

Señales que regulan la expresión de genes en la regeneración hepática

MARÍA CASCALES ANGOSTO

RESUMEN

La regeneración hepática es un proceso en el que el hígado recupera su masa y función perdidas por resección quirúrgica, infección vírica o intoxicación. Después de la hepatectomía parcial del 70%, se desencadena la proliferación hepatocelular asociada con cascadas de señalización que implican citoquinas, factores de crecimiento, remodelación de la matriz y varios mecanismos de activación e inhibición de señales relacionadas con el crecimiento. Las citoquinas activan vías señalizadoras mediadas por receptor, que inducen la expresión de genes y la síntesis de proteínas necesarias para la proliferación hepatocelular. Gran número de genes se encuentran implicados en este proceso, pero los circuitos esenciales incluyen citoquinas, factores de crecimiento y metabolitos, existiendo mucha redundancia e interacciones entre ellos. El sistema inmune innato juega un papel importante en la iniciación de la regeneración hepática habiéndose identificado nuevos mecanismos cuya misión es hacer «competentes» a los hepatocitos para responder a los factores de crecimiento y entrar en el ciclo celular. La regeneración hepática se encuentra directamente implicada en situaciones clínicas tales como la resección de tumores, el trasplante de hígado de pequeño tamaño o la recuperación de fallo hepático fulminante.

ABSTRACT

Liver regeneration is a process in which the liver recovers its lost mass and function following hepatectomy, virus infection or intoxication. After 70% partial hepatectomy, hepatocellular proliferation is associated with sig-

naling cascades involving cytokines, growth factors, matrix remodeling, and several mechanisms of stimulation and inhibition of growth related signals. In response to cytokine stimuli, receptor-mediated signaling systems are activated, and many proteins are transcriptionally up-regulated to trigger liver cell proliferation. A large number of genes are involved in this process, but the essential circuit required include cytokines, growth factors and metabolites. There is much redundancy within each network, and intricate interactions exist between them. The innate immune system plays an important role in the initiation of liver regeneration after partial hepatectomy, and new mechanisms that participate in the «priming», of hepatocytes have been identified. Primed hepatocytes readily respond to growth factors and enter the cell cycle. Liver regeneration has significant implications for a variety of clinical situations, including surgical removal of a portion of the liver, such as that which occurs following tumor resection, liver transplantation and for recovery from fulminant liver failure.

INTRODUCCIÓN

La importancia del hígado en el organismo radica en su papel esencial en el mantenimiento de la homeostasis metabólica. La amplia variedad de funciones realizadas por el hígado han sido preservadas a lo largo de la evolución al proporcionar a este órgano una extraordinaria capacidad regeneradora en respuesta a la pérdida de su propia masa, sin que con ello resulte afectada la viabilidad del organismo. Un medio para vislumbrar los mecanismos implicados en la regeneración hepática es caracterizar las moléculas críticas que regulan este proceso, y para ello, se cuenta hoy en día con un sinnúmero de estudios encaminados a conocer los genes que 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 ante la pérdida de una parte de ellas mismas, por hepatectomía parcial o lesión hepatocelular, las células que permanecen, experimentan un cambio rápido hacia el estado proliferativo en respuesta a determinadas señales, que se transmiten al núcleo en las etapas iniciales de la regeneración hepática, y activan una serie de genes de respuesta al crecimiento. Recientes estudios han demostrado que el número de genes implicados en este proceso se cifra en más de 100. 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 resección quirúrgica o la lesión hepatocelular. El curso temporal de esta ex-

presión define la conexión que existe entre proliferación y cese del crecimiento, e indica que se han transmitido adecuadamente las señales reguladoras de la proliferación hepatocelular en el hígado remanente [1-4]

MODELOS EXPERIMENTALES DE REGENERACIÓN HEPÁTICA

El modelo experimental que muestra con más claridad el fenómeno de la regeneración hepática es la hepatectomía parcial en hígado en rata, que fue descrito por Higgins y Anderson en 1931 [5]. En este modelo, dos tercios del hígado se eliminan por cirugía y el hígado remanente crece hasta que se restaura la masa hepática original. Esta resección reduce la masa hepática al extirpar dos de los segmentos hepáticos, con lo cual los segmentos que permanecen se encuentran sometidos a un mayor flujo y presión de sangre portal. La hepatectomía parcial no va acompañada de lesión hepatocelular y es por tanto el modelo preferido para estudiar *in vivo* la respuesta regenerativa. En este modelo se separan, mediante ligadura, los lóbulos izquierdo y medio y posteriormente se escinden, lo que permite la eliminación del 70% de la masa hepática sin producir lesión aparente. Los lóbulos remanentes sufren una hiperplasia compensatoria que aumenta la masa hepática hasta alcanzar la del hígado original. Lo mismo ocurre en humanos después de hepatectomía parcial, de resección de tumores o de recibir por trasplante un injerto pequeño.

En otro modelo de regeneración hepática, muy utilizado en investigaciones farmacológicas, la pérdida de células hepáticas se debe a la administración de fármacos hepatotóxicos necrogénicos (paracetamol, CCl_4 , tioacetamida, etc). En este caso la pérdida hepática se induce por necrosis hepatocelular desencadenada en el proceso de la biotransformación del fármaco. La necrosis va unida a una reacción inflamatoria, que precede a la respuesta regenerativa, en la que juegan un papel importante los fagocitos residentes (células de Kupffer) y los circulantes (neutrófilos), que se activan en respuesta a la lesión, para eliminar los residuos celulares producto de la necrosis [6].

Otro modelo estudiado más recientemente, que presenta gran interés por su aplicación a la clínica, es el que se origina por embolización o ligadura de la vena porta, lo que permite eliminar el riego sanguíneo portal en la porción del hígado que se va a extirpar, proporcionando mayor flujo hemodinámico a la porción restante, con la consiguiente inducción de la proliferación hepatocelular. Este modelo tiene su aplicación en caso de cirrosis, tumores y también en trasplantes de hígado de pequeño tamaño [7, 8].

INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES

En el proceso de la regeneración hepática se pueden distinguir dos clases de genes: los que regulan el crecimiento elevando su expresión durante la fase proliferativa y retornan a su expresión normal a los 3 días, y los que regulan el ciclo celular mostrando un máximo a las 24 h, que coincide con la primera ronda de replicación del DNA, seguido de una segunda ronda menos intensa a las 48 h de la hepatectomía [1-4]. No todos estos genes son «genes tempranos inmediatos», un número de ellos se expresa pocas horas después de la inducción de los genes tempranos y son los denominados «genes tempranos retrasados», los cuales se regulan 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. Por último, los cambios en los niveles de ciclinas y sus quinasas, por regulación transcripcional y postranscripcional, permite la transición G1 (ciclina D, CDK4 y 6), hasta S (ciclina E, CDK2), y las últimas fases del ciclo celular, G2/M (ciclinas A, B). Los complejos ciclina D/CDK4 y 6 están implicados en 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].

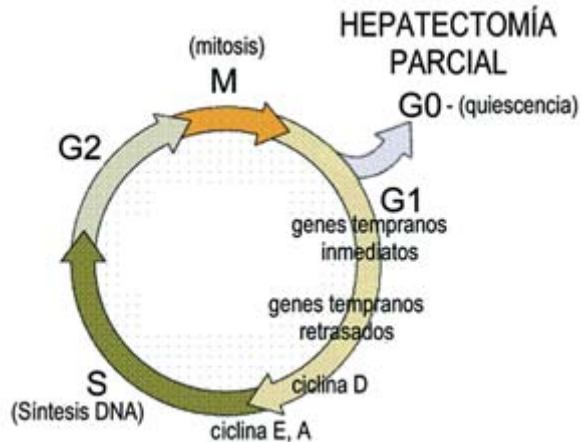


FIGURA 1. Ciclo celular de las células hepáticas después de la hepatectomía parcial. Las células normales quiescentes en G0, sufren una rápida transición a G1 que va acompañada por la transcripción de genes tempranos inmediatos de respuesta al crecimiento, seguida por la de los genes tempranos retrasados y por las ciclinas. A continuación las células sufren la replicación del DNA en la fase S y posteriormente la transición G2/M, que implica la entrada en mitosis.

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

CAMBIOS HEMODINÁMICOS DERIVADOS DE LA HEPATECTOMÍA PARCIAL

La hepatectomía de los 2/3 del hígado, elimina quirúrgicamente dos lóbulos hepáticos sin lesión aparente de los residuales, lo cual origina grandes cambios en el flujo de sangre que atraviesa el hígado remanente, que son de enorme importancia e inducen un espectro de acontecimientos. El suministro de sangre arterial por unidad de tejido hepático no cambia, pero el flujo portal se eleva tres veces. La vena porta mantiene el flujo completo de sangre, procedente del intestino, bazo y páncreas, que atraviesa los sinusoides, cuya capacidad, por efecto de la hepatectomía, ha descendido a un tercio de la original. Los sinusoides están tapizados por células endoteliales fenestradas que proporcionan acceso directo del plasma a los hepatocitos. Un reciente estudio, en un modelo de *shunt* porto-hepático, demuestra que si estos cambios hemodinámicos se previenen, la activación del HGF es deficiente y se produce apoptosis en los hepatocitos [9].

Otro aspecto importante es el impacto de la presión parcial de oxígeno en el flujo sanguíneo hepático después de la hepatectomía parcial. La sangre portal posee menor concentración de oxígeno que la arterial, así que el incremento relativo en la presión portal ocasiona una disminución en la presión de oxígeno en la sangre circulante, lo cual va a desencadenar una respuesta hipóxica. La hipoxia en el hígado se regula mediante vías diferentes de las clásicas, ya que el HIF1 α (factor inducible por hipoxia alfa), no aparece en el núcleo de los hepatocitos, pero se ha detectado en peroxisomas y mitocondria [10]. El aumento en el flujo de sangre portal trae consigo también mayor disponibilidad de factores de crecimiento y citoquinas procedentes del intestino y páncreas, entre los que se incluyen; insulina, EGF, endotoxina y nutrientes derivados de los alimentos (aminoácidos, lípidos y carbohidratos).

Los cambios hemodinámicos debidos a la hepatectomía parcial influyen sobre la expresión de los genes tempranos inmediatos, entre ellos el

que codifica el inhibidor del activador del plasminógeno (*PAI-1*) [11]. Cuando hepatocitos en cultivo se expusieron a estas fuerzas hemodinámicas, la concentración del PAI-1 mRNA se elevó de manera significativa a las 3 h de la exposición y gradualmente decreció. El análisis del promotor de 2.1-kb del 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*. También se ha revelado que la expresión de otros genes tempranos inmediatos, tales como el factor de respuesta temprana el crecimiento 1 (*Egr-1*), y la fosfatasa del hígado regenerante-1 (*PRL-1*), se inducen en lóbulos hiperperfundidos durante las primeras horas de la hepatectomía parcial. Estos datos muestran que los hepatocitos son sensibles al mayor flujo sanguíneo y que su función y expresión génica no está solo regulada por mediadores químicos (citoquinas, factores de crecimiento y hormonas) [11]. Por tanto, aunque es importante el papel de una serie de citoquinas y factores de crecimiento en el desarrollo de los eventos que ponen en marcha la regeneración hepática, la «preparación» de los hepatocitos, anterior a la acción de las citoquinas y factores de crecimiento, es necesaria para la iniciación del proceso. El mayor flujo sanguíneo ha de estar involucrado en el mecanismo que hace «competentes» a los hepatocitos para responder al efecto mitogénico de los factores de crecimiento e ingresar en el estado proliferativo. Las células endoteliales que tapizan los sinusoides, son las primeras en percibir estos cambios hemodinámicos, y aunque no tienen la típica lámina basal, poseen fenestras que permiten el paso de quilomicrones, lipoproteínas, hormonas, factores de crecimiento y proteasas. El tamaño de las fenestras se altera después de la hepatectomía, detectándose de inmediato fusiones entre ellas y huecos en las áreas periportal y perivenosa. Los hepatocitos al encontrarse expuestos a los espacios Disse, están en contacto con el flujo sanguíneo portal sinusoidal, a través de las fenestras de las células endoteliales (Figura 2) [12].

Braet *et al.*, [13] han evaluado los cambios en el flujo portal inmediatamente después de la hepatectomía, que pueden observarse en la gráfica de la Figura 3. En las células endoteliales sometidas *in vitro* a las fuerzas hemodinámicas antes mencionadas, se han detectado elevaciones significativas en la concentración de VEGFR-1, VEGFR-2 y neuropilina-1 mRNA [14]. En estas condiciones ambos receptores alternan su orientación, desde la región perinuclear a la citoplasmática, para adherirse a componentes del citoesqueleto y a la membrana celular. Estos cambios coinciden con el comportamiento de las proteínas de adherencia VE-cadherina y β -catenina.

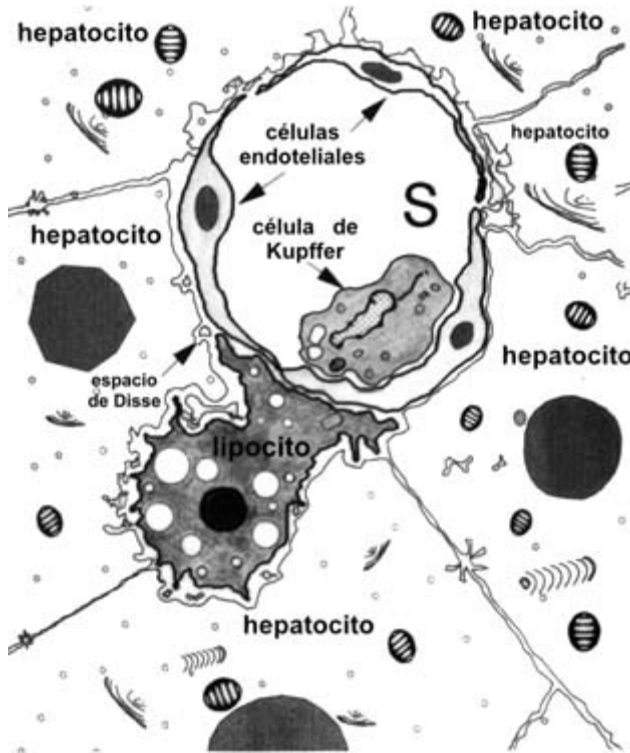


FIGURA 2. Modelo de sinusoide hepático (S) en hígado normal, donde se observan las células endoteliales tapizando el sinusoide, una célula de Kupffer en el sinusoide, un lipocito en el espacio de Disse y los hepatocitos en íntimo contacto con el espacio de Disse [12].

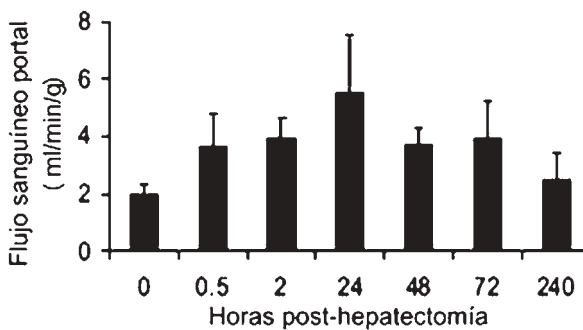


FIGURA 3. Flujo de sangre portal en hígado de ratas normales (0 horas) y parcialmente hepatectomizadas (70%). A tiempos determinados, después de la hepatectomía, las ratas se anestesiaron y sometieron a temperatura controlada. Después de la traqueotomía e infusión salina un sensor de ultrasonido se conectó a la vena porta. El flujo de sangre se evaluó por medida ultrasónica del flujo. Los resultados representan una media de 5 ratas \pm SD (Braet et al, 2004 [13])

OXIDO NÍTRICO (NO)

Las fuerzas hemodinámicas, por tanto, constituyen el primer evento que precede a la expresión de factores, alguno de los cuales aparecen a los varios minutos. Así, la inducción de la síntesis de NO, por acción de la óxido nítrico sintasa (NOS), conlleva la expresión de genes que participan en la regeneración hepática, incluyendo el *c-fos*, cuya elevación después de la hepatectomía, se inhibe por N-nitro-L-arginina metil éster, que bloquea la actividad NOS [15]. Las acciones biológicas del NO, oscilan entre la transducción de señales y la citotoxicidad. Existen dos isoformas de NOS en hígado, la constitutiva endotelial (cNOS), y la inducible (iNOS) [16]. Aunque ambas generan NO, la cNOS lo hace rápidamente después de un estímulo y tiene vida media corta. Sin embargo la iNOS requiere la inducción de la expresión génica y la síntesis de la proteína enzimática, y da como resultado una prolongada y sostenida producción de NO. Las especies activas de oxígeno y las de nitrógeno, junto con algunas citoquinas producidas en los procesos inflamatorios, son buenos promotores de la iNOS. En la proliferación hepatocelular las isoformas cNOS e iNOS juegan un papel crítico en la regeneración hepática inducida por hepatectomía parcial. La activación de la cNOS en las células endoteliales hepáticas ocurre por unión del ligando con el receptor (activación del receptor colinérgico) o por cambios en las fuerzas hemodinámicas sobre los vasos sanguíneos [15]. Si el cambio en la cNOS por efecto de la unión ligando/receptor puede ser importante en el mantenimiento del tono vascular en hígado normal, el cambio producido por la presión hemodinámica inducida por la hepatectomía sobre las células endoteliales, es un factor crítico en el proceso regenerativo [16]. La presión ejercida por el flujo portal sinusoidal sobre las células endoteliales es un potente estímulo para la NOS y la liberación de NO. El compromiso de dicho mecanismo conlleva un incremento de la resistencia vascular en respuesta a la elevada presión sanguínea. Shoen *et al.*, (15) han emitido la siguiente hipótesis: después de la hepatectomía parcial el incremento en las fuerzas mecánicas debido al mayor flujo de sangre, induce la liberación de NO, el cual, a su vez, pone en marcha la compleja cascada de reacciones que conduce a la regeneración hepática. El temprano incremento en la actividad cNOS y la liberación de NO es esencial para desencadenar posteriores eventos y vías señalizadoras requeridas para que las células hepáticas entren en la fase G1 y comience la proliferación hepatocelular [17]. El incremento de la actividad iNOS, más tardío y dependiente de citoquinas, coincide con la inducción, por IL-6, de los factores de transcripción [18]. Una combinación de TNF α e IL-6 se requiere para actividad de la iNOS, la cual es en sí misma requerida para la regeneración [19].

Se ha demostrado también la participación de la iNOS en la regeneración hepática post necrótica inducida por hepatotóxicos. Investigaciones de nuestro grupo han observado que el NO interviene en los mecanismos implicados en el inicio de la regeneración post necrótica inducida por tioacetamida [20]. La actividad y el mRNA iNOS se elevaron a las 48-96 h de la intoxicación, coincidiendo con el punto máximo de regeneración. Esto indica que la actividad iNOS se eleva paralelamente a la proliferación hepatocelular y que el NO se libera por los hepatocitos o por las células de Kupffer aisladas de hígado en regeneración y cultivadas independientemente. Ambas, actividad y mRNA iNOS se detectaron en el hígado regenerante postnecrótico indicando que este es un efecto local. En cualquier caso, el NO difunde a través de las células y el tipo celular donde se genera no afecta su capacidad de promover cambios en las células vecinas. La inhibición selectiva de la iNOS con aminoguanidina, administrada una hora antes de la intoxicación, proporcionó evidencia que este inhibidor aminora la lesión hepatocelular inducida por el hepatotóxico. El efecto beneficioso de la aminoguanidina no se puede atribuir a su acción inhibidora sobre la iNOS, ya que los niveles de mRNA iNOS eran solo detectables en hepatocitos en proliferación, a las 48-96 h de la intoxicación [21], más bien, la aminoguanidina tiene la capacidad de atrapar al peroxinitrito producido al reaccionar el NO con el radical superóxido generado en la biotransformación del hepatotóxico, y de ahí su efecto protector sobre la lesión hepatocelular [22]. Sin embargo, el pretratamiento con aminoguanidina no afectó aparentemente la proliferación hepatocelular, aunque ejerció un efecto apoptogénico que hizo que en las fases últimas de la regeneración aparecieran poblaciones hipodiploides indicativas de apoptosis [21]. En un estudio reciente de trasplante de hígado de reducido tamaño en ratas se ha observado que el NO ejerce un efecto positivo en la regeneración de estos hígados por incrementar el flujo hepático arterial [23]. De todos los datos comentados anteriormente puede deducirse que la generación de NO es un fenómeno que se desencadena en cualquier proceso lesivo de tipo inflamatorio, para incrementar el flujo sanguíneo a través del órgano y la inducción de la expresión de respuestas metabólicas específicas requeridas para la recuperación de la función hepática.

CASCADA DE PROTEASAS Y SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR

La cascada proteolítica, uno de los eventos tempranos en la regeneración hepática, es una respuesta rápida y controlada que permite la liberación coordinada de señales de iniciación y terminación. Esta cascada funciona en paralelo

con la remodelación de la matriz extracelular y el restablecimiento de la estructura tisular. Las serina proteasas y las metaloproteasas (MMP) intervienen en estas cascadas, que requieren mecanismos precisos, en un determinado momento, para la activación de enzimas latentes (proenzimas), y en otro momento, para la inhibición de la forma activa de esas enzimas [24]. Estas dos clases de mecanismos se conectan de manera que son unas serina proteasas específicas las que activan las MMP latentes [25]. La activación de una proteasa se regula espacialmente en el contexto de la arquitectura tisular, ya que a menudo se encuentra anclada en la superficie celular. En la Figura 4 se muestra la conexión entre las proteasas y la señalización celular.

La uroquinasa (uPA) es uno de los iniciadores de la cascada proteolítica de la matriz, que se eleva de inmediato después de la hepatectomía parcial y convierte el plasminógeno en plasmina [26]. La plasmina actúa sobre el pro-MMP liberando MMP que, a su vez, actúa sobre el pro-HGF liberándolo de su secuestro en la matriz (Figura 4). Kim *et al* [27] estudiando la transformación plasminógeno en plasmina en la regeneración hepática, por análisis Western blot, han detectado un pequeño incremento a los 15 min, seguido por una gran elevación a las 3 - 6 h. Además, el fibrinógeno, el sustrato principal de la plasmina, inicia su degradación a los 15-30 min, detectándose menor distribución en la región periportal. Estos datos demuestran que la reorganización de los componentes de la matriz extracelular, juega un importante papel en las etapas iniciales de la regeneración.

Para progresar a través del ciclo celular es necesario superar la transición G1-S, transición estimulada por el HGF vía señalización mediante su receptor cMET [28]. El HGF es un potente mitógeno que induce la expresión de los genes tempranos durante la regeneración hepática. Después de la hepatectomía parcial, los niveles plasmáticos de HGF se elevan de inmediato (1 h), pero su mRNA no se sintetiza hasta las 3-6 h, lo que demuestra la existencia de un mecanismo alternativo que es el que proporciona su temprano incremento plasmático. El HGF se encuentra anclado en la matriz extracelular hepática como pro-HGF, consistente en una sola cadena polipeptídica. Para pasar a HGF activo, el pro-HGF ha de ser liberado de la matriz por proteólisis y activado por rotura proteolítica en dos cadenas peptídicas [28-30]. Así, el pro-HGF unido a la matriz extracelular, es un reservorio de HGF, que se libera en el momento de la remodelación de la matriz.

Por tanto, las serina proteasas y las MMP, cuya transcripción se induce durante la regeneración hepática, al degradar la matriz, liberan citoquinas y factores de crecimiento que se encuentran allí secuestrados y requieren ser procesados para

su actividad, y desencadenan las señales iniciales, proporcionando una interfase entre la cascada proteolítica y la señalización intracelular [30]. Al considerar las funciones de las MMP sobre los factores de crecimiento, se deduce que la proteólisis pericelular participa en la regulación de la proliferación de los hepatocitos. Se ha descrito que el TIMP1, el inhibidor tisular de las MMP, es esencial para la regeneración hepática porque proporciona un punto de control durante este proceso [31]. Las alteraciones genéticas de TIMP1 ejercen un impacto directo sobre la progresión de los hepatocitos en el ciclo celular, alterando la activación del HGF y su intervención en la señalización, y actuando como regulador negativo del HGF durante la regeneración hepática. Se ha demostrado que, de los cuatro TIMP conocidos, tres se inducen transcripcionalmente. TIMP3 lo hace a las 6 h, coincidiendo con la disminución de los niveles 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 h). 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.

MODIFICACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN POR PROTEASAS EXTRACELULARES

Las serina proteasas y las MMP poseen sus inhibidores específicos endógenos. Los animales deficientes en las serina proteasas activadoras del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) y en las de tipo tisular (tPA), exhiben un retraso en la regeneración hepática, mientras que los animales deficientes en el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI) muestran una regeneración acelerada después de la hepatectomía parcial, lo que demuestra el importante papel que juega el sistema activador del plasminógeno. Estudios con ratones deficientes en inhibidores tisulares de las MMP, los TIMP-1 o -3, apuntan también una función de las MMP en este proceso [25].

Un amplio repertorio de proteínas transmembrana se libera por proteólisis desde la superficie celular, por rotura del ectodominio. La rotura proteolítica funciona en señales de activación o de inactivación, bien directamente o mediante modificación de las proteínas de enlace. La liberación de factores unidos a la matriz extracelular o de factores unidos a membrana, puede extender sus efectos desde niveles locales hasta sistémicos. La liberación de los receptores de la superficie celular proporciona un medio de impedir la señalización celular. Así que, el procesamiento proteolítico, es un mecanismo inmediato que modifica las señales preexistentes sin necesidad de recurrir a síntesis *de novo*.

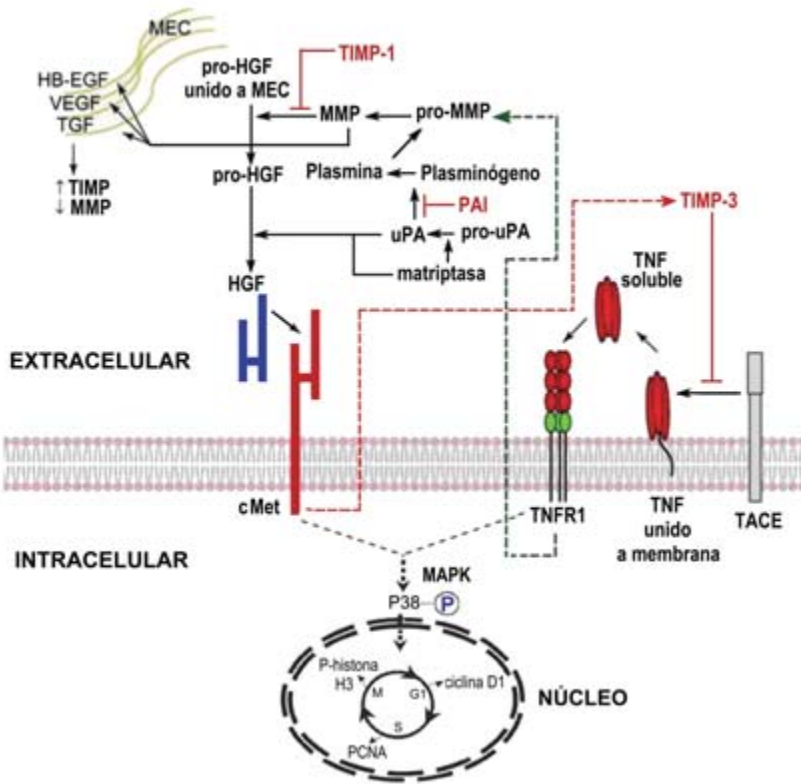


FIGURA 4. Interfase pericelular de las cascadas proteolíticas e inducción de señales intracelulares. Las serina proteasas activan a las metaloproteasas (MMP) causantes de la degradación de la matriz extracelular y la liberación y activación de factores de crecimiento y citoquinas en el microambiente celular. La proteólisis se inhibe por PAI, TIMP-1 y TIMP-3. Los factores de crecimiento y las citoquinas implicadas en la síntesis del DNA de los hepatocitos inducen o inhiben a TIMP y a 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, modificado). [25]

Ejemplos los tenemos en el $TNF\alpha$, heterotrímico unido a membrana que se separa de la superficie celular por la acción proteolítica de TACE (enzima convertidor del $TNF\alpha$) (Figura 4) [25]. TIMP-3 es el inhibidor fisiológico de TACE, y su deficiencia origina una elevada concentración de $TNF\alpha$ hepático. Cuando se eleva el $TNF\alpha$, se acelera la progresión del ciclo celular en los hepatocitos después de la hepatectomía, pero esto puede conllevar también a apoptosis, ne-

crossis y fallo hepático [32]. El papel del TACE en la regeneración hepática no se ha podido estudiar directamente, ya que los ratones *TACE*^{-/-} exhiben letalidad perinatal. Así que, la liberación del TNF α mediada por TACE es importante para la iniciación de los hepatocitos, pero igualmente importante es la inhibición de este enzima. TACE libera también de la superficie celular los receptores TNFR1, TNFR2, los cuales en su forma soluble, retienen la capacidad de unirse al TNF α y pueden alterar la señalización al secuestrar al TNF α e impedir su unión a los receptores de membrana. Así pues, los TNFR solubles ejercen un papel regulador negativo en la regeneración hepática.

Ya se comentó anteriormente que la concentración plasmática del HGF, se eleva 1 h después de la hepatectomía parcial en ratas, por liberación del pro-HGF y posterior proteólisis que lo convierte en la forma de dos cadenas, el HGF activo [29]. Los ratones *uPA*^{-/-} muestran un retraso en la activación del pro-HGF, mientras que los *uPAR*^{-/-} no muestran esas alteraciones, lo que indica que el efecto de uPA es independiente de la señalización y está asociado a su actividad proteasa 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 [33].

La rotura proteolítica puede contribuir a las dos vías siguientes: la liberación del pro-HGF de la matriz extracelular por las MMP, y la maduración del HGF por varias serina proteasas. El receptor de HGF, cMET, se libera también de la superficie celular por acción de una MMP sensible a TIMP-3 [36]. La activación tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR, directamente por el EGF o indirectamente vía el agonista del receptor acoplado a proteínas G (GPCR), induce la rotura de cMET, mediante la activación de la cascada señalizadora ERK MAPK [34].

Los EGF y TGF α , ambos de la superfamilia EGF, señalizan a través de la familia de receptores EGF, EGFR. Una forma de EGF contiene una secuencia N-terminal conductora que confiere unión a la heparina (HBEGF) y se sintetiza como pro-HBEGF que requiere maduración proteolítica [35]. HBEGF se induce a las 10 h de la hepatectomía parcial, con un incremento paralelo en la fosforilación de la tirosina del EGFR. El EGF hepático juega un papel mitogénico en la regeneración, al estar disponible de inmediato para los hepatocitos. La sobreexpresión transgénica de HBEGF acelera la división de los hepatocitos después de la hepatectomía parcial.

También el TGF α se sintetiza en forma de precursor unido a membrana, que se desprende de la superficie celular por proteólisis [36], y su mRNA se eleva inmediatamente después de la hepatectomía. El papel del TGF α en la re-

generación hepática es más difícil de discernir ya que los ratones *TGF^{-/-}* no presentan regeneración hepática alterada, como otros miembros de la superfamilia EGF. Ratones transgénicos que sobreexpresan HBEGF y TGF α presentan un agrandamiento hepático y mayor proliferación basal de los hepatocitos. TACE/ADAM17 es la proteasa primaria que produce la rotura proteolítica 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^{-/-}* [37]. TACE se considera crucial para la liberación del pro-TGF α , aunque otras MMP también actúan en ausencia de TACE. El precursor pro-HBEGF es también sustrato de ADAM17, ADAM9, ADAM12, MMP-7 y MMP-3 [42].

Después de la división celular, los hepatocitos se encuentran agrupados sin acceso a los sinusoides. 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 los sinusoides donde se han de alinear las placas de hepatocitos. El VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial) se encuentra implicado en este proceso, y su concentración se eleva y llega a su punto máximo a las 48 h de la hepatectomía parcial. [39]. La activación del receptor-1 del VEGF induce la secreción de HGF por las células endoteliales sinusoidales, y la proliferación de los hepatocitos [40]. El VEGF existe en varias isoformas, algunas de ellas contienen dominios que se unen a la heparina y a proteoglicanos heparan sulfato, localizados en la superficie celular o en la matriz extracelular [41]. La inmovilización del VEGF en la matriz 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 [42]. La MMP-9, una de las inducidas durante la regeneración, y la plasmina modifican la liberación del VEGF [25].

El FGF-1 (factor de crecimiento de los fibroblastos) pertenece a otra familia de moléculas proangiogénicas potentes, que señala mediante un grupo de receptores tirosina quinasa FGFR1-FGFR4. El FGF-1 es un mitógeno poderoso que se induce inmediatamente después de la hepatectomía parcial. El perlecán es un importante proteoglicano heparan sulfato, que se encuentra en las membranas basales y en la matriz extracelular de todos los tejidos vascularizados, y la unión de los FGF al perlecán limita la difusión y liberación de estos factores para protegerlos de la degradación proteolítica [43]. El perlecán promueve también la activación del receptor del FGF y la mitogénesis [44]. Las MMP-1 y MMP-3 liberan al FGF del perlecán, proporcionando un mecanismo

que controla 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 [45]. Al igual que los TNFR solubles el ectodominio del FGFR soluble modula 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 [46]. Las MMP poseen una capacidad reconocida para degradar IGFBP. Las MMP-3 y MMP-9 pueden romper, de manera específica al IGFBP-1, en un proceso proteolítico que se inhibe por TIMP-1 y TIMP-2 [47].

El factor transformante de crecimiento beta (TGF β), se secreta como un complejo latente de 290 kDa consistente en una molécula de TGF β unida a un péptido asociado a la latencia (LAP), y la proteína LTBP1 se une, a su vez, covalente a LAP [48]. El complejo LTBP-LAP vuelve inactivo al TGF β , previniendo su capacidad señalizadora manteniéndolo unido a la matriz extracelular (Figura 5). Varias proteasas son capaces de activar al TGF β latente, incluyendo la plasmina, la elastasa de leucocitos, las MMP-2, MMP-9 y la MT1-MMP. El TGF β , interacciona también con un proteoglicano pequeño denominado decorina, que inhibe su actividad. Las MMP-2, -3 y -7 pueden liberar al TGF β de la decorina. Este tipo de regulación proteolítica ejerce un impacto significativo en la localización y actividad del TGF β . La producción y actividad elevadas de las MMP durante el proceso regenerativo pueden participar en la remodelación de la matriz extracelular y también coordinar la liberación del TGF β . El 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 [49]. La proteólisis ocurre como proceso intracelular por el enzima convertidor de la IL-1 β (ICE), la caspasa, o como proceso extracelular por proteasas del tipo serina proteasa, tripsina, quimiotripsina, elastasa y las MMP-2, -3 y -9 [50]. La exposición prolongada de la IL-1 β a la MMP-3 degrada esta citoquina. La familia de receptores IL-1 también sufre rotura proteolítica y los IL-1R solubles presentan efectos agonistas y antagonistas sobre la actividad IL-1. Por tanto, las dos citoquinas identificadas, que intervienen en la finalización del crecimiento, TGF β e IL-1 β , están sujetas a regulación por proteólisis que modula su actividad.

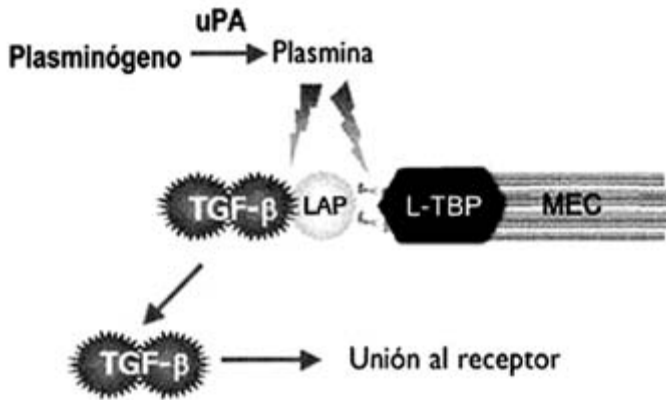


FIGURA 5. Estructura y activación del TGFβ. El TGFβ, se sintetiza como molécula inactiva unida a LAP, anclada a la matriz extracelular mediante una proteína LTBP1. Para liberarse como TGFβ activo que se une a su receptor, tiene que sufrir proteólisis por la plasmina. uPA, uroquinasa activadora del plasminógeno; LAP, péptido asociado a la latencia; LTBP1, péptido asociado al TGFβ latente; MEC, matriz extracelular.

FACTORES CIRCULANTES EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

En 1967 Molten y Bucher [51] vislumbraron que unos factores circulantes presentes en suero de ratas hepatectomizadas, podían inducir la replicación de los hepatocitos en animales normales, y experimentos posteriores identificaron varios factores de crecimiento, tales como HGF, TGFα y el factor antiproliferativo TGFβ. Más tarde, estudios moleculares sobre las cascadas de expresión génica en hígado regenerante, pusieron de manifiesto los mecanismos que se activan en el hígado remanente después de la hepatectomía parcial. Se han identificado más de 100 genes tempranos inmediatos activados por factores de transcripción. Estos factores, normalmente en estado latente, cuando se activan inducen la expresión de genes implicados en la transición G0/G1. 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 [52].

Los factores humorales secretados y los solubles, implicados en la respuesta a la hepatectomía parcial, se han clasificado en cinco categorías basadas en el modelo propuesto por Fausto *et al.*, [53]: (1) *Factores iniciadores*, que hacen competentes a los hepatocitos para responder a los factores de crecimiento, y promueven la transición G→G1; pertenecen a este grupo las citoquinas TNFα e IL-6, ambas se generan en respuesta al LPS (lipopolisacárido) derivado de las

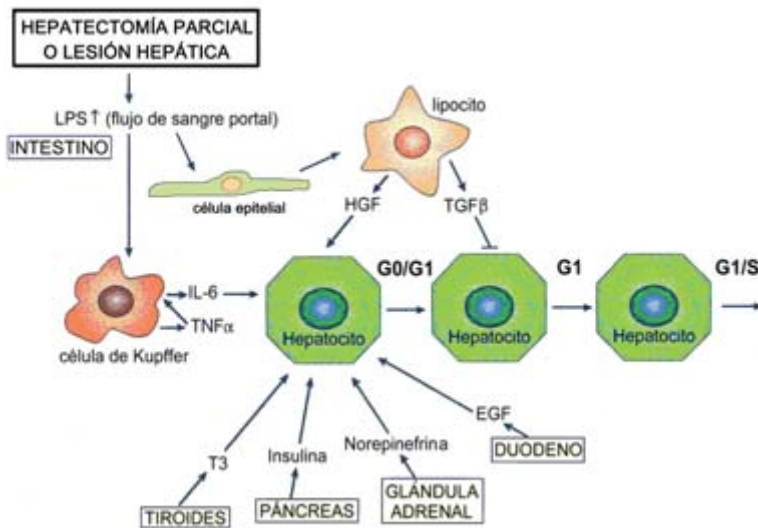


FIGURA 6. La hepatectomía parcial o lesión hepatocelular desencadena una serie de señales en el hígado. Factores derivados del intestino (LPS) alcanzan el hígado a través de la sangre portal y activan las células epiteliales y las de Kupffer. Esas últimas elevan la producción de $TNF\alpha$ e IL-6. Otros factores se liberan del páncreas (insulina), duodeno (EGF), glándula adrenal (norepinefrina), glándula tiroides (T3) y lipocitos activados por las células epiteliales (HGF). Estos factores permiten a los hepatocitos pasar de la fase G0 a la G1 y de la G1 a la fase S, lo que conduce a su proliferación. La señalización a través del $TGF\beta$, procedente de los lipocitos, que inhibe la síntesis del DNA, se bloquea durante la fase proliferativa y su actividad se restaura al final del proceso regenerativo para el retorno al estado quiescente. LPS, lipopolisacárido; IL-6, interleuquina-6; $TNF\alpha$, factor de necrosis tumoral alfa; HGF, factor de crecimiento hepatocítico; T3, triyodotiroxina; $TGF\beta$, factor transformante de crecimiento beta; EGF, factor de crecimiento epidérmico (Taub, 2004 modificado) [52].

bacterias intestinales. (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, $TGF\alpha$ y EGF. (3) *Comitógenos*, que facilitan la acción de los mitógenos, como 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 $TGF\beta$. (5) *Supresores de los inhibidores de crecimiento*, cuya actividad se debe a su elevada afinidad y unión reversible a los inhibidores de crecimiento, incapacitándolos para unirse a sus receptores celulares e impartir sus propiedades; pertenecen a este grupo el inhibidor del $TGF\beta$, el péptido LAP (*latency associated peptide*) y el inhibidor de la activina, la folistatina.

De acuerdo con un programa cronológico inducido por las señales iniciadoras, las vías señalizadoras intracelulares, en las que se encuentran implicadas las 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. Gracias a investigaciones genéticas y farmacológicas [54] 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 6).

CITOQUINAS EN LA INICIACIÓN DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

Lo que distingue a las citoquinas de los factores de crecimiento, es que activan selectivamente señales que pueden no estar ligadas a la mitogénesis [59, 56]. 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 estos mecanismos dependientes de citoquinas (TNF α e IL6) e independientes de citoquinas (HGF, TGF y otros), que son importantes reguladores de la respuesta regenerativa [52, 57]. Una serie de factores de transcripción específicos, NF κ B, STAT3 y AP1 se activan en los hepatocitos remanentes minutos después de la hepatectomía parcial. 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 manipulados genéticamente establecieron que, después de la hepatectomía, la regeneración hepática requiere la intervención de IL-6, pero esta citoquina no es suficiente para la inducción de este proceso [58, 59]. La IL-6 es una citoquina efectora en varios procesos, que está implicada en la hepatoprotección, la respuesta a la fase aguda y la mitogénesis (figura 7).

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 de la familia de las Janus quinasas 1 (JAK1) (Figura 8) [55, 56]. La JAK1 una vez activa, fosforila a gp130 en un residuo tirosina. La estimulación de gp130 activa la cascada señalizadora ERK1/2. Las proteínas STAT, que contienen dominios de homología Src, son también fosforiladas por JAK,

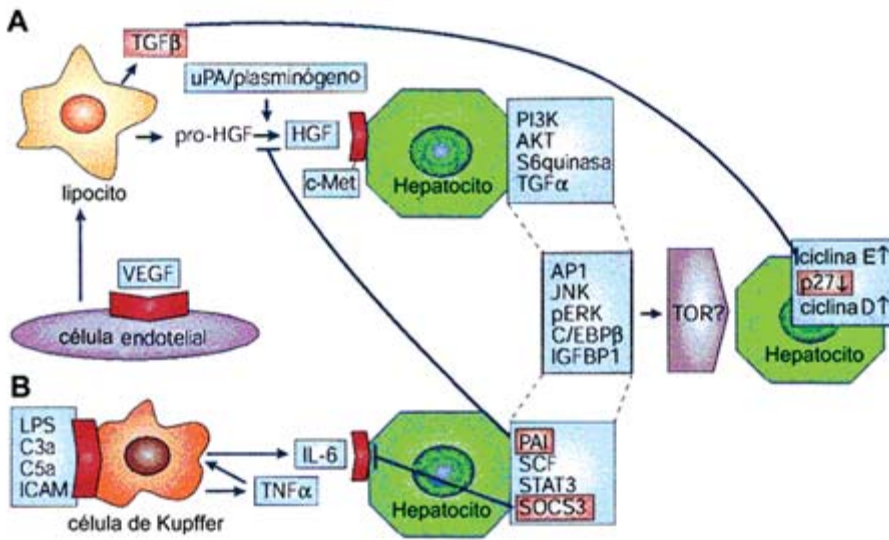


FIGURA 7. Vías que se activan durante la regeneración hepática por citoquinas y factores de crecimiento. A: Factores de crecimiento. VEGF se une a las células endoteliales y promueve la liberación del pro-HGF, desde los lipocitos. La uPA interviene liberando el HGF que se une al receptor *c-Met* en los hepatocitos y activa las quinasas PI3K, AKT y S6. La señalización por el HGF libera $TGF\alpha$ y activa otras señales compartidas con las vías mediadas por las citoquinas, tales como AP1, la quinasa amino terminal Jun (JNK), las quinasas reguladas por señales extracelulares (pERK), la proteína intensificadora de la unión a CCAAT (C/EBP), y la proteína que se une al factor insulínico I (IGFBP1). Estos factores activan el objetivo de la rapamicina (TOR), lo que 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, que producen $TNF\alpha$. Éste, activa la expresión de IL-6 por las mismas células. IL-6 se une a su receptor en los hepatocitos, lo que causa la fosforilación y activación del transductor de señales y activador de la transcripción (STAT3) y la expresión del factor stem-cell (SCF) y de varias proteínas. Se activan proteínas inhibidoras involucradas en la terminación de la regeneración hepática: el $TGF\beta$ (lipocitos), el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI), el supresor de la señalización de citoquinas-3 (SOCS3), p27 y otros inhibidores de las CDK. (Taub 2004 modificado) [52].

y de esta manera adquieren la capacidad de dimerizar y unirse al DNA para activar la expresión de determinados genes, entre los que se incluyen los supresores de la señalización de citoquinas (*Socs*). La misión inhibidora de las proteínas SOCS se basa en bloquear el complejo señalizador, por unión directa al receptor de la citoquina fosforilado en tirosina, o por marcaje del complejo receptor para la degradación proteosómica. Así, el estímulo de la transcripción del gen *Socs* por STAT, establece un mecanismo inhibitorio de la señalización por citoquinas, y hace que SOCS juegue un papel importante en la regulación de las

citoquinas, bien modulando su expresión o inhibiendo las cascadas de señalización. En hígado SOCS3 es un inhibidor crítico de la señalización de IL-6 mediada a través del receptor gp130, ya que ratones deficientes en gp130 no producen STAT3 en respuesta a IL-6. Yang *et al*, han demostrado que IL-6 ejerce un papel crucial en la expresión de *Socs3* durante las respuestas inflamatorias [60]. La inhibición de la vía IL-6-gp130 implica la unión de SOCS3 a la fosfotirosina 759 del receptor gp130 activo. En la regulación de esta vía, SOCS3 ejerce un efecto importante sobre la respuesta a la lesión o inflamación hepáticas. Se ha demostrado que el gen *Socs3* se expresa de manera muy intensa entre las 2 - 8 h después de la hepatectomía parcial, lo cual hace que exista un solapamiento con la expresión de STAT3, y que la expresión de *Socs3* en el hígado en regeneración, sea dependiente de IL-6. En las fases iniciales de la regeneración hepática, parece que SOCS3 interrumpe la respuesta temprana de las citoquinas, quizás para proteger al hígado de los efectos citotóxicos de la prolongada expresión a estas citoquinas. Se ha demostrado que en ausencia de SOCS3 ocurre lo siguiente: (a) la replicación del DNA y la progresión a través del ciclo celular está notablemente elevada después de la hepatectomía parcial, lo que acelera la regeneración hepática; (b) los hepatocitos aislados de ratones deficientes en *Socs3* tienen mayor capacidad de replicación; y (c) los ratones deficientes en *Socs3* desarrollan carcinoma hepatocelular. Esto sugiere que además de su papel en el control de la expresión de las citoquinas en hígado en regeneración, SOCS3 coordina las respuestas de los componentes del sistema inmune innato con los de las vías proliferativas. La coordinación de estos sistemas se requiere para la regulación y sincronización de la proliferación de los hepatocitos durante la regeneración y para la prevención de la tumorigenesis en un ambiente tan proliferativo [61].

La cascada señalizadora MAPK es crucial para la proliferación celular 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. 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 síntesis del DNA en hepatocitos y discretas anormalidades en la fase G1, incluyendo la carencia de activación de STAT3 y alteraciones selectivas en la expresión génica [58]. El defecto se limita a los hepatocitos ya que la síntesis del DNA aparece normal en células no parenquimáticas. También el TNF α se requiere para conseguir una respuesta proliferativa adecuada después de la hepatectomía parcial. Esto se ha demostrado con ratones deficientes para el receptor TNF (TNFR1), ya que esta respuesta está mediada por la capacidad del TNF α de inducir a IL-6, y el tra-

tamiento con esta última corrige el defecto en la síntesis del DNA que presentan los ratones deficientes en TNFR1 antes aludidos. Por razones no explicables, sin embargo, la ausencia de TNF α no perjudica demasiado la regeneración hepática [62]. 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* [63]. 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), componente del sistema inmune innato que se une a su receptor en las células de Kupffer, es importante en el proceso que desencadena la regeneración post-hepatectomía y en otros modelos de lesión hepática (Figura 8) También se ha detectado que C3a y C5a, miembros de la cascada del complemento, interaccionan con sus 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 [64, 65].

La defectuosa regeneración hepática 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 expresan durante la regeneración hepática están regulados por la IL-6. 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 inducidos por hepatectomía parcial, que son los que activan el resto de los genes. El SCF (*stem cell factor*), que se une al receptor tirosina quinasa Kit, es un objetivo de IL-6 y es un factor de crecimiento que procede de la proteólisis de pro-SCF [66]. Aunque el mecanismo mediante el cual IL-6 activa a SCF no está del todo claro, 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 pERK (MAPK) (Figura 8). Los estudios de Taub *et al.*, [52] proporcionaron las primeras evidencias *in vivo* del efecto de STAT3 como promotor de 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.

Aunque en ratones *gp130*^{-/-} se detectó menos impacto sobre la síntesis del DNA posthepatectomía de lo esperado de los fenotipos *IL-6*^{-/-} o *Stat3*^{-/-}, en este modelo de hígado suprimido en gp130, se observaron deficiencias en la expresi-

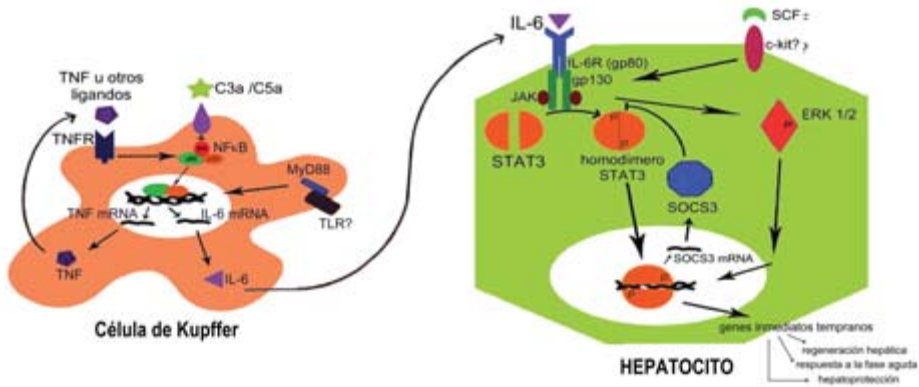


FIGURA 8. Interacciones entre células de Kupffer y hepatocitos en hígado en regeneración. El TNF se une a su receptor (TNFR) en las células de Kupffer, lo que conduce a la activación de NF κ B. C3a, C5a y MyD88 pueden también activar a NF κ B después de la hepatectomía parcial. Los genes *Il-6* y *Tnf* son objetivos de NF κ B. La IL-6 se libera en suero y se une a su receptor, complejo de gp80 y gp130 en los hepatocitos. La activación de gp130 fosforila los monómeros STAT3 por las quinasas asociadas a Janus (JAK). STAT fosforilado, homodimeriza y se traslada al núcleo, donde induce la transcripción de genes entre ellos el que codifica a SOCS3, proteína que inhibe la fosforilación de STAT3. SCF puede también activar a STAT3. La activación de gp130 conduce también a una cascada señalizadora que implica la fosforilación de ERK1/2 y la regulación de la transcripción de genes necesarios para la regeneración. TNF, factor de necrosis tumoral; NF κ B, factor nuclear-kappa B; MyD88, factor mioide 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 con modificaciones) [65].

sión de las ciclinas E y A, que indican la importancia de esta proteína en la progresión normal del ciclo [67]. Otro estudio describe que se requiere la IL-6 para mantener la supervivencia del hígado después de la hepatectomía [68]. 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 hepatectomía parcial [69]. El mantenimiento de grandes concentraciones de IL-6 en un período de 2 semanas, incluso en ausencia de exceso de IL-6R, dio lugar a una proliferación masiva de hepatocitos, lo que demuestra que elevadas concentraciones de IL-6 pueden contrarrestar la deficiencia de otros factores de crecimiento [70]. Sin embargo, Sun *et al.*, [71] han observado que, en determinadas condiciones, el tratamiento con IL-6 inhibió la proliferación de hepatocitos en cultivo. Utilizando cocultivo de hepatocitos con células hepáticas no parenquimáticas, se ha demostrado que la IL-6 inhibe directamente la proliferación

por un mecanismo dependiente de p21^{cip1}, e indirectamente la favorece al estimular las células no parenquimáticas a producir HGF. Todos estos resultados llevan a la conclusión que la IL-6 muestra 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.

ACCIÓN MITOGÉNICA DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO

Está claro que la IL-6 presenta propiedades mitogénicas para los hepatocitos, ya que la estimulación de la proliferación hepática es mínima en ausencia de hepatectomía parcial, a menos que la IL-6 este sobreexpresada [69]. Además de las vías dependientes de citoquinas, varios factores de crecimiento funcionan promoviendo la replicación celular durante la regeneración hepática. Sobre la base de estudios *in vivo* e *in vitro*, el HGF y el TGF α se consideran los mitógenos más poderosos [72, 73]. El HGF se sintetiza *in vivo*, por las células no parenquimáticas, particularmente por los lipocitos, afectando a los hepatocitos de manera paracrina. El pro-HGF, se activa inmediatamente después de la hepatectomía parcial o lesión hepática, por acción de la uPA y su efector el plasminógeno, [74] (Figura 4). El bloqueo de la 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. [75, 76].

El HGF regula varios procesos en el hígado, y es también 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 suprimidos en *HGF* y *c-MET* dan 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. 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 [72]. 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. Al igual que 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. 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 [77]. 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 endoteliales sinusoidales en el hígado y puede causar un incremento en la producción del HGF por células no parenquimáticas (lipocitos). Este crecimiento mediado por VEGF depende de la presencia de células endoteliales, y se bloquea en parte con anticuerpos HGF [39].

INTERRELACIÓN CITOQUINAS Y FACTORES DE CRECIMIENTO

Las vías de señalización celular mediadas por HGF y TNF α /IL-6 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 factores de crecimiento o citoquinas. Existen pocas moléculas transductoras de señales (ERK y JNK), factores de transcripción (AP1 y C/EBP, proteína intensificadora de la unión a CCAAT) y otras, la proteína de unión al factor insulínico 1 (IGFBP1), que puedan estar reguladas, tanto por factores de crecimiento como por citoquinas. Esto permite especular acerca de cómo la combinación de señales de citoquinas y factores de crecimiento puede conducir a una poderosa regeneración hepática 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 [60, 78]. En hígado regenerante, la rapamicina, un inmunosupresor 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 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 (Figura 7) [52, 79].

Las vías señalizadoras inducidas por IL-6, TNF α y 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 acti-

vacación 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 [80, 81]. 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 [82].

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 señalar 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 y se caracteriza por necrosis hepatocelular y por un retraso y reducción de la síntesis del DNA en los hepatocitos [86]. Esta respuesta regenerativa anormal se asocia con menor activación MAPK-ERK y menor expresión de C/EBP, factor de transcripción conectado a las vías reguladas por las citoquinas. Al igual que las anomalías observadas en ratones hepatectomizados *C/EBP*^{-/-}, 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, 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, lo que indica que IGFBP1 puede sostener la regeneración hepática afectando las actividades de MAPK-ERK y C/EBP. 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 quizás la señalización mediada por la integrina [82].

Ambas C/EBP, 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*^{-/-} e *IL-6*^{-/-}, no revelaron una correlación positiva entre IL-6 y C/EBP. De hecho, la concentración de IL-6 estuvo elevada en animales *C/EBP*^{-/-}, 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*^{-/-}, pero los genes y las vías que están afectadas son diferentes de las reguladas por IL-6 [83]. De manera que el mecanismo de activación e inducción de C/EBP, durante la regeneración hepática permanece sin esclarecer, pero la conexión entre la actividad de C/EBP, y la

expresión de IGFBP1 es interesante y sitúa a C/EBP, en una posición donde puede ser regulada por las señales de los factores de crecimiento y las citoquinas (Figura 5) [52].

OTRAS VÍAS IMPLICADAS EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

Plaquetas y serotonina. En hígado regenerante aparecen cambios en las concentraciones plasmáticas, no solo de TNF α sino también de ácidos biliares y serotonina derivada de las plaquetas. Las plaquetas, aparte de su misión bien conocida en la coagulación de la sangre, poseen propiedades que las hace intervenir en procesos de inflamación, angiogénesis, reparación y regeneración, isquemia/repercusión y lesión. Todos estos procesos se encuentran implicados de alguna manera en las alteraciones que tienen lugar en el trasplante hepático. Las plaquetas contienen muchas sustancias bioactivas, tales como varios factores de crecimiento HGF, IGF1, TGF α , PDGF y serotonina. [84]. Se ha descrito recientemente, que la serotonina interviene en la regeneración hepática, al demostrarse que en ratones trombocitopénicos (deficientes en plaquetas), se presenta atenuado este proceso, mientras que la administración de serotonina a estos ratones revierte muchos de los efectos de la depleción plaquetaria [85]. Los ratones con bajos niveles de serotonina (deficientes en triptófano hidroxilasa 1), presentan deficiencias en la regeneración hepática inducida por hepatectomía parcial. No están claros los mecanismos que rigen estos procesos, pues la serotonina no es un mitógeno directo ni indirecto para los hepatocitos en cultivo. Un estudio muy reciente ha demostrado que los ratones sometidos a hepatectomía parcial masiva del 90%, cuya inevitable mortalidad se debe a fallo hepático agudo, pueden sobrevivir en condiciones trombocitóticas debido a que el exceso de plaquetas contribuye a la progresión del ciclo celular y previene el fallo hepático agudo. La hepatectomía parcial del 90% en ratones es un modelo sin posibilidad de supervivencia, pero la gran cantidad de plaquetas de los ratones trombocitóticos, no solo permite la supervivencia sino que interviene en la completa regeneración a partir de un hígado remanente sólo del 10% del total [86]. En estas condiciones trombocitóticas las vías señalizadoras se activan antes y se sobreexpresan los genes estimuladores de la regeneración. Estos datos indican que las plaquetas contribuyen a la regeneración hepática, siendo la serotonina la responsable en gran parte de esta activación. Son muchas las vías que se encuentran activadas, entre ellas las relacionadas con la glucólisis y la AKT. Esta última es importante en la promoción de la supervivencia celular al estimular la replicación celular mediante la fosforilación de la GSK3, (glucógeno sintasa quinasa 3 beta), causante de la acu-

mulación nuclear de la ciclina D1 y posterior síntesis del DNA. Estos autores también han demostrado que la fosforilación de AKT se hizo visible mucho antes y de manera más intensa que en los controles. Lo mismo ocurrió con la fosforilación de STAT y otros parámetros señalizadores analizados. Así pues, puede concluirse que el exceso de plaquetas permite la supervivencia y acelera la regeneración hepática a partir de hígados remanentes muy pequeños. La infusión de plaquetas puede ser aplicada a pacientes con trasplantes de pequeño tamaño y a donantes vivos para acelerar el crecimiento hepático después de la operación. Sin embargo, el uso de las plaquetas para estimular la regeneración hepática puede presentar efectos perjudiciales ya que la transfusión de plaquetas se ha identificado como un riesgo independiente de supervivencia reducida, via mecanismos no completamente conocidos.

A pesar de los múltiples estudios sobre regeneración hepática, muchos aspectos permanecen sin esclarecer. Los cambios asociados con la hepatectomía parcial que constituyen el primer desencadenante no están claros, pero es inevitable pensar que además de las alteraciones hemodinámicas del flujo portal anteriormente comentadas, otros eventos ocurren en el interior de la célula. Así, el dominio intracelular de Notch (NICD) y la β -catenina, aparecen en el núcleo de los hepatocitos a los 15-30 min de la hepatectomía y se ha demostrado que la eliminación de la expresión de estas proteínas por RNA de interferencia disminuye la regeneración hepática.

Notch y Jagged. Existen varios miembros de esta familia de proteínas que componen una red compleja, que media interacciones ligando-receptor entre las células, en tejidos que sufren diferenciación y proliferación. Notch se considera receptor y Jagged ligando, aunque ambos están anclados a la membrana plasmática con un dominio transmembrana. La unión de Jagged a Notch conduce a una cascada de eventos proteolíticos que se inicia al desprenderse el dominio intracelular de Notch (NICD) y migrar al núcleo donde funciona como un factor de transcripción (coactivador), que media la expresión de varios genes relacionados con el ciclo celular. La traslocación de NICD al núcleo de los hepatocitos se verifica a los 15 min de la hepatectomía parcial. Existe una expresión incrementada de Notch1 y Jagged1 desde las 3h hasta 4 días después de la hepatectomía. El tratamiento con RNA de interferencia (RNAi) frente a Notch1 y Jagged1 se ha demostrado que suprime parcialmente la regeneración hepática [87].

Wnt y β -catenina. La vía Wnt canónica actúa a través de la β -catenina. La unión de Wnt, una glicoproteína secretada en el medio extracelular, a Frizzled, su receptor de superficie y a una proteína correceptora relacionada con las LDL, promueve la activación de dishevelled y la hipofosforilación de la β -catenina.

Esto ocurre como resultado de la inactivación del complejo formado por el producto del gen APC (*Adenous poliposis coli*), GSK3, (glucógeno sintasa quinasa 3 beta), axina y CK (caseína quinasa), que conlleva la liberación de la β -catenina, la estabilización citoplasmática de su forma monomérica y su traslocación al núcleo. Ya en el núcleo la β -catenina se une a un complejo formado por el factor de células T (TCF) y un miembro de la familia de activadores de factores linfoides (LEF), y activa la expresión de genes. En ausencia de Wnt la forma libre monomérica de la β -catenina citoplasmática se activa para su degradación por ubiquitinación, una vez que sufre la fosforilación en serina y treonina en su terminal NH_2 por las quinasas CK o la GSK3, auxiliadas por la axina y el producto del gen APC.

Se ha estudiado el papel de la β -catenina en la regeneración hepática y se ha detectado que la β -catenina se eleva a los pocos minutos de la hepatectomía parcial por un mecanismo epigenético o post traduccional independiente de la transcripción y aunque esta elevación es transitoria y dura menos de 15 min, la traslocación nuclear de la β -catenina se mantiene hasta las 48 h. Los ratones deficientes en β -catenina, mediante el uso de nucleótidos antisentido, muestran una disminución significativa en la proliferación celular. Estos y otros estudios sugieren que la β -catenina juega un papel temprano en la regeneración hepática iniciando potencialmente una cascada de eventos necesarios para el correcto funcionamiento de la regeneración hepática. Los genes objetivo de esta cascada son: ciclina D1, c-myc, uPAR, MMP, EGFR, etc., que se expresan durante la localización nuclear de la β -catenina. Los ratones genéticamente disminuidos en β -catenina muestran un retraso de 24 h en el punto máximo de regeneración después de la hepatectomía. Se han identificado otros factores: IL-6, PDGFRa, decorina, y otros, que se generan en exceso para compensar la pérdida de la β -catenina [87 - 89].

Caveolinas. La caveolina 1 es una proteína de 178 aminoácidos de la membrana plasmática de la superficie celular que es responsable de la formación de caveolas en células diferenciadas terminales. Las caveolas son dominios de la membrana plasmática que se encuentran en la mayoría de las células, donde intervienen en procesos de señalización y ocurren en un ambiente muy regulado de lípidos y proteínas. La caveolina-1 juega un papel crucial en el mecanismo que coordina el metabolismo lipídico con la respuesta proliferativa en el hígado después de lesión o hepatectomía. La caveolina 1 se encuentra implicada en la regulación de diversas vías transductoras de señales que regulan el ciclo celular. La acumulación hepática de triglicéridos se observa de inmediato después de la hepatectomía parcial y es esencial para la propia regeneración hepática.

De hecho, varios genes inducidos normalmente durante la diferenciación de los adipocitos se activan durante la regeneración hepática. Los ratones *cav^{-/-}* muestran regeneración hepática alterada y baja supervivencia después de la hepatectomía parcial. Los hepatocitos poseen menor acumulación de gotas lipídicas y no avanzan hacia el ciclo celular. La administración de glucosa a estos animales eleva su supervivencia y restablece en los hepatocitos, la entrada en el ciclo celular [90]. En conclusión, la caveolina-1 es un factor crítico en la regulación de la homeostasis lipídica, que puede promover la acumulación de triglicéridos en hígado y tejido adiposo blanco y su movilización en el tejido adiposo blanco y en el marrón. En el caso del hígado la caveolina interviene en la regulación de la proliferación celular. Diversas vías señalizadoras están afectadas en ratones deficientes en caveolina después de la hepatectomía parcial. Estas cascadas señalizadoras incluyen STAT3, c-myc y JNK.

Otro control. Se ha demostrado que el sistema cJun/AP-1 promueve la transición G1/S en hepatocitos mediante una vía que depende de p53. En condiciones de regeneración hepática c-Jun reprime la actividad transcripcional de p53 que impone un estado antiproliferativo en los hepatocitos, por activación de la MAPK p38 α y el consiguiente incremento de p21. En ausencia de c-Jun, el estado antiproliferativo se mantiene incluso después de la hepatectomía parcial, pero puede ser abolido por pérdida adicional de p53 [91]. Estos datos suponen una nueva conexión en la red compleja de señalización en la que se encuentran implicados c-Jun/AP-1, p53/p21 y p38, lo cual es esencial para regular la restauración de la masa hepática después de la hepatectomía parcial o lesión hepática.

ENFERMEDADES HEPÁTICAS FRENTE A RESECCIONES Y TRASPLANTES HEPÁTICOS

Datos obtenidos en centros clínicos que realizan cirugía hepatobiliar y trasplantes hepáticos de donantes vivos, han informado de una mortalidad operativa típica del 2-3%, asociada con grandes resecciones hepáticas cuando se realizan en hígado normal, mientras que en presencia de esteatosis esta mortalidad operativa se eleva al 10%. Además, el contenido en grasa mayor del 30-60% se asocia con un notable incremento de disfunción primaria [92-94]. 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 trasplantes. La mortalidad después de la resección en estos hígados ocurre generalmente días después de la cirugía cuando no se verifica

la proliferación hepatocelular y los hepatocitos mueren por apoptosis. La esteatosis hepática aparece en una serie de patologías 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 origina un flujo sanguíneo anormal [95]. 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 a esta patología, generalmente por mutaciones heterocigóticas en genes implicados en el metabolismo oxidativo incluyendo la hidroxiacil CoA deshidrogenasa de cadena larga, la carnitina palmitoil transferasa I y la 3-hidroxiacil-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 [96]. Anormalidades en la inducción de enzimas dependientes del citocromo P450 (CYP) se han observado también en casos de hígado graso y esteatohepatitis. Se han identificado numerosos polimorfismos del promotor CYP, que han mostrado diferentes grados de respuesta después de lesión hepática inducida por agentes hepatotóxicos. Los pacientes que responden en menor grado y metabolizan con menos efectividad muchos agentes químicos y toxinas estarán expuestos a un mayor riesgo de lesión celular y mitocondrial incluyendo la carcinogénesis [97, 98]. También están expuestos al riesgo de desarrollar hígado graso y cirrosis debido a la exposición a hepatotoxinas y como resultado presentan alteraciones en la regeneración hepática [99]. Selzner y Claviene han examinado los efectos de la esteatosis sobre la regeneración hepática en un modelo de ratas Zucker obesas [100], y han 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.*, [101] han descrito alteraciones en la regeneración hepática en ratas con esteatosis debida a la ingestión de alcohol, observándose anormalidades en la señalización del TNF, aumento de la apoptosis y actividad disminuída del NFκB. Estos autores examinaron también los efectos de la endotoxina (LPS) sobre la esteatosis hepática utilizan-

do el modelo de ratas obesas Zucker y encontraron mayor sensibilidad a la endotoxina con producción alterada de TNF y señalización anormal [102]. 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 esteatohepatitis alcohólica o la no alcohólica se cree que suponen la etiología principal para la cirrosis criptogénica [103]. La regeneración hepática en pacientes con esteatohepatitis es notablemente anormal, similar a la detectada 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 anomalías en la arquitectura hepática que posteriormente alteran y limitan la regeneración hepática. Mayor control de la glucosa, como también discreta pérdida de peso, pueden disminuir 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 se ha encontrado que el glucagón reduce rápidamente el contenido de grasa en hígado en varios modelos animales. Se han examinado otros tratamientos que pueden disminuir el contenido de lípidos hepáticos, por ejemplo, el gemfibrozil y la ursodesoxicolina [104].

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 [105]. 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 [106]. 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 cambios anormales en los hepatocitos y en la membrana basal. Además la contractura de las cicatrices es también una barrera física para la hiperplasia compensatoria después de la resección [107] [108].

CONCLUSIONES

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. Las 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 mayor éxito en la recuperación de los pacientes sometidos a resecciones o trasplantes hepáticos.

La buena recuperación del hígado después de la hepatectomía parcial o del trasplante hepático, depende de cómo se regenera el hígado después de la operación. Profundizar en el conocimiento de estos mecanismos es de importancia fundamental para la prevenir fracasos postoperatorios y mejorar la superación de los trasplantes. Los recientes avances en cirugía experimental están permitiendo que sean cada vez más las resecciones hepáticas acometidas favorablemente con hígados normales y enfermos. El mejor conocimiento de la fisiología hepática y de los mecanismos moleculares y celulares que se encuentran implicados en las diferentes etapas de la respuesta regenerativa, permitirá intervenir en la forma de movilizar e intensificar el proceso regenerativo en hígado después de la resección o de los trasplantes. Estos conocimientos pueden también ampliar su aplicación a la restauración de masa tisular perdida en otros órganos. La estimulación del hígado para regenerarse después de la hepatectomía parcial está permitiendo la utilización cada vez con más éxito de un mayor número de injertos de pequeño tamaño y de donantes vivos.

ABREVIATURAS

AKT, serina-treonina quinasa; AP1, heterodímero formado por jun y fos; C3a y C5a, factores de complemento; CDK, quinasas dependientes de ciclina; C/EBP, proteína intensificadora de la unión a CCAAT; ERK, quinasa regulada por señales extracelulares; HGF, factor de crecimiento de hepatocitos (scatter factor); ICE, enzima convertidor de IL-1; IGF, factor de crecimiento insulínico; IGFBP1, proteína que se une al IGF; IL-6, interleuquina 6; JAK, quinasa Janus; JNK, quinasa aminoterminal JUN; L-NAME, N' nitroarginina metil ester; LAP, péptido asociado a la latencia; LPS, lipopolisacárido; MAPK, proteína quinasa

activada por mitógenos; MMP, metaloproteasas; NFκB, factor nuclear kappa B; NICD, dominio intracelular de Notch; 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-morfolinosidnonimina-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; TACE, enzima convertidor del TNF; TGFβ, factor transformante del crecimiento beta; TIMP, inhibidor tisular de las metaloproteasas; TNFβ factor de necrosis tumoral β; TOR, objetivo de la rapamicina; uPA, uroquinasa activadora del plasminógeno; VEGF, factor de crecimiento vascular endotelial.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cascales Angosto M (2008) Mecanismos que regulan la regeneración hepática. Instituto de España. Madrid. ISBN. 978-84-85559-97-8.
2. Cascales Angosto M (2006) El extraordinario fenómeno de la Regeneración hepática. Real Academia Nacional de Farmacia/Fundación José Casares Gil pp 7-28. Madrid.
3. Michalopoulos GK (2007) Liver regeneration *J Cell Physiol* **213**, 286-300.
4. Su AI, Guidotti LG, Pezacki JP, *et al.* (2002) Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 11181-11186.
5. Higgins GM y Anderson RM (1931) Experimentaln pathology of the liver. I. Restoration of liver of white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol Lab Med* **12**, 186-202.
6. Díez-Fernández C,, Alvarez 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, 1993.
7. Furrer K, Tian Y, Pfammatter T, *et al.* (2008) Selective portal vein embolization and ligation trigger different regenerative responses in the rat liver. *Hepatology* **47**, 1615-1623.
8. Wilms C, Mueller L, Lenk C, *et al.* (2008) Comparative study of portal vein embolization versus portal vein ligation for induction of hypertrophy of the future liver remnant using a mini-pig model. *Ann Surg.* **247**, 825-834.

9. Marubashi S, Sakon M, Nagano H, *et al.* (2004) Effect of portal hemodynamics on liver regeneration studied in a novel portohepatic shunt rat model. *Surgery* **136**, 1028-1037.
10. Khan Z, Michalopoulos GK, Stolz DB. (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.
11. Nakatsuka H, Takaaki S, Yamamoto K, *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.
12. Cascales Angosto M (2008) Anatomía hepática. Sistemas celular y vascular.. En: Bases celulares y Moleculares de la Regeneración hepática pp 11-34. Instituto de España. Madrid.
13. Braet F, Shleper M, Paizi M, *et al* (2004) Liver sinusoidal endothelial cell modulation upon resection and shear stress *in vitro*. *Comp Hepatol* **3**, 7-17.
14. Bockhorn M, Goralski M, Prokofiev D, *et al.* (2007) VEGF is important for early liver regeneration after partial hepatectomy. *J Surg Res* **138**, 291-298.
15. Schoen JM, Wang HH, Minuk GY, y Lautt WW (2001) Shear stress induced nitric oxide release triggers the liver regeneration cascade. *Nitric Oxide* **5**, 453-464.
16. Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H. (1998) Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* **12**, 773-790.
17. Wang HH, Lautt WW (1997) Does nitric oxide (NO) trigger liver regeneration? *Proc West Pharmacol Soc* **40**, 17-18.
18. 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.
19. Rai RM, Lee FY, Rosen A, *et al.*(1998) Impaired liver regeneration in inducible nitric oxide synthase deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 13829-13834.
20. Diez-Fernandez C, Sanz N, ... y Cascales M. (1997) Involvement of nitric oxide synthesis in hepatic perturbations induced in rats by a necrogenic dose of thioacetamide. (1997) *Br J Pharmacol.* **121**, 820-826.
21. Diez-Fernández C, Sanz N, 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.
22. Szabo 1C, Ferrer-Sueta G Zingarelli B, Southan GJ, Salman AL y Radi R (1997) mercaptoethylguanina and guanidine inhibitors of nitric oxide synthase react with

- peroxynitrite and Project against peroxynitrite-induced oxidative damage. *J Biol Chem* **272**, 9030- 9036.
23. Cantre D, Schuett H Hildebradt A, *et al.* (2008) Nitric oxide reduces organ injury and enhances regeneration of reduced-size livers by increasing hepatic arterial flow. *British J Surg* **95**, 785-792.
 24. Cascales M (2008) Matriz extracelular y proteasas. En: Bases celulares y Moleculares de la regeneración hepática. Instituto de España pp 71-102. Madrid.
 25. Mohammed FF, Pennington CJ, Kassiri Z *et al.* (2005) metalloproteinase inhibidor TIMP1 affects hepatocyte cell cycle via HGF activation in murine liver regeneration. *Hepatology* **41**, 857-867.
 26. Lee SL, Dickson RB y Lin CY (2000) Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease, *J Biol Chem* **275**, 36720-36725.
 27. Kim TH, Mars WM, Stolz DB *et al.* (1997) Extracellular matrix remodelling at early stages of liver regeneration in the rat. *Hepatology* **26**, 896-904.
 28. Schmidt C, Blatt F, Goedcke S, *et al.* (1995) Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for the liver development. *Nature* **373**, 699-702.
 29. Naldini L, Tamagnone L, Vigna E, *et al.* (1992) Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J* **11**, 4825-4883.
 30. Mars WM, Zarnegar R y Michalopoulos GK (1993) Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activator uPA and tPA. *Am J Pathol* **143**, 949-958.
 31. Mohammed FF y Khokha R (2005) Thinking outside the cell. *Trends Cell Biol* **15**, 555-563.
 32. Black RA, Rauch CT, Kazlasky CJ, *et al.*, (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells, *Nature* **385**, 729-733.
 33. Padiaditakis P, López-Talavera JC, Petersen B, Monge SP y Michalopoulos GK, (2001) The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat, *Hepatology* **34**, 688-693.
 34. Nath D, Williamson NJ, 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.
 35. Kiso S, Kawata S, Tamura S, *et al.* (2003) Liver regeneration in heparin-binding EGF-like growth factor transgenic mice after partial hepatectomy, *Gastroenterology* **124**, 701-707.

36. Lee DC, Sunnarborg SW, Hindle CL y Myers TJ (2003) TACE/ADAM17 processing of EGFR ligands indicates a role as a physiological convertase, *Ann NY Acad Sci* **995**, 22-38.
37. Russell WE, Kaufmann WK, Sitaric S, *et al.* (2003) Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor-alpha-targeted mice, *Mol Carcinog* **15**, 183-189.
38. Luetteke NC y Lee DC (1990) Transforming growth factor alpha: expression, regulation and biological action of its integral membrane precursor. *Semin Cancer Biol* **1**, 265-275.
39. Kraizer Y, Mawasi N, Seagal J, *et al.* (2001) Vascular endothelial growth factor and angiopoietin in liver regeneration, *Biochem Biophys Res Commun* **287**, 209-215.
40. LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, *et al.* (2003) Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1, *Science* **299**, 890-893.
41. Ruhrberg C (2003) Growing and shaping the vascular tree: multiple roles for VEGF, *BioEssays* **25**, 1052-1060.
42. Ehrbar M, Djonov VG, Schnell C, *et al.* (2004) Cell-demanded liberation of VEGF121 from fibrin implants induces local and controlled blood vessel growth, *Circ Res* **94**, 1124-1132.
43. Ornitz DM (2000) FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development, *Bio Essays* **22**, 108-112.
44. Aviezer D, Hecht D, Safran M, *et al.* (1994) Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis, *Cell* **79**, 1005-1013.
45. Levi E, Fridman R, Miao HQ, *et al.* (1996) Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7069-7074.
46. Martin DC, Fowlkes JL, 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.
47. Coppock HA, White A, Aplin JD y Westwood M (2004). Matrix metalloproteinase-3 and -9 proteolyse insulin-like growth factor binding protein-1. *Biol Reprod* **71**, 438-443.
48. Khalil N (2001) Post translational activation of latent transforming growth factor beta (L-TGF-beta): clinical implications, *Histol Histopathol* **16**, 541-551.
49. Black RA, Kronheim SH, Cantrell M, *et al.* (1988) Generation of biologically active interleukin-1 beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor, *J Biol Chem* **263**, 9437-9442.

50. Kostura MJ, Tocci MJ, Limjoco G, *et al.* (1989) Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity, *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 5227-5231.
51. Moolten FL y Bucher NL (1967) Regeneration of rat liver: transfer of humoral agent by cross circulation. *Science* **158**, 272-274.
52. Taub R (2004) Liver regeneration: From myth to mechanism. *Nature Rev Mol Cell Biol* **5**, 836-847.
53. Fausto N. (2000) Liver regeneration. *J Hepatol* **32**, 19-31.
54. Koniaris LG, McKillop IH, Schwartz SI y Zimmers TA (2003) Liver regeneration. *J. Am Col. Surg* **197**, 634-659.
55. Levy DE y Lee CK (2003) What does Stat3 do? *J Clin Invest* **109**, 1143-1148.
56. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, *et al.* (2002) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* **374**, 1-20.
57. Taub R, Greenbaum LE, y Peng Y (1999) Transcriptional regulatory signals define cytokine-dependent and -independent pathways in liver regeneration. *Semin. Liver Dis.* **19**, 117-127.
58. Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, *et al.* (1996) Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* **274**, 1379-1383.
59. 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.
60. Yang XP, Schaper F, Teubner A, *et al.* (2005) Interleukin-6 plays a crucial role in the hepatic expression of SOCS3 during acute inflammatory processes in vivo. *J Hepatol* **43**, 704-710.
61. Riehle KJ, Campbell JS, McMahan RS, *et al.* (2008) Regulation of liver regeneration and hepatocarcinogenesis by suppressor of cytokine signalling 3. *J Exp Med* **205**, 91-103.
62. Fujita J, Marino MW, Wada H, *et al.* (2001) Effect of *TNF* gene depletion on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Surgery* **129**, 48-54.
63. Aldeguer X, Debonera F, Shaked A, *et al.* (2002) Interleukin-6 from intrahepatic cells of bone marrow origin is required for normal murine liver regeneration. *Hepatology* **35**, 40-48. 8.
64. Strey CW, Markiewski M, Mastellos D, *et al.* (2003) The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *J Exp Med* **198**, 913-923.
65. Fausto N, Campbell JS y Riehle KJ (2006) Liver regeneration. *Hepatology* **43**, (supl 1), S45-S53.

66. 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.
67. Wuestefeld, Betz U, Lauber J, *et al.*, (2003) Interleukin-6/glycoprotein 130-dependent pathways are protective during liver regeneration. *J Biol Chem* **278**, 11281-11288.
68. Blindenbacher A, Langer I, Savino R, *et al.* (2003) Interleukin-6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* **38**, 674-682.
69. Peters M, Zimmers TA, McKillop IH, *et al.* (2000) Combined interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor accelerates murine liver regeneration. *Gastroenterology* **119**, 1663-1671.
70. Zimmers T, McKillop IH, Pierce RH, *et al.* (2003). Massive liver growth in mice induced by systemic interleukin-6 administration. *Hepatology* **38**, 326-334.
71. 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.
72. Huh CG, Factor VM, Sanchez A, *et al.* (2004) Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 4477-4482.
73. Currier AR, Sabla G, Locaputo S, *et al.* (2003) Plasminogen directs the pleiotropic effects of uPA in liver injury and repair. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **284**, G508-G515.
74. Shimizu M, Hana A, Okuno 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.
75. Matsuda Y, Matsumoto K, Yamada A, *et al.* (1997) Preventive and therapeutic effects in rats of hepatocyte growth factor infusion on liver fibrosis/cirrhosis. *Hepatology* **26**, 81-89.
76. Burr AW, Toole K, Chapman C, *et al.* (1998) Anti-hepatocyte growth factor antibody inhibits hepatocyte proliferation during liver regeneration. *J Pathol* **185**, 298-302.
77. Scheving LA, Stevenson MC, Taylormoore JM, *et al.* (2002) Integral role of the EGF receptor in HGF-mediated hepatocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 197-203.
78. Diehl AM, Yin M, Fleckenstein J, *et al.* (1994) Tumor necrosis factor- induced *c-jun* during the regenerative response to liver injury. *Am J Physiol* **267**, G552-G561.

79. Tomiya T, Yamaoka M, Inoue Y, Nishikawa, et al. (2007) Effect of rapamycin on hepatocyte function and proliferation induced by growth factors. *Chemotherapy* **53**, 59-69.
80. Behrens A, Sibilía M, David JP, et al (2002) Impaired postnatal hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice lacking c-jun in the liver. *EMBO J* **21**, 1782-1790.
81. Leu JI, Crissey MAS, Leu JP, et al. (2001) Interleukin-6-induced Stat3 and AP-1 amplify hepatocyte nuclear factor 1-mediated transactivation of hepatic genes, an adaptive response to liver injury. *Mo. Cell Biol* **21**, 414-424.
82. Leu JI, Crissey MA, Craig LE 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, and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase regulation. *Mol Cell Biol* **23**, 1251-1259.
83. Greenbaum LE, Li W, Cressman DE, et al. (1998) CCAAT enhancer-binding protein, is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy. *J Clin Invest* **102**, 996-1007.
84. Lesurtel M, Graft R, Aleil B, et al. (2006). Platelets and platelet derived serotonin mediates liver regeneration. *Science* **312**, 104-107.
85. Myronovych A, Murata S, Chiba M, et al. (2008) Role of platelets on liver regeneration after 90% hepatectomy in mice. *J Hepatol* **49**, 363-372.
86. Pereboom ITA, Lisman Y y Porte RJ (2008) Role of platelets in liver regeneration: Friend o foe. *Liver Transplantation* **14**, 923-931.
87. Kohler C, Bell AW, Bowen WC, et al. (2004) Expression of Notch-1 and its ligand Jagged-1 in rat liver during liver regeneration. *Hepatology* **39**, 1056-1065.
88. Tan X, Behari J, Cieply B, et al. (2006) Conditional deletion of β -catenin reveals its role in liver growth and regeneration. *Gastroenterology* **131**, 1561-1572.
89. Thompson MD y Monga SPS (2008) VNT/ β -catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology* **45**, 1298-1305.
90. Fernández MA, Albor C, Ingelmo-Torres M, et al. (2006) Caveolin-1 is essential for liver regeneration. *Science* **313**, 1628-1632.
91. Stepniak E, Ricci R, Efert R, et al. (2006) c-Jun/AP-1 controls LR by repressing p53/p21 and p38 MAPK activity. *Genes & Dev* **20**, 1306-2314.
92. Behrns KE, Tsiotos GG, DeSouza NF, et al. (1998) Hepatic steatosis as a potential risk factor for major hepatic resection. *J Gastrointest Surg* **2**, 292-298.
93. Little SA, Jarnagin WR, DeMatteo RP, 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.

94. Todo S, Demetris AJ, Makowka L, *et al.* (1989) Primary nonfunction of hepatic allografts with preexisting fatty infiltration. *Transplantation* **47**, 903-905.
95. 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.
96. Ibdah JA, Yang Z y Bennett MJ (2000) Liver disease in pregnancy and fetal fatty acid oxidation defects. *Mol Genet Metab* **71**, 182-189.
97. Minchin RF, McManus ME, Boobis AR, *et al.* (1985) Polymorphic metabolism of the carcinogen 2-acetylaminofluorene in human liver microsomes. *Carcinogenesis* **6**, 1721-1724.
98. Farrell GC (2002). Drugs and Steatohepatitis. *Seminars in Liver Disease* **22**, 185-194.
99. 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.
100. Selzner M y Clavien PA (2000) Failure of regeneration of the steatotic rat liver: disruption at two different levels in the regeneration pathway. *Hepatology* **31**, 35-42.
101. Yang SQ, Lin HZ, Yin M, *et al.* (1998) Effects of chronic ethanol consumption on cytokine regulation of liver regeneration. *Am J Physiol* **275**, G696-G704.
102. Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, *et al.* (1999) Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology* **29**, 664-669.
103. Angulo P y Lindor KD (2002) Non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* **17 Suppl 1**, 186-190.
104. Laurin J, Lindor KD, Crippin JS, *et al.* (1996) Ursodeoxycholic acid or clofibrate in the treatment of non-alcohol- induced steatohepatitis: a pilot study. *Hepatology* **23**, 1464-1467.
105. Friedman SL (2001) The hepatic stellate cell. *Semin liver disease* **21**, 307-452.
106. Cascales M (2008) Matriz extracelular y proteasas, en Bases Celulares y Moleculares de la Regeneración Hepática, pp 137-170. Instituto de España. Madrid.
107. Riley TR y Bhatti AM (2001). Preventive strategies in chronic liver disease: part I. Alcohol, vaccines, toxic medications and supplements, diet and exercise. *Am Fam Physician* **64**, 1555-1560.
108. Nocito A, El-Badry AM y Clavien PA (2006) When is steatosis too much for transplantation? *J Hepatol* **45**, 483-313.