



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO  
FUNCIÓN DE LAS PLAQUETAS EN LA  
REPARACIÓN HEPÁTICA**

**Autor: Laura García Bustillo**

**Tutor: Almudena Porras Gallo**

**Convocatoria: Junio 2018**

## Índice

RESUMEN .....	3
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	3
1. Plaquetas.....	3
2. Daño hepático y reparación .....	5
3. Posible papel de las plaquetas en la reparación hepática .....	9
OBJETIVOS .....	12
METODOLOGÍA.....	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
1. El papel de las plaquetas en la regeneración hepática tras una hepatectomía .....	12
2. El papel de las plaquetas en la reparación del daño hepático inducido por fármacos: el papel de las plaquetas en la cirrosis hepática .....	14
3. Efecto perjudicial de las plaquetas .....	17
CONCLUSIONES.....	18
BIBLIOGRAFÍA .....	18

## **Resumen**

Las plaquetas son el constituyente más pequeño de la sangre. Se trata de estructuras anucleadas que contienen, entre otras cosas, tres tipos de gránulos secretores: gránulos alfa, gránulos densos y gránulos lisosomales. Cada uno de estos gránulos contiene sustancias bioactivas como factores de la inflamación, factores de crecimiento y factores angiogénicos que son liberados tras la activación plaquetaria. Son estas sustancias las que hacen que las plaquetas tengan múltiples funciones extra-homeostásicas, incluyendo la reparación hepática. En este trabajo se analiza el papel de las plaquetas en el proceso de reparación y regeneración hepática tras una hepatectomía parcial, así como en el daño hepático inducido por fármacos, la consecuente fibrosis y la reparación de la misma. Además, se evalúa la efectividad de terapias basadas en el aumento del número de plaquetas para abordar el daño hepático.

## **Introducción y antecedentes**

### **1. Plaquetas**

Las plaquetas, también denominadas trombocitos, son fragmentos citoplasmáticos anucleados provenientes de una célula conocida como megacariocito (MKs: *megakaryocytes*). Los MK son células de gran tamaño que se encuentran principalmente en la médula ósea, pero también en bazo y pulmones.<sup>1</sup> Estos MKs se desarrollan a partir de una célula troncal pluripotencial bajo la influencia de factores estimuladores de colonias (CSFs) producidos por macrófagos, fibroblastos, linfocitos T y células endoteliales estimuladas.<sup>1,2</sup> La diferenciación de las células troncales en megacarioblastos productores de plaquetas depende de diferentes interleuquinas y de CSFs.<sup>1</sup>

Cuando las plaquetas ingresan en la circulación sanguínea periférica, su diámetro promedio es de 2,5  $\mu\text{m}$ .<sup>1</sup> La zona periférica está formada por la membrana plaquetaria, que contiene glucoproteínas. La estructura de la membrana plaquetaria cuenta con capas interna y externa de fosfolípidos polares con proteínas estructurales incorporadas por debajo y a través de las dos capas; los residuos de ácido siálico en la superficie le confieren carga negativa. Las proteínas integrales que atraviesan las capas actúan como receptores, bombas ATPasa de sodio y calcio, enzimas y cofactores necesarios para la actividad plaquetaria.<sup>3</sup>

Contiene, asimismo, un sistema tubular denso que recorre la plaqueta a lo largo de su circunferencia, y es el lugar primario de atrapamiento de iones de calcio interno.<sup>1,3</sup>

En el interior de la plaqueta hay múltiples orgánulos como mitocondrias, gránulos lisosomales, gránulos electrodensos y gránulos alfa, que secretan su contenido durante la activación y constricción plaquetaria, de manera que el sistema canalicular abierto libera el contenido granular a la superficie.<sup>2,4</sup>

Cada gránulo contiene sustancias secretoras como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF: *platelet-derived growth factor*), el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1: *insulin-like growth factor 1*), el factor de crecimiento del hepatocito (HGF: *hepatocyte growth factor*), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF: *vascular endothelial growth factor*), serotonina, ADP (*adenosine diphosphate*), ATP (*adenosine triphosphate*), el factor de crecimiento epidérmico (EGF: *epidermal growth factor*), el factor de crecimiento transformante de tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ : *transforming growth factor- $\beta$* ) y la esfingosina 1-fosfato (S1P: *sphingosine 1 phosphate*), entre otros.<sup>2,5</sup>

Además de los mediadores sintetizados en los MKs, las plaquetas también portan mediadores que recogen del plasma, que se ven concentrados o modificados en el interior de las plaquetas.<sup>4</sup> Algunos de ellos están ligados a la inflamación y reparación o regeneración del tejido, como el VEGF, la histamina o la serotonina.<sup>6</sup>

La concentración normal de plaquetas en sangre es de 150 a 400x10<sup>3</sup>/ $\mu$ L, y su tiempo de vida media es de 7 a 10 días.<sup>3</sup> La mitad de las plaquetas que se producen circulan en sangre, mientras que el bazo retiene la otra mitad.<sup>7</sup> Así, constantemente entran en el bazo una cantidad de plaquetas igual a la cantidad que lo abandona. Si a los 7 días las plaquetas no se han destruido en los lugares donde actúan, se mueren definitivamente por apoptosis.<sup>3</sup>

Para la activación de las plaquetas, es necesario un cambio conformacional que supone un aumento de la superficie externa de la misma, de forma que los receptores presentes en la membrana externa quedan más expuestos y se facilita su interacción con los distintos ligandos implicados en el proceso de coagulación y formación del tapón plaquetario.<sup>3</sup>

Las plaquetas son conocidas por su función en la homeostasis primaria, donde la formación del agregado plaquetario constituye la primera medida para cerrar un vaso sanguíneo dañado.<sup>8</sup> Sin embargo, tienen múltiples funciones extra-homeostáticas, incluyendo la inflamación, defensa del hospedador, angiogénesis, reparación y regeneración tisular, metástasis tumoral y cicatrización de heridas.<sup>7</sup> Para llevar a cabo estas funciones extra-homeostáticas, las plaquetas cuentan con diferentes mecanismos: son capaces de interactuar con las células inflamatorias facilitando su traslado, excretan el contenido de sus gránulos y

son capaces de llevar a cabo la síntesis *de novo* de diversas proteínas no relacionadas con la homeostasis.<sup>8</sup>

## 2. Daño hepático y reparación

El fallo hepático agudo (ALF: *acute liver failure*) es un síndrome clínico producido por diversas causas, como infecciones víricas, fármacos o toxinas. Es el resultado de una pérdida rápida de la función de los hepatocitos, y suele estar asociado a una coagulopatía y una encefalopatía. Ocurre en pacientes sin enfermedad hepática preexistente. El tiempo que transcurre desde el comienzo de los síntomas hasta que aparece la encefalopatía suele ser de 1 a 2 semanas, pero hay casos que evolucionan más lentamente, hasta los 6 meses de duración.<sup>9</sup>

La enfermedad hepática crónica (CLD: *chronic liver disease*) se refiere a un proceso patológico a largo plazo que consiste en la continua destrucción del parénquima hepático y su sustitución gradual por tejido fibrótico, lo que resulta en cirrosis hepática y una elevación del riesgo de carcinogénesis. Es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en muchos países. La fibrosis hepática es, por tanto, la consecuencia de una cicatrización sostenida en respuesta al daño hepático crónico, que puede estar inducido por múltiples causas como pueden ser infecciones virales hepatotróficas, abuso del alcohol y drogas, desórdenes autoinmunes, fármacos, colestasis y distrés metabólico.<sup>6, 10</sup>

La fibrosis es un proceso dinámico de remodelado de la matriz extracelular continua (ECM: *extra*cellular *matrix*) en el lugar del daño hepático crónico. Durante el proceso, hay una acumulación de proteínas extracelulares –como son glucoproteínas, colágeno, elastina–, y proteoglicanos.<sup>2, 6</sup> El resultado final es la sustitución del tejido hepático con ECM, la formación de tejido cicatricial y un cese gradual de las funciones hepáticas.<sup>10</sup>

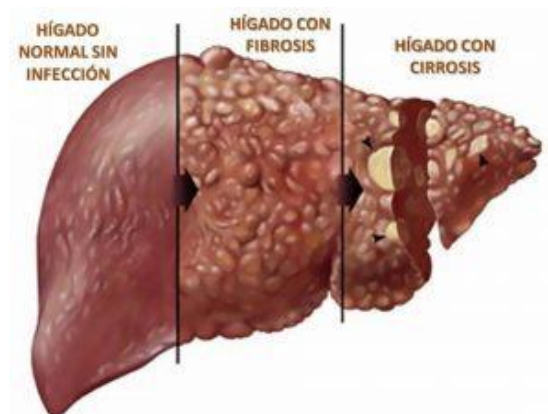


Figura 1. Daño hepático. *Hepatitis 2000*

El hígado está formado por células parenquimales o hepatocitos y células no parenquimales como las células de Kupffer (un tipo especial de macrófagos), las células endoteliales sinusoidales (LSECs: *liver sinusoidal endothelial cells*) y las células hepáticas estrelladas (HSCs: *hepatic stellate cells*).<sup>2, 10</sup>

Las HSCs son las células que están principalmente implicadas en el proceso de fibrosis por la producción de grandes cantidades de ECM y por la secreción de TFG- $\beta$ , que es una

citoquina mediadora clave en la fibrogénesis hepática.<sup>2</sup> En condiciones normales, las HSCs se encuentran en el espacio de Disse, entre las LSECs y los hepatocitos,<sup>10</sup> y su función principal es el almacenamiento de vitamina A y otros retinoides.<sup>2,6</sup> En respuesta al daño hepático, las HSCs sufren una diferenciación morfológica y funcional, de manera que pasan a ser células contráctiles miofibroblásticas en un proceso denominado activación,<sup>11</sup> que lleva a la producción de grandes cantidades de proteínas de ECM como el colágeno I y III y la fibronectina, que se acumulan en el espacio de Disse formando fibras, dando lugar así a la aparición de la fibrosis.<sup>10, 12</sup>

Las LSECs son células sinusoidales que se encuentran formando una fina capa continua de endotelio sinusoidal, de manera que crean una barrera estructural entre el parénquima hepático y la sangre que fluye en el hígado. Estas LSECs juegan un papel importante en el mantenimiento de las funciones hepáticas, pues permiten el intercambio de nutrientes entre la sangre circulante y los hepatocitos gracias a la presencia de poros abiertos a lo largo del endotelio. Además, las LSECs secretan citoquinas inmunorreguladoras, y factores de crecimiento, incluyendo HGF, IL-1, IL-6 e interferones, que regulan la regeneración hepática, entre otras cosas.<sup>10</sup>

La hepatectomía parcial en roedores permite estudiar el proceso regenerativo. La técnica fue descrita por primera vez por Higgins y Anderson en 1931, y aprovecha la estructura multilobular del hígado murino para eliminar dos tercios de la masa hepática. La retirada de los lóbulos no está asociada con la destrucción del tejido hepático que permanece en el roedor. El hecho de retirar los dos lóbulos mayores del hígado favorece el crecimiento de los dos lóbulos residuales, que se expanden en tamaño hasta alcanzar el tamaño total del hígado original previo a la hepatectomía.<sup>13</sup> En el caso de los humanos, el modelo utilizado para estudiar el proceso de regeneración es el trasplante hepático de donante vivo del lóbulo derecho. En estos estudios se demostró que la regeneración hepática se produce en las primeras cuatro semanas, siendo especialmente importante la primera.<sup>14</sup>

La regeneración hepática es un proceso que ocurre en todos los vertebrados, y los mecanismos implicados son comunes entre varias especies. Se trata de una respuesta fisiológica de adaptación al daño hepatocelular. En la regeneración hepática hay una proliferación de células parenquimales y no parenquimales, que contribuyen a la restauración del tejido hepático dañado. La proliferación de los hepatocitos y de las células mesenquimales, así como la morfogénesis y el volumen final del hígado están regulados genéticamente.<sup>10, 12</sup>

Los hepatocitos permanecen en estado quiescente (fase G0 del ciclo celular), pero, a diferencia de otros tejidos, tienen la capacidad de reiniciar el ciclo celular en caso de daño hepático, pérdida de tejido o estímulos externos. La proliferación celular se produce en un orden cronológico y secuencial. Los hepatocitos son las primeras células en responder a los estímulos de regeneración. Las células biliares entran en proliferación casi al mismo tiempo que los hepatocitos, mientras que las células endoteliales y las células estrelladas lo hacen más tarde.<sup>13</sup>

La proliferación celular es posible gracias a numerosos factores de crecimiento y citoquinas, como HGF, TGF- $\alpha$ , EGF e IL-6, que activan a sus receptores correspondientes provocando cascadas de señalización y transcripción de genes asociados a la progresión del ciclo celular. Es un proceso muy rápido, que se inicia en segundos y finaliza en pocos días con la recuperación del volumen hepático.<sup>10</sup>

La activación de las células de Kupffer da lugar a la secreción de citoquinas estimuladoras del crecimiento que promueven la proliferación de los hepatocitos tras una hepatectomía, y con ello inducen el proceso implicado en la regeneración hepática. Las células de Kupffer son la fuente más importante de IL-6 y TNF- $\alpha$ . El hecho de que los niveles de TNF- $\alpha$  estén aumentados tras una hepatectomía sugiere que esta citoquina, así como su principal productor, –las células de Kupffer, – están implicados en la reparación del hígado en condiciones patológicas. Esta idea se ve respaldada por la observación de una supresión de la proliferación de hepatocitos producida por anticuerpos anti-TNF- $\alpha$ . Además, en ratones carentes de receptores para TNF- $\alpha$  no se produce la regeneración hepática debido al descenso en la producción de IL-6.<sup>10, 13</sup>

TNF- $\alpha$  e IL-6 son los principales responsables del abandono de la fase G0 y la entrada en la fase G1 del ciclo celular, pues activan dos factores transcripcionales diferentes:

- NF $\kappa$ B es un factor de transcripción formado por dos subunidades y una proteína. El complejo migra al núcleo y actúan como promotor de secuencias genéticas que mejoran la transcripción de genes implicados en el ciclo celular. La rápida activación de NF $\kappa$ B tras una hepatectomía está regulada por TNF- $\alpha$ , hecho que se demuestra por el dramático descenso de la activación de NF $\kappa$ B en ratones que han sufrido una eliminación homocigótica del receptor TNF tipo 1.<sup>13</sup>
- STAT3 es fosforilado por las JAK-quinazas (*Janus kinase*), y migra al núcleo, induciendo la expresión de genes asociados con la regulación del ciclo celular, como el factor activador de proteínas tipo 1 (AP-1: *activating protein 1*). En ratones

con una eliminación homocigótica de IL-6, la activación del factor de transcripción STAT3 es deficiente, por lo que se puede afirmar que IL-6 está implicado en su activación.<sup>13</sup>

Por otro lado, la adición de anticuerpos anti-HGF bloquea la proliferación de los hepatocitos. No está claro si el HGF actúa sólo de forma local tras la activación, o si actúa también de forma indirecta a través de la sangre. La activación de su receptor dentro de la primera hora tras la hepatectomía sugiere que sus efectos son tempranos y críticos para el inicio del ciclo celular.<sup>13</sup>

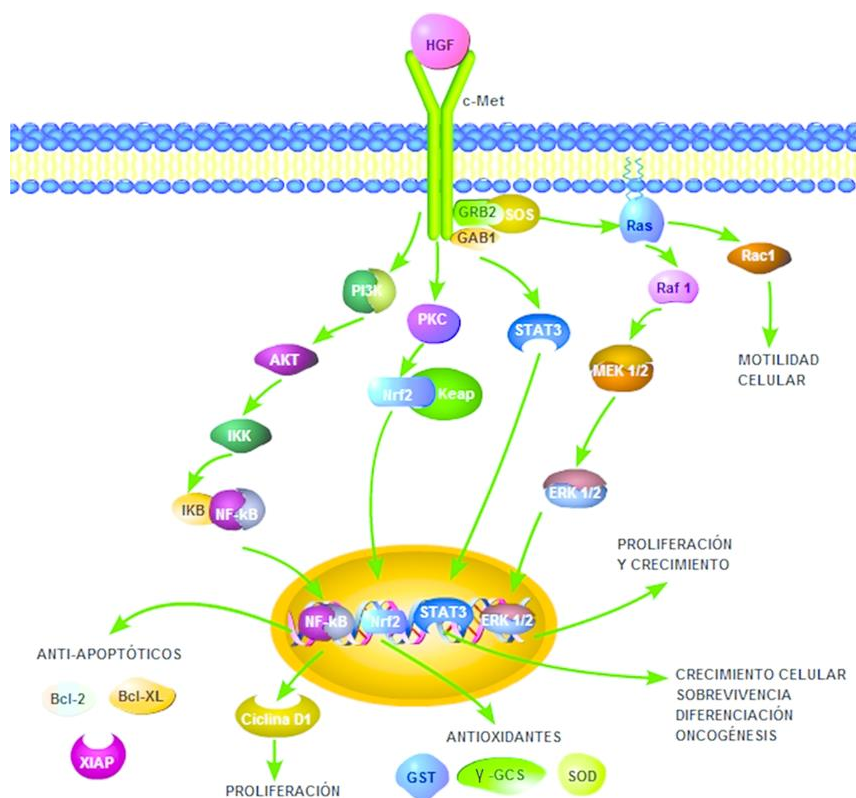


Figura 2. Cascadas de señalización tras la unión de HGF a su receptor. *Research Gate*.

Los hepatocitos que se están regenerando reciben señales mitogénicas que provienen de las células adyacentes, y generan señales similares hacia otras células del hígado. Estas señales paracrinias se producen gracias al TGF- $\alpha$ , cuya expresión comienza 20 horas después del comienzo del ciclo celular en los hepatocitos.<sup>13</sup>

La proliferación de los hepatocitos progresa desde las áreas periportales a las áreas pericentrales del lobulillo. La regeneración hepática finaliza cuando la masa inicial del hígado es restaurada y se permite que el hígado lleve a cabo sus funciones.<sup>13</sup>

La estricta regulación del índice hepático, entendido como la relación entre el volumen hepático y la superficie corporal, es uno de los factores más intrigantes de la regeneración



hepática, pues requiere un estricto control al término del ciclo celular y una remodelación del tejido neoformado.<sup>13</sup>

La capacidad regenerativa del hígado es casi ilimitada, y se han descrito hasta 7 hepatectomías del 50% consecutivas en ratas sin provocar una insuficiencia hepática ni disminuir su potencial regenerativo. Diversos autores han resaltado que cuanto más severo es el daño hepático, más intensa es la respuesta proliferativa del hígado, y viceversa.<sup>13</sup>

### **3. Posible papel de las plaquetas en la reparación hepática**

La fibrosis hepática ha sido siempre considerada un proceso irreversible, pero estudios recientes en animales indican que incluso en la fibrosis avanzada puede haber reversión.<sup>15, 16</sup> En la actualidad, el trasplante hepático es la única aproximación a la curación disponible para estadios avanzados de cirrosis, pero el proceso está asociado a problemas como complicaciones de la cirugía, rechazos de órganos y elevado coste.<sup>6, 10</sup> Además, el bajo número de donantes vivos limita la aplicación de esta técnica.<sup>15</sup> En las últimas décadas se han recogido datos sobre pacientes con cirrosis hepática que han sido tratados de manera eficaz, revirtiendo así el daño hepático, lo que ha estimulado el desarrollo de terapias antifibróticas.<sup>15,</sup>

17

Las plaquetas se acumulan en el hígado de los humanos dentro de la primera hora y media tras la hepatectomía parcial, así como en pacientes con cirrosis. Esta rápida acumulación de plaquetas da lugar a una excreción de los factores de crecimiento contenidos en los gránulos plaquetarios, favoreciendo la respuesta regenerativa. El HGF, IGF y serotonina almacenados en las plaquetas han mostrado estimular la proliferación de los hepatocitos *in vitro*. Además, el VEGF acumulado en las plaquetas estimula indirectamente la proliferación de los hepatocitos mediante la estimulación de la liberación de HGF desde las LSECs, además de estimular la neoangiogénesis.<sup>18</sup>

Las plaquetas se acumulan en el lugar de la lesión, y participan en la cicatrización y regeneración tisular. El papel de las plaquetas en la regeneración hepática se debe a un efecto directo en los hepatocitos, y a un efecto cooperativo con las células no parenquimales del hígado, que se explicará más adelante. Además, la serotonina procedente de las plaquetas media en la regeneración hepática.<sup>2, 6</sup>

La regeneración hepática se ve atenuada en ratones con un bajo número de plaquetas. Esto se debe a que las plaquetas contienen, como ya se ha mencionado, muchas sustancias bioactivas como el HGF y la serotonina. En ratones trombocitopénicos a los que se administró un suplemento de serotonina, se vio que revertían muchos de los efectos producidos por el

bajo número de plaquetas. La serotonina protege al hígado frente a lesiones colestásicas, y parece aminorar los efectos de la edad en la regeneración hepática mejorando la producción del VEGF y mediando en la formación de las fenestras en las LSECs.<sup>13</sup>

#### a. Acción directa en los hepatocitos

Las plaquetas pueden inducir la regeneración hepática directamente interaccionando con los hepatocitos. Un mecanismo propuesto consiste en la migración de las plaquetas en el hígado dañado desde los sinusoides hepáticos hasta el espacio de Disse, donde mediante la interacción con los hepatocitos, las plaquetas secretan HGF, IGF-1 y VEGF, induciendo así la proliferación de los hepatocitos que resulta en la regeneración hepática. Otro mecanismo posible sería la existencia de una transferencia horizontal de RNA codificante o regulador entre las plaquetas y los hepatocitos, lo que estimularía la proliferación de estos últimos. Sin embargo, el papel de ambos mecanismos necesita confirmación *in vivo*.<sup>10, 19</sup>

#### b. Acción en las células no parenquimales

Las HSCs son claves en el proceso fibrótico por producir grandes cantidades de ECM y por su secreción de TGF- $\beta$ . Estas HSCs cuentan con receptores para la adenosina, de manera que un aumento en los niveles de adenosina en sus proximidades inactiva estas células al aumentar los niveles de AMPc intracelular. Esto da lugar a la inactivación del proceso fibrótico. Ikeda *et al.*<sup>2</sup> describieron que las plaquetas humanas contribuyen a la supresión de

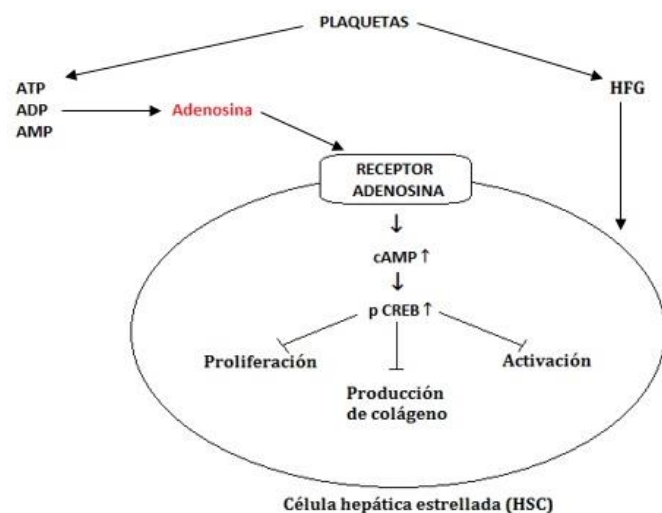


Figura 3. Acción de las plaquetas en las HSCs.

la activación de las HSC y de la producción de colágeno tipo 1 por una vía de señalización dependiente de AMPc mediante ensayos *in vitro*.<sup>10</sup> Se producirían grandes cantidades de adenosina en el entorno de las HSCs como consecuencia de la degradación de nucleótidos de adenosina, como el ADP y el ATP, que están almacenados en los gránulos densos de las plaquetas.<sup>10, 20</sup> Los niveles de AMPc intracelular se incrementarían al activarse los receptores de adenosina de las HSCs, lo que da lugar a la inactivación de dichas células.<sup>11, 20</sup> Estas HSCs en estado quiescente, que están inactivadas por la adenosina, disminuyen su capacidad para producir TGF- $\beta$  y secretar ECM, y, por lo tanto, disminuye también el proceso fibrótico.<sup>13, 21</sup>

Además, el HGF también atenúa la fibrosis mediante la supresión de la activación de las HSCs y la expresión de TFG- $\beta$  por los hepatocitos, bloqueando la activación de los miofibroblastos, en modelos murinos.<sup>10</sup> Sin embargo, las plaquetas humanas contienen menor cantidad de HGF que las plaquetas de los roedores, por lo que no está claro que estos mecanismos que tienen lugar en los roedores sean aplicables a los humanos.<sup>13, 21</sup>

Por otra parte, el contacto directo de las plaquetas con las LSECs estimula la proliferación de LSECs y acelera la síntesis de DNA en los hepatocitos mediante la inducción de la secreción de IL-6, posiblemente vía S1P (S1P: *sphingosine 1 phosphate*).<sup>10</sup> La S1P induce la activación de STAT3 mediante la estimulación de la secreción de IL-6. Las plaquetas activadas secretan grandes cantidades de S1P, lo que actúa en las células endoteliales durante procesos como la trombosis, la angiogénesis o la aterosclerosis.<sup>2, 21</sup>

En cuanto a las células de Kupffer, es muy probable que las plaquetas sean activadas por contacto directo con estas células, y que, a su vez, las células de Kupffer sean estimuladas por contacto directo con las plaquetas. El efecto colaborativo de las plaquetas con las células de Kupffer en la regeneración hepática tras la hepatectomía, se cree que ocurre como consecuencia de la activación de las células de Kupffer, las cuales inducen la acumulación y activación de plaquetas en el hígado. A su vez, las funciones de las células de Kupffer se ven aumentadas por la acumulación de plaquetas.<sup>2</sup>

La regeneración hepática, por tanto, se produciría por la acción directa de los factores de crecimiento liberados por las plaquetas y por el efecto paracrino de las células de Kupffer, que se ve estimulado por las plaquetas.<sup>2</sup>

Una complicación habitual de la CLD es la trombocitopenia producida por una disminución en la producción de trombopoyetina (TPO: *thrombopoietin*) por parte del hígado, un aumento en la destrucción de las plaquetas y la incapacidad de la médula ósea para llevar a cabo la hematopoyesis.<sup>6</sup> La trombocitopenia agrava la destrucción hepática y contribuye a la patogénesis de la enfermedad hepática crónica y a la cirrosis.<sup>8, 9</sup>

La TPO es el factor de crecimiento más importante en la regulación de la diferenciación de los MKs y de la producción de plaquetas.<sup>2</sup> Hay compuestos que estimulan los receptores de TPO con el fin de elevar los niveles de plaquetas, como son eltrombopag y romiplostim, frecuentemente utilizados en el tratamiento de la trombocitopenia en pacientes con enfermedad crónica hepática y cirrosis.<sup>2, 10</sup> Su capacidad para aumentar los niveles de plaquetas puede reducir significativamente la necesidad de una trasfusión de plaquetas y

facilitar el uso de la terapia antiviral basada en el interferón necesaria en casos de infección vírica, así como otros tratamientos necesarios en estos pacientes.<sup>6, 22</sup> Se ha demostrado que el aumento del número de plaquetas inducido por la administración de TPO puede mejorar la fibrosis hepática. Esto se debe a que las plaquetas secretan factores de crecimiento como el PDGF y el HGF, que promueven la regeneración hepática. La trombocitopenia, por tanto, conlleva un fallo en la iniciación de la proliferación de los hepatocitos.<sup>15, 23-25</sup>

## Objetivos

- Analizar el proceso de regeneración hepática desencadenado tras una hepatectomía y el papel de las plaquetas en el mismo.
- Analizar el papel de las plaquetas en el proceso de regeneración hepática y en la progresión de la fibrosis en el hígado cirrótico.
- Determinar el interés de la terapia frente a la fibrosis y el daño hepático basada en el aumento del número de plaquetas.

**Palabras clave:** *platelets, platelets function, liver damage, liver repair, platelets and liver damage, platelets and liver regeneration.*

## Metodología

Este trabajo se ha elaborado llevando a cabo una revisión bibliográfica de artículos procedentes de diversas fuentes y bases de datos, como son Pubmed (NCBI), SciELO, MedlinePlus (NIH) y publicaciones literarias reconocidas. Los criterios de inclusión han sido el año de publicación y el contenido del mismo, así como el idioma (inglés y castellano). La búsqueda se ha realizado mediante las palabras clave anteriormente mencionadas.

## Resultados y discusión

### 1. El papel de las plaquetas en la regeneración hepática tras una hepatectomía

La hepatectomía parcial induce una hiperplasia residual del lóbulo restante, de manera que la masa hepática es restaurada en 7-10 días en ratones. Durante este periodo, los hepatocitos completan uno o más ciclos de división celular, alcanzando la normalidad de las funciones celulares.<sup>26</sup>

Murata *et al.*<sup>26</sup> llevaron a cabo un estudio con el que pretendían clarificar el papel de las plaquetas en la regeneración hepática tras una hepatectomía masiva. Para ello, diseñaron el estudio dividiendo a los ratones en tres grupos:

1. Grupo con niveles plaquetarios normales.<sup>26</sup>
2. Grupo con trombocitosis: se administró el factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos humanos recombinantes pegilados 5 días antes de la hepatectomía.<sup>26</sup>
3. Grupo con trombocitopenia: se empleó anticuerpo monoclonal plaquetario de ratones Pm-1 24 horas antes de la hepatectomía.<sup>26</sup>

Se estudiaron las diferencias en la acumulación de plaquetas en el hígado residual y en la regeneración hepática:

- En el grupo trombocitótico, el número de plaquetas aumentó 2 o 3 veces más que en el grupo normal, y permaneció durante las 48 horas posteriores a la hepatectomía. En el grupo trombocitopénico, el recuento de plaquetas fue inferior al normal y la trombocitopenia se mantuvo durante las 48 horas posteriores a la hepatectomía. A las 96 horas tras la hepatectomía, no hubo diferencias significativas en el recuento de plaquetas entre los tres grupos.<sup>26</sup>
- La relación peso hepático/peso corporal en los grupos trombocitótico y normal fueron significativamente mayores que en el grupo trombocitopénico 48 horas después de la hepatectomía, y esa relación en el grupo trombocitótico fue significativamente mayor que el del grupo normal. A las 96 horas tras la hepatectomía, no había diferencias significativas entre la relación peso hepático/peso corporal de los tres grupos. Por otra parte, el índice mitótico en el grupo trombocitopénico fue significativamente mayor que el de los otros dos grupos 48 horas después de la hepatectomía, siendo el del grupo trombocitopénico significativamente menor que el del grupo normal.<sup>26</sup>

Estos resultados indican que las plaquetas promueven la regeneración hepática en el periodo inmediatamente posterior a la hepatectomía. Estos resultados también demuestran que las plaquetas se acumulan en el hígado residual en el periodo posterior a la hepatectomía, y que el número de plaquetas disponible afecta a la regeneración hepática en la fase aguda tras la hepatectomía.<sup>26</sup>

En estudios *in vivo*, se observó que las citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento como TNF- $\alpha$ , IL-6, EGF o HGF favorecían el proceso de regeneración hepática.<sup>27, 28</sup> Tras la estimulación de sus receptores en la membrana celular, la activación de factores de transcripción y rutas de transducción como NF $\kappa$ B o STAT3 se activaron, provocando así la proliferación de los hepatocitos.<sup>26</sup>

## **2. El papel de las plaquetas en la reparación del daño hepático inducido por fármacos: el papel de las plaquetas en la cirrosis hepática**

La regeneración hepática tras una hepatectomía ha sido el modelo utilizado para conocer las vías moleculares de la regeneración hepática. Sin embargo, el hígado no solo se regenera tras la retirada física del tejido hepático, sino que la respuesta regenerativa también ocurre cuando el tejido hepático está dañado por virus, toxinas o por daños por isquemia/reperfusión.<sup>13, 18</sup>

El daño hepático producido por fármacos produce una pérdida de parénquima hepático en una zona geográfica concreta. La lesión más frecuente causada por los fármacos es la necrosis centrilobular. Los hepatocitos de la región centrilobular tienen una alta expresión de las enzimas de la familia del citocromo P450 (CYP).<sup>13</sup> Estas hemoproteínas pertenecen a una amplia familia de enzimas con funciones detoxificantes de fármacos y otros compuestos mediante reacciones oxidativas que generan radicales libres tóxicos para los hepatocitos. El grado de daño hepático dependerá de la dosis de fármaco.<sup>13</sup> Los compuestos más utilizados para realizar estudios experimentales son acetaminofeno y tetracloruro de carbono.<sup>29, 30</sup>

La mayoría de los estudios relacionados con el daño hepático inducido por fármacos están centrados en los efectos en los hepatocitos,<sup>31</sup> y los efectos crónicos que dan lugar a la activación de las HSCs y a la aparición de fibrosis.<sup>13, 32</sup>

La capacidad regenerativa en el hígado cirrótico está muy deteriorada, lo que hace que estos pacientes tengan un elevado riesgo de fracaso postoperatorio tras la hepatectomía. Para evitar el fracaso de la resección hepática, se buscan terapias que aceleren la regeneración hepática, mejoren la fibrosis y protejan a las células hepáticas de los mediadores químicos.<sup>24</sup>

El papel de las plaquetas en la fibrosis hepática no ha sido lo suficientemente estudiado *in vivo* hasta la fecha.<sup>15</sup> Se ha demostrado que el número de plaquetas afecta a la regeneración hepática en el primer periodo tras la hepatectomía. Como ya se ha explicado, las plaquetas se translocan al espacio de Disse e interaccionan de forma directa con los hepatocitos. Además, se ha visto que promueven la regeneración en condiciones de disminución del número de células de Kupffer tras una hepatectomía en ratones.<sup>24</sup>

Se ha investigado sobre el efecto de la administración de TPO con el objetivo de mejorar la fibrosis hepática y favorecer la regeneración hepática en condiciones de cirrosis hepática.<sup>24</sup> Para ello, Murata *et al.*<sup>16</sup> llevaron a cabo un estudio en ratones, que se dividieron en tres grupos:

1. Grupo LC: ratones a los que se administró dimetilnitrosamina tres veces a la semana durante tres semanas con el objetivo de inducir la fibrosis.<sup>24</sup>
2. Grupo LC+TPO: ratones a los que se administró dimetilnitrosamina tres veces a la semana durante tres semanas con el objetivo de inducir la fibrosis y a los que posteriormente se administró TPO intravenosa. Tras cinco días administrando TPO intravenosa se realizó la hepatectomía parcial del 70% siguiendo el modelo de Higgins y Anderson.<sup>24</sup>
3. Grupo control: ratones control, sin cirrosis hepática.<sup>24</sup>

Se compararon secciones hepáticas antes de la hepatectomía y 24 horas después de la misma, y se contaron los hepatocitos en fase de mitosis. 24 horas después de la hepatectomía, el índice mitótico, -entendido como el número de hepatocitos en fase de mitosis con respecto del total-, era significativamente menor en el grupo LC que en el grupo control. El índice mitótico del grupo LC+TPO era el mismo que el índice mitótico del grupo control.<sup>24</sup> En este último caso, el aumento en el número de plaquetas inhibió la activación de las HSCs y redujo el área fibrótica del hígado cirrótico.<sup>2</sup>

Para examinar el papel de las plaquetas en la expresión de los factores de crecimiento tras la hepatectomía, se estudiaron los niveles de HGF, entre otros, en los distintos grupos. Los niveles de HGF en tejido hepático del grupo LC+TPO en el momento de la hepatectomía fueron significativamente mayores que en el grupo control.<sup>24</sup>

Murata *et al.* concluyen el estudio afirmando que la administración única de TPO en ratones con hígado cirrótico mejora la regeneración hepática tras una hepatectomía del 70%.<sup>24</sup>

La TPO se produce por los hepatocitos en el hígado. En la fibrosis hepática se observan bajos niveles de TPO en plasma, lo que causa trombocitopenia. El receptor de la TPO se expresa en las células hepáticas progenitoras tanto fetales como adultas, pero no en los hepatocitos. En el estudio anteriormente mencionado, la regeneración hepática acelerada por la administración de TPO se inhibió con suero antiplaquetario. Los resultados indican que la aceleración de la regeneración hepática producida por la TPO se debe al aumento en el número de plaquetas y no a la TPO en sí misma.<sup>24</sup>

Por otro lado, Watanabe *et al.*<sup>15</sup> llevaron a cabo un estudio tomando como hipótesis el papel beneficioso de las plaquetas no solo en la promoción de la regeneración hepática sino también en la mejora de la fibrosis hepática. Diseñaron un estudio con un objetivo dual: determinar si las plaquetas promueven la regeneración hepática en el hígado fibrótico, y

determinar si las plaquetas previenen la progresión de la fibrosis hepática.<sup>15</sup> Para ello, se emplearon ratones, que se dividieron en cinco grupos de 8 miembros cada uno:

1. Grupo control.<sup>15</sup>
2. Grupo TPO: ratones a los que se administró TPO.<sup>15</sup>
3. Grupo CCl<sub>4</sub>: ratones a los que se les administró CCl<sub>4</sub> dos veces en semana durante ocho semanas.<sup>15</sup>
4. Grupo CCl<sub>4</sub> + TPO: ratones a los que se les administró CCl<sub>4</sub> y TPO.<sup>15</sup>
5. Grupo CCl<sub>4</sub> + Sp: ratones a los que se les administró CCl<sub>4</sub> y sufrieron una esplenectomía.<sup>15</sup>

Se observó un aumento de las células mitóticas en el grupo CCl<sub>4</sub> + TPO y CCl<sub>4</sub> + Sp. Además, los índices mitóticos de estos grupos fueron significativamente mayores que los del grupo CCl<sub>4</sub>. Se monitorizaron la progresión de la fibrosis y la activación de las HSCs, de manera que las áreas con cambios en las fibras eran menores en los grupos CCl<sub>4</sub> + TPO y CCl<sub>4</sub> + Sp con respecto al grupo CCl<sub>4</sub>. Esto sugiere que las plaquetas juegan un papel importante en la regeneración hepática y en la fibrolisis, antes que en la fibrogénesis y en la progresión de la fibrosis hepática.<sup>15</sup>

Los resultados de este estudio demostraron que las plaquetas degradan la ECM y reducen la progresión de la fibrosis inducida por tratamiento con CCl<sub>4</sub> en ratones, además de promover la regeneración hepática.<sup>15</sup>

Watanabe *et al.*<sup>15</sup> demostraron que la trombocitosis suprime la progresión de los cambios en las fibras hepáticas e inhibe el aumento en la expresión de TGF- $\beta$  en el hígado, pero se pudo demostrar si la inhibición de la expresión de TGF- $\beta$  es debida a la supresión de la activación de las células de Kupffer o a la supresión de la activación de las HSCs.<sup>15</sup>

La figura 4 muestra el papel de las plaquetas en la supresión de la fibrosis hepática. La lesión crónica hepática inducida por una infección vírica, abuso de alcohol o drogas, hace que las HSCs produzcan y respondan al TGF- $\beta$  de forma autocrina. Las HSCs activadas por el TGF- $\beta$  secretan grandes cantidades de ECM y participan en la progresión de la fibrosis hepática. Tras el tratamiento con TPO o agonistas de su receptor, o la realización de una esplenectomía, aumentan el número de plaquetas. Las plaquetas entran en contacto con las HSCs y liberan nucleótidos de adenina almacenados en sus gránulos, como el ADP y el ATP, y ello da lugar a la producción de adenosina por un mecanismo de degradación mediado por las HSCs. Esta adenosina inhibe la activación de las HSCs. Además, las plaquetas también



contribuyen a la expresión de HGF en el hígado. Las HSCs en estado quiescente que han sido inactivadas por la adenosina o el HGF reducen la producción de TGF- $\beta$  y ECM, y con ello la fibrosis.<sup>6</sup>

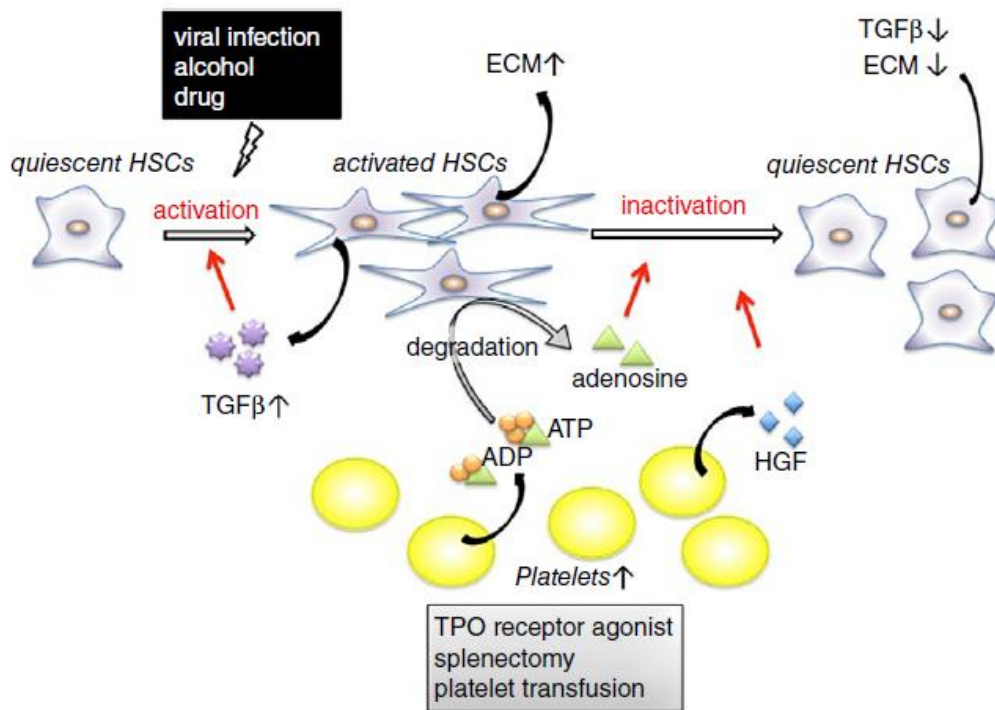


Figura 4. Papel de las plaquetas en la supresión de la fibrosis hepática.<sup>6</sup>

### 3. Efecto perjudicial de las plaquetas

Sin embargo, las plaquetas contienen TGF- $\beta$ , que es producido principalmente por las células de Kupffer y las HSC. El TGF- $\beta$  estimula a las HSCs, favoreciendo la secreción de ECM e inhibiendo su degradación actuando en diferentes rutas bioquímicas. Además, el PDGF, producido principalmente por las células de Kupffer, las HSCs y las plaquetas, es el estímulo más potente para las HSCs.<sup>15</sup>

A pesar de que los efectos estimulantes de las plaquetas en la regeneración hepática están bien establecidos, las plaquetas también tienen efectos perjudiciales en la función hepática. Se ha visto que las plaquetas agravan la lesión hepática o fibrosis en modelos murinos con fallo hepático agudo y crónico. Además, las plaquetas contribuyen al daño por isquemia/reperfusión, lo que es relevante en el contexto de trasplante hepático y hepatectomía parcial.<sup>18</sup> Los riesgos potenciales de la elevación del número de plaquetas no justifican estudios clínicos para el uso profiláctico de esta estrategia en la regeneración hepática en pacientes con una respuesta regenerativa suficiente. El tratamiento del fallo en la regeneración en pacientes con fallo hepático agudo tampoco está justificado, pues estos pacientes suelen

desarrollar una respuesta inflamatoria sistémica y fallo multiorgánico asociado a una hiperactivación de las plaquetas. En este tipo de pacientes, aquellos que recibieron concentrado de plaquetas en la primera semana tuvieron peores resultados que aquellos que no lo hicieron.<sup>18</sup>

Debido a todo esto, estudios más detallados sobre los mecanismos por los cuales las plaquetas estimulan la regeneración hepática serán clave en el desarrollo de estrategias terapéuticas que promuevan la regeneración hepática estimulada por plaquetas.<sup>18</sup>

## Conclusiones

- Las plaquetas juegan un importante papel en la regeneración hepática mediante la liberación de sustancias bioactivas acumuladas en sus gránulos, que desencadenan diferentes rutas bioquímicas implicadas en la regeneración hepática.
- La administración de TPO aumenta el número de plaquetas, mejorando así la fibrosis hepática y promoviendo la regeneración del tejido dañado.
- Es necesario seguir investigando en los mecanismos por los que actúan las plaquetas para la estimulación de la regeneración hepática con el objetivo de reducir los efectos adversos asociados al empleo de esta terapia.

## Bibliografía

1. Bernadette F.Rodak. Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas. Ed. Médica Panamericana. 2005; 838:143-152.
2. Kurokawa Tomohiro, Zheng Yun-Wen and Ohkohchi Nobuhiro. Novel function of platelets in the liver. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* N°31. 2016; pp.745-751.
3. Aura Rosa Manascero Gómez. Atlas de morfología celular, alteraciones y enfermedades relacionadas. *Universidad Pontificia Javeriana*. 2003; 195:48-49.
4. J. Ripoché. Blood platelets and inflammation: their relationship with liver and digestive diseases. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2011; 35: 353-357.
5. Talahashi Kazuhiro, Murata Soichiro, Nobuhiro Ohkohchi. Novel therapy for liver regeneration by increasing the number of platelets. *Organ transplantation gastroenterological and hepatobiliary surgery. Surgery Today*. 2012.
6. Nowatari Takeshi, Murata Soichiro, Fukunaga Kiyoshi and Ohkohchi Nobuhiro. Role of platelets in chronic liver disease and acute liver injury. *Hepatology Research*. 2014; 44: 165-172.
7. Takahashi K *et al*. Thrombocytopenia after liver transplantation: should we care? *World Journal of Gastroenterology*. 2018; 24(13): 1386-1397

8. Lisman Tom and Porte Robert J. The role of platelets in liver inflammation and regeneration. *Semin Thromb Hemost.* 2010; 36: 170-174.
9. Lee William M. Acute Liver Failure. *Semin Respir Crit Care Med.* 2012; 33: 36-45.
10. Kurokawa Tomohiro, Ohkohchi Nobuhiro. Platelets in liver disease, cancer and regeneration. *World Journal of Gastroenterology.* 2017 May 14; 23(18): 3228-3239.
11. Friedman SK. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology.* 2008; 134 (6): 1655-1669.
12. Ikeda N, Murata S, Maruyama T et al. Platelet-derived adenosine 5'-triphosphate suppresses activation of human hepatic stellate cell: in vitro study. *Hepatology Research.* 2011; 42 (1): 91-102.
13. Michalopoulos GK. Principles of liver regeneration and growth homeostasis. *Comprehensive Physiology.* 2013; 3: 485-513.
14. Anand Sable, Shailesh, Maheshwari Sharad, Sharma Swapnil et al. Kinetics of liver regeneration in donors after living donor liver transplantation: a retrospective analysis of "2/3<sup>rd</sup> partial hepatectomy" model at 3 moths. *Indian Journal of Gastroenterology.* 2018.
15. Watanabe M, Murata S, Hashimoto I et al. Platelets contribute to the reduction of liver fibrosis in mice. *Journal of Gastroenterology and Hepatology,* 2009; 24 (1): 78-89.
16. Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J. Clin. Invest.* 2007; 117:539-548.
17. Matsuo R, Ohkohchi N, Murata S et al. Platelets strongly induce hepatocyte proliferation with IGF-1 and HGF in vitro. *Journal of Surgery Res.* 2008; 145: 279-286.
18. Lisman Tom and Porte Robert J. Mechanisms of platelet-mediated liver regeneration. *Blood.* 2006; 128(5): 625-629.
19. Kirschbaum M, KArimian G, Adelmeijer J, Giepmans BN, Porte RJ, Lisman T. Horizontal RNA transfer mediates platelet-induced hepatocyte proliferation. *Blood.* 2015; 126: 198-806.
20. Mafi Afsaneh, Dehghani Farzaneh, Moghadam Abbas, Noorafshan Ali, Vojdani Zahra and Talaei-Khozanai, Tahereh. Effects of platelet-rich plasma on liver regeneration in CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity model. *Platelets. Taylor & Francis Group.* 2016: 1-7
21. Xia JL, Dai C, Michalopoulos GK, Liu Y. Hepatocyte Growth Factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation. *Am. J. Pathol.* 2006; 168 (5): 1500-15012.
22. Poynard T, McHutchison J, Manns M et al. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2002; 122: 1303-1313.
23. Afdhal NH, Giannini EG, Tayyab G et al. Eltrombopag before procedures in patients with cirrhosis and thrombocytopenia. *New England Journal of Medicine.* 2012; 367 (8): 716-124.

24. Murata S, Hashimoto I, Nakano Y, Myronovych A, Watanabe M, Ohkohchi N. Single administration of thrombopoietin prevents progression of liver fibrosis and promotes liver regeneration after partial hepatectomy in cirrhotic rats. *Annals of Surgery*. 2008; 248 (5): 821-828.
25. Matsuo R, Ohkohchi N, Murata S, Ikeda O, Nakano Y, Watanabe M, Hisakura K, Myronovych A, Kubota T, Narimatsu H, Ozaki M. Platelets strongly induce hepatocyte proliferation with IGF-1 and HGF in vitro. *Journal Surgery Research*. 2008; 145: 279-286.
26. Murata S, Ohkohchi N, Matsuo R, Ikeda O, Myronovych A, Hoshi R. Platelets promote liver regeneration in early period after hepatectomy in mice. *World Journal of Surgery*. 2007; 31: 808-816.
27. Borowiak M, Garratt AN, Wüstefeld T *et al*. Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 10608-10613.
28. Blindenbacher A, Wang X, Langer I *et al*. Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. *Hepatology*. 2003; 38: 674-682.
29. Jaeschke H, McGill MR, Williams CD, Ramachandran A. Current issues with acetaminophen hepatotoxicity: a clinically relevant model to test the efficacy of natural products. *Life Sci*. 2011; 88: 737-745.
30. Jaeschke H, Williams CD, Ramachandran A, Bajt ML. Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity. *Liver Int*. 2012; 32: 8-20.
31. Anselmi K, Stolz DB, Nalesnik M, Wtkins SC, Kamath R, Gandhi CR. Gliotoxin causes apoptosis and necrosis of rat Kupffer cells in vitro and in vivo in the absence of oxidative stress: exacerbation by caspase and serine protease inhibition. *Journal of Hepatology*. 2007; 47:103-113.
32. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*. 2008; 88(1): 125-172.