

XXXIV CONGRESO ANUAL DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA PARA EL ESTUDIO DEL HÍGADO

Nuevos mecanismos en la defensa natural del hígado frente a la lesión

C. Berasain*, J. Castillo, M. Iñiguez, M.J. Perugorria, U. Latasa, S. Goñi, J. Prieto y M.A. Ávila

División de Hepatología y Terapia Génica, CIMA, Universidad de Navarra, Pamplona, España

El hígado desempeña un papel central no sólo en el metabolismo energético del organismo, sino en su protección y la desintoxicación, mediante el metabolismo y la eliminación de productos de desecho y productos tóxicos. Como consecuencia de la exposición a estas sustancias tóxicas, el hígado ha desarrollado numerosos mecanismos de defensa que le permiten tanto protegerse del daño como recuperarse de él¹. La capacidad de regeneración del hígado se conoce desde la antigüedad. La masa hepática perdida tras una hepatectomía parcial es rápidamente recuperada mediante la activación de diferentes rutas en las que se encuentran implicadas citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o las interleucinas IL-6 e IL-1 β , factores de crecimiento como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) o los ligandos del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), y metabolitos, como los ácidos biliares². La activación de estas vías tiene como fin último la inducción de la proliferación de los hepatocitos para preservar la capacidad funcional del hígado, pero también participan en la inducción de mecanismos antiapoptóticos de supervivencia a través de las rutas de NF- κ B, MAPK y PI3K¹.

En diferentes situaciones patológicas, estos mecanismos de defensa se ven superados y, como consecuencia, se produce un aumento en la muerte de los

hepatocitos, tanto por necrosis como por apoptosis³. La apoptosis masiva de los hepatocitos es característica de las enfermedades hepáticas agudas, como las hepatitis virales, las reacciones a fármacos, tóxicos o alcohol y el rechazo a los trasplantes. La apoptosis persistente es una característica de las enfermedades hepáticas crónicas, como las hepatitis virales y alcohólicas, y las enfermedades metabólicas y autoinmunes. En estas situaciones, la activación sostenida de la respuesta reparadora y cicatrizante conlleva el desarrollo de la fibrosis y la cirrosis y, en último término, del hepatocarcinoma (HCC)³.

Es necesario un mejor conocimiento tanto de los mecanismos que median el daño hepático como de los mecanismos endógenos defensivos de supervivencia y regeneración activados en el hígado en respuesta al daño. Esto permitirá el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas capaces de reducir el daño hepatocelular sin inhibir el potencial regenerador del hígado o, incluso, potenciándolo.

En la presente revisión se describen nuevas estrategias terapéuticas farmacológicas para el tratamiento del daño hepático inducido por isquemia/reperfusión (I/R), basadas en un mejor conocimiento de los mecanismos protectores endógenos activados durante el precondicionamiento isquémico (PI)⁴. Además, se revisa el papel de la anfíregulina (AR), un ligando del EGFR en la progresión del daño hepático y su posible utilización como diana terapéutica dual, tanto para el tratamiento del daño hepático agudo como del HCC⁵.

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: cberasain@unav.es (C. Berasain).

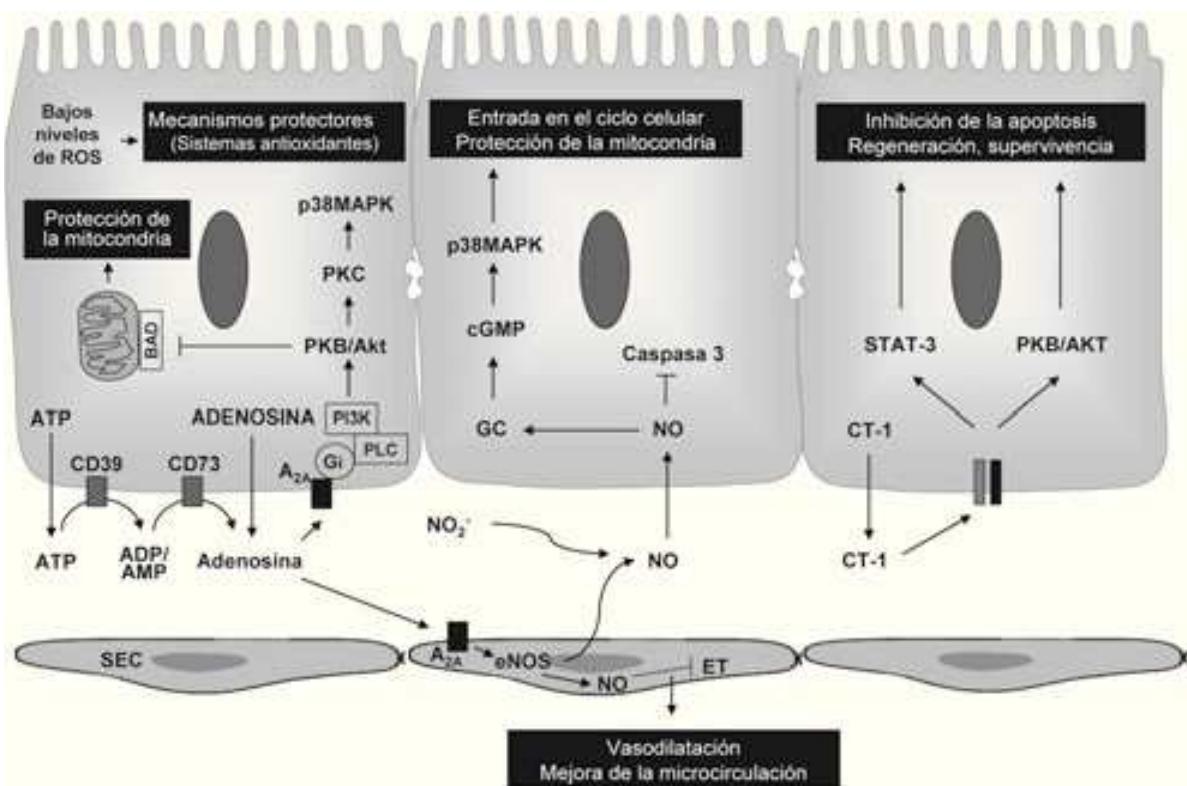


Figura 1 Mecanismos protectores que participan en el precondicionamiento isquémico. La adenosina liberada tras el daño o producida por la actividad de nucleotidasas transmembrana (CD39/CD73) activa a través de los receptores A_{2A} señales de supervivencia para los hepatocitos. En las células endoteliales sinusoidales (SEC), la adenosina induce la producción de óxido nítrico (NO) mediante la activación de la óxido nítrico sintasa (eNOS). Este NO, junto con el producido tras la reducción de los nitritos, inhibe la apoptosis e induce señales de supervivencia en los hepatocitos. Estos efectos son también activados tempranamente en las células parenquimales por la acción de citocinas como la cardiotrofina-1 (CT-1).

Mecanismos endógenos protectores en el precondicionamiento isquémico. Aplicaciones terapéuticas en el tratamiento del daño hepático por isquemia y reperfusión

El daño por isquemia y reperfusión (I/R) se produce cuando el flujo sanguíneo del hígado se interrumpe o disminuye de forma importante durante un tiempo, tras el cual es restaurado. La isquemia puede producir muerte celular, pero principalmente prepara a las células para el daño intenso que ocurre con la reperfusión. El daño por I/R tiene gran importancia clínica, dado que puede ser la causa de un fallo hepático tras el trasplante o comprometer la función del hígado remanente en las resecciones hepáticas⁶. La preservación de la viabilidad y las funciones hepáticas es esencial en estos procedimientos quirúrgicos y la identificación de compuestos protectores puede, además, hacer posible la utilización para el trasplante de los llamados órganos marginales, como los hígados estea-tósicos o los provenientes de donantes con avanzada edad o corazón parado.

En la actualidad, las únicas estrategias protectoras utilizadas de forma sistemática son quirúrgicas: el clampaje intermitente y el precondicionamiento isquémico (PI), que consiste en un breve período de isquemia seguido de una reperfusión transitoria previa al proceso isquémico prolongado⁷. La identificación de los mecanismos causantes del daño por I/R puede proporcionar nuevas dianas para la intervención terapéutica, y el conocimiento de los mecanismos endógenos defensivos activados por el PI puede permitir el diseño de estrategias terapéuticas farmacológicas que imiten o potencien estas respuestas endógenas^{4,8}.

Los mecanismos protectores activados durante el PI son complejos y suponen, además, la interacción de diferentes tipos celulares (fig. 1)^{4,9}. Durante el PI se produce una rápida acumulación de adenosina en el medio extracelular¹⁰ que, mediante la interacción con los receptores de adenosina A_{2A}, supone la activación de una cascada protectora constituida por proteínas G, fosfolipasa C, fosfatidilinositol-3-cinasa, proteincinasa C y p38⁹. Se ha demostrado que el tratamiento con adenosina o agonistas de su receptor mimetiza el

efecto protector del PI y protege del daño por I/R^{10,11}. De acuerdo con estos datos, en un trabajo reciente se ha demostrado que la actividad de la enzima transmembrana ecto-5'-nucleotidasa (CD73) participa en la generación de adenosina extracelular y en el efecto protector del PI¹². En este trabajo, el tratamiento con la enzima 5'-nucleotidasa soluble se presenta como una nueva estrategia terapéutica, al proteger frente al daño por I/R mediante el aumento de la concentración de adenosina extracelular¹². La concentración de óxido nítrico (NO) también aumenta tras el PI y participa en su acción hepatoprotectora^{8,10}, por lo que numerosas estrategias terapéuticas están orientadas a aumentar la disponibilidad de NO. Entre éstas se incluyen la administración de donantes de NO^{9,10}, de inhibidores de la arginasa, con objeto de aumentar la concentración de arginina, precursor de NO¹³, o de nitritos, que se presenta como una estrategia segura, sencilla y eficaz^{14,15}. En numerosos ensayos se ha tratado de mimetizar el efecto del PI mediante el uso de citocinas. Nuestro grupo ha demostrado que la cardiotrofina 1 (CT-1), una citocina de la familia de la IL-6, desempeña un papel esencial en el correcto funcionamiento del PI, dado que los ratones nulos para CT-1 no quedan protegidos frente al daño por I/R con la maniobra del PI¹⁶. La administración exógena de CT-1 recombinante resulta en la protección de los ratones frente al daño por I/R a través de la activación de la vía protectora de STAT-3¹⁶. Este efecto hepatoprotector de la CT-1 también se ha demostrado en un modelo de fallo hepático fulminante tras una hepatectomía del 90%, en un modelo de hepatitis inducida por concanavalina A¹⁷ y en el modelo de daño agudo por activación del receptor de muerte Fas¹⁸. El papel relevante de la CT-1 en la defensa del hígado frente al daño queda confirmado por el hecho de que, en un modelo de hepatectomía parcial en hígados cirróticos, la administración de CT-1 mejora la función hepática y estimula la regeneración del hígado¹⁹. Todos estos datos indican que la CT-1 puede ser un candidato ideal para la protección del hígado y la estimulación de la regeneración en las cirugías de resección hepática y trasplante²⁰.

Identificación de la anfirregulina como factor mitogénico y de supervivencia para los hepatocitos. Implicaciones en la protección frente al daño agudo

El EGFR es un receptor transmembrana con actividad tirosincinasa que se expresa de forma importante en los hepatocitos y desempeña un papel fundamental en la respuesta regeneradora y de supervivencia activada en el hígado en respuesta al daño²¹. Su activación por autofosforilación se produce tras la unión de

un amplio número de ligandos, entre los que se encuentran el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento epidérmico con dominio de unión a heparina (HB-EGF), el factor de crecimiento transformante (TGF) alfa, la epirregulina (Ereg), la betacelulina (Btc) o la anfirregulina (AR). La AR, como el resto de los miembros de la familia, se sintetiza como una proteína transmembrana que es procesada por la metaloproteasa ADAM17/TACE para generar el factor de crecimiento soluble⁵. A diferencia de otros miembros de la familia, la expresión de la AR es indetectable en un hígado sano. Sin embargo, nuestro grupo ha demostrado que su expresión se induce rápidamente tras una hepatectomía parcial (HP)²² y en diferentes modelos de daño hepático agudo con relevancia clínica²³. Así, la expresión de la AR se induce con rapidez tras la activación del receptor de muerte Fas por el anticuerpo agonista Jo2, tras la administración del tóxico CCl₄ o tras la administración de lipopolisacárido bacteriano (LPS)²³. Mediante la utilización de hepatocitos de ratón en cultivo primario hemos demostrado que el tratamiento con AR induce su proliferación, mediante la activación del receptor EGFR y de las vías de las MAPK, y que este efecto es inhibido por el factor de crecimiento transformante beta (TGFβ), de acuerdo con el papel de esta citocina en la fase de terminación de la regeneración hepática²². Además, el tratamiento con AR resulta en la activación de la vía de PI3K/Akt y la protección de los hepatocitos frente a la apoptosis inducida por la activación de Fas²³. El papel no redundante de la AR en la respuesta regeneradora y protectora natural del hígado queda demostrado por el hecho de que los ratones nulos para la AR (KOAR) presentan un significativo retraso en el inicio de la regeneración tras HP²² y son significativamente más sensibles a dosis letales de Jo2²³. Nuestros resultados también demuestran que la administración de AR recombinante protege a los ratones del daño agudo inducido tanto por la activación de Fas como por la administración de CCl₄²³. Todos estos datos indican que el tratamiento con AR podría ser utilizado para prevenir el fallo hepático o mejorar la supervivencia de los injertos, por ejemplo, en el trasplante hepático.

Identificación de la anfirregulina como factor mitogénico y de supervivencia para las células productoras de matriz extracelular. Implicaciones en el desarrollo de la fibrosis. La anfirregulina, un arma de doble filo

La muerte celular y la respuesta inflamatoria inducida en situaciones de daño promueven, además de la respuesta regeneradora y protectora de las células pa-

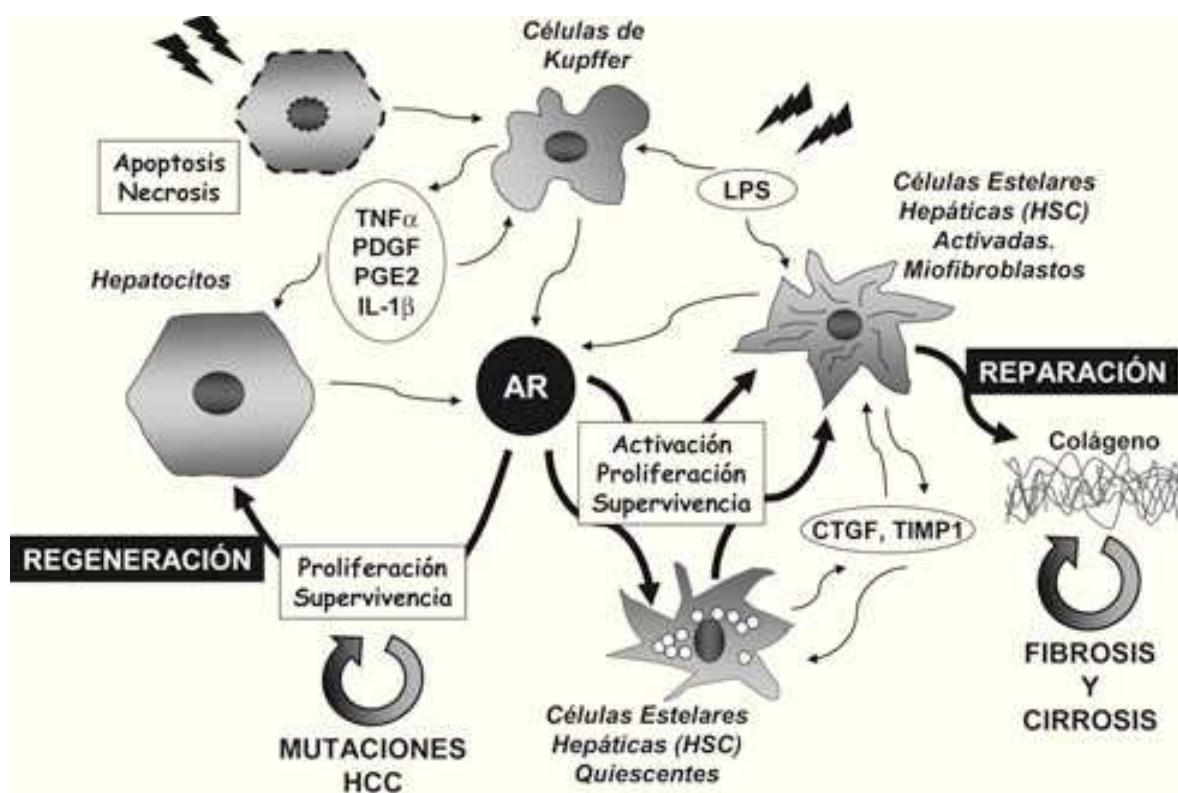


Figura 2 Participación de la anfíregulina (AR) en la respuesta regeneradora y reparadora del hígado: el yin y el yang de la AR. La muerte de los hepatocitos induce la activación de las células de Kupffer y una respuesta inflamatoria. En respuesta a las citocinas inflamatorias, los hepatocitos y las propias células de Kupffer producen AR, que induce la proliferación y la supervivencia de las células parenquimales. Las citocinas inflamatorias y la AR participan en la activación de las células estelares y su transactivación a miofibroblastos. Los miofibroblastos son los causantes de la producción de matriz extracelular y colaboran en aumentar el agrupamiento de AR, que a su vez induce su proliferación y supervivencia. Ante una agresión continua, la perpetuación de la respuesta regeneradora y reparadora inducida por la AR resulta en un aumento del depósito de matriz extracelular y el desarrollo de la fibrosis y la cirrosis. La alta tasa de replicación de las células parenquimales facilita la fijación de mutaciones, que resultarán en la transformación neoplásica de los hepatocitos. La AR contribuirá a la proliferación y la supervivencia de estas células de hepatocarcinoma.

renquimales, una respuesta reparadora cicatrizante asociada con la activación de las células productoras de matriz extracelular²⁴. La activación sostenida de estos mecanismos reparadores durante el daño hepático crónico tiene como consecuencia el desarrollo de la fibrosis y, en último término, de la cirrosis. El papel del sistema del EGFR en el proceso de fibrogénesis *in vivo* no está bien caracterizado. Nuestros resultados demuestran que la expresión de la AR se induce durante el desarrollo de la fibrosis en ratones tratados de forma crónica con CCl₄²⁵ y en el hígado de ratas cirróticas y de pacientes con cirrosis²². En un reciente trabajo hemos demostrado que la expresión de la AR podría estar participando en el desarrollo de la fibrosis²⁵. Nuestros resultados muestran que los ratones KOAR desarrollan menos fibrosis que los correspondientes controles tras el tratamiento con CCl₄. La disminución en el depósito de colágeno en los hígados de los ratones KOAR se acompaña de una menor producción de TGFβ y una menor expresión del marcador de

activación de células profibrogénicas, actina de músculo liso (α -SMA). En los ratones KOAR, la expresión del ARNm de otros genes relacionados con el proceso de fibrogénesis, como el procolágeno tipo 1, el inhibidor de metaloproteasas TIMP1 o el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), está también significativamente disminuida. Para caracterizar el papel de la AR en los diferentes tipos celulares que participan en la respuesta inflamatoria-reparadora se aislaron los macrófagos residentes del hígado o las células de Kupffer (KC), y las células profibrogénicas, tanto los miofibroblastos portales (MFB) como las células estelares hepáticas (HSC). Nuestros datos muestran que la expresión de la AR se induce en las KC tras el tratamiento con citocinas proinflamatorias como el TNF α o la IL1 β , y en los miofibroblastos portales tras el tratamiento con factores de crecimiento como el EGF o el PDGF. Por otra parte, el tratamiento con AR de las HSC induce su proliferación y, además de su propia expresión, la expresión de genes clave en el

proceso fibrogénico, como TIMP1 o CTGF. La supervivencia de las células productoras de matriz activadas se ha descrito como esencial para la progresión de la fibrosis²⁶. De hecho, la apoptosis de las HSC activadas se ha asociado con la resolución de la fibrosis²⁷ y su inducción se ha propuesto como una estrategia terapéutica¹. Por todo ello, decidimos analizar el papel de la AR en la supervivencia de las células productoras de matriz extracelular. El tratamiento con AR inhibió significativamente la apoptosis inducida por ausencia de suero y por la activación de los receptores de muerte TNF o Fas, tanto en MFB en cultivo primario como en una línea de HSC humana (LX2)²⁵. Si consideramos todos nuestros resultados en conjunto, indican que la AR tiene un importante papel en la respuesta defensiva natural del hígado frente al daño. La AR participaría no sólo en la respuesta regeneradora del hígado comportándose como un mitógeno y un factor de supervivencia para las células parenquimales, sino también en la respuesta reparadora, al actuar como un factor de activación, proliferación y supervivencia para las células productoras de tejido cicatrizante. Sin embargo, en condiciones de daño crónico, la activación sostenida de esta respuesta sería la causa del depósito excesivo de matriz extracelular y daría lugar al desarrollo de fibrosis (fig. 2).

Identificación de la anfirregulina como factor mitogénico y de supervivencia para las células de hepatocarcinoma. Implicaciones en el desarrollo del hepatocarcinoma, el lado oscuro de la anfirregulina

La inducción persistente de señales regeneradoras y antiapoptóticas en respuesta al daño crónico es considerada esencial en el proceso de hepatocarcinogénesis, al posibilitar la fijación de mutaciones y favorecer el establecimiento de bucles autocrinos que permiten la proliferación y la supervivencia de las células transformadas (fig. 2)^{28,29}. Nuestros resultados muestran que la AR cuya expresión se encuentra inducida en la cirrosis podría participar en el proceso de hepatocarcinogénesis. La expresión de la AR se encuentra inducida en los HCC humanos y en las líneas de HCC³⁰. En las células de HCC, la AR participa en un bucle autocrino que confiere a estas células capacidad para proliferar en ausencia de suero y de adhesión a sustrato³⁰. La expresión de AR en estas células está también relacionada con su tumorigenicidad y con su reconocida resistencia a la apoptosis inducida por quimioterápicos. De hecho, el silenciamiento de la expresión de la AR en las células de HCC las sensibiliza a la apoptosis inducida por doxorrubicina³⁰. La sobreeexpresión de AR se ha asociado con la resisten-

cia de las células de HCC al tratamiento con gefitinib, un inhibidor de EGFR utilizado para el tratamiento de cáncer de pulmón y de colon³¹. La inhibición de la expresión o de la actividad de la AR en el HCC se plantea así como una nueva estrategia para potenciar el efecto antineoplásico de fármacos citostáticos, como la doxorrubicina, o de inhibidores específicos, como el gefitinib.

Conclusiones

La respuesta del hígado frente al daño es multicelular y multifactorial. En ella participan las células de Kupffer, los hepatocitos, las células estelares, las células endoteliales de los sinusoides y una pléyade de citocinas, factores de crecimiento y metabolitos. Se necesita un mejor conocimiento de las relaciones celulares y los efectos pleiotrópicos de muchos de estos factores para comprender los mecanismos implicados en el daño y para caracterizar las respuestas defensivas naturales que puedan ser potenciadas o utilizadas en el desarrollo de nuevos tratamientos.

Bibliografía

1. Schoemaker MH, Moshage H. Defying death: the hepatocyte's survival kit. *Clin Sci (Lond)*. 2004;107:13-25.
2. Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol*. 2007; 213:286-300.
3. Malhi H, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology*. 2008;134:1641-54.
4. Iniguez M, Dotor J, Feijoo E, Goni S, Prieto J, Berasain C, et al. Novel pharmacologic strategies to protect the liver from ischemia-reperfusion injury. *Recent Patents Cardiovasc Drug Discov*. 2008;3:9-18.
5. Berasain C, Castillo J, Perugorria MJ, Prieto J, Ávila MA. Amphiregulin: a new growth factor in hepatocarcinogenesis. *Cancer Lett*. 2007;254:30-41.
6. Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol*. 2003;18:891-902.
7. Desai KK, Dikdan GS, Shareef A, Koneru B. Ischemic preconditioning of the liver: a few perspectives from the bench to bedside translation. *Liver Transpl*. 2008;14:1569-77.
8. Vardanian AJ, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Molecular mediators of liver ischemia and reperfusion injury: a brief review. *Mol Med*. 2008;14:337-45.
9. Carini R, Albano E. Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. *Gastroenterology*. 2003;125:1480-91.
10. Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, Bulbena O, Rosello-Catafau J. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology*. 1997;25:934-7.
11. Nakayama H, Yamamoto Y, Kume M, Yamagami K, Yamamoto H, Kimoto S, et al. Pharmacologic stimulation of adenosine A2 receptor supplants ischemic preconditioning in providing ischemic tolerance in rat livers. *Surgery*. 1999;126:945-54.

12. Hart ML, Much C, Gorzolla IC, Schittenhelm J, Kloor D, Stahl GL, et al. Extracellular adenosine production by ecto-5'-nucleotidase protects during murine hepatic ischemic preconditioning. *Gastroenterology*. 2008;135:1739-50 y 1733.
13. Reid KM, Tsung A, Kaizu T, Jeyabalan G, Ikeda A, Shao L, et al. Liver I/R injury is improved by the arginase inhibitor, N(omega)-hydroxy-nor-L-arginine (nor-NOHA). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292:G512-7.
14. Duranski MR, Greer JJ, Dejam A, Jagannathan S, Hogg N, Langston W, et al. Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver. *J Clin Invest*. 2005;115:1232-40.
15. Abe Y, Hines I, Zibari G, Grisham MB. Hepatocellular protection by nitric oxide or nitrite in ischemia and reperfusion injury. *Arch Biochem Biophys*. 2008. En prensa.
16. Iniguez M, Berasain C, Martínez-Anso E, Bustos M, Fortes P, Pennica D, et al. Cardiotrophin-1 defends the liver against ischemia-reperfusion injury and mediates the protective effect of ischemic preconditioning. *J Exp Med*. 2006;203:2809-15.
17. Bustos M, Beraza N, Lasarte JJ, Baixeras E, Alzuguren P, Bordet T, et al. Protection against liver damage by cardiotrophin-1: a hepatocyte survival factor up-regulated in the regenerating liver in rats. *Gastroenterology*. 2003;125:192-201.
18. Marques JM, Belza I, Holtmann B, Pennica D, Prieto J, Bustos M. Cardiotrophin-1 is an essential factor in the natural defense of the liver against apoptosis. *Hepatology*. 2007;45:639-48.
19. Yang ZF, Lau CK, Ngai P, Lam SP, Ho DW, Poon RT, et al. Cardiotrophin-1 enhances regeneration of cirrhotic liver remnant after hepatectomy through promotion of angiogenesis and cell proliferation. *Liver Int*. 2008;28:622-31.
20. Rickenbacher A, Graf R, Clavien PA. The way to safer liver resection in cirrhotic patients: is Cardiotrophin-1 the future miracle drug? *Liver Int*. 2008;28:589-91.
21. Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5:836-47.
22. Berasain C, García-Trevijano ER, Castillo J, Erroba E, Lee DC, Prieto J, et al. Amphiregulin: an early trigger of liver regeneration in mice. *Gastroenterology*. 2005;128:424-32.
23. Berasain C, García-Trevijano ER, Castillo J, Erroba E, Santamaría M, Lee DC, et al. Novel role for amphiregulin in protection from liver injury. *J Biol Chem*. 2005;280:19012-20.
24. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008;134:1655-69.
25. Perugorria MJ, Latasa MU, Nicou A, Cartagena-Lirola H, Castillo J, Goni S, et al. The epidermal growth factor receptor ligand amphiregulin participates in the development of mouse liver fibrosis. *Hepatology*. 2008;48:1251-61.
26. Elsharkawy AM, Oakley F, Mann DA. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis*. 2005;10:927-39.
27. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest*. 1998;102:538-49.
28. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet*. 2002;31:339-46.
29. Laurent-Puig P, Zucman-Rossi J. Genetics of hepatocellular tumors. *Oncogene*. 2006;25:3778-86.
30. Castillo J, Erroba E, Perugorria MJ, Santamaría M, Lee DC, Prieto J, et al. Amphiregulin contributes to the transformed phenotype of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res*. 2006;66:6129-38.
31. Desbois-Mouthon C, Cacheux W, Blivet-Van Eggelpoel MJ, Barbu V, Fartoux L, Poupon R, et al. Impact of IGF-1R/EGFR cross-talks on hepatoma cell sensitivity to gefitinib. *Int J Cancer*. 2006;119:2557-66.