

TFG MEDICINA

REGENERACIÓN HEPÁTICA

ALUMNO: PUCHÁN LASARTE, MARTA

DIRECTORA: SOLANAS VILLACAMPA, ESTELA

FACULTAD DE MEDICINA- UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

DEPARTAMENTO: ANATOMÍA E HISTOLOGÍA HUMANAS

INDICE

1. Resumen.....	3
2. Abstract.....	4
3. Introducción y palabras clave.....	5
4. Concepto de regeneración hepática.....	6-9
5. Factores y células implicados.....	10-13
6. Mecanismo regenerativo.....	14-22
7. Regeneración y tumores hepáticos.....	23-25
8. Aplicaciones clínicas principales y perspectivas de futuro.....	26-31
9. Conclusiones.....	32-33
10. Valoración personal.....	34
11. Referencia bibliográfica.....	35-41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	7
Tabla 2.....	11

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	8
Figura 2.....	8
Figura 3.....	10
Figura 4.....	14
Figura 5.....	18

1. RESUMEN

En los últimos años la investigación en regeneración hepática ha tenido grandes avances con implicaciones importantes en la práctica clínica.

Tras una agresión del tejido hepático por enfermedades diversas, tóxicos, tumores ó cirugías hepáticas, se produce una rápida reacción en la que el hígado recupera su tamaño y función original, interviniendo en esta cascada numerosos tipos celulares y factores moleculares. En la mayoría de los casos, generalmente en enfermedad aguda, la cascada de reacciones da lugar a la regeneración del órgano, sin embargo en otros casos, cuando el daño persiste en el tiempo, la capacidad regenerativa se ve sobrepasada y se produce la degeneración del tejido hacia un tejido más fibroso o incluso tumoral.

Especial relevancia cobran los mecanismos de regeneración hepática en la evolución de los tumores hepáticos, pre y post-cirugía, ya que factores de crecimiento tisulares permiten la reproducción del tumor con una mayor probabilidad, empeorando el pronóstico del paciente.

Aunque se ha avanzado de forma importante en el estudio de los mecanismos implicados en la regeneración hepática, la elucidación de todos y cada uno de ellos permitiría reducir la morbi-mortalidad relacionada con las enfermedades de este órgano, disminuir la insuficiencia hepática post-hepatectomía, y mejorar así la calidad de vida de los afectados, ya que un mejor conocimiento de los mecanismos implicados permitirá desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. Estas nuevas estrategias pueden incluir el uso de terapia génica y/o el uso de terapia celular, dirigidas a la regulación específica de los factores de crecimiento implicados, la creación de injertos artificiales o incluso de órganos 3D.

2. ABSTRACT

In recent years research on liver regeneration has made great progress with important implications for clinical practice.

After an attack of liver tissue for various toxic, liver cancer or disease surgeries, is a rapid reaction in the liver regains its original size and function, intervening in this cascade numerous cell types and molecular factors. In most cases, usually acute, the cascade of reactions leading to organ regeneration, however in other cases when the damage persists long time, regenerative capacity is overwhelmed and it made the tissue degeneration into a fibrotic tissue or cancer.

Especially relevant have the liver regeneration mechanisms in the development of liver cancer, pre and post-surgery, as tissue growth factors allow the reproduction of the cancer with a higher probability, worsening the patient's prognosis.

Although progress has been so important in the study of the mechanisms involved in liver regeneration, clarifying each and every one of them would reduce morbidity and mortality related to diseases of this organ, reduce post-hepatectomy liver failure, and improve the quality of life of those affected, and that a better understanding of the mechanisms involved will develop new therapeutic strategies. These strategies may include the use of gene therapy and / or use of cell therapy targeting the specific regulation of growth factors involved, creating artificial grafts or organ 3D.

3. INTRODUCCIÓN

A continuación desarrollo el trabajo de fin de grado sobre REGENERACIÓN HEPÁTICA con una revisión bibliográfica de artículos de investigación, un tema de estudio que en los últimos años ha avanzado mucho permitiendo conocer mejor los mecanismos implicados no solo en la regeneración del tejido, sino también en el desarrollo de la enfermedad crónica, y por tanto el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que han permitido en definitiva un mejor pronóstico de los enfermos hepáticos, así como un aumento de la supervivencia de los mismos.

Las partes del trabajo se centrarán en explicar el concepto de regeneración hepática y cómo se produce, incluyendo los mecanismos celulares, moleculares y fisiológicos implicados. Veremos las aplicaciones clínicas principales y la regeneración en pacientes con tumores hepáticos. Para finalizar analizaremos las perspectivas de futuro que plantean los investigadores.

PALABRAS CLAVE: Regeneración hepática, hepatocitos, células madre, factores de crecimiento, citoquinas, hepatectomía, transplante hepático, hepatocarcinoma.

4. REGENERACIÓN HEPÁTICA

Las enfermedades hepáticas tienen un alto impacto en la morbilidad y mortalidad humana. Aunque hay numerosos tratamientos, el éxito, la recuperación y la supervivencia dependen, en gran parte, de la capacidad que tenga el hígado para regenerarse tras un daño tisular, ya que cuanto menor sea su capacidad regenerativa mayor es el riesgo de desarrollar insuficiencia hepática y, por lo tanto, las secuelas y recidivas que puedan producirse crecen exponencialmente.

El hígado posee la capacidad específica para volver a un tamaño constante dentro de un corto periodo de tiempo y reorganizarse y crear una vascularización especial tras sufrir un daño tisular externo, como ocurre en el fallo hepático agudo, debido a casos de toxicidad hepática o en aquellas situaciones en las que se realiza una resección o trasplante hepático.

Tras estas agresiones, agudas o crónicas, se desencadena una cascada de señales moleculares que provocan que en un primer momento los hepatocitos generalmente quiescentes entren en proliferación. Si esta respuesta es insuficiente debido al daño producido, las células madre hepáticas comienzan a proliferar y diferenciarse hacia el tipo celular necesario, y, por último, si esto sigue siendo insuficiente, se liberan factores a través del torrente sanguíneo que atraen células madre de médula ósea que parecen participar en el proceso de regeneración (Michalopoulos, 1997).

En los tiempos modernos, el mejor modelo experimental para el estudio de la regeneración del hígado se introdujo por Higgins y Anderson (1931) (Tabla 1, se muestra un resumen de estudios en las últimas décadas): realizaron una operación (hepatectomía parcial) en el que resecaron dos tercios del hígado de una rata y observaron que los lóbulos residuales se agrandaban para compensar la masa de los lóbulos retirados. En el caso de la rata, todo este proceso tiene una duración de 5 a 7 días. La hepatectomía parcial es el estímulo a menudo más utilizado para los estudios de la regeneración del hígado porque, en comparación con otros métodos que utilizan sustancias tóxicas hepáticas (tales como CCl_4), no están asociados con la lesión tisular y la inflamación, y la iniciación del estímulo regenerativo.

Tabla 1. Tabla resumen de los principales estudios de revisión realizados en los últimos años sobre regeneración hepática. Clinical implications of advances in liver regeneration. Clin Mol Hepatol. 2015 ; 21: 7–13.

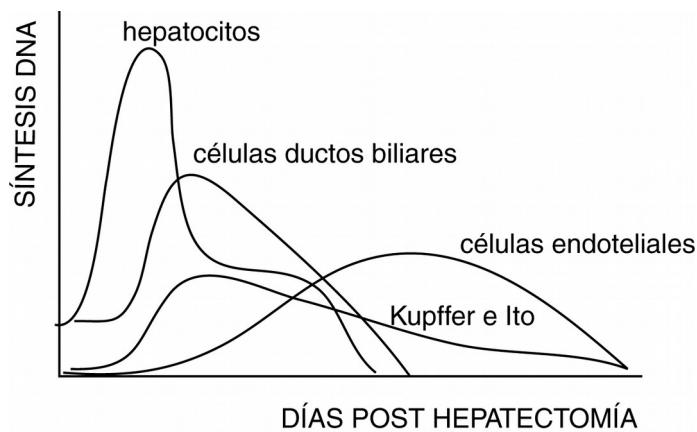
Year	First author	Contents
2011 ⁴⁴	Mortensen	Animal research on liver regeneration
2010 ⁴⁵	Kandilis	Variable cell types and topographic differences
2007 ²	Michalopoulos	Molecular aspects of liver regeneration
2006 ¹	Fausto	Molecular mechanism of liver regeneration
2004 ⁴⁶	Black	Molecular aspects of liver regeneration
2004 ⁴⁷	Zimmermann	Regulatory steps of liver regeneration
2001 ⁴⁸	Kountouras	Liver regeneration after hepatectomy
2000 ⁴⁹	Diehl	Molecular aspects of liver regeneration
1997 ⁵⁰	Kay	Molecular aspects and clinical applications of liver regeneration
1996 ⁵¹	Taub	Genetic aspects of liver regeneration
1996 ⁵²	Diehl	Signal regulation during liver regeneration
1991 ⁵³	Fausto	Variable growth factors in liver
1990 ⁵⁴	Leffert	Molecular aspects of liver regeneration
1990 ⁵⁵	Michalopoulos	Molecular aspects of liver regeneration
1986 ⁵⁶	Alison	Molecular aspects of liver regeneration

Los estudios con resecciones hepáticas en animales grandes (perros y primates) y los seres humanos han establecido que la respuesta regenerativa es proporcional a la cantidad de hígado eliminado. Incluso pequeñas resecciones (10%) producen una regeneración del hígado a tamaño completo. Cuando el hígado de perros grandes se trasplantan en perros pequeños, el tamaño del hígado disminuye gradualmente hasta que el tamaño del órgano se vuelve proporcional al nuevo tamaño del cuerpo (Huang J. y Rudnick David A., 2014).

En contraste con otros tejidos con capacidad regenerativa (médula ósea, piel), la regeneración del hígado no depende solo de un pequeño grupo de células progenitoras o células madre. La regeneración hepática después de la resección hepática en los estudios realizados nombrados anteriormente, se lleva a cabo por la proliferación de todas las poblaciones celulares existentes que componen el órgano (Figura 1). Éstos incluyen a los hepatocitos (las principales células funcionales del órgano); células epiteliales biliares (revestimiento conductos biliares); células endoteliales fenestradas (un tipo único de células endoteliales con grandes lagunas citoplasmáticos (fenestrae) que permiten el máximo contacto entre sangre circulante y hepatocitos); células de Kupffer (macrófagos en sinusoides hepáticos); y células de Ito (células estrelladas cuyos largos procesos envuelven a los hepatocitos, que almacenan vitamina A, sintetizan diferentes proteínas del tejido conectivo y secretan diferentes factores de crecimiento).

Todas estas células proliferan para reconstruir el tejido hepático perdido. Los hepatocitos son los primeros en proliferar, normalmente, entre 10 a 12 horas en ratas (Micholopoulous, 1997). La cinética de la proliferación celular difiere ligeramente de una especie a otra. El primer pico de la síntesis de ADN en hepatocitos se produce alrededor de las primeras 24 horas, con un pico menor entre las 36 y 48 horas.

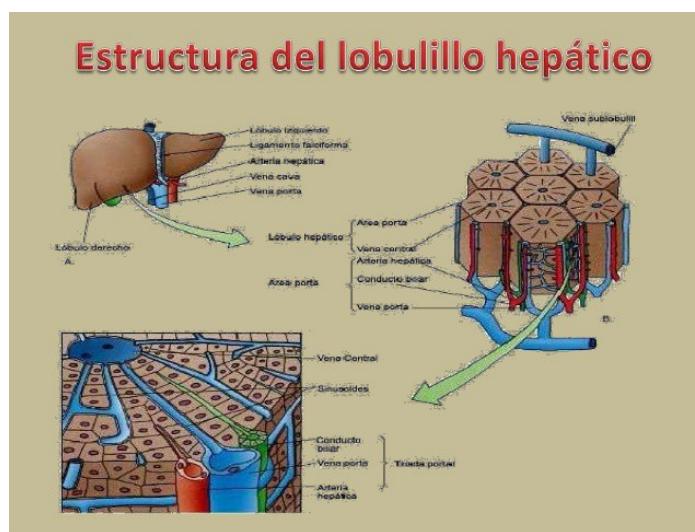
Figura 1. Gráfico del orden de síntesis de DNA de los diferentes tipos celulares en el tiempo tras resección hepática o daño hepático agudo. Recuperado de: escuela.med.puc.cl.



El parénquima hepático está organizado en unidades llamadas lobulillos hepáticos, que se construyen en el espacio entre las tríadas portales y las venas centrales. La sangre llega por las ramas de la vena porta y la arteria hepática pasa a través de los sinusoides y drena en el centro de las vénulas situadas en el centro del lóbulo.

Figura 2: imagen de estructura del lobulillo hepático.

Estructura del lobulillo hepático, 2013. Recuperado de: es.slideshare.net

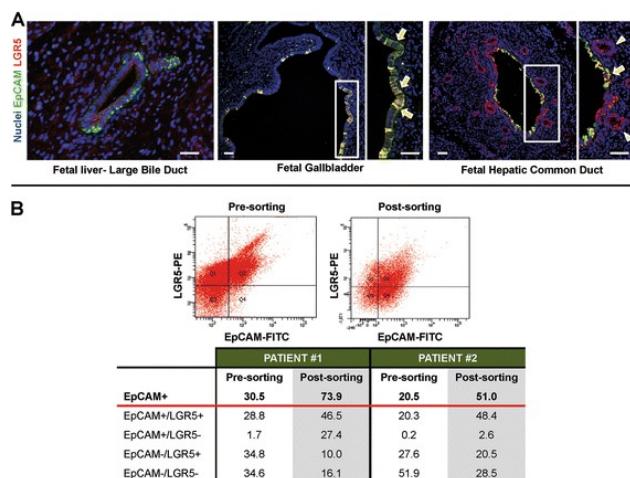


La proliferación de hepatocitos se inicia en las zonas de los lóbulos que rodean las tríadas portales (zona periportal) y a las 36-48h en las áreas pericentrales. Las otras células del hígado comienzan la síntesis del ADN 24 horas después de los hepatocitos, con un pico en la síntesis de ADN a las 48 horas o posteriori. La cinética de la proliferación celular y los factores de crecimiento producido por la proliferación de hepatocitos sugieren que los hepatocitos proporcionan los estímulos mitogénicos que conducen a la proliferación de las otras células (Michalopoulos, 1997). Después de 2 - 3 días durante los cuales todos los elementos celulares del hígado proliferan, la histología hepática en el día 3 - 4 está caracterizada por grupos de pequeños hepatocitos circundantes en los capilares. La histología típica hepática se restablece poco a poco en el tiempo.

5. FACTORES Y CÉLULAS IMPLICADOS

El hígado puede regenerarse mediante el aumento de la tasa de mitosis de los hepatocitos y la diferenciación de células madre en hepatocitos o colangiocitos. Así, las células madre hepáticas junto con los hepatocitos adultos son células principales para la regeneración del hígado. Varios estudios sugieren la existencia de una o más poblaciones de células madre que participen en el proceso (células madre hepáticas, células progenitoras hepáticas y células madre extrahepáticas) que son capaces de diferenciarse en hepatocitos y células epiteliales biliares. Cardinale y col. (2014) describieron el primer procedimiento de trasplante a través de la arteria hepática de células madre del árbol biliar fetal humano en pacientes con cirrosis avanzada (Figura 3).

Figura 3: Inmunofenotipo de las células madre del árbol biliar y citometría de las células trasplantadas. Transplantation of human fetal biliary tree stem/progenitor cells into two patients with advanced liver cirrhosis. *BMC Gastroenterol.* 2014; 14: 204.



Durante el desarrollo embrionario, los hepatoblastos generan los dos linajes de células epiteliales: hepatocitos y células biliares. El área de conexión del segmento terminal del sistema biliar ductal con hepatocitos parenquimatosos persiste en el hígado adulto y se conoce como los canales de Hering. Los conductos biliares intrahepáticos primitivos expresan ambas proteínas de hepatocitos y marcadores epiteliales biliares, en consecuencia se han denominado "células de transición". Las células de transición tienen propiedades intermedias entre las de células ovales y hepatocitos. Estas células se cree que permanecen en el hígado adulto como progenitores bipotenciales tanto para los hepatocitos como para las células biliares.

Las glándulas de las vías biliares extrahepáticas representan un nicho de células endodérmicas y progenitoras. Este nicho sigue el modelo del nicho de células madre intestinales. La activación de estas células para la transformación en hepatocitos maduros es un proceso condicional que se produce sólo cuando la capacidad de regeneración de los hepatocitos se sobrepasa. La diferenciación de hepatocitos dentro de los conductos biliares en el hígado humano se ha observado y ha llevado a la conclusión de que las células madre del árbol biliar expresan marcadores típicos de las células biliares y hepatocitos, que repueblan el parénquima hepático severamente dañado, y que pueden funcionar como una célula progenitora para los nuevos hepatocitos (Reid, 2011).

Para que estas células, tanto hepatocitos como células madre, entren en proliferación y secreten otros factores que activen otras células hepáticas que participan en la remodelación y vascularización del nuevo tejido existe una cadena de señales moleculares. A continuación detallamos en la Tabla 2, los principales factores de crecimiento y citoquinas implicados en la regeneración hepática:

Tabla 2. Factores implicados y funciones. Clinical implications of advances in liver regeneration. Clin Mol Hepatol. 2015 ; 21: 7-13

FACTORS	FUNCTION
Tumor necrosis factor α (TNF- α)	After partial hepatectomy, expression of TNF- α is induced in Kupffer cells. It vitalize the transcription factor, nuclear factor κ B (NF- κ B). The latter is an potent regulator of initiation of liver regeneration.
Interleukin-6 (IL-6)	IL-6 is increased after partial hepatectomy and serum levels are elevated soon after hepatectomy. It is mainly secreted by Kupffer cells and the LPS/MyD88 pathway regulate its expression.
Hepatocyte growth factor (HGF)	After partial hepatectomy, serum HGF level increase intensively within 1-3 hours. HGF activates receptor tyrosine kinase c-Met. It is a major hepatocyte mitogen.
Epidermal growth factor (EGF) family	EGF activates EGFR/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 and HER4/ErbB4. It provoke hepatocyte proliferation and is significant for survival after partial hepatectomy.
Fibroblast growth factors (FGFs)	FGFs activate FGF receptors (FGFR) 1-4.
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	VEGF controls angiogenesis and lymphangiogenesis by activating three receptor tyrosine kinases (VEGFR1-3).
Insulin-like growth factors (IGFs)	IGF-I and IGF-II are strong mitogens. They bind to six insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs).
Transforming growth factor β (TGF- β)	TGF- β activates heteromeric receptor complexes containing type I and type II transmembrane receptors. It is a powerful suppressor for variable types of epithelial cells.
Activins	Activins activate heterodimeric receptor complexes consisting of type I and type II receptors. Activin A has a potential role in terminating the liver regeneration.

Se resume a continuación las principales características de los factores nombrados en la tabla 2:

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa. Después de una hepatectomía parcial, la expresión de TNF α es inducida por las células de Kupffer, que activan los factores de transcripción y factores nucleares kB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas). Es un potente regulador de la iniciación de la regeneración hepática.

IL-6: Interleuquina-6. Tras una hepatectomía parcial existe una alta secreción de IL-6 (Interleuquina-6) a nivel del hígado, de forma que rápidamente aumentan sus niveles en suero. La IL-6 es secretada por las células de Kupffer y células progenitoras hepáticas. (CPH)/MyD88 es la vía que regula su expresión.

HGF: Factor de crecimiento de los hepatocitos. Tras una hepatectomía parcial, los niveles en suero se elevan entre 1-3 horas después en ratas. Este activa el receptor de la tirosina kinasa C-Met. Es un importante mitógeno que induce la expresión de los genes durante la regeneración hepática.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico. Activa diferentes complejos y provoca la proliferación hepática.

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos. Es un factor de crecimiento que aumenta el índice de actividad mitótica y síntesis de ADN facilitando la proliferación de varias células precursoras. En el hígado pueden activar las células estrelladas transformándolas a mioepiteliales que forman el tejido fibroso, de unión y soporte del cuerpo. Activa receptores FGF (FGFR) 1-4.

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular. Es una proteína señalizadora implicada en la vasculogénesis (formación *de novo* del sistema circulatorio embrionario) y en la angiogénesis (crecimiento de vasos sanguíneos provenientes de vasos preexistentes).

IGF: Factor de crecimiento de la insulina. El factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1) es principalmente secretado en el hígado como resultado de la estimulación de la hormona del crecimiento (GH). El IGF-1 es importante para la regulación de la fisiología normal, como también lo es en numerosos estados patológicos, incluyendo el cáncer. El eje IGF ha demostrado jugar un papel en la promoción de la proliferación celular y la inhibición de la muerte celular (apoptosis). Tanto IGF-I como IGF-II son fuertes mitógenos.

TGF-beta: Activan receptores heteroméricos complejos incluidos los receptores transmembrana tipo I y II. Es un potente supresor de diferentes tipos de células endoteliales.

Activina: Activan receptores heteroméricos complejos tipo I y II. Además la Activina A tiene un rol importante en la finalización de la regeneración hepática

Además de factores o moléculas químicas, en el inicio de la regeneración actúan también factores físicos, como el “shear stress”. El “shear stress” del hígado o tensión de cizallamiento es un estímulo muy importante en el caso de hepatectomías para el inicio de esta cascada de regeneración. Tras la resección, los factores hemodinámicos, tras un aumento de flujo de la vena portal, aumentan la tensión de cizallamiento del hígado y se secreta óxido nítrico (NO), iniciándose entonces la cascada de regeneración hepática que regulará el tamaño del órgano.

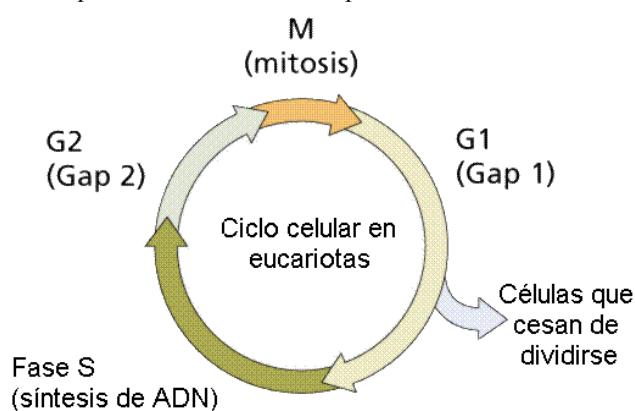
6. MECANISMO REGENERATIVO

Vistos los factores implicados, se pasa a explicar el ciclo celular y el momento en el que intervienen las citoquinas y factores anteriormente expuestos.

Como ya se ha mencionado al inicio, tras una agresión externa, aguda o crónica, se produce una respuesta regenerativa hepática específica, lo que incluye la activación de señales extracelulares e intracelulares específicas, seguido de alteraciones en la expresión génica y proteica. Ante dicha agresión, los hepatocitos entran en ciclo celular (Figura 4) y proliferan, de forma que, en última instancia se produce la restauración de la relación existente antes de la resección hepática entre tamaño del hígado y masa corporal y la normalización de la función hepática. Posteriormente, la arquitectura lobular hepática, distorsionada temporalmente por la respuesta regenerativa, se remodela y el hígado vuelve a su estado normal.

Por lo general, los hepatocitos están en una fase no divisoria (fase G0) en el hígado normal. Despues de la lesión del hígado, entran en fase G1 (Figura 4). El factor de necrosis tumoral (TNF- α) y la interleucina-6 (IL-6) son liberados por las células de Kupffer, y éstos contribuyen a la iniciación del ciclo celular (G0 a G1) mediante la unión a sus receptores. Varios factores como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y el factor de crecimiento de transformación α (TGF- α) se cree que inician la transición de G1 a S (Kwon, 2015). Estos factores estimulan la replicación del ADN y la mitosis mediante la unión a sus correspondientes receptores.

Figura 4. Esquema ciclo celular. Recuperado de: www.whfreeman.com.



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 serín 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 posteriormente, para la inhibición de la forma activa de estos enzimas. Estas dos clases de mecanismos se conectan de manera que son unas serín proteasas específicas las que activan las MMP latentes. 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. 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. La plasmina actúa sobre la pro-MMP liberando MMP que, a su vez, actúa sobre el pro-HGF liberándolo de su secuestro en la matriz (Cascales, 2008).

Para progresar a través del ciclo celular es necesario superar la transición G1-S, transición estimulada por el HGF vía de señalización mediante su receptor cMET. 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 incremento plasmático temprano (Cascales, 2008). 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 proteolisis y activado por rotura proteolítica en dos cadenas peptídicas. 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 (Cascales, 2008).

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 cMET 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 (Huh y col., 2004). 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. 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 en proceso de regeneración (Scheving y col., 2002). 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 (células estrelladas). Este crecimiento mediado por VEGF depende de la presencia de células endoteliales, y se bloquea en parte con anticuerpos HGF (Kraizer y col., 2001).

Por tanto, las serín 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. 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.

El TIMP1, el inhibidor tisular de las MMP, es esencial para la regeneración hepática porque proporciona un punto de control durante este proceso. 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. 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 (Cascales, 2008).

Las serín proteasas y las MMP poseen sus inhibidores específicos endógenos. Los animales que presentan un déficit 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 con déficit en el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI) muestran una regeneración acelerada después de la hepatectomía parcial, por lo que el sistema activador del plasminógeno juega un papel importante.

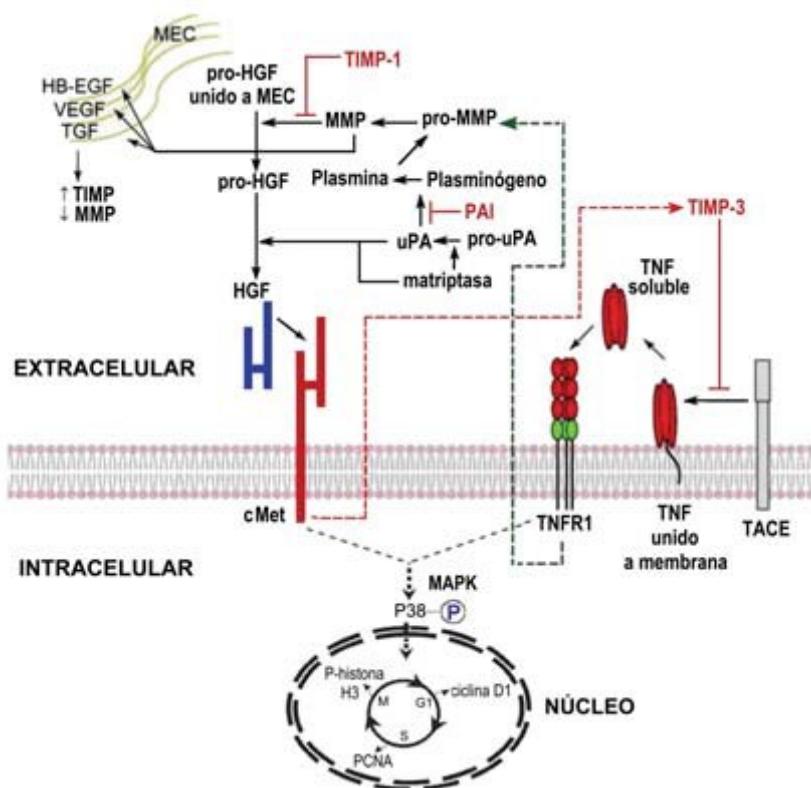
El FGF-1 (factor de crecimiento de los fibroblastos) pertenece a otra familia de moléculas pro-angiogénicas potentes, que señala mediante un grupo de receptores tirosina quinasa FGFR1-FGFR4. El FGF-1 es un mitógeno poderoso que se induce inmediatamente después de la hepatectomía parcial. El perlecano es un importante proteoglicano de heparan sulfato, que se encuentra en las membranas basales y en la matriz extracelular de todos los tejidos vascularizados. La unión de los FGF al perlecano limita la difusión y liberación de estos factores para protegerlos de la degradación proteolítica. El perlecano promueve también la activación del receptor del FGF y la mitogenesis. Las MMP-1 y MMP-3 liberan el FGF del perlecano, 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. Al igual que los TNFR solubles el ectodominio del FGFR soluble modula la actividad mitogénica y angiogénica del FGF durante la regeneración hepática (Cascales, 2008).

TGF- β 1 parece ser un inhibidor de la proliferación de hepatocitos (Bissell y col., 1995). En el hígado normal, los factores de crecimiento y TGF- β tienen efectos agonistas. Al comienzo de la regeneración, la señal de HGF es más potente que la de TGF- β , mientras que en las fases finales de la regeneración, el equilibrio original es restaurado. En este

sentido, también la activina es un inhibidor de la regeneración del hígado que suprime selectivamente la proliferación de hepatocitos (Bissell y col., 1995).

Para finalizar con lo explicado anteriormente, las serin 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. A continuación vemos una figura con la interfase pericelular de las cascadas proteolíticas e inducción de señales intracelulares. (Mohammed y col., 2005).

Figura 5. Interfase pericelular de las cascadas proteolíticas e inducción de señales intracelulares. (Mohammed y col., 2005).



Por otro lado, además de las señales moleculares también las señales físicas participan en todo este proceso. Así, en la hepatectomía de los 2/3 del hígado, se 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 tras la resección, 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. Marubashi y col. (2004) realizaron un estudio, en un modelo de shunt porto-hepático, demostrando que si estos cambios hemodinámicos se previenen, la activación del HGF es deficiente y se produce apoptosis en los hepatocitos. 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 (Khan Z., 2006). 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) (Cascales, 2008).

Los cambios hemodinámicos debidos a la hepatectomía parcial influyen también sobre la expresión temprana de genes, entre ellos el que codifica el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) (Nakatsuka y col., 2006). 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-pb (pares de bases) 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) (Nakatsuka y col., 2006). 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 de Disse, están en contacto con el flujo sanguíneo portal sinusoidal, a través de las fenestras de las células endoteliales (Cascales, 2008).

Braet y col. (2004) han evaluado los cambios en el flujo portal inmediatamente después de la hepatectomía, observando 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 (Bockhorn y col., 2007). 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.

Visto todo lo anterior, se puede decir que ante un daño hepático moderado, los hepatocitos adultos, mediante su multiplicación, pueden reemplazar por si solos a las células vecinas en pocos días, logrando la regeneración del tejido dañado. Sin embargo, ante daños hepáticos agudos severos o daños continuados a lo largo del tiempo, como en las enfermedades hepáticas crónicas, el número de hepatocitos sanos es insuficiente para llevar a cabo todo el proceso regenerativo por lo que es necesario además de la activación de las células progenitoras hepáticas (Cascales, 2009). Katoonizadeh y col.

(2006) sugirieron, que al menos se requiere un 50% de pérdida de hepatocitos para desencadenar la activación de células progenitoras hepáticas.

También ha habido una considerable discusión que las células madre hematopoyéticas derivadas de la médula ósea pueden diferenciarse en hepatocitos o células ovales y regenerar el hígado cuando todos los demás medios de regeneración fallan (Petersen y col., 1999). Una demostración de este fenómeno fue el rescate de los ratones con tirosinemia (debido a la deficiencia congénita de la enzima FAH, que participa en la degradación de la tirosina). La inyección de médula ósea de ratones normales dio lugar a un gran número de hepatocitos que aparecen normales y regeneró el hígado (Lagasse y col., 2000). Estudios posteriores, sin embargo, mostraron que las células madre hematopoyéticas tienen la capacidad de fusionarse con otras dianas celulares (Terada y col., 2002).

En otros tejidos (corazón, músculo) también se ha observado que las células madre hematopoyéticas aparentemente dan lugar a otros tipos de células no hematológicas.

Por otro lado, hay varios ejemplos de cultivos de células de médula ósea en la que, bajo la influencia de HGF, las células hematopoyéticas aparentemente se transforman en células muy similares a hepatocitos, produciendo albúmina (Miyazaki y col., 2004).

A pesar de la activación tanto de hepatocitos como de células progenitoras hepáticas ante cualquier agresión, muchas veces ante ciertos daños, agudos o crónicos, la capacidad regenerativa del hígado se ve sobre pasada, de forma que la función hepática no puede restaurarse y se genera una lesión a nivel tisular irreversible.

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 las células estrelladas. 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 (Cascales, 2008). 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 (Cascales, 2008).

Los miofibroblastos participan en la remodelación activa de la matriz extracelular en tejidos en proceso fibrogénico o reparativo, produciendo los diversos componentes de la matriz extracelular, principalmente las colágenas tipos I y III. Se han identificado diferentes factores de crecimiento, estímulos y moléculas que inducen la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos, entre éstos se encuentran el PDGF, TGF- β 1 (factor de crecimiento trasformador beta1), la IL-1 β (interleuquina 1 β), el EGF (factor de crecimiento epidérmico), el TNF α (factor de necrosis tumoral alfa), el FGF-2 o bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos), el IGF-I (factor de crecimiento de la insulina-I) y el CTGF (factor de crecimiento del tejido conectivo). Por otra parte, las isoformas del PDGF, además de inducir la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos, son potentes mitogénicos para fibroblastos (Thomasek y col., 2002). El SCF (factor de crecimiento de células madre) es otro probable estimulante en la diferenciación de las células troncales en fibroblastos (Mallat y col., 1998). Es importante destacar que el factor más potente que estimula la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos tanto *in vivo* como *in vitro* es el TGF- β 1 (Fritsch y col., 1997). Además, en el hígado el TGF- β 1 se estimula no solamente la diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos, sino también la de miofibroblastos activados en miofibroblastos estrellados (Clouthier y col., 1997). Esta diferenciación por supuesto induce toda una serie de cambios en la expresión génica, y por consiguiente también en el fenotipo de síntesis y secreción de matriz extracelular. La fibrosis es un proceso prácticamente irreversible, hecho que pesa mucho en el pronóstico desfavorable del daño hepático crónico, sin embargo, el mejor conocimiento de la fibrogénesis permitirá avanzar en las intervenciones terapéuticas efectivas, no sólo para detener el proceso, sino también para revertirlo. Diversas terapias anti-fibróticas están cercanas a su aplicación, pero aún se necesita conocer su seguridad (ausencia de efectos tóxicos) y eficacia clínica.

7. LA REGENERACIÓN Y LOS TUMORES HEPÁTICOS

En este apartado nos vamos a centrar en la regeneración hepática tras una cirugía oncológica de hígado. Como ya hemos explicado tras un daño tisular de hígado, por enfermedades metabólicas, cáncer, tóxicos, etc., se produce una cascada de regeneración hepática que consigue recuperar el volumen hepático en pocos días tras la operación.

Hay datos experimentales y clínicos (Shi y col., 2014) que indican que las señales de regeneración facilitan, además del crecimiento del tejido hepático sano, el crecimiento de los tumores hepáticos primarios y secundarios y que puede alterar su potencial maligno. Este es un importante mecanismo que subyace a la recurrencia después de la cirugía hepática. Se necesitan nuevas estrategias terapéuticas basadas en una mejor comprensión de la relación entre la regeneración hepática y la biología del tumor.

El carcinoma hepatocelular (CHC) es el tumor maligno primario más frecuente del hígado, es la causa principal de muerte entre los pacientes con cirrosis y la tercera causa de mortalidad por cáncer en todo el mundo. El pronóstico del CHC sin tratamiento específico es pobre. La cirugía del hígado, incluyendo la resección hepática y en casos seleccionados el trasplante, así como la ablación por radiofrecuencia, son las opciones de primera línea para el carcinoma hepatocelular temprano y la metástasis limitada.

El desarrollo y progresión del cáncer de hígado y metástasis de hígado es un proceso molecular multifacético, que está vinculado a alteraciones en algunas vías de señalización celular prominentes, incluyendo vía RAS / RAF-MAPK, fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) / Akt, WNT / β - catenina, similar a la insulina, factor de crecimiento vía (IGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) / c-MET vía de señalización y el crecimiento angiogénico del factor reguladas.

Se ha demostrado que los cambios celulares y moleculares siguientes a la hepatectomía, incluyendo las respuestas de estrés quirúrgicos, lesión de isquemia de reperfusión, pueden alterar la cinética de crecimiento del tumor y contribuir así a la recurrencia (Shi y Line, 2014). Los factores relacionados con el estrés quirúrgico en sí representan cambios transitorios, mientras que el proceso de regeneración del hígado puede actuar como un estímulo más fuerte y más sostenido que promueve el crecimiento de tumores ocultos y desarrollo neoplásico. La regeneración del hígado después de la cirugía proporciona un microambiente con muchos factores de crecimiento y citoquinas que son favorables para el crecimiento y propagación del tumor a través de la activación celular,

la proliferación, la migración y la angiogénesis. La mayoría de los estudios en HCC indican que los factores vinculados a la invasividad tumoral y la implicación vascular son los más importantes (Ding y col., 2013) (Zhu y col, 2010). Además, los mecanismos endocrino, paracrino y autocrino que ocurren durante la regeneración del hígado pueden influir en micrometástasis latentes y tumorogénesis en el hígado remanente.

Como hemos visto los principales resultados de la cirugía a nivel molecular son una rápida afluencia de citoquinas, como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleucina 6 (IL-6), y factores angiogénicos que alteran el microambiente de depósitos tumorales latentes distantes. Los factores de crecimiento tales como HGF, factor de crecimiento epidérmico, factor de transformación del crecimiento alfa (TGF- α) y TGF- β , que desempeñan un papel esencial en la regeneración del hígado, se ha demostrado que se asocian con un aumento de la agresividad del tumor y la metástasis (Le Pabic y col., 2003). El crecimiento del tumor requiere el equilibrio entre factores de crecimiento y citoquinas en el microambiente para favorecer la angiogénesis.

Las células epiteliales del tumor primario de hígado o recurrente, pueden además someterse a una transición de epitelial a mesenquimal y de ese modo incrementar su potencial invasivo como una respuesta a diversos estímulos dentro del microambiente del tumor. Los factores de crecimiento que se unen a los receptores tirosín quinasa, tales como EGF, HGF, TGF- β , FGF y MMP, pueden promover dicha transición en células carcinogénicas (Shi y col., 2014). Por tanto, estos factores son regulados por la cirugía del hígado y, en la remodelación de la matriz extracelular durante la regeneración del hígado, pueden producir un mayor crecimiento y potencial metastásico en el caso de las células tumorales remanentes.

Los cánceres hepatocelulares que se derivan de células progenitoras se han identificado por el hecho de que muchos tumores de HCC humanos contienen una mezcla de hepatocitos maduros y unos fenotipos intermedios entre células progenitoras hepáticas (CPH) y hepatocitos maduros, similar a las células progenitoras (Boer y col., 1999) (Shan y col., 2013). Los hepatocarcinomas que se derivan de CPH, muestran un pronóstico significativamente peor y una mayor tasa de recurrencia después de la resección quirúrgica. Además, el reclutamiento de células progenitoras se ha demostrado que contribuyen a la formación de cáncer de hígado en un modelo

preclínico (Shi y col., 2014) y probablemente dan lugar a HCC así como a colangiocarcinoma intrahepático, apoyando la opinión de que las células progenitoras en algunos casos tienen un papel crítico en la iniciación y progresión de cáncer de hígado.

Las células progenitoras también pueden afectar a la progresión de carcinoma hepatocelular a través de la contribución indirecta de factores de crecimiento. En modelos de roedores experimentales con la implantación del tumor intrahepático y la resección hepática concomitante, la presencia de tumor parece estimular la regeneración del hígado en los principales animales resecados (> 70%) en comparación con los animales sin tumor resecado, y esto podría posiblemente ser atribuido en parte a la activación de células progenitoras (Oosthuizen y col., 2005). Del mismo modo, *in vitro* y en modelos *in vivo*, la influencia de las células progenitoras sobre las células cancerígenas de roedores y tumores experimentales indican que las células progenitoras provocan en las células de HCC un fenotipo de células madre haciéndolas más resistentes a la quimioterapia y dando lugar a la aparición de tumores de crecimiento más rápido y con mayor potencial invasivo y metastásico. Estos cambios parecen ser en parte relacionados con la activación de las vías de la MAPK (proteín quinasas activadas por mitógenos), PI3K/Akt (fosfatidil-inositol--kinasa), TGF- β 1 (factor de crecimiento transformante tipo beta) y WNT / β -catenina (Shi y col., 2014).

8. APPLICACIONES CLÍNICAS PRINCIPALES Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

El conocimiento de los mecanismos de regeneración hepática ha permitido el desarrollo de estrategias clínicas dirigidas a la mejora de la calidad de vida de los afectados por enfermedades hepáticas, intentando restaurar la función fisiológica del hígado y disminuyendo por tanto el grado de disfunción hepática.

La embolización de la vena porta es el mejor ejemplo de cómo la investigación en regeneración hepática ha influido en la aplicación clínica. Es una técnica que se realiza antes de la resección hepática para que el tejido que no va a ser resecado amplíe su volumen y evitar así un fallo hepático post-hepatectomía por falta de tejido para llevar a cabo las funciones hepáticas. Fue descrito por primera vez por Kinoshita y col. (1994). En general, existen dos enfoques para la oclusión de la vena portal: embolización de la vena porta vía radiológica o ligadura de la vena porta vía quirúrgica. Después de esta lesión del hígado, diversos factores de crecimiento activados se trasportan desde el intestino hasta el hígado. Estos factores viajan a través del flujo portal, no de la arteria hepática, e inducen una serie de cambios moleculares y celulares. Schindl y col. (2005) observaron una relación entre la puntuación de disfunción hepática y el volumen hepático residual relativo e identificaron un volumen relativo mínimo del 26,6% necesario para evitar la disfunción hepática grave en hígados normales. Si el tamaño del hígado remanente excede del 30% del volumen original, la hepatectomía puede realizarse con seguridad. En hígados cirróticos, el umbral es del 50% basado en la práctica actual y datos disponibles (Schindl y col., 2005).

Otro caso de aplicación es el trasplante de hígado de donante vivo en el que se trasplanta solamente una parte de la masa hepática en el receptor de forma que dicha masa transplantada se regenera hasta alcanzar el tamaño apropiado. El trasplante de hígado de donante vivo es la opción terapéutica más estudiada en la regeneración del hígado. Aunque hay muy buenos resultados clínicos de diferentes centros de investigación, todavía hay obstáculos que superar. En 2008, Ghobrial y col. examinaron la morbilidad de pacientes transplantados de donante vivo. Las complicaciones generales

fueron del 38% (148 donantes sufrieron un total de 220 complicaciones). Aunque para la seguridad de los donantes, es necesario reducir al mínimo el tamaño del injerto, el tamaño del injerto en el donante se relaciona positivamente con su pronóstico, por lo que el equilibrio entre donante y receptor debe ser fundamental.

Entendiendo la regeneración hepática también se han conseguido avances en el síndrome “small-for size”, cuadro clínico caracterizado por el uso de un injerto de menor tamaño al necesario y una alteración del sistema de flujo venoso hepático de salida, que conduce a un amplio espectro de entidades clínicas como la pérdida del injerto o necesidad de re-trasplante. Las principales causas de éste síndrome son la hipertensión e hiperflujo portal. No siempre un injerto proporcionalmente de menor tamaño para el receptor se asocia a la aparición de complicaciones, lo que pone de manifiesto que existen otros factores involucrados en la patogenia de este síndrome. Por ejemplo, se ha descrito como factores la alteración en la expresión de genes involucrados en la regulación hemodinámica, en la remodelación celular y en la respuesta al estrés (Man, 2003). También se ha planteado que la respuesta inmune en contra del órgano implantado que se encuentra en regeneración pudiera ser mayor que en injertos completos (Yang, 2004).

En el caso de la regeneración tras resección de tumores, en el tratamiento de las lesiones cancerígenas podemos emplear tanto la resección del tumor, el trasplante hepático, la ablación local y la quimioembolización arterial transcatéter. Siempre que hay una recaída el pronóstico para el paciente empeora, por lo que hay que tener muy en cuenta el tipo de tratamiento que se le aplica en un primer momento y el que se realiza en la recaída, si el tiempo entre la primera resección y la recaída es corto, disminuye la supervivencia. El estudio de la regeneración hepática contribuye a un tratamiento más adecuado para cada paciente de forma individualizada, intentando evitar recaídas y aumentando así la supervivencia.

Existe un gran número de enfermedades hepáticas en las que el único tratamiento efectivo en la actualidad es el trasplante hepático. Sin embargo, su principal limitación se encuentra en la falta de órganos disponibles, lo que genera un desequilibrio entre pacientes y receptores y una significativa lista de espera, que conlleva un aumento de la mortalidad. Se plantea la urgente necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas.

La terapia celular se considera hoy una estrategia terapéutica de vanguardia complementaria al trasplante de órgano sólido.

Las ventajas objetivas que presenta el trasplante de hepatocitos frente al trasplante de órgano lo convierten en una alternativa muy estudiada. El trasplante de hepatocitos permitiría mantener las funciones hepáticas durante el período puente hasta la obtención de un órgano adecuado, o incluso en casos de fallo hepático fulminante permitiría la regeneración hepática, lo que implicaría la recuperación de la función del órgano. Los resultados de este tratamiento indican que puede ser una técnica muy útil en la medida en que dispongamos de hepatocitos humanos de calidad, viables y metabólicamente funcionales (Koh, 2006). Por otra parte, se trata de un método poco invasivo, que gracias la posibilidad de criopreservación celular se puede realizar de forma semiprogramada, y posibilita el tratamiento de varios receptores a partir de un único donante.

Debido a las dificultades técnicas que presenta el trasplante de hepatocitos por su baja disponibilidad de células (ya que los hepatocitos se obtienen de órganos rechazados para trasplante ortotópico) y por su baja implantación en el tejido receptor (entre el 5-10% de las células), en la actualidad, a nivel experimental, la actuación dentro de la medicina regenerativa hepática va encaminada al estudio de la terapia con células madre para conseguir la regeneración del hígado enfermo, bien a través de su trasplante directo (diferenciadas o no a hepatocitos) o bien mediante la infusión de los factores secretados por algunas de estas células para promover la regeneración natural del propio tejido.

Las células madre y sus descendientes (células progenitoras) son capaces de proliferar y la diferenciarse en células especializadas. Las células madre se definen por su capacidad de auto-renovación, es decir, de mantener una población de células con propiedades idénticas mediante mecanismos de división celular simétrica y asimétrica. Estas terapias podrían aplicarse tanto en patologías agudas como crónicas. Sin embargo, como en todas las terapias basadas en el trasplante celular es necesario de la pre-existencia de una arquitectura hepática bien conservada que facilite la implantación de las células en el tejido y la posterior regeneración.

Las células madre embrionarias se derivan de las masas de células internas de blastocistos humanos. Se aislaron por primera vez en 1998 por el grupo de Thomson en la Universidad de Wisconsin. Debido a sus capacidades combinadas, tanto de expansión potencial ilimitada como de pluripotencia, las células madre embrionarias parecen ser una fuente ideal para el reemplazo de tejidos después de una lesión o en enfermedades metabólicas. En 2007, Soto-Gutierrez y col., diseñaron un protocolo que describe un sistema de cultivo para la diferenciación *in vitro* de células madre embrionarias de ratón en células hepáticas. La diferenciación implica cuatro etapas: la formación de cuerpos embrioides, la inducción de endodermo definitivo de 2 días de edad, la inducción de células progenitoras hepáticas y la maduración en las células hepáticas. La diferenciación se completa en 16 días. A nivel clínico su uso todavía presenta serios inconvenientes. Actualmente no hay tratamientos clínicos aprobados que las empleen por varias razones: la acumulación de mutaciones espontáneas y la reordenación cromosómica. Por otra parte, las cuestiones éticas y obstáculos técnicos, como la diferenciación *ex vivo* de células madre embrionarias en células hepáticas funcionales, o su inmunogenicidad tras trasplante, son otros problemas que impiden su aplicación médica en la actualidad.

Otro subgrupo de células madre pluripotentes que actualmente se están estudiando para poder regenerar el hígado en casos de enfermedad hepática son las células madre pluripotentes inducidas (iPS). Las células iPS se obtuvieron por primera vez en el año 2006 a partir de células de ratones (Takahashi y Yamanaka, 2006), y en 2007 a partir de células humanas (Takahashi y col., 2007). En 2006, se describió por primera vez este proceso a partir de fibroblastos de ratón utilizando retrovirus que vehiculizaban e inducían la expresión de varios genes exógenos. Recientemente se ha publicado una revisión sobre esta primera metodología (Miller y Schlaeger, 2011). Este logro se considera uno de los avances más importantes de la investigación con células madre, ya que permite obtener células madres pluripotenciales a partir de células adultas. Estas células se pueden generar mediante la reprogramación de células somáticas maduras (por ejemplo, procedentes de tejidos de la piel del adulto humano) mediante la transfección retroviral de diversos factores de transcripción (Takahashi, 2007). El trasplante autólogo de iPS presentaría ventajas frente al trasplante y uso de células embrionarias ya que por un lado no supondría problemas éticos y por otro al proceder del propio individuo no requerirían de inmunosupresión en el paciente. En la actualidad,

la aplicación clínica se ve obstaculizada, el problema es que no se consigue tampoco diferenciarlas a células hepáticas plenamente funcionales, y podrían producir tumores como las embrionarias, y además, las iPS son células que tienden a envejecer de forma más rápida que el resto de células.

En el hígado adulto las células madre están representadas por células progenitoras hepáticas (CPH), que se pueden aislar y cultivar fácilmente. En el pasado, el principal factor limitante en el estudio de CPH ha sido la incapacidad para identificar, aislar o purificar estas células de una manera fiable. Recientemente, Cardinale y col. (2011), aislaron con éxito células multipotentes madre progenitoras del árbol biliar humano por técnicas de cultivo celular, y demostraron que estas células progenitoras son capaces de dar lugar a hepatocitos, colangiocitos, y a islotes pancreáticos. Por lo tanto, las CPH pueden suponer otra fuente celular en medicina regenerativa para las enfermedades hepáticas.

Otras células, las células mesenquimales (MSC), se ha observado que tienen efectos terapéuticos para la insuficiencia hepática. Estos efectos se basan en su capacidad de diferenciarse en hepatocitos y alterar la función de las células inmunes responsables de la lesión hepática aguda (Shi y col., 2012). Estas células liberan factores tróficos e inmunomoduladores y atenúan la proliferación de las células NKT (Natural Killer T Cell) y promueven la apoptosis de las células estrelladas (Shi y col., 2012). Las células madre mesenquimales se asignan a la población de células madre adultas y se pueden encontrar en el compartimento perivascular del hígado y la mayoría de otros órganos. Se pueden aislar a partir de una variedad de tejidos, tales como la médula ósea, tejido adiposo, el tejido del cordón umbilical y el líquido amniótico y puede dar lugar a células como los hepatocitos (Shi y col., 2012). Las células madre mesenquimales se presentan como una fuente prometedora para el trasplante ya que parecen tener un bajo riesgo de rechazo después de su administración. Al parecer, juegan un papel cada vez más importante como una fuente de células trasplantables en varios tipos de enfermedad hepática (Shi y col., 2012).

Para acabar, otra área muy interesante en el que se está trabajando extensamente a nivel experimental para poder ser trasladado en un futuro a la práctica clínica es todo lo relativo a la ingeniería de tejidos. Teniendo en cuenta los mecanismos de regeneración

hepática y las células y factores implicados, tanto químicos como físicos, la ingeniería de tejidos puede ser una opción terapéutica útil para el tratamiento de enfermedades hepáticas en un futuro. La ingeniería de tejidos combina células y soportes biológicos, los cuales activos juegan un papel crítico mediante la regulación de las funciones celulares y la inducción de la formación de nuevos tejidos y órganos. Proporcionan un espacio adecuado para las células trasplantadas, así como señales físicas y biológicas que promueven la adhesión, migración, proliferación y diferenciación, y también reúne las células que han proliferado en los tejidos funcionales y órganos. En 2010, Ott y col., crearon un pulmón artificial biológico a partir de pulmones descelularizados. A partir de entonces fueron capaces de transplantar con éxito los pulmones artificiales regenerados en la posición ortotópica. En 2010, Uygun y col., demostraron la arquitectura de un hígado 3-D descelularizado de rata, así como su vasculatura funcional y la composición de la matriz original. Además, lograron la recelularización del injerto *in vitro*. Este hígado artificial era viable por sí mismo. En 2013, Takebe y col., construyeron un órgano humano funcional a partir de células madre pluripotenciales. Generaron hígados humanos funcionales *in vitro* con vasculatura a partir de células madre iPS humanas para el trasplante de hígado.

Por otro lado, la impresión 3-D se refiere a una variedad de procesos para la fabricación de objetos tridimensionales a partir de un modelo de 3D o de otras fuentes de datos electrónicos principalmente a través un proceso aditivo en el que las sucesivas capas de material se establecen bajo el control del equipo. En un futuro próximo, podríamos ser capaces de generar hígados bio-impresos utilizando la tecnología de impresión 3D.

Por lo tanto, la investigación en regeneración hepática podría tener una gran aplicación a la práctica clínica de los enfermos hepáticos, mejorando su calidad de vida y disminuyendo las complicaciones derivadas de las enfermedades de este órgano. Todas las aplicaciones nombradas anteriormente están ahora mismo en estudio, mejorando de una forma rápida y obteniendo buenos resultados.

9. CONCLUSIONES

La regeneración hepática es un tema estudiando desde hace décadas, pero ha sido en las últimas en las que se ha entendido mejor su mecanismo, quizá esto también debido a los avances tecnológicos.

Investigaciones recientes se han centrado en la comprensión de la regeneración del hígado después de la resección hepática y el trasplante de hígado. El uso de los nuevos descubrimientos podría cambiar las estrategias para el tratamiento de disfunciones hepáticas como la insuficiencia hepática post-hepatectomía, síndrome pequeño para el tamaño del injerto, el fallo hepático agudo (por diferentes causas), enfermedades metabólicas, etc.

La regeneración hepática tiene numerosas aplicaciones clínicas: el uso de la técnica de oclusión de vena portal debería permitir la eliminación de grandes volúmenes de tejido hepático con una disminución del riesgo de insuficiencia hepática; el trasplante de hepatocitos que trata de ser una alternativa parcial o total al trasplante convencional y que tiene como objetivo la recuperación y mantenimiento de las funciones hepáticas hasta disponer de un órgano compatible, sustituir de forma temporal la función de los hepatocitos y, en los errores congénitos del metabolismo, reemplazar el déficit enzimático causante de la enfermedad, bien como puente al trasplante hepático (TH) o bien hasta conseguir la recuperación de la función enzimática.. Por tanto, la terapia celular podría ofrecer un mejor resultado para el trasplante de donante vivo, lo cual se ve siempre limitado por la necesidad de un número suficiente de donantes. Otros enfoques más recientes apuntan al trasplante de células madre como el trasplante de células madre no hepáticas. Los resultados de los experimentos son prometedores por lo que en un futuro podrían ser una terapia eficaz para el tratamiento de la insuficiencia hepática aguda.

Por lo tanto, la investigación sobre los mecanismos de regeneración del hígado hasta permitiendo el desarrollo de nuevas estrategias para la detección y el tratamiento de una gran variedad de enfermedades hepáticas.

En esta revisión hemos hecho una mención especial a la regeneración hepática post-cirugía oncológica. La regeneración después de la cirugía proporciona un microambiente con muchos factores de crecimiento y citoquinas que son necesarias para la proliferación de hepatocitos maduros, pero concomitantemente favorable para la progresión del tumor en el hígado. Las células progenitoras pueden bajo ciertas condiciones ser activadas después de una cirugía mayor, y pueden tener un efecto estimulante y nutritivo en los tumores hepáticos. Una mejor comprensión de la relación entre la regeneración hepática y la propagación del tumor de hígado es de importancia para el manejo clínico del paciente con tumores hepáticos primarios y secundarios, y proporcionará una base para nuevas estrategias terapéuticas con el fin de minimizar la recurrencia del cáncer después de la cirugía hepática.

10. VALORACIÓN PERSONAL

En primer lugar me gustaría agradecer a la Dra. Solanas la oportunidad de haber hecho este tema en el TFG y su atención y ayuda a lo largo de todo el cuatrimestre.

He podido hacer una revisión de diferentes artículos sobre el tema de regeneración hepática y me ha parecido muy interesante. Creo que es un campo de investigación muy importante ya que sus avances influyen directamente no solo en la supervivencia, sino también en la calidad de vida de los afectados de estas patologías, que es común en nuestra sociedad.

La regeneración hepática no es un estudio reciente, desde hace décadas se lleva estudiando e investigando su fisiología, mecanismos, factores implicados y, en consecuencia sus aplicaciones clínicas, si bien es cierto que en los últimos años ha habido un cambio importante, probablemente debido también a los avances tecnológicos que dan la posibilidad de avanzar en los estudios clínicos.

Desgraciadamente, por otro lado, la investigación en España actualmente no tiene la capacidad económica de ser sustentada, y tanto investigadores (11.000 desde el año 2010) como diferentes proyectos se ven mermados en sus avances por este motivo. Creo que es fundamental para el desarrollo de la ciencia, y la medicina en este caso, que se apoye más al campo de la investigación, y que además, dichas investigaciones se apliquen a la práctica clínica para evolucionar y mejorar la calidad y la esperanza de vida de los afectados por enfermedades que, en algunos casos hoy en día son incurables.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bissell DM, Wang S , Jarnagin WR, Roll F J. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest.* 1995; 96: 447 – 455.
- Boer CJ, van Krieken JH, Janssen-van Rhijn CM, Litvinov SV. Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol.* 1999; 188: 201 - 206.
- Braet F, Shleper M, Paizi M, Brodsky S, Kopeiko N, Resnick N, Spira G. Liver sinusoidal endothelial cell modulation upon resection and shear stress in vitro. *Comp Hepatol.* 2004; 1: 3 - 7.
- Bockhorn M, Goralski M, Prokofiev D. VEGF is important for early liver regeneration after partial hepatectomy. *J Surg Res.* 2007; 138: 291 - 298.
- Cascales AM .Anatomía hepática. Sistemas celular y vascular. Bases celulares y Moleculares de la Regeneración hepática pp 11-34. Instituto de España. Madrid. 2008.
- Cardinale V, Wang Y, Carpino G, Cui CB, Gatto M, Rossi M, Berloco PB, Cantafora A, Wauthier E, Furth ME, Inverardi L, Dominguez-Bendala J, Ricordi C, Gerber D, Gaudio E, Alvaro D, Reid L. Multipotent_stem/progenitor cells in human biliary tree give rise to hepatocytes, cholangiocytes, and pancreatic islets. *Hepatology.* 2011; 54: 2159 - 2172.
- Cardinale V, Carpino G, Gentile R, Napoletano C, Rahimi H, Franchitto A, Semeraro R, Nuti M, Onori P, Berloco PB, Rossi M, Bosco D, Brunelli

R, Fraveto A, Napoli C, Torrice A, Gatto M, Venere R, Bastianelli C, Aliberti C, Salvatori FM, Bresadola L, Bezzi M, Attili AF, Reid L, Gaudio E, Alvaro D. Transplantation of human fetal biliary tree stem/progenitor cells into two patients with advanced liver cirrhosis. *BMC Gastroenterol.* 2014; 4: 114 - 204.

- Clouthier DE, Comerford SA, Hammer RE. Hepatic fibrosis, glomerulosclerosis, and a lipodystrophy-like syndrome in PEPCK-TGF-beta1 transgenic mice. *J Clin Invest.* 1997; 1: 2697 - 2713.
- De Boer CJ, van Krieken JH, Janssen-van Rhijn CM, Litvinov SV. Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol.* 1999; 188: 201 - 206.
- Ding X, Carrasco-Avino G, Thung SN, Roayaie S. A two-step right hepatic lobectomy with portal vein ligation for large_hepatocellular carcinoma: rapid induction of left-lobe_regeneration_and clinicopathologic correlation. *Semin Liver Dis.* 2013; 33: 293 - 297.
- Fritsch C, Simon-Assmann P, Kedinger M, Evans GS. Cytokines modulate fibroblast phenotype and epithelial-stroma interactions in rat intestine. *Gastroenterology* 1997; 112: 826 - 838.
- Ghobrial RM, Freise CE, Trotter JF, Tong L, Ojo AO, Fair JH, Fisher RA, Emond JC, Koffron AJ, Pruett TL, Olthoff KM. A2ALL Study Group. Donor morbidity after living donation for liver transplantation. *Gastroenterology.* 2008; 135: 468 - 476.
- Huh CG, Factor VM, Sanchez A. Hepatocyte growth factor/c-met signalling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 4477 - 4482.

- Katoonizadeh A, Nevens F, Verslype C, Pirenne J, Roskams T. Liver regeneration in acute severe liver impairment: a clinicopathological correlation study. *Liver Int.* 2006; 26: 1225 - 1233.
- Khan Z, Michalopoulos GK, Stoltz DB. Peroxisomal localization of hypoxia-inducible factors and hypoxia-inducible factor regulatory hydroxylases in primary rat hepatocytes exposed to hypoxia-reoxygenation. *Am J Pathol* 2006; 56: 169 - 175.
- Koh M¹, Okamoto E, Yamanaka J, Fujimoto J. Impact of donor age on the growth of young recipient rats after liver transplantation. *Surg Today*. 2006; 36: 457 - 464.
- Kraizer Y, Mawasi N, Seagal J. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin in liver regeneration, *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 287: 209 - 215.
- Huang J., Rudnick David A. Elucidating the Metabolic Regulation of Liver Regeneration. *Am J Pathol*. 2014; 184: 309–321.
- Lagasse E¹, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. 2000; 6: 1229 - 1234.
- Le Pabic H, Bonnier D, Wewer UM, Coutand A, Musso O, Baffet G, Clément B, Théret N. ADAM12 in human_liver_cancers: TGF-beta-regulated expression in stellate cells is associated with matrix remodeling. *Hepatology*. 2003; 37: 1056 - 1066.
- Mallat A, Gallois C, Tao J, Habib A, Maclouf J, Mavrier P. Platelet-derived growth factor-BB and thrombin generate positive and negative signals for human hepatic stellate cell proliferation. Role of a prostaglandin/cyclic AMP

pathway and cross-talk with endothelin receptors. *J Biol Chem* 1998 ; 273: 27300 - 27305.

- Man K, Lo CM, Lee TK, Li XL, Ng IO, Fan ST. Intragraft gene expression profiles by cDNA microarray in small-for-size liver grafts. *Liver Transpl* 2003; 9: 425 - 432.
- Marubashi S, Sakon M, Nagano H. Effect of portal hemodynamics on liver regeneration studied in a novel portohepatic shunt rat model. *Surgery*. 2004; 136: 1028 - 1037.
- Michalopoulos GK. Principles of liver regeneration and growth homeostasis. *Compr Physiol*. 2013; 3: 3485 - 3513.
- Miller JD, Schlaeger TM. Generation of induced pluripotent stem cell lines from human fibroblasts via retroviral gene transfer. *Methods Mol Biol*. 2011; 767: 55 - 65.
- Miyazaki M, Masaka T, Akiyama I, Nakashima E, Sakaguchi M, Huh NH. Propagation of adult rat bone marrow-derived hepatocyte-like cells by serial passages in vitro. *Cell Transplant*. 2004 ;13: 385 - 391.
- Nakatsuka H, Takaaki S, Yamamoto K. Shear stress induces hepatocyte PAI-1 gene expression through cooperative Sp1/Ets-1 activation of transcription. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006; 111: 29 - 38.
- Nayoun Kim, Seok-Goo Cho. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Korean J Intern Med*. 2013; 28: 387 - 402.
- Oosthuizen MM, Ndaba N, Myburgh JA. Rat hepatoproliferin revealed the status of a complete hepatomitogen in human hepatoma cells. *Transplant Proc*. 2005; 37: 89 - 92.

- Ott HC, Clippinger B, Conrad C, Schuetz C, Pomerantseva I, Ikonomou L, Kotton D, Vacanti JP. Regeneration and orthotopic transplantation of a bioartificial lung. *Nat Med.* 2010; 16: 927 – 933.
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science.* 1999; 14: 1168 - 1170.
- Reid L. Paradoxes in studies of liver regeneration: Relevance of the parable of the blind men and the elephant. *Hepatology.* 2015; 20: 25 - 37.
- Scheving LA, Stevenson MC, Taylormoore JM. Integral role of the EGF receptor in HGF-mediated hepatocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 290: 197 - 203.
- Schindl MJ, Redhead DN, Fearon KC, Garden OJ, Wigmore SJ. The value of residual liver volume as a predictor of hepatic dysfunction and infection after major liver resection.. *Edinburgh Liver Surgery and Transplantation Experimental Research Group (eLISTER).* *Gut.* 2005; 54: 289 - 296.
- Shan SW, Fang L, Shatseva T, Rutnam ZJ, Yang X, Du W, Lu WY, Xuan JW, Deng Z, Yang BB. Mature_miR-17-5p and passenger miR-17-3p induce_hepatocellular carcinoma_by targeting PTEN, GalNT7 and vimentin in different signal pathways. *J Cell Sci.* 2013; 15: 126 - 133.
- Shi JH, Line PD. Effect_of_liver regeneration_on_malignant_hepatic tumors. *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 16167 - 16177.
- **Shi JH¹, Scholz H, Huitfeldt HS, Line PD.** The effect of hepatic progenitor cells on experimental hepatocellular carcinoma in the regenerating liver. *Scand J Gastroenterol.* 2014; 49: 99 - 108.

- Shi M, Zhang Z, Xu R, Lin H, Fu J, Zou Z, Zhang A, Shi J, Chen L, Lv S, He W, Geng H, Jin L, Liu Z, Wang FS. Human mesenchymal stem cell transfusion is safe and improves_liver_function in acute-on-chronicliver failure_patients. *Stem Cells Transl Med.* 2012; 1: 725 – 731.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007; 30: 861 - 872.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of_pluripotent_stem_cells_from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 25: 663 - 676.
- Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, Zhang RR, Ueno Y, Zheng YW, Koike N, Aoyama S, Adachi Y, Taniguchi H. Vascularized and functional_human_liver from an iPSC-derived_organ_bud transplant. *Nature.* 2013; 25: 481 - 484.
- Tanaka H, Kinoshita H, Hirohashi K, Kubo S, Otani S. **Two-stage hepatectomy with preoperative portal vein embolization in rats.** *Nihon Geka Gakkai Zasshi.* 1994; 95: 102 - 108.
- Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. Bone marrow_cells_adopt the phenotype of other_cells_by spontaneous cell fusion. *Nature.* 2002; 4: 542 - 545.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998; **282** :1145 - 1147.

- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3: 349 – 363.
- Torrice A, Gatto M, Venere R, Bastianelli C, Aliberti C, Salvatori FM, Bresadola L, Bezzi M, Attili AF, Reid L, Gaudio E, Alvaro D. Transplantation of human fetal biliary tree stem/progenitor cells into two patients with advanced liver cirrhosis. *BMC Gastroenterol.* 2014; 4: 114 - 204.
- Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, Izamis ML, Guzzardi MA, Shulman C, Milwid J, Kobayashi N, Tilles A, Berthiaume F, Hertl M, Nahmias Y, Yarmush ML, Uygun K. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized_liver_graft using decellularized_liver_matrix. *Nat Med.* 2010; 16: 814 - 820.
- Yang ZF, Ho DW, Chu AC, Wang YQ, Fan ST. Linking inflammation to acute rejection in small-for-size liver allografts: the potential role of early macrophage activation. *Am J Transplant.* 2004; 4: 196 - 209.
- **Yong Jin Kwon, Kyeong Geun Lee, y Dongho Choi.** Clinical implications of advances in liver regeneration. *Clin Mol Hepatol.* 2015; 21: 7 - 13.
- Zhu BD, Li XL, Liu Y, Chang J, Liu Y, Zhang DD, Wang Q, Ren J, Cui CP. Involvement_of hepatopoietin Cn in the development of human_hepatocellular carcinoma. *Clin Exp Metastasis.* 2010; 27: 571 - 580.