pero ello causó un estímulo más tardío con un incremento compensatorio de la ciclina E [62].

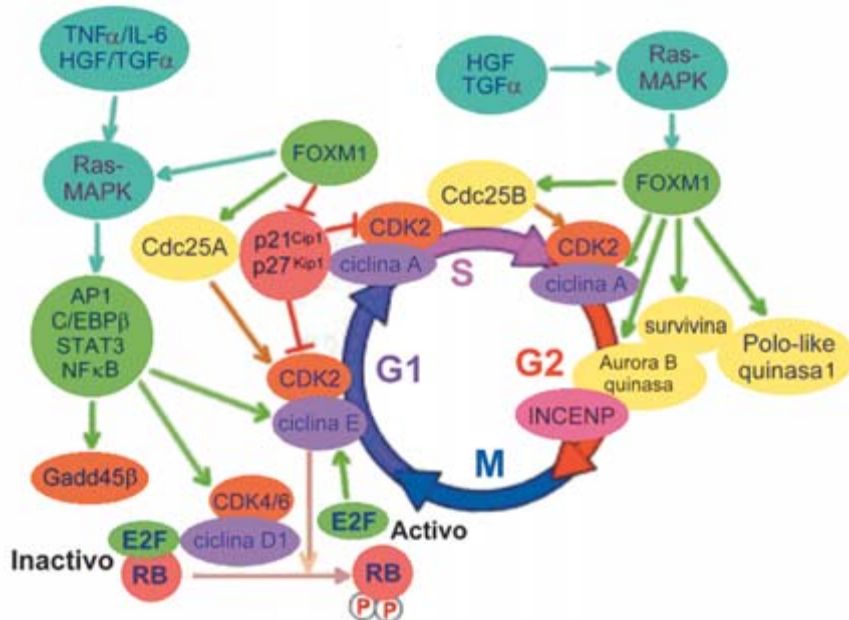


FIGURA 3. **Regulación de los genes del ciclo celular en hepatocitos en regeneración inducida por hepatectomía parcial.** Flechas azules, señalización ciclo celular; Flechas verdes, regulación positiva transcripcional; Flechas rojas: regulación negativa; Flechas naranjas, fosforilación; Flechas amarillas, desfosforilación. La inducción de la vía Ras-MAPK por las citoquinas (TNF α and IL-6) y los factores de crecimiento (TGF α y HGF) estimulan la expresión de factores de transcripción tempranos inmediatos (AP1, C/EBP β , NF κ B y STAT3), los cuales regulan la expresión de la ciclina D1, que activa las quinasas dependientes de ciclina 4 y 6 (Cdk 4, 6), mediante formación de complejo. La vía TNF α -NF κ B estimula la expresión del gen Gadd45 β implicado en la prevención de la apoptosis. Para la entrada en la fase S, se requiere que la proteína retinoblastoma (RB) sea fosforilada por Cdk4/Cdk6-ciclina D. RB fosforilada se disocia del factor de transcripción E2F, el cual, al quedar libre, estimula la transcripción de la ciclina E y otros genes promotores de la fase S. La asociación de la ciclina E con Cdk2 conduce a la hiperfosforilación de RB, estimulando así la progresión del ciclo celular. Las proteínas p21^{Cip1} y p27^{Kip1} (CDK1) regulan negativamente la actividad CDK mediante la formación de un complejo. La fosforilación de los CDK1 por el complejo Cdk2-ciclina E, se requiere para su degradación. Los hepatocitos en regeneración de ratones knockout Foxm1^{-/-} muestran niveles elevados de CDK1, lo que indica que Foxm1 controla la expresión de genes que regulan los niveles nucleares de estas proteínas CDK1. Foxm1 se requiere para la expresión de la fosfatasa promotora de la fase S, Cdc25A, que desfosforila a Cdk2 y activa Cdk2-ciclina E. Foxm1 es esencial para la progresión hacia la mitosis porque regula la transcripción de Cdk1 activando la transcripción de los genes que codifican la fosfatasa Cdc25B y la ciclina y los reguladores mitóticos Aurora B quinasa, survivina y Polo-like quinasa 1. La survivina forma un complejo con Aurora B quinasa y con la proteína interna del centrómero (INCENP), donde juega un papel crítico en la localización del complejo Aurora-B quinasa-INCENP en la región interna de los centrómeros cromosómicos en los estadios tempranos de la mitosis (Costa et al., 2005) [53].

4. VÍAS QUE INTERVIENEN EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

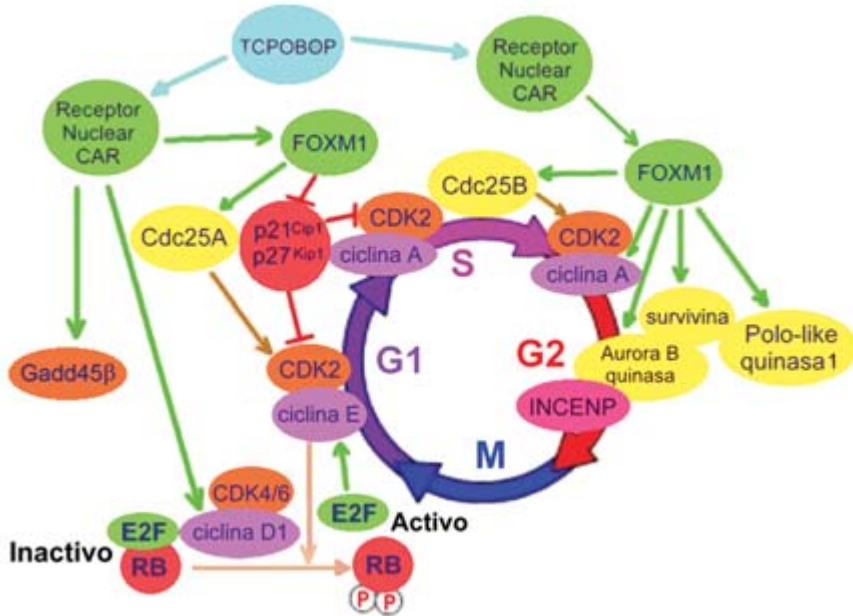


FIGURA 4. **Regulación de los genes del ciclo celular en hepatocitos en proliferación inducida por CAR.** El diagrama del ciclo celular se describe en la leyenda de la Figura 3. El receptor nuclear CAR evita la inducción de los factores de transcripción tempranos inmediatos y activa la expresión de ciclina D1 y el factor de transcripción Foxm1, ambos críticos para la progresión del ciclo celular, replicación del DNA y mitosis. El receptor nuclear CAR también estimula la expresión del gen Gadd45β, implicado en la prevención de la apoptosis (Costa et al., 2005) [53].

Aunque los ratones knockout *TNFR1*^{-/-} y los doble knockout *TNFR1*^{-/-} *TNFR2*^{-/-} no responden a la hepatectomía parcial, Columbano *et al.* han demostrado que TCPOBOP produjo una intensa proliferación de los hepatocitos en ratones deficientes en estos receptores, y que este fenómeno se asociaba con elevadas concentraciones de ciclina D1 [52]. Esta espectacular inducción de la proliferación indica que existe un diálogo negativo entre las vías señalizadoras TCPOBOP-CAR y TNFα-NFκB, ambas reguladoras de la proliferación de los hepatocitos. Por otro lado, se ha observado que la proliferación de los hepatocitos inducida por TCPOBOP, tanto en ratones normales como en los deficientes en TNFR se verificó sin inducción detectable de los factores de transcripción NFκB o STAT3 [52], factores que se inducen normalmente en hígado en regeneración post hepatectomía [1-3, 63]. Para examinar si las vías señalizadoras TNFα-NFκB y TCPOBOP/CAR son

diferentes, estos autores estudiaron la expresión de Gadd45 β /MyD118, un miembro de la familia Gadd45 β de factores inducibles por hepatectomía parcial y por tratamiento con TCPOBOP. Ellos demostraron que TCPOBOP indujo la expresión hepática de Gadd45 β de la misma manera que la hepatectomía parcial, tanto en ratones normales como en deficientes en TNFR y por tanto, la falta de activación de NF κ B no alteró la inducción de Gadd45 β mediada por CAR [52]. Posteriores estudios evaluaron la expresión genética inducida por TCPOBOP en ratones *CAR*^{-/-} y encontraron que los cambios inducidos en la expresión de genes, incluida la estimulación de Gadd45 β , desaparecieron completamente, ya que todas estaban mediadas vía activación del receptor nuclear CAR. Los resultados indican que en hígado, Gadd45 β se induce por una vía distinta que requiere CAR y es independiente de la vía TNF α /NF κ B.

Se ha demostrado que el tratamiento de ratones de doce meses con el agonista de CAR, el TCPOBOP, causó una elevación en la replicación y mitosis de los hepatocitos similar a la observada en ratones de dos meses [64]. La estimulación de la síntesis de DNA por TCPOBOP se asoció con una elevada expresión de varias proteínas relacionadas con el ciclo celular (ciclinas D1, A y B1, E2F, RB y p107), todas ellas exhibieron expresión comparable en ratones jóvenes y viejos. El tratamiento con TCPOBOP también elevó la expresión del factor de transcripción Forkhead Box M1 (FoxM1 or FoxM1B, conocido previamente como HFH-11B), en ratones jóvenes y restauró los niveles del mRNA FoxM1 en ratones viejos [64]. Se sabe que FoxM1 regula la transcripción de los genes requeridos para la progresión de los hepatocitos hacia la replicación y mitosis [15, 65, 66] y la expresión inducida de Foxm1 está severamente comprometida durante la regeneración en ratones viejos [67-69]. Además, el mantenimiento de FoxM1, sólo en hepatocitos de ratones viejos, fue suficiente para restaurar la síntesis de DNA, mitosis y la expresión de genes reguladores del ciclo celular a niveles encontrados en hígado de ratón en regeneración (Figura 3). La inducción de la expresión de FoxM1 por TCPOBOP en ratones viejos es así consistente con los niveles normales de la proliferación de los hepatocitos y reestablece la expresión de los genes reguladores del ciclo celular (Figura 4). Estos datos indican que FoxM1 es objetivo importante de la vía TCPOBOP-CAR que estimula la proliferación de los hepatocitos en ratones viejos.

Durante la regeneración hepática en ratón, la expresión de Foxm1 se induce hacia la mitad de la fase G1 y la expresión prematura de FoxM1 causa una replicación y mitosis más temprana de los hepatocitos y una

4. VÍAS QUE INTERVIENEN EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

anticipada expresión de los genes requeridos para entrar en la fase S y la mitosis. La supresión condicional del gen *FoxM1* en hepatocitos adultos de ratón han demostrado que este gen se requiere para conseguir elevados niveles de replicación del DNA en hepatocitos regenerantes y que es esencial para la mitosis [15, 69]. *Foxm1* se requiere también para la expresión de la fosfatasa *Cdc25A* y para disminuir la acumulación nuclear de los CDKI, *p21^{Cip1}* y *p27^{Kip1}* [15, 65, 69]. Para la entrada en mitosis, *FoxM1* regula la transcripción de *CDK1* activando la fosfatasa *Cdc25B* y la ciclina B1, y los reguladores mitóticos Aurora B quinasa, survivina y Polo Like quinasa 1, que fosforilan sustratos esenciales para la mitosis [65-67].

VÍAS METABÓLICAS EN LA REGENERACIÓN HEPATICA

La regeneración hepática, después de la hepatectomía parcial, es una respuesta perfectamente calibrada cuyo sensor aparente es la demanda de la función hepática. Ha sido difícil identificar los mecanismos moleculares que dan cuenta de la capacidad del hígado para modular su crecimiento de acuerdo a las necesidades del organismo. Sin embargo, el incremento en las demandas metabólicas, impuesto al hígado remanente después de la hepatectomía parcial, está probablemente conectado con la activación de la maquinaria implicada en la replicación del DNA.

La administración de una mezcla de aminoácidos a ratas intactas induce una oleada de replicación de los hepatocitos, por el contrario, la privación de proteínas bloquea la regeneración hepática después de la hepatectomía parcial [70]. Se ha observado que los aminoácidos regulan la proliferación de los hepatocitos a través de la expresión de la ciclina D. La iniciación de la traducción de las proteínas es un punto de control que tiene que integrar a los nutrientes y la energía con las señales mitogénicas. Después de la hepatectomía parcial, la actividad de la p70 S6 quinasa se eleva, y la activación de 4E-BP1 (represor traduccional) disminuye, lo que conduce a incrementos en la traducción. Estas dos proteínas son efectores de mTOR (objetivo de la rapamicina), que es parte de un complejo que percibe el *status* energético y de nutrientes y que también integra las señales de los factores de crecimiento, lo que resulta en la traducción de proteínas y en la proliferación celular [71]. La importancia de la traducción en la regeneración hepática se ha puesto de manifiesto en ratones knockout *S6* después de la hepatectomía parcial, donde se observó una completa pérdida de la replicación de los hepatocitos [72]. El complejo mTOR puede regular la rege-

neración hepática modulando el crecimiento celular y la proliferación en respuesta a las demandas energéticas del hígado remanente, dado que la rapamicina, un inhibidor de mTOR, inhibe la replicación del DNA después de la hepatectomía parcial [73]. Si esto ocurre, la regeneración hepática tiene un contrincante en este complejo, porque los mecanismos sensores de nutrientes en las células de mamíferos modulan el crecimiento celular dependiendo de la disponibilidad de estos nutrientes. Después de la hepatectomía parcial, el hígado remanente necesita mantener la homeostasis sistémica de nutrientes, mientras sus propias células sufren el crecimiento y proliferación.

INTERACCIÓN DE LAS DIFERENTES VÍAS

Aunque se ha comentado por separado las vías activadas por citoquinas, las activadas por factores de crecimiento y las metabólicas, todas ellas interaccionan entre sí después de la hepatectomía parcial, en las diferentes etapas de la regeneración. Una conexión importante que tiene lugar entre citoquinas y factores de crecimiento es la activación, por el TNF, de las metaloproteinasas de la matriz (MMP). La actividad de varias metaloproteinasas se eleva después de la hepatectomía parcial [74], y en un reciente estudio con ratones knockout *TIMP3* se implica a una MMP denominada enzima convertidora del $TGF\alpha$ (TACE, también conocida como ADAM17) [75]. *TIMP3* es un inhibidor específico de TACE, y los ratones knockout *TIMP3* muestran elevadas concentraciones de TGF y un adelanto en la entrada en la fase S, después de la hepatectomía parcial. Sin embargo, seis días después de la hepatectomía parcial, una porción de estos animales deficientes en el gen *TIMP3* mueren, posiblemente debido a la pérdida de la regulación de las vías señalizadoras TNF.

El grupo de Fausto ha demostrado que el mismo TNF activa a TACE, lo que origina la liberación de $TGF\alpha$, la activación de EGFR y la proliferación celular en hepatocitos en cultivo [49]. La activación secuencial de los receptores de las citoquinas y factores de crecimiento puede estimular numerosas vías señalizadoras intracelulares necesarias para la supervivencia celular y la proliferación (Figura 5). Como se ha demostrado que TACE rompe las formas precursoras de las citoquinas y entre ellas muchos ligandos de EGFR [76], como HBEGF, AR y $TGF\alpha$, se necesita profundizar en estos estudios para dilucidar su papel en la regeneración hepática.

4. VÍAS QUE INTERVIENEN EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

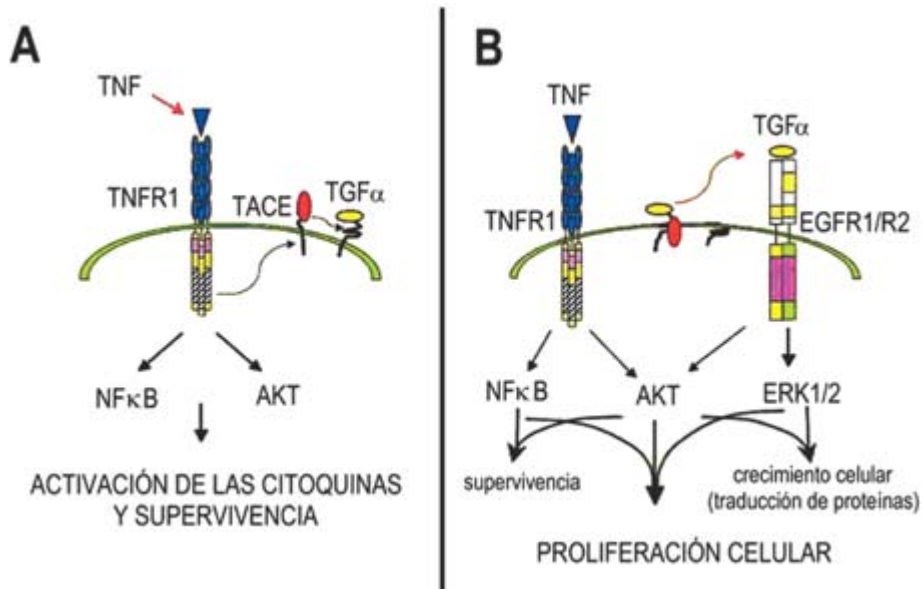


FIGURA 5. **Vías de activación del EGFR mediante actividad TACE.** La unión de TNF α su receptor TNFR activa NF κ B y AKT, estimulando la producción de citoquinas y las vías de supervivencia (panel izquierdo). El TNF activa también a TACE, que libera por hidrólisis a TGF α , que se encuentra inactivo unido a la membrana. El TGF α activo se une y activa a EGFR, un receptor tirosina quinasa, lo que conduce, a su vez, a la activación de ERK1/2 (panel derecho). La cooperación entre las citoquinas (TNF) y los factores de crecimiento (ligandos EGF), activa las vías señalizadoras necesarias para la supervivencia, crecimiento y proliferación de los hepatocitos. EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; TACE, enzima convertidor del TGF α ; NF κ B, factor nuclear kappa B; TNF, factor de necrosis tumoral; TGF α , factor transformante del crecimiento alfa; ERK1/2, quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 [1].

En un interesante estudio sobre la proliferación de hepatocitos cultivados con células epiteliales hepáticas, Serandour *et al.* [77] han mostrado que el EGF por sí solo no es capaz de iniciar la replicación de los hepatocitos, pero la exposición del sistema a EGF y TNF induce la replicación en un 30% de los hepatocitos. Estos autores demuestran que el efecto primario de TNF es activar las MMP, las cuales posteriormente degradan los componentes de la matriz extracelular, permitiendo así la proliferación de los hepatocitos. Este régimen de EGF y TNF es capaz de inducir repetidas rondas de replicación de los hepatocitos. Estos resultados están en consonancia con los anteriormente mencionados sobre las interacciones entre TNF y EGFR en la transducción de señales, y proporcionan un interesante sistema *in vitro* para estudiar la regeneración hepática.

CONCLUSIONES

Durante los últimos años ha surgido gran interés por el estudio de los mecanismos celulares y moleculares implicados en la regeneración hepática. Los científicos experimentales consideran que la regeneración hepática post hepatectomía constituye un modelo único para estudiar la transducción de señales y los acontecimientos del ciclo celular de una manera sincronizada. Desde la perspectiva clínica, el progreso en el conocimiento de los mecanismos que controlan la regeneración hepática es de importancia fundamental para el manejo y desarrollo de nuevas terapias en casos de enfermedades hepáticas agudas y crónicas (cirrosis). La interacción entre el conocimiento básico y los resultados clínicos está estrechamente conectada con estudios que tratan de células progenitoras hepáticas y de la repoblación del hígado durante el desarrollo y la enfermedad.

La regulación del crecimiento de hígados trasplantados, y particularmente el del hígado donante en el trasplante de donantes vivos, parece seguir los mismos principios de aquellos que regulan la regeneración hepática después de hepatectomía parcial en animales de laboratorio. Se necesitan aún mayores esfuerzos para aplicar el conocimiento adquirido en la investigación experimental a la resolución de problemas clínicos, tales como evitar el fracaso de trasplantes de pequeño tamaño, conseguir un crecimiento hepatocelular más rápido después del trasplante, etc. Otro asunto de gran repercusión clínica es la pérdida de la actividad replicativa de los hepatocitos en la progresión de la cirrosis [78]. Pudiera ser que los hepatocitos en las fases tardías de la cirrosis hayan agotado su capacidad replicativa. Si este fuera el caso, pudiera la senescencia replicativa de los hepatocitos contradecir los datos experimentales obtenidos por trasplante seriado en ratón en el que se demostró que los hepatocitos eran capaces de duplicarse hasta 80 veces [79]. Y, por último, habría que conseguir que la restauración de la capacidad proliferativa de los hepatocitos corrigiera las deficiencias funcionales sin riesgo de tumorigenesis.

ABREVIATURAS

AKT, proteína quinasa B, serina-treonina quinasa; AR, anfiregulina, ligando que se une al EGFR; CAR, receptor nuclear constitutivo androstano; Cdc25, Cdc fosfatasa; CDKI, inhibidor de las CDK; EGF, factor de crecimiento epidérmico; EGFR, receptor del EGF; ERK, quinasa regulada por señales extracelulares; FoxM1, forkhead box, factor de transcripción;

Gadd45 β factor inducible por hepatectomía parcial y por TCPOBOB mediado por CAR; GH, hormona del crecimiento; HBEGF, EGF unido a la heparina; HGF, factor de crecimiento de hepatocitos (*scatter factor*), IL-6, interleuquina 6, citoquina; INCENP, proteína interna del centrosoma; JAK, quinasa Janus; LPS, lipopolisacárido; cMET, receptor del HGF; MMP, metaloproteínasa; MyD88, factor de diferenciación mieloide 88; NF κ B, factor nuclear kappa B, factor de transcripción; OSM, oncostatina; TACE, ADAM17, enzima convertidora del TGF α ; SCF, *stem cell factor*; SOCS, supresor de la señalización mediada por citoquinas; STAT, transductor de señales y activador de la transcripción; TCPOBOP, 1,2-bis [2-(3.5-dicloropiridiloxi)] benzeno ligando sintético de CAR; TLR, receptor Toll Like; TNF, factor de necrosis tumoral; TNFR, receptor de TNF; mTOR, objetivo de la rapamicina; WEE1, quinasa que fosforila CDK2.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fausto, N.; Campbell, J. S., y Riele, K. J. (2006): Liver regeneration *Hepatology* **43**, S45-S53.
2. Michalopoulos, G. K. (2007): Liver regeneration. *J Cell Physiol*, **213**, 286-300.
3. Taub, R. Liver regeneration: from myth to mechanism (2004). *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 836-847.
4. Higgins, G. M., y Anderson, R. M. (1931): Experimental pathology of the liver. *Arch Pathol* **12**, 186-202.
5. Greene, A. K. y Puder, M. (2003): Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management. *J Invest Surg* **16**, 99-102.
6. Tanaka, E. M. (2003): Regeneration: if they can do it, why can't we? *Cell* **113**, 559-562.
7. Fausto, N., y Campbell, J. S. (2003): The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* **120**, 117-130.
8. Fausto, N. (2004): Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* **39**, 1477-1487.
9. Farber, J. L., y Gerson, R. J. (1984): Mechanisms of cell injury with hepatotoxic chemicals. *Pharmacol Rev* **36**, 71S-75S.
10. Díez-Fernández, C.; Boscá, L.; Fernández-Simón, L.; Álvarez, A., y Cascales, M. (1993): Relationship between DNA ploidy and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacetamide. *Hepatology* **18**, 912-918.

11. Lemire, J. M.; Shiojiri, N., y Fausto, N. (1991): Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by **D** -galactosamine. *Am J Pathol* **139**, 535-552.
12. Fujii, H.; Hirose, T.; Oe, S.; Yasuchika, K.; Azuma, H.; Fujikawa, T., *et al.* (2002): Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol* **36**, 653-659.
13. Matsuo, T.; Yamaguchi, S.; Mitsui, S.; Emi, A.; Shimoda, F., y Okamura, H. (2003): Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science* **302**, 255-259.
14. Schibler, U. (2003): Circadian rhythms. Liver regeneration clocks on. *Science* **302**, 234-235.
15. Wang, X.; Kiyokawa, H.; Dennewitz, M. B., y Costa, R. H. (2002): The Forkhead Box m1b transcription factor is essential for hepatocyte DNA replication and mitosis during mouse liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 16881-16886.
16. Weglarz, T. C., y Sandgren, E. P. (2000): Timing of hepatocyte entry into DNA synthesis after partial hepatectomy is cell autonomous. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 12595-12600.
17. Iwai, M.; Cui, T. X.; Kitamura, H.; Saito, M., y Shimazu, T. (2001): Increased secretion of tumour necrosis factor and interleukin 6 from isolated, perfused liver of rats after partial hepatectomy. *Cytokine* **13**, 60-64.
18. FitzGerald, M. J.; Webber, E. M.; Donovan, J. R., y Fausto, N. (1995): Rapid DNA binding by nuclear factor kappa B in hepatocytes at the start of liver regeneration. *Cell Growth Differ* **6**, 417-427.
19. Cressman, D. E.; Diamond, R. H., y Taub, R. (1995): Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration. *Hepatology* **21**, 1443-1449.
20. Cressman, D. E.; Greenbaum, L. E.; DeAngelis, R. A., *et al.* (1996): Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* **274**, 1379-1383.
21. Yamada, Y.; Kirillova, I.; Peschon, J. J., y Fausto, N. (1997): Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 1441-1446.
22. Campbell, J. S.; Prichard, L.; Schaper, F.; Schmitz, J., *et al.* (2001): Expression of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration. *J Clin Invest* **107**, 1285-1292.
23. Webber, E. M.; Bruix, J.; Pierce, R. H., y Fausto, N. (1998): Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. *Hepatology* **28**, 1226-1234.

4. VÍAS QUE INTERVIENEN EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

24. Hayashi, H.; Nagaki, M.; Imose, M.; Osawa, Y.; Kimura, K., *et al.* (2005): Normal liver regeneration and liver cell apoptosis after partial hepatectomy in tumor necrosis factor- α -deficient mice. *Liver Int* **25**, 162-170.
25. Knight, B., y Yeoh, G. C. (2005): TNF/LT α double knockout mice display abnormal inflammatory and regenerative responses to acute and chronic liver injury. *Cell Tissue Res* **319**, 61-70.
26. Li, W.; Liang, X.; Leu, J. I.; Kovalovich, K.; Ciliberto, G., y Taub, R. (2001): Global changes in interleukin-6-dependent gene expression patterns in mouse livers after partial hepatectomy. *Hepatology* **33**, 1377-1386.
27. Klein, C.; Wustefeld, T.; Assmus, U.; Roskams, T., *et al.* (2005): The IL-6-gp130-STAT3 pathway in hepatocytes triggers liver protection in T cell-mediated liver injury. *J Clin Invest* **115**, 860-869.
28. Wuestefeld, T.; Klein, C.; Streetz, K. L.; Betz, U., *et al.* (2003): Interleukin-6/glycoprotein 130-dependent pathways are protective during liver regeneration. *J Biol Chem* **278**, 11281-11288.
29. Zimmers, T. A.; McKillop, I. H.; Pierce, R. H.; Yoo, J. Y., y Koniaris, L. G. (2003): Massive liver growth in mice induced by systemic interleukin 6 administration. *Hepatology* **38**, 326-334.
30. Ren, X.; Hogaboam, C.; Carpenter, A., y Colletti, L. (2003): Stem cell factor restores hepatocyte proliferation in IL-6 knockout mice following 70% hepatectomy. *J Clin Invest* **112**, 1407-1418.
31. Nakamura, K.; Nonaka, H.; Saito, H.; Tanaka, M., y Miyajima, A. (2004): Hepatocyte proliferation and tissue remodeling is impaired after liver injury in oncostatin M receptor knockout mice. *Hepatology* **39**, 635-644.
32. Jim, X.; Zimmers, T. A.; Pérez, E. A.; Pierce, R. H.; Zhang, Z., y Koniaris, L. G. (2006): Paradoxical effects of short- and long-term interleukin-6 exposure on liver injury and repair. *Hepatology* **43**, 474-484.
33. Cornell, R. P.; Liljequist, B. L., y Bartizal, K. F. (1990): Depressed liver regeneration after partial hepatectomy of germ-free, athymic and lipopolysaccharide-resistant mice. *Hepatology* **11**, 916-922.
34. Poltorak, A.; He, X.; Smirnova, I.; Liu, M. Y., *et al.* (1998): Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-2088.
35. Akira, S.; Takeda, K., y Kaisho, T. (2001): Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**, 675-680.
36. Fausto, N. (2006): Involvement of the innate immune system in liver regeneration and injury. *J Hepatol* **45**, 347-349.

37. Campbell, J. S.; Riehle, K. J.; Brookling, J. T.; Bauer, R. L.; Mitchell, C., y Fausto, N. (2006): Proinflammatory cytokine production is *Myd88* dependent, but independent of *Cd14*, *Tlr2* and *Tlr4*. *J Immunol* **176**, 2522-2528.
38. Strey, C. W.; Markiewski, M.; Mastellos, D.; Tudoran, R., *et al.* (2003): The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *J Exp Med* **198**, 913-923.
39. Albrecht, J. H.; Poon, R. Y.; Ahonen, C. L.; Rieland, B. M., *et al.* (1998): Involvement of p21 and p27 in the regulation of CDK activity and cell cycle progression in the regenerating liver. *Oncogene* **16**, 2141-2150.
40. Matsumoto, K., y Nakamura, T. (1992): Hepatocyte growth factor: molecular structure, roles in liver regeneration, and other biological functions. *Crit Rev Oncogene* **3**, 27-54.
41. Huh, C. G.; Factor, V. M.; Sánchez, A.; Uchida, K.; Conner, E. A., y Thorgeirsson, S. S. (2004): Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 4477-4482.
42. Mead, J. E., y Fausto, N. (1989): Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 1558-1562.
43. Russell, W. E.; Kaufmann, W. K.; Sitaric, S.; Luetke, N. C., y Lee, D. C. (1996): Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor-alpha-targeted mice. *Mol Carcinog* **15**, 183-189.
44. Kiso, S.; Kawata, S.; Tamura, S.; Inui, Y., *et al.* (2003): Liver regeneration in heparin-binding EGF-like growth factor transgenic mice after partial hepatectomy. *Gastroenterology* **124**, 701-707.
45. Mitchell, C.; Nivison, M.; Jackson, L. F.; Fox, R., *et al.* (2005): Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration. *J Biol Chem* **280**, 2562-2568.
46. Michalopoulos, G. K., y Khan, Z. (2005): Liver regeneration, growth factors, and amphiregulin *Gastroenterology* **128**, 503-506.
47. Berasain, C.; García-Trevijano, E. R.; Castillo, J., *et al.* (2005): Amphiregulin: an early trigger of liver regeneration in mice. *Gastroenterology* **128**, 424-432.
48. Thoresen, H.; Guren, T., y Christoffersen, T. (2003): Role of ERK, p38 and PI3-kinase in EGF receptor-mediated mitogenic signalling in cultured rat hepatocytes: requirement for sustained ERK activation. *Cell Physiol Biochem* **13**, 229-238.
49. Argast, G. M.; Campbell, J. S.; Brookling, J. T., y Fausto, N. (2004): Epidermal growth factor receptor transactivation mediates tumor necrosis factor-induced hepatocyte replication. *J Biol Chem* **279**, 34530-34536.

4. VÍAS QUE INTERVIENEN EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

50. Scheving, L. A.; Stevenson, M. C.; Taylormoore, J. M.; Traxler, P., y Russell, W. E. (2002): Integral role of the EGF receptor in HGF-mediated hepatocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*; **290**, 197-203.
51. Ledda-Columbano, G. M.; Pibiri, M.; Concas, D.; Cossu, C.; Tripodi, M., y Columbano, A. (2002): Loss of cyclin D1 does not inhibit the proliferative response of mouse liver to mitogenic stimuli. *Hepatology* **36**, 1098-1105.
52. Columbano, A.; Ledda-Columbano, G. M.; Pibiri, M.; Cossu, C., *et al.* (2005): Gadd45 β is induced through a CAR-dependent TNF-independent pathway in liver hyperplasia. *Hepatology* **42**, 1118-1126.
53. Costa, R. H.; Kalinchenko, V. V.; Tan, Y., y Wang, I. C. (2005): The CAR nuclear receptor and hepatocyte proliferation *Hepatology* **42**, 1004-1008.
54. Nilsson, I., y Hoffmann, I. (2000): Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog Cell Cycle Res* **4**, 107-114.
55. Massague, J. (2004): G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* **432**, 298-306.
56. Barr, F. A.; Sillje, H. H., y Nigg, E. A. (2004): Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 429-440.
57. Meraldi, P.; Honda, R., y Nigg, E. A. (2004): Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 29-36.
58. Columbano, A., y Shinozuka, H. (1996): Liver regeneration versus direct hyperplasia. *FASEB J* **10**, 1118-1128.
59. Columbano, A., y Ledda-Columbano, G. M. (2003): Mitogenesis by ligands of nuclear receptors: an attractive model for the study of the molecular mechanisms implicated in liver growth. *Cell Death Differ* **10**, S19-S21.
60. Menegazzi, M.; Carcereri-De Prati, A.; Suzuki, H., *et al.* (1997): Liver cell proliferation induced by nafenopin and cyproterone acetate is not associated with increases in activation of transcription factors NF-kappaB and AP-1 or with expression of tumor necrosis factor alpha. *Hepatology* **25**, 585-592.
61. Columbano, A.; Ledda-Columbano, G. M.; Pibiri, M., *et al.* (2001): Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha mice show enhanced hepatocyte proliferation in response to the hepatomitogen 1,4-bis [2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzene, a ligand of constitutive androstane receptor. *Hepatology* **34**, 262-266.
62. Ledda-Columbano, G. M.; Pibiri, M.; Concas, D.; Cossu, C., *et al.* (2002): Loss of cyclin D1 does not inhibit the proliferative response of mouse liver to mitogenic stimuli. *Hepatology* **36**, 1098-1105.
63. Diehl, A. M. (2000): Cytokine regulation of liver injury and repair. N (2000) Liver regeneration. *J Hepatol* **32**, 19-31.

64. Ledda-Columbano, G. M.; Pibiri, M.; Cossu, C.; Molotzu, F., *et al.* (2004): Aging does not reduce the hepatocyte proliferative response of mice to the primary mitogen TCPOBOP. *Hepatology* **40**, 981-988.
65. Kalinichenko, V. V.; Major, M.; Wang, X.; Petrovic, V., *et al.* (2004): Forkhead Box m1b transcription factor is essential for development of hepatocellular carcinomas and is negatively regulated by the p19ARF tumor suppressor. *Genes Dev* **18**, 830-850.
66. Wang, I.-C.; Chen, Y.-J.; Hughes, D. E.; Petrovic, V.; Major, M. L., *et al.* (2005): Forkhead Box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF(Skp2-Cks1)Ubiquitin Ligase. *Mol Cell Biol* In Press.
67. Wang, X.; Quail, E.; Hung, N.-J.; Tan, Y.; Ye, H., y Costa, R. H. (2001): Increased levels of Forkhead Box M1B transcription factor in transgenic mouse hepatocytes prevents age-related proliferation defects in regenerating liver. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 11468-11473.
68. Wang, X.; Krupczak-Hollis, K.; Tan, Y.; Dennewitz, M. B., *et al.* (2002): Increased hepatic Forkhead Box M1B (FoxM1B) levels in old-aged mice stimulated liver regeneration through diminished p27Kip1 protein levels and increased Cdc25B expression. *J Biol Chem* **277**, 44310-44316.
69. Costa, R. H.; Kalinichenko, V. V.; Holterman, A. X., y Wang, X. (2003): Transcription factors in liver development, differentiation, and regeneration. *Hepatology* **38**, 1331-1347.
70. McGowan, J.; Atryzek, V., y Fausto, N. (1979): Effects of protein-deprivation on the regeneration of rat liver after partial hepatectomy. *Biochem J* **180**, 25-35.
71. Avruch, J.; Lin, Y.; Long, X.; Murthy, S., y Ortiz-Vega, S. (2005): Recent advances in the regulation of the TOR pathway by insulin and nutrients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **8**, 67-72.
72. Volarevic, S.; Stewart, M. J.; Ledermann, B.; Zilberman, F., *et al.* (2000): Proliferation, but not growth, blocked by conditional deletion of 40S ribosomal protein S6. *Science* **288**, 2045-2047.
73. Jiang, Y. P.; Ballou, L. M., y Lin, R. Z. (2001): Rapamycin-insensitive regulation of 4e-BP1 in regenerating rat liver. *J Biol Chem*; **276**: 10943-10951.
74. Rudolph, K. L.; Trautwein, C.; Kubicka, S.; Rakemann, T., *et al.* (1999): Differential regulation of extracellular matrix synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatology* **30**: 1159-1166.
75. Mohammed, F. F.; Smookler, D. S.; Taylor, S. E.; Fingleton, B., *et al.* (2004): Abnormal TNF activity in Timp3^{-/-} mice leads to chronic hepatic inflammation and failure of liver regeneration. *Nat Genet* **36**, 969-977.

4. VÍAS QUE INTERVIENEN EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

76. Lee, D. C.; Sunnarborg, S. W.; Hinkle, C. L.; Myers, T. J., *et al.* (2003): TACE/ADAM17 processing of EGFR ligands indicates a role as a physiological convertase. *Ann N Y Acad Sci* **995**, 22-38.
77. Serandour, A. L.; Loyer, P.; Garnier, D.; Courselaud, B., *et al.* (2005): TNF α -mediated extracellular matrix remodeling is required for multiple division cycles in rat hepatocytes. *Hepatology* **41**: 478-486.
78. Humar, A.; Kosari, K.; Sielaff, T. D.; Glessing, B., *et al.* (2004): Liver regeneration after adult living donor and deceased donor split-liver transplants. *Liver Transpl* **10**, 374-378.
79. Overturf, K.; al-Dhalimy, M.; Ou, C. N.; Finegold, M., Grompe, M. (1997): Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol* **151**, 1273-1280.

5. Mecanismos que regulan la regeneración hepática

INTRODUCCIÓN

Un medio para comprender los mecanismos que intervienen en la regeneración hepática es determinar las moléculas críticas que regulan este proceso. Para ello, se han llevado a cabo una serie de estudios encaminados a esclarecer qué genes se expresan *de novo* en el hígado remanente al inicio de la regeneración. Las células en el hígado normal se encuentran en estado quiescente o de reposo proliferativo, pero después de la hepatectomía parcial o de la lesión hepatocelular, las células cambian hacia el estado proliferativo en respuesta a determinadas señales. Estas señales se transmiten al núcleo en las etapas iniciales de la regeneración hepática, y activan en el hígado remanente una serie de genes de respuesta al crecimiento. Con los recientes avances se ha demostrado que el número de genes implicados en este proceso se cifra en más de cien. En la mayoría de los casos estos genes no se expresan en el hígado normal, sin embargo, la intensidad de su expresión se eleva exponencialmente en minutos o en pocas horas después de la lesión o la resección quirúrgica. El curso temporal de esta expresión define la conexión entre proliferación y cese del crecimiento, e indica que se han transmitido señales reguladoras del crecimiento en las células del hígado remanente.

INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES

Existen dos clases de genes: los que regulan el crecimiento elevando su expresión durante la fase proliferativa y retornan a su expresión normal a los tres días, y los que regulan el ciclo celular mostrando un máximo

agudo a las 24 horas, que coincide con la primera ronda de replicación, seguido de una segunda ronda de replicación menos aguda que ocurre a las 48 horas de la hepatectomía [1-3]. No todos estos genes son «genes tempranos inmediatos», un número de ellos se expresa pocas horas después de la inducción inicial de los genes tempranos y son los denominados «genes tempranos retrasados». Estos últimos están regulados a nivel transcripcional o post-transcripcional por productos de los genes tempranos inmediatos. A este respecto, una cascada reguladora de la expresión de genes del ciclo celular permite a la célula progresar a través de la fase G1 del ciclo celular. Por último, los cambios en los niveles de ciclinas y sus quinasas reguladoras, por regulación transcripcional y post-transcripcional permite la transición desde G1 (ciclina D, CDK4 y 6), hasta S (ciclina E, CDK2), y las últimas fases del ciclo celular, G2/M (ciclina A, B). Los complejos ciclina D/CDK4 y 6 son importantes para la progresión a través del punto de restricción en G1, porque en parte fosforilan a la proteína RB. Los inhibidores asociados a las ciclinas, p21 y p27 son importantes, tanto por su intervención a través del ciclo como por su inhibición en caso de proliferación alterada (Figura 1) [1-3].

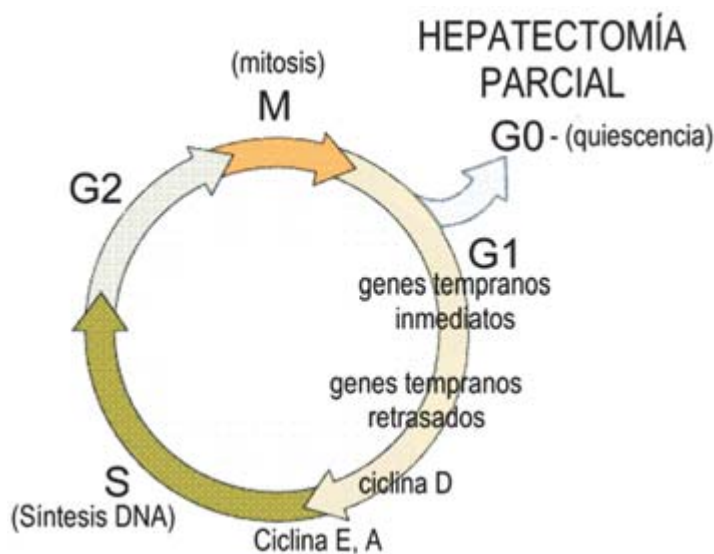


FIGURA 1. *Ciclo celular de las células hepáticas después de la hepatectomía parcial.* Las células normales quiescentes en G0 sufren una rápida transición a G1 acompañada por la transcripción de genes tempranos inmediatos de respuesta al crecimiento, seguidos por los genes tempranos retrasados y por las ciclinas. Sigue la fase S (síntesis de DNA) y posteriormente la transición G2/M que implica la mitosis [1].

5. MECANISMOS QUE REGULAN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

En el complejo proceso de la regeneración hepática intervienen dos vías principales, una dependiente de citoquinas y la otra no dependiente de citoquinas (Figura 2). Muchas citoquinas y factores de crecimiento están implicados en la regulación de la regeneración hepática. Las citoquinas incluyen a TNF e IL-6 y los factores de crecimiento a HGF, EGF, TGF α , insulina y glucagón. Existen unos factores de transcripción individuales o proteínas requeridas para que se verifique la regeneración hepática en condiciones óptimas.

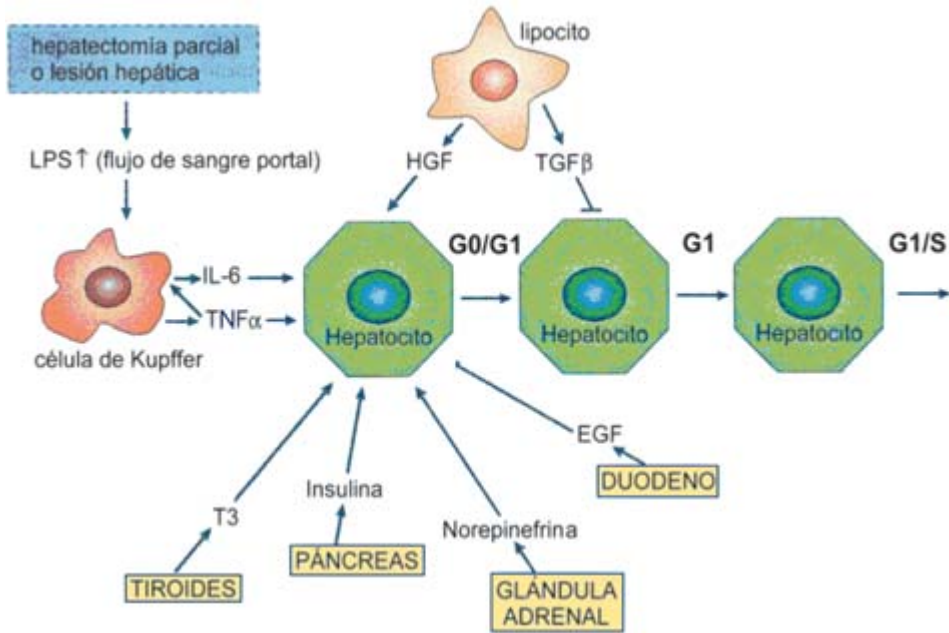


FIGURA 2. Después de la hepatectomía parcial o lesión hepatocelular infligida por agentes hepatotóxicos o virus, se inician una serie de señales en el hígado. Factores derivados del intestino, como el lipopolisacárido (LPS) alcanzan el hígado a través de la sangre portal y activan las células de Kupffer y las endoteliales e incrementan la producción de TNF e IL-6. Otros factores se liberan del páncreas (insulina), duodeno (EGF), glándula adrenal (norepinefrina), glándula tiroides (triiodotiroxina; T3) y lipocitos (HGF). La cooperación de estos factores permite a los hepatocitos superar los puntos de control del ciclo celular y pasar de la fase G0 a la G1 y de la G1 a la fase S. Esto conduce a la síntesis del DNA y a la proliferación de los hepatocitos. La señalización a través del TGF β , que inhibe la síntesis del DNA en los hepatocitos, se bloquea durante la fase proliferativa y se restaura al final del proceso regenerativo para que los hepatocitos retornen al estado quiescente (Taub, 2004) [5].

FACTORES CIRCULANTES EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

Molten y Bucher en 1967 [4] comenzaron a vislumbrar que unos factores circulantes, presentes en suero de ratas hepatectomizadas, podían inducir la replicación de los hepatocitos en animales normales. Más tarde otros experimentos con hepatocitos aislados identificaron varios factores de crecimiento, tales como HGF, TGF α y el factor antiproliferativo TGF β . Fue entonces difícil probar el papel de cada uno de estos factores sobre los mecanismos de la regeneración hepática. Posteriormente, han sido los estudios moleculares sobre las cascadas de expresión génica en hígado regenerante, los que han proporcionado evidencias sobre los mecanismos que se activan rápidamente en el hígado remanente después de la hepatectomía parcial. Se han identificado más de cien genes tempranos inmediatos que son activados por factores de transcripción. Estos factores de transcripción, normalmente en estado latente, cuando se activan inducen la expresión de genes implicados en la transición G0/G1 [3-5]. Los perfiles de expresión génica indican que algunos genes se activan transitoriamente, mientras que otros, particularmente aquellos implicados en la síntesis proteica y crecimiento celular, se elevan a lo largo de toda la respuesta proliferativa en el hígado en regeneración.

Los factores humorales secretados y los solubles, que intervienen en la respuesta a la hepatectomía parcial, se han clasificado en cinco categorías basadas en gran parte en el modelo propuesto por Fausto *et al.* [6]: (1) *Factores iniciadores*, que hacen competentes a los hepatocitos para responder a los factores de crecimiento, promoviendo la transición G0 $\rightarrow$ G1; este grupo incluye a las citoquinas TNF e IL-6, ambas se cree que se generan en respuesta al LPS (lipopolisacárido) derivado de las bacterias intestinales, después de la hepatectomía parcial. (2) *Factores de crecimiento*, que permiten a los hepatocitos iniciados o competentes progresar en la transición G1 $\rightarrow$ S; este grupo incluye a los potentes mitógenos HGF, TGF α y EGF. (3) *Comitógenos*, que facilitan la acción de los mitógenos; en este grupo se incluye a la insulina y la epinefrina. (4) *Inhibidores del crecimiento*, que suprimen la respuesta regenerativa de los hepatocitos, cuya expresión está inhibida durante la regeneración; este grupo incluye la activina y el TGF β . (5) *Supresores de los inhibidores de crecimiento*, que inhiben la actividad de los inhibidores del crecimiento por elevada afinidad y unión reversible a estos inhibidores, haciéndolos incapaces de unirse a sus receptores celulares e incapacitándolos a impartir sus propiedades

5. MECANISMOS QUE REGULAN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

inhibidoras del crecimiento; este grupo incluye al inhibidor del $TGF\beta$, el péptido LAP (*latency associated peptide*) y al inhibidor de la activina, la follistatina.

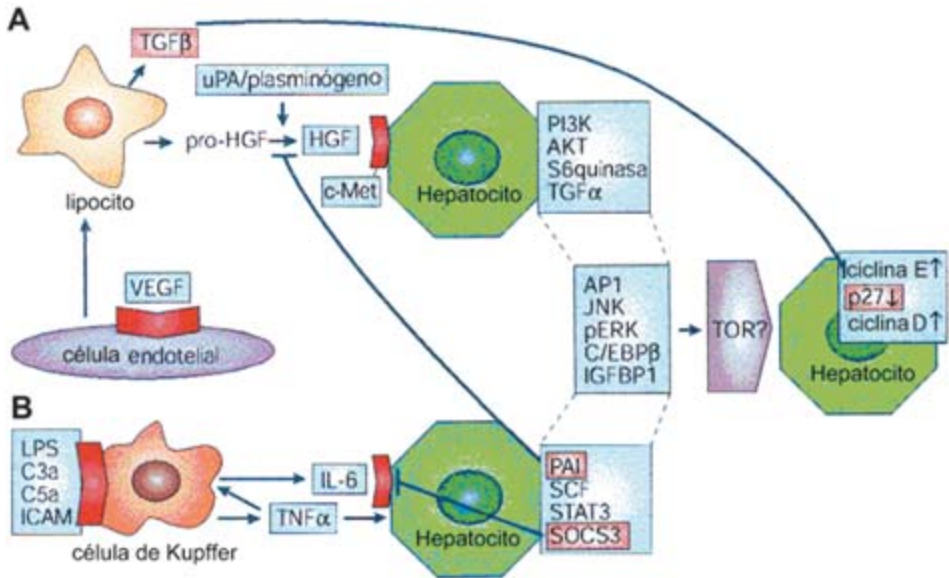


FIGURA 3. Mecanismos que se activan durante la regeneración hepática por acción de citoquinas y factores de crecimiento. **A:** Factores de crecimiento. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) se une a las células endoteliales, que desencadenan la liberación de pro-HGF, desde los lipocitos. La uroquinasa activadora del plasminógeno (uPA) libera el HGF que se une al receptor c-Met en los hepatocitos para activar las quinasas PI3K, AKT y S6. La señalización HGF libera al $TGF\alpha$ y activa otras señales compartidas con las vías mediadas por las citoquinas, tales como AP1, la quinasa aminoterminal Jun (JNK), las quinasas reguladas por señales extracelulares (pERK), la proteína intensificadora de la unión a CCAAT (C/EBP) β y la proteína que se une al factor insulínico1 (IGFBP1). Estos factores activan el objetivo de la rapamicina (TOR), y esto conduce a la progresión del ciclo celular al incrementar la expresión de las ciclinas D y E y reducir la concentración de p27. **B:** Citoquinas. Moléculas implicadas en: la inmunidad innata, el lipopolisacárido (LPS), factores del complemento C3a y C5a y moléculas de adhesión intercelular (ICAM), activan las células de Kupffer, las cuales producen $TNF\alpha$. Este, a su vez, activa la expresión de IL-6 por las células de Kupffer. $TNF\alpha$ e IL-6 activan los hepatocitos vecinos, lo que causa la activación del transductor de señales y activador de la transcripción (STAT)3, y la expresión del factor stem-cell (SCF) y de varias proteínas. Otras proteínas inhibidoras que intervienen en la terminación de la regeneración hepática también se activan (se muestran en naranja): el $TGF\beta$ (producido por los lipocitos), el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI), el supresor de la señalización de citoquinas-3 (SOCS3), p27 y otros inhibidores de las CDK. Los receptores de la superficie celular se muestran en rojo (Taub, 2004) [5].

Las vías intracelulares señalizadoras, en las que se encuentran implicadas las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y más específicamente las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), la quinasa aminoterminal jun (JNK) y los receptores tirosina quinasa, se activan rápidamente de acuerdo con un programa cronológico inducido por las señales iniciadoras. Gracias a investigaciones genéticas y farmacológicas [6, 7], es hoy posible conocer muchas de las proteínas que intervienen en las vías señalizadoras dependientes de citoquinas o factores de crecimiento e identificar los mecanismos que se solapan entre ellas (Figura 3). Las citoquinas se unen a sus receptores celulares y generan señales que conducen a la activación de factores de transcripción. Lo que distingue a las citoquinas de los factores de crecimiento es que activan selectivamente señales que pueden no estar ligadas a la mitogénesis [8, 9]. Esta distinción no siempre está clara, ya que hay objetivos de las citoquinas que están conectados con el crecimiento celular, tal como ERK, que pueden ser activados por unas y otros.

El hallazgo de factores de transcripción activos indica la operatividad de mecanismos dependientes de citoquinas (TNF α e IL6) e independientes de citoquinas (HGF, TGF y otros), que son importantes reguladores de la respuesta regenerativa [5, 10]. Una serie de factores de transcripción específicos, tales como NF κ B, STAT3 y AP1 se activan rápidamente en los hepatocitos remanentes minutos después de la hepatectomía parcial.

PAPEL DE LAS CITOQUINAS EN LOS MECANISMOS QUE DESENCADENAN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

Las citoquinas se unen a sus receptores celulares y generan señales intracelulares que conducen a la activación de factores de transcripción. Como se encontró que los factores de transcripción NF κ B y STAT3 se activaban inmediatamente después de la hepatectomía parcial, se pensó que eran las citoquinas las que regulaban la respuesta regenerativa. Estudios con ratones knockout establecieron que, después de la hepatectomía, la regeneración hepática, que incluye hepatoprotección, requiere la intervención de IL-6, pero esta citoquina no es suficiente para la inducción de este proceso [11, 12], pues en ausencia de IL-6, la restitución de la masa hepática sólo experimenta un retraso. La IL-6 es una citoquina efectora en varios procesos, que está implicada en la fisiología hepática, incluyendo la hepatoprotección, la respuesta a la fase aguda y la mitogénesis (Figura 4).

5. MECANISMOS QUE REGULAN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

Algunos estudios han cuestionado el papel preponderante propuesto para la IL-6 en la respuesta mitogénica post hepatectomía [5].

La unión de la IL-6 a la cadena alfa de su receptor IL-6R, la forma soluble gp80, asociada a dos subunidades de gp130, estimula la actividad tirosina quinasa de miembros asociados a la familia de las Janus quinasas 1 (JAK1) (Figura 4) [8, 9]. Una vez activa la JAK1 fosforila a gp130 en un residuo tirosina (Y), lo que ocasiona la dimerización de STAT3, requisito necesario para que STAT3 pueda trasladarse al núcleo y activar la

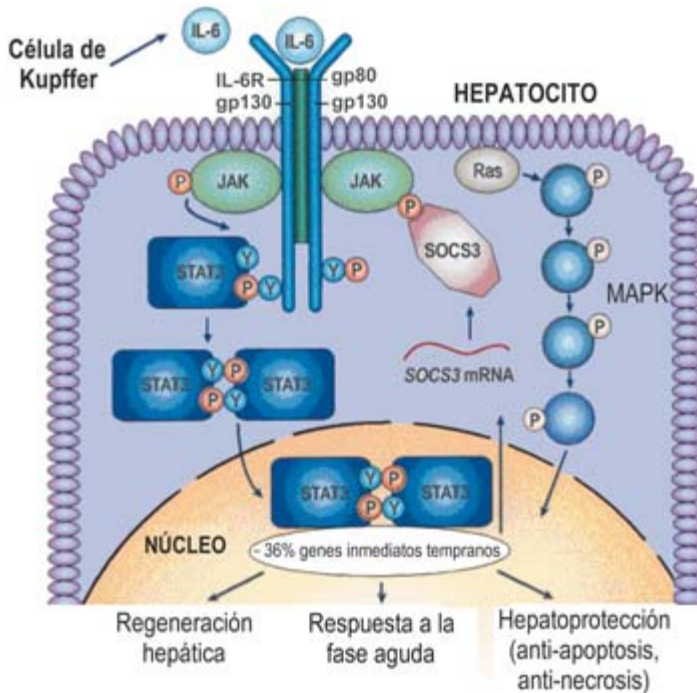


FIGURA 4. **Mecanismos señaladores de la vía IL-6 - STAT3.** La IL-6, procedente de las células de Kupffer, se une al IL-6R en los hepatocitos e interacciona con las dos subunidades de gp130 y activa a JAK (quinasa Janus), la cual desencadena dos vías: Primera, la de la MAPK que se activa por SHP2-GRB2-SOS-Ras (donde SHP2, proteína tirosina fosfatasa 2 que contiene dominio SH2; GRBs, proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento y SOS. Sólo se indica Ras). Segunda, la de STAT3, que se activa a través de fosforilación de la tirosina (Y), mediada por JAK. STAT3 dimeriza y se trasloca al núcleo, donde activa un 36% de genes tempranos inmediatos. En hígado este proceso promueve la regeneración hepática, la respuesta de la fase aguda y la hepatoprotección frente a Fas y lesión tóxica. La transcripción del supresor de la señalización por citoquinas (SOCS3) está también regulada por IL-6. SOCS3 interacciona con JAK y bloquea la señalización de las citoquinas (Taub, 2004) [5].

transcripción de genes. La estimulación de gp130 activa también la cascada señalizadora MAPK y las evidencias obtenidas indican que JAK1 activa la tirosina fosfatasa SHP2, que contiene dominio SH2, y recluta la proteína 2, unida al receptor del factor de crecimiento GBR2 y a SOS. El complejo GRB2-SOS, a su vez, activa a Ras, lo cual conduce a la activación de Raf-MEK-ERK (MEK significa MAPK y ERK quinasa). La cascada señalizadora MAPK es crucial para la proliferación celular [13] y se ha observado que la señalización mediante IL-6 puede también activar directamente quinasas que están implicadas en la supervivencia celular, como la fosfatidilinositol 3-quinasa y la AKT [14].

Después de la hepatectomía parcial, la regeneración hepática está alterada en hígado de ratón *IL6*^{-/-} lo que se caracteriza por necrosis hepatocelular y fallo hepático, reducida respuesta de síntesis del DNA en hepatocitos y discretas anormalidades en la fase G1, incluyendo la carencia de activación de STAT3 y alteraciones selectivas en expresión génica [11]. El defecto se limita a los hepatocitos, ya que la síntesis del DNA parece que es normal en células no parenquimáticas en hígado *IL6*^{-/-}. También el TNF α se requiere para conseguir una respuesta proliferativa adecuada después de la hepatectomía parcial. Esto se ha conseguido utilizando ratones knockout para el receptor TNF (TNFR1). Este efecto está mediado por la capacidad del TNF α de inducir a IL-6, ya que el tratamiento con esta última citoquina corrige el defecto en la síntesis del DNA, que ocurre en ratones knockout TNFR1, al que antes hemos aludido. Por razones no explicables, sin embargo, la ausencia de TNF α no perjudica la regeneración hepática [15]. El trasplante de médula ósea mostró que las células de Kupffer producen la mayor parte de IL-6 en hígado y que el TNF α induce la producción de IL-6 por activación del factor de transcripción NF κ B, que a su vez activa la transcripción del gen *IL-6* [16]. El sistema inmune innato es el principal responsable de la producción de IL-6 y TNF α por las células de Kupffer. El lipopolisacárido (LPS), un componente del sistema inmune innato que interacciona con el receptor LPS en las células de Kupffer, es importante en el proceso que desencadena de la regeneración post-hepatectomía y en otros modelos de lesión hepática (Figura 2). Además se ha detectado que los miembros de la cascada del complemento C3a y C5a interaccionan con los receptores en las células de Kupffer para estimular la liberación de IL-6 y TNF α . Se han observado defectos en la regeneración hepática en animales deficientes en C3 y C5 que se relacionan con menor expresión de IL-6, TNF α , STAT3 y NF κ B [17].

SEÑALIZACIÓN Y ACTIVACIÓN GÉNICA REGULADA POR LA IL-6

La defectuosa regeneración hepática en hígado puede explicarse por el gran número de vías activadas por genes que resultan alterados en hígado *IL-6*^{-/-}. Un 36% de los genes tempranos inmediatos que se activan durante la regeneración hepática están regulados por la IL-6 (Figura 4). El tratamiento de ratones *IL-6*^{-/-} con IL-6, en ausencia de hepatectomía parcial, induce un número mucho menor de genes, lo que indica que la IL-6 coopera con otros factores que se inducen por hepatectomía parcial, que son los que activan el resto de los genes. El SCF, factor que se une al receptor tirosina quinasa Kit, es un objetivo de IL-6 y es un factor de crecimiento que se activa por rotura proteolítica de su precursor pro-SCF [18]. Aunque el mecanismo mediante el cual IL-6 activa a SCF no está del todo aclarado, los cambios regenerativos en ratones *IL-6*^{-/-} pueden corregirse por tratamiento con SCF. También SCF puede activar a STAT3 sin intervención de IL-6 y de la vía señalizadora MAPK.

Teniendo en cuenta estas consideraciones puede resumirse que IL-6, a través del complejo gp130-IL-6R, produce la activación de dos vías señalizadoras importantes: STAT3 y MAPK (Figura 4). Como el fenotipo STAT3-null es letal embrionario, se han utilizado los knockouts STAT3 específicos del hígado, *Alb*⁺ *STAT3*^{fl/fl} (donde *Alb* significa el promotor de la albúmina y *fl*, el alelo suprimido), para comprobar que la contribución de STAT3 a la respuesta proliferativa está mediada por IL-6. La síntesis del DNA en hígado *Alb*⁺ *STAT3*^{fl/fl} estuvo alterada después de la hepatectomía parcial y las anomalías detectadas en la activación de los genes tempranos inmediatos no fueron idénticas a las encontradas en hígado *IL-6*^{-/-}. La activación normal de la vía MAPK (pERK) en hígado *Alb*⁺ *STAT3*^{fl/fl} apoya la idea que no todos los efectos de IL-6 sobre la proliferación de los hepatocitos están mediados por STAT3. Además los estudios de Taub *et al.* [5] proporcionan las primeras evidencias *in vivo* del efecto de STAT3 de promover la progresión del ciclo celular y la proliferación en condiciones fisiológicas, lo que demuestra que no está clara la separación entre citoquinas y factores del crecimiento en cuanto a la regulación de las vías señalizadoras.

PROLIFERACIÓN HEPÁTICA INDUCIDA POR CITOQUINAS

El knockout condicional *gp130*^{-/-} tiene menos impacto sobre la síntesis del DNA posthepatectomía, que podría haberse esperado de los fenotipos *IL*^{-/-} o *STAT3*^{-/-} en ratones knockout. Sin embargo, en este modelo (hígado suprimido en gp130) se observaron deficiencias en la expresión de las ciclinas E y A, lo que indica que esta proteína es importante para la progresión normal del ciclo [19]. Otro estudio describe que se requiere la IL-6 para mantener la supervivencia del hígado después de la hepatectomía [20]. Los datos obtenidos en condiciones en las que la IL-6 estuvo sobreexpresada en hígado, apoyan también el papel propuesto para la IL-6 como el principal regulador de la proliferación de los hepatocitos. Las evidencias experimentales detectadas en casos en los que el receptor soluble sIL-6R estuvo hiperexpresado, refuerzan la importancia de este receptor en el crecimiento hepático mediado por la hepatectomía parcial [21, 22]. El mantenimiento de grandes concentraciones de IL-6 en un período de dos semanas, incluso en ausencia de exceso de IL-6R, dio lugar a una proliferación masiva de hepatocitos, lo que indica que la necesidad de otros factores de crecimiento puede ser contrarrestada por elevadas concentraciones de IL-6 [23].

El papel preciso de IL-6 en la regeneración hepática y en la proliferación de los hepatocitos es controvertido y el papel de SOCS3 permanece sin aclarar. Sun *et al.* [24] muestran que el tratamiento *in vitro* con IL-6 inhibió la proliferación de hepatocitos en cultivo porque IL-6 indujo la expresión de p21^{cip1}. Utilizando cocultivo con células hepáticas no parenquimáticas, estos autores han encontrado que IL-6 inhibe directamente la proliferación de los hepatocitos por un mecanismo dependiente de p21^{cip1}, e indirectamente favorece la proliferación de los hepatocitos al estimular las células no parenquimáticas a producir HGF.

Considerados todos estos resultados, se concluye que la IL-6 muestra claramente efectos pleiotropicos en el hígado, por una parte se necesita para una respuesta normal integrada a la hepatectomía parcial, y por otra, se requiere para la respuesta a la fase aguda, la supresión de la apoptosis, y la inducción de la proliferación de los hepatocitos.

FACTORES DE CRECIMIENTO: HGF Y TGF α

No se cree que la IL-6 sea un poderoso mitógeno para los hepatocitos, ya que la estimulación de la proliferación hepática es mínima en ausencia de hepatectomía parcial, a menos que la IL-6 esté hiperexpresada [5]. Además de las vías dependientes de citoquinas, varios factores de crecimiento funcionan promoviendo la replicación celular durante la regeneración hepática. Sobre las bases de estudios *in vivo* e *in vitro*, el TGF α y el HGF se consideran los factores de crecimiento más importantes [10, 25, 26]. El HGF se sintetiza *in vivo*, por las células no parenquimáticas, particularmente por los lipocitos, y por tanto afecta a los hepatocitos de manera paracrina. El precursor del HGF, el pro-HGF, se activa rápidamente, después de la hepatectomía parcial o lesión hepática, por acción de proteasas tales como la uPA (uroquinasa activadora del plasminógeno) y su efector el plasminógeno [27, 28] (Figura 3). El bloqueo de uPA retrasa la aparición del HGF y la regeneración hepática, mientras que el bloqueo del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI) acelera la liberación del HGF y la regeneración hepática. Si se administran anticuerpos HGF al mismo tiempo que se provoca una lesión hepática por administración de CCl₄, la respuesta regenerativa se bloquea. Por otro lado, la infusión de HGF en roedores reduce el grado de lesión hepática inducida por CCl₄ [29].

El HGF regula varios procesos en el hígado, y es también un estimulador directo de la proliferación de los hepatocitos. Como el HGF (receptor c-MET) es un factor de crecimiento importante en varios tejidos, y como los knockout de sus genes (*HGF* y *c-MET*) da como resultado un fenotipo letal, ha sido muy difícil utilizar modificaciones genéticas accesibles para estudiar *in vivo* las vías señalizadoras que son reguladas por el HGF [25, 26]. Para resolver este problema, se ha utilizado un knockout condicional, específico del hígado del receptor c-MET y se ha demostrado que la vía HGF-MET es importante para la síntesis del DNA después de la lesión hepática [25]. Además una serie de datos han surgido de investigaciones sobre otros ratones knockout, tales como *uPA*, plasminógeno y *VEGF* (*vascular endothelial growth factor*). También con medios farmacológicos, anticuerpos y adenovirus, se ha demostrado que el HGF tiene un regulador, el TGF α , que funciona en la respuesta mitogénica del hígado.

El HGF es un potente inductor de la síntesis del DNA en hepatocitos en cultivo y también altera la morfología y motilidad de las células. Como muchos otros factores de crecimiento, el HGF ejerce efectos pleiotrópicos

sobre varias vías señalizadoras mitogénicas. El HGF activa el receptor tirosina quinasa c-MET, como también a varias otras vías que implican a PI3K, ERK, S6 kinasa y AKT [30]. En hepatocitos aislados se ha detectado que el efecto mitogénico del HGF está en parte regulado por otro factor, el TGF α , ya que los anticuerpos anti-TGF α bloquean parcialmente la síntesis del DNA en hígado regenerante [31]. Sin embargo, como un gran número de receptores y ligandos pertenecen a la familia TGF y EGF, la incapacidad de bloquear todos estos ligandos y receptores simultáneamente, ha hecho muy difícil probar que los mitógenos más potentes para los hepatocitos, el TGF α y el EGF son de importancia crucial para la regeneración hepática. Igualmente, el VEGF interacciona específicamente con las células sinusoidales endoteliales en el hígado y puede causar un incremento en la producción del HGF por células no parenquimáticas. Este crecimiento mediado por VEGF depende de la presencia de células endoteliales, y se bloquea en parte con anticuerpos HGF [32].

DIÁLOGO ENTRE CITOQUINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO

Las vías de señalización celular mediadas por HGF y TNF α /IL-6 (Figura 3) son necesarias para la regeneración hepática, pero, como se comentó anteriormente, otras señales y otros factores de transcripción intervienen en la respuesta regenerativa, que no se han relacionado todavía con otro factor del crecimiento o citoquina. Existen pocas moléculas transductoras de señales (ERK y JNK), factores de transcripción (AP1 y C/EBP β , proteína intensificadora de la unión a CCAAT) y la proteína de unión al factor insulínico 1 (IGFBP1), que puedan estar reguladas, tanto por factores de crecimiento como por citoquinas (Figura 3). Esto permite especular acerca de cómo la combinación de señales de las citoquinas y factores de crecimiento puede conducir a una robusta regeneración y reparación hepáticas después de la lesión. Por ejemplo, ambos TNF α y HGF pueden activar a JNK y MAPK-ERK, los cuales son reguladores cruciales en la activación de Jun. Uno y otro pueden también inducir la proliferación celular y la expresión de la ciclina D1, proteína importante en el crecimiento hepático [13, 33]. En hígado regenerante, la rapamicina, un medicamento inmunosupresor, que se sabe que bloquea la regeneración hepática, inhibe la activación de la ciclina D1, previniendo, por tanto, la progresión a través de G1 y la entrada en la fase S. La rapamicina funciona a través de la inhibición de TOR (*target of rapamycin*), un importante

5. MECANISMOS QUE REGULAN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

regulador de la traducción de las proteínas, de la síntesis de los ribosomas y de la maquinaria del crecimiento celular, que tiene un papel significativo en las transiciones del ciclo celular [34].

Las vías señalizadoras inducidas por IL-6-TNF α y el HGF regulan la actividad de varios factores de transcripción homo y heterodiméricos AP1, que incluyen el heterodímero Jun-Fos. La actividad de AP1 se requiere para la activación de una serie de proteínas implicadas en la respuesta al crecimiento, y la cooperación de AP1 con STAT3 amplifica la expresión de genes en el hígado, lo que va a originar una respuesta adaptativa durante la regeneración hepática [35, 36]. Otro posible punto de intersección entre HGF e IL-6 puede ser la regulación del gen *IGFBP1*, el cual codifica una proteína promitogénica y hepatoprotectora que se activa *in vivo* por la IL-6 y también por el HGF [37].

IGFBP1 es uno de los genes que se induce más rápidamente en el hígado en regeneración y su proteína producto IGFBP1 puede modular el crecimiento celular a través de las vías señalizadoras mediadas por el IGF o puede señalizar por mecanismos independientes de IGF, lo que implica la activación o supresión de la vía mediada por la integrina. En la transcripción del *IGFBP1* interviene parcialmente la IL-6, que es la responsable del 50% de la inducción de la expresión de dicho gen después de la hepatectomía parcial. Aunque los ratones *IGFBP1*^{-/-} se desarrollan normalmente, la regeneración hepática post hepatectomía está alterada [37], y se caracteriza por necrosis hepatocelular y por un retraso y reducción de la síntesis del DNA en los hepatocitos. Esta respuesta regenerativa anormal se asocia con menor activación MAPK-ERK y menor expresión de C/EBP β , factor de transcripción conectado a las vías reguladas por las citoquinas. Al igual que las anomalías observadas en ratones hepatectomizados *C/EBP β* ^{-/-}, la expresión de las ciclinas A y B1 de la fase S está retrasada y reducida en hígados *IGFBP1*^{-/-}, pero la expresión de la ciclina-D1, que está alterada en hígados de ratones *IL-6*^{-/-}, se muestra relativamente normal. El tratamiento de ratones *IGFBP1*^{-/-} con una dosis de IGFBP1, previa a la operación, induce la activación de MAPK-ERK y la expresión de C/EBP β , lo que indica que IGFBP1 puede sostener la regeneración hepática afectando las actividades de MAPK-ERK y C/EBP β . Como los receptores IGF no son reguladores importantes del crecimiento de los hepatocitos, la hipótesis predominante es que IGFBP1 estimula el crecimiento de los hepatocitos a través de vías independientes de IGF, modulando quizá la señalización mediada por la integrina.

Ambas C/EBP β e IL-6 están implicadas en las vías de activación de las citoquinas durante la respuesta a la fase aguda del hígado. Sin embargo, estudios en animales C/EBP $\beta^{-/-}$ y IL-6 $^{-/-}$, no revelaron una correlación positiva entre IL-6 y C/EBP β . De hecho, la concentración de IL-6 estuvo elevada en animales C/EBP $\beta^{-/-}$, y un posterior tratamiento con IL-6 empeoró el resultado después de la hepatectomía parcial. Igual que en los ratones IL-6 $^{-/-}$, la regeneración hepática está alterada en ratones C/EBP $\beta^{-/-}$, pero los genes y las vías que están afectadas son diferentes de las reguladas por IL-6 [38]. De manera que el mecanismo de activación e inducción de C/EBP β durante la regeneración hepática permanece sin esclarecer, pero la conexión entre la actividad de C/EBP β y la expresión de IGFBP1 es interesante y sitúa a C/EBP β dentro de las vías de regeneración en una posición donde puede ser regulada por las señales de los factores de crecimiento y las citoquinas (Figura 4).

PROTECCIÓN HEPÁTICA DESPUÉS DE LA LESIÓN

Los factores de crecimiento y las citoquinas, tales como HGF, IGFBP1 e IL-6 promueven la supervivencia hepática al estimular la regeneración en varios modelos de lesión hepática, que incluyen la mediada por Fas, la causada por hepatotoxinas (CCl₄, tioacetamida, paracetamol) y por isquemia, proporcionando además hepatoprotección [5-7]. La relación entre los efectos promitogénicos y los efectos protectores de estos factores no está claramente definida, pero al menos, parte de esta protección se verifica mediante inducción de la expresión de proteínas antiapoptóticas que regulan la cascada de las caspasas. Estos hallazgos ofrecen nuevas posibilidades de mecanismos comunes de hepatoprotección, tanto en lesión hepática inducida por Fas como por hepatotoxinas, y permiten predecir las intervenciones terapéuticas que pueden ser beneficiosas para el tratamiento de enfermedades hepáticas en humanos.

Los análisis más detallados de hepatoprotección han sido realizados con animales deficientes en IL-6, y ha sido ya parcialmente definido el papel protector de esta citoquina frente a la lesión [39, 40]. El papel de su regulador, el TNF α (Figura 5), está menos claro, ya que el TNF α puede, por un lado proteger, y por otro lado intensificar la lesión hepática [41, 42]. Sin embargo, la señalización mediada por TNF α , que conduce a la activación del NF- κ B, es claramente antiapoptótica [43, 44]. La IL-6 produce una mejoría en lesión hepática aguda, ya que se ha detectado que después del tratamiento agudo con CCl₄ los ratones IL-6 $^{-/-}$ desarrollaron

lesión hepatocelular y regeneración defectuosa [45]. Esto estuvo acompañado por una reducción significativa de la activación de STAT3 y NF- κ B y por una menor síntesis del DNA y respuesta mitótica en hepatocitos [38]. A diferencia de la hepatectomía parcial, el tratamiento con CCl₄ produjo un incremento en la apoptosis de los hepatocitos en hígados *IL-6*^{-/-}. El pretratamiento con IL-6 redujo la lesión aguda y la apoptosis mediada por el CCl₄, y aceleró la regeneración hepatocelular, tanto en hígado normal como en hígado *IL-6*^{-/-}.

La unión con Fas, causante principal de la apoptosis, proporciona nuevos conocimientos de los mecanismos a través de los cuales la IL-6 reduce la apoptosis de los hepatocitos. Se ha observado que los ratones *IL-6*^{-/-} son más susceptibles a la apoptosis mediada por Fas, que los respectivos controles [46]. Después de la activación por Fas, los hígados *IL-6*^{-/-} muestran alteraciones en las vías apoptóticas que implican a las caspasas 8 y 3, como también a la liberación del citocromo c resultante del incremento de la permeabilidad mitocondrial. Los hígados *IL-6*^{-/-} presentan concentraciones reducidas de factores antiapoptóticos BCL2 and BCL-X_L, y una mayor degradación del inhibidor FLIP de la caspasa 8 [*Fas-associated death domain (FADD)-like IL-1-converting enzyme (flice)-inhibitory protein*] después del tratamiento con Fas (Figura 5). El factor STAT3, el responsable principal de la hepatoprotección mediada por IL-6, bloquea la lesión apoptótica por dos mecanismos: primero por la inducción de los reguladores anti-caspasa; y segundo por la reducción de la lesión oxidativa mediante la activación de una proteína antioxidante REF1 [47, 48].

De la misma manera IGFBP1, otro factor promotor de la regeneración, es marcadamente protector frente a la lesión mediada por Fas, que ocurre por vías diferentes de las estimuladas por IL-6 and STAT3 [49]. Después del tratamiento con Fas, la deficiencia en IGFBP1 se asocia con una apoptosis masiva de los hepatocitos, consecuencia de la activación de las caspasas, que se corrige por pretratamiento con IGFBP1. Una serie de resultados indican que IGFBP1 es importante en la regulación de dos factores apoptogénicos, la metaloproteinasa de la matriz 1 (MMP1) y el TGF β .

El HGF es también protector en la lesión hepática mediada por Fas, ya que la concentración de HGF se relaciona con la protección frente a la cirrosis [25, 50, 51]. En un modelo de cirrosis hepática en rata, producido por dimetilnitrosoamina, se produjeron concentraciones plasmáticas elevadas de HGF humano, que se obtuvieron por transfección del gen humano *HGF* en el músculo esquelético. Esto dio como resultado la activación del

receptor c-MET y una disminución en el incremento de TGF β 1 que normalmente se asoció al tratamiento con dimetilnitrosoamina. Además, se ha observado que la infusión de HGF inhibe la fibrogénesis y la apoptosis de los hepatocitos, causa la resolución de fibrosis en un hígado ya cirrótico, y mejora la supervivencia en ratas con enfermedad hepática. El bloqueo de la apoptosis de los hepatocitos se debe en parte a la capacidad del HGF para inactivar Rac1 por fosforilación mediada por PI3K/AKT (Figura 5) [52]. También parece inhibir directamente la señalización por Fas

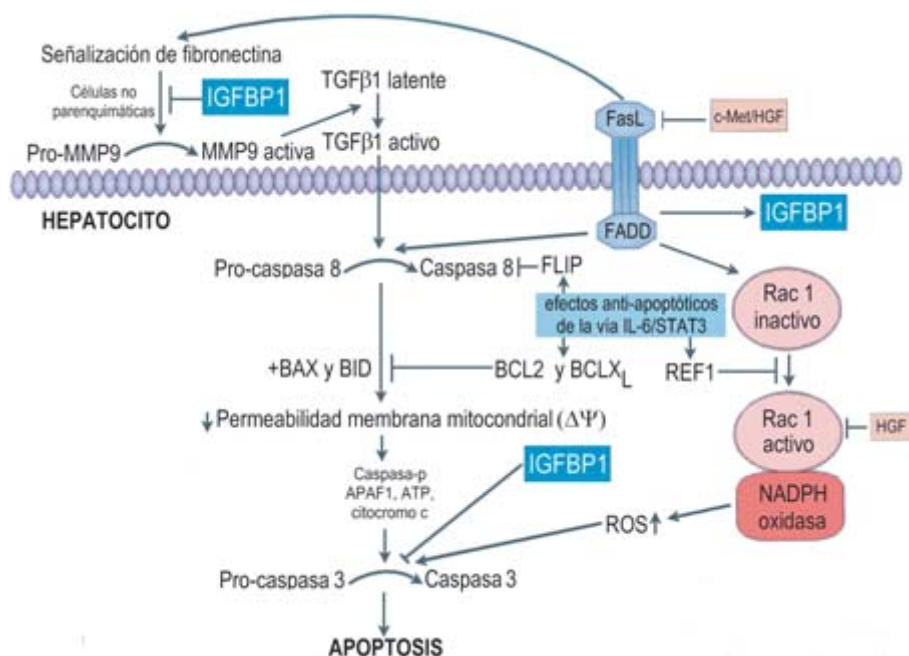


FIGURA 5. **Mecanismos protectores del hígado frente a la apoptosis.** La unión de FasL a FasR activa la cascada de las caspasas, induce la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la NADPH oxidasa y Rac1 (pequeña proteína unida al GTP que activa la NADPH oxidasa), e induce la expresión de IGFBP1. IL-6/STAT3 bloquea la apoptosis por activación de FLIP [Fas-associated death domain (FADD)-like IL-1-converting enzyme (flice)-inhibitory protein]; BCL2 y BCLXL, que son inhibidores de la cascada de las caspasas; y REF1, que bloquea la producción de ROS al inhibir la activación de Rac1. HGF también bloquea la producción de ROS al inactivar Rac1. IGFBP1 funciona sobre las células no parenquimáticas para prevenir la señalización de la fibronectina y bloquea la conversión pro-MMP9 a MMP9. MMP9 causa la activación proteolítica del TGF β 1, que funciona en los hepatocitos estimulando el paso pro-caspasa-8 a caspasa-8 y pro-caspasa 3 a caspasa 3. IGFBP1 también previene directamente la conversión de pro-caspasa 3 en caspasa-3. Cambios de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) regulados por las proteínas proapoptóticas BAX o BID, originan la salida del citocromo c, que activa la caspasa 3 por acción de la caspasa 9 y APAF1 (componente del apoptosoma junto con el citocromo c y la caspasa 9). ROS también activa la caspasa 3, que en sus últimas consecuencias genera la apoptosis (Taub, 2004) [5].

a través de una interacción entre Fas y el receptor c-MET [53]. Como en el caso de la IL-6, no está claro si el efecto de HGF sobre la cirrosis se limita a su efecto sobre la lesión hepatocelular o si directamente reduce la activación de la fibrogénesis [24].

CAMBIOS HEMODINÁMICOS DERIVADOS DE LA HEPATECTOMÍA PARCIAL

La lesión típica de un tejido ocasiona la disrupción de las redes vasculares de capilares y la extravasación de la sangre por la liberación local de los factores de coagulación, plaquetas, factores de crecimiento, etc. [54]). En el caso de la hepatectomía de los 2/3 del hígado, los tres lóbulos hepáticos se eliminan quirúrgicamente sin lesión de los dos lóbulos residuales, aunque se verifican grandes cambios en el flujo de sangre que atraviesa el hígado remanente. Estos cambios hemodinámicos, después de la hepatectomía parcial, son importantes e inducen un espectro de acontecimientos importantes en el hígado. El suministro de sangre arterial por unidad de tejido hepático no cambia, pero la contribución portal se eleva unas tres veces. La vena porta mantiene el flujo completo de sangre procedente del intestino, bazo y páncreas. Este flujo necesita atravesar los sinusoides, cuya capacidad descende matemáticamente a un tercio del original. Estos capilares poseen células endoteliales fenestradas que proporcionan acceso directo del plasma a los hepatocitos. Un reciente estudio demuestra que si estos cambios se previenen manteniendo constante la presión de la vena porta, existirá una activación deficiente del HGF y se producirá una mayor apoptosis de los hepatocitos, incluso aunque la cinética del marcaje nuclear del PCNA no parezca afectada [55].

Otro aspecto que necesita ser profundizado es el impacto potencial del cambio de la presión parcial de oxígeno en el flujo sanguíneo hepático después de la hepatectomía parcial. La vena porta posee una concentración de oxígeno mucho menor que la sangre arterial, así que el incremento relativo en la presión de la sangre portal por unidad de tejido debida a la hepatectomía parcial ha de ocasionar una disminución de la presión de oxígeno en la sangre circulante que ha de desencadenar una respuesta hipóxica. Se ha demostrado que la hipoxia en el hígado puede ser regulada mediante vías diferentes de las clásicas, ya que el HIF1 α (factor inducible por hipoxia alfa), no se ha identificado en el núcleo de los hepatocitos, pero se ha detectado en peroxisomas y mitocondria [56]. El triple aumento

del flujo de sangre portal causa un triple incremento matemático en la disponibilidad de factores de crecimiento y citoquinas derivados del intestino y páncreas. Tales factores incluyen insulina y factor de crecimiento epidérmico (EGF), endotoxina y nutrientes derivados de los alimentos (aminoácidos, lípidos y carbohidratos). De todos los aspectos de la regeneración hepática, la importancia de los acontecimientos hemodinámicos y los cambios en la proporción relativa de la sangre arterial/portal, son los menos estudiados y menos comprendidos. Sin embargo, existe casi un total acuerdo que los cambios descritos anteriormente pueden explicar los mecanismos señalizadores en el tejido hepático [2].

Nakatsuka *et al.* [57] han estudiado los cambios hemodinámicos que se establecen después de la hepatectomía parcial al elevarse flujo de sangre portal en los lóbulos remanentes, donde se induce la expresión de los genes tempranos inmediatos, entre los que se encuentra el que codifica el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1). Así, estos autores han detectado que las fuerzas mecánicas generadas por el flujo de sangre (*shear stress*), inducen inmediatamente la expresión del gen *PAI-1* en los hepatocitos. Así que cuando hepatocitos en cultivo fueron expuestos a estas fuerzas mecánicas, la concentración del PAI-1 mRNA se elevó a las tres horas con valores significativamente más elevados que los controles y gradualmente decreció. La inducción de la expresión del gen *PAI-1* fue dependiente del *shear stress* más que del *shear rate* y estuvo acompañada por elevada producción de la proteína PAI-1. El análisis funcional del promotor de 2.1-kb de gen *PAI-1* indicó que un segmento de 278-bp que contenía las secuencias consenso de los factores de transcripción Sp1 y Ets-1 fue crítico para el incremento de la transcripción de *PAI-1* dependiente de *shear stress*, pero ninguno de ellos por sí solos previno la transcripción basal de *PAI-1* y abolió la respuesta del promotor del *PAI-1* al *shear stress*. Estos datos llevan a la conclusión que la expresión del gen *PAI-1* en hepatocitos es sensible al flujo y se encuentra regulada a nivel transcripcional por los cambios circulatorios hemodinámicos, vía interacciones cooperativas entre Sp1 y Ets-1.

La recuperación del hígado después de la hepatectomía parcial, la ligadura del ramal porta o el trasplante hepático, depende de cómo se regenera el hígado después de la operación. El profundizar en estos mecanismos es de importancia fundamental para la prevenir fracasos postoperatorios y mejorar la superación de los trasplantes. El papel de una serie de citoquinas y factores de crecimiento ha sido ya estudiado y comentado ampliamente como desencadenante de la regeneración hepática, pero la

«preparación» de los mismos hepatocitos, anterior a la acción de las citoquinas o factores de crecimiento, se considera necesaria para la «iniciación» de la regeneración. Se ha sugerido que las fuerzas hemodinámicas, que surgen de cambios en el flujo y presión de la sangre portal después de la hepatectomía parcial están involucradas en el mecanismo que conduce a la iniciación [2]. Como los hepatocitos se encuentran expuestos directamente a los espacios de Disse, en los cuales fluye la sangre portal a través de los sinusoides hepáticos, se encuentran también expuestos a las fuerzas mecánicas hemodinámicas ejercidas por el flujo sanguíneo, y estas fuerzas mecánicas al elevarse pueden afectar a las funciones de los hepatocitos.

Se han detectado alteraciones en la morfología, función y expresión génica en respuesta al estrés hemodinámico en varios tipos de células, pero pocos estudios han investigado esta respuesta en hepatocitos. Kan *et al.* [58] han observado que este estrés eleva la velocidad de eliminación del amonio y la síntesis de la urea por hepatocitos en un sistema de cocultivo hepatocitos/células no parenquimatosas. Tilles *et al.* [59] han investigado la función de hepatocitos de rata cocultivados con fibroblastos expuestos a flujo en un bioreactor y han demostrado que el estrés generado por este flujo afecta la síntesis de albúmina y urea. Los estudios de Natkasuka *et al.* [57] han revelado que la expresión de un número de genes tempranos inmediatos del factor de respuesta temprana el crecimiento 1 (*Egr-1*), inhibidor de la activador del plasminógeno-1 (*PAI-1*), y fosfatasa del hígado regenerante-1 (*PRL-1*), se induce en lóbulos hiperperfundidos durante las primeras horas después de la hepatectomía o ligadura del ramal porta. Los resultados de estas y otras investigaciones sugieren que los hepatocitos son sensibles a los cambios a las fuerzas mecánicas derivadas del mayor flujo sanguíneo y que su función y expresión génica está regulada no sólo por mediadores químicos (citoquinas, factores de crecimiento y hormonas), sino también por la fuerza mecánica generada por el flujo sanguíneo.

Por tanto, el hígado remanente después de la hepatectomía parcial de los 2/3 del hígado se encuentra transfundido por el volumen normal de sangre, lo cual expone a las células endoteliales sinusoidales a un exceso de fuerzas hemodinámicas, que constituyen el primer evento que conduce a la restauración hepática. Este exceso infligido a las células hepáticas precede la expresión de factores, algunos de los cuales aparecen a los varios minutos. Por ejemplo, se induce la síntesis de NO, lo cual conlleva la expresión de genes que participan en la regeneración hepática incluyendo el *c-fos*. Existen evidencias que demuestran que el incremento en

c-fos después de la hepatectomía o la ligación del ramal porta se inhibe por N-nitro- L-arginina metil ester, que bloquea la NOS [60]. Braet *et al.* [61] han examinado los efectos de las fuerzas hemodinámicas a nivel estructural y molecular sobre las células endoteliales sinusoidales y sobre los receptores de VEGF, presentes en estas células, y han descrito que existe una relación entre el elevado flujo portal inducido por hepatectomía y las alteraciones morfológicas asociadas con las células endoteliales sinusoidales. También estos autores han obtenido evidencias que demuestran que en las células endoteliales sometidas a estas fuerzas *in vitro* se detectan elevaciones significativas en las concentraciones de VEGFR-1, VEGFR-2 y neuropilina-1 mRNA. Además, por efecto de estas condiciones experimentales, ambos receptores alternan desde la orientación perinuclear a la citoplasmática para adherirse a los componentes del citoesqueleto y a la membrana celular. Estos cambios coinciden con el comportamiento de las proteínas de las uniones de adherencia VE-cadherina y β -catenina [62].

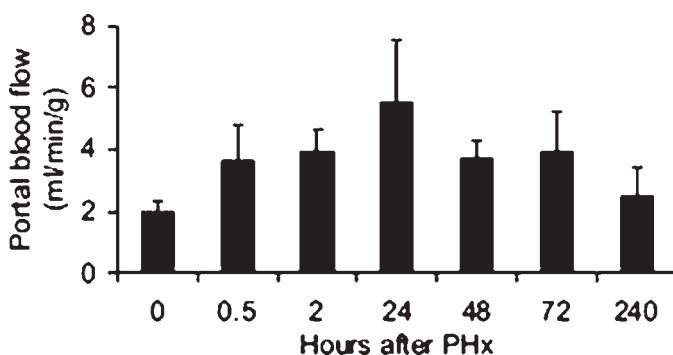


FIGURA 6. Portal blood flow in normal and 70% partially hepatectomized rats. At the designated time following partial hepatectomy rats were anesthetized and placed on a temperature controlled table. Following tracheotomy and saline infusion an ultrasound sensor was fixed to the portal vein. Blood flow was monitored by ultrasonic flowmetry. Results represent an average of 5 rats $\pm$ 2 $\times$ SD. Braet *et al.*, 2004.

Dejando a un lado los diferentes momentos cronológicos, el cambio más obvio que tiene lugar inmediatamente después de la hepatectomía es la elevación en las fuerzas hemodinámicas a la que son sometidas las células hepáticas, como consecuencia de un incremento en el flujo sanguíneo en relación al peso del hígado. Braet *et al.* [61] han detectado un incremento cercano a tres veces en el flujo portal inmediatamente después

de la hepatectomía que persiste durante varios días (Figura 6). Las células endoteliales que tapizan los sinusoides son las primeras en percibir estos cambios hemodinámicos. Ya se ha comentado anteriormente que estas células exhiben características particulares, no tienen la típica lámina basal, pero poseen fenestras que permiten el paso de quilomicrones, lipoproteínas, hormonas, factores de crecimiento y proteasas. El tamaño y densidad de estas fenestras resultan afectadas por los factores físicos y por factores solubles. La mayor presión portal afecta la morfología de las células endoteliales y modifica la expresión génica y la distribución proteica. Después de la hepatectomía parcial se detectó inmediatamente un cambio ultraestructural en forma de fenestras fusionadas y huecos en las áreas periportal y perivenosa. Mediante métodos microscópicos de diferente resolución se ha observado que los huecos pueden originarse a partir de la fusión de varias fenestras. Wack *et al.* [63] han descrito un gradiente en la porosidad entre las áreas periportal y perivenosa posterior a la hepatectomía, aunque este gradiente persistió sólo a los cinco minutos y a las 24 horas. Esto puede explicarse si se tiene en cuenta que el tamaño de los huecos varía entre 0,3 μm y 2 μm . En los experimentos de Braet *et al.* [61] los valores máximos de flujo sanguíneo se observaron a las 24 horas. La inconsistencia entre el número de huecos y la relación del flujo sanguíneo por mg de tejido hepático puede reflejar el lapso de tiempo requerido para que el tejido hepático se recupere o que la presión portal no sea el único factor que ejerza influencia sobre las células endoteliales sinusoidales. En concordancia con la permeabilidad incrementada en la zona 1 y en la zona 2 después de la hepatectomía, fue evidente la acumulación de pequeñas gotas de lípidos 10 horas después de la operación, que persistieron hasta el tercer día. Al finalizar el proceso regenerativo, el contenido de lípidos retornó a la normalidad.

ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Las acciones biológicas del NO, radical extraordinariamente difusible de vida media corta, oscilan entre la transducción de señales y la citotoxicidad. NO se genera a partir de la arginina por la óxido nítrico sintasa (NOS) [64]. Existen tres isoformas de NOS, la constitutiva (cNOS), que incluye la cerebral y la endotelial, y la inducible (iNOS) [65]. Aunque todas ellas sintetizan NO, cNOS lo hace rápidamente a renglón seguido de un estímulo y tiene vida media corta, sin embargo iNOS requiere la inducción y la síntesis de la proteína enzimática y da como resultado una pro-

longada y sostenida liberación de NO. Las especies activas de oxígeno y las especies activas de nitrógeno, junto con algunas citoquinas, producidas en los procesos inflamatorios, son buenos promotores de la iNOS. En el caso de crecimiento hepático compensatorio las isoformas cNOS e iNOS juegan un papel crítico en el éxito de la regeneración hepática después de la hepatectomía parcial. La activación de la cNOS en las células endoteliales hepáticas ocurre después de la unión del ligando con el receptor (activación del receptor colinérgico) o provocado por cambios en el *shear stress* inducido por la hepatectomía sobre los vasos sanguíneos [60]. Si los cambios en la actividad cNOS a continuación de la unión con el ligando, pueden ser importantes en el mantenimiento del tono vascular en hígado normal, los cambios producidos por la presión hemodinámica inducida por la hepatectomía sobre las células endoteliales, es un factor crítico en el proceso regenerativo [66].

El reflejo de las fuerzas mecánicas ejercidas por la sangre sobre las células endoteliales es un importante estímulo fisiológico para la actividad de la NOS y para la liberación de NO del endotelio. El compromiso de dicho mecanismo puede llevar a un incremento de la resistencia vascular y en consecuencia de presión sanguínea elevada. Shoen *et al.* (60) han emitido la hipótesis siguiente: después de la hepatectomía parcial, el incremento en las fuerzas mecánicas debido al mayor flujo de sangre al hígado, induce la liberación de NO, el cual, a su vez, induce y desencadena la cascada de reacciones que conducen a la regeneración hepática. La presión venosa portal se eleva en la misma intensidad en el caso de la hepatectomía parcial que en el caso de una ligadura selectiva del ramal venoso portal, un modelo hemodinámico de hepatectomía parcial, que origina una situación experimental similar en ambos modelos. Estos autores determinaron los parámetros de actividad PF y c-fos mRNA, que resultaron inhibidos por administración del antagonista de la NOS L-NAME (N^o nitroarginina metil ester). Posteriormente, la administración del donador de NO, SIN-1 (3-morfolinosidnonimina-1), revirtió la inhibición en ambos modelos. Estos resultados proporcionan apoyo a la hipótesis que un cambio hemodinámico da como resultado incremento en el *shear stress* en el hígado que induce la generación de NO, el cual desencadena la cascada de la regeneración hepática [60].

Por tanto, después de la hepatectomía parcial, el hígado remanente recibe el volumen de sangre previo a la hepatectomía, que ocasiona un incremento significativo del estrés de tensión y un correspondiente incremento en cNOS generado por las células endoteliales hepáticas. Este incre-

mento inicial en la actividad de cNOS y liberación de NO es esencial en el desencadenamiento de los eventos iniciales y las vías señalizadoras requeridas para que las células hepáticas parenquimáticas entren en la fase G1 y para que comience la proliferación hepatocelular [66]. Por el contrario, los efectos iNOS resultan retrasados si se comparan con los de la cNOS, debido a que la iNOS necesita que sea inducida su expresión. Parece ser que la inducción de la iNOS ocurre predominantemente en hepatocitos y coincide con la fase de prereplicación celular (6-8 horas de la hepatectomía) [66]. La inducción de iNOS depende de citoquinas y se ha demostrado que coincide con la inducción, por IL-6, de los factores de transcripción [67]. Una combinación de TNF e IL-6 se requiere para la inducción de la actividad iNOS, la cual es en sí misma requerida para la regeneración normal después de hepatectomía parcial [68]. Así, NO juega un papel esencial en la repoblación de los hepatocitos del hígado, respondiendo la cNOS en el estímulo inicial que sigue a la resección quirúrgica, siendo requerida posteriormente la iNOS para proteger a las células de la muerte después que han entrado en el ciclo celular.

También se ha demostrado la participación de la iNOS en la regeneración hepática post necrótica inducida por hepatotóxicos. Investigaciones del grupo de Cascales han observado que el NO interviene en los mecanismos fisiopatológicos implicados en el desencadenamiento de la regeneración post necrótica inducida por una dosis subletal de thioacetamida [69]. En hígado la actividad y el mRNA iNOS se elevaron notablemente entre las 48 y las 96 horas de la intoxicación, coincidiendo con el máximo de regeneración a las 48 horas. Estos resultados indican que la actividad iNOS se eleva paralelamente a la regeneración post necrótica y que NO se libera por los hepatocitos o por las células de Kupffer aisladas de hígado en regeneración y cultivadas independientemente. Ambas, actividad NOS y mRNA iNOS se detectaron en el hígado regenerante postnecrótico indicando que éste es un efecto local. Sin embargo, el grado de contribución de las células de Kupffer y los hepatocitos a la actividad NOS total y síntesis de NO fue diferente ya que en condiciones normales las células de Kupffer, aunque menos abundantes que los hepatocitos producen un orden de magnitud más de NO que los hepatocitos. Esta diferencia inicial puede ser debida al efecto de la colagenasa del medio de perfusión, que activa las células de Kupffer, ya que cuando estas células se incubaron independientemente durante 24 horas, este efecto desapareció. En cualquier caso, NO puede fácilmente difundir a través de las células y el tipo de célula donde se genera no afecta su capacidad de inducir cambios en las células vecinas. En otro trabajo del mismo grupo

se trató de profundizar en los mecanismos en los que se encuentra implicado la iNOS y su producto NO. El compuesto nucleofílico aminoguanidina es una hidracina que disminuye el desarrollo de complicaciones en la diabetes y ha sido propuesto como agente protector en humanos [70]. Además la aminoguanidina está recibiendo mucha atención como inhibidor de la NOS debido al reconocimiento de su selectividad hacia la iNOS, su escasa toxicidad y su potencial clínico, sobre modelos de inflamación [71]. El tratamiento con aminoguanidina previo a la intoxicación con una dosis subletal de tioacetamida, ha proporcionado evidencia de disminuir significativamente la lesión hepática inducida por el hepatotóxico. Este efecto beneficioso del pretratamiento con aminoguanidina no se puede atribuir sólo a la acción sobre la iNOS, ya que en el anterior trabajo se observó que los niveles de mRNA iNOS eran sólo detectables en hepatocitos en proliferación, a las 48-96 horas de la intoxicación [72]. Sin embargo la aminoguanidina puede actuar como atrapador del peroxinitrito producido por al reaccionar el NO producido por la cNOS y por la iNOS residual, con el radical superóxido generado en la biotransformación del hepatotóxico, y de ahí su efecto protector sobre la severidad de la lesión hepatotóxica. Sin embargo, la aminoguanidina ejerce un efecto apoptogénico lo que hizo que en las fases últimas de la regeneración aparecieran poblaciones hipodiploides indicativas de hepatocitos apoptóticos.

De todos los experimentos comentados anteriormente puede deducirse que la generación de NO por las NOS es un fenómeno que se desencadena en cualquier proceso inflamatorio o de lesión, para permitir un incremento del flujo sanguíneo a través del órgano, y la inducción de la expresión de respuestas metabólicas específicas requeridas para la recuperación de la función hepática.

EFFECTO DE ENFERMEDADES HEPÁTICAS PREEXISTENTES SOBRE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

Datos obtenidos en centros clínicos que realizan cirugía hepatobiliar y trasplantes de donantes vivos han informado de una mortalidad operativa típica del 2-3%, asociada con grandes resecciones hepáticas cuando se realizan en hígado normal. En presencia de esteatosis la mortalidad operativa asociada se eleva al 10%. Además, el contenido en grasa mayor del 30-60% se asocia con un notable incremento de disfunción primaria [73-75]. La esteatohepatitis o inflamación del hígado debida a la infiltración

grasa, acarrea un riesgo aún mayor después de la resección hepática y se cree que dicho padecimiento es una contraindicación para resecciones hepáticas importantes o para el uso de trasplantes. La mortalidad después de la resección en estos hígados ocurre generalmente días después de la cirugía cuando la regeneración no se verifica y los hepatocitos mueren por apoptosis. El hígado graso es una patología que aparece en una serie de procesos patológicos tales como diabetes, hígado graso agudo del embarazo y obesidad mórbida. También aparece después de ingestión aguda de alcohol o con el uso de algunos medicamentos. Entre las anormalidades hepáticas que resultan de la esteatosis está la reducción del espacio sinusoidal, lo que a su vez origina un flujo sanguíneo anormal [76]. También, la acumulación de lípidos se asocia con cambios mitocondriales en el hepatocito, debidos a la lesión producida por los radicales libres originados por la oxidación anormal de los ácidos grasos y la acumulación de ácidos grasos dicarboxílicos durante el metabolismo intermediario. Un subgrupo de pacientes con hígado graso mostró predisposición genética, generalmente por mutaciones heterocigóticas en genes implicados en el metabolismo oxidativo incluyendo la hidroxiacl CoA deshidrogenasa de cadena larga, carnitina palmitoil transferasa I y 3-hidroxiacl-CoA deshidrogenasa de cadena media. La mayoría de los estudios genéticos se han concentrado en pacientes con hígado graso agudo del embarazo o síndrome HELLP, caracterizado por hemólisis, elevados enzimas hepáticos y niveles bajos de plaquetas [77]. Anormalidades en la inducción de enzimas dependientes del citocromo p450 (CYP) se han observado también en casos de hígado graso y esteohepatitis. Se han identificado numerosos polimorfismos del promotor CYP, que han mostrado diferentes grados de respuesta después de lesión hepática inducida por agentes hepatotóxicos. Los que responden en menor grado metabolizan con menos efectividad muchos agentes químicos y toxinas y por consiguiente dichos pacientes estarán expuestos a un riesgo incrementado de lesión celular y mitocondrial incluyendo la carcinogénesis [78, 79]. También pueden estar expuestos a un riesgo de desarrollar hígado graso y cirrosis debido a la exposición a la hepatotoxina y como resultado presentan alteraciones en la regeneración hepática [80]. Selzner y Claviene han examinado los efectos de la esteatosis sobre la regeneración hepática en un modelo de ratas Zucker obesas y normales [81]. Se ha observado un retraso y alteración en la mitosis como también un incremento en la tasa de mortalidad en ratas obesas con esteatosis. La IL-6 revirtió parcialmente este efecto normalizando la entrada de los hepatocitos en G1, pero fracasó en la progresión hacia las fases S y M. Los resultados de este estudio indican que la esteatosis altera la regeneración

normal del hígado en múltiples fases del ciclo regenerativo. De la misma manera Yang *et al.* [82] han descrito alteraciones en la regeneración hepática en ratas con esteatosis debida a la ingestión de alcohol. En este modelo se observaron anormalidades en la señalización TNF aumento de la apoptosis y actividad disminuida NFκB. Estos autores examinaron también los efectos de la endotoxina sobre la esteatosis hepática utilizando el modelo de ratas obesas Zucker y encontraron mayor sensibilidad a la endotoxina con producción alterada de TNF y señalización anormal [83]. En humanos se ha descrito que la esteatosis se asocia con incrementos en la apoptosis. La esteatohepatitis es una forma más severa de enfermedad de hígado graso asociada a la inflamación. La esteatohepatitis no alcohólica y la alcohólica son dos formas severas de enfermedad hepática que exhiben lesión hepatocelular con hepatocitos edematosos. Estas patologías son factores de riesgo para el desarrollo de la cirrosis y de hecho la esteohepatitis alcohólica o no alcohólica se cree que supone la etiología principal para la cirrosis criptogénica [84]. La regeneración hepática en pacientes con esteatohepatitis es notablemente anormal, debido a las anormalidades similares a las detectadas en la esteatosis como también debido a la sensibilidad a la apoptosis mediada por TNF y los efectos antiproliferativos de otras citoquinas como el interferon gamma. El desarrollo de cirrosis y fibrosis origina anormalidades en la arquitectura hepática que posteriormente alteran y limitan la regeneración hepática. Mayor control de la glucosa como también discreta pérdida de peso, disminuyen la hepatoesteatosis en un periodo de pocos meses. La modificación de la dieta referente a la menor ingesta de grasas y carbohidratos es beneficiosa para disminuir la esteatosis. Ningún estudio en humanos ha examinado aún los beneficios preoperativos de terapias hormonales para disminuir el hígado graso, aunque el glucagón se ha encontrado que reduce el contenido de grasa en hígado rápidamente en varios modelos animales. Otras investigaciones han examinado otros tratamientos, por ejemplo, el gemfibrazol y la ursodesoxicolina indicando que estos agentes pueden disminuir el contenido de lípidos hepáticos [85]. La aplicación de estas terapias antes de la resección hepática se encuentra en estudio. La fibrosis hepática es una consecuencia de la lesión hepática crónica. Representa una acumulación parcialmente reversible de colágeno fibrilar unida a una pérdida relativa del colágeno normal tipo IV de la membrana basal de la matriz. Este fenómeno comienza en el espacio subendotelial y se debe a la secreción de colágeno anormal por los lipocitos. La cirrosis es el estadio final resultado de fibrosis incontrolada con la progresión de nódulos debidos a puentes fibróticos y contracturas de cicatrices en el hígado [86]. La regeneración

anormal es manifiesta en el hígado fibrótico debido a la difusión crónica alterada de nutrientes y factores hepatotróficos a través de la membrana basal anormal y fibrilar (ver capítulo 3, Figura 3, en este volumen). La alteración en la función de los hepatocitos es el resultado de la ausencia de factores tróficos. La cirrosis representa el extremo de esta situación con cambios tales como hiperbilirrubinemia global, que se hace manifiesta como resultado de los hepatocitos anormales y la membrana basal. Además la contractura de las cicatrices es también una barrera física para la hiperplasia compensatoria después de la resección [87]. La regeneración hepática es una respuesta extraordinariamente regulada y orquestada frente a la pérdida de masa hepática por resección quirúrgica o lesión tóxica o vírica. La iniciación, progresión y cese de la respuesta proliferativa hepatocelular se regula a muchos niveles, desde los factores secretados liberados por otros órganos, al control intrínseco ejercido por el propio hepatocito. Enfermedades hepáticas preexistentes y algunas terapias alteran la capacidad regenerativa del hígado. La apreciación de los mecanismos implicados en la respuesta proliferativa normal y patológica, puede dar como resultado mejoras en los resultados de resecciones o trasplantes hepáticos.

ABREVIATURAS

AKT, serina-treonina quinasa, proteína quinasa B; AP1, heterodímero formado por jun y fos. Factor de transcripción; C3a y C5a, factores de complemento; CDK, quinasas dependientes de ciclina; C/EBP β , proteína intensificadora de la unión a CCAAT; ERK, quinasa regulada por señales extracelulares; HGF, factor de crecimiento de hepatocitos (*scatter factor*); IGF, factor de crecimiento insulínico; IGFBP1, proteína que se une al IGF; IL-6, interleuquina 6, citoquina; JAK, quinasa Janus; JNK, quinasa amino-terminal JUN; L-NAME (N^o nitroarginina metil ester); LPS, lipopolisacárido; MAPK, proteína quinasa activada por mitógenos; NF κ B, factor nuclear kappa B, factor de transcripción; NO, óxido nítrico; NOS óxido nítrico sintasa; PA, plasminógeno; PAI, proteína inhibidora del activador del plasminógeno; PI3K, fosfatidil inositol 3 quinasa; S6, quinasa; SIN-1 (3-morfolinosisidnonimina-1); SHP2, tirosina fosfatasa con dominio SH2 que recluta la proteína 2 unida al GBR2 y a SOS3; SOS3, supresor de la señalización por citoquinas; STAT, transductor de señales y activador de la transcripción; TGF β , factor transformante del crecimiento beta, citoquina; TNF, factor de necrosis tumoral, citoquina; TOR, objetivo de la

rapamicina; uPA, uroquinasa activadora del plasminógeno; VEGF, factor de crecimiento vascular endotelial.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cascales Angosto, M. (2006): *El extraordinario fenómeno de la regeneración hepática*. Real Academia Anal de Farmacia/Fund. J. Casares Gil, pp. 7-28.
2. Michalopoulos, G. K. (2007): Liver regeneration. *J Cell Physiol* **213**, 286-300.
3. Su, A. I.; Guidotti, L. G.; Pezacki, J. P.; Chisari, F. V., y Schultz, P. G. (2002): Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 11181-11186.
4. Moolten, F. L., y Bucher, N. L. (1967): Regeneration of rat liver: transfer of humoral agent by cross circulation. *Science* **158**, 272-274.
5. Taub, R. (2004): Liver regeneration: From myth to mechanism. *Nature Rev Mol Cell Biol* **5**, 836-847.
6. Fausto, N. (2000): Liver regeneration. *J Hepatol* **32**, 19-31.
7. Koniaris, L. G.; McKillop, I. H.; Schwartz, S. I., y Zimmers, T. A. (2003): Liver regeneration. *J. Am Col. Surg* **197**, 634-659.
8. Levy, D. E., y Lee, C. K. (2003): What does Stat3 do? *J Clin Invest* **109**, 1143-1148.
9. Heinrich, P. C., *et al.* (2002): Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* **374**, 1-20.
10. Taub, R.; Greenbaum, L. E., y Peng, Y. (1999): Transcriptional regulatory signals define cytokine-dependent and -independent pathways in liver regeneration. *Semin. Liver Dis.* **19**, 117-127.
11. Cressman, D. E.; Greenbaum, L. E.; DeAngelis, R. A.; Ciliberto, G., *et al.* (1996): Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* **274**, 1379-1383.
12. Sakamoto, T.; Liu, Z.; Murase, N.; Azur, T., *et al.* (1999): Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology* **29**, 403-411.
13. Talarmin, H.; Rescan, C.; Cariou, S.; Glaise, D., *et al.* (1999): The mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G₁ phase progression in proliferating hepatocyte. *Mol Cell Biol* **19**, 6003-6011.

5. MECANISMOS QUE REGULAN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

14. Ueki, T.; Kaneda, Y.; Tsutsui, H.; Nakanishi, K.; Sawa, Y., *et al.* (1999): Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats. *Nature Med.* **5**, 226-230.
15. Fujita, J., *et al.* (2001): Effect of *TNF* gene depletion on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Surgery* **129**, 48-54.
16. Aldeguer, X., *et al.* (2002): Interleukin-6 from intrahepatic cells of bone marrow origin is required for normal murine liver regeneration. *Hepatology* **35**, 40-48.
17. Strey, C. W.; Markiewski, M.; Mastellos, D.; Tudoran, R., *et al.* (2003): The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *J Exp Med* **198**, 913-923.
18. Ren, X.; Hogaboam, C.; Carpenter, A., y Colletti, L. (2003): Stem cell factor restores hepatocyte proliferation in IL-6 knockout mice following 70% hepatectomy. *J Clin Invest* **112**, 1407-1418.
19. Wuestefeld; Betz, U.; Lauber, J.; Buer, J.; Manns, M. P., *et al.* (2003): Interleukin-6/glycoprotein 130-dependent pathways are protective during liver regeneration. *J Biol Chem* **278**, 11281-11288.
20. Blindenbacher, A.; Langer, I.; Savino, R.; Terracciano, L., y Heim, M. H. (2003): Interleukin-6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* **38**, 674-682.
21. Galun, E.; Zeira, E.; Pappo, O.; Peters, M., y Rose-John, S. (2000): Liver regeneration induced by a designer human IL-6/sIL-6R fusion protein reverses severe hepatocellular injury. *FASEB J* **14**, 1979-1987.
22. Peters, M.; Zimmers, T. A.; McKillop, I. H.; Pierce, R. H.; Yoo, J. Y., y Koniaris, L. G. (2000): Combined interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor accelerates murine liver regeneration. *Gastroenterology* **119**, 1663-1671.
23. Zimmers, T.; McKillop, I. H.; Pierce, R. H.; Yoo, J. Y., y Koniaris, L. G. (2003): Massive liver growth in mice induced by systemic interleukin-6 administration. *Hepatology* **38**, 326-334.
24. Sun, R.; Jaruga, B.; Kulkarni, S.; Sun, H., y Gao, B. (2005): IL-6 modulates hepatocyte proliferation via induction of HGF/p21cip1: regulation by SOCS3. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 1943-1949.
25. Huh, C. G.; Factor, V. M.; Sánchez, A.; Uchida, K.; Conner, E. A., y Thorgeirsson, S. S. (2004): Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 4477-4482.
26. Padiaditakis, P.; López-Talavera, J. C.; Petersen, B.; Monga, S. P., y Michalopoulos, G. K. (2001): The processing and utilization of hepatocyte growth

- factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat. *Hepatology* **34**, 688-693.
27. Currier, A. R.; Sabla, G.; Locaputo, S.; Melin-Aldana, H., *et al.* (2003): Plasminogen directs the pleiotropic effects of uPA in liver injury and repair. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **284**, G508-G515.
28. Shimizu, M. *et al.* (2001): Mechanism of retarded liver regeneration in plasminogen activator-deficient mice: impaired activation of hepatocyte growth factor after Fas-mediated massive hepatic apoptosis. *Hepatology* **33**, 569-576.
29. Matsuda, Y., *et al.* (1997): Preventive and therapeutic effects in rats of hepatocyte growth factor infusion on liver fibrosis/cirrhosis. *Hepatology* **26**, 81-89.
30. Burr, A. W.; Toole, K.; Chapman, C.; Hines, J. E., y Burt, A. D. (1998): Anti-hepatocyte growth factor antibody inhibits hepatocyte proliferation during liver regeneration. *J Pathol* **185**, 298-302.
31. Scheving, L. A.; Stevenson, M. C.; Taylormoore, J. M.; Traxler, P., y Russell, W. E. (2002): Integral role of the EGF receptor in HGF-mediated hepatocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 197-203.
32. LeCouter, J.; Moritz, D. R.; Li, B.; Phillips, G. L.; Liang, X. H., *et al.* (2003): Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* **299**, 890-893.
33. Diehl, A. M.; Yin, M.; Fleckenstein, J.; Yang, S. Q., *et al.* (1994): Tumor necrosis factor- α induced c-jun during the regenerative response to liver injury. *Am J Physiol* **267**, G552-G561.
34. Tomiya, T.; Yamaoka, M.; Inoue, Y.; Nishikawa, *et al.* (2007): Effect of rapamycin on hepatocyte function and proliferation induced by growth factors. *Cher-motherapy* **53**, 59-69.
35. Behrens, A.; Sibilio, M.; David, J. P.; Mohle-Steinlein, U., *et al.* (2002): Impaired postnatal hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice lacking c-jun in the liver. *EMBO J* **21**, 1782-1790.
36. Leu, J. I.; Crissey, M. A. S.; Leu, J. P.; Ciliberto, G., y Taub, R. (2001): Interleukin-6-induced Stat3 and AP-1 amplify hepatocyte nuclear factor 1-mediated transactivation of hepatic genes, an adaptive response to liver injury. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 414-424.
37. Leu, J. I.; Crissey, M. A.; Craig, L. E., y Taub, R. (2003): Impaired hepatocyte DNA synthetic response posthepatectomy in insulin-like growth factor binding protein 1-deficient mice with defects in C/EBP β and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase regulation. *Mol Cell Biol* **23**, 1251-1259.

5. MECANISMOS QUE REGULAN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

38. Greenbaum, L. E.; Li, W.; Cressman, D. E.; Peng, Y.; Ciliberto, G.; Poli, V., y Taub, R. (1998): CCAAT enhancer-binding protein β is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy. *J Clin Invest* **102**, 996-1007.
39. Kovalovich, K.; DeAngelis, R. A.; Li, W.; Furth, E. E.; Ciliberto, G., y Taub, R. (2000): Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice. *Hepatology* **31**, 149-159.
40. Debonera, F.; Aldeguer, X.; Shen, X.; Gelman, A. E., *et al.* (2001): Activation of interleukin-6/Stat3 and liver regeneration following transplantation. *J Surg Res* **96**, 289-295.
41. Yamada, Y., y Fausto, N. (1998): Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor. *Am J Pathol* **152**, 1577-1589.
42. Czaja, M. J.; Xu, J., y Alt, E. (1995): Prevention of carbon tetrachloride induced rat liver injury by soluble tumor necrosis factor receptor. *Gastroenterology* **108**, 1849-1854.
43. Iimuro, Y., *et al.* (1998): NF κ B prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. *J Clin Invest* **101**, 802-811.
44. Maeda, S.; Chang, L.; Li, Z. W.; Luo, J. L.; Leffert, H., y Karin, M. (2003): IKK β is required for prevention of apoptosis mediated by cell-bound but not by circulating TNF α . *Immunity* **19**, 725-737.
45. Shi, J.; Aisaki, K.; Ikawa, Y., y Wake, K. (1998): Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. *Am J Pathol* **153**, 515-525.
46. Kovalovich, K.; Li, W.; DeAngelis, R.; Greenbaum, L. E.; Ciliberto, G., y Taub, R. (2001): Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2 and Bcl-xL. *J Biol Chem* **276**, 26605-26613.
47. Haga, S.; Terui, K.; Zhang, H. Q.; Enosawa, S.; Ogawa, W., *et al.* (2003): Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and independent mechanisms. *J Clin Invest* **112**, 989-998.
48. Taub, R. (2003): Hepatoprotection via the IL-6/Stat3 pathway *J Clin Invest* **112**, 978-980.
49. Leu, J. I.; Crissey, M. A., y Taub, R. (2003): Massive hepatic apoptosis associated with TGF- β 1 activation after Fas ligand treatment of IGF binding protein-1-deficient mice. *J Clin Invest* **111**, 129-139.

50. Corpechot, C.; Barbu, V.; Wendum, D.; Chignard, N., *et al.* (2002): Hepatocyte growth factor and c-Met inhibition by hepatic cell hypoxia: a potential mechanism for liver regeneration failure in experimental cirrhosis. *Am J Pathol* **160**, 613-620.
51. Xue, F. *et al.* (2003): Hepatocyte growth factor gene therapy accelerates regeneration in cirrhotic mouse livers after hepatectomy. *Gut* **52**, 694-700.
52. Ozaki, M.; Haga, S.; Zhang, H. Q.; Irani, K., y Susuki, S. (2003): Inhibition of hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress in HGF-stimulated antiapoptotic signaling: role of PI3-K and Akt kinase upon rac1. *Cell Death Differ* **10**, 508-515.
53. Wang, X. *et al.* (2002): A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met. *Mol. Cell* **9**, 411-421.
54. Schafer, M., Werner, S. (2007): Transcriptional Control of Wound Repair. *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**, 1617-1626.
55. Marubashi, S.; Sakon, M.; Nagano, H.; Gotoh, K.; Hashimoto, K., *et al.* (2004): Effect of portal hemodynamics on liver regeneration studied in a novel porto-hepatic shunt rat model. *Surgery* **136**, 1028-1037.
56. Khan, Z.; Michalopoulos, G. K., Stolz, D. B. (2006): Peroxisomal localization of hypoxia-inducible factors and hypoxia-inducible factor regulatory hydroxylases in primary rat hepatocytes exposed to hypoxia-reoxygenation. *Am J Pathol* **169**, 1251-1269.
57. Nakatsuka, H.; Takaaki, S.; Yamamoto, K.; Sato, Y., *et al.* (2006): Shear stress induces hepatocyte *PAI-1* gene expression through cooperative Sp1/Ets-1 activation of transcription. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **291**, G26-G34.
58. Kan, P.; Miyoshi, H.; Yanagi, K., and Ohshima, N. (1998): Effects of shear stress on metabolic function of the co-culture system of hepatocyte/nonparenchymal cells for a bioartificial liver. *ASAIO J* **44**, M441-M444.
59. Tilles, A. W.; Baskaran, H.; Roy, P.; Yarmush, M. L., y Toner, M. (2001): Effects of oxygenation and flow on the viability and function of rat hepatocytes cocultured in a microchannel flat-plate bioreactor. *Biotechnol Bioeng* **73**, 379-389.
60. Schoen, J. M.; Wang, H. H.; Minuk, G. Y., and Lau, W. W. (2001): Shear stress induced nitric oxide release triggers the liver regeneration cascade. *Nitric Oxide* **5**, 453-464.
61. Braet, F.; Shleper, M.; Paizi, M.; Brodsky, S., *et al.* (2004): Liver sinusoidal endothelial cell modulation upon resection and shear stress *in vitro*. *Comp Hepatol* **3**, 7-17.

5. MECANISMOS QUE REGULAN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

62. Bockhorn, M.; Goralski, M.; Prokofiev, D.; Dammann, P. *et al.* (2007): VEGF is important for early liver regeneration after partial hepatectomy. *J Surg Res* **138**, 291-298.
63. Wack, K. E.; Ross, M. A.; Zegarra, V.; Sysko, L. R.; Watkins, S. C.; Stolz, D. B. (2001): Sinusoidal ultrastructure evaluated during the revascularization of regenerating rat liver. *Hepatology* **33**, 363-378.
64. Radomski, M. W. (1995): Nitric oxide: biological mediator, modulator and effector. *Ann Med* **27**, 321-329.
65. Forstermann, U.; Boissel, J. P.; Kleinert, H. (1998): Expressional control of the «constitutive» isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* **12**, 773-790.
66. Wang, H. H.; Lutt, W. W. (1997): Does nitric oxide (NO) trigger liver regeneration? *Proc West Pharmacol Soc* **40**, 17-18.
67. Sass, G.; Koerber, K.; Bang, R., *et al.* (2001): Inducible nitric oxide synthase is critical for immune-mediated liver injury in mice. *J Clin Invest* **107**, 439-447.
68. Rai, R. M.; Lee, F. Y.; Rosen, A., *et al.* (1998): Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthase deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 13829-13834.
69. Díez-Fernández, C.; Sanz, N.; Bosca, L.; Hortelano, S., y Cascales, M. (1997): Involvement of nitric oxide synthesis in hepatic perturbations induced in rats by a necrogenic dose of thioacetamide. *Br J Pharmacol.* **121**, 820-826.
70. Hames, H.; Martin, S.; Federlin, K.; Geisen, K., y Brownlee, M. (1991): Aminoguanidine inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**, 11555-11558.
71. Szabo, I. C.; Ferrer-Sueta, G.; Zingarelli, B.; Southan, G. J.; Salman, A. L., y Radi, R. (1997): Mercaptoethylguanina and guanidine inhibitors of nitric oxide synthase react with peroxynitrite and protect against peroxynitrite-induced oxidative damage. *J Biol Chem* **272**, 9030-9036.
72. Díez-Fernández, C.; Sanz, N.; Álvarez, A. M.; Zaragoza, A., y Cascales, M. (1998): Influence of aminoguanidine on parameters of liver injury and regeneration induced in rats by a necrogenic dose of thioacetamide. *Br J Pharmacol* **125**, 102-108.
73. Behrns, K. E.; Tsiotos, G. G.; DeSouza, N. F., *et al.* (1998): Hepatic steatosis as a potential risk factor for major hepatic resection. *J Gastrointest Surg* **2**, 292-298.
74. Little, S. A.; Jarnagin, W. R.; DeMatteo, R. P., *et al.* (2002): Diabetes is associated with increased perioperative mortality but equivalent long-term outcome after hepatic resection for colorectal cancer. *J Gastrointest Surg* **6**, 88-94.

75. Todo, S.; Demetris, A. J.; Makowka, L., *et al.* (1989): Primary nonfunction of hepatic allografts with preexisting fatty infiltration. *Transplantation* **47**, 903-905.
76. Hakamada, K.; Sasaki, M.; Takahashi, K., *et al.* (1997): Sinusoidal flow block after warm ischemia in rats with diet-induced fatty liver. *J Surg Res* **70**, 12-20. 152.
77. Ibdah, J. A.; 152 Yang, Z., y Bennett, M. J. (2000): Liver disease in pregnancy and fetal fatty acid oxidation defects. *Mol Genet Metab* **71**, 182-189.
78. Minchin, R. F.; McManus, M. E.; Boobis, A. R., *et al.* (1985): Polymorphic metabolism of the carcinogen 2-acetylaminofluorene in human liver microsomes. *Carcinogenesis* **6**, 1721-1724.
79. Farrell, G. C. (2002): Drugs and Steatohepatitis. *Seminars in Liver Disease* **22**, 185-194.
80. Kurumiya, Y.; Nozawa, K.; Sakaguchi, K., *et al.* (2000): Differential suppression of liver specific genes in regenerating rat liver induced by extended hepatectomy. *J Hepatol* **32**, 636-644.
81. Selzner, M., y Clavien, P. A. (2000): Failure of regeneration of the steatotic rat liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway. *Hepatology* **31**, 35-42.
82. Yang, S. Q.; Lin, H. Z.; Yin, M., *et al.* (1998): Effects of chronic ethanol consumption on cytokine regulation of liver regeneration. *Am J Physiol* **275**, G696-G704.
83. Caldwell, S. H.; Oelsner, D. H.; Iezzoni, J. C., *et al.* (1999): Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology* **29**, 664-669.
84. Angulo, P., y Lindor, K. D. (2002): Non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* **17 Suppl 1**, 186-190.
85. Laurin, J.; Lindor, K. D.; Crippin, J. S., *et al.* (1996): Ursodeoxycholic acid or clofibrate in the treatment of non-alcohol- induced steatohepatitis: a pilot study. *Hepatology* **23**, 1464-1467.
86. Friedman, S. L. (2001): The hepatic stellate cell. *Semin liver disease* **21**, 307-452.
87. Riley, T. R., y Bhatti, A. M. (2001): Preventive strategies in chronic liver disease: part I. Alcohol, vaccines, toxic medications and supplements, diet and exercise. *Am Fam Physician* **64**, 1555-1560.

6. Células madre hepáticas

INTRODUCCIÓN

Una célula madre es una célula indiferenciada capaz de autorrenovarse durante toda su vida y de generar uno o más tipos de células diferenciadas. Cada célula adulta tiene una «madre», de quien procede y una línea de antepasados cada vez menos diferenciados. Los antepasados últimos son las células del embrión temprano que son totipotenciales. A partir de aquí, siguiendo la línea en el feto y después en el adulto, aparecen las células madre pluripotenciales y multipotenciales. Aquellas cercanas a la diferenciación final se denominan células progenitoras comprometidas o transitorias [1, 2].

El considerable interés que rodea el campo de las células madre se basa en las propiedades biológicas de estas células, su capacidad de autorrenovarse y regenerar órganos y tejidos. Aunque se ha debatido durante años la existencia de células madre hepáticas, hoy se acepta que el hígado contiene células con propiedades de células madre y que esas células pueden, una vez activadas, proliferar y diferenciarse en células epiteliales hepáticas maduras bajo ciertas circunstancias fisiológicas [3, 4]. La terapia celular con estas células madre hepáticas es un acceso prometedor que ha de contribuir al tratamiento de enfermedades. La identificación de las células madre hepáticas presenta un gran interés como potencial terapéutico, que podrá ser utilizado en ingeniería tisular y protocolos de terapia génica. Entre las células madre están los propios hepatocitos, las células ovales, las células de la médula ósea y los hepatoblastos.

Las células madre no son sólo unidades de organización biológica responsables del desarrollo y regeneración de tejidos y órganos, sino también son unidades en evolución por selección natural. El hígado, aunque es un órgano transcripcionalmente muy activo, su capacidad de replicación en

condiciones normales es muy baja. A pesar de este recambio celular tan bajo, los dos linajes celulares parenquimáticos, los hepatocitos y las células del epitelio biliar poseen una notable capacidad para hacer frente a las demandas que ocasiona la pérdida de la masa celular hepática. El mejor ejemplo de esta capacidad proliferativa de los hepatocitos y las células del epitelio biliar del hígado adulto, lo muestra el modelo experimental de hepatectomía parcial del 70% del hígado en ratas y ratones, en el cual la hiperplasia compensatoria en los lóbulos remanentes restaura la masa y función hepáticas en un breve período de tiempo. El éxito del trasplante de hígado en clínica tiene su base en estos modelos animales que reflejan correctamente la capacidad de regeneración del hígado humano [5]. Debido a este rasgo bien establecido de los hepatocitos y células del epitelio biliar adulto de regenerar el hígado después de pérdida del tejido hepático por hepatectomía, agentes hepatotóxicos o víricos, la existencia de células madre hepáticas que pueden participar en la regeneración ha sido controvertida durante mucho tiempo, y esta controversia tiene su base en no querer reconocer que las células madres pueden existir con diferentes grados de diferenciación y poseer diferentes capacidades de generar linajes de progenia.

CÉLULAS QUE INTERVIENEN EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

Como la mayoría de órganos en un adulto sano, el hígado mantiene un perfecto equilibrio entre la ganancia y la pérdida de células. Existen tres clases de células que pueden responder a la pérdida de hepatocitos:

1. *Hepatocitos maduros*, que proliferan en caso de renovación del tejido hepático normal o después de un daño hepático. Los hepatocitos remanentes son numerosos y unipotentes que responden con rapidez a la lesión hepática.
2. *Células ovals*, que se activan cuando la lesión hepática es extensa y crónica o en caso de que se inhiba la capacidad proliferativa de los hepatocitos remanentes. Estas células se encuentran en el canal de Hering o adyacentes a él. Son menos numerosas, clonogénicas y bipotentes y responden durante más tiempo con una proliferación limitada.
3. *Células madre hepáticas exógenas*, las cuales derivan de las células madre hematopoyéticas circulantes o de las células madre

de la médula ósea. Responden a la lesión producida por alcohol alílico y a la hepatocarcinogénesis.

Permanece aún enigmático cómo estas tres poblaciones de células se integran para conseguir un equilibrio homeostático [6]. El automantenimiento es un rasgo fundamental y común de todas las células madre. Aquella población celular que tiene capacidad de autorrenovarse es quizá la única definición que hay que aplicar a todas las células madre. En este aspecto, el hígado adulto, teniendo la gran capacidad de mantener el número de células durante toda la vida del organismo, puede considerarse como un sistema simple de células madre en el cual es el hepatocito la propia célula madre. Experimentos de trasplante de células hepáticas en un modelo de ratón transgénico han demostrado el enorme potencial de crecimiento de los hepatocitos, de 12 a 16 duplicaciones por célula donante [7]. Esto apoya el concepto que considera al parénquima hepático como un sistema de linaje unipotencial de células madre. Si usamos la definición clásica para las células madre propuesta por Potten y Loeffler [8], se tienen que clasificar los grupos siguientes: células madre actuales, células madre potenciales y células madre comprometidas. Las *células madre actuales* se definen como células no diferenciadas capaces de proliferar, automantenerse, producir un gran número de progenias diferenciadas, regenerar el tejido después de la lesión y flexibilidad en el uso de estas opciones. Las *células madre potenciales* son homólogas a las anteriores, pero quiescentes o en estado latente, que pueden ser reactivadas para llegar a funcionales. Las *células madre comprometidas* son aquellas células en división transitoria, que comparten con las células diferenciadas terminales la capacidad de ejecutar funciones específicas del tejido. Aplicando estas definiciones, los hepatocitos aparecen como células madre comprometidas, que son quiescentes en condiciones normales, pero que en casos de emergencia se activan para producir progenia, cuya sola opción de diferenciación es la hepatocítica.

El hecho de que los hepatocitos fetales tempranos o *hepatoblastos* sean progenitores de los hepatocitos y de las células del epitelio biliar lleva a la conclusión que los hepatoblastos son precursores *bipotenciales*. No existe evidencia sustancial que indique que los hepatocitos maduros diferenciados sean más que un sistema celular comprometido y unipotencial. La posible excepción a esta generalización es el concepto de metaplasia ductular o transformación de los hepatocitos en células ductulares. Estudios de enfermedades colestáticas crónicas en humanos, utilizando histoquímica enzimática e inmunohistoquímica, han proporcionado evi-

dencias de la transformación gradual de los hepatocitos en células del tipo del conducto biliar [9]. Sin embargo, no existen evidencias de que estas células exhiban características funcionales del epitelio biliar normal. Es por tanto cuestionable, pero posible, que la metaplasia ductular de los hepatocitos observada en enfermedades colestáticas puedan reflejar una capacidad bipotencial en los hepatocitos.

Dejando a un lado el sistema hepatocítico, hay ya pruebas evidentes que indican la existencia, en rincones del epitelio biliar, de un compartimento de células que pueden producir progenia, *las células ovals*, capaces de diferenciarse en varios linajes: epitelio biliar, hepatocitos, páncreas exocrino etc. [10]. También, como ha descrito Sell [11], debe existir un sistema periductular de células madre capaz de diferenciarse en todos los linajes hepatocíticos. Estas células ductulares/periductulares se las denomina frecuentemente como compartimento de células madre hepáticas. Existen evidencias ampliamente contrastadas que demuestran que las células ovals, la progenia temprana del compartimento de células madre hepáticas, son más primitivas y menos diferenciadas que los hepatocitos o las células del epitelio biliar y las múltiples opciones de diferenciación que poseen, están firmemente establecidas [10, 11]. Por tanto las células ovals encuentran una potencialidad más elevada que los hepatocitos al clasificarlas entre las células madre, ya que están menos diferenciadas, demuestran

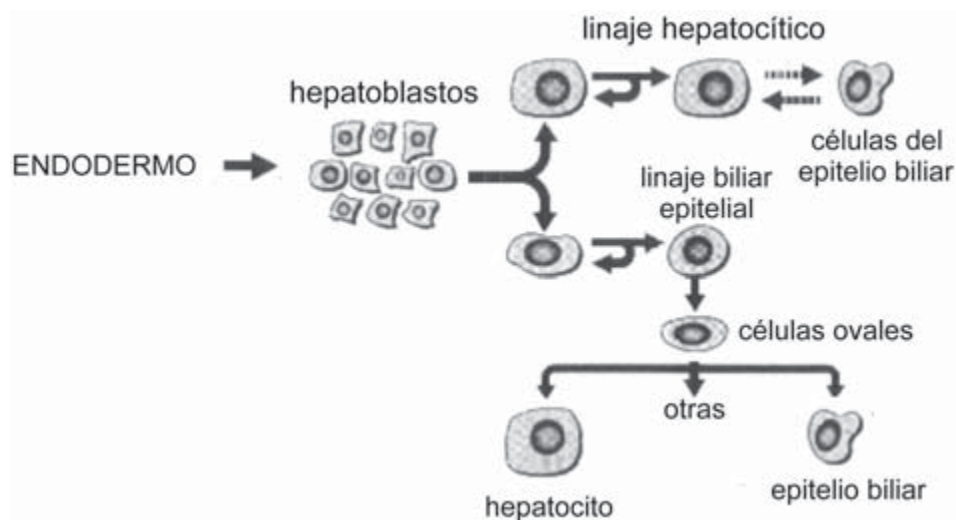


FIGURA 1. Diagrama que muestra el desarrollo de los linajes celulares en hígado [13].

capacidad proliferativa y presentan múltiples opciones de diferenciación, entre las que se incluyen los hepatocitos y las células del epitelio biliar.

Se desconoce aún si las células ovales poseen la capacidad de proliferar y diferenciarse durante toda la vida de un animal. Sin embargo, los precursores inmediatos de las células ovales parece que se aproximan a la definición de Potten y Loeffler, de células madre potenciales, cuyas funciones de generar progenia están latentes, pero pueden ser reactivadas en condiciones apropiadas. Esta definición de células madre hepáticas «facultativas» fue propuesta por Grisham en 1980 [12], cuya activación podía conducir a la proliferación de las células ovales. A la luz de estas observaciones, Torgeirsson [13] propone que el hígado ha de ser contemplado como compuesto por dos sistemas de células madre: el unipotencial de células comprometidas (hepatocitos) y el bipotencial epitelial (ductular) no parenquimático (Figura 1).

PROCEDENCIA DE LOS HEPATOCITOS *DE NOVO* EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

De lo anteriormente mencionado y dependiendo de la naturaleza del proceso regenerativo, los hepatocitos neoformados responsables de la regeneración hepática pueden derivar de tres fuentes:

1. De la replicación de los hepatocitos remanentes.
2. De la diferenciación de células ovales.
3. De células madre hematopoyéticas de la médula ósea.

Otras procedencias derivan de los *hepatocitos pequeños con capacidad proliferativa* (SHPC), frecuentemente comentada en casos de estrés regenerativo, y los *hepatoblastos* [4, 14].

La replicación de los hepatocitos maduros en hígado en regeneración ha sido ampliamente documentada en capítulos anteriores. La diferenciación de las células ovales se ha establecido como un mecanismo que genera hepatocitos en número significativo en condiciones de inhibición o bloqueo de la replicación de los hepatocitos (Tabla 1). Sin embargo, la contribución de células madre de la médula ósea para la generación de hepatocitos en la repoblación y regeneración del hígado, permanece un tanto incierta, tanto respecto a su intensidad como a los mecanismos implicados [4].

TABLA 1. *Procedencia de los hepatocitos en la regeneración hepática* [4]

Proliferación celular dependiente de la replicación de hepatocitos diferenciados

- Hepatectomía parcial 2/3 y 1/3.
- Lesión perivenosa inducida por hepatotóxicos (CCl₄, tioacetamida).
- Lesión periportal inducida por cocaína en ratones pretratados con fenobarbital.

Proliferación celular dependiente de células ovals que generan hepatocitos

- Lesión inducida por galactosamina.
- Lesión inducida por dieta deficiente en colina combinada con etionina o acetilaminofluoreno (AAF).
- Hepatectomía parcial 2/3 combinada con AAF o dipina.
- CCL₄ combinado con N-2-acetilaminofluoreno.
- 3,5-dietoxicarbonil-1-1, 4-dihidrocolidina (DCC).
- Alcohol alílico.

Proliferación de células pequeñas precursoras de hepatocitos (SHPC)

- Lesión causada por retrorsina.
- Lesión causada por galactosamina.

Otras

- Reacciones ductulares atípicas en estados avanzados de cirrosis de varias etiologías.
 - Esteatosis hepática.
 - Displasias de células pequeñas.
 - Necrosis hepatocelular masiva.
-

Como regla general, la replicación de los hepatocitos existentes es la vía más rápida y más eficiente para generar hepatocitos en el proceso de regeneración y reparación hepáticas. Las células ovals se replican y diferencian en hepatocitos cuando la proliferación de los hepatocitos remanentes y maduros se retrasa o está completamente bloqueada. Las células madre de la médula ósea pueden generar hepatocitos en hígado trasplan-

tado, pero hasta aquí, la frecuencia de los hepatocitos producidos por esta ruta es muy baja y tales células no son siempre detectables. Hay que anotar, sin embargo, que en hígado trasplantado, las células de la médula ósea son una fuente importante de células no parenquimáticas, tales como las células de Kupffer y las células endoteliales. Los linajes celulares en hígado se muestran en la Figura 2. Durante el desarrollo embrionario son los hepatoblastos los que dan origen a los dos linajes epiteliales hepáticos: el hepatocítico y el colangiocítico. Las células ovales se originan en asociación con el sistema biliar intrahepático, formado por hepatoblastos localizados en las cercanías del espacio portal. En hígado adulto, los hepatocitos y los colangiocitos pueden replicarse. Las células ovales suponen una reserva bipotencial capaz de generar hepatocitos siempre que sea bloqueada la replicación de los hepatocitos. Los pequeños hepatocitos de transición son células con capacidad proliferativa que algunos autores los hacen derivar de las células ovales y pudieran derivar también de los hepatoblastos (Figura 2).

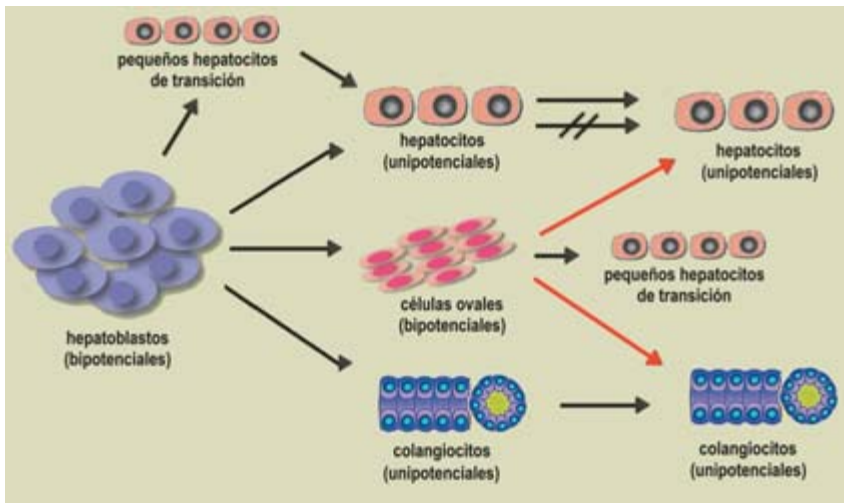


FIGURA 2. **Linajes celulares en hígado.** Durante el desarrollo embrionario, los hepatoblastos dan origen a dos linajes epiteliales hepáticos: hepatocítico y colangiocítico. Las células ovales se originan en asociación con el sistema biliar intrahepático, formado por hepatoblastos localizados en las cercanías del espacio portal. En hígado adulto, los hepatocitos y los colangiocitos pueden replicarse. Las células ovales suponen una reserva bipotencial capaz de generar hepatocitos, siempre que sea bloqueada la replicación de los hepatocitos (líneas rojas). Los pequeños hepatocitos de transición son células con capacidad proliferativa que algunos autores los hacen derivar de las células ovales y pudieran derivar también de los hepatoblastos (modificado de Fausto, 2004) [4].

HEPATOCITOS COMO CÉLULAS MADRE HEPÁTICAS

Se estima que el hígado, a pesar de su bajo recambio, se reemplaza por tejido nuevo una vez al año [15]. El reemplazo del tejido hepático perdido se realiza mediante la proliferación de los hepatocitos maduros y de las células sinusoidales [16]. Parece ser que los hepatocitos periportales son los que proliferan antes, pero todos los hepatocitos, incluso aquellos cercanos al terminal venoso, tienen capacidad de sufrir la mitosis y proliferar adecuadamente [17].

Como la regeneración hepática posthepatectomía del 70% de la masa hepática requiere no más de dos rondas de replicación de los hepatocitos remanentes, hace años se asumió que la capacidad replicativa de los hepatocitos era muy limitada. Esta idea ha cambiado radicalmente, en primer lugar porque experimentos con hepatocitos en cultivo aislados de ratones transgénicos que expresaban factores del crecimiento, han demostrado que la replicación a largo plazo de los hepatocitos es compatible con un fenotipo diferenciado [18], y porque resultados aún más notables de experimentos de trasplante de hepatocitos en ratones transgénicos que expresan uroquinasa activadora del plasminógeno (uPA), demostraron también que la repoblación del hígado por hepatocitos trasplantados implicaba al menos doce rondas de replicación [19]. Posteriores experimentos de trasplantes seriados realizados en ratones deficientes en fumarilacetoacetato hidrolasa (ratones knockout FAH), han detectado que los hepatocitos pueden replicarse 70 o más veces [20]. En estos trasplantes seriados no hubo evidencias experimentales que demostraran que la repoblación dependiera de células madre exógenas. Esta conclusión también está apoyada por resultados que demuestran que los hepatocitos, sean diploides, tetraploides u octoploides, tienen la misma capacidad de dividirse y repoblar hígados lesionados [21]. Así, aunque los hepatocitos sean quiescentes en hígado normal y se repliquen de manera limitada y regulada durante la regeneración posthepatectomía, estas células guardan un enorme potencial proliferativo, que puede desencadenarse en ciertas condiciones. Sin embargo, existen evidencias que demuestran que esta enorme capacidad replicativa de los hepatocitos disminuye en casos de cirrosis avanzada y de lesión hepática crónica, alcanzando entonces los hepatocitos un estado de senescencia replicativa, quizás como consecuencia del acortamiento de telómeros [22].

CÉLULAS MADRE HEPÁTICAS EN EL CANAL DE HERING

La existencia de células con propiedades de células madre, que pueden diferenciarse en hepatocitos fue postulada por primera vez hace casi setenta años por Kinoshita en 1937 [23] y después sugerida como una posibilidad por otros investigadores. Wilson y Leduc [24], ensayando la regeneración hepática en ratón después de lesión crónica, postularon que los colangiocitos no diferenciados podían proliferar para formar células ovales que podrían, a su vez, diferenciarse en hepatocitos y células del epitelio biliar. El principal apoyo a la existencia de las células madre hepáticas procede de estudios en carcinogénesis hepática [25]. Varios modelos experimentales en rata han surgido de estos estudios: tratamiento con dietas deficientes en colina, tratamiento con D-galactosamina, y el tratamiento con 2-acetilaminofluoreno (AAF) previo a la hepatectomía parcial. En todos estos modelos hay una severa necrosis hepatocelular acoplada a una incapacidad aparente de los hepatocitos residuales a proliferar. Como respuesta aparecen en hígado unas células pequeñas en la zona periportal que presentan escaso citoplasma y un núcleo ovoidal, las células ovales [3]. Estas representan la progenie del compartimento de células madre hepáticas y en algunas instancias son también precursoras de tumores hepáticos [25]. La localización anatómica precisa del compartimento de células madre hepáticas en hígado normal, parece que se encuentra en el lugar de las células ductulares terminales que conectan el canal de Hering con el canalículo biliar y con una población distinta de células periductulares. Las células ovales son capaces de diferenciarse *in vivo* en dos linajes, el hepatocítico y el biliar. Por otra parte, las células ovales aisladas en cultivo, pueden ser inducidas a diferenciarse en hepatocitos y en células del epitelio biliar, por tanto, tienen opciones proliferativas semejantes a las de los hepatoblastos en los estadios tempranos del desarrollo hepático. Como tales, las células ovales poseen capacidad proliferativa bipotencial para dos linajes del parénquima hepático y también pueden exhibir una capacidad para diferenciarse en linajes no hepatocíticos cuando el microambiente hepático está drásticamente alterado [3].

Durante el desarrollo del hígado, los hepatocitos fetales tempranos o hepatoblastos, son progenitores de los hepatocitos adultos y de las células del epitelio biliar, lo cual atribuye a los hepatoblastos una capacidad proliferativa bipotencial [4]. Está aún por demostrar si ambos linajes celulares derivados de los hepatoblastos retienen la capacidad bipotencial de sus células madre. Las células ovales tienen opciones similares a las de los hepa-

toblastos en las etapas iniciales del desarrollo hepático. Por tanto, las células ovales son «precursores bipotenciales» para los dos linajes del parénquima hepático. Desde el punto de vista morfológico, las células ovales son pequeñas, poseen una relación grande núcleo/citoplasma, el núcleo tiene forma oval (de ahí su nombre). Son heterogéneas y muestran características de células del conducto biliar y de hepatocitos. Se activan para proliferar en respuesta a la pérdida de masa hepática severa y crónica en el hígado maduro o en casos de que sea inhibida la proliferación de los hepatocitos, tal como por infección vírica. En estos casos su progenie se extiende por el lóbulo hepático y se diferencia en hepatocitos y células del conducto biliar, reconstruyendo la masa hepática perdida [4]. Experimentos de inmunolocalización de OV-6 y dos marcadores biliares, citoqueratina 19 (CK 19) y el antígeno epitelial humano 125 (HEA-125) [26], se realizaron en secciones de hígado humano normal, de cirrosis biliar primaria y de colangitis esclerosante primaria. De esta manera se ha comprobado que las células OV-6 positivas, son análogas a las observadas en modelos de rata y pueden representar las células madre en el hígado humano que se diferencian en células del conducto biliar OV6 positivas y en hepatocitos. La reacción más reconocida en apoyo de la existencia de células ovales en hígado humano adulto es la aparición de «reacciones ductulares» [27], que consisten en la respuesta proliferativa a muchos tipos de lesión hepática en humanos, caracterizada por un incremento en estructuras similares a las del conducto biliar. En una serie de estudios morfológicos, la presencia de células con apariencia de células ovales ha sido descrita en tejido hepático humano con enfermedades tales como necrosis hepática severa, cirrosis alcohólica, hiperplasia focal nodular, hepatoblastoma, cirrosis biliar y atresia biliar. Se han obtenido resultados interesantes a partir de un detallado estudio para evaluar la cronología de la activación de las células madre hepáticas en un modelo experimental de AAF/hepatectomía parcial [28]. Para ello, se ha utilizado una combinación inmunohistoquímica con anticuerpos OV-6 y desmina y autoradiografía, después de administración de [3H] timidina inmediatamente después de la hepatectomía. Estos experimentos han demostrado que la población que antes prolifera, las células OV-6 positivas, se localiza en los conductillos biliares. Esta temprana población de células OV-6 positivas expresa albúmina y α -fetoproteína, lo que indica que la fuente principal de células ovales, deriva de las células que recubren los conductos biliares y que estas células constituyen el compartimento de células madre hepáticas durmientes facultativas. El trabajo experimental de Theise *et al.* [29] sugiere que las células ovales descansan dentro o adyacentes al canal de Hering, que es la unión anatómica del sistema canalicular hepatocítico y las ramas terminales

del árbol biliar. Las células ovales expresan marcadores similares a los hepatocitos o células del canalículo biliar, tales como α -fetoproteína, citoqueratina 19 (CK19) y gamma glutamil transferasa. Los anticuerpos monoclonales tales como OV6, OC2 y BD1, también ayudan a su caracterización. OV6 identifica una citoqueratina de 56 kDa, con epítomos compartidos con las citoqueratinas 14 y 19. OV-6 está presente en hígado de rata en los conductos biliares, células ovales y hepatocitos nodulares y también en hepatocitos de transición. En hígado humano OV-6 identifica células en la placa ductular, en las células ovales y en los conductos y conductillos en tejido fetal y células ovales en hiperplasia nodular [30]. Durante el desarrollo embrionario la α -fetoproteína, una glicoproteína sérica muy abundante en animales en desarrollo, se detecta en hígado fetal, y tanto la proteína, como su mRNA se expresan en grandes cantidades en los primitivos hepatoblastos y en los hepatocitos postnatales. También la α -fetoproteína se expresa en células ovales y en los hepatocitos pequeños basofílicos que aparecen durante las etapas iniciales de la carcinogénesis. Por tanto la expresión de la α -fetoproteína puede utilizarse como indicador de los linajes iniciales y ha servido como marcador importante para la detección de la activación del compartimiento de células madre hepáticas. El factor de células madre (Stem Cell Factor) SCF, también denominado ligando c-Kit, es una tirosina quinasas transmembrana que pertenece a la subfamilia del factor del crecimiento derivado de las plaquetas. El sistema SCF/c-Kit se cree que juega un importante papel en la biología de las células madre durante la hematopoyesis, gametogénesis y melanogénesis [31]. Se ha demostrado que SCF y c-Kit se expresan en las células del conducto biliar y que la expresión de ambos genes se incrementa en las células ovales en el modelo acetil aminofluoreno/hepatectomía parcial (AAF/PH).

CONDUCTOS BILIARES EN DESARROLLO Y CÉLULAS OVALES EN EL ADULTO

Tanto los hepatocitos como las células del conducto biliar proceden de los hepatoblastos derivados del endodermo (Figura 3) que expresan albúmina (Alb^+) y α -fetoprotein (AFP^+) [32]. En el día 14.º del desarrollo embrionario en ratón y en el 15.º en la rata, los hepatoblastos, localizados cerca de los espacios vasculares, sitio de los espacios porta en la última fase del desarrollo, expresan marcadores de los linajes hepatocítico (AFP^+ , Alb^+) y colangiocítico (citoqueratinas 7 y 19) [32, 33]. Estos hepatoblastos originan los conductos biliares intrahepáticos primitivos, estructuras que

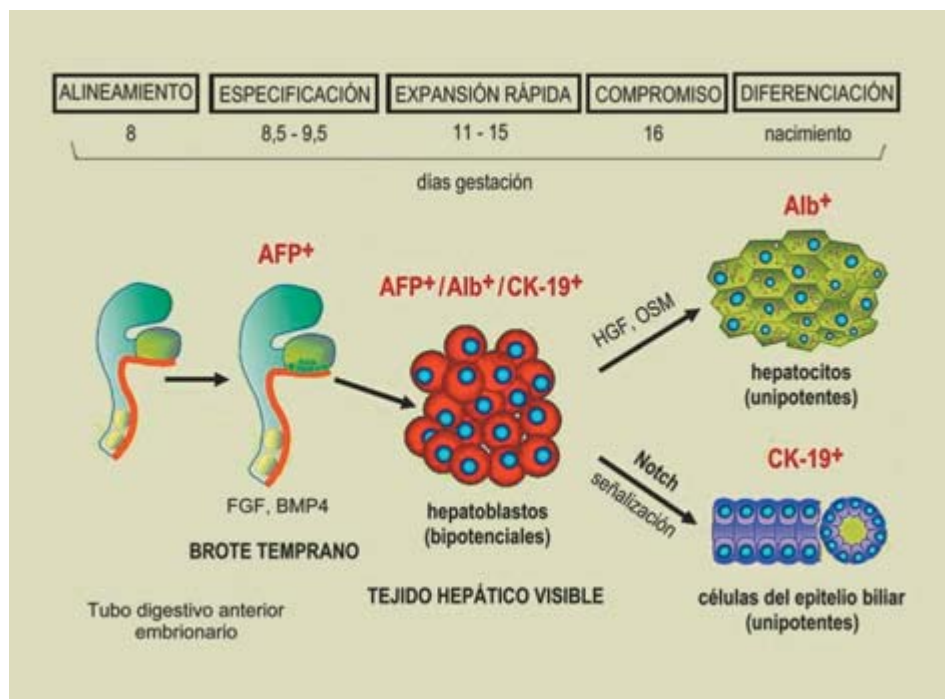


FIGURA 3. **Representación esquemática del desarrollo del hígado fetal en rata.** Durante el desarrollo normal del hígado, cuando el canal alimentario anterior derivado del endodermo se encuentra en el octavo día de gestación, las células madre endodérmicas comienzan a proliferar y a diferenciarse. La especificación hacia los linajes epiteliales hepáticos ocurre a los 8,5 días de gestación y requiere señal del FGF (fibroblast growth factor), desde el mesodermo cardiogénico y de la BMP (bone morphogenic protein), desde el mesenquima del septum transverso. Las células que se expanden en el endodermo del canal alimentario pueden identificarse entre los 8,5-9 días de la gestación y poco más tarde estas células empiezan a formar un brote temprano y expresar genes específicos del hígado. Las células hepáticas especificadas son hepatoblastos que proliferan masivamente. Cordones de hepatoblastos invaden el mesenquima del septum transverso, que es la fuente de los lipocitos y de las células sinusoidales endoteliales. En el día 11 de la gestación, células madres hematopoyéticas invaden el brote y forman una estructura visible hepática. Los hepatoblastos continúan proliferando rápidamente y expresan numerosas proteínas. Antes del día 16, los hepatoblastos divergen en dos linajes el hepatocítico y el colangiocítico. La diferenciación en el linaje colangiocítico está promovida por la señal Notch y es antagonizada por HGF (hepatocyte growth factor), que en conjunción con la oncostatina M (OSM), promueve la diferenciación de los hepatocitos. Después del día 16 ocurren notables cambios en la expresión génica en las células epiteliales del hígado fetal, hacia un fenotipo más diferenciado y el número de células bipotentes, que son aquellas que expresan genes de ambos linajes (AFP, Alb y CK19), se reduce notablemente. En este punto, la mayoría de células son unipotentes y se comprometen al linaje hepatocítico o colangiocítico, aunque continúan proliferando (Shafritz et al., 2006) [32].

conectan los hepatocitos con los segmentos del sistema biliar. Los conductos biliares primitivos intrahepáticos corresponden a los canales de Hering y a los conductos biliares terminales de hígado adulto que constituyen el reservorio de las células progenitoras intrahepáticas [34].

El origen embriológico de los conductos biliares intrahepáticos explica algunas características importantes de la proliferación de las células ovales en hígado adulto:

I) Las células de los canales de Hering y de los conductillos biliares terminales expresan α -fetoproteína (AFP) [35]. Considerando que las células ovales son generadas a partir de ellos, expresan AFP y contienen isoenzimas de aldolasa, piruvato quinasa y láctico deshidrogenasa, presentes en células de hígado adulto y fetal, y glucosa-6-fosfatasa, un marcador típico hepatocítico. Sin embargo, la intensidad a la cual estos marcadores se expresan en una población de células ovales en proliferación, depende del agente que causó la proliferación de ellas mismas.

II) Analizando la expresión de marcadores se ha llegado a sugerir que las poblaciones de células ovales proliferativas constituyen un compartimento heterogéneo que contiene células que difieren en su estado de diferenciación. Algunas de estas células funcionan como progenitoras de hepatocitos, mientras que otras no se distinguen de los colangiocitos, ya que no expresan AFP o marcadores de hepatocitos. Las células ovales y los colangiocitos comparten epitopos que reaccionan, entre otros, con citoqueratinas 7, 8, 18, y 19, con el anticuerpo OV6 (un anticuerpo anti-citoqueratina 19), OC2 (anti-mieloperoxidasa), y algún otro miembro de la serie OC, gamma glutamiltransferasa y los antígenos A6 y G7 [36].

CÉLULAS OVALES Y CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS

Además de expresar marcadores de los linajes hepatocítico y colangiocítico, las células ovales expresan marcadores de células madre hematopoyéticas. Entre éstos están Thy-1, CD34, CD45, Sca-1, c-Kit, y flt-3 [37], los cuales pueden detectarse también en hígado fetal. Células con características de células madre positivas para CD34 y c-Kit se han aislado de hígado humano normal y cirrótico. El hígado murino normal adulto contiene células hematopoyéticas fenotípicamente similares a células presentes en la médula ósea, incluyendo células de la población lateral (side) de la médula ósea [38]. Esta población consiste en células madre hematopo-

yéticas (HSC) purificadas en base a su capacidad para no teñirse con el fluorocromo Hoechst 33342 [39], debido a que poseen el transportador ATP binding cassette ABCG2/BCRP1, que también se ha detectado durante la proliferación de células ovales hepáticas [37]. La capacidad transportadora de fármacos de las células madre, que les confieren los transportadores ABC, es un marcador importante cuando se trata de aislar y analizar las HSC. La mayoría de las células acumulan fluorocromos, tales como Hoechst 33342 y rodamina 123, pero las células madre no, ya que estos compuestos son expulsados de las células por *ABCG2* y *ABCB1*, respectivamente. Como estas células no acumulan fluorocromos, pueden ser seleccionadas y recolectadas en función de los bajos niveles de fluorescencia Hoechst 33342 o rodamina 123, que incorporan, por lo que se las denomina «células apagadas» (dull cells) o «población lateral» (*side population*, SP). El término población lateral se acuñó porque durante los análisis por citometría de flujo se visualizaban, como población negativa a la tinción por el fluorocromo, desplazadas a un lado de la mayoría de células (Figura 4). Una gran fracción de células madre hematopoyéticas se encuentra en la fracción SP y cuando estas células aisladas de ratón, se trasplantaron en ratones con la médula ósea destruida por irradiación, un pequeño número de ellas fue capaz de reconstituir dicha médula, demostrando así su capacidad pluripotente. Las células SP pueden aislarse de muchos tejidos: cerebro, mama, pulmón, corazón, páncreas, testículos, piel e hígado, y representan células madre específicas de linaje. La tinción con Hoechst-33342 de células de médula ósea obtenidas a partir de ratones carentes de *ABCG2* no detectó células SP, no porque las SP estuvieran ausentes, sino porque no expresaban *ABCG2* lo que permitió que todas acumularan el fluorocromo Hoechst y emitieran fluorescencia.

Tomando como base los datos existentes, la expresión de los marcadores hematopoyéticos en hígado normal adulto puede interpretarse de dos maneras diferentes:

A) Un número pequeño de células madre hematopoyéticas, presentes en hígado fetal, pueden permanecer en hígado adulto. Estas células pueden ser distintas a las células ovales, pero son inducidas a proliferar por las mismas condiciones que causan la proliferación de las células ovales. En este caso, las células madre hematopoyéticas podrían ser un componente del compartimento de las células ovales, pero constituyendo una población distinta, que no adquiere los marcadores del linaje hepatocítico, pero comparte los marcadores de las células madre en general y de las células ovales del canal de Hering [4].

6. CÉLULAS MADRE HEPÁTICAS

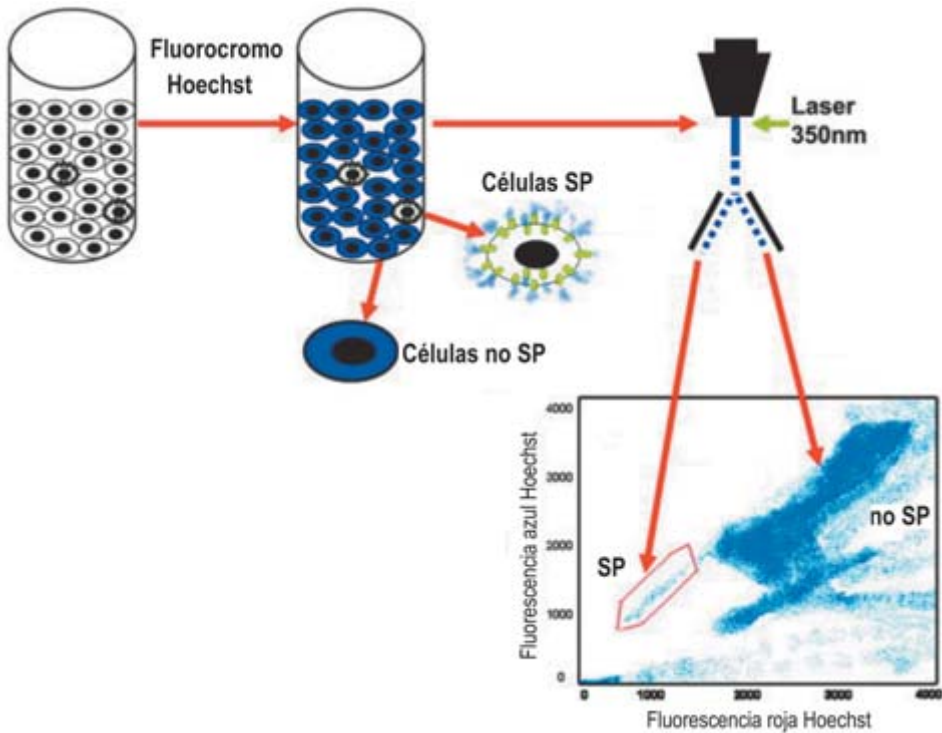


FIGURA 4. **Protocolo experimental para detectar las células SP.** Las células se tratan con el fluorocromo Hoechst 33342 y se separan por citometría de flujo; aquella proporción pequeña de células, que es capaz de repeler el fluorocromo, presenta un perfil de fluorescencia diferente debido a su baja incorporación del fluorocromo. Esta es la fracción SP. Esta propiedad se basa, en parte a su elevada expresión de *ABCB1* (*MDR1*) [39].

B) Las células hematopoyéticas localizadas en hígado adulto pueden ser células madre pluripotentes presentes en el tejido hepático, funcionando como el equivalente de células madre embrionarias, capaz de generar múltiples linajes, incluyendo el hepatocítico. Si este planteamiento es correcto, las células madre hematopoyéticas localizadas en el hígado (quizás en el espacio periductular), se diferenciarían progresivamente, primero en células ovales y después en hepatocitos, bajo estímulos que causan respuesta en las células ovales. La relación entre las células ovales y las células de la médula ósea podrían comprenderse más fácilmente si pudiera demostrarse que las células ovales pueden derivar de las células hematopoyéticas. Esto ha sido demostrado en algunos modelos experimentales, pero en estos experimentos, la proporción de hepatocitos generados por esta ruta fue

muy pequeña, representando sólo un 0,155 de los hepatocitos del hígado. Posteriores resultados usando el modelo FAH de lesión hepática, han demostrado que las células ovals no se originan a partir de precursores de la médula ósea, sino que se generan intrahepáticamente [40].

CÉLULAS DUCTULARES EN NECROSIS HEPÁTICA MASIVA

Una reacción ductular severa tiene lugar después de necrosis hepatocelular masiva en humanos. En este tipo de lesión, la proliferación ductular implica a los colangiocitos maduros y a los hepatocitos ductulares. Estos últimos, localizados en la periferia de los tractos portales, proliferan y expresan marcadores de colangiocitos y hepatocitos. Los hepatocitos ductulares se consideran una forma intermedia entre las células ductulares y los hepatocitos y se parecen a las células de la placa ductural en hígado humano en desarrollo. Tales células están también presentes en necrosis hepatocelular masiva en ratas [41]. No se sabe con certeza si la generación de hepatocitos a partir de los hepatocitos ductulares conduce a la completa repoblación de los hígados humanos lesionados, pero al menos se ha descrito un caso bien documentado en un paciente que se recuperó después de una necrosis masiva. Fujita *et al.* [42] realizaron biopsias secuenciadas del hígado de un paciente con necrosis masiva después de recibir un trasplante hepático parcial ortotópico. La completa regeneración del hígado se observó 12 a 14 meses después del trasplante a través de un proceso que implica una reacción ductular inicial seguida de diferenciación de hepatocitos a partir de hepatocitos ductulares.

CÉLULAS OVALES EN HEPATOCARCINOGENÉISIS Y CIRROSIS

Como las células ovals proliferan en respuesta a tratamientos con carcinógenos y no carcinógenos, la detección de las células ovals en un proceso carcinogénico no prueba que las células ovals sean progenitoras de células cancerosas. Sin embargo, se ha demostrado en roedores que las células ovals pueden generar carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma y hepatoblastoma [43]. Aunque la proliferación de las células ovals es bastante común en modelos experimentales de hepatocarcinogenesis, en algunos modelos, la proliferación de las células ovals y ductulares no es aparente, por ejemplo, en carcinogenesis inducida por hipereexpresión de

factores del crecimiento tales como el TGF α [44]. De hecho, no existe una razón especial para apoyar la idea que el carcinoma hepatocelular se genere exclusivamente por las células ovals. Los hepatocitos maduros también pueden funcionar como precursores de tumores, en tanto en que ellos se encuentren en estado proliferativo. Es también importante destacar que las células ovals no parece que produzcan tumores directamente, pero lo pueden hacer a través de la generación de hepatocitos, aunque se ha observado que estas células se fusionan con los hepatocitos de nódulos neoplásicos en hígado de ratas tratadas con el carcinógeno 3'-metil-4-dimethyl aminoazobenceno [45]. Está aún sin resolver, si los hepatocitos generados de las células ovals en hígado adulto son anormales, inmaduros o tienen riesgo de transformarse. En lesión hepatocelular inducida por retrorsina combinada con hepatectomía parcial, la gran mayoría de células proliferantes son hepatocitos no completamente diferenciados, que se denominan células hepatocíticas precursoras pequeñas (SHPC) [4]. Tales células, que también han sido detectadas en lesión hepática inducida por galactosamina [46], se originan posiblemente a partir de las células ovals. Su acumulación preferente en algunos tipos de lesión refleja un flujo variable entre los compartimentos celulares que contienen células progenitoras ductulares, células ovals, SHPC y hepatocitos maduros. Las células ovals, a las que nos referimos como células madre hepáticas, se han detectado en hígado humano en focos displásicos de SHPC, adenomas hepatocelulares, hepatitis crónica vírica y alcohólica, esteatosis hepática no alcohólica, hemocromatosis, cirrosis biliar primaria y cirrosis asociada con colangitis primaria esclerosante, condiciones todas ellas, asociadas a un elevado riesgo de desarrollo neoplásico [47]. Los marcadores de las células ovals, tales como α -fetoproteína (AFP) y citoqueratinas 7 y 19 se expresan en un 50% de focos displásicos de SHPC en carcinoma hepatocelular, lo que indica el posible origen del carcinoma hepatocelular a partir de células que expresan estos marcadores [48]. Esta conclusión está reforzada por el hallazgo que tales marcadores no se han detectado en focos de displasia de células grandes no consideradas como precursoras de tumores. La generación de hepatocitos a partir de las células ovals ocurre en las fases tardías de la cirrosis, aparentemente en el momento en el que los hepatocitos disminuyen su capacidad replicativa [49]. Sin embargo, este proceso no conduce a una extensa regeneración parenquimática esencialmente efectiva en la restauración del parénquima normal.

Durante el estrés regenerativo las células ovals y los SHPC contribuyen al proceso. Vig *et al.* [50] han estudiado las fuentes intra y extrace-

lulares del reemplazo celular en un modelo de lesión hepática crónica en ratones transgénicos que expresaban el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg). Ratones hembras HBsAg recibieron un trasplante de médula ósea de ratones machos HBsAg-negativos y la mitad de los animales recibieron retrorsina para bloquear la proliferación de los hepatocitos indígenas. Los hígados se examinaron tres y seis meses después del trasplante de médula ósea para evidenciar los hepatocitos derivados de la médula ósea, las células ovales y los SHPC. En los animales que no recibieron retrorsina, la regeneración parenquimática se verificó mediante la replicación de los hepatocitos y la médula ósea apenas contribuyó a la regeneración hepática. En ratones que recibieron retrorsina, un 4,8% de los hepatocitos fueron cromosoma Y positivos a los tres meses, pero esto se atribuyó a la fusión celular entre los hepatocitos indígenas y las células de la médula ósea donadora y su frecuencia decreció a 1,6% a los seis meses, a medida que se desarrollaban reacciones con células ovales e iban apareciendo nódulos de SHPC. Los análisis seriados de secciones de hígado y la reconstrucción de un mapa tridimensional del hígado, mostraron riadas continuas de células ovales que rodeaban y se adentraban profundamente en los nódulos de SHPC, indicando una posible conversión de las células ovales en SHPC. Estos datos sugieren que durante el estrés regenerativo, la contribución a la regeneración parenquimática a partir de la médula ósea es menor y atribuible a la fusión celular. Las células ovales y los SHPC son de origen hepático intrínseco y pueden formar nódulos de SHPC.

En base a los resultados discutidos anteriormente, se sugiere que la generación de los hepatocitos a partir de las células ovales en hígado cirrótico, produce hepatocitos con un gran riesgo de sufrir transformación. Las respuestas proceden de estudios de poblaciones de células aisladas de focos displásicos de SHPC en carcinoma hepatocelular. Tanto en animales como en humanos, las anormalidades presentes en tumores se han encontrado en estos focos [49]. Sería importante conocer si las células que esconden tales defectos cromosómicos en los focos displásicos expresan fenotipos de las células ovales.

CÉLULAS MADRE HEPÁTICAS DE LA MÉDULA ÓSEA

Por tratamiento con alcohol alílico a ratas, Yavoskovsky *et al.* [51], consiguieron un modelo de necrosis periportal que no indujo respuesta proliferativa, que se puso en evidencia por la carencia de marcadores, no

solo de los hepatocitos sino también de los colangiocitos. Esto indicaba que las células ovales no eran las únicas células madre hepáticas. Esta hipótesis es correcta si se considera la capacidad de transdiferenciación de las células madre de la médula ósea. Se está poniendo de manifiesto, cada vez más, la capacidad de estas células para convertirse en células de diferentes órganos por ejemplo, en células músculo esquelético, células renales o en células del cerebro [3], y además, existe una correlación entre la médula ósea y el hígado, como se muestra a continuación:

1. La hematopoyesis y el desarrollo hepático comparten aspectos comunes. Durante el desarrollo fetal, las células madre hematopoyéticas se mueven desde el saco vitelino hasta el hígado en desarrollo. El hígado permanece hematopoyético durante todo el periodo fetal y hasta la primera semana después del nacimiento en los neonatos. Simultáneamente, con la aparición de la hematopoyesis, pueden detectarse células madre hematopoyéticas en hígado fetal. En la última etapa de la gestación y después del nacimiento, la función hematopoyética del hígado se reduce de manera considerable hasta llegar a estar ausente. Aunque el hígado pierde sus funciones hematopoyéticas, la hematopoyesis a menudo retorna en hígado adulto en estados de enfermedad [4].
2. Algunos estudios muestran que las células ovales y las células madre hematopoyéticas comparten CD34, Thy-1 y proteína y mRNA c-Kit. Las células ovales expresan también el receptor flt-3, que se había descrito que estaba restringido a las células madre hematopoyéticas [4].
3. Las investigaciones de Theise *et al.* [52] se realizaron sobre ratones hembra que después de recibir dosis letales de irradiación para producirles mieloablación, fueron trasplantadas con médula ósea de donantes machos de la misma edad. En todos los animales sacrificados dos meses después del trasplante se identificaron hepatocitos con cromosoma Y positivo, mediante la técnica FISH (*fluorescence in situ hybridization*). Estos experimentos muestran que las células de la médula ósea, trasplantadas de donantes machos a recipientes hembras singeneicos, son capaces de localizar los lóbulos del hígado y diferenciarse en hepatocitos maduros que poseen el cromosoma Y.

En muestras obtenidas de biopsias humanas se han analizado los hepatocitos y colangiocitos derivados de esos trasplantes y se ha detectado que

existe una interrelación médula ósea-hígado y se espera que esta interrelación se muestre en los dos linajes celulares [53]. Los hepatocitos y los colangiocitos pueden ambos derivar de las células de la médula ósea. Tanto en animales de experimentación como en humanos, el implante de células de la médula ósea y su conversión en hepatocitos ha podido detectarse en ausencia de lesión severa, lo que sugiere que tal movimiento puede ocurrir a bajo nivel como fenómeno fisiológico. El mecanismo de entrada y diferenciación de las células de la médula ósea trasplantadas en las placas celulares hepáticas también se verifica por diversos caminos. Primero, las células de la médula ósea circulantes pueden alcanzar las placas hepáticas directamente desde la circulación sinusoidal. Estas células se dispersan a través del parénquima y se intercalan sin orden en las placas hepáticas preexistentes, ya como hepatocitos. Por otra parte, consideradas las demostraciones previas de que las células ovals derivan del canal de Hering y que no sólo los hepatocitos, sino también las células ovals, derivan de las células de la médula ósea [54], se puede especular que estas células entran en el hígado a través de la circulación, entonces se translocan, a través de las membranas basales, al canal de Hering y a las ramas terminales del árbol biliar, y se diferencian en células colangiocíticas pequeñas citoqueratina 19-positivas. La proliferación y diferenciación en hepatocitos se seguirá en proporción al tipo e intensidad de la lesión hepática. De esta manera, la regeneración hepática, a través de las células madre de la médula ósea puede presentar vías múltiples y quizás superpuestas para conseguir el reemplazo celular y la reparación del órgano. Las células madre de la médula ósea no son muy autorregenerativas, pero pueden transdiferenciarse en células madre hepáticas endógenas y en células del parénquima hepático, por lo tanto pueden reparar el hígado dañado.

Si se establece una comparación entre el trasplante de hígado y el trasplante de hepatocitos, se llega a la conclusión que existen más donantes de médula ósea que de hígado. Si se utilizan las células de la médula ósea del propio paciente como nueva opción terapéutica para tratar las enfermedades hepáticas, el rechazo inmunológico se evitará completamente. Ahora las células madre de la médula ósea se han utilizado en experimentos con animales y en clínica. Orlic *et al.* [55] obtuvieron células de médula ósea linaje negativas (Lin-) de ratones transgénicos que expresaban proteína fluorescente verde sobre la base de expresión de c-Kit. Inyectaron estas células en la pared que bordeaba el infarto inmediatamente después de la ligadura de la coronaria. Los resultados obtenidos nueve días después del trasplante de las células de la médula, demostraron que el

miocardio formado de nuevo ocupaba el 68% de la porción infartada del ventrículo. Estos estudios indican que es posible reconstruir el corazón lesionado por un infarto con células madres adultas de la médula ósea.

Para determinar si la médula ósea contenía células que podían corregir enfermedades hepáticas, Lagasse *et al.* [56] utilizaron el trasplante de la médula ósea en ratones deficientes en fumarilacetoacetato hidrolasa (FAH), un modelo animal de tirosinemia fatal hereditaria tipo I, citado anteriormente, en el cual la deficiencia de este enzima conlleva la acumulación de intermediarios tóxicos en la degradación de la tirosina, lo cual causa una masiva y continua lesión hepática. Los resultados mostraron que el trasplante de médula ósea salvó la vida al ratón y restauró las funciones bioquímicas del hígado.

FACTORES ASOCIADOS CON LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS OVALES E INTERFERENCIA CON LA PROLIFERACIÓN DE LOS HEPATOCITOS

Tanto en hígado humano como en el de roedores, las células ovales proliferan y se diferencian en estrecha proximidad con los lipocitos con características morfológicas de miofibroblastos. En ratas, las células ovales forman conductillos, que son extensiones del canal de Hering y están rodeados por una membrana basal continua. Los lipocitos penetran a través de esta membrana y establecen contacto directo con las células ovales en los conductillos [57]. La proliferación de las células ovales se asocia con una mayor expresión de c-Kit, HGF, FGF y TGF α , los cuales funcionan también como factores de crecimiento para la replicación de los hepatocitos. En humanos y en roedores, la expresión de factores de transcripción de la familia del HGF, se detecta enseguida una vez que se inicia la proliferación de las células ovales, lo que indica la existencia de un compromiso temprano para la diferenciación hepatocítica. Es un enigma que los factores de crecimiento que estimulan la proliferación de las células ovales sean similares a los que estimulan la replicación de los hepatocitos después de la hepatectomía parcial y que ambos tipos celulares requieran señalización a través del receptor del TNF (TNFR1) [58]. A pesar de todo, es raro que las células ovales y los hepatocitos proliferen simultáneamente; la replicación de las células ovales ocurre generalmente cuando la replicación de los hepatocitos se bloquea. Así, son varios los estudios que demuestran que el interferón gamma (IFN γ) estimula la proliferación de las células

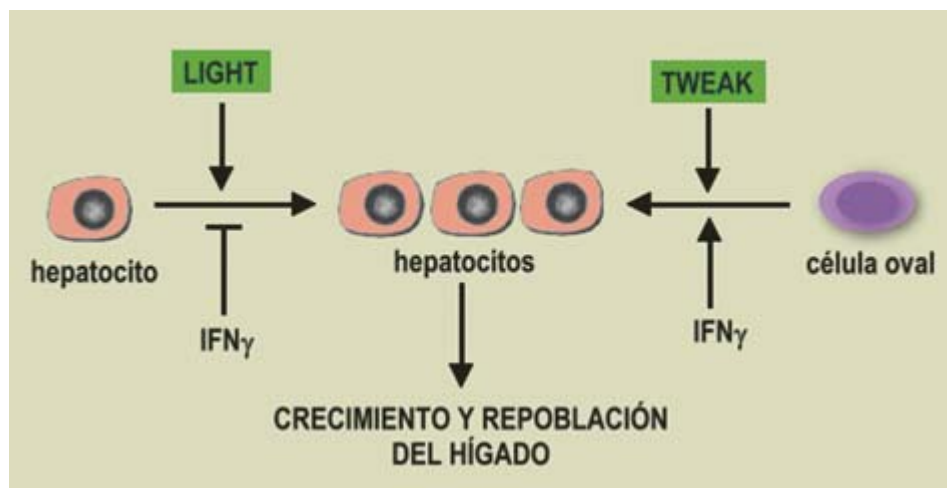


FIGURA 5. Efecto inhibitorio del interferon gamma ($IFN\gamma$) sobre la replicación de los hepatocitos (Fausto, 2006) [59].

ovales y no la de los hepatocitos [59]. Otros estudios indican que las interacciones entre el $IFN\gamma$ y las citoquinas, tales como el TNF, inhiben la proliferación de los hepatocitos, mientras que estimulan la replicación de las células ovals [60].

Aunque varios factores de crecimiento participan en la respuesta proliferativa del hígado, nada es específico para un tipo particular de reacción celular. Múltiples miembros de la familia del TNF se encuentran involucrados en la respuesta de crecimiento hepático y TWEAK y LIGHT son los últimos componentes identificados (Figura 5).

Jakubowski *et al.* [60] han identificado una proteína que se dirige a las células ovals incitándolas a proliferar y han demostrado que TWEAK (*TNF-like weak* inductor de la apoptosis), un ligando de la familia TNF para el receptor Fn14, estimula la proliferación de las células ovals en hígado de ratones transgénicos. Han observado que los ratones que expresan TWEAK mostraban una notable expansión de las células ovals sin ningún efecto sobre los hepatocitos, y también que la expresión de TWEAK a partir de construcciones adenovíricas, estimulaba la proliferación de las células ovals en ratón normal, pero no en animales knockout Fn14. La proliferación de las células ovals inducida por agentes químicos se redujo en ratones knockout Fn14 y pudo ser parcialmente bloqueada en ratón normal por un anticuerpo específico de TWEAK.

A este estudio Nelson Fausto [59] hace el siguiente comentario: La identificación de las células ovales no es sencilla, porque los marcadores se solapan entre las células ovales y las células no madre del epitelio biliar. Este solapamiento no es sorprendente, ya que el nicho de las células madre hepáticas es el canal de Hering, una estructura que constituye la transición entre los conductillos biliares y los hepatocitos. Células con capacidad madre tapizan estos canales y se encuentran al lado de células biliares no madre. Jakubowski *et al.* [60] detectaron en cortes de hígado de ratones transgénicos TWEAK, dos marcadores que reconocían a células ovales y epiteliales biliares. Aunque observaron en dichos cortes, un incremento de ambos marcadores, ambos no se expresaron frecuentemente en las mismas células. Así que no está completamente claro que TWEAK aumente la proliferación de las células biliares en general o específicamente marque las células madre. Este problema no está resuelto porque los experimentos en cultivos celulares, diseñados para responder esta cuestión usaron células biliares epiteliales que carecían de capacidad progenitora. Se necesitan más experimentos para caracterizar las células que proliferan en ratones transgénicos TWEAK, y determinar si estas células pueden diferenciarse en hepatocitos *in vivo*, *in vitro* o en trasplantes.

Generalmente las respuestas ocurren de manera que cuando proliferan los hepatocitos maduros, las células ovales raramente se activan y viceversa. Además, muchos miembros de la familia TNF estimulan los dos tipos celulares y no se conoce ningún factor de crecimiento que sea específico para los hepatocitos o para las células ovales. Puede que la respuesta celular esté determinada por la expresión diferencial de los miembros de la familia TNF y lo que sucede es que los miembros de esta familia pueden elevar de manera específica la proliferación de uno u otro tipo celular. Incluso más interesante sería encontrar agentes que pudieran estimular por un lado a las células madre y por otro bloquear la replicación de los hepatocitos. TWEAK es uno de los pocos ligandos de la familia TNF que incrementa sólo la proliferación de las células del conducto biliar y la de las células madre. Sin embargo, los mecanismos de los efectos específicos de TWEAK son difíciles de explicar; la expresión de Fn14, el receptor de TWEAK, se eleva después de la hepatectomía parcial [61], un crecimiento que sólo implica a los hepatocitos. Además, Fn14 activa NF- κ B, que es un componente importante de la respuesta regenerativa después de la hepatectomía parcial.

La linfotoxina α , otro ligando de la familia TNF, estimula la proliferación de ambos tipos celulares, hepatocitos y células ovales [62]. La situación con la linfotoxina β y su receptor es aún más complicada, ya que

esta última se expresa durante la respuesta de las células ovales e inhibe la proliferación de los hepatocitos, pero ambos tipos celulares requieren el receptor de la linfotoxina β para la replicación. LIGHT es otro ligando del receptor de la linfotoxina que causa un masivo agrandamiento en el hígado [63], pero su efecto sobre las células ovales no ha sido investigado. Por tanto, la señalización a través del receptor de la linfotoxina β puede implicar a la propia linfotoxina β como principal ligando para las respuestas de las células ovales y a LIGHT como ligando importante para la replicación de los hepatocitos.

Este cuadro complejo puede hacerse más confuso si se considera que ninguna de estas citoquinas funciona *in vivo* aisladamente. Los efectos últimos dependen de interacciones entre múltiples citoquinas. Por ejemplo, en cultivos celulares, el TNF estimula a los hepatocitos y a las células ovales, pero en combinación con IFN γ , el TNF inhibe la replicación de los hepatocitos, pero induce la replicación de las células ovales. Estos hallazgos pueden explicar por qué la proliferación de las células ovales se asocia generalmente con la inflamación en la cual se elevan las concentraciones del receptor TNFR1, y de los ligandos TNF e IFN γ . Por el contrario, en la regeneración hepática después de hepatectomía parcial, la señalización a través del TNFR1 se eleva, pero la expresión de IFN γ no cambia o decrece [62]. Otras características interesantes del fenotipo de las células ovales son la expresión de proteínas de la familia genética de la multiresistencia a fármacos, *mdr*, de los transportadores adenosintrifosfato *binding cassette* y de péptidos neuroendocrinos [64, 65].

CÉLULAS MADRE DE LA MÉDULA ÓSEA Y REGENERACIÓN HEPÁTICA

El espectacular interés generado por las células madre durante los últimos años ha conducido al descubrimiento de dos nuevas propiedades de estas células:

1. Las células madre hematopoyéticas y las células madre de la médula ósea son capaces de generar muchos tipos diferentes de células tisulares, propiedad conocida como «transdiferenciación».
2. Estas células pueden elegir múltiples vías de diferenciación, propiedad denominada «plasticidad», que se define como la flexibilidad en la expresión de genes [19].

El conocimiento de los mecanismos de la transdiferenciación es la clave en este campo de la biología, que puede proporcionar importantes pistas para el uso de las células madre en la repoblación y regeneración de órganos. Hasta aquí, las demostraciones experimentales más importantes de la generación de hepatocitos a partir de células madre de la médula ósea, son la producción de hepatocitos en cultivo a partir de *células madre multipotentes adultas* y la repoblación de hígados de ratones knockout FAH por trasplante de células madre hematopoyéticas (HSC) [66]. Todavía ninguna de estas condiciones puede ser considerada como ejemplos de transdiferenciación. En cultivo, las células madre multipotentes adultas pueden diferenciarse en células de linajes mesodérmicos, ectodérmicos y endodérmicos. Una célula madre multipotente adulta inyectada en un blastocisto contribuye a la formación de todos los tejidos somáticos. Así, estas células pueden ser consideradas como equivalentes a las células madre embrionarias, que han persistido en tejidos adultos. Las células madre multipotentes adultas humanas, o de roedores cuando se cultivaron en Matrigel, en presencia de HGF y de FGF4, se diferenciaron en hepatocitos maduros, con todas sus propiedades funcionales. Si estas células madre adultas son equivalentes a células madre embrionarias, la generación de hepatocitos a partir de estas células constituye un proceso de diferenciación de células multipotentes no comprometidas, a través de una vía de diferenciación. Esto es similar al proceso de diferenciación que ocurre durante el desarrollo y es completamente diferente a la transdiferenciación, que implica un cambio en el compromiso de diferenciación de una célula ya comprometida. Estos prometedores resultados han de ser confirmados, porque se necesita saber más de las propiedades de estas células madre multipotentes adultas y de cómo pueden ellas generar hepatocitos *in vivo*.

La otra demostración de la generación de hepatocitos a partir de células madre de la médula ósea es la amplia repoblación de hígados lesionados de ratones knockout FAH trasplantados con HSC [66, 67]. Hasta aquí, este es el único ejemplo en animales o humanos de una amplia repoblación de hígados lesionados con células derivadas de la médula ósea. En este sistema la cinética de repoblación por HSC fue lenta y poco eficiente comparada con la obtenida por trasplante de hepatocitos, aunque eventualmente pudo detectarse alguna repoblación significativa. Los primeros hepatocitos generados a partir de HSC aparecieron a las siete semanas del trasplante. Por el contrario, los hepatocitos trasplantados reconstituyeron más del 50% del hígado sólo en cuatro semanas, lo que llevó a los autores a

concluir que el reemplazo de los hepatocitos por células de la médula ósea es un evento raro y lento. Sin embargo, a las veintidós semanas del trasplante, la repoblación por HSC trasplantadas constituyó un 30% del hígado completo. Se ha demostrado que los hepatocitos generados a partir de HSC en ratones knockout FAH son producto de la fusión celular más que resultado de la transdiferenciación. La fusión crea hepatocitos tetraploides (4C), hepatocitos hexaploides (6C) y hepatocitos aneuploides. La célula hepática que se fusiona con HSC no se ha identificado, pero los hepatocitos producidos por fusión no expresan genes HSC. Estudios de regeneración en músculo sugieren que las HSC no son capaces de generar directamente progenitores miogénicos [68]. En cambio, después de lesión muscular, las células inflamatorias circulantes, tales como los macrófagos y los neutrófilos se fusionaron con los miotubos. Un mecanismo similar puede ocurrir en hígado, de manera que la fusión se verifique entre macrófagos derivados de la médula ósea y las células hepáticas, desencadenándose la proliferación de las células hepáticas fusionadas. Es posible que la fusión entre las células de la médula ósea y las del hígado ocurra en knockouts FAH por la elevada presión proliferativa impuesta por este sistema. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que sólo pueden conseguirse cantidades elevadas de hepatocitos, generados a partir de células madre hematopoyéticas, en sistemas en los que se verifique la fusión celular. En cualquier caso, estos resultados ponen en claro que cualquier intento de usar HSC para reconstituir hígados necesita demostrar lo siguiente:

- A) el mecanismo por el cual los hepatocitos se forman, y
- B) que los hepatocitos generados a partir de células de la médula ósea funcionen normalmente, no tengan genomas anormales y no sean propensos a la malignidad.

CAPACIDAD DE LAS CÉLULAS DE LA MEDULA ÓSEA PARA GENERAR HEPATOCITOS

Krause *et al.* [69] inyectaron células de la médula ósea altamente purificadas en ratones irradiados y obtuvieron enraizamiento en varios órganos: piel, pulmón e hígado. Los hígados de cinco ratones examinados no contenían hepatocitos derivados de HSC y tres de estos cinco ratones tampoco tenían células derivadas de la médula ósea en conductos biliares. Los otros dos ratones tuvieron un 0,4% y 2,2% de células del conducto biliar originadas por células de la médula ósea once días después del

trasplante. Wagers *et al.* [70] utilizaron métodos diferentes de aislamiento de células de la médula ósea y marcaron las células con una proteína de fluorescencia verde. Las células así marcadas, inyectadas a ratones irradiados (mieloablación), fracasaron en contribuir a cerebro, riñón, músculo, intestino e hígado, aunque si reconstituyeron completamente la médula ósea de estos animales. Los experimentos antes citados se diferencian en aspectos técnicos importantes, incluyendo el tipo de células, pero están completamente de acuerdo respecto a la generación de hepatocitos a partir de células de la médula ósea purificadas e inyectadas, sin embargo, ningún hepatocito derivado de la médula ósea se detectó en estos experimentos. Theise *et al.* [71] trasplantaron células de la médula ósea no fraccionadas o células purificadas CD34⁺lin de ratones machos a ratones hembras irradiadas y buscaron en estas últimas células el cromosoma Y que expresaran el mRNA de la albúmina en el hígado de las hembras receptoras. Después de períodos de tiempo que fluctuaron entre una semana a ocho meses después del trasplante, se detectaron células positivas para el cromosoma Y, y para el mRNA de la albúmina a frecuencias del 0,39% al 1,1% de los hepatocitos totales en el hígado. En todos los experimentos, los hígados de los ratones trasplantados con células de la médula ósea fueron morfológicamente normales y aparentemente no lesionados.

Sería de gran interés determinar si se puede conseguir una producción más eficiente en la generación de hepatocitos a partir de células de la médula ósea, que conduzca a la repoblación de hígados lesionados. Mallet *et al.* [72] reconstituyeron la médula ósea de ratones irradiados letalmente con células de la médula ósea procedentes de ratones transgénicos Bcl-2 y se preguntaron si los hepatocitos derivados de la médula ósea que expresaban Bcl-2 podrían repoblar el hígado en un caso de lesión hepática originada por repetidas inyecciones del anticuerpo agonista Fas. Incluso en caso de lesión hepática severa, la proporción de hepatocitos, que expresaba Bcl-2, encontrada en tejido hepático, derivados de la médula ósea, fue solo del 0,008% al 0,8% del total de hepatocitos, dependiendo de la intensidad de la lesión. Kanazawa y Verma [73] han estudiado la generación de hepatocitos a partir de células de la médula ósea en tres modelos diferentes de lesión hepática y concluyeron que la contribución de las células de la médula ósea al reemplazo de hepatocitos en estos modelos, fue muy poca o nula. Fujii *et al.* [74] trasplantaron células de la médula ósea positivas en proteína con fluorescencia verde, en ratones irradiados, negativos en la proteína fluorescente, e identificaron células endoteliales y células de Kupffer positivas a la proteína fluorescente, pero no hepatocitos. Un resul-

tado similar fue obtenido por Dahlke *et al.* [75] utilizando un modelo de fallo hepático agudo. Se puede concluir de estos experimentos que las células de la médula ósea tienen capacidad mínima para generar hepatocitos en hígados normales y muy baja capacidad en hígados lesionados. La excepción es la producción de hepatocitos a partir de células de la médula ósea en ratones knockout FAH, los cuales, como ya se ha discutido anteriormente, es una consecuencia de la fusión celular.

Los estudios antes comentados describen que las células de la médula ósea pueden originar diferentes tipos de células hepáticas epiteliales, incluyendo las células ovales, hepatocitos y células del epitelio biliar. Estas observaciones han llevado a emitir la hipótesis que las células madre residentes de la médula ósea, específicamente células madre hematopoyéticas, son una fuente importante para el reemplazo de células epiteliales hepáticas, particularmente durante la lesión hepática crónica. Sin embargo, la mayor parte de los datos publicados indican que las células madre de la médula ósea no juegan un papel fisiológico significativo en el reemplazo de las células epiteliales en ninguna forma de lesión hepática. De hecho, existen hepatocitos completamente funcionales derivados de la médula ósea, pero son raros y se generan por fusión celular no por diferenciación.

Otros autores, Quintana-Bustamante *et al.* [76] por el contrario, han sido más afortunados en sus experimentos y han conseguido resultados muy esperanzadores, claramente positivos, movilizandando las células hematopoyéticas con el factor estimulador de las colonias de granulocitos (G-CSF). Estos autores trataron las células hematopoyéticas con G-CSF para observar si esta movilización influía en la producción *in vivo* de hepatocitos derivados de la médula ósea. En un modelo de lesión hepática recurrente producido por inyecciones de CCl_4 durante tres meses, en ratón que expresaba la proteína fluorescente verde en las células derivadas de las hematopoyéticas, se detectaron focos necróticos con infiltrados ricos en histiocitos, pero poca proliferación de células ovales. Estos animales fueron tratados posteriormente con G-CSF durante una, dos o tres semanas y se sacrificaron un mes después del tratamiento con dicho factor. Los resultados obtenidos por estos autores indican que el G-CSF hizo que aumentaran significativamente los hepatocitos derivados de la médula ósea en hígados lesionados con CCl_4 . Los hepatocitos originados a partir de la fusión *in vivo* se evaluaron trasplantando células de ratones hembras, que expresaban proteína fluorescente verde, a ratones machos, e identificando posteriormente, fluorescencia verde en hepatocitos binucleados que contenían el cromosoma Y, prueba de la fusión. Ellos concluyen que la mo-

vilización de las células hematopoyéticas con G-CSF incrementa la producción de hepatocitos derivados de la médula ósea y que este es el primer modelo que demuestra la fusión hepatocito/célula hematopoyética, recurriendo a la lesión inducida por CCl_4 . Además, en este modelo se detectan infiltrados ricos en macrófagos, una franca respuesta de las células ovales y un proceso predominante de fusión *in vivo* para la aceptación (enraizamiento, *engraftment*) de las células circulantes en el hígado. Estos resultados abren la posibilidad de usar los factores de crecimiento hematopoyéticos para tratar enfermedades degenerativas no hematopoyéticas.

Yamazaki *et al.* [77], por otro lado, han detectado que las células madre de la médula ósea muestran plasticidad y se diferencian en varios tipos celulares, incluyendo los hepatocitos. Para evaluar la diferenciación hepática en células de la médula ósea, estos autores han evaluado la expresión génica en ratones que han sufrido la hepatectomía parcial con o sin tratamiento con 2-acetilaminofluoreno. La hepatectomía indujo varios genes relacionados con diferenciación hepatocítica temprana en médula ósea, y la expresión de estos genes fue intensificada por administración de 2-acetilaminofluoreno. Conclusiones: En respuesta a la hepatectomía se indujo, en células de la médula ósea, la expresión de genes tempranos de diferenciación hepática, especialmente cuando la regeneración del hígado remanente fue suprimida con acetilaminofluoreno. Las señales circulantes generadas en hígado tratado con acetilaminofluoreno después de hepatectomía parcial son las que han de activar esta diferenciación. Este estudio es el primer análisis de los eventos tempranos de la diferenciación hepática en médula ósea durante la regeneración.

GENERACIÓN DE HEPATOCITOS EN TRASPLANTES DE HÍGADO Y MÉDULA ÓSEA

En pacientes receptores de trasplantes de hígado y médula ósea, Theise *et al.* [78] han investigado si los hepatocitos podían generarse a partir de células de la médula ósea del propio beneficiario. La frecuencia de los hepatocitos derivados de la médula ósea fue variable, del 1% al 3,6% en cinco pacientes y 8% en un paciente. Los autores multiplicaron estos valores por 5 para corregir los errores de la muestra en la detección del cromosoma Y, y mostraron que la aceptación (*engraftment*) de los hepatocitos variaba entre el 4% al 43%. Alison *et al.* [79] examinaron también los hígados de los pacientes que recibieron trasplantes de hígado o médula

ósea a partir de donantes y calcularon la frecuencia de hepatocitos derivados de la médula ósea que habían enraizado en el hígado de los receptores, que se estimó entre el 0,5% to 2%. Korbling *et al.* [80] han demostrado que la frecuencia de los hepatocitos generados a partir de trasplantes de hígado o médula ósea a receptores osciló desde el 4% hasta el 7% y no tuvo relación alguna con la lesión hepática ni con el tiempo transcurrido después del trasplante. En otros estudios en pacientes receptores de trasplante hepático no se detectaron hepatocitos derivados de la médula ósea.

Diversos estudios han dirigido la pregunta del quimerismo celular en trasplantes hepáticos. Así, Hove *et al.* [81] han examinado el hígado de 16 pacientes trasplantados, para identificar células originadas a partir del receptor, descritas como quimerismo de células endoteliales en 14 pacientes, quimerismo de células del conducto biliar epitelial en cinco pacientes, y quimerismo de hepatocitos en un paciente. Otros [82] han descrito que la gran mayoría de células derivadas de los receptores, presentes en los hígados trasplantados, fueron macrófagos o células de Kupffer y que sólo el 1,6% del total de las células detectadas en estos hígados derivadas del receptor, eran hepatocitos. Finalmente, Kleeberger *et al.* [83] han detectado el 91% de frecuencia de quimerismo en beneficiarios de trasplante hepático y que la presencia de quimerismo en hepatocitos en dos de nueve pacientes en muestras obtenidas cuatro semanas después del trasplante y en cinco de nueve pacientes a los doce meses o más. El análisis cuantitativo del porcentaje de los hepatocitos en los hígados quiméricos de los beneficiarios no ha sido descrito aún.

La interpretación de estos resultados es difícil. Primero, la falta de consistencia de los datos se debe al uso de técnicas diferentes para identificar los hepatocitos del receptor en el hígado trasplantado. A menudo se usan factores para corregir la incapacidad de examinar la superficie completa del núcleo del hepatocito para detectar el cromosoma Y. Este tipo de corrección, que implica multiplicar los valores observados por factores que fluctúan entre 2 y 5, puede introducir errores significativos e incertidumbre en los datos presentados. Otra dificultad es que grandes cantidades de células mesenquimáticas en hígados trasplantados tienen su origen en la médula ósea del propio beneficiario. Aunque se pueden utilizar varios marcadores para identificar a los hepatocitos, la precisión de los métodos usados para esta identificación es variable y no siempre óptima. La superposición de imágenes en microscopía confocal puede conducir a errores causados por la detección de productos de reacción o señales de hibridación *in situ* en células de Kupffer o endoteliales que están en yuxtapo-

sición con un hepatocito. Hasta que se obtengan datos más definitivos se puede concluir: que la generación de hepatocitos derivados de la médula ósea ocurre en hígado de algunos pacientes que han recibido trasplantes, que este es un proceso poco eficiente y que debido a su frecuencia baja, su relevancia permanece no probada.

HÍGADO FETAL COMO FUENTE DE HEPATOCITOS

El hígado fetal es rico en células hematopoyéticas y es el lugar de proliferación y diferenciación de precursores de las células hepáticas. La expresión de AFP, en este estado se considera un marcador endodérmico que aparece los nueve días de gestación y la de la albúmina (Alb⁺) a los 9,5. Los factores de crecimiento de fibroblastos FGF1 y FGF2 son importantes en la inducción de la expresión de la albúmina. Durante los días de gestación 9.º al 12.º, los hepatoblastos expresan progresivamente AFP, albúmina, GGT, anti-tripsina a1, GST, y se bifurcan después en hepatocitos o células del epitelio biliar. La oncostatina-M (ONC) y los glucocorticoides favorecen la diferenciación de los hepatoblastos [84]. Células con similitud morfológica a los hepatocitos son capaces a los trece días de diferenciarse en células del conducto biliar después del trasplante y reimplantación. Otros autores han derivado líneas celulares hepáticas bipotenciales a partir de embriones de ratón de catorce días [85]. Inicialmente, las colonias expresaron factores de transcripción asociados a los hepatocitos, pero no albúmina y otros productos específicos de hepatocitos. Las células pudieron ser diferenciadas hacia el fenotipo biliar por medio de Matrigel, y hacia el fenotipo hepatocítico por medio de agregación. Estudios de expresión génica en hepatoblastos de hígado fetal de rata han descrito las diferencias entre hígado adulto y fetal y cambios seriados durante la gestación [86]. Otros estudios han demostrado la capacidad proliferativa y la diferenciación de células madre hepáticas a partir de trasplante de estas células procedentes de fetos de ratas a hígado de rata adulta, siguiendo la pista de la maduración de los hepatoblastos a los 13,5 días después del trasplante, con el desarrollo del fenotipo adulto maduro entre las dos y las seis semanas. La proliferación de las células trasplantadas fue más intensa cuando se inhibió la replicación normal de los hepatocitos [87], o cuando las células trasplantadas poseían una ventaja de supervivencia. Los hepatoblastos proliferan vigorosamente incluso después de ser trasplantados en hígado normal, lo que contrasta con la falta de proliferación de los hepatocitos adultos cuando son trasplantados en las mismas circunstancias.

Los hepatoblastos proliferan in vitro. Kubota y Reid [88] por digestión de hígado fetal de rata, establecieron el cultivo de hepatoblastos bipotenciales clonogénicos sobre un medio hormonalmente definido, siendo los progenitores MHC clase-1- ICAM-1+. Uno de los intereses principales en el hígado fetal es la identificación de los marcadores celulares de los hepatoblastos para diferenciarlos de los progenitores hematopoyéticos. Tal identificación se puede conseguir por estrategias de supresión (*magnetic cell sorting*) para excluir células OX43+ (macrófagos, células endoteliales y precursores de eritrocitos) y OX44+ (anti-CD53 y células mieloides y linfoides). Suzuki *et al.* [89] han estudiado las células CD45-TER119- (positivas para el antígeno común de los leucocitos CD45 y los precursores eritroides) de embriones de ratón, clasificando las células inicialmente para las subunidades de integrina $\alpha 6$ (CD49f) y $\beta 1$ (CD29), y CD117 (c-Kit). Estos autores han identificado células c-Kit-, CD49f + CD29+, notablemente enriquecidas para el desarrollo de unidades formadoras de colonias hepáticas, cuando se cultivaron sobre placas cubiertas con matriz extracelular en presencia de HGF [90]. Estas colonias surgen en cinco días alcanzando a los veinte días varios cientos de células. Marcadores hepatocíticos y colangiocíticos se expresaron en estas colonias. De la misma manera, Minguet *et al.* [91] identificaron un 10% de células hepáticas en embriones de once días como c-Kit low CD45-TER119-. Estas células fueron bimodales respecto a la expresión de integrina $\alpha 6$ (CD49f), expresaron albumina, AFP, TTR, HGF, OSMR y c-MET, y pudieron mantenerse *in vitro* proliferando durante largo tiempo en presencia de HGF o FGF-1, activadas con oncostatina-M y demostrando su bipotencialidad por maduración en hepatocitos funcionales (Alb+ y CK-19-) y colangiocitos (Alb- y CK-19+). Posteriormente Suzuki *et al.* [92] refinaron la estrategia y utilizaron células únicas para demostrar que células CD45-TER119- c-Kit- c-MET+CD49f+/low de hígados de ratón de trece días (0,3% células hepáticas), se enriquecieron 560 veces en unidades formadoras de colonias hepáticas, comparadas al hígado de procedencia. Células únicas cultivadas sobre placas cubiertas de laminina en presencia de HGF/EGF y medio condicionado para células de hígado fetal, dieron lugar a colonias de hasta 100 células a los cinco días; sobre cultivos a largo plazo las células que emergieron, expresaron ambas o solo una de las características de los hepatocitos (albúmina) o colangiocitos (citoqueratina-19), mientras que las células multipotenciales también persistieron. La multipotencialidad se demostró por la capacidad de diferenciarse *in vitro* en hepatocitos y epitelio biliar, gástrico e intestinal y reconstituir células en hígado, páncreas e intestino después del trasplante en dichos órganos. En este momento, en algunas colonias se hicieron detectables mar-

cadores, c-Kit, Thy-1 and CD34, asociados con células progenitoras que se desarrollaban en hígado murino lesionado. Una temprana diferenciación hacia la expresión de albúmina fue inducida por HGF y asociada con la activación de CEBP. La inhibición de CEBP frenó la diferenciación y restauró la proliferación [90]. La diferenciación más tardía en hepatocitos maduros que expresaban triptófano-2,3-dioxigenasa se intensificó en presencia de oncostatina M. La significación de este estudio se encuentra, no sólo en la caracterización de un progenitor multipotencial (incluyendo los hepatocitos) por medio de ensayos con una sola célula, sino también en la demostración de algunos marcadores celulares considerados como tempranos.

Un marcador alternativo para los hepatoblastos fue definido por Tanimizu *et al.* [93], quienes identificaron en células hepáticas fetales a los 10,5-16, 5 días de gestación, una fuerte expresión de DLK, una proteína de membrana con seis repeticiones similares a EGF- en su dominio extracelular. Las células con este marcador expresaron albúmina y AFP (evaluada por medios inmunoquímicos y por RT-PCR), y CK19, y proliferaron en respuesta a HGF. Tales células pudieron diferenciarse en hepatocitos después de ser trasplantadas en bazo de ratón. Yasuchika *et al.* [94] investigaron en células de hígado de ratón a los 13,5 días de gestación, que formaban agregados en cultivos de suspensión y demostraron que estas células incluían progenitores hepáticos que expresaban albúmina, AFP y CK19. Los progenitores fueron CD49f+Thy1-CD45-, pero la maduración en hepatocitos más diferenciados terminales que expresaron tirosina aminotransferasa y triptófano oxidasa, tuvo que ser ayudada por cocultivo con células Thy1+ que se agruparan en los agregados.

Thorgeirsson y Grisham [95] han interpretado recientemente la evidencia proporcionada por las últimas publicaciones referentes a la intervención de las células hematopoyéticas en la regeneración hepática y han llegado a la conclusión que las células hematopoyéticas pueden raramente adquirir el fenotipo hepatocítico en el hígado (frecuencia = 10^{-4}). Las células hematopoyéticas no parecen ser directas precursoras de hepatocitos, los cuales en cambio, pueden ser generados a partir de células del linaje macrófago-monocítico. La fusión entre los hepatocitos y células hematopoyéticas trasplantadas ha sido considerada como un mecanismo mediante el cual se han generado hepatocitos que llevan marcadores de médula ósea, pero la directa transdiferenciación de las células hematopoyéticas no se ha demostrado. Por tanto, estas células contribuyen poco a la formación de los hepatocitos, tanto en condiciones fisiológicas como en patológicas. Es un hecho que estas células pueden proporcionar citoquinas y factores de crecimiento que van a

estimular las funciones de los hepatocitos por mecanismos paracrinós. Las células del linaje endodérmico hepatocítico son mucho más potentes generadores de hepatocitos que las células hematopoyéticas.

Ya se ha comentado anteriormente que las células hematopoyéticas y las hepáticas mantienen una estrecha asociación durante la vida de los mamíferos. El hígado embrionario es el lugar principal de la formación de células sanguíneas a partir de las células mesodérmicas que migran desde el saco vitelino [96].

Los hepatocitos endógenos residuales reactivan rápidamente las células quiescentes, las cuales proliferan y reemplazan las células perdidas por enfermedad o toxicidad. Además, cuando los hepatocitos residuales incurren en lesión que les bloquea la proliferación en respuesta a la pérdida celular, pueden ser reemplazados mediante las células ovas. Los hepatocitos diferenciados aislados y trasplantados enraizan eficientemente y se replican al ritmo de los hepatocitos preexistentes del hospedador, y los hepatocitos *FAH^{+/+}* amplifican consecutivamente a través de numerosas rondas de división cuando se trasplantan seriadamente en ratones *FAH^{-/-}* [97]. Hasta un 20% de los hepatocitos trasplantados enraizan en el hígado y de éstos, un 6% proliferan en respuesta a los déficits de hepatocitos. La comparación directa del enraizamiento y la expansión de las células de la médula ósea trasplantadas *versus* la de los hepatocitos en condiciones comparables, indican que estos últimos enraizan con mucha más eficiencia que las células de la médula ósea, y que la capacidad proliferativa de los hepatocitos auténticos es mucho mayor que la de las células de la médula ósea (Figura 6).

Los mecanismos que podrían utilizar las células hematopoyéticas para generar hepatocitos se incluyen la transdiferenciación de las células de la médula ósea y la fusión entre un hepatocito y una célula hematopoyética [98]. La transdiferenciación implica un cambio simultáneo en la actividad transcripcional de muchos genes para cambiar directamente el fenotipo de una célula hematopoyética en el de un hepatocito. Por el contrario, la fusión entre un hepatocito y una célula hematopoyética produce una célula híbrida heterocariótica que contiene inicialmente los elementos genéticos y orgánulos de ambos tipos celulares. La expresión del fenotipo hepatocítico por tal célula híbrido requiere que el núcleo de la célula hematopoyética sufra una extrusión desde el heterocarion o que los genes específicos sean reprogramados para generar proteínas específicas del hepatocito (Figura 7).

6. CÉLULAS MADRE HEPÁTICAS

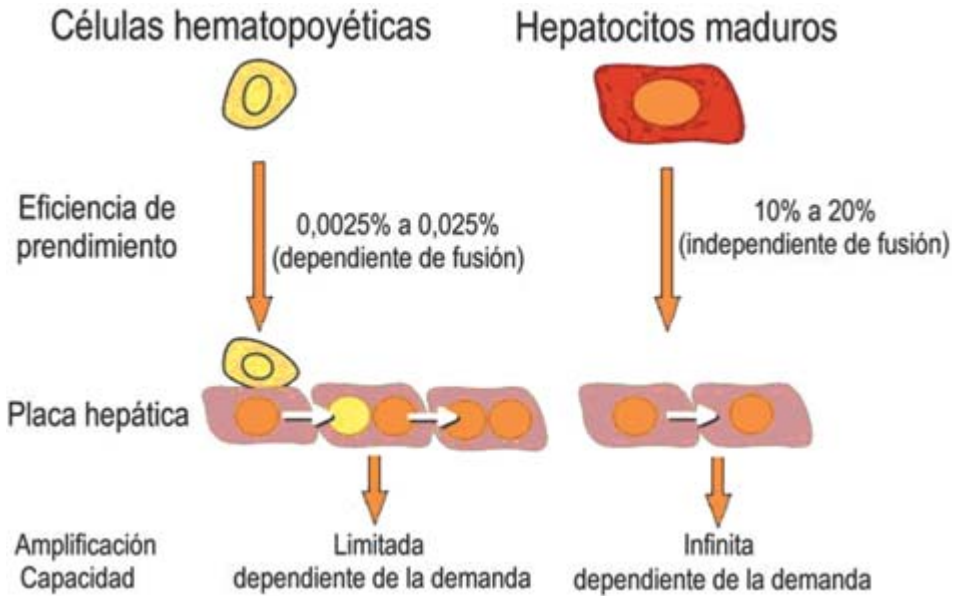


FIGURA 6. Comparación entre las eficiencias relativas de enraizamiento en los trasplantes de células hematopoyéticas y en los trasplantes de hepatocitos maduros (Thorgeisson y Grishan, 2006) [95].

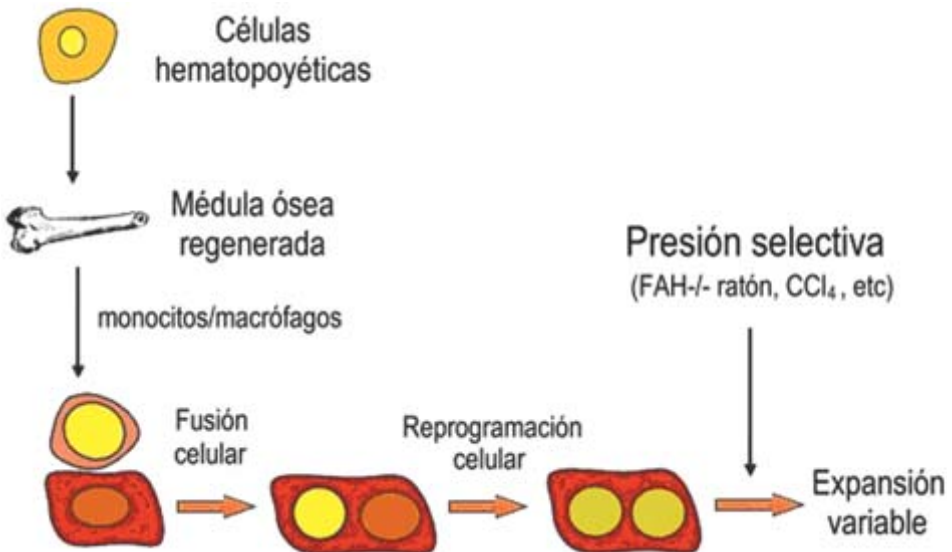


FIGURA 7. Generación de hepatocitos a partir de células hematopoyéticas trasplantadas (Thorgeisson y Grishan, 2006) [95].

La directa transdiferenciación de las células hematopoyéticas en hepatocitos no ha sido demostrada en ninguno de los estudios examinados. La demostración de la transdiferenciación requiere que los cambios en la actividad de los múltiples genes específicos de las células hematopoyéticas y los hepatocitos se pongan de manifiesto en células individuales en «tiempo real» (un cambio clonal), y que la célula afectada genere hepatocitos cuando se trasplanta. La única evidencia de formación de hepatocitos por trasdiferenciación directa de las células hematopoyéticas es la falta de demostración de un mecanismo alternativo.

Ante la carencia de evidencia de la generación directa de hepatocitos por transdiferenciación de las células hematopoyéticas, la derivación de células hepatocíticas por fusión de una célula hematopoyética con un hepatocito hospedador ha sido experimentalmente demostrada en diversos estudios con hígado normal y patológico de receptores trasplantados con células hematopoyéticas, aunque a frecuencias muy bajas of 10^{-4} . La fusión ha sido demostrada en ratones *FAH*^{-/-} en estudios independientes que utilizan diferentes métodos para detectar células híbridas. Además, se ha demostrado que los núcleos hematopoyéticos contenidos en las células híbridas heterocarióticas estaban reprogramados para inhibir los genes hematopoyéticos y activar los hepatocíticos. De este modo, se corrigen los defectos metabólicos característicos de los hepatocitos *FAH*^{-/-}. La corrección fenotípica no ocurriría si el núcleo de la célula hematopoyética, que contiene un gen *FAH* intacto, fuera simplemente extrudido. La fusión de las células hematopoyéticas y los hepatocitos a una baja frecuencia similar ha sido demostrada también en hígados de ratones sanos por medio de recombinación Cre-lox. Sin embargo, otro estudio que utilizaba la recombinación Cre-lox no detectó fusión entre las células de la médula ósea y los hepatocitos, pero sí la detectó en un animal expuesto a agente hepatotóxico. Este dato hace sospechar que los hepatocitos lesionados son más fusogénicos que los hepatocitos sanos [95].

Células del linaje monocito-macrófago parecen fusionarse con los hepatocitos de ratones sanos y de ratones *FAH*^{-/-} que recibieron NTBC. De los pocos estudios sobre trasplantes xenogéneos que han intentado reconocer fusión entre células de dos diferentes especies, detectando células que contienen mezclas de proteínas o secuencias de DNA específicas de las especies, la mayoría examinó un número insuficiente de hepatocitos en los hígados receptores para excluir su existencia en la baja frecuencia esperada. En un estudio en el cual se trasplantaron células de la sangre del cordón umbilical en ratones SCID, se detectaron hepatocitos que contenían

una mezcla de cromosomas humanos y murinos o sólo humanos, lo que indicaría la simultánea existencia de fusión y transdiferenciación. Sin embargo, se demostró que los hepatocitos eucarióticos derivaban de hepatocitos híbridos que fueron productos de fusión de hepatocitos *FAH^{-/-}* y células de la médula ósea *FAH^{+/+}*, indicando que algún grupo de cromosomas tendrían que haber sido eliminados de las células heterocarióticas. Este es un tema de considerable importancia si las células híbridas fusionadas van a ser utilizadas en el tratamiento de enfermedades hepáticas en humanos, porque en otras circunstancias la aneuploidia se asocia con transformación neoplásica [97-99].

Las células hematopoyéticas y las células hepáticas no parenquimáticas, derivadas de las células hematopoyéticas, contribuyen al mantenimiento y reemplazo de los hepatocitos por mecanismos indirectos que no implican su transformación directa en hepatocitos. Las células hematopoyéticas en el hígado producen citoquinas y factores de crecimiento que mantienen la diferenciación y crecimiento de los hepatocitos durante la embriogénesis. En animal adulto, las citoquinas y factores de crecimiento producidos por las células no parenquimáticas derivadas de la médula ósea regulan la proliferación y mantienen la función de los hepatocitos [100].

Varios estudios indican que las citoquinas y factores de crecimiento producidas por células hematopoyéticas infundidas, pueden apoyar la función y reparación hepáticas en adultos sin formar nuevos hepatocitos a partir de las células infundidas. Es de destacar que la infusión de G-CSF previno la muerte de ratones de la toxicidad del CCl_4 en ausencia de trasplante de células hematopoyéticas. La infusión de células de la médula ósea autólogas en el lóbulo hepático izquierdo de pacientes que habían sufrido la resección del lóbulo derecho que contenía un tumor, se asoció con un mayor crecimiento de los lóbulos residuales. Otras situaciones en las que los resultados fueron posiblemente no mediados por la transformación directa de las células hematopoyéticas en hepatocitos incluyen la reducción de la fibrosis inducida por CCl_4 y la reducción de los niveles de cobre plasmáticos en ratones con el gen *WND* mutado. Se necesita profundizar en los estudios para separar los efectos del trasplante de células hematopoyéticas que son mediados por factores de crecimiento y citoquinas secretadas por las células trasplantadas y su progenia de células hepáticas no parenquimáticas y los que pudieran depender de la transformación de las células hematopoyéticas en hepatocitos [95, 101].

Los resultados obtenidos hasta la fecha indican que las células mesodérmicas hematopoyéticas pueden generar hepatocitos a frecuencia muy

baja. Esto hace que la mayoría de los autores consideren la generación de hepatocitos a partir de las células hematopoyéticas mesodérmicas sólo como una curiosidad biológica, que refleja un escape de bajo nivel de un proceso controlado con precisión de segregación de la capa germinal. Sin embargo, está bien establecido que los núcleos de los tipos celulares diferenciados pueden ser programados experimentalmente para generar nuevos linajes celulares. Por tanto, una pregunta fundamental es: ¿Por qué las células madre hematopoyéticas multipotenciales no se diferencian en hepatocitos con más eficiencia? La respuesta puede relacionarse con la importancia de los nichos de células madre específicos de tejido como determinantes de la especificidad de diferenciación de las células madre [102]. El trasplante de las células madre hematopoyéticas, bien directamente en un órgano como el hígado, o vía sistema vascular, no implica depositarlas en un nicho de células madre, específico de dicho órgano, con excepción de trasplantes de médula ósea en receptores que han sufrido la ablación de la médula ósea.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Durante los últimos años, profundizar en el conocimiento de las células madre ha sido una de las áreas más atractivas de la investigación biomédica, que ha generado gran entusiasmo en científicos, clínicos y público en general. Lo prometedor de estas investigaciones es que tienen como meta la repoblación y regeneración de los tejidos y órganos, lo cual está aún lejos de alcanzarse. Después de la fase inicial de entusiasmo y de las numerosas publicaciones de hallazgos que a menudo se oponen al conocimiento aceptado, es ahora el momento de valorar el progreso realizado para señalar peligros y más importante aún, para proyectar una visión realista hacia el futuro. Es un criterio que ha de tomarse con discreción, ya que incluso las propias definiciones de las células madre están todavía en debate. ¿Es una célula madre una entidad o una función, un componente de un sistema jerárquico o una entidad funcional plástica? ¿Puede esta entidad ser aislada y estudiada en cultivo en una manera significativa desde el punto de vista biológico? Llegando a las más extremas implicaciones hemos de interpretar con crudeza algunas de las ideas que conducen al «todo vale» en el medio intelectual en el que todos los resultados, incluso los más discordantes, son aceptados sin críticas.

Es un hecho que se ha progresado mucho en el tema de las células madre y este progreso ha de continuar con el cuidadoso escrutinio de los datos

experimentales, examinando la realidad y reproducibilidad de los métodos y encaminando el resultado de la relevancia biológica de los descubrimientos. El progreso en este campo va unido al conocimiento de los mecanismos de diferenciación celular, proliferación y transdiferenciación y de las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular en órganos tejidos normales y lesionados. El interés que se ha atribuido a las células de la médula ósea a menudo ha oscurecido la extraordinaria capacidad regenerativa del hígado que es en primerísimo lugar el resultado de la replicación de los propios hepatocitos maduros. Cuando la replicación de los hepatocitos es baja o se inhibe, unas células progenitoras intrahepáticas dan lugar a las células ovales, las cuales se replican y diferencian en hepatocitos. La capacidad proliferativa de los hepatocitos normales quiescentes y altamente diferenciados es única entre las células diferenciadas de los tejidos de mamíferos. Puede sonar paradójico para los biólogos estudiosos de las células madre: *el hepatocito es la célula madre con mayor grado de eficiencia para la regeneración hepática.*

La primera observación a plantear cuando se trata de sacar aplicaciones a estas investigaciones es que la identificación de los hepatocitos derivados de las células madre de la médula ósea necesita ser considerada con criterios rigurosos. Revisando la literatura presentada aquí y los resultados obtenidos hasta el momento, se concluye que la generación de hepatocitos a partir de células de la médula ósea es un evento raro en trasplante y repoblación de hígado después de la lesión y que los hepatocitos generados se producen por fusión celular más que por mecanismos de transdiferenciación. Esto no excluye un papel potencial funcional para estas células de la médula ósea en la homeostasis hepática.

Los avances científicos de últimos años sobre procesos regenerativos han dado a conocer una serie de aspectos a nivel celular y molecular de la regeneración hepática, imposible de vislumbrar hasta hace pocos años, que han incrementado las expectativas sobre el trasplante hepático en humanos y sobre las células madre adultas. Como campo expandido a una gran audiencia, estos nuevos conocimientos traen también confusión e interpretaciones erróneas, respecto a los mecanismos responsables de la regeneración en los diferentes tipos de crecimiento hepático. Los hallazgos más recientes se han conseguido con modelos manipulados genéticamente y el interés que despiertan tiene su base en la aplicación clínica al trasplante de hígado en humanos.

ABREVIATURAS

AAF, acetilaminofluoreno; AFP⁺, que expresan a-fetoproteína; Alb⁺, que expresan albúmina; BMP, proteína morfogénica ósea; C/EBP β , proteína de unión a la secuencia CAAT, factor de transcripción; CK19, citoqueratina 19, marcador biliar; DLK, proteína de membrana; FAH, fumarilacetoacetato hidrolasa; FGF, factor de crecimiento de fibroblastos; G-CSF, factor estimulador de las colonias de granulocitos; GGT, gamma glutamil transferasa; GST, glutathion transferasa; HEA125, antígeno epitelial humano 125, marcador biliar; HSC, células madre hematopoyéticas; MHC, complejo principal de histocompatibilidad; NTBC, 2 (2 nitro 4 difluorometil benzoil) 1-3 ciclohexano diona; OSM, oncostatina M; OV-6, anticuerpo frente a células ovales y biliares epiteliales; PDGF, factor de crecimiento derivado de las plaquetas; SCF/cKit, tirosina quinasa transmembrana perteneciente a la familia del PDGF; SHPC, células hepatocíticas precursoras pequeñas; TWEAK, TNF *like weak*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Roskams, T. (2006): Different types of liver progenitor cells and their niches. *J Hepatol* **45**, 1-4.
2. Walkup, M. H., y Gerber, D. A. (2006): Hepatic stem cells: in search of. *Stem Cells* **24**, 1833-1840.
3. Wang, X.; Foster, M.; Al-Dhalimy; Lagasse, E.; Finegold, M., y Grompe (2004): The origin and repopulating capacity of murine oval cells *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 11881-11888.
4. Fausto, N. (2004): Liver regeneration and repair: Hepatocytes, progenitor cells and stem cells. *Hepatology* **39**, 1477-1487.
5. Zhang, Y.; Bai, X. F., y Huang, C. X. (2003): Hepatic stem cells: existence and origin. *World J Gastroenterol* **9**, 201-204.
6. Van Thiel, D. H.; Gaveler, J. S.; Kam, I.; Francavilla, A., *et al.* (1989): Rapid growth of an intact human liver transplanted into a recipient larger than the donor. *Gastroenterology* **93**, 1414-1419.
7. Rhim, J. A.; Sandgren, E. P.; Degen, J. L.; Palmiter y Brinster, R. L. (1994): Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science* **263**, 1149-1152.
8. Potten, C. S., y Loeffler, M. (1990): Stem cells: attributes, cycles, spirals pitfalls and uncertainties. *Development* **110**, 1001-1020.

9. Van Eyken, P.; Sciote, R.; Callea, F., y Desmet, V. J. (1989): A cytokeratin-immunohistochemical study of focal nodular hyperplasia of the liver: further evidence that ductular metaplasia of hepatocytes contributes to ductular «proliferation». *Liver* **9**, 372-377.
10. Fausto, N. (1990): Oval cells and liver carcinogenesis: an analysis of cell lineages in hepatic tumors using oncogene transfection techniques. *Prog Clin Biol Res* **331**, 325-334.
11. Sell, S. (1990): Is there a liver stem cell? *Cancer Res* **50**, 3811-3815.
12. Grisham, J. W. (1980): Cell types in long-term propagable cultures of rat liver. *Ann NY Acad Sci* **349**, 128-137.
13. Thorgeirsson, S. S. (1996): Hepatic stem cells in liver regeneration. *FASEB J* **10**, 1249-1256.
14. Thorgeirsson, S. S., y Grisham, J. W. (2003): Overview of recent experimental studies on liver stem cells. *Semin Liver Dis* **23**, 303-312.
15. Fausto, N. (2001): Liver regeneration: from laboratory to clinic. *Liver Transpl* **7**, 835-844.
16. Wu, J. C.; Merlino, G., y Fausto, N. (1994): Establishment and characterization of differentiated, nontransformed hepatocyte cell lines derived from mice transgenic for transforming growth factor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 674-678.
17. Cascales, M.; Álvarez, A.; Gascó, P.; Fernández-Simón, L. *et al.* (1994): Cocaine liver injury in mice elicits specific changes in DNA ploidy and induced programmed cell death of hepatocytes. *Hepatology* **20**, 902-1001.
18. Rhim, J. A.; Sandgren, E. P.; Degen, J. L.; Palmiter, R. D., Brinster, R. L. (1994): Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science* **263**, 1149-115.
19. Theise, N. D., Krause, D. S. (2002): Toward a new paradigm of cell plasticity. *Leukemia* **16**, 542-548.
20. Overturf, K.; al-Dhalimy, M.; Ou, C. N.; Finegold, M., y Grompe, M. (1997): Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol* **151**, 1273-1280.
21. Weglarz, T. C.; Degen, J. L., y Sandgren, E. P. (2000): Hepatocyte transplantation into diseased mouse liver. Kinetics of parenchymal repopulation and identification of the proliferative capacity of tetraploid and octaploid hepatocytes. *Am J Pathol* **157**, 1963-1974.
22. Wiemann, S. U.; Satyanarayana, A.; Tsahuridu, M., *et al.* (2002): Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J* **16**, 935-942.

23. Kinoshita, R. (1937): Studies on the carcinogenis chemical substances *Trans Soc Pathol Jpn* **27**, 665-727.
24. Wilson, J. W., y Leduc, E. H. (1958): Role of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury. *J Pathol Bacteriol* **176**, 441-449.
25. Hixson, D. C.; Faris, R. A., y Thompson, N. L. (1990): An antigenic portrair of the liver during carcinogenesis *Pathobiology* **58**, 65-77.
26. Crosby, H. A.; Hubscher, S.; Fabris, L.; Joplin, R., *et al.* (1998): Immunolocalization of putative human liver progenitor cells in livers from patients with end-stage primary biliary cirrhosis and sclerosing cholangitis using the monoclonal antibody OV-6. *Am J Pathol* **152**, 771-779.
27. Kiss, A.; Schnur, J.; Szabo, Z., y Nagy, P. (2001): Immunohistochemical analysis of atypical ductular reaction in the human liver, with special emphasis on the presence of growth factors and their receptors. *Liver* **21**, 237-246.
28. Evarts, R. P.; Hu, Z.; Fujio, K.; Marsden, E. R., y Thorgeirsson, S. S. (1993): Activation of hepatic stem cell compartment in the rat: role of transforming growth factor alpha, hepatocyte growth factor, and acidic fibroblast growth factor in early proliferation. *Cell Growth Differ* **4**, 555-561.
29. Theise, N. D.; Saxena, R.; Portmann, B. C.; Thung, S. N., *et al.* (1999): The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* **30**, 1425-1433.
30. Crosby, H. A.; Hubscher, S. G.; Joplin, R. E., *et al.* (1998): Immunolocalisation of OV-6, a putative progenitor cell marker in human fetal and diseased pediatric liver. *Hepatology* **28**, 980-985.
31. Shiojiri, N.; Lemire, J. M., y Fausto, N. (1991): Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development. *Cancer Res* **51**, 2611-2620.
32. Shafritz, D. A.; Oertel, M.; Menthena, A.; Nierhoff, D., y Dabeva, M. D. (2006): Liver stem cells and prospects for liver reconstitution by transplanted cells. *Hepatology* **43** (2 suppl), S86-S98.
33. Laurson, J.; Selden, C., y Hodgson, H. J. F. (2005): Hepatocyte progenitors in man and in rodents. Multiple pathways, multiple candidates. *J Exp Pathol* **86**, 1-8.
34. Van Eyken, P.; Sciot, R., y Desmet, V. (1988): Intrahepatic bile duct development in the rat: a cytokeratin-immunohistochemical study. *Lab Invest* **59**, 52-59.
35. Lemire, J. M.; Shiojiri, N., y Fausto, N. (1991): Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by L-galactosamine. *Am J Pathol* **139**, 535-552.
36. Britt, D. E.; Flanagan, D. L.; Yang, D., y Hixson, D. C. (2003): Cloning of the rat oval cell/bile duct antigen OC.2. *FASEB J* **17**, 665-667.

37. Petersen, B. E.; Grossbard, B.; Hatch, H.; Pi, L.; Deng, J., y Scott, E. W. (2003): Mouse A6-positive hepatic oval cells also express several hematopoietic stem cell markers. *Hepatology* **37**, 632-640.
38. Shimano, K.; Satake, M.; Okaya, A.; Kitanaka, J., *et al.* (2003): Hepatic oval cells have the side population phenotype defined by expression of ATP-binding cassette transporter ABCG2/BCRP1. *Am J Pathol* **163**, 3-9.
39. Forbes, S. J., y Alison, M. R. (2006): Side population (SP) cells: Taking center stage in regeneration and liver cancer? *Hepatology* **44**, 23-26.
40. Menthen, A.; Deb, N.; Oertel, M.; Groddanov, P. N., *et al.* (2004): Bone marrow progenitors are not the source of expanding oval cells in the injured liver. *Stem Cells* **22**, 1049-1061.
41. Sirica, A. (1995): Ductular hepatocytes. *Histol Histopathol* **10**, 433-456.
42. Fujita, M.; Furukawa, H.; Hattori, M.; Todo, S., *et al.* (2000): Sequential observation of liver cell regeneration after massive hepatic necrosis in auxiliary partial orthotopic liver transplantation. *Mod Pathol* **13**, 152-157.
43. Sell, S. (2002): Cellular origin of hepatocellular carcinomas. *Semin Cell Dev Biol* **13**, 419-424.
44. Bralet, M. P.; Pichard, V., y Ferry, N. (2002): Demonstration of direct lineage between hepatocytes and hepatocellular carcinoma in dimethylnitrosamine treated rats. *Hepatology* **36**, 623-630.
45. Farber, E. (1956): Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res* **16**, 142-148.
46. Lemire, J. M.; Shiojiri, N., y Fausto, N. (1991): Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. *Am J Pathol* **139**, 535-552.
47. Libbrecht, L., y Roskams, T. (2002): Hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Semin Cell Dev Biol* **13**, 389-396.
48. Thorgeirsson, S. S., y Grisham, J. W. (2001): Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* **31**, 339-346.
49. Vandersteenhoven, A. M.; Burchette, J., y Michalopoulos, G. (1990): Characterization of ductular hepatocytes in end-stage cirrhosis. *Arch Pathol Lab Med* **114**, 403-406.
50. Vig, P.; Russo, F. P.; Edwards, R. J.; Paul, J.; Tadrous, P. J., *et al.* (2006): Liver Biology and Pathobiology The sources of parenchymal regeneration after chronic hepatocellular liver injury in mice. *Hepatology* **43**, 316-324.
51. Yavorkovsky, L.; Lai, E.; Ilic, Z., y Sell, S. (1995): Participation of small intraportal stem cells in the restitutive response of the liver to periportal necrosis induced by allyl alcohol. *Hepatology* **21**, 1702-1712.

52. Theise, N. D.; Nimmakayalu, M.; Gardner, R.; Illei, P. B., *et al.* (2000): Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* **32**, 11-16.
53. Theise, N. D.; Badve, S.; Saxena, R.; Henegariu, O., *et al.* (2000): Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-inuduced myeloablation. *Hepatology* **31**, 235-240.
54. Mitaka, T. (2001): Hepatic stem cells: from bone marrow cells to hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **281**, 1-5.
55. Orlic, D.; Kajstura, J.; Chimenti, S.; Jakoniuk, I., *et al.* (2001): Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**, 701-705.
56. Lagasse, E.; Connors, H.; Al-Dhalimy, M.; Reitsma, M., *et al.* (2000): Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* **6**, 1229-1234.
57. Libbrecht, L.; Cassiman, D.; Desmet, V., y Roskams, T. (2000): The correlation between portal myofibroblasts and development of intrahepatic bile ducts and arterial branches in human liver. *Liver* **22**, 252-258.
58. Lowes, K. N.; Croager, E. J.; Olynyk, J. K.; Abraham, L. J., y Yeoh, G. C. (2003): Oval cell mediated liver regeneration: role of cytokines and growth factors. *J Gastroenterol Hepatol* **18**, 4-12.
59. Fausto, N. (2005): Tweaking liver progenitor cells. *Nature Med* **11**, 1053-1054.
60. Knight, B., y Yeoh, G. C. (2005): TNF/LT alfa double knockout mice display abnormal inflammatory and regenerative responses to acute liver injury. *Cell Tissue Res.* **319**, 61-70.
61. Jakubowski, A.; Ambrose, C.; Parr, M.; Lincecum, J. M., *et al.* (2005): TWEAK induces liver progenitor cell proliferation *J Clin Invest* **115**, 2330-2340.
62. Akhurst, B.; Mathews, V.; Huso, K.; Smyth, M. J., *et al.* GC (2005): Differential lymphotoxin-beta and interferon gamma signaling during mouse liver regeneration induced by chronic and acute injury. *Hepatology* **41**, 327-335.
63. Anders, R. A.; Subudhi, S. K.; Wang, J.; Pfeffer, K., y Fu, Y. X. (2005): Contribution of the lymphotoxin beta receptor to liver regeneration. *J. Immunol* **175**, 1295-1300.
64. Brooling, J. T.; Campbell, J. S.; Mitchell, C.; Yeoh, G. C., y Fausto, N. (2005): Differential regulation of rodent hepatocyte and oval cell proliferation by interferon gamma *Hepatology* **41**, 906-915.
65. Ros, J. E.; Roskams, T. A.; Geuken, M.; Habinga, R., *et al.* (2003): ATP binding cassette transporter gene expresión in rat liver progenitor cells. *Gut* **52**, 1060-1067.
66. Ros, J. E.; Libbrecht, L.; Geuken, M.; Cansen, P. L., Roskams, T. A. (2003): High expresión of MDR1, MRP1, and MRP3 in the hepatic progenitor

- cell compartment and hepatocytes in severe human liver disease. *J Pathol* **200**, 553-560.
67. Austin, T. W., Lagasse, E. (2003): Hepatic regeneration from hematopoietic stem cells. *Mech Dev* **120**, 131-135.
 68. Wang, X.; Willenbring, H.; Akkari, Y.; Torimaru, Y., *et al.* (2003): Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* **422**, 897-901.
 69. Rudnicki, M. A. (2003): Marrow to muscle, fission versus fusion. *Nat Med* **9**, 1461-1462.
 70. Krause, D. S.; Theise, N. D.; Collector, M. I.; Henegariu, O.; Hwang, S.; Gardner, R., *et al.* (2001): Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow derived stem cell. *Cell* **105**, 369-377.
 71. Wagers, A. J.; Sherwood, R. I.; Christensen, J. L.; Weissman, I. L. (2002): Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* **297**, 2256-2259.
 72. Theise, N. D.; Badve, S.; Saxena, R.; Henegariu, O., *et al.* (2000): Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation induced myelo-ablation. *Hepatology* **31**, 235-240.
 73. Mallet, V. O.; Mitchell, C.; Mezey, E.; Fabre, M., *et al.* (2002): Bone marrow transplantation in mice leads to a minor population of hepatocytes that can be selectively amplified in vivo. *Hepatology* **35**, 799-804.
 74. Kanazawa, Y., Verma, I. M. (2003): Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver. *Proc Natl Acad Sci USA* **100** (Suppl 1), 11850-11853.
 75. Fujii, H.; Hirose, T.; Oe, S.; Yasuchika, K., *et al.* (2002): Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol* **36**, 653-659.
 76. Dahlke, M. H.; Popp, F. C.; Bahlmann, F. H.; Aselmann, H., *et al.* (2003): Liver regeneration in a retrorsine/CCl₄-induced acute liver failure model: do bone marrow-derived cells contribute? *J Hepatol* **39**, 365-373.
 77. Quintana-Bustamante, O.; Álvarez-Barrientos, A.; Kofman, A. V.; Fabregat, I., *et al.* (2006): Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes via in vivo cell fusion. *Hepatology* **43**, 108-116.
 78. Yamazaki, S.; Miki, K.; Takayama, T.; Hasegawa, K., *et al.* (2006): Hepatic gene induction in murine bone marrow alter hepatectomy. *J Hepatol* **44**, 325-333.
 79. Theise, N. D.; Nimmakayalu, M., Gardner, R. (2000): Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* **32**, 11-16.

80. Alison, M. R.; Poulson, R.; Jeffery, R.; Dhillon, A. P., *et al.* (2000): Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* **406**, 257.
81. Korbiling, M.; Katz, R. L.; Khanna, A.; Ruifrok, A. C., *et al.* (2000): Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral- blood stem cells. *N Engl J Med* **346**, 738-746.
82. Hove, W. R.; van Hoek, B.; Bajema, I. M.; Ringers, J.; van Krieken, J. H., Lagaij, E. L. (2003): Extensive chimerism in liver transplants: vascular endothelium, bile duct epithelium, and hepatocytes. *Liver Transpl* **9**, 552-556.
83. Ng, I. O.; Chan, K. L.; Shek, W. H.; Lee, J. M., *et al.* (2003): High frequency of chimerism in transplanted livers. *Hepatology* **38**, 989-998.
84. Kleeberger, W.; Rothamel, T.; Glockner, S.; Flemming, P., *et al.* (2002): High frequency of epithelial chimerism in liver transplants demonstrated by microdissection and STR-analysis. *Hepatology* **35**, 110-116.
85. Kinoshita, T.; Sekiguchi, T.; Xu, M. J., *et al.* (1999): Hepatic differentiation induced by oncostatin M attenuates fetal liver hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 7265-7270.
86. Strick-Marchand, H., y Weiss, M. C. (2002): Inducible differentiation and morphogenesis of bipotential liver cell lines from wild-type mouse embryos. *Hepatology* **36**, 794-804.
87. Petkov, P. M.; Zavadil, J.; Gotees, D., *et al.* (2004): Gene expresión pattern in hepatic stem/progenitor cells during rat fetal development using complementary DNA microarrays. *Hepatology* **39**, 617-627.
88. Sandhu, J. S.; Petkov, P. M.; Daveba, V., Shafritz, D. A. (2001): Stem cell properties and repopulation of the rat liver by fetal liver epithelial progenitor cells *Am J Pathol* **159**, 1323-1334.
89. Kubota, H., y Reid, L. M. (2000): Clonogenic hepatoplasts common precursors for hepatocytic and biliary lineages are lacking classic major histocompatibility complex class I antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 12132-12137.
90. Suzuki, A.; Zheng, Y.; Kondo, S., *et al.* (2000): Flow cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver *Hepatology* **32**, 1230-1239.
91. Suzuki, A.; Iwama, A.; Miyashita, H.; Makuuchi, H., y Taniguchi, H. (2003): Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development* **130**, 2513-2524.
92. Miguet, S.; Cortesano, I.; Gonzalo, P., *et al.* (2003): A population of c-Kit(low) (CD45/TER119)- hepatic cell progenitors of 11 days postcoitus mouse embryo liver reconstitutes cell-depleted liver organoids. *J Clin Invest* **112**, 1152-1163.

6. CÉLULAS MADRE HEPÁTICAS

93. Suzuki, A.; Zheng, Y., y Kaneko, S. (2002): Clonal identification and characterization of self- renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J Cell Biol* **156**, 173-184.
94. Tanimizu, N.; Nishikawa, M.; Saito, H.; Tsujimura, T., y Miyajima, A. (2003): Isolation of hepatoblasts based on the expresión of Dlk/Pref-1. *J Cell Sci* **116**, 1775-1786.
95. Yasuchika, K.; Hirose, T.; Fujii, H., *et al.* (2002): Establishment of a highly efficient gene transfer system for mouse fetal hepatic progenitor cells. *Hepatology* **36**, 1488-1497.
96. Thorgeirsson, S. S., y Grisham, J. W. (2006): Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: A critical review of the evidence. *Hepatology* **43**, 2-8.
97. Durand, C., y Dzierzak, E. (2005): Embryonic beginnings of adult hematopoietic stem cells. *Haematologica* **90**, 100-108.
98. Lemaigre, F., y Zaret, K. S. (2004): Liver development up to date: new embryo models, cell lineage control and morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 582-590.
99. Grompe, M. (2005): Bone marrow derived hepatocytes. *Novartis Found Symp* **265**, 20-27.
100. Grompe, M. (2004): The importance of knowing your identity: sources of confusion in stem cell biology. *Hepatology* **39**, 35-37.
101. Zheng, Y.; Suzuki, A., y Taniguchi, H. (2004): Diversity of hepatic stem cells in the fetal and adult liver. *Semin Liver Dis* **23**, 337-348.
102. Wagers, A., y Weissman, I. L. (2004): Plasticity of adult stem cells. *Cell* **116**, 639-648.
103. Ohlstein, B.; Kai, T.; Decotto, E.; Spradling, A. (2004). The stem cell niche: theme and variations. *Current Opin Cell Biol*, 16693-16699.

7. Regeneración hepática y envejecimiento

INTRODUCCIÓN

Los cambios morfológicos y funcionales de la regeneración hepática están siendo estudiados en profundidad, y en los últimos veinte años se ha adquirido gran cantidad de información respecto a la expresión génica que acompaña a la recuperación de la función y masa hepáticas después de la lesión tóxica o vírica o de la hepatectomía parcial [1, 2]. Es un hecho conocido que la incidencia de enfermedades hepáticas se eleva con el envejecimiento, pero son muchas las perturbaciones celulares y subcelulares implicadas en esta predisposición que permanecen aún por aclarar. Hasta la fecha se han estudiado una serie de cambios relacionados con la edad, tales como: a) la disminución del volumen hepático, b) la elevación de cuerpos densos (lipofuscina), c) la disminución en la fase I del metabolismo de fármacos, d) cambios en la expresión de una serie de proteínas, e) disminución de las funciones hepatobiliares, etc. Otros cambios más sutiles, como la menor respuesta al estrés oxidativo [3-5], la expresión reducida de genes reguladores del crecimiento, disminución en el ritmo de reparación del DNA, acortamiento de telómeros, etc., contribuyen también a la menor capacidad regenerativa hepática, a la menor supervivencia post trasplantes [6] y a la mayor susceptibilidad a ciertas enfermedades [7].

PROLIFERACIÓN HEPATOCELULAR Y EDAD

En 1964 Bucher *et al.*, publicaron el perfil cinético de la proliferación de hepatocitos en el hígado remanente después de los 2/3 de la hepatectomía parcial en ratas de diferentes edades [8]. Se observaron grandes diferencias en la intensidad de síntesis del DNA y en el momento al cual ocurría el máximo de respuesta de replicación del DNA. En ratas de

más edad la respuesta regenerativa a la hepatectomía estuvo retrasada y reducida (Figura 1).

Posteriormente Stocker y Heine (1971) realizaron un cuidadoso estudio para estimar la fracción de células en el hígado remanente que entraban en la fase proliferativa después de la hepatectomía parcial en ratas de edades diferentes [9]. Sus observaciones mostraron que en animales jóvenes la proliferación implicaba al 99% de los hepatocitos residuales, mientras que en animales viejos sólo el 30% de los hepatocitos se replicaban. El retraso y la pérdida de sincronía en respuesta a la hepatectomía parcial podía ser debido a la reducción de los hepatocitos con capacidad proliferativa, indicando que en los animales de más edad permanecía esta capacidad en un menor número de células, por tanto, estas células tendrían que sufrir más rondas de división para reconstituir la masa total del hígado. Estas primeras observaciones han sido objeto de posteriores estudios de nuestro grupo para encontrar explicación a esta diferencia, dependiente de la edad, en la respuesta regenerativa a la lesión hepática [10-12]. Krupczak-Hollis *et al.*, han propuesto varias observaciones respecto a las bases moleculares de estas diferencias debidas a la edad y han ofrecido un potencial terapéutico para mejorar el bloqueo de la proliferación celular en la lesión hepática observada en ancianos [13].

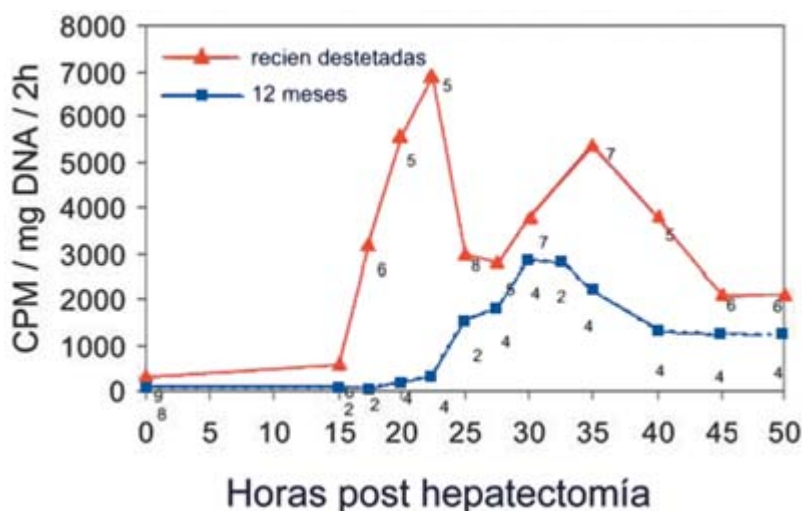


FIGURA 1. Incorporación de 3H-timidina en el DNA en hígado de ratas jóvenes (tres semanas) y viejas (12 meses) después de hepatectomía parcial. Las muestras de hígado se obtuvieron a distintos tiempos (horas) después de la hepatectomía. Los números indican el número de animales utilizado en cada experimento (Bucher *et al.*, 1964) [8].

La lesión hepática aguda está causada por una variedad de agresiones: lesión tóxica por fármacos o xenobióticos, hepatitis vírica e isquemia. El hígado es la primera línea de protección frente a la agresión causada por agentes hepatotóxicos, entre los que se encuentran numerosos xenobióticos y muchos fármacos, que ocasionan frecuentemente necrosis y/o apoptosis [14, 15].

Los cambios dependientes del envejecimiento influyen de manera notable en el proceso de regeneración hepatocelular post-necrótica. Entre las modificaciones que ocurren durante el período de la vida de un organismo se encuentran los relativos a la biotransformación y eliminación de fármacos y xenobióticos que acarrearán mayor riesgo de toxicidad [4, 5]. Los xenobióticos, como los fármacos, se eliminan del organismo por diferentes vías, una de ellas, y la más importante, es mediante la biotransformación del agente hepatotóxico por el sistema microsómico de las monooxigenasas de función mixta dependiente del citocromo P-450 o de las flavinas. Es un hecho comprobado que estos sistemas enzimáticos experimentan una marcada disminución como consecuencia del envejecimiento [4]. La influencia de la edad sobre las monooxigenasas microsómicas se asocia con una sensibilidad aumentada a los xenobióticos y con cambios hepáticos tales como la pérdida de masa del órgano, menor flujo sanguíneo y síntesis de proteínas anormales [4, 5, 7]. También, después de la lesión inducida por el agente hepatotóxico, el retraso en la respuesta regenerativa de los hepatocitos senescentes es una consecuencia de su menor capacidad proliferativa [8, 9] y de la mayor sensibilidad a fármacos. Después de la agresión tóxica, en la cual está implicada muerte hepatocelular, por necrosis y/o apoptosis, las células remanentes se dividen para restaurar la masa y la función hepáticas [10-13]. Los mecanismos que intervienen en esta restauración son similares a los que ocurren después de la hepatectomía parcial, y están también estrictamente controlados por citoquinas y factores de crecimiento [1, 2], que juegan un importante papel en la transición desde el estado quiescente de los hepatocitos diferenciados adultos al estado proliferativo de las células en regeneración [14, 15].

Como es un hecho aceptado que el envejecimiento afecta la biotransformación y eliminación de xenobióticos, estudios de nuestro grupo han determinado si esta influencia se refleja en la relación que existe entre la severidad de la lesión hepática inducida por agentes hepatotóxicos y la respuesta proliferativa. Así, se indujo necrosis y regeneración hepáticas mediante la administración intraperitoneal de una dosis subletal del hepatotóxico tioacetamida a ratas jóvenes, adultas y viejas (dos, doce y treinta

meses), determinando la regeneración post-necrótica por evaluación de la ploidia y distribución del DNA en las diferentes fases del ciclo celular en hepatocitos aislados. También se determinó la aparición en suero de TNF α e IL-6 y la capacidad de este suero de inducir la proliferación de cultivos quiescentes de fibroblastos NIH 3T3, que se evaluó por incorporación de timidita tritiada y sobre cultivos de macrófagos de ratas no tratadas para inducir en ellas la síntesis de la NOS y la liberación de NO [11].

El estudio de las alteraciones en la respuesta hepática a la lesión hepática y la regeneración postnecrótica inducida por sustancias hepatotóxicas (fármacos o xenobióticos) a medida que transcurre la edad, presenta un interés considerable a niveles fisiopatológicos y farmacológicos [4]. Por ello, Sanz *et al.* [4] observaron, tanto la intensidad de la lesión hepática como la actividad del sistema implicado en la biotransformación de la tioacetamida a distintos tiempos después de la administración de la dosis del hepatotóxico. La dosis fijada de tioacetamida (500 mg/Kg) podría ser

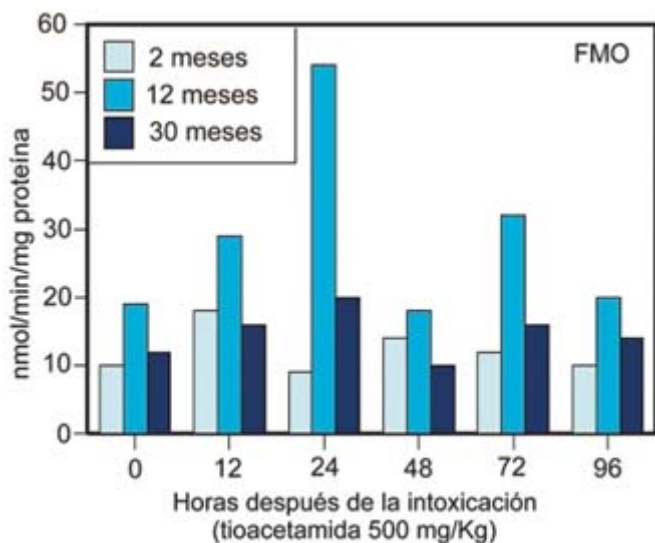


FIGURA 2. Actividad flavina monooxigenasa (FMO) en homogenados de hígado de rata. Variaciones por efecto de la edad frente a la administración del agente hepatotóxico tioacetamida (500 mg/Kg), en ratas de 2, 12 y 30 meses. Los valores basales, a tiempo 0, muestran las variaciones debidas a la edad sin tratamiento. La administración del hepatotóxico induce la actividad de este sistema que muestra su mayor actividad en el grupo de 12 meses a las 24 horas. La respuesta bifásica se debe al punto máximo de necrosis en las jóvenes a las 24 horas y el de las adultas y viejas a las 48 horas (Figura 3). Esta disminución se debe a que los sistemas monooxigenasas se ubican en la región perivenosa del acino, que es la que resulta destruida por la necrosis (Sanz *et al.*, 1999) [4].

biotransformada de manera diferente según la edad del animal, y los datos basales obtenidos muestran cómo en animales sin tratar existen notables diferencias que se mantienen una vez que se administra el agente tóxico. En los resultados en la Figura 2 cabe destacar que no se detectaron diferencias significativas en la actividad de la FAD monooxigenasa (FMO) microsómica, entre el grupo de ratas jóvenes y el de ratas viejas, mientras que se apreció un notable incremento en el grupo de ratas adultas. La explicación a estos datos es que en animales jóvenes el sistema enzimático monooxigenasa no está del todo desarrollado y en animales viejos muestra una depresión dependiente de la edad.

La intensidad de la lesión hepática (necrosis perivenosa masiva), detectada por la aparición de aspartato aminotransferasa en suero, fue paralela a la actividad de la FMO. La Figura 3 muestra marcadas diferencias en la aparición de la necrosis perivenosa, que fue anterior en ratas jóvenes (a las 24 horas de la intoxicación), y en la intensidad de la lesión que fue notablemente mayor en ratas adultas. También hubo diferencias en la restauración hacia la normalidad, que a las 96 horas fue completa en el grupo joven. La

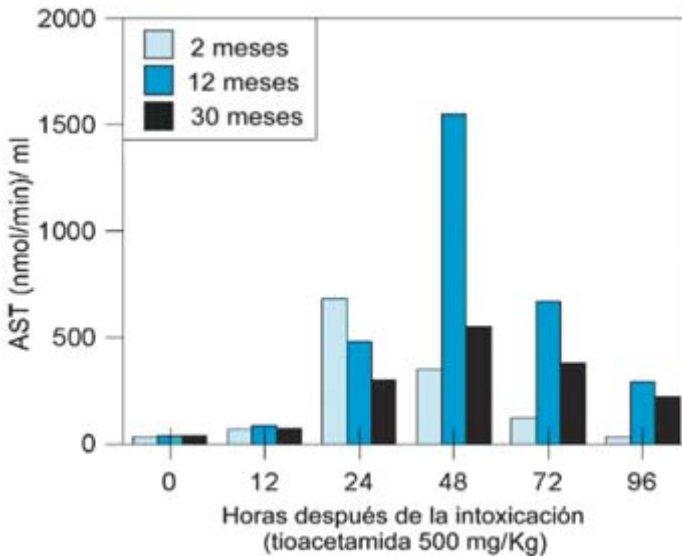


FIGURA 3. Actividad aspartato aminotransferasa (AST) en suero de ratas tratadas con tioacetamida (500 mg/Kg). La actividad AST en suero es un marcador de necrosis hepatocelular perivenosa que se evaluó en ratas de distintas edades: jóvenes, adultas maduras y viejas a distintos tiempos (horas) después de la intoxicación. El punto máximo se registró en las ratas adultas a las 48 horas de la intoxicación y superó en dos veces al alcanzado por las ratas jóvenes y las ratas viejas (Sanz et al., 1999) [5].

expansión de la capacidad metabólica en ratas adultas (doce meses) es una consecuencia de la mayor biotransformación de la tioacetamida y la mayor generación de oxidantes y especies reactivas derivadas de la hepatotoxina. Esto explica la mayor severidad en la lesión necrótica (en ratas de doce meses de edad, a las 48 horas de la intoxicación), que demanda mayor respuesta al estrés oxidativo. La hepatotoxicidad de la tioacetamida depende de su biotransformación mediante el sistema monooxigenasa de función mixta dependiente mayoritariamente de la flavina. Los cambios basales dependientes de la edad en la FAD monooxigenasa basal, como también en la inducción de este sistema a partir de la administración de tioacetamida, explican en parte el menor grado de lesión detectado en los grupos joven y viejo, porque la respuesta necrogénica, detectada por evaluación de la actividad aspartato aminotransferasa (AST) en suero (Figura 3), fue paralela a la actividad FAD monooxigenasa evaluada en hepatocitos (Figura 3), la cual estuvo significativamente más elevada en el grupo adulto.

La Figura 4 muestra el % de células que se encuentran comprometidas en la transición $2C \rightarrow 4C$, como parámetro evaluador de la síntesis de DNA.

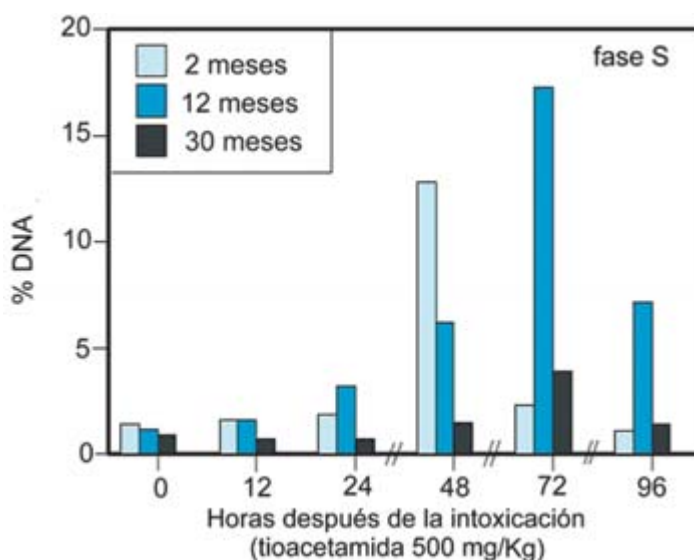


Figura 4. Evaluación de la síntesis de DNA en regeneración hepatocelular postnecrótica inducida por una dosis subletal de tioacetamida (500 mg/Kg), en ratas de 2, 12 y 30 meses. Los resultados se expresan en % de hepatocitos que se encuentran en la fase S del ciclo celular, en hígado a diferentes tiempos después de la administración del agente hepatotóxico. La síntesis del DNA se adelanta en las ratas jóvenes, se retrasa y es superior en las maduras, y es muy baja en ratas viejas (Sanz et al., 1999) [5].

7. REGENERACIÓN HEPÁTICA Y ENVEJECIMIENTO

En este caso, las ratas jóvenes se adelantan en la regeneración, en las adultas como en las viejas existe un retraso en la aparición del punto máximo, pero los valores más elevados se registraron en las adultas como consecuencia de la mayor intensidad de la lesión. Sin embargo, en la secuencia de acontecimientos que trae consigo la administración de dosis necrogénicas de un agente hepatotóxico: intoxicación → biotransformación → necrosis hepatocelular masiva → regeneración → y restauración de la función hepática; los cambios relativos a la necrosis pueden dissociarse de los relativos a la proliferación hepatocelular post-necrótica, porque la respuesta proliferativa de los animales de más edad frente a la necrosis hepatocelular, no es la misma cuando se compara con el grupo joven. Además de la biotransformación, otros factores tales como el estado redox de la célula (GSH/GSSG), citoquinas circulantes (TNF α , IL-6) juegan también papeles importantes [5, 12, 16].

De los datos anteriores se deduce que el retraso en el desarrollo de la lesión (necrosis) y la menor capacidad regenerativa impiden la restauración de la función hepática en las ratas de más edad. Por otro lado, los sistemas de defensa antioxidante se elevan con la edad, pero el ritmo de generación de especies reactivas excede la capacidad antioxidante inducida, lo que genera situaciones de estrés oxidativo y peroxidación [12].

Otros datos incluyen una progresiva poliploidización que va acompañada por cambios en el potencial proliferativo que decrece notablemen-

Tioacetamida (500 mg/Kg) → Biotransformación (radicales libres) → Lesión (necrosis) → Regeneración hepatocelular → Recuperación de la función				
Edad ratas (meses)	Lesión máxima (horas)	Intensidad de la lesión	Máxima síntesis DNA (horas)	Recuperación a las 96 horas
0,75 meses	24	+	48	total
2 meses	24	++	48	total
6/12 meses	48	+++	72	media
18/30 meses	48	++	72	poca

Esquema que muestra las diferencias entre grupos de ratas de diferentes edades intoxicados con Tioacetamida (500 mg/Kg), respecto al punto de máxima lesión (necrosis perivenosa), la intensidad de la lesión, la síntesis del DNA y la recuperación hacia la normalidad.

te de $2C \rightarrow 4C$ y se eleva de $4C \rightarrow 8C$. La conexión entre los sistemas oxidante/antioxidante y la elevación de la poliploidización no está clara y puede interpretarse como dos manifestaciones independientes del envejecimiento [14, 15].

EVENTOS INICIADORES EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

El proceso de la regeneración hepática está constituido por una serie de etapas que incluyen los eventos iniciadores o inductores «priming» que van a conducir a la mitosis celular (Figura 5). El conocimiento de las señales

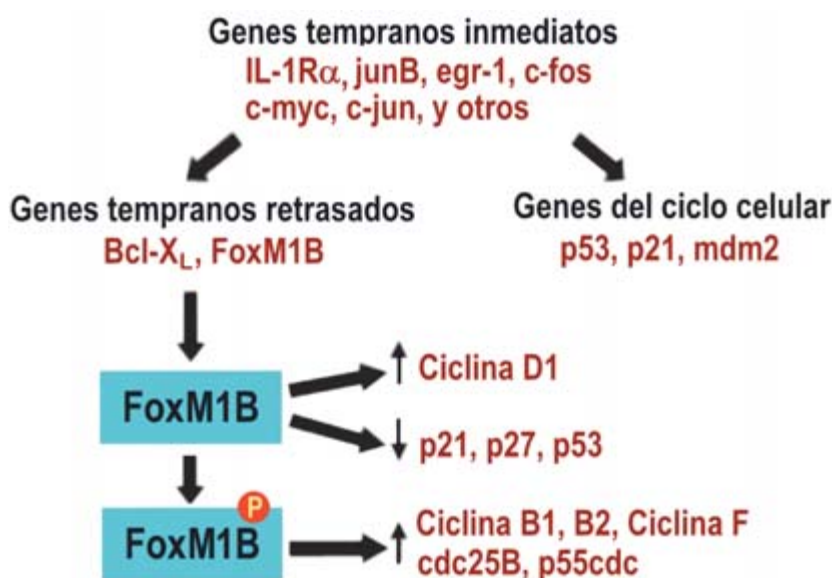


FIGURA 5. Secuencia de eventos en hígado en regeneración después de hepatectomía parcial. Después de la resección hepática de las dos terceras partes del hígado, tiene lugar la fase de «iniciación», en la cual las citoquinas $TNF\alpha$ e $IL-6$ activan sus respectivos receptores en los hepatocitos. Esto conduce a la activación de varios factores de transcripción clave $NF\kappa B$, $AP-1$, $STAT3$, $STAT1$ y $C/EBP\beta$ y δ . Éstos inducen, a su vez, la expresión de los genes tempranos inmediatos. HGF se expresa en este momento y se encuentra implicado en la transición $G0/G1$. Durante $G1$ se expresan los genes tempranos retrasados y posteriormente los genes del ciclo celular, todos ellos necesitan nueva síntesis proteica. La elevada expresión de $FoxM1B$ y $TGF\alpha$ se verifica en la transición $G1/S$ y se relaciona con la mayor expresión de ciclina D y menor expresión de los inhibidores. Durante $G2/M$ $FoxM1B$ eleva la transcripción de la ciclina $B1$, ciclina $B2$ y $cdc25B$. Adicionalmente, $FoxM1B$ se asocia con niveles elevados de ciclina F y $p55cdc$, que están implicados en la finalización del ciclo celular después de la hepatectomía parcial (Mackey, Sing y Darlington, 2003) [18].

de iniciación que conducen a las células remanentes hacia el ciclo celular ha sido la meta de muchas investigaciones. La delineación molecular de esta estimulación inicial del proceso regenerativo puede llevar a conseguir una terapia útil en casos de lesión hepática. Diversos estudios utilizando animales genéticamente manipulados (transgénicos o knockouts) han llegado a responsabilizar a las citoquinas TNF α e IL-6 [17] como las principales promotoras de la iniciación de los hepatocitos, haciéndolos competentes para responder a los factores de crecimiento EGF y HGF [19, 20]. Además, Greenbaum *et al.* [21] han demostrado que el factor de transcripción C/EBP- β es un objetivo posterior a la señalización de las citoquinas, que juega un importante papel en el resultado de la respuesta proliferativa.

Después de la resección hepática de las dos terceras partes del hígado, tiene lugar la fase de «iniciación» en la cual las citoquinas TNF α e IL-6 activan sus respectivos receptores en los hepatocitos. Esto conduce a la activación de varios factores de transcripción clave NF κ B, AP-1, STAT3, STAT 1 y C/EBP β y δ . Éstos inducen, a su vez, la expresión de los genes tempranos inmediatos. HGF se expresa en este momento y se encuentra implicado en la transición G0/G1. Durante G1 se expresan los genes tempranos retrasados y posteriormente los genes del ciclo celular, todos ellos necesitan nueva síntesis proteica. La elevada expresión de FoxM1B (*fork-head box*) y TGF α se verifica en la transición G1/S y se relaciona con la mayor expresión de ciclina D y menor expresión de los inhibidores. Durante G2/M FoxM1B eleva la transcripción de la ciclina B1, ciclina B2 y cdc25B. Adicionalmente, FoxM1B se asocia con niveles elevados de ciclina F y p53cdc, que están implicados en la finalización del ciclo celular después de la hepatectomía parcial [18].

ACTIVACIÓN DE LOS GENES TEMPRANOS INMEDIATOS

Después de los eventos iniciadores discutidos anteriormente, se inducen los genes tempranos inmediatos, debido en gran parte a modificaciones post-traduccionales de los factores de transcripción preexistentes AP1, C/EBP- β y STAT3, y NF κ B, inducidos por las citoquinas. La expresión de los genes tempranos inmediatos se verifica pocas horas después de la resección quirúrgica y no requiere nueva síntesis proteica. Algunos de los bien caracterizados genes tempranos inmediatos que son inducidos incluyen: c-Myc, c-fos, c-jun, EGR1, IGFBP-1, y HGF [22, 23]. La disposición de los genes tempranos inmediatos ha sido parcialmente establecida por

perfiles de expresión génica, que dan una completa imagen de los acontecimientos moleculares que tienen lugar en la iniciación y en la fase temprana inmediata [18, 24]. Después de esta fase temprana e inmediata, tienen lugar numerosos cambios en la expresión génica que requieren nueva síntesis proteica. Estos acontecimientos empujan a la célula para salir de G0 y entrar en G1 y de aquí a la fase S (síntesis del DNA), del ciclo.

FOXM1B

El gen *FoxM1* exhibe una pauta específica de expresión durante el ciclo celular. Tanto los niveles de FoxM1 mRNA como los de proteínas son apenas detectables en células quiescentes, mientras que se elevan notablemente en células estimuladas a reentrar en el ciclo celular. La elevación de la expresión de FoxM1 se inicia en la fase S y continúa a través de G2 y mitosis. Se ha demostrado que la actividad transcripcional de *FoxM1* está restringida al ciclo celular y se relaciona con la fosforilación de la proteína, que alcanza su máximo en la fase G2 [25]. Los estudios iniciales sobre FoxM1 describieron que la fosforilación de FoxM1 se verificaba principalmente durante la mitosis. Después se ha demostrado que la fosforilación se inicia por los complejos ciclina/CDK, al principio de G1, y continúa durante G2/M. Son las quinasas CDK1, CDK2, MAPK y Plk las que se encuentran implicadas en la fosforilación de FoxM1.

El envejecimiento se caracteriza por una disminución en la proliferación celular combinada con acumulación de defectos mitóticos e inestabilidad cromosómica [26]. Los defectos mitóticos observados en células de pacientes ancianos, como también en pacientes con progeria (envejecimiento prematuro), se han asociado con menor expresión de varios genes reguladores del ciclo celular, siendo uno de los más afectados el que codifica FoxM1 (23). Por tanto, los niveles reducidos de FoxM1 pueden contribuir a los defectos mitóticos de las células envejecidas, y la pérdida de FoxM1 origina un descenso en la proliferación celular. Como un knockout total de FoxM1 es letal, se ha conseguido un knockout condicional para la alteración del FoxM1 específico del hígado (24), en el cual se ha comprobado que existe una reducción significativa de la proliferación de los hepatocitos después de la hepatectomía parcial. La proliferación reducida en respuesta a la hepatectomía en pacientes envejecidos se ha asociado a concentraciones bajas de la hormona del crecimiento (GH). De hecho, el tratamiento de pacientes ancianos con GH ha demostrado que restaura

la proliferación celular. También la GH parece que juega un papel en la proliferación de los hepatocitos durante la regeneración hepática, al promover la traslocación nuclear de FoxM1. El tratamiento con GH puede restaurar la proliferación de los hepatocitos después de la hepatectomía parcial en ratones viejos y esto se ha relacionado con la inducción de FoxM1 [13]. Sin embargo, después de la alteración de FoxM1 en el hígado, GH fue incapaz por sí misma de restaurar la proliferación, lo cual proporciona un mecanismo mediante el cual GH estimula la proliferación en organismos viejos, y es a través de FoxM1. No obstante, la respuesta a mitógenos, tales como TCPOBOP, fue comparable en ratones viejos frente a los jóvenes, en los cuales la inducción de FoxM1, como también la de otras proteínas asociadas al ciclo celular, fue similar [27]. Estas observaciones sugieren que los hepatocitos diferenciados retienen su capacidad de proliferar a lo largo de toda la vida mediante la activación de FoxM1.

Se ha demostrado recientemente que FoxM1b, miembro de la familia de factores de transcripción, es una proteína esencial para el crecimiento de los hepatocitos [28, 29]. Durante el desarrollo y diferenciación de los hepatocitos, la familia del factor forkhead está presente en los tejidos embrionarios y regula la entrada de las células en la fase S y en la mitosis.

El grupo de Costa ha contribuido significativamente al conocimiento del papel de Foxm1b mediante el uso de ratones transgénicos que sobreexpresaban la proteína humana y de ratones knockout carentes de Foxm1b en hepatocitos [28]. Wang *et al.* han observado que los ratones que carecían de FoxM1b mostraban una respuesta proliferativa en hígado muy disminuida después de la resección quirúrgica del hígado [30]. Posteriormente demostraron que la sobreexpresión de la FoxM1B humana introducida mediante adenovirus a ratones silvestres de doce meses, restauraba la respuesta normal a la hepatectomía parcial [31]. La sobreexpresión de FoxM1B en los animales transgénicos causó un adelanto en la iniciación de la síntesis del DNA. El adelanto en la entrada en la fase S en respuesta FoxM1B fue paralelo a la expresión de otros componentes críticos de la maquinaria del ciclo celular, incluyendo la ciclinas D y E [32, 33] y acopla la expresión de Foxm1b con la progresión del ciclo celular. En ensayos de cotransfección se detectó que FoxM1B es capaz de elevar la transcripción de los promotores de la ciclina B [34] y de la ciclina D [30], promoviendo así la transición G1/S y G2/M en el ciclo celular. Otros componentes importantes en la regulación del ciclo celular durante la regeneración están

controlados por FoxM1b, tales como cdc25A y B fosfatasa, que activan los complejos ciclina/CDK [25]. Además, FoxM1B promovió también una reducción en los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina (CDKI) p27 y p21 [30, 31]. La multiplicidad de puntos de control de FoxM1b indica que la actividad de este factor Forkhead es un determinante principal en el proceso de división de los hepatocitos. Estudios del grupo de Madena [35] han responsabilizado a FoxM1 de estar implicado en la transición G2/M y que la falta en este factor de transcripción retrasa la mitosis por impedir la normal segregación de los cromosomas y la progresión G2/M. También se ha observado que la carencia de este factor produce la acumulación de células poliploides.

HORMONA DEL CRECIMIENTO, REGENERACIÓN HEPÁTICA Y EDAD

La secreción de la hormona del crecimiento (GH) disminuye a medida que transcurre la edad. Moolten *et al.*, han demostrado que la administración de GH acelera la respuesta de la síntesis de DNA hepática a la hepatectomía parcial, pero los mecanismos moleculares implicados no están claros [36]. Krupczak-Hollis *et al.* [13] han mostrado que existe una conexión entre la GH y FoxM1B, ya que el tratamiento de los animales viejos con GH elevó la expresión de FoxM1B y la entrada de los hepatocitos en la fase de síntesis del DNA, tanto en los animales control como en los que habían sufrido la hepatectomía parcial. La elevación en FoxM1B en animales viejos tratados con GH estimuló la proliferación a niveles equivalentes a los de animales jóvenes en las mismas condiciones. El requerimiento de FoxM1B en la proliferación estimulada por GH se demostró tratando ratones knockout deficitarios en FoxM1B con GH y observando que estos animales no aceleraron la síntesis del DNA en contraste con los ratones con FoxM1B funcional. Estos resultados apoyan la conclusión que FoxM1B tiene que estar presente para que GH estimule la proliferación.

La hormona del crecimiento (GH), la cual se reduce con la edad, corrige la alterada capacidad proliferativa del hígado de animales viejos. Wang *et al.*, recientemente [37], han presentado un mecanismo mediante el cual GH elimina el control negativo de la proliferación dependiente de la edad e incrementa la transcripción de genes específicos hepáticos en hígado de ratón viejo. Esta reducida capacidad proliferativa del hígado por efecto del envejecimiento se asocia con el complejo C/EBP α -Brm que

inhibe los promotores que dependen de E2F. Estos autores han encontrado que el secuestro de C/EBP α en complejo con Brm conduce a una interacción débil de C/EBP α con promotores de genes específicos del hígado, cuya expresión se reduce en animales viejos. La inyección de GH o del regulador de la amplitud de su liberación endógena, la grelina, reduce la formación del complejo C/EBP α - Brm en hígados de ratones viejos, lo que conduce a una desrepresión de los objetivos de E2F, a mayor interacción de C/EBP α con promotores de genes específicos hepáticos, y a la corrección de su expresión. La eliminación del complejo, dependiente de GH está mediada por la inhibición de la actividad de la ciclina D3-CDK4 y por la elevación de una fosfatasa, la proteína fosfatasa 2A, que desfosforila C/EBP α y disocia el complejo.

Si los hepatocitos que sufren proliferación son estimulados por mitógenos, cabe preguntarse cuál es el papel que juega FoxM1B. Columbano *et al.*, han resumido los conocimientos adquiridos hasta la fecha respecto a la inducción de la proliferación de hepatocitos en ausencia de lesión o pérdida de las propias células [27, 38]. Diferentes ligandos, tales como el hidrocarburo halogenado TCPOBOP, ligandos PPAR, ácido retinoico o T3 pueden actuar como mitógenos primarios *in vivo* mediante receptores nucleares. Cuando se administran estos agentes no se requiere la iniciación de los hepatocitos inducida por las citoquinas, ni la activación de los mitógenos primarios, ni la elevación de los factores de crecimiento HGF y TGF α , ni la elevación de la expresión de muchos genes tempranos inmediatos, descritas anteriormente. Después de la administración del TCPOBOP, la cinética de la síntesis del DNA está enormemente alterada con una entrada acelerada en la fase S. La estimulación primaria de la proliferación por mitógenos no implica la activación de los factores de transcripción AP-1, STAT3, NF κ B y C/EBP β y δ por las citoquinas, ni la elevación de los factores TNF α y HGF. El grupo de Columbano ha realizado diversos trabajos en los que trataba ratones de doce meses de edad, con el hepatomitógeno TCPOBOP y conseguía que la respuesta a la hepatectomía en estos ratones viejos fuera similar a la de los ratones jóvenes de tres semanas de edad. La estimulación de la síntesis del DNA se asoció con mayor expresión de la ciclina A, ciclina B, E2F y p107. Los niveles de todos ellos fueron comparables con los obtenidos en ratones jóvenes. El hidrocarburo halogenado TCPOBOP elevó también la expresión de FoxM1B en un grado similar en ambos grupos. Ellos concluyen que esto demuestra que los hepatocitos de ratas viejas retienen su capacidad proliferativa [37].

Regulación de Foxm1b

Los datos obtenidos indican que la acumulación de Foxm1b después de la hepatectomía es solo parcialmente el resultado de la activación transcripcional y que la estabilización del mRNA puede ser un mecanismo importante mediante el cual FoxM1B se eleva [26]. Se desconoce si este mecanismo de estabilización del mRNA es un fenómeno general o es específico para el FoxM1B.

La GH se ha administrado a ancianos con resultados positivos, tales como incremento de la densidad de la masa corporal asociada a disminución del tejido adiposo [39]. Paradójicamente, muchos estudios en organismos no humanos indican que niveles reducidos de GH e IGF1 se asocian con incrementos en la longevidad [40]. El uso de GH en ancianos como agente contra el envejecimiento está muy debatido, en parte por la frecuencia de efectos adversos, tales como la aparición de diabetes [39, 41], lo cual puede ser debido a la utilización de tratamiento largos (26 semanas). Es probable que tratamientos a corto plazo puedan ser eficaces para activar la regeneración que acompaña el trasplante hepático, terapia celular o genética o para la rápida recuperación después de enfermedad hepática. Otro asunto de importancia potencial es la demostración por Krupczak-Hollis *et al.* [13] que la proliferación hepatocelular se eleva también en hígados normales no regenerantes tratados con GH. Esta observación nos lleva a rechazar la terapia con GH a largo plazo, ya que inducir división celular por encima de la necesaria puede llevar a la fijación de mutaciones no deseadas que pueden conducir al cáncer. Sin embargo, Columbano y Ledda-Columbano apuntan que algunas hormonas, operando a través de receptores nucleares, pueden disminuir el crecimiento neoplásico, a pesar de la estimulación de los hepatocitos normales [38].

Vías señalizadas por GH que son iguales o diferentes en modelos de hepatotoxicidad

La estimulación de la síntesis de DNA por el GH en hígados de ratas jóvenes y viejas que no han sido sometidas a intervención quirúrgica, alcanzan niveles similares a los observados después de la hepatectomía en animales jóvenes. Así, la iniciación por lesión hepatotóxica parece innecesaria para la estimulación de la proliferación por GH (Figura 6).

Un objetivo inmediato del receptor GH es JAK2, con implicación potencial de IRS-1 (sustrato del receptor de la insulina) y STAT3. IRS-1 es

también un objetivo directo de IGF-1 y de receptores de la insulina, y la PI3K se regula posteriormente por IRS-1. Estas intervenciones comunes entre las vías señalizadoras llevan a sugerir la necesidad de experimentación adicional para determinar si JAK2 y/o IRS-1 se requieren para la señalización de la proliferación por GH y/o elevación de FoxM1B y cómo las respuestas a GH difieren de las de la IGF-1/insulina. Los estudios presentados aquí son sólo una selección de la cantidad de grupos de investigación implicados en la investigación de la regulación molecular del complejo proceso de la regeneración con el objeto de identificar una hormona reguladora.

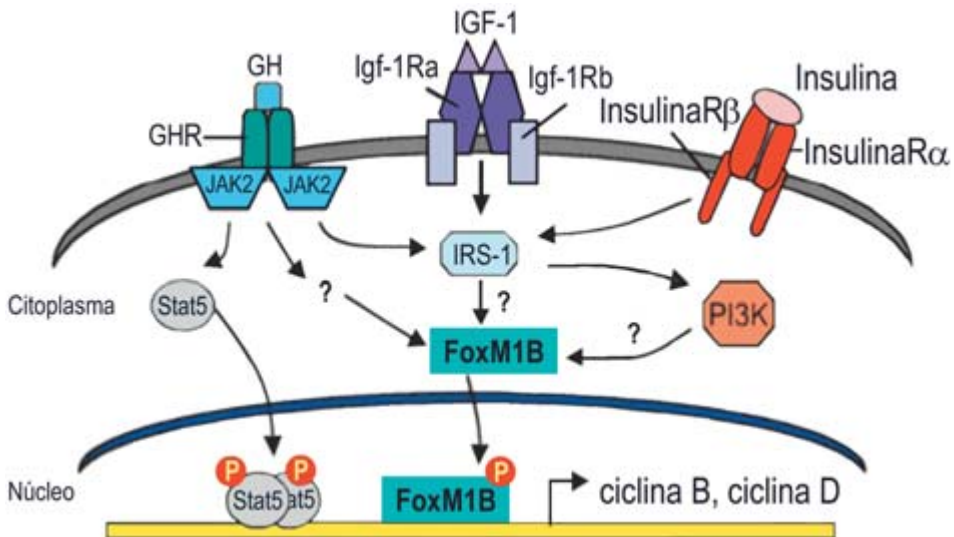


FIGURA 6. Señalización por la hormona del crecimiento, IGF-1 e insulina mediante sus receptores compartiendo un objetivo común en IRS-1. La regulación de la proteína FoxM1B puede ocurrir directamente a través de IRS-1, a través de la quinasa PI3K o a través de vías no conocidas (Mackey, Singh y Darlington, 2003) [18].

La depleción del FoxM1B humano se asocia con la acumulación de poblaciones celulares poliploides (tetraploides y octoploides) y altera la progresión del ciclo celular [42]. La progresión a través del ciclo celular implica la expresión periódica de un grupo de genes específicos de cada fase. FoxM1B se requiere para la entrada en mitosis y para la correcta segregación de los cromosomas. FoxM1B regula la expresión de una larga lista de genes específicos en la transición G2/M. La transactivación de la ciclina B mediada por FoxM1B es esencial para la entrada en mitosis. Los resultados del grupo de Medema [35] muestran que FoxM1B afecta la fi-

delidad de la segregación cromosómica. El único factor forkhead de mamíferos que exhibe expresión dependiente de la proliferación es FoxM1B, previamente conocido como HFH1/trident/Win. FoxM1B se eleva al principio de la fase S y persiste hasta el final de la fase M. Además la letalidad embrionaria observada en embriones carentes de FoxM1B se asocia con la presencia de células poliploides en corazón e hígado, lo que indica que la función de FoxM1B es necesaria para la ejecución de la mitosis [42].

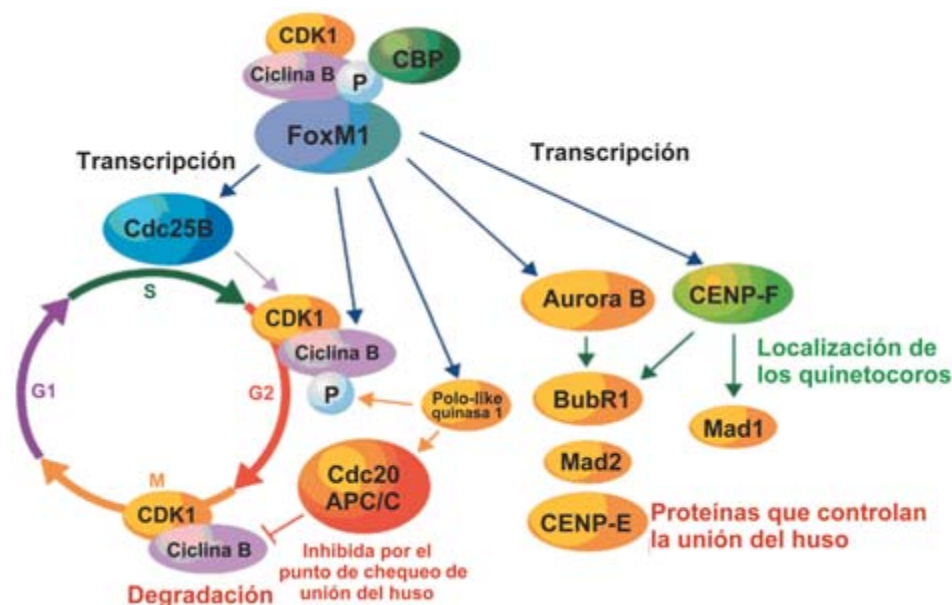


FIGURA 7. El factor de transcripción FoxM1 regula la transcripción de los genes del ciclo celular que son esenciales para la transición G2/M, la segregación cromosómica y la citoquinesis. FoxM1 requiere la unión de los complejos CDK2-ciclina E/A (G1/S) o CDK1-ciclina B (G2/M) a una secuencia LXL (639-641) en su dominio de activación transcripcional. Esto se requiere para la fosforilación eficiente del sitio CDK en la trea 596, mediando así la unión a la proteína coactivadora CBP. Se han identificado los genes objetivo de FoxM1 que regulan la progresión G2/M, la quinasa Polo (Plk1), CENP-F, la cdc25B fosfatasa, Aurora B quinasa y genes ciclina B. Al iniciarse la fase G2, Plk1 fosforila a la ciclina B. Eso media su entrada en el núcleo y activa la fase M, promoviendo el complejo CDK1-ciclina B. La actividad Aurora B quinasa es necesaria para la citoquinesis y la exacta segregación cromosómica, porque regula la localización de varias proteínas de los puntos de control de ensamblaje del huso, incluyendo los quinetocoros centroméricos, un complejo proteico que media la inserción de los microtubulos a los cromosomas, que son necesarios para la segregación. La menor localización del quinetocoro de las proteínas del punto de control regulador BubR1 y Mad1 se ha encontrado en una fracción significativa de células suprimidas en FoxM1 o CENP-F (Costa, 2003) [29].

Otro interesante estudio de Conboy *et al.* [43], considera que una de las características de las alteraciones de la edad se deben a cambios en las células madres específicas de los tejidos. El declinar en la proliferación de las células progenitoras es consecuencia de la formación de un complejo que implica a C/EBP α y al factor remodelador de la cromatina Brm, que inhibe la capacidad regenerativa del hígado de animal viejo. Estos autores han establecido un sistema de parejas parabióticas (que comparten el sistema circulatorio), entre un ratón joven y otro viejo (parabiosis heterocrónica). De esta manera el ratón viejo se expone a factores presentes en suero del animal joven. Con este tipo de experimentos se demostró que la parabiosis heterocrónica restauró la activación de la señalización Notch y ha demostrado que el declinar de la actividad proliferativa de las células hepáticas puede ser modulada por factores sistémicos que cambian con la edad. El declinar del potencial regenerativo tisular es una de las características del envejecimiento y puede ser debido a los cambios en las células madre de los tejidos. Además la parabiosis heterocrónica elevó la proliferación de los hepatocitos a niveles similares a los del animal joven, lo que demostró que el declinar de la capacidad proliferativa de las células del ratón viejo se debe al cambio en los factores sistémicos propio de la avanzada edad. El hígado de ratones viejos sometidos a parabiosis con ratones jóvenes puede adquirir la capacidad de rejuvenecer las células madre residentes añosas. En hígado existen muchos tipos de células madre que participan en la regeneración y homeostasis, dependiendo de las condiciones fisiológicas o patológicas [44].

El declinar de la capacidad de la proliferación de los hepatocitos con la edad es un hecho bien establecido [45, 46]. En los parabiontes antes mencionados se ha examinado la proliferación por dos criterios independientes: la incorporación de BrdU o la expresión del marcador de proliferación Ki67 en células Alb+. En parabiontes jóvenes isocrónicos los niveles de proliferación basal de los hepatocitos alcanzaron valores dos o tres veces mayores que en controles no parabióticos, lo cual es consistente con publicaciones previas sobre los efectos de la parabiosis sobre los hepatocitos [47-49].

También se observaron grupos de células proliferantes BrdU-positivas que no eran hepatocitos en hígados añosos. La proliferación de células albúmina-positivas en parabiontes isocrónicos viejos, fue menor que la observada en parabiontes isocrónicos jóvenes, lo que indica que existe una disminución relacionada con la edad en el ritmo basal de la proliferación de los hepatocitos en animales no parabióticos. Sin embargo, la parabiosis con una pareja joven elevó de manera significativa la proliferación de los

hepatocitos en ratones viejos. Una reducción de la proliferación de las células progenitoras se detectó en hígados de ratones jóvenes después del emparejamiento parabiótico con ratones viejos. El declinar de la proliferación de los hepatocitos relacionado con el envejecimiento se debe a la formación de un complejo específico de la edad de reguladores del ciclo celular con C/EBP α , que inhibe la expresión génica promovida por E2F. Una de las proteínas detectadas en este complejo en hígado de ratones viejos, pero no en jóvenes, es el factor remodelador de la cromatina Brm. La concentración del complejo C/EBP α -Brm se eleva en hígado de roedores viejos, lo que conduce a una menor proliferación de los hepatocitos. El complejo C/EBP α -Brm se detectó en extractos hepáticos de parabiontes isocrónicos viejos, pero no en parabiontes isocrónicos jóvenes, de manera similar a previos estudios en roedores no parabiontes. La formación del complejo C/EBP α -Brm disminuyó en extractos hepáticos de parabiontes heterocrónicos viejos. Así, el determinante molecular había revertido al fenotipo «joven», consistente con actividad proliferativa intensificada de los hepatocitos en estos ratones. El complejo estuvo presente a elevados niveles en parabiontes heterocrónicos jóvenes comparados con el control joven, también consistente con la modesta inhibición de la proliferación de los hepatocitos en parabiontes heterocrónicos jóvenes. Estos datos muestran que el ambiente sistémico joven restaura el perfil joven de señalización celular a las células progenitoras añosas en el hígado y también aumenta su proliferación.

Los experimentos de Conboy *et al.* [43] sugieren que existen factores sistémicos que pueden modular las vías señalizadoras críticas para la activación de células progenitoras específicas del tejido y que el ambiente sistémico de un animal joven es el que promueve el éxito de la regeneración, mientras que el del animal viejo fracasa en la promoción o inhibe activamente la regeneración tisular. Ha de ser de gran interés identificar factores que tienen tal influencia crítica en las células madre específicas del tejido. Los estudios de estos autores demuestran que el declinar del potencial regenerativo de un tejido con la edad puede ser revertido mediante la modulación de factores sistémicos, sugiriéndose que las células madre y las progenitoras específicas del tejido retienen mucho de su potencial proliferativo intrínseco, incluso en la vejez, pero que los cambios relacionados con el envejecimiento en el ambiente sistémico y en el nicho en el cual estas células madre residen impide la activación de estas células para la regeneración productiva del tejido.

ABREVIATURAS

AST, aspartato aminotransferasa; BrdU, bromo desoxiuridina; Brm, factor remodelador de la cromatina; CBP, proteína de unión a CREB; CDK, quinasa dependiente de ciclina; CDKI, inhibidores de las CDK; CENP, proteína F asociada al centrómero; C/EBP, proteína intensificadora de la unión a CCAAT; FMO, flavin monooxigenasa; FoxM1, Forkhead box, factor de transcripción; GH, hormona del crecimiento; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; IGF-I, factor insulínico; IL-6, interleuquina 6; IRS, sustrato del receptor de la insulina; MAPK, quinasa inducida por mitógenos; NO, óxido nítrico; Plk1, polo like quinasa; TNF, factor de necrosis tumoral.

BIBLIOGRAFÍA

1. Michalopoulos, G. K. (2007): Liver regeneration. *J Cell Physiol* **213**, 286-300.
2. Fausto, N. (2006): Liver regeneration *Hepatology* **43**, suppl 2, S45-S53.
3. Gagliano, N.; Grizzi, F., y Annoni, G. (2007): Mechanisms of aging and liver functions *Dig Dis* **25**, 118-123.
4. Sanz, N.; Díez-Fernández, C.; Álvarez, A., y Cascales, A. (1997): Age-dependent modifications in rat hepatocyte antioxidant defense systems. *J Hepatol* **27**, 525-534.
5. Sanz, N.; Díez-Fernández, C., y Cascales, M. (1996): Variations of hepatic antioxidant systems and DNA ploidy in rats aged 2 and 8 months. *Biochim Biophys Acta* **1315**, 123-130.
6. Cuervas-Mons, V. (2006): Trasplante hepático y regeneración hepática. En: *Regeneración hepática*. Real Academia Nacional de Farmacia/Fundación J. Casares Gil. Madrid, pp. 47-58.
7. Schnucker, D. L. (2005): Age-related changes in liver structure and function: Implications for disease *Exp Gerontol* **49**, 650-659.
8. Bucher, N. L. R.; Swaffield, M. N., DiTroia, J. F. (1964): The influence of age upon the incorporation of thymidine-2-C14 into the DNA of regenerating rat liver. *Cancer Res* **24**, 509-512.
9. Stocker, E., y Heine, W.-D. (1971): Regeneration of liver parenchyma under normal and pathological conditions. *Mol Cell Biol* **144**, 400-408.
10. Sanz, N.; Díez-Fernández, C.; Álvarez, A. M.; Fernández-Simón, L., y Cascales, M. (1998): Aging delays the post necrotic restoration of liver functions *Biofactors* **8**, 103-109.

11. Sanz, N.; Díez-Fernández, C.; Álvarez, A. M.; Fernández-Simón, L., y Cascales, M. (1999): Age-related changes on parameters of experimentally-induced liver injury and regeneration. *Toxicol & Appl Pharmacol* **154**, 40, 491.
12. Sanz, N.; Díez-Fernández, C.; Álvarez, A., y Cascales, M. (1997): Age-dependent modifications in rat hepatocyte antioxidant defense systems *J Hepatol* **27**, 525-534.
13. Krupczak-Hollis, K.; Wang, X.; Dennewitz, M. B., Costa, R. H. (2003): Growth hormone stimulates proliferation of old-aged regenerating liver through Forkhead Box m1b. *Hepatology* **38**, 1552-1562.
14. Cascales, M.; Álvarez, A.; Gascó, P.; Fernández-Simón, L., *et al.* (1994): Cocaine liver injury in mice elicits specific changes in DNA ploidy and induced programmed cell death of hepatocytes. *Hepatology* **20**, 902-1001.
15. Díez-Fernández, C.; Boscá, L.; Fernández-Simón, L.; Álvarez, A., y Cascales, M. (1993): Relationship between genomic DNA ploidy and parameters of liver damage during necrosis and regeneration induced by thioacetamide. *Hepatology* **18**, 912-918.
16. Sanz, N.; Díez-Fernández, C., y Cascales, M. (2002): Hepatotoxicity and aging: endogenous antioxidant defense system in rat hepatocytes from 2, 6, 12, 18 and 30 month old rats following acute thioacetamide intoxication *Biochim Biophys Acta* **1587**, 12-20.
17. Cressman, D. E.; Greenbaum, L. E.; DeAngelis, R. A.; Ciliberto, G.; Furth, E. E.; Poli, V., Taub, R. (1996): Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* **274**, 1379-1383.
18. Mackey, S.; Singh, P., y Darlington, G. J. (2003): Making the liver young again. *Hepatology* **38**, 1349-1352.
19. Taub, R. (1996): Liver regeneration 4: transcriptional control of liver regeneration. *FASEB J* **10**, 413-427.
20. Fausto, N. (2000): Liver regeneration. *J Hepatol* **32**, 19-31.
21. Greenbaum, L. E.; Li, W.; Cressman, D. E.; Peng, Y.; Ciliberto, G.; Poli, V., Taub, R. (1998): CCAAT enhancer-binding protein beta is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy. *J Clin Invest* **102**, 996-1007.
22. Michalopoulos, G. K., DeFrances, M. C. (1997): Liver regeneration. *Science* **276**, 60-66.
23. Su, A. I.; Guidotti, L. G.; Pezacki, J. P.; Chisari, F. V., Schultz, P. G. (2002): Gene expresión during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 11181-11186.

24. Kelley-Loughnane, N.; Sabla, G. E.; Ley-Ebert, C.; Aronow, B. J.; Bezerra, J. A.: Independent and overlapping transcriptional activation during liver development and regeneration in mice. *Hepatology* **35**, 525-534.
25. Korver, W.; Roose, J.; Clevers, H. (1997): The winged-helix transcription factor Trident is expressed in cycling cells. *Nucleic Acids Res* **25**, 1715-1719.
26. Ly, D. H.; Lockhart, D. J.; Lerner, R. A., y Schultz, P. G. (2000): Mitotic misregulation and human aging. *Science* **287**, 2486-2492.
27. Ledda-Columbano, G. M.; Pibiri, M.; Cossu, C.; Molotzu, F.; Locker, J., y Columbano, A. (2004): Aging does not reduce the hepatocyte proliferative response of mice to the primary mitogen TCPOBOP. *Hepatology* **40**, 981-988.
28. Wang, X.; Kiyokawa, H.; Dennewitz, M., Costa, R. (2002): The Forkhead Box m1b transcription factor is essential for hepatocyte DNA replication and mitosis during mouse liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 16881-16886.
29. Costa, R. H. (2005): FoxM1 dances with mitosis. *Nature Cell Biol* **7**, 108-110.
30. Wang, X.; Krupczak-Hollis, K.; Tan, Y.; Dennewitz, M.; Adami, G. R.; Costa, R. H. (2002): Increased Forkhead Box M1B (FoxM1B) levels in old-aged mice stimulated liver regeneration through diminished p27Kip1 protein levels and increased Cdc25B expression. *J Biol Chem* **277**, 44310-44316.
31. Wang, X.; Quail, E.; Hung, N. J.; Tan, Y.; Ye, H., Costa, R. H. (2001): Increased levels of forkhead box M1B transcription factor in transgenic mouse hepatocytes prevent age-related proliferation defects in regenerating liver. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 11468-11473.
32. Nelsen, C. J.; Rickheim, D. G.; Timchenko, N. A.; Stanley, M. W.; Albrecht, J. H. (2001): Transient expression of cyclin D1 is sufficient to promote hepatocyte replication and liver growth in vivo. *Cancer Res* **61**, 8564-8568.
33. Nelsen, C. J.; Hansen, L. K.; Rickheim, D. G.; Chen, C.; Stanley, M. W.; Krek, W., Albrecht, J. H. (2001): Induction of hepatocyte proliferation and liver hyperplasia by the targeted expression of cyclin E and skp2. *Oncogene* **20**, 1825-1831.
34. Leung, T. W.; Lin, S. S.; Tsang, A. C.; Tong, C. S.; Ching, J. C.; Leung, W. Y.; Gimlich, R., *et al.* (2001): Over-expression of FoxM1 stimulates cyclin B1 expression. *FEBS Lett* **507**, 59-66.
35. Laoukili, L.; Kooiska, M. R. H.; Bras, A.; Kauw, J.; Ker, R. M.; Morrison, R.; Clevers, H., Medema, R. H. (2005): FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. *Nature Cell Biol* **7**, 126-136.
36. Moolten, F. L.; Oakman, N. J., Bucher, N. L. (1970): Accelerated response of hepatic DNA synthesis to partial hepatectomy in rats pretreated with growth hormone or surgical stress. *Cancer Res* **30**, 2353-2357.

37. Wang, G.-L.; Shi, X.; Salisbury, E.; Sun, Y., *et al.* (2007): Growth Hormone Corrects Proliferation and Transcription of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in Livers of Old Mice via Elimination of CCAAT/Enhancer-binding Protein α -Brm Complex. *J Biol Chem* **282**, 1468-1478.
38. Columbano, A., Ledda-Columbano, G. M. (2003): Mitogenesis by ligands of nuclear receptors: an attractive model for the study of the molecular mechanisms implicated in liver growth. *Cell Death Differ*, **10 Suppl 1**: S19-S21.
39. Harman, S. M., Blackman, M. R. (2003): The effects of growth hormone and sex steroid on lean body mass, fat mass, muscle strength, cardiovascular endurance and adverse events in healthy elderly women and men. *Horm Res* **60**, 121-124.
40. Bartke, A. (2003): Is growth hormone deficiency a beneficial adaptation to aging? Evidence from experimental animals. *Trends Endocrinol Metab* **14**, 340-344.
41. Blackman, M.; Sorkin, J.; Munzer, T.; Bellantoni, M. *et al.* (2002): Growth hormone and sex steroid administration in healthy aged women and men: a randomized controlled trial. *JAMA* **288**, 2282-2292.
42. Laoukili, J.; Stahl, M., y Medema, R. H. (2007): FoxM1: at the crossroad of ageing and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1775**, 92-102.
43. Convoy, I. M.; Conboy, M. J.; Wagers, A. J.; Girma, E. R.; Weissman, U. L., y Rando, T. A. (2005): Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment *Nature* **433**, 760-764.
44. Timchenko, N. A., *et al.* (1998): Regenerating livers of old rats contain high levels of C/EBP α that correlate with altered expression of cell cycle associated proteins. *Nucleic Acids Res* **26**, 3293-3299.
45. Sigal, S. H.; Brill, S.; Fiorino, A. S., y Reid, L. M. (1992): The liver as a stem cell and lineage system. *Am J Physiol* **263**, G139-G148.
46. Iakova, P.; Awad, S. S., y Timchenko, N. A. (2003): Aging reduces proliferative capacities of liver by switching pathways of C/EBP α growth arrest. *Cell* **113**, 495-506.
47. Hekimi, S., y Guarente, L. (2003): Genetics and the specificity of the aging process. *Science* **299**, 1351-1354.
48. Finerty, J. (1952): Parabiosis in physiological studies. *Physiol Rev* **32**, 277-302.
49. Tauchi, H., y Hasegawa, K. (1977): Change of the hepatic cells in parabiosis between old and young rats *Mech Ageing Dev* **6**, 333-339.