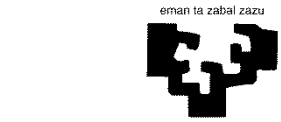
POTENCIADORES DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA EN CIRUGÍA ONCOLÓGICA



Mikel Osorio Capitán

Dpto. de Cirugía y Radiología y Medicina Física

Figura 1. El águila de Zeus comiendo el hígado de Prometeo, encadenado al monte Cáucaso. (Grabado, 1566, posiblemente después de un trabajo de Tiziano. Hulton Getty Picture Collection, Londres).

"Porque el rey de Babilonia se ha detenido en una encrucijada, al principio de los dos caminos, para usar de adivinación; ha sacudido las saetas, consultó a sus ídolos, miró el hígado".

Ezequiel 21:21

Dedicatoria

Resulta difícil pensar en una única persona a la que dedicar este trabajo, así que, a pesar de que resulte inusual, la compartiré con tres personas a las que debo mi pasado, presente y futuro.

En primer lugar, gracias Aita por no arrojar nunca la toalla conmigo, por haber sufrido, llorado y reído todos los grandes triunfos de mi vida; por recordarme que cualquier competición se puede ganar siempre que se juegue; en definitiva, por haberme dado alas para poder creer que este partido también lo podía ganar.

No sería quien soy ahora mismo sin ti Ama, extraordinaria en todos los sentidos. Cada día que me miro en el espejo solo quiero poder ver algo de ti en mí. Este trabajo es fruto del alma curiosa y científica que me dejaste en herencia, mi regalo es pensar que lo hemos compartido.

Finalmente a mi futuro, mi alma gemela, mi media naranja. Sin tu apoyo esto no hubiera sido posible. La mayoría de los actos de la vida requieren del creer, no del poder; solo tú has sabido hacer que crea en mí y confíe en que podría conseguirlo. Te quiero Celia.

Agradecimientos

En primer lugar a la Fundación Gangoiti por haberme otorgado su beca para poder realizar todo el proceso de investigación.

Al servicio de laboratorio del Hospital Donostia por ayudarme e instruirme en el procesado de las muestras sanguíneas.

A la Dra. Gomez Mateo por su ayuda en el análisis histológico de las muestras hepáticas.

A todos mis amigos y familiares por el apoyo y compresión que han mostrado.

Y finalmente a mis compañeros de trabajo, y en especial, a Borja, Inma y Nacho. Este trabajo es consecuencia de vuestra perseverancia y paciencia. Gracias por haber supuesto y suponer un referente para seguir adelante

INDICE

TABLA DE ABREVIATURAS **5**

INTRODUCCIÓN **1**

Recuerdo anatómico-histológico del hígado 2

Anatomía quirúrgica del hígado 3

Anatomía hepática de la rata 5

Histología hepática 8

Contextualización clínica 9

Metástasis hepática de carcinoma colorrectal 10

Tratamiento quimioterápico 11

Efecto hepático del tratamiento quimioterápico 13

5-fluorouracilo y metabolitos del ácido fólico 15

Técnicas para incrementar-preservar parénquima hepático 16

Técnicas quirúrgicas que influyen en el crecimiento del remanente hepático . 17

Hepatectomías repetidas 17

Embolización portal preoperatoria (PVE) 19

Partición hepática con ligadura portal (ALPPS) 20

Insuficiencia hepática 21

Regeneración hepática 24

Reflexión histórica 24

Características del proceso regenerativo 25

Biología de la regeneración hepática 27

Rutas de regeneración alternativas 28

Mitosis y división nuclear en la regeneración hepática 29

Fundamentos moleculares de la regeneración hepática 30

Otras estirpes celulares 35

Moléculas que puedan acelerar la regeneración hepática 36

Acido fólico 37

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO **41**

HIPÓTESIS-OBJETIVOS **43**

MATERIAL Y MÉTODOS **45**

Animales utilizados 45
Modelo experimental 46
Procedimiento anestésico 46
Intervención quirúrgica 47
Eutanasia-adquisición de la muestra 49
Administración de fármacos 50
Grupos experimentales 50
Mediciones biométricas 52
Procesamiento de las muestras 52
Muestras sanguíneas 52
Tejido hepático 53
Análisis estadístico de los resultados 56
RESULTADOS 57
Parámetros ponderales 57
Evolución ponderal del animal 57
Peso hepático total 60
Peso del hígado no ligado 62
Hiperplasia del parénquima no sometido a ligadura portal 64
Parámetros bioquímicos 69
Parámetros metabólicos 69
Enzimas de colestasis-citólisis 71
Análisis Histológico 74
Recuento nuclear 75
Tamaño de los núcleos 76
Análisis histológico del parénquima 77
DISCUSIÓN 83
Idoneidad de la hipótesis 83
Fármacos 85
Ácido fólico y 5-FU 85
Idoneidad del modelo animal utilizado 86
Modelo de atrofia hepática parcial 88
Ligadura portal selectiva en nuestro modelo animal 89

Valoración de la función hepática 90
Objetivación del sufrimiento hepático 91
Parámetros de Citólisis 92
Estudio de la Colestasis 96
Análisis de los resultados 97
Datos biométricos 97
Peso corporal 97
Peso hepático 99
Índice de regulación hepatoestática 99
Peso por lóbulos 100
Morfología celular 103
Proliferación celular 103
Área nuclear 103
Mitosis celular 105
Histología 106
CONCLUSIÓN 108
ÍNDICE DE FIGURAS 109
INDICE DE TABLAS 111
BIBLIOGRAFIA 112
BIBLIOMETRÍA 119
Distribución normal y análisis gráfico de los datos 125
Años de publicación 125
Factor de impacto (estratificado por año de publicación) 126
Citas bibliográficas 127

TABLA DE ABREVIATURAS

A

ALPPS: Partición Hepática con Ligadura Portal

ADP: Adenosina DiFosfato

AMPK: Proteína quinasa activada por Adenosina MonoFosfato

Ap-1: Proteína Activador 1

ATP: Adenosina TriFosfato

B

Bcl-2: Proteína del Linfoma celular B

C

CCR: Cáncer ColoRrectal

C/EBPα: CCAAT/Enhancer-Binding Protein alpha

C-met: Receptor del Factor de Crecimiento Hepatocitario/Proteína Tirosin Quinasa Met

CPT-11: Irinotecan

D

DAMP: patrones moleculares asociados a la lesión celular

DHFR: Dihidrofolato Reductasa

DS: Desviación eStandar de la media.

E

EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico.

EGF_R: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

F

FA: Fosfatasa Alcalina

FdUMP: 5-Fluoro-2´-deoxiUridin-5´-MonoFosfato

FH_2: Dihidrofolato

FH_4: Tetrahidrofolato

Fo: Ácido Fólico

FOLFIRI: 5-Fluorouracilo + Leucovorina + Irinotecan

FOLFOX: 5-Fluorouracilo + Leucovorina + Oxaliplatino

FOLFOXIRI: 5-Fluorouracilo + Leucovorina + Irinotecan + Oxaliplatino

FOLR-1: Receptor de Folatos 1

Foxm1b: mediador citosólico m1b de la caja Forhead

5-FU: 5-Fluorouracilo

FXR: Receptor X Farnesoide

G

GOT: ASpartato Animo Transferasa (ASAT)

GPT: ALanino Amino Transferasa (ALAT)

GSK3β: Quinasa de la Glucógeno Sintetasa 3b

H

HGF: Factor de Crecimiento Hepatocitario

HNFs: Factores Nucleares Hepatocitarios

5HT2A/2B: Receptor de 5-HidroxiTriptamina/Serotonina 2A y 2B

I

IGF-I: Receptor del factor de Crecimiento similar a la Insulina

J

JAK-GP130: Receptor Janus Quinasa-Glicoproteína 130

L

LC: Lóbulo Caudado

LLD: Lóbulo Lateral Derecho

LLI: Lóbulo Lateral Izquierdo

LM: Lóbulo Medio

LMD/LPM: Lóbulo Medio Derecho/Lóbulo Paramediano Derecho

LMI/LPI: Lóbulo Medio Izquierdo/Lóbulo Paramediano Izquierdo

LOEs: Lesiones Ocupantes de Espacio

LP: Lóbulo Paramediano

LV: LeucoVorina

M

MAP: Quinasas Activadas por Mitógenos

MFT: Metilen-Formil Transferasa

MTHFD: Metileno-TetraHidroFolato Deshidrogenasa

MTHFC: Metileno-TetraHidroFolato Ciclohidrolasa

MTHFR: Metileno-TetraHidroFolato Reductasa

MTS: MeTionina Sintetasa

Myd88: Receptor de Diferenciación Mieloide 88

N

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Reducido

$NADP^+$: Nicotinamida Adenina DiNucleótido Fosfato

NLRs: Receptores con dominios de Nucleótidos ricos en secuencias de Leucina

NF-kβ: Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B activadas

P

µPA: Activador de Plasminogeno tipo uroquinasa

PCFT: Transportador de Folato acoplado a Protones

PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas

PF: Peso Final

PI: Peso Inicial

PVE: Embolización Portal Preoperatoria

R

SIRT1: Proteína tipo Sirtuína-1

RTK: Receptor tipo Tirosin-Quinasa

S

SOCS: Proteínas Transmisoras de Señales de Citocinas

STAT3: Activador de la Transcripción y Transductor de la Señal 3

T

TACE: Enzima Convertidora de TGF-α

TGF-α: Factor de Crecimiento Transformante-α

TGF-β: Factor de Crecimiento Transformante-β

TLR: Receptor tipo Toll

TNF-α: Factor de Necrosis Tumoral-α

mTOR: diana de la Ramapicina en las células de Mamífero

TYMS: Timidilato Sintetasa

U

dUMP: DeoxiUridina MonoFosfato

V

VEGF: Factor de Crecimiento del Endotelial Vascu

INTRODUCCIÓN

Desde hace siglos se conoce la trascendencia del hígado para conservar la vida. El porqué de este hecho incuestionable, así como la función concreta del órgano ha sido una incógnita presente desde los primeros papiros y escritos de las civilizaciones antiguas. Es difícil establecer con seguridad cuál es la primera referencia escrita en relación al hígado, su anatomía y su función. No obstante, ya en documentos de la época del código de Hammurabi (2000 a.c) se pueden leer referencias a partes del hígado y su importancia teológica y vital. Según lo observado en heridas sufridas en combate, en ofrendas de sacrificio e incisiones realizadas tras la muerte, se describió que el hígado era el órgano más grande del abdomen y albergaba gran cantidad de sangre. Si bien la sangre se relacionaba directamente con la vida, percibidos ambos como sinónimos, el hígado fue considerado asiento del alma.

El hígado y lo concerniente a su estudio ha supuesto un pilar básico en el desarrollo de la medicina moderna. Dentro del campo de la hepatología, la regeneración hepática es un fenómeno que ha generado y genera un gran interés en los medios científicos actuales. La primera alusión a este fenómeno, posiblemente fortuita, la encontramos en la "Teogonía de Hesíodo", año 750-700 a.c. Según la mitología griega, Prometeo, valiente titán al que gustaba provocar la ira de Zeus, fue encadenado a una alta montaña donde cada jornada un águila hambrienta le devoraría el hígado. Siendo inmortal, diariamente el hígado se le regeneraría, condenando al héroe a un sufrimiento inimaginable y eterno.

Desde la mitología de la antigua Grecia hasta bien avanzado el siglo XIX, no existen nuevas referencias acerca del fenómeno de regeneración hepática. No es hasta el año 1890 cuando se inicia una discusión científica acerca del fenómeno en cuestión.

Múltiples han sido las hipótesis que han querido explicar el proceso por el cual el hígado es capaz de crecer y suplantar la funcionalidad perdida. Modelos experimentales en

animales que sugerían la importancia del flujo venoso procedente de la vena porta supusieron la base del estudio a principios del siglo XX. Hubo que esperar a Higgins y Anderson[67] en 1931 para empezar a estudiar la regeneración hepática desde cambios morfológicos y su cinética. Es en la última mitad del siglo XX cuando la investigación se empezó a orientar a detectar factores de crecimiento que pudieran explicar y ayudar al crecimiento hepático.

Durante los últimos 20 años la investigación de la regeneración hepática ha permitido conocer numerosos factores extrínsecos de crecimiento, cambios intrínsecos en la matriz extracelular, así como mecanismos de transducción de señales intracelulares que están presentes en el hígado y que forman parte del entramado necesario para que la regeneración tenga lugar. Actualmente podemos hablar con más propiedad de cómo el hígado se regenera y de cómo ocurre el proceso de hiperplasia compensadora tras una hepatectomía. El hígado es capaz de restablecer su volumen necesario después de una agresión que conlleve pérdida celular. No obstante, el proceso mediante el cual el hígado crece es complejo y abstruso, no depende exclusivamente de un único factor y se ve afectado por el mecanismo lesional.

La cirugía del hígado ha evolucionado de ser casi inexistente a comprender un repertorio de operaciones que pueden eliminar de forma segura casi cualquier cantidad de tejido hepático. Estas operaciones ahora se realizan en numerosos hospitales y centros médicos de todo el mundo, con diversas aplicaciones médicas, muchas veces referidas a cirugía oncológica y curativa. No obstante, es crucial poder estudiar la regeneración y mejorar dichas técnicas quirúrgicas; intentado obtener el mayor porcentaje de hígado viable y sano, en el menor tiempo posible, para optimizar los tratamientos actuales.

Recuerdo anatómico-histológico del hígado

En este apartado nos vamos a ocupar de describir sucesivamente la anatomía quirúrgica del hígado, las peculiaridades del hígado de la rata respecto al del ser humano, así como aspectos interesantes de la histología del órgano.

Anatomía quirúrgica del hígado

De manera paralela al desarrollo de la cirugía hepática, el conocimiento anatómico del hígado, su división y terminología anatómica ha ido desarrollándose a lo largo del último siglo. Es imprescindible un preciso conocimiento de la anatomía hepática y del árbol biliar para poder operar el hígado con seguridad.

El hígado es un órgano sólido cuya masa (1200-1600 g) ocupa casi todo el hipocondrio derecho. Representa poco más del 2% del peso de un individuo sano, pudiendo variar entre ambos sexos. El aporte sanguíneo del hígado es dual, 80% procede la circulación venosa esplácnica y esplénica; el 20% corresponderá a la sangre arterial que proviene de la arteria hepática.

Inicialmente el hígado se dividía en dos "hígados", derecho e izquierdo, según su marca superficial más conspicua, el ligamento falciforme. Esta descripción no sólo era excesivamente simple, sino que además resultaba incorrecta en relación al verdadero aporte sanguíneo del hígado. Posteriormente, se propusieron descripciones más fidedignas de la anatomía lobular del hígado, dividiendo el hígado en dos lóbulos, derecho e izquierdo, basando dicha división en las ramas de la vena porta y hepática. Si bien este sistema resultaba más exacto desde el punto de vista anatómico, no describía la anatomía segmentaria funcional.

La anatomía funcional del hígado se compone de 8 segmentos, cada uno alimentado por una sola tríada portal. Los segmentos se organizan a su vez en cuatros sectores, diferenciados y divididos por las ramas suprahepáticas. Los cuatros sectores se reparten luego en hígado derecho e izquierdo.

Fue Claude Coinaud en 1954 quién inicialmente propusiera esta terminología, la que más tarde, en 1957, fuera desarrollada por Goldsmith y Woodburne. Define la anatomía hepática desde la prespectiva quirúrgica. La proyección vertical de las venas suprahepáticas divide al hígado en cuatro secciones: posterior derecha, anterior derecha, medial izquierda y lateral izquierda. Las fronteras anatómicas entre las cuatro secciones se denominan cisuras (cisura portal derecha, cisura sagital o media y cisura

portal izquierda) y no se corresponden con las cisuras de la anatomía morfológica clásica. Su importancia radica en que se trata de líneas fundamentales para la sección del parénquima hepático durante una resección reglada. La cisura principal (sagital o media) contiene la vena hepática media que sigue un trayecto anteroposterior desde la fosa cística por el borde izquierdo de la vena cava y divide el hígado en los hemihígados derecho e izquierdo. La línea de la cisura principal también se conoce como línea de Cantlie.

Si se traza un plano horizontal imaginario sobre el eje de la bifurcación portal, se observa cómo las cuatro secciones antes definidas se dividen en ocho segmentos, que componen la base de la anatomía funcional hepática. Por último, el lóbulo caudado (segmento I) es la porción dorsal del hígado y abraza la vena cava inferior por su cara posterior, situándose detrás de la tríada portal izquierda, vena hepática izquierda y media.

Desde el punto de vista anatómico se han descrito tres porciones del segmento I: lóbulo caudado (lóbulo de Spiegel) a la izquierda de la vena porta; proceso o tubérculo caudado, porción entre la vena cava y vena porta; y porción paracaval, porción más craneal que se localiza cerca de las venas suprahepáticas (que se reconoce como segmento IX). La porción izquierda del lóbulo caudado se encuentra en la transcavidad de los epiplones y está revestida, por delante, por el ligamento gastrohepático (epiplón menor) que lo separa de los segmentos II y III situados en un plano anterior.

En el año 2000, el Comité Científico de la Asociación Internacional Hepatobilio-Pancreática (IHPBA), con objeto de poner fin a la confusión entre las diferentes clasificaciones aprobó unánimemente una nueva terminología: la clasificación de Brisbane (fig. 2). Establecieron divisiones de primer orden (definiendo un plano medial en que se dividía el hígado en hemi-hígados, derecho e izquierdo); divisiones de segundo orden (definiendo planos intersecciones que dividía cada hemi-hígado en dos sectores) y divisiones de tercer orden (definiendo planos intersegmentarios que dividían los sectores en 8 segmentos independientes de manera similar a la que describió Couinaud).

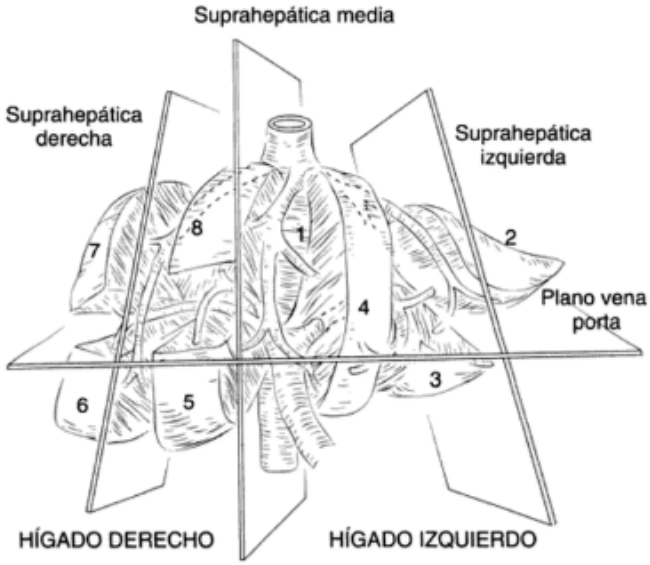


Figura 2. División hepática en ocho segmentos. Proyección de las venas suprahepáticas y bifuración portal. (Cirugía Hepática. Guías Clínicas de la Asociación Española de Cirujanos. D. Casanova, J. Figueras, F. Pardo. Arán Ediciones, S.L. 2004.)

Por último, conviene detenerse, aunque solo sea de manera simbólica en la descripción del hilio hepático, cuyo conocimiento es crucial y avío para la ligadura portal. En el hilio hepático, la tríada portal derecha sigue un trayecto extrahepático corto, de aproximadamente 1 cm a 1,5 cm. La triada portal izquierda, por el contrario, posee un trayecto extrahepático largo, de hasta 3 cm o 4 cm, y discurre transversalmente a lo largo de la base del segmento IV. La tríada portal izquierda continúa hacia adelante y hacia abajo por la fisura umbilical (portal izquierda) y emite ramas para los segmentos II y III, así como ramas recurrentes para el segmento IV.

Anatomía hepática de la rata

La rata de laboratorio (Rattu Norvegicus Albinus) ha sido usada como modelo para investigaciones médicas, biológicas y de diversa índole desde hace mucho tiempo. Sin embargo, existen pocos escritos que hablen de la anatomía hepática de la rata.

El hígado se ubica sobre la cara caudal del diafragma, extendiéndose a ambos lados del plano mediano y ocupando el espacio desde el arco costal derecho al izquierdo. A pesar

de ser un órgano multilobulado, el hígado murino, y más concretamente el lóbulo medio hepático, se encuentra fijado a la concavidad del diafragma izquierdo por una ligera y fina capa de tejido conectivo que recuerda al ligamento falciforme humano. Atendiendo a similitudes con la anatomía humana, encontramos que también existe un símil al ligamento gastrohepático, localizado entre el lóbulo lateral izquierdo y la curvadura menor gástrica.

Órgano firme de color rojo oscuro, el hígado murino está compuesto por 4 lóbulos: mediano, lateral izquierdo, lateral derecho y caudado.

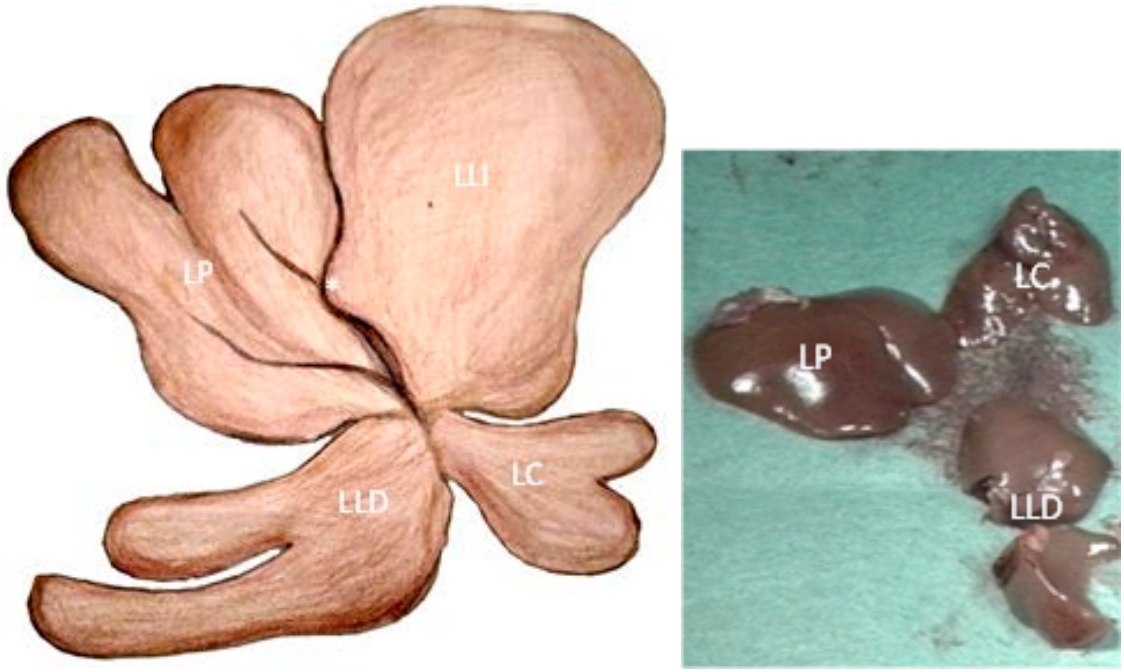


Figura 3. A. División hepática en 4 segmentos. Visión en proyección caudal del hígado murino. LLI: Lóbulo lateral izquierdo, LP: Lóbulo paramediano, LLD: Lóbulo lateral derecho, LC: Lóbulo Caudado. * Tubérculo en cara medial interna de LI, zona de ligadura hepática del 50% (LLI + LM lobulillo izquierdo). **B**. **Hepatectomía de Lóbulo Lateral Izquierdo** (hepatectomía del 40%). Hipertrofia de lóbulos remanentes.

Analizándolos de manera individualizada, en lo que se refiere al **lóbulo mediano**, éste corresponde al 30% del peso hepático y está dividido por una fisura longitudinal, formando los lóbulos central o paramediano derecho e izquierdo. El lóbulo central derecho se encuentra generalmente cubierto por el lóbulo lateral derecho, dificultando

su visualización. El **lóbulo lateral derecho** corresponderá al 20% del peso hepático total y está divido transversalmente a su vez en anterior y posterior, estando éste último en contacto directo con el polo superior del riñón derecho. Detrás del lóbulo central izquierdo encontramos el **lóbulo lateral izquierdo**, lóbulo compacto, grande y de apariencia alargada que supone el 40% del parénquima. Por último, el **lóbulo caudado**, que corresponde a un 10% del peso hepático y que se localizado ventro-caudal al resto de los lóbulos, se divide en dos pequeñas fracciones por medio de una fisura transversal (fig. 3). El lóbulo mediano y el lateral izquierdo suponen el 70 % del hígado y su extirpación se reconoce clásicamente como modelo de hepatectomía parcial. Siendo el hígado murino un órgano con divisiones anatómicas claras, su extirpación y ligadura hiliar no resulta técnicamente complicada. Sin embargo, la individualización de las estructuras portales dificulta los modelos de ligadura portal, más aún si se tiene en cuenta que a lo largo del recorrido de la triada portal izquierda se van produciendo las divisiones vasculo-biliares que van a dirigirse de manera separada a cada uno de los segmentos del lóbulo mediano. En la siguiente ilustración (fig. 4) se expone la división hiliar que ocurre entre el lóbulo lateral izquierdo y el lóbulo mediano izquierdo, habiéndose ramificado proximalmente el pedículo para el lóbulo mediano derecho.

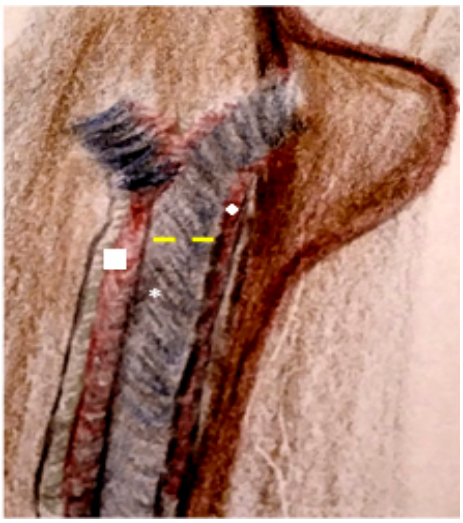


Figura 4. Pedículo portal para Lóbulo Lateral Izquierdo y Lóbulo Paramediano Izquierdo. Tapado por el tubérculo hepático de la cara medial de Lóbulo Lateral Izquierdo. * Rama portal ■ Arteria hiliar ♦ Arteria hiliar posterior. Inconstante. - - Zona de ligadura.

Histología hepática

La histología hepática y su distribución celular se estructuran a partir del hepatocito, célula principal del parénquima hepático. Histológicamente va acompañada de células del epitelio biliar, células de endotelio vascular, fibrobablastos y células inmunitarias: las células estrelladas o de Ito, las células de Kupffer y los leucocitos.

Los hepatocitos se disponen en láminas, cordones lineales unicelulares que delimitan lagunas vasculares llamadas sinusoides, donde drenará la sangre procedente de las ramas portales y arteriales. Los sinusoides son estructuras capilares con amplios poros intercelulares que permiten el paso bidireccional de moléculas y elementos sanguíneos desde el espacio de Disse o perisinusoidal y que facilitan una comunicación vascular entre el sistema venoso portal y la vena cava. La sangre fluirá a partir de la triada portal, compuesta por una rama terminal de la arteria hepática, otra de la vena porta y un conductillo biliar.

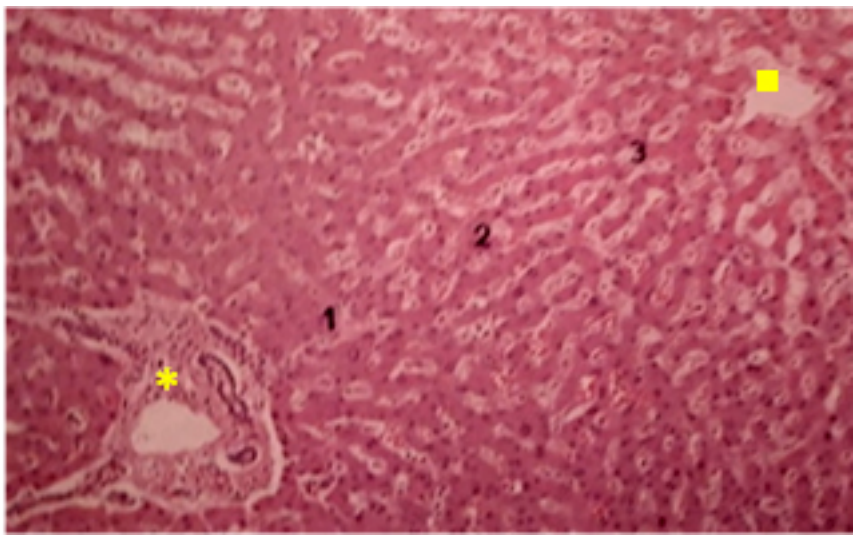


Figura 5. Distribución funcional del acino hepático. Cordones de hepatocitos dispuestos entre: * Triada portal y ■ Vénula central (Atlas de Anatomía Patológica. Robbins y Cotran. E.C. Klatt.)

La bilis por el contrario, fluye en dirección opuesta, siendo secretada dentro de espacios intercordonales estrechos que se localizan entre las superficies enfrentadas de hileras

de hepatocitos. Los canalículos biliares desembocan en el canal de Hering, conexión que existe entre éstos y el árbol biliar a nivel del espacio portal.

La estructura básica funcional del parénquima hepático es el lobulillo. Atendiendo al flujo sanguíneo, el lobulillo hepático se ha entendido clásicamente como una figura geométrica hexagonal, delimitada por una triada portal en cada uno de sus seis vértices, y dispuesta alrededor de una vénula central que desemboca en el sistema venoso suprahepático. Esta distribución también puede ser comprendida desde un punto de vista biliar, en cuyo caso, el centro del lobulillo sería el conducto biliar a nivel de la triada portal.

Las consideraciones funcionales van cogiendo mayor relevancia, habiendo cambiado la percepción clásica del lobulillo hepático, y clasificándolo actualmente en tres zonas. De esta manera, en consideración con el flujo sanguíneo, cada hexágono puede ser entendido como 6 acinos hepáticos, divididos a su vez en tres zonas: zona I rica en óxigeno y nutrientes, II intermedia y zona III, pobre en oxígeno y nutrientes. El concepto de acino hepático explica mejor los patrones de regeneración hepática, actividad metabólica y aparición de cirrosis.

Contextualización clínica

Existen múltiples enfermedades que afectan al hígado, de las cuales, un gran número de procesos neoplásicos solo serán curables tras una cirugía con márgenes quirúrgicos libres de enfermedad.

En diversas situaciones la búsqueda de la curación y del control de la enfermedad se resume en cirugías que conllevan un sacrificio importante del volumen hepático.

Un ejemplo que frecuentemente suele producir este tipo de tesitura es el tratamiento de las metástasis hepáticas del carcinoma colorrectal, enfermedad que sin mayor diseminación ha demostrado mejoría oncológica llamativa una vez resueltas la afectación primaria y la hepática.

Metástasis hepática de carcinoma colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es una enfermedad con una gran carga mundial. En los países desarrollados resulta ser el segundo tumor maligno más común, considerando conjuntamente ambos sexos; y ocupa el primer lugar como causa de muerte por cáncer. En España y en el entorno que nos ocupa, la prevalencia es de 26.500 casos/año, habiéndose incrementado porcentualmente en los últimos años.

En cuanto a lo que concierne a su diseminación, el CCR invasivo se propaga principalmente a través de dos mecanismos: por medio de la metástasis a ganglios linfáticos regionales-centrales y circulación sistémica, o diseminándose directamente al hígado a través del drenaje venoso portal. Cuando el cáncer se propaga a través del sistema portal, el hígado actúa eficazmente como filtro y minimiza o incluso evita, en primera instancia, la propagación a sitios distantes.

La diseminación gradual del cáncer desde el sitio primario al hígado a través de la circulación portal, y del hígado a otros órganos, brinda la oportunidad de prevenir la diseminación del tumor a otros sitios por medio del tratamiento directo de las metástasis hepáticas.

El hígado es el órgano que con mayor frecuencia alberga metástasis de origen hematógeno del CCR. En la enfermedad diseminada, en 2/3 de los casos existe enfermedad en otros órganos, pero alrededor del 30% de los pacientes, tiene afectación hepática como única localización. En pacientes con metástasis hepáticas aisladas, la extensión de la enfermedad hepática es el principal determinante de supervivencia [2].

En los tumores metastásicos (estadio IV) la supervivencia tradicionalmente estimada al año es de 5.7% con enfermedad hepática generalizada, 27% para aquellos con metástasis localizadas en un solo segmento o lóbulo hepático, y del 60% para pacientes con metástasis solitaria[2]; con una supervivencia a los 3 años menor al 20%[3]. Sin embargo, hoy en día este valor ha experimentado una importante mejoría debido a la implementación de tratamientos multidisciplinares que integran tanto tratamientos quirúrgicos como terapias locales y nuevos tratamientos quimioterápicos. Con los

nuevos tratamientos multimodales y una cuidadosa selección de pacientes, se prevé una supervivencia a 5 años cercana al 70% tras la resección hepática[4]. La metástasis de carcinoma colorrectal se considera potencialmente curable con tasas de supervivencia entorno al 55%, 30% y > 18% a los 5, 10 y 20 años respectivamente[4,7].

En las últimas tres décadas la cirugía ha demostrado ser una modalidad segura y potencialmente curativa en el tratamiento de la metástasis hepática de origen colorrectal. La supervivencia máxima estimada a 5 años después de una resección hepática con margen negativo es de entorno al 55%[6,7], con una supervivencia a 10 años cercana al 30%[7]. A pesar de la inexistencia de ensayos prospectivos aleatorizados que comparen la resección hepática frente a terapias sistémicas, regionales u otras terapias locales, el resultado para los pacientes después de la resección hepática de metástasis es lo suficientemente favorable como para que la cirugía se considere terapia primaria en pacientes seleccionados[5].

Además, la notable capacidad del hígado para regenerarse después de la resección hepática ha permitido opciones quirúrgicas agresivas. En pacientes con parénquima hepático normal es posible la eliminación de hasta el 80% del hígado[7], ocurriendo la regeneración hepática en las sucesivas semanas. Todo ello vendrá limitado por el volumen hepático resecado y/o la capacidad del hígado para poder restaurar su función. Esto estará influenciado asimismo por las condiciones basales del paciente, en general, deterioradas por la necesidad de tratamientos adyuvantes con quimioterapia.

Tratamiento quimioterápico

El tratamiento sistémico del CCR ha variado mucho en las últimas tres décadas, siendo el 5-fluorouracilo (5-FU) el fármaco central y eje del tratamiento quimioterápico. Con alto grado de recomendación y evidencia científica, fue a partir de la década de los 80 cuando el 5-FU se combinó con la leucovorina (LV), optimizando la tasa de respuesta tumoral y la mediana de supervivencia[6,9].

En el 2000 se añadió el irinotecan (CPT-11) a la terapia sistémica, en combinación con 5-FU / LV (terapia FOLFIRI)[9]. Posteriormente, fue el oxaliplatino junto con 5-FU / LV

(FOLFOX) aceptado como segundo régimen de combinación de primera línea efectivo[11,12]. FOLFIRI y FOLFOX son considerados como equivalentes en el entorno oncológico y generalmente se seleccionan de acuerdo con el perfil de toxicidad. No obstante, dado a sus eficaces resultados, se han llegado a considerar terapias combinadas entre ambos esquemas, régimen FOLFOXIRI, terapia agresiva con buenos resultados oncológicos[12].

Por último, la quimioterapia ha sido suplementada por nuevos tratamientos, denominados biológicos: moléculas y anticuerpos en contra de factores de crecimiento o receptores de los mismos en la superficie celular. Así es el caso del Bevacizumab, anticuerpo monoclonal contra el factor de crecimiento del endotelial vascular (VEGF), de eficacia demostrada[14]; y el Cetuximab[15,16,18] y el Panitumumab[17], ambos anticuerpos monoclonales contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF_R); útiles en enfermedad diseminada siempre que el gen KRAS permanezca nativo y sin mutación.

Por otro lado, sería injusto reconocer el desarrollo de los tratamientos modernos únicamente desde su prespectiva molecular. Se han estudiado diferentes métodos de aplicación con objeto de disminuir sus efectos sistémicos, ejemplo de ello es la administración selectiva intraarterial de agentes quimioterápicos[24].

Este desarrollo ingente de adyuvancia y de tratamientos sistémicos para el CCR ha demostrado lograr tasas de respuestas de hasta el 70%. Siendo así, y considerando que no más del 25% de las metástasis hepáticas de cáncer colorrectal son resecables al diagnóstico[19,20,21], los tratamientos sistémicos han adquirido una importancia crucial a la hora de poder rescatar metástasis hepáticas de inicio irresecables.

Por tanto, varias ventajas prácticas y conceptuales asisten a la quimioterapia neoadyuvante en el CCR metastásico. La eficacia mejorada de la quimioterapia moderna tiene el potencial de convertir el CCR metastásico irresecable en una enfermedad resecable[22,23,24,25], o reducir al menos el grado de resección requerido para eliminar la enfermedad hepática. Los estudios actuales infieren una conversión de hasta un 12-33%

de los pacientes, permitiendo una resección R0 y logrando supervivencias a 5 años > al 30-35%.

En la actualidad, con el empleo de los tratamientos multidisciplinares modernos, los factores que limitan la resección curativa en las metástasis hepáticas son:

- La inoperabilidad del paciente.
- La presencia de lesión bilobular o voluminosa que afecta a >70% del parénquima hepático.
- La presencia de enfermedad extrahepática no controlable.
- La afectación vascular o biliar que impida una resección R0.

A nivel hepático y obviando el hecho práctico de tener que realizar una cirugía con márgenes libres de enfermedad, será la disponibilidad de suficiente parénquima sano lo que podrá llegar a limitar la curación. En pacientes con reserva hepática normal es posible la eliminación de hasta el 70-80% del hígado; no obstante, la necesidad de neoadyuvancia para rescatar pacientes de inicio irresecables puede dañar el tejido hepático y por ende obligar a preservar mayor porcentaje que asegure una funcionalidad hepática mínima.

Efecto hepático del tratamiento quimioterápico

En los últimos años, a medida que han mejorado las técnicas quirúrgicas, el instrumental y la experiencia de los cirujanos; la morbi-mortalidad de las resecciones hepáticas ha disminuido sensiblemente. La mortalidad postoperatoria es ya inferior al 5% en la mayoría de las series. Bien es verdad que la morbilidad aún es elevada, situándose en un rango del 20-40% en la mayoría de las publicaciones. En general las principales complicaciones referenciadas son: insuficiencia hepática, hemorragia, absceso subfrénico y fístula biliar.

Por otro lado, la quimioterapia neoadyuvante ha demostrado causar lesiones hepáticas en algunos pacientes (tabla 1), llegándose a describir efectos adversos como: colangitis esclerosante, dilatación-fibrosis de las venas centrales y moderada necrosis

hepatocelular o colestasis en el área centrolobular. Específicamente, el oxaliplatino se ha asociado con la obstrucción sinusoidal hepática[27,33] y el fluorouracilo e irinotecan con la esteatosis hepática[28,32], pudiendo incluso causar esteatohepatitis grave. Estos cambios histológicos pueden ser responsables de un mayor riesgo de sangrado durante la cirugía a medida que aumenta la congestión y la friabilidad del parénquima hepático.

Tabla 1. Toxicidad hepática de la quimioterapia

Fármaco	Lesión	Impacto Clínico
5-FU	Esteatosis	Aumento morbilidad
Oxaliplatino	Sd Oclusión sinusoidal	Aumento morbilidad
Irinotecán	Esteatohepatitis	Aumento morbi-mortalidad
Floruridina ia	Estenosis VBE	Daño biliar

Cuando se planifica una resección hepática importante en un paciente y se sospecha que tiene una función hepática alterada tras la exposición a quimioterapia sistémica, existen diversos métodos justificados para inducir hipertrofia en el futuro hígado residual. En algunos casos, la preocupación sobre la función del futuro remanente hepático puede incluso obligar al cirujano a modificar el orden del proceso, operando y administrando quimioterapia adyuvante durante el periodo postoperatorio, después de que el hígado se haya regenerado.

Como se ha mencionado, además de la esteatohepatitis, el hígado tratado puede volverse fibrótico y desarrollar adherencias perivasculares que puedan complicar una resección planificada. A pesar de que está bien documentado que con la quimioterapia se producen cambios histológicos en el hígado, su impacto clínico real no está del todo claro; de hecho, los estudios difieren en cuanto a su influencia en la mortalidad de las series publicadas. Bien es verdad que la mayoría de la bibliografía coincide en reconocer

su asociación con la morbilidad postoperatoria. De esta manera, cuando el remanente hepático estimado es inferior al 20-30%[7], la elección y el método de resección está sujeto a debate.

5-fluorouracilo y metabolitos del ácido fólico

El 5-fluorouracilo ha supuesto el centro de las terapias quimioterápicas de la patología neoplásica gastrointestinal desde que fue descrito en 1957[30].

Dicho fármaco, y más concretamente su metabolito activo el 5-fluoro-2´-deoxiuridin-5´-monofosfato (FdUMP), inhibe la proliferación celular al unirse a la enzima Timidilato Sintetasa (TYMS); ya que esto afecta a la producción de ciertos ácidos nucleicos, y como consecuencia, a la síntesis de DNA y RNA.

Se ha demostrado que la eficacia del 5-fluorouracilo aumenta cuando se administra en adyuvancia con el fármaco leucovorina, folinato cálcico que en su forma 5-10-dimetilenetetrahidrofolato (5-10-CH_2-FH_4) genera un complejo de unión entre la TYMS y el FdUMP potenciando el efecto del 5-FU.

La leucovorina (LV) y el resto de metabolitos derivados del ácido fólico suponen un sustrato esencial para un importante número de procesos metabólicos, entre los que destacan la modulación de la TYMS por medio de su donación de moléculas de carbono. Según Tsukihara et al[31] la deficiencia de leucovorina como del ácido fólico y sus derivados, afecta directamente en la eficacia del 5-fluorouracilo, habiendo inhibido in vitro y a nivel celular la expresión de receptores y enzimas necesarias para la reducción del ácido fólico y su adquisición en la célula. En situaciones normales, la deficiencia de ácido fólico afectaría directamente a la proliferación celular por su efecto directo en la modulación de la enzima TYMS.

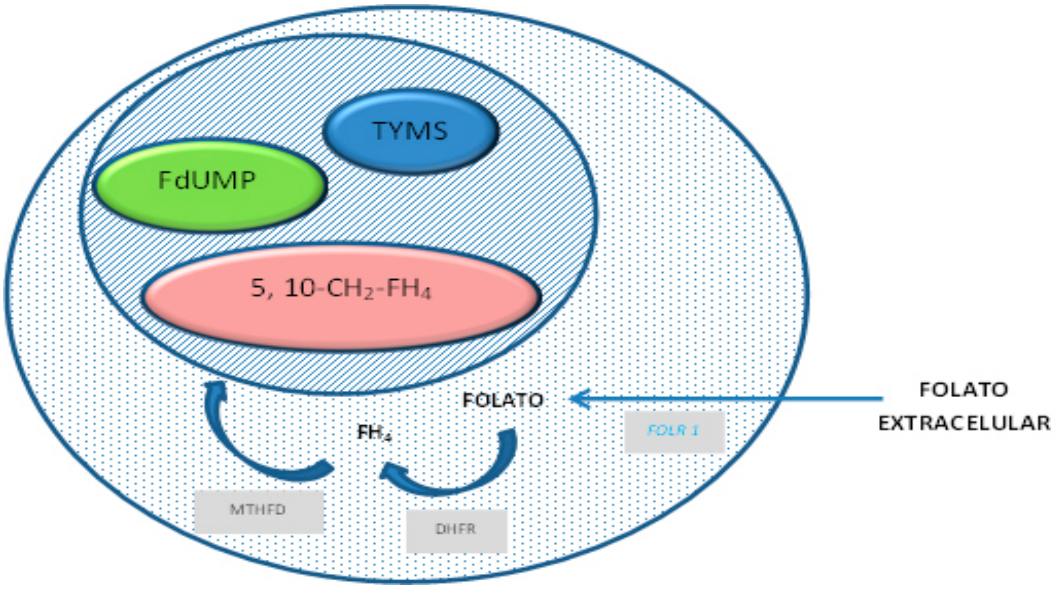


Figura 6. Transformación intracelular del folato. Una vez en el interior de la célula el ácido fólico sufrirá un proceso de reducción y de adquisición de grupos metileno. El metabolito 5-10-CH_2-FH_4 resultante; se unirá a la TYMS para su normal funcionamiento. Será al complejo TYMS-5-10-CH_2-FH_4 al que se unirá el FdUMP, inactivándolo. *FOLR-1 (Receptor de Folatos 1), DHFR (dihidrofolato reductasa), MTHFD (metileno-tetrahidrofolato deshidrogenasa)*

Técnicas para incrementar-preservar parénquima hepático

Tal y como se ha mencionado previamente, en contraste con otros órganos sólidos, el hígado humano tiene la capacidad única de regenerarse después de una lesión tóxica, inflamación crónica o resección quirúrgica. Los términos regeneración, hiperplasia e hipertrofia se utilizan como sinónimos en la literatura, pero el concepto de hiperplasia es el más preciso desde el punto de vista celular. Este proceso está altamente regulado, involucrando múltiples tipos de células, señales extrahepáticas, rutas moleculares complejas e interacciones celulares que se expondrán en el apartado de regeneración hepática.

No obstante, de manera resumida podría decirse que el hígado posee la cualidad singular de regenerarse, ajustando su volumen a las necesidades del organismo. La regeneración del hígado es una respuesta hiperplásica de todos los tipos celulares de este órgano, en la que se mantiene, al final, la anatomía microscópica del hígado funcional, no así su morfología anatómica.

Sin embargo, y al hilo de lo mencionado previamente, en múltiples ocasiones la cirugía hepática se realizará en hígados enfermos y cuya función pudiera estar alterada tras la quimioterapia, adquiriendo importancia vital las técnicas, tanto quirúrgicas como médicas, que potencien y faciliten la restauración del parénquima hepático.

Técnicas quirúrgicas que influyen en el crecimiento del remanente hepático

En expectativa de una resección hepática mayor en hígados con LOEs (lesiones ocupantes de espacio) múltiples y/o bilaterales (derechas e izquierdas), urge la necesidad de utilizar técnicas que puedan garantizar una cirugía oncológica radical y que preserven suficiente tejido hepático para mantener sus funciones básicas.

Aunque dificultosa y con gran morbi-mortalidad asociada, la resección hepática en manos de grupos especializados se realiza de manera eficiente y con márgenes libres seguros, siendo actualmente el dejar tejido hepático suficiente la principal limitación.

Hoy en día, por tanto, serán limitaciones para la cirugía hepática de la metástasis del CCR que las LOEs sean resecables y que el parénquima hepático remanente supere el 20-30% del volumen inicial, normalmente cubierto con la preservación de 2 o más segmentos hepáticos contiguos.

En ese sentido, conocedores de la posibilidad regenerativa del hígado, existen múltiples posibilidades intervencionistas y quirúrgicas que buscan incrementar el parénquima hepático para poder llevar a cabo mayores hepatectomías.

Además, en contra de lo postulado previamente en relación a obtener márgenes quirúrgicos de seguridad amplios, existe bibliografía suficiente que defiende que márgenes milimétricos libres de enfermedad son suficientes para obtener un beneficio oncológico[35].

Hepatectomías repetidas

Las nuevas estrategias oncoquirúrgicas buscan el control de la enfermedad hepática por medio de la resección completa de la metástasis del carcinoma colorrectal, bajo la

"promesa" biológica de que el hígado será capaz de soportar grandes hepatectomías al regenerar su volumen y mantener su función.

Cuando la enfermedad se limita a un escaso número de LOEs, una de las opciones terapéuticas viables será la resección multifocal de la enfermedad, siempre y cuando, el volumen hepático y las estructuras vasculares principales se respeten (figura 7).

Figura 7. Resección de una única lesión ocupante de espacio (LOE). Cuando la enfermedad se limita a un único lóbulo hepático el tratamiento puede restringirse únicamente a metastasectomías-segmentectomías limitadas. A: dos metástasis hepáticas en hígado izquierdo. B: metastasectomía limitada a LOEs

Asimismo, se ha visto que en caso de recidiva, las segundas y terceras hepatectomías obtienen un beneficio y supervivencia similar a las hepatectomías primarias[38,39]. De ello se deduce que en metástasis resecables y que cuya resección preserve suficiente parénquima hepático, las hepatectomías repetidas son una estrategia válida y respetuosa que otorga al hígado tiempo suficiente para poder regenerarse.

Por otro lado, de resultados obtenidos tras hepatectomías repetidas se han postulado los siguientes signos de mal pronóstico[35,36,37]:

- Márgenes afectos
- Lesiones cuyo tamaño real resultó ser >5 cm
- Lesiones más numerosas de las inicialmente diagnosticadas

Esto ha llevado a optimizar el diagnóstico preoperatorio, buscando gran exactitud en la valoración preoperatoria del tamaño, número y límites de las lesiones a extirpar.

Además, siendo estas las limitaciones principales, actualmente se ha abierto un escenario quirúrgico ilimitado.

Todo ello ha llevado al desarrollo de técnicas agresivas basadas en amplias resecciones y cirugías en diferentes tiempos, que asocian procesos de incremento de parénquima hepático sano para preservar la funcionalidad del órgano. La capacidad de crecer que tiene el hígado ha facilitado que en pacientes seleccionados se sopese la opción de realizar hepatectomías en dos tiempos, optando por una cirugía curativa en un segundo tiempo[40]. Otro ejemplo de esta nueva prespectiva es la oclusión portal selectiva, pudiendo asociar transecciones hepáticas que incrementen su efecto regenerativo.

Embolización portal preoperatoria (PVE)

A pesar de presentar metástasis subsidiarias de resección, existen hígados cuyo parénquima sano resulta insuficiente para poder soportar una resección hepática mayor, aunque ésta se realice en dos tiempos; lo que llevaría a una insuficiencia hepática insalvable.

Es ese contexto, en 1990 Makuuchi et al[41] propusieron una nueva técnica con objeto de conseguir mayor volumen hepático remanente. Observaron que la limitación principal en la cirugía oncológica del colangiocarcinoma extrahepático proximal radicaba en la insuficiencia hepática residual del lóbulo hepático que se preservaba; por lo que propusieron un aumento volumétrico y funcional preoperatorio por medio de una embolización de las ramas portales del lóbulo hepático contralateral. Según esta hipótesis, la atrofia que generara dicha embolización en el lóbulo hepático a resecar, provocaría una hiperplasia del remanente, preparándolo para la cirugía.

Los buenos resultados obtenidos pronto han extendido su utilidad a otras intervenciones hepáticas. Un ejemplo de ello es la cirugía oncológica de la metástasis hepática del CCR. En los casos en que la enfermedad metastásica afecta a ambos lóbulos hepáticos, suele ser necesario realizar una resección en dos tiempos. En este contexto, la técnica de embolización se puede asociar durante la primera etapa: se resecan las metástasis de un hemi-hígado y al mismo tiempo se emboliza el hígado contralateral.

De esta manera, cuando se realice la segunda intervención, el hígado no embolizado se habrá hiperplasiado, procediéndose a realizar la hepatectomía del lóbulo atrofiado.

La PVE ha convertido en operables a pacientes con enfermedad bilateral hepática y/o con poco volumen hepático remanente, evitando la insuficiencia hepática post-cirugía. Se trata de un procedimiento con baja morbimortalidad y con complicaciones similares a otras técnicas percutáneas[42]. No obstante, el crecimiento hepático que se quiere lograr se obtiene a las 4-8 semanas de la embolización, habiéndose objetivado en ciertas series una progresión tumoral en probable relación al ambiente mitogénico que se genera[43,44,99]. De ello se infiere que una regeneración más precoz podría controlar mejor la enfermedad, habiéndose desarrollado alternativas prometedoras como la ALPPS "Associating Liver Partition and Portal ligation for Staged hepatectomy" (Partición Hepática con Ligadura Portal), descrita por Baumgart et al[46].

Partición hepática con ligadura portal (ALPPS)

La asociación de la transección hepática a la embolización portal (fig. 8) ha demostrado conseguir una precoz y marcada regeneración del hígado remanente, pudiendo objetivarla ya a los 7-10 días tras la cirugía.

Su eficacia radica en que evita el flujo sanguíneo colateral existente entre ambos lóbulos hepáticos, intensificando la isquemia portal del hemi-higado embolizado y aumentando así su hiperplasia contralateral. Además, disminuiría el tiempo del proceso regenerativo y por tanto, el contacto de la enfermedad tumoral con el ambiente proliferativo.

Todo ello produce un rápido crecimiento del hígado permitiendo una reintervención precoz (< 1 semana), tratando de prevenir la recidiva tumoral en el ínterin entre cirugías. No obstante, los resultados iniciales asociados a la técnica presentaron una gran morbimortalidad, llegando a registrarse alrededor de un 30% de pacientes con insuficiencia hepática postquirúrgica[51,52]. Durante la técnica, el hígado sufre una afluencia intensa de señales proliferativas pudiendo desencadenar una hiperperfusión y una respuesta al estrés hiperproliferativo excesivo que conllevaría una insuficiencia hepática. Además, existen autores que han descrito un aumento de agresividad en la

célula tumoral durante el periodo intercirugía, pudiendo estar en relación con la hiperseñalización que se produce y empeorando, por consiguiente, el pronóstico de la enfermedad tumoral[43,44].

Nos encontramos por tanto ante un recurso terapéutico prometedor que podría rescatar y curar a un gran número de pacientes, pero que somete al parénquima hepático a una exigencia muy intensa. Todo ello ha relegado la técnica a indicaciones muy limitadas con una estrecha selección de pacientes.

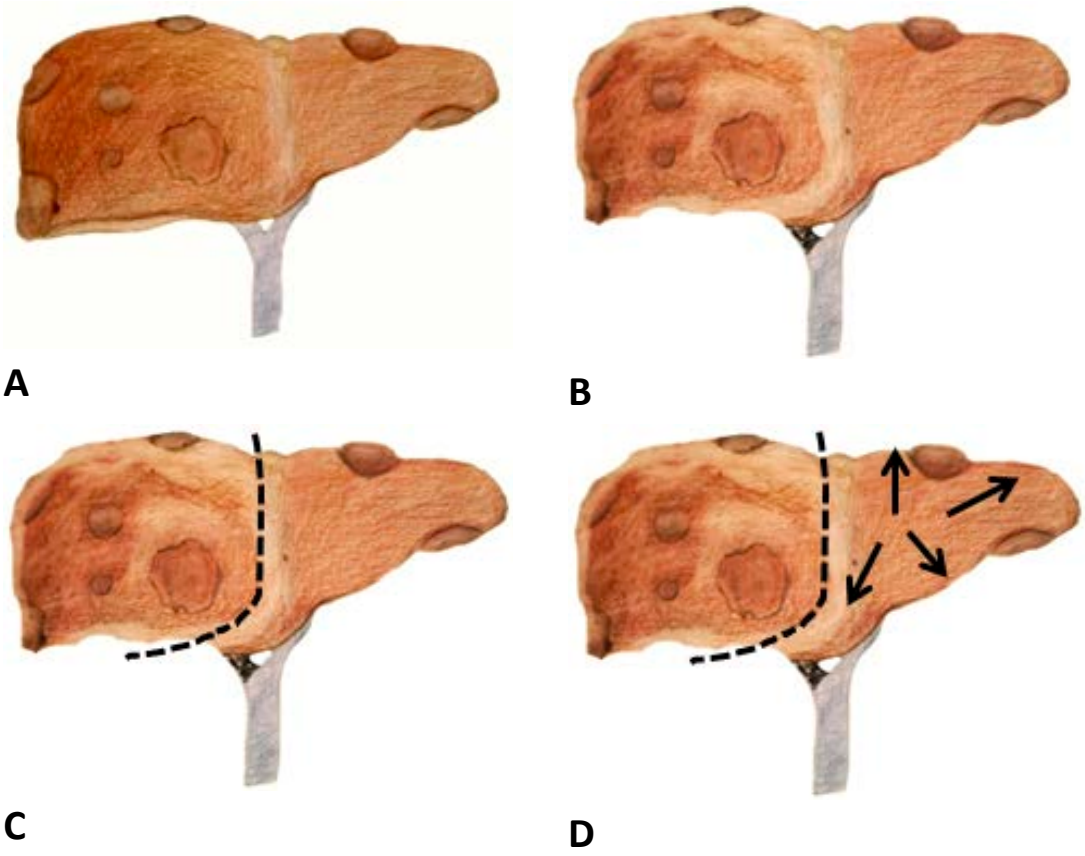


Figura 8. Ilustración que evoca la Partición hepática con ligadura portal (ALPPS). A: Hígado con metástasis bilaterales. B: Ligadura-embolización de lóbulo hepático con más enfermedad y su atrofia. C: Metastasectomía en parénquima remanente y transección hepática. D: Hiperplasia compensatoria de hígado sano.

Insuficiencia hepática

La necesidad de implementar tratamientos multidisciplinares con objeto de buscar la resecabilidad de la metástasis hepática del carcinoma colorrectal, y la influencia de los

diversos quimioteráticos en el remanente hepático; ha supuesto un escenario complejo y en cierta medida incierto acerca de la viabilidad final del hígado.

A día de hoy sigue sin conocerse la razón por la que la misma resección hepática en unos pacientes provoca insuficiencia hepática y en otros da lugar a una regeneración eficaz, siendo probablemente de etiología multifactorial.

Después de una lesión tóxica, resección o trasplante hepático, la funcionalidad hepática cambia dramáticamente a tareas cruciales de recuperación y regeneración, a expensas de interrumpir el metabolismo normal. El éxito de restaurar la masa hepática perdida, reparar la lesión del tejido y resolver la inflamación, determina la capacidad del hígado para soportar una función metabólica normal y recuperarse. Es por lo que la implementación de Unidades de Cuidados Intensivos que aprecien signos incipientes de fallo hepático e instauren tratamientos intensivos que proporcionen un buen postoperatorio es crucial para poder hacer frente a la insuficiencia hepática.

El progreso a nivel de técnicas quirúrgicas, anestésicas e intensivitas, ha disminuido la incidencia de la insuficiencia hepática postresección y su mortalidad, estimada en torno al 0-5%[54], variando según estudios y definiciones de la misma.

No existe una definición universal del cuadro clínico. El cuadro típico del paciente con insuficiencia hepática tras una hepatectomía suele caracterizarse por ictericia, coagulopatía, desregulación metabólica y encefalopatía; pudiendo ocurrir de manera aguda o subaguda[124]. Los factores de riesgos predisponentes a dicho fallo se resumen en los siguientes[52, 54, 55, 56, 57]:

- Razones preoperatorias:
    - Edad
    - Malnutrición, diabetes
    - Hepatopatía crónica: cirrosis, esteatosis hepática, colestasis, etc.
    - Tratamientos adyuvantes: quimioterapia
    - Cirugía hepática previa
- Razones intraoperatorias:

    - Tiempo quirúrgico
    - Tiempo de isquemia-reperfusión hepática.
    - Volumen hepático residual. Extensión de la resección
- Razones postoperatorias:
    - Hemorragia
    - Sepsis
    - Control postoperatorio

Una resección hepática mayor (definida como una resección de 4 o más segmentos) en hígados con esteatosis, esteatohepatitis y/o con síndromes oclusivos sinusoidales, puede suponer un mecanismo lesional suficiente como para producir una insuficiencia hepatocelular.

Para obtener una regeneración óptima y efectiva es obligatorio que exista un número de células hepáticas (parenquimatosas y no-parenquimatosas) suficientes. El hígado residual deberá ser capaz de soportar la redistribución del flujo enterohepático. Según la teoría de "hiperperfusión" [54, 55, 59], si el hígado remanente no es capaz de soportar el flujo sanguíneo hepático residual, condenará a una dilatación extrema de los sinusoides con el consiguiente estrés, sufusión del espacio de Disse, activación de células de Kupffer, de Ito, células proinflamatorias, necrosis centrolobulillar, colestasis y muerte celular/apoptosis. La somatostatina, molécula con capacidad de producir vasoconstricción esplácnica y disminución del flujo portal, ha demostrado tener utilidad en evitar la insuficiencia hepática por hiperaflujo[105].

Por otro lado, es crucial que exista un volumen hepático remanente suficiente, en general calculado en torno al >20% del parénquima inicial en hígados sanos[7,54]. Esto varía en caso de hígados con enfermedad previa: cirrosis hepática, esteatosis, colestasis, e incluso, enfermedad hepática inducida por la quimioterapia. El 5 FU y el irinotecan, relacionados estrechamente con la esteatosis y la esteatohepatitis, se han relacionado con un aumento de la mortalidad tras la resección hepática[60].

El hígado remanente además tendrá que ser capaz de tolerar y mantener una función suficiente para sostener todo el flujo enterohepático (circulación biliar, nutricional, tóxico) y función metabólica, pudiendo en caso contrario desarrollar una insuficiencia hepática subaguda o crónica.

Sin embargo, la razón por la que en algunos hígados se desarrolla una insuficiencia hepática irreversible continúa siendo incierta. Existe la teoría de la "respuesta al estrés hiperproliferativo" [75], por la que se cree que un estímulo mitogénico intenso podría desembocar en una senescencia celular inducida. Todas las células de nuestro organismo presentan una senescencia replicativa determinada e inmutable según el proceso de reducción de los telómeros. No obstante, la agresión quirúrgica con daño endotelial asociado, necrosis y hemorragia parenquimatosa, podría desencadenar un estímulo hiperproliferativo que produjera una senescencia inducida por medio de la activación del gen p53; detención del ciclo celular, apoptosis celular e insuficiencia hepática postresección.

Regeneración hepática

La inquietud sobre la condición, evolución y proceso de curación ha supuesto siempre un enigma que ha despertado el ansía de respuesta del ser humano. El misticismo y la adivinatoria cedieron su lugar a la ciencia y al racionalismo, en la búsqueda de repuesta a las preguntas esenciales sobre el comportamiento de múltiples procesos biológicos.

Reflexión histórica

Debemos remontarnos a Babilonia en la antigua Mesopotomia para encontrar referencias mitológicas sobre procesos de curación y regeneración. Los abundantes conflictos bélicos de la época y la hepatoscopia heredada de las culturas del Este, proporcionó a la cultura greco-latina una imagen mística y vital del hígado. Y es que, es imposible no hacer alusión a la leyenda de Prometeo y el águila de Zeus, que ya citábamos en el inicio de este volumen. Prometeo, héroe que quiso otorgar libre albedrio a la humanidad, fue castigado con que un águila devorase diariamente su hígado regenerado cada noche.

Llama por tanto la atención la alusión a la capacidad regenerativa del hígado que hicieron los autores grecolatinos, necesitando más de una veintena de siglos para empezar a entender y estudiar dicha cualidad. Puede que los griegos simplemente conocieran la importancia vital del hígado, ya que su lesión condenaba a los soldados a un final fatal; o que desde un punto de vista adivinatorio, tuvieran una concepción mística y mágica del mismo. No obstante, lo que sin duda sabían era que su ausencia imposibilitaba la vida, ya que Prometeo, inmortal titán, debía volver a producir su hígado para no fallecer.

Es a partir de mediados del siglo XIX cuando se empiezan a encontrar referencias anatómicas y fisiológicas sobre la funcionalidad hepática y su naturaleza biológica. El progreso de la ciencia nos ha permitido ser conocedores de su capacidad de regeneración, y sin embargo, la medicina sigue teniendo grandes limitaciones que imposibilitan prolongar la supervivencia de muchos pacientes hepatópatas. Aún nos queda mucho por conocer para poder influir eficazmente sobre dicho proceso.

Características del proceso regenerativo

Es obvio y básico aseverar que sin hígado no se puede vivir. La existencia de órganos únicos y vitales en el cuerpo humano es una certeza que limita y dificulta en muchos aspectos el acto sanitario. No obstante, a diferencia de otras células como la neurona o el cardiomiocito, el hepatocito mantiene la posibilidad de replicarse y regenerarse tras una agresión físico-química, razón por la que bien estudiada y manipulada dicha cualidad, podrían llegar a realizarse grandes resecciones hepáticas en busca de una curación clínica sin condenar la vida del paciente.

Desde los estudios de Higgins y Anderson[67] y las primeras referencias a la regeneración hepática, se abrió un tema importante de investigación en cirugía experimental en busca de entender el fenómeno y darle practicidad clínica.

Lo cierto es que la regeneración hepática es un complejo proceso caracterizado por ser redundante, pleiotrópico, pleiomórfico y estar estrechamente regulado. Está

protagonizado por un órgano con una gran “robustez” y cuyo fin es obtener una hiperplasia compensatoria.

Analizando una a una cada una de sus características, entendemos que la regeneración es:

- **Redundante** por tratarse de una sucesión de procesos desencadenados y potenciados por múltiples vías que pueden actuar de manera sinérgica estimulando la misma ruta celular. De hecho, una de las grandes limitaciones durante los estudios experimentales radica en la dificultad de objetivar la influencia de múltiples mediadores; dado que a pesar de su ausencia, existen otras muchas rutas que podrán estimular la misma vía y por tanto, no afectar a la regeneración hepática.
- **Pleiotrópica** por mostrar activación de diferentes vías tras la transducción de un único gen. Resulta difícil dilucidar la interconexión de las vías celulares que acontecen de manera sincrónica, pudiendo estar originadas y desencadenadas por un mismo gen.
- **Pleiomórfica** por presentarse de múltiples formas. Existen múltiples modelos que han tratado de explicar el proceso, diversos estudios experimentales que han demostrado desencadenar el fenómeno por medio de diferentes agresiones hepáticas. Se trata por tanto de un proceso sujeto a múltiples agentes etiológicos que desencadenaran diversas formas de una misma entidad, la restauración del parénquima hepático.
- Rigurosa y estrechamente **regulada** por la denominada “regulación hepatoestática”. Se trata una de las características que más interés ha suscitado del proceso de la regeneración hepática, regulación por la que el hígado cesa su hiperplasia una vez que es capaz de realizar sus funciones básicas, dictaminado por medio de una ratio hepato-corporal de entorno al 2,5%.

Entendemos por tanto que la regeneración hepática se trata de un proceso complejo y estrictamente regulado, en el que el parénquima hepático es capaz de responder a

múltiples estímulos exógenos y endógenos, manteniendo su forma y función. Razón por la que se dice que le hígado es un órgano con mucha "fortaleza" o "**robustness**".

Por último, hay que recalcar que, aunque se nombre y se describa comúnmente como "regeneración" hepática, el proceso más correctamente debiera de ser apodado como "restauración" hepática. Tras una lesión orgánica del hígado, éste no mostrará una regeneración epimórfica como ocurre en otras especias con otras partes anatómicas (ejemplo, la cola en algunos lagartos); no existirá un proceso de desdiferenciación celular que origine una estructura idéntica a la perdida, sino que se producirá una activación y proliferación de células con alta diferenciación celular, llevándose a cabo una "**hiperplasia compensatoria**" que finalizará una vez se vean restauradas las funciones básicas del hígado, sin haberse recuperado su forma original.

Todo ello vendrá controlado por la relación hepatoestática, constante fisiológica humana que mantiene el peso del hígado según una relación porcentual de 2,5% respecto al peso corporal total. Esto explica que pueda apreciarse una variación del volumen hepático en situaciones que se alteren la estructura y masa corporal (proceso de crecimiento infantil, caquexia). De ello se deduce que el proceso de regeneración hepática finalizará cuando la relación hepatocorporal se haya cubierto.

Biología de la regeneración hepática

La regeneración hepática es un proceso con una gran complejidad biológica. Sin duda, lo que más ha intrigado desde que se conoce su existencia es la señalización de su inicio y fin: la vía por la que las células saben que deben entrar y salir del ciclo celular. También es necesario explicar por qué no existe una total sincronía en el proceso, ya que se observan imágenes histológicas, que como si de un mosaico se tratara, albergan células en diferentes fases del ciclo y con diversas funciones de manera simultánea.

El grupo de "Fausto et al"[76] lleva tiempo estudiando la regeneración hepática y postulando un modelo basado en estudios experimentales en el ratón que mejora nuestra comprensión del proceso. Según dicha explicación, la regeneración hepática puede dividirse en tres etapas:

- **Fase de cebado**: fase inicial en la que se produce un ambiente con múltiples estímulos mitogénicos que reactivan el ciclo celular del hepatocito. En el modelo murino, esta fase suele ocurrir entre la primera media hora y las 4 horas tras la lesión hepática desencadenante. Corresponde a las fases G0 y G1 del ciclo celular.
- **Fase de progresión**: fase caracterizada por la influencia mayoritaria de los factores de crecimiento, suele ocurrir durante los 5-7 días tras la agresión hepática. Durante esta etapa la célula entra en mitosis.
- **Fase de apoptosis**: fase final en la que las células saldrán del ciclo celular para volver a fase G0, según el tipo e intensidad de las señales que reciban. Ocurre alrededor del día 7-10.

En el ser humano, como cabría suponer, a pesar de que se cree que el proceso ocurre siguiendo el mismo modelo, los tiempos son mayores. Si bien el primer pico de síntesis de DNA ocurre entre las 24-40 horas en el ratón, en los primates ocurre a los 7-10 días. Según observaciones realizadas en estudio de trasplante hepático, parece que el pico de regeneración del hígado humano ocurre a las dos semanas del trasplante y finaliza entorno a los 3 meses tras la cirugía.

Rutas de regeneración alternativas

Según los modelos experimentales que explican la regeneración hepática, los hepatocitos y las células del epitelio biliar se replican para generar las pérdidas celulares producidas durante la lesión hepática. No obstante, es interesante mencionar la existencia de otras estirpes celulares visualizadas en el parénquima hepático que podrían colaborar durante el proceso[77]:

- **Células madre hepáticas**: sin haber sido identificadas en medios in vitro reproducibles, múltiples estudios han sugerido la existencia de una población pequeña, aunque constante, de células madre hepatocitarias que pudieran ayudar a la regeneración hepática en caso necesario. Existe evidencia que

defiende que las células madre pueden provenir de otros tejidos, como la médula ósea, y asentar en el parénquima hepático.

- **Células ovales**: después de escasos días tras una hepatectomía se han apreciado focos de proliferación celular con células con pequeños núcleos de forma oval, sobretodo en áreas periportales del lobulillo hepático. Dichas células ovales, capaces de diferenciarse en hepatocitos y células biliares, podrían suponer una ruta de emergencia que colaborase durante el proceso de regeneración hepática.
- **Células estrelladas**: el hecho de haberse objetivado factores nucleares hepatocitarios (HNF) en las células estrelladas y marcadores genéticos de las células estrelladas en los hepatocitos (GFP), ha hecho pensar que en circunstancias especiales las células estrelladas del parénquima hepático puedan funcionar como fuente de células madre que ayuden a la regeneración.

Mitosis y división nuclear en la regeneración hepática

El complejo proceso molecular que acontece tras una agresión al parénquima hepático conllevará un cambio cuantitativo celular a nivel histológico.

A nivel tisular el hepatocito supondrá el 70% de todo el recuento celular[93] de un hígado sano. Se ha demostrado que tras el nacimiento, el hígado de los mamíferos sufre un proceso de crecimiento originado de la poliploidización de sus hepatocitos, consecuencia de una alteración en su citocinesis[75,94]. El grado de poliploidia varía según las especies; representado sobre todo por células mononucleadas o binucleadas.

En modelos de hepatectomías mayores en roedores, el número de células binucleadas disminuye del 20% al 5%[75], aumentando el número de células mononucleares poliploides[95]. Tras una agresión hepática el hepatocito quiescente entrará nuevamente en ciclo celular, tal y como se ha explicado previamente; no obstante, no todos pasarán por la fase de mitosis; resultando en un aumento de células poliploides mononucleares.

Fundamentos moleculares de la regeneración hepática

Existen múltiples modelos experimentales que tratan de estudiar el proceso de regeneración hepática: modelos por inducción de tóxicos (etanol, cloruro de carbono, galactosamina), ligadura biliar o portal, y hepatectomías mayores. La mayoría se han realizado en modelos murinos y se basan en silenciar genes, demostrando de esta manera su implicación en dicho proceso.

Tras una resección hepática mayor, el hígado remanente ha de ser capaz de soportar todo el flujo enterohepático, es decir, debe albergar todo el flujo sanguíneo portal y la circulación bilioentérica, amén de hacer frente a tóxicos y endotoxinas que vaya recibiendo. La dilatación de los sinusoides hepáticos, las sales biliares en exceso y los lipopolisacaridos bacterianos supondrán señales mitogénicas directas e indirectas, pudiendo influir en el proceso al lesionar al hepatocito y/u otras células del parénquima hepático.

De hecho, el sistema inmune celular, linfocitos y sistema fagocítico, no solo serán capaces de hacer frente a señales infecciosas y/o dañinas externas, sino que también serán capaces de reaccionar frente a patrones moleculares asociados a la lesión celular, los denominados DAMP o alarminas[75,76,78,79].

Cuando se produce un hiperaflujo sanguíneo, la lesión endotelial, sinusoidal y celular residual; producirá una liberación al medio celular de múltiples moléculas DAMP: nucleósidos, proteínas citosólicas, proteoglicanos, oligosacáridos y componentes polisacáridos de la matriz extracelular (como son el heparán sulfato y el ácido hialurónico). Todas estas moléculas conformarán los patrones moleculares de lesión celular (DAMP), y serán reconocidos por células adyacentes, tanto células estructurales del parénquima hepático (hepatocitos, células biliares, células de Ito) como por células del sistema inmune y reticuloendotelial (células de Kupffer, células estrelladas).

Una vez que las moléculas DAMP son asimiladas por células del sistema fagocítico y reconocidas por sus receptores citosólicos, receptores con dominios de nucleótidos ricos en secuencias de leucina (NLRs)[79]; se crearán los denominados inflamosomas que

potenciarán la transcripción de un gran número de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-18 y TNF-α, (factor de necrosis tumoral-α)).

Se ha demostrado, a su vez, que el sistema de complemento también ayudará durante la activación de los macrófagos y la regeneración hepática[80, 81]. Los linfocitos T Natural Killer (NK), reclutados durante las fases iniciales de la afectación sinusoidal, liberarán IL-4; está influirá sobre la inmunidad humoral produciendo IgM que acabará por activar a C3 y C5. El sistema de complemento activado contribuirá a la estimulación de las células dendríticas y de Kupffer, produciéndose más IL-6 y TNF-α. Se cree, además, que C3a y C5a son capaces de atraer más linfocitos NK y potenciar su activación[81]. Asimismo, siendo la regeneración hepática un proceso pleiotrópico y redundante, es posible que la misma lesión hepática active al sistema de complemento por medio de los DAMP y de la consiguiente activación del sistema inmune humoral.

Todo ello conllevará un ambiente mitogénico rico en citocinas que activará el proceso de cebado de los hepatocitos. Será protagonizado en esencia por la IL-6 y el TNF-α, reiniciando así el ciclo celular de los hepatocitos que pasarán a fase G1.

Analizándolo de manera individualizada, la interleucina 6 producirá una activación de su receptor JAK-GP130 (receptor Janus Quinasa-glicoproteína 130) a nivel de la célula hepática, fosforilando al factor de transcripción STAT3 (activador de la transcripción y transductor de la señal 3) que transducirá la señal de activación celular por medio de la estimulación de los genes c-fos, c-myc y c-jun; además de inducir la transcripción de proteínas antiapoptóticas como la Bcl-2 (proteína del linfoma celular B). Estos genes se transcribirán también por medio de la activación de los factores NF-kβ (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) y Ap-1 (proteína activador 1), vías de señalización puestas en marcha igualmente tras la transducción de la señal producida por el TNF-α. Los oncogenes estimulados reactivarán el ciclo celular y estimularán la mitosis.

No obstante, la regeneración hepática es un proceso potenciado de manera redundante por varias vías, vías que por otra parte desencadenan múltiples efectos. Es el caso del factor de crecimiento hepatocitario (HGF) que impulsará la progresión del ciclo celular.

Dicho factor de crecimiento es producido por las células de Kupffer y las plaquetas, además de ser liberado desde la matriz extracelular por medio de las metaloproteasas activadas por citocinas (TNF-α principalmente). De hecho, es en la matriz extracelular hepatocitaria donde encontramos una fuente importante de HGF, liberado por múltiples metaloprotesas. Dentro de las metaloprotesasas destacan el activador de plasminogeno tipo uroquinasa (μPA), que facilitará el paso de pro-HGF de la matriz extracelular a su forma activa[75, 76], y la TACE o enzima convertidora de TGF-α (factor de crecimiento transformante-α). Ésta última aumentará los niveles de TGF-α, producida también en lo hepatocitos, y que funcionará como comitógeno de la proliferación celular junto al resto de los factores de crecimiento[75].

El HGF, así como el resto de factores de crecimiento asociados a los oncogenes activados en la fase de cebado (EGF, VEGF, PDGF), inician la fase de progresión y de división celular. La mayoría de estos factores también son secretados por las plaquetas, acompañados de la serotonina. Aunque es algo aun discutido, la serotonina plaquetaria parece que tiene un papel mitogénico importante que facilita la progresión del ciclo celular[82,83], sin ser probablemente crucial ni indispensable[84]. Se han encontrado receptores 5HT2A y 2B en los hepatocitos, lo que apoya la hipótesis de su acción mitogénica[83].

El factor HGF y EGF (factor de crecimiento epidérmico), por medio de receptores de membrana y citoplasmáticos con actividad tirosin-quinasa (RTK) o C-met (en el caso del HGF) activan la vía de quinasas MAP (quinasas activadas por mitógenos), potenciando vías de cebado celular y de progresión. De hecho, son uno de los grandes estímulos que activan la transcripición de los complejos de ciclinas-cdk (quinasa dependiente de ciclina), necesarios para la progresión del ciclo celular y la mitosis.

No obstante, no debemos olvidar que el hígado remanente deberá poder mantener asimismo su función metabólica y detoxificante. De hecho, tras cualquier tipo de

agresión al parénquima hepático, la expresión genética del hepatocito prioriza funciones de regeneración y recuperación, a expensas de afectar su metabolismo basal. No obstante, es la capacidad de mantener un metabolismo corporal mínimo durante su proceso de regeneración lo que evita que el hígado entre en insuficiencia.

La activación de la ruta JAK-STAT y del factor AP-1 no solo activa oncogenes, sino también factores nucleares hepatocitarios (HNFs), que influyen sobre rutas metabólicas del hígado. De hecho, durante el proceso posterior al daño hepático el hepatocito trata de mantener la homeostasis corporal glucídica expresando genes que codifican enzimas y proteínas de la vía de la gluconeogénesis[85], con objeto de paliar las reservas de glucógeno perdidas y producir glucosa suficiente para el resto de las células corporales. Además, la célula hepática en situación de baja energía y alto requerimiento, mantiene sus niveles de ATP (adenosina trifosfato) por medio de la oxidación de ácidos grasos, acumulados durante el proceso de regeneración.

En situaciones de baja energía aumenta la expresión de la proteína SIRT1 (sirtuína-1), que por medio de la enzima LKB1, aumenta la producción de AMPK (proteína quinasa activada por adenosina monofosfato) y de ATP[86]. Una vez la necesidad energética disminuye, a la par que la regeneración hepática va a menos, la expresión de SIRT1 disminuye y se activa el mTOR (diana de la ramapicina en las células de mamífero), lo que colabora a controlar el metabolismo hepático y su regeneración, mediante la potenciación de la producción proteica.

Hay que recalcar que durante todo el proceso de regeneración el hígado también tiene que controlar y gestionar toda la circulación bilioentérica y mantener su función destoxificadora. Siendo así, se ha demostrado que la señal recibida por las sales biliares a través de su receptor FXR (receptor X farnesoide) facilita el aumento del mediador Foxm1b en el citosol (proteína m1b de la caja Forhead)[87, 88], que actúa de manera sinérgica sobre la activación del ciclo celular, proliferación y mantenimiento de la homeostasis[75, 76, 77].

Por otro lado, se ha demostrado que los liposacáridos bacterianos ayudan a la regeneración hepática. Las endotoxinas bacterianas activan la producción de citocinas IL-6 y TNF-α a través de su unión a repectores tipo Toll (TLR) en la membrana de las células del sistema fagocito-macrófago. Estos receptores median la producción de las citadas interleucinas y la activación de la replicación hepatocitaria por medio del transductor de señal Myd88 (receptor de diferenciación mieloide 88)[76, 90].

Por último, una vez se ha restaurado el parénquima hepático, las células de Kupffer disminuyen su producción de citocinas mitógenas y aumentan la producción de TGF-β (factor de crecimiento transformante-β), activina A [91, 92] e IL-10. La superfamilia de citocinas TGF-β, a la que pertenece la activina A, activa la ruta de proteínas SMAD, cuya translocación nuclear se traduce en un aumento de los supresores de proteínas transmisoras de señales de citocinas (SOCS) y de diversos mediadores de la transcripción celular que aumentan la producción de p16, p21 y p53; el guardián del genoma. Además de los mencionados, se transcribe C/EBPα (de sus siglas en inglés "CCAAT/enhancer-binding protein alpha") que normaliza la función metabólica.

En base a la intensidad de la señal que regula y finaliza la regeneración hepática, los hepatocitos pueden volver a fase G0 del ciclo celular y/o entrar en apoptosis. De hecho, un estímulo mitogénico intenso podría estimular una producción elevada y anticipada de las proteínas citadas, pudiendo desencadenar una insuficiencia hepática por la previamente descrita “respuesta al estrés hiperproliferativo”[75].

Todas las rutas y mediadores mencionados, además de sus interrelaciones, se explican en la figura 9.

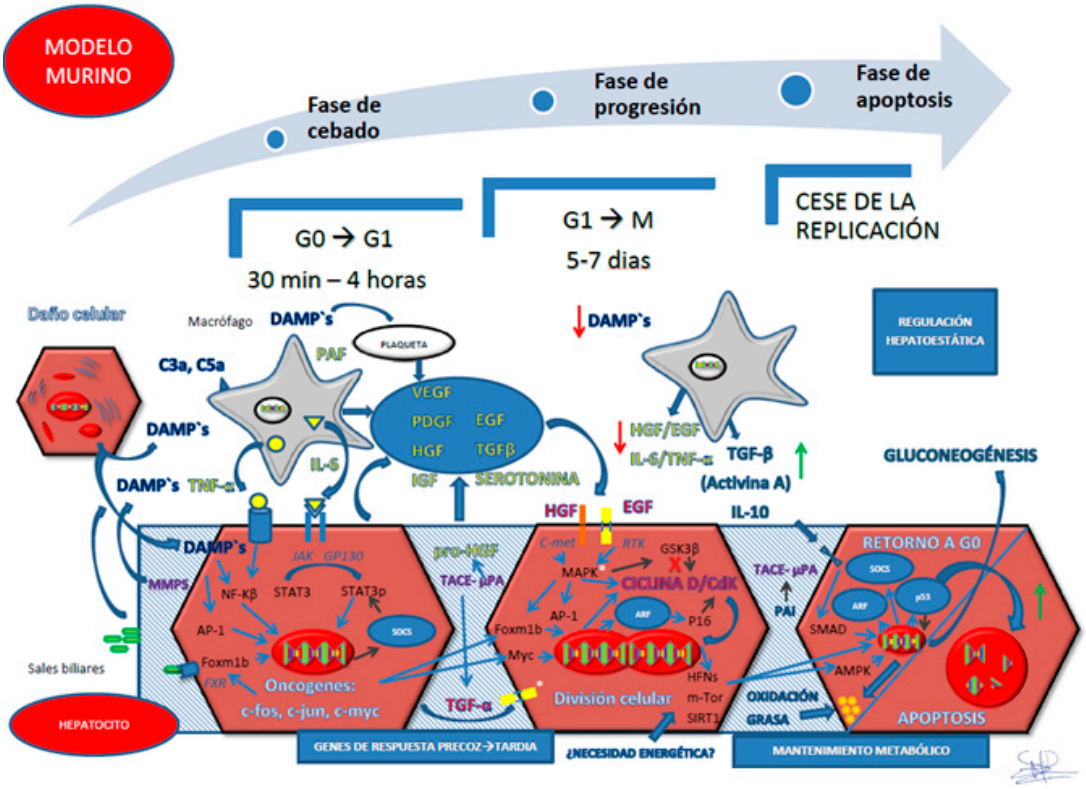


Figura 9. Esquema de la regeneración hepatocitaria en un modelo murino, basado en el proceso trifásico propuesto por Fausto et al[76]. En él se pueden observar de manera simplificada las vías moleculares citadas y la progresión celular del hepatocito tras un estímulo lesivo a nivel del parénquima hepático. GSK3β (quinasa de la glucógeno sintetasa 3b), quinasa que inhibe a las Ciclinas D. Durante el proceso de regeneración reprimido por MAPK.

Otras estirpes celulares

Además del hepatocito, el parénquima hepático está formado por otras poblaciones celulares que deben proliferar para una recuperación histológica y funcional óptima.

En cierta medida, todo el proceso de proliferación ocurre de manera síncrona. El mismo daño celular origina la liberación de mediadores que activan a las células de Kupffer y a las células estrelladas (de Ito), creando un ambiente proinflamatorio que activa a todos los tipos celulares del parénquima hepático.

De estudios cuantitativos de DNA se infiere que durante el proceso de regeneración y proliferación celular las primeras células en duplicarse son los hepatocitos, las células de Kupffer y las de Ito. Éstas presentan su primer pico 24-48 horas tras la lesión hepática, siendo más llamativo y precoz en los hepatocitos. Los colangiocitos, algo más tardíos, se

duplican antes de las 48 horas; y las células del endotelio sinusoidal, a las 96 horas tras la agresión.

Existen pocas referencias que expliquen la manera en la que todas las estirpes celulares proliferan. Asimismo, existen estudios que defienden la aparición de cambios fenotípicos celulares que pudieran potenciar el que células de un tipo celular pudieran cambiar y conformar células de otra estirpe, pudiendo ser fuente de hepatocitos células de otros grupos[77].

Además, es importante comprender que el daño histológico estructural del parénquima requerirá una proliferación de fibroblastos que produzcan nueva matriz extracelular y colágeno. Se sabe que el estímulo proinflamatorio causará una diferenciación celular hacia miofibroblastos, llamativamente protagonizada por las células estrelladas o de Ito. Todo ello es regulado por las células de Kupffer-macrófagos y plaquetas, a través de diversos factores de crecimiento, como son el factor de crecimiento plaquetario (PDGF) y el TGF-β, mayoritariamente relacionado con la finalización de la regeneración. Es deducible por tanto, que un estímulo lesivo crónico hepático, podrá producir una diferenciación celular numerosa hacia miofibroblastos que desencadenaría una cirrosis hepática.

Moléculas que puedan acelerar la regeneración hepática

En el último medio siglo se ha realizado mucha investigación sobre el control humoral y genético de la regeneración hepática. Los principales factores circulantes identificados (fundamentalmente en estudios con roedores) son el HGF y el EGF, así como las citocinas TNF, IL-1 e IL-6. Cuando se infunden estos factores a un anfitrión sano, no ocurre ningún crecimiento hepático, es decir, parece que hay que estimular a los hepatocitos para que respondan a los factores de crecimiento.

Durante los estudios realizados de regeneración hepática, y siendo como es un proceso redundante y pleiotrófico, la ausencia de diversos factores supuestamente implicados no ha llegado a revelar su imprescindibilidad. No obstante, existen estudios en los que

la suma de diferentes mediadores ha demostrado influir durante el proceso de regeneración[96,97,98].

El origen y resultado final de la regeneración hepática será la síntesis de DNA, por lo que la administración de moléculas que faciliten su producción ha demostrado incrementar la proliferación celular en estudios experimentales.

El ácido ascórbico, por ejemplo, suplemento vitamínico antioxidante esencial, se cree que puede funcionar como molécula estimuladora de la síntesis de DNA a través de los recetores RTK y de la interacción con el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)-I, estimulando la regeneración hepática y la mitosis celular[97].

Otra vitamina con resultados interesantes en la modulación de la regeneración hepática es la vitamina B9 o ácido fólico. Existen estudios experimentales en ratas que han demostrado su influencia tras hepatectomías mayores y procesos de isquemia reperfusión hepática[98, 104].

Ácido fólico

El ácido fólico o vitamina B9 es una vitamina B hidrosoluble descubierta en 1931 por "Wills y Mehta" y llamada inicialmente factor de "Wills". Fue en 1941 cuando adquirió el nombre de ácido fólico, una vez fue aislada en la hoja de la espinaca. El propio nombre, del latín folium, hace referencia a los alimentos más ricos en esta vitamina: las hojas.

De hecho, adquirimos su aporte principalmente de los vegetales y cereales: germen de trigo, hígado, espinacas, haba de soja, yema de huevo, endibias, lechuga, espárragos, lentejas, cereales integrales, brócoli, coliflor… El hígado, será el almacén principal del ácido fólico en los organismos, siendo uno de los alimentos que más aporte tengan de vitamina B9. La cantidad diaria recomendada de ácido fólico es de 50-400 µg/día, siendo mayor durante el embarazo. La dosis máxima recomendada es de 1000 µg/día.

Se trata de una vitamina hidrosolube compuesta de polipéptidos de grupos glutamato. Una vez se ingiere el alimento, el ácido fólico es hidrolizado a su estructura más básica,

monoglutamato. Esto ocurre por medio de la hidrolasa de folato localizada en el medio ácido del yeyuno proximal; lugar donde se absorbe a través del portador de folato reducido y al transportador de folato acoplado a protones (PCFT). Posteriormente, la forma monoglutamato es reducida y metilada dentro del enterocito, formando el compuesto metil-FH_4 (metil-tetrahidrofolato) que se vierte a la circulación venosa mesentérica. El hígado es su siguiente estación, representando éste, como se ha mencionado previamente, su almacén principal. Una vez internalizado dentro de la célula, los folatos son retenidos dentro por medio de la poliglutamilación y por proteínas fijadoras de folato. Los folatos se excretan principalmente por el riñón y la bilis, pudiendo reincorporarse parcialmente por la circulación enterohepática.

El ácido fólico, en definitiva, es un alimento esencial necesario para llevar a cabo múltiples procesos biosintéticos. Es un donador de grupos carbono que actúa como cofactor enzimático en múltiples procesos metabólicos:

- Toma parte en la biosíntesis de purinas y pirimidinas (timinas), contribuyendo a la síntesis de DNA.
- Síntesis de aminoácidos: facilita la conversión de homocisteina a metionina. Durante múltiples procesos metabólicos facilita la conversión de serina en glinica y de histidina en ácido glutámico.
- Síntesis de RNA mitocondrial: necesario para la producción de proteínas.

Es por ello que se entiende que durante el proceso de proliferación celular, y más en concreto, en el metabolismo de las células con un gran recambio celular, la participación del ácido fólico es imprescindible.

Por tanto, la posibilidad de que el aporte de ácido fólico durante el proceso de regeneración hepática pudiera potenciar la proliferación celular de los hepatocitos es una hipótesis interesante[98,104], siendo como es un proceso con un requerimiento metabólico intenso y una importante síntesis de DNA.

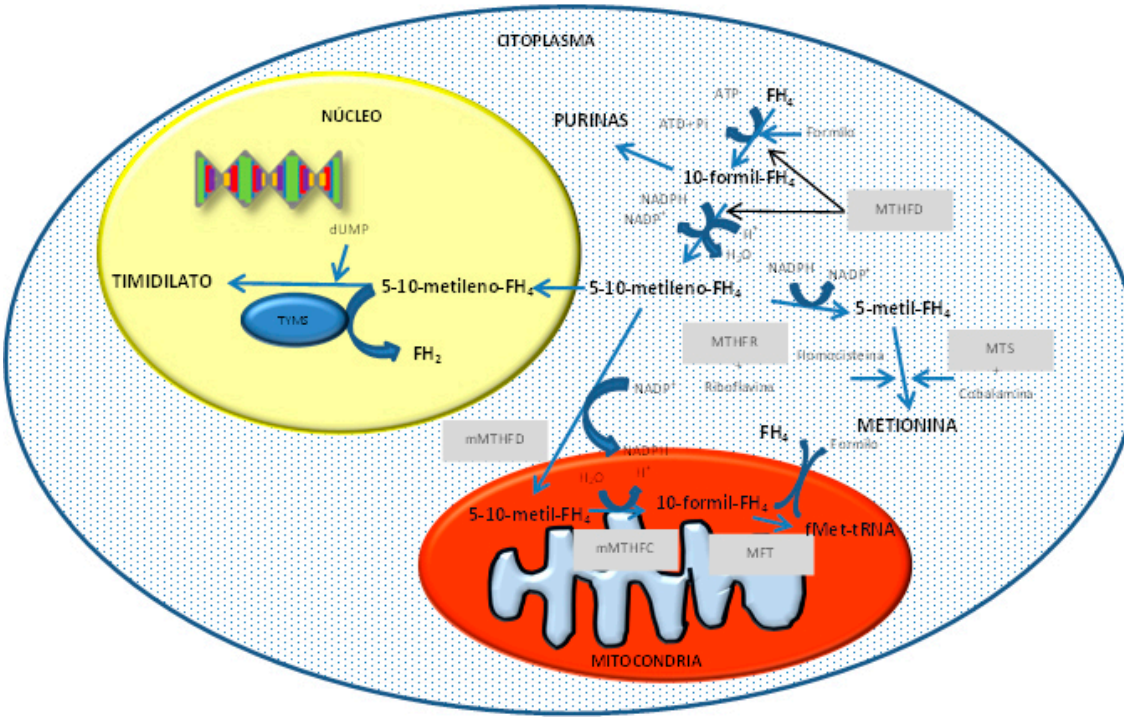


Figura 10. Metabolismo celular del ácido fólico, distribuido por cada compartimento celular: citoplasmas, núcleo y mitocondria. FH_4 (tetrahidrofolato), FH_2 (dihidrofolato), ADP (adenosina difosfato), ATP (adenosina trifosfato), $NADP^+$ (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido), dUMP (deoxiuridina monofosfato), MTHFD (metileno-tetrahidrofolato deshidrogenasa), MTS (metionina sintetasa), MTHFC (metileno-tetrahidrofolato ciclohidrolasa), MTHFR (metileno-tetrahidrofolato reductasa), MFT (metilen-formil transferasa), TYMS (timidilato sintetasa).

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El tratamiento del CCR ha experimentado un progreso sustancial a manos del control de su enfermedad metastásica, rescatando a pacientes otrora desahuciados y ofreciendo un escenario esperanzador con mejoría de la supervivencia.

No obstante, el número de pacientes cuya enfermedad a distancia resulta resecable al diagnóstico continúa siendo escaso, habiendo sido necesario recurrir a tratamientos adyuvantes que controlen y reduzcan la metástasis hepática y faciliten su escisión.

El avance y perfeccionamiento de la medicina moderna ha forzado la existencia de marcos quirúrgicos en los que la metastasectomía y/o segmentectomía hepática sea circunscrita a la enfermedad oncológica, haciendo más laxas las indicaciones quirúrgicas e incrementando el número de pacientes que entren a quirófano. De hecho, la notable capacidad del hígado para regenerarse después de la resección hepática ha permitido opciones quirúrgicas agresivas. Sin embargo, la implementación de éstos nuevos tratamientos ha traído consigo un incremento de pacientes cuya resecabilidad resulte incierta por una operabilidad dudosa.

Vemos por tanto que las limitaciones actuales radican en la viabilidad y funcionalidad del remanente hepático postquirúrgico. Ciertamente, el hígado será capaz de regenerarse, siempre y cuando, se mantenga un mínimo de parénquima suficiente, cuya calidad y función sea óptima, y posea tiempo para su hiperplasia.

La regeneración hepática y más aún, la razón por la que en mismas condiciones algunos hígados entran en insuficiencia hepática, continúa siendo incierta en muchos casos. Desde Higgins y Anderson[67], y los primeros modelos experimentales de hepatectomías, han ido apareciendo una ingente fuente de literatura que explica la regeneración hepática desde su fundamento molecular. Ello ha traído escenarios en los que la modulación de las vías de señalización celular pudieran potenciar el fenómeno.

Por otro lado, no debemos olvidar que por definición una enfermedad neoplásica con focos a distancia es una enfermedad avanzada y diseminada. Si bien su control y escisión quirúrgica pudieran suponer una curación, la existencia de dicha diseminación supone un escenario en el que pudieran existir focos microscópicos de células tumorales que pasasen inadvertidos. Dicha situación precipita la necesidad de añadir de manera precoz tratamientos sistémicos, muchas veces retrasados, por la necesidad de una recuperación postquirúrgica. Es decir, es necesaria una regeneración hepática y recuperación postquirúrgica eficiente para poder restaurar de manera precoz tratamientos sistémicos y hacer frente a la enfermedad neoplasia que pudiera haber quedado residual.

No obstante, la duración del proceso de regeneración, además de prolongar un ambiente mitogénico que pudiera influir también sobre la célula tumoral[43,44,99], retrasa la aplicación precoz de tratamientos multidisciplinares.

Es por ello que la posibilidad de modular e implementar selectivamente la regeneración hepática, disminuyendo su tiempo necesario, e implementando de manera anticipada tratamientos sistémicos; podría vislumbrar un marco interesante y prometedor dentro del tratamiento de la metástasis hepática del CCR y/o de otras neoplasias.

HIPÓTESIS-OBJETIVOS

Las premisas en las que hemos basado nuestro razonamiento son las siguientes, fuertemente refrendadas en la literatura:

- La lesión físico-química del parénquima hepático conllevará una hiperplasia compensatoria del remanente tisular sano[67,107].
    - La ligadura portal selectiva induce[100,102,103]:
        - Atrofia del hígado ligado
        - Hiperplasia en la porción no ligada
- Existen moléculas con capacidad de potenciar la regeneración hepática[96,97,98,104].
    - La regeneración hepática puede inducir la proliferación tumoral[43,44,99]
- La onco-quimioterapia frena el crecimiento de células en proliferación[125].
    - La base de la quimioterapia para el carcinoma colorrectal es el 5-Fluorouracilo[9,30].

De dichas premisas se deduce y se hipotetiza que:

- El ácido fólico mejora la regeneración hepática del hígado no isquémico tras una ligadura portal selectiva.
- La quimioterapia de primera línea del CCR frena la regeneración hepática.
- El ácido fólico podría frenar el efecto deletéreo del 5-FU.

Finalmente, los objetivos de este trabajo son:

- Demostrar que las moléculas/fármacos que aceleran la regeneración hepática serán útiles para acelerar también la restauración del parénquima hepático tras la ligadura portal.
- Objetivar si la quimioterapia para el CCR frena el proceso de regeneración hepático.

- Identificar protocolos de tratamiento que potencien la regeneración hepática de una manera eficiente y selectiva para la célula hepática.
    - Estudiar si la implementación precoz del 5-FU y del ácido fólico es una estrategia viable.

Todo lo anterior podría suponer una importante mejora en la eficacia de los tratamientos oncoquirúrgicos actuales. Si se confirmara sería posible aplicar tratamientos con eficacia demostrada simultáneamente con la cirugía, reduciendo de esta manera el tiempo habitual de espera del tratamiento adyuvante. De esta manera se incrementaría la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes afectos de carcinoma colorrectal avanzado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Mediante este estudio comparativo se trata de evaluar la respuesta regeneradora hepática tras la administración añadida de moléculas que implementen su hiperplasia y tratamientos adyuvantes quimioterápicos. Se hipotetiza así un escenario que fomente una regeneración hepatocitaria óptima, sin favorecer el avance tumoral, lo que supondría un marco terapéutico en su contra.

Animales utilizados

Se han utilizado ratas (Rattus Norvegicus) de la cepa singénica WAG/RijHsd mantenidas en el Servicio Animalario de la UPV/EHU. Para el estudio se han empleado animales macho, de 3-4 meses de edad y un peso que oscilo ente los 220 y los 286 g.

Los animales permanecieron estabulados en una sala donde la temperatura, humedad y ciclo luz-oscuridad se estableció según su ritmo circadiano habitual. El consumo de alimento y agua fue “ad libitum”. La dieta administrada fue A04 SP (SAFE, Germany).

La utilización de los animales, así como los procedimientos empleados en esta investigación fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación con Animales (CEEA) de la UPV/EHU, con código M20/2020/299 y el Comité de Ética de Investigación con Agentes Biológicos (CEIAB) M30/2020/300.

Durante el estudio se cumplimentaron todos los estándares estipulados para la manipulación de animales de experimentación en laboratorio. Se aplicaron las Guías Nacionales para el Cuidado de Animales de Experimentación según el RD 53/2013 y se aplicó toda la preceptiva contemplada en la Orden del 25 de junio de 1991, del Consejero de Agricultura y Pesca, por la que se dictan normas sobre la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos en el País Vasco (B.O.P.V. 136, del 4 de julio).

Modelo experimental

El estudio se ha llevado a cabo en animales sometidos a la ligadura selectiva de las ramas portales que nutren el ≈50% del volumen hepático, y que fueron sacrificados a las 36 horas para estudiar el efecto de diversos tratamientos sobre la regeneración hepática.

Procedimiento anestésico

La técnica anestésica y analgésica empleada fue idéntica en todos los grupos de investigación.

La anestesia de los animales se llevó a cabo con isofluorano, anestésico volátil de administración inhalatoria. Para la inducción anestésica la concentración de isofluorano empleada fue del 4%, con un flujo de 0,5 l/min de O_2 y 1 l/min de N_2O. El procesó requirió 2-3 minutos y se practicó con el animal introducido en una urna hermética conectada al respirador por una única toma de gases. El mantenimiento de la sedación hasta la finalización del proceso se realizó con isofluorano 1,5%, preservando constantes los flujos de oxígeno y protóxido de nitrógeno.

Figura 11. Cámara de inducción conectada a toma de gases e isofluorano

Durante la intervención el manejo analgésico se llevó a cabo por medio de buprenorfina (0,05 mg/kg, s.c.) y medetomidina (0,5 mg/kg, i.p.). Además, se utilizó la pomada humectante tipo lágrima ("Lubrithal") para la protección ocular.

Para el control del dolor postoperatorio inmediato se administró Meloxicam (2 mg/ml, s.c.) justo antes de concluir la intervención. Además, hasta el sacrificio del animal se administró buprenorfina (0,05 mg/kg, s.c.) cada 12 horas.

Intervención quirúrgica

En posición de decúbito supino se accedió a la cavidad peritoneal por medio de una laparotomía media subxifoidea. Una vez expuesto el hemiabdomen superior, se descolgó el hígado del "ligamento falciforme" y del gastrohepático, facilitando la exteriorización y eversión de los lóbulos lateral izquierdo y mediano.

Una vez visualizada la cara lateral interna del lóbulo lateral izquierdo y su tubérculo parenquimatoso, se procedió a disecar las estructuras hileares, justo por debajo del tubérculo hepático de la cara medial del lóbulo lateral izquierdo (figura 12).

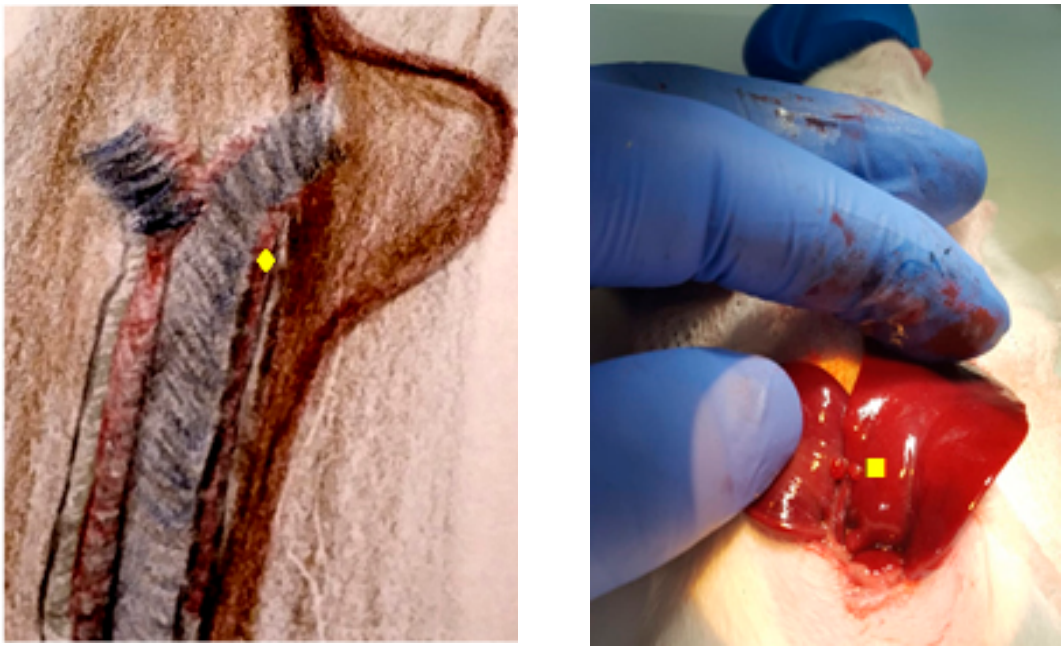


Figura 12. Detalle del hilio hepático. Durante la disección hiliar relevancia aparte adquirió la existencia de una rama posterior de la arteria hepática lobar, dado que su lesión se correlacionó directamente con sangrado durante la cirugía e isquemia arterial parcheada del lóbulo lateral izquierdo. ♦ Arteria hiliar posterior. Inconstante. ■ Tubérculo parenquimatoso.

Una vez disecada e individualizada la rama portal lobar correspondiente al lóbulo lateral izquierdo y al lóbulo paramediano izquierdo, se procedió a su ligadura por medio de una sutura de 6/0 de seda (figura 13). El cese súbito del aporte venoso portal se correlacionó directamente con un cambio en el color del parénquima isquémico, delimitado claramente y fácil de visualizar.

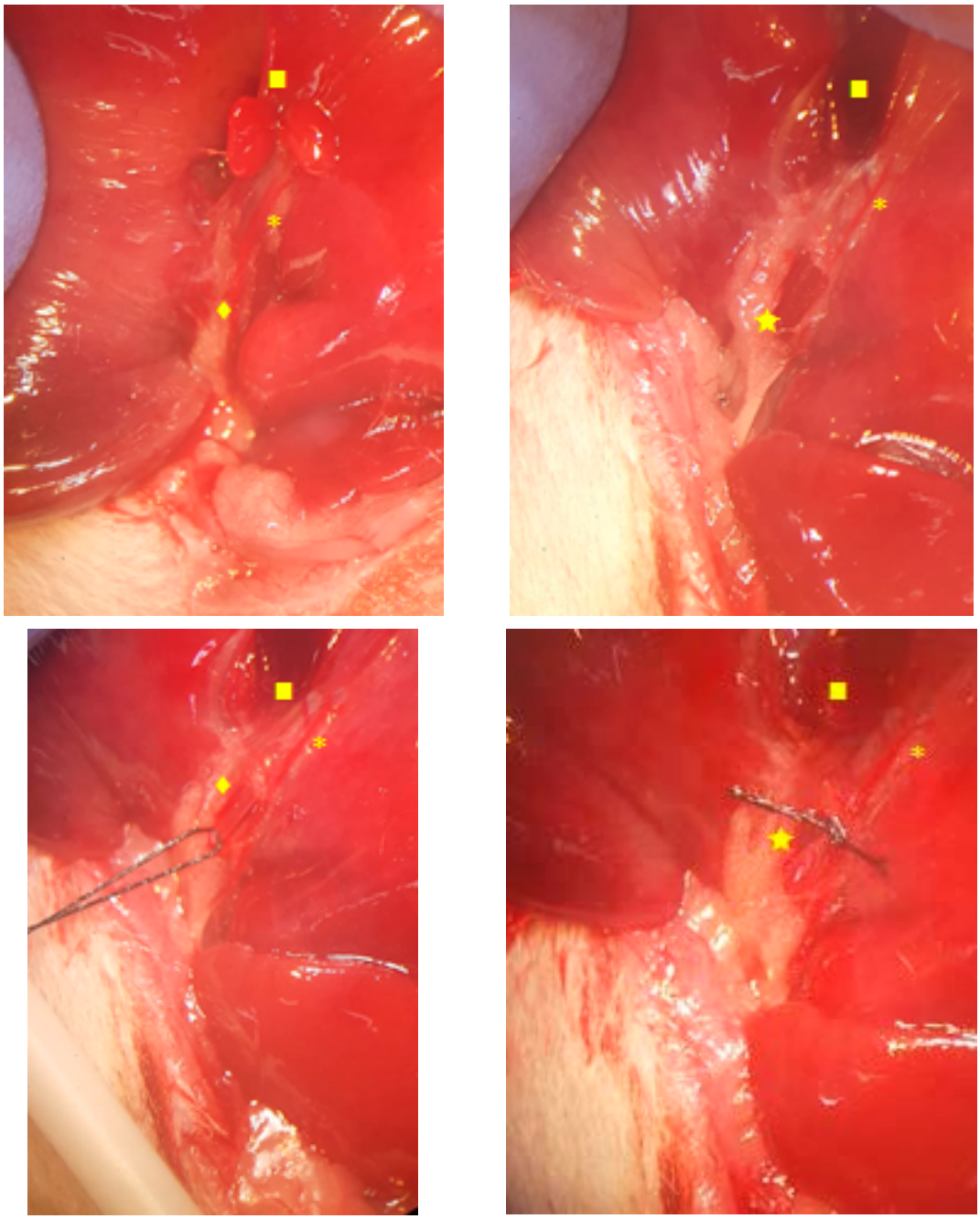


Figura 13. Pedículo portal para Lóbulo Lateral Izquierdo y Lóbulo Paramediano Izquierdo. Ligadura portal: ■ Tubérculo hepático ★ Rama portal ♦ Arteria hiliar × Arteria hiliar posterior. Inconstante.

La técnica quirúrgica se realizó utilizando un microscopio quirúrgico Leica Wild M651 e instrumental quirúrgicos para microcirugía (figura 14). Una vez finalizada la intervención, y reintroducido el hígado a la cavidad abdominal, el cierre de la laparotomía se realizó en dos planos: el plano muscular con una sutura continúa de prolene 3/0 y la piel con puntos sueltos de seda de 3/0.

Figura 14. Microscopio quirúrgico Leica Wild M651 para microcirugía.

Eutanasia-adquisición de la muestra

Transcurridas 36 horas desde la ligadura portal el animal se volvió a anestesiar con el protocolo ya descrito (isofluorano y protóxido de nitrógeno).

Se reabrió la laparotomía media y se extrajo el paquete intestinal para tener acceso a la cava infrarrenal. Se puncionó la vena con una aguja 23G aspirándose con jeringuilla 5 cc de sangre. La aspiración fue lenta y continua, con objeto de evitar coágulos y hemólisis.

A continuación se procedió a extraer el hígado en bloque, se lavó con suero fisiológico y se procedió a su disección ex vivo. Con finalidad de separar el hígado isquémico y el hiperplasiado, se procedió a realizar una transección hepática a través de la cisura del

lóbulo medio, separando así el lóbulo mediano izquierdo y el lóbulo lateral izquierdo del resto del parénquima hepático (figura 15).

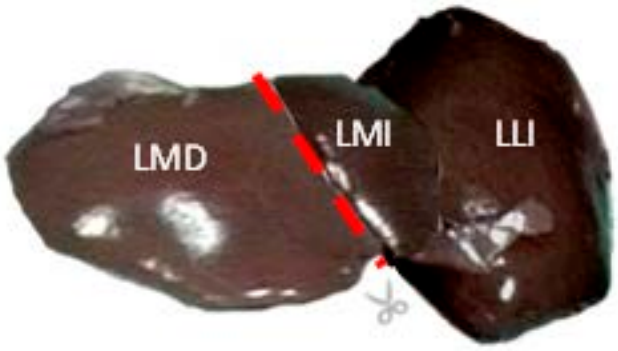


Figura 15. Hígado extraído 36 h tras la ligadura. LLI: Lóbulo Lateral Izquierda, LMI: Lóbulo Medio Izquierdo, LMD: Lóbulo Medio Derecho. Isquemia portal de LLI + LMI, delimitándose fisura en el LM por donde realizar la transección.

Administración de fármacos

El 5-FU se obtuvo de Sigma-Aldrich© (Ref. F6627) en forma de polvo anhidro. Para su administración se diluyó en suero fisiológico e hidróxido sódico 1N (en proporción 9/1) hasta obtener una concentración de 20 mg/ml. Se administró una dosis única de 50 mg/kg por vía intraperitoenal, 48 h antes de la intervención.

El ácido fólico se obtuvo en forma de ácido folínico (Folinato Cálcico Altan® 50mg, Altan Pharmaceutical S.A.), que se presenta liofilizado en un vial de 50 mg. Se rehidrató en 5 ml de agua destilada (10 mg/ml), y posteriormente se diluyó en suero salino para obtener soluciones alícuotas de 1 mg/ml. Se administraron 2,5 mg/kg por vía intraperitoneal, durante el acto quirúrgico.

De esta manera, ambos fármacos se administraron en un volumen de 0,25 ml/100g de peso del animal. Los controles recibieron idéntico volumen de suero salino.

Grupos experimentales

Para obtener valores de referencia en animales sanos se han utilizado seis ratas de 12 semanas de edad, machos. Previo a su sacrificio se procedió a la extracción de las

muestras sanguíneas para disponer de rangos normales de parámetros bioquímicos. Además, se calculó la masa hepática total y de cada uno de sus lóbulos, obteniendo a su vez valores porcentuales de cada lóbulo respecto al total.

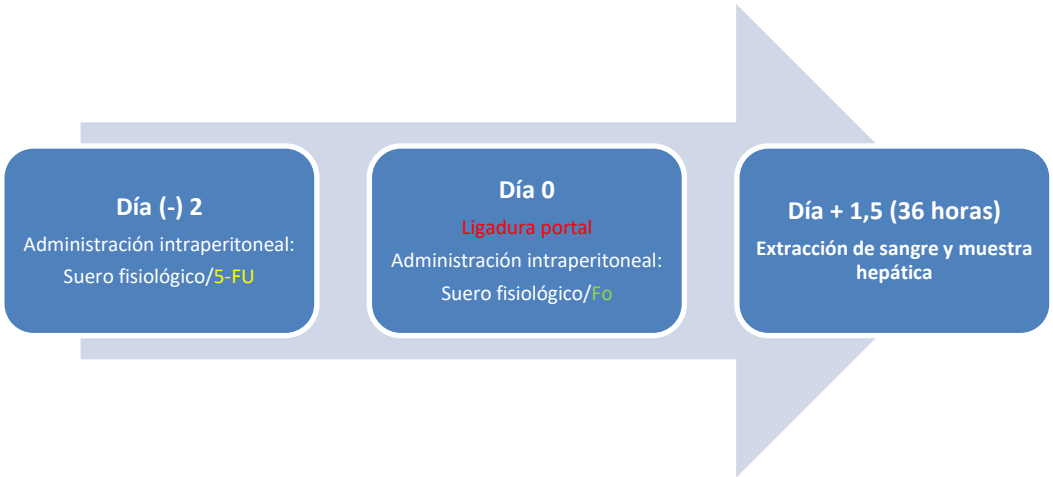
El trabajo ha incluido cuatro grupos experimentales, cada uno con 6 animales sometidos a ligadura portal selectiva:

- Grupo control (recibieron suero fisiológico)
- Grupo tratado con ácido fólico (se perdió un animal)
- Grupo tratado con 5-Fluouraclo
- Grupo tratado con Fólico y 5-FU

La pérdida de una de las ratas en el grupo de ácido fólico ocurrió durante la inducción anestésica, por lo que no afectó a la supervivencia postratamiento, pudiendo aseverar una supervivencia del 100% sin objetivar mortalidad alguna tras la intervención quirúrgica y la administración de las sustancias a estudio.

Para intentar evitar sesgos y homogeneizar las vías de actuación, la línea de tiempo que se siguió y los volúmenes administrados fueron iguales en todos los grupos.

El protocolo de actuación y flujo de trabajo fue el siguiente:



Mediciones biométricas

El peso de cada animal se obtuvo previo al procedimiento y a su sacrificio. Los pesos fueron analizados de manera global para cada grupo de estudio y expuesto en gramos.

Además, se analizó la diferencia de peso hallada previo y posterior a la intervención quirúrgica. El peso perdido se expuso de manera cuantitativa y según su relación porcentual, según la fórmula que explican Héctor et al[100] en su artículo original del "Desarrollo de un modelo experimental de ligadura portal asociada a transección parenquimatosa (ALPPS) en ratas":

%PI/PF= (PF-PI)/PI x 100

Donde PI hace referencia al Peso Inicial y PF al Peso Final.

Una vez extraídas las muestras hepáticas, el hígado fue medido de manera global e individualizada por cada lóbulo, todo representado también en gramos. Se comparó el peso global hepático entre grupos y la diferencia cuantitativa de peso entre grupos. Además, se halló la relación hepatoestática por medio de la fracción entre el peso hepático y el corporal.

Para el análisis individualizado de los lóbulos, se procedió a analizar el valor porcentual individualizado de cada uno de ellos en relación al peso hepático total.

Procesamiento de las muestras

Muestras sanguíneas

Una vez extraída la sangre, ésta fue centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos, obteniendo entre 1 y 2 ml de suero que se congelaron en tubos Eppendorf hasta su ulterior transporte y análisis en la Unidad de Análisis Clínicos y Laboratorio del Hospital Universitario Donostia. Con objeto de no romper la cadena del frío los sueros congelados se transportaron aislados en recipientes con hielo seco.

Los parámetros examinados fueron aquellos directamente relacionados con la función hepática:

- Enzimas de citólisis:
    - Alanino amino transferasa (ALAT o GPT).
    - Aspartato animo transferasa (ASAT o GOT).
- Colestasis:
    - Bilirrubina total
    - Fosfatasa alcalina (FA)
- Proteínas
- Glucosa

La actividad de los factores de coagulación se midió a través del tiempo de protrombina por medio de un medidor del Ratio Internacional Normalizado (INR).

Tejido hepático

Una vez extirpado el hígado y escindido de todos sus tejidos adyacentes, se procedió a medir su peso global y particularizarlo en sus lóbulos. A posteriori se midió el peso de cada lóbulo de manera individualizada; a excepción del lóbulo central que se dividió a través de su cisura media, añadiendo su porción isquémica al lóbulo lateral izquierdo y singularizando su parte hipertrofiada que se consideró como lóbulo independiente.

Para su conservación y fijación previa a su análisis histológico, las muestras hepáticas fueron sumergidas en una solución de formaldehído al 10% durante al menos 24 horas. Tras ello, las muestras se deshidrataron empleando una secuencia de alcoholes de graduación creciente y se incluyeron en parafina. Del lóbulo paramediano derecho se obtuvieron secciones histológicas de 3 µm, que se tiñeron con hematoxilina eosina para los estudios morfológicos.

Se procedió a analizar microscópicamente las características histológicas de las secciones teñidas, describiendo la existencia de imágenes sugestivas de isquemia, necrosis y/o apoptosis; además de su distribución anatómica y lobulillar.

La distinción entre la necrosis y la apoptosis se definió según el grado del componente inflamatorio apreciado. Es decir, para una misma sección histológica en la que se apreciaran cambios en la morfología celular, un proceso inflamatorio intenso subyacente se definió como necrosis; mientras que, si éste era inexistente, como apoptosis. La destrucción de la pared celular en la necrosis, y la consiguiente liberación de elementos citoplasmáticos, condiciona un intenso infiltrado linfocitario ausente en la muerte celular programada (apoptosis).

Los cortes teñidos se observaron con un objetivo de 40 aumentos, fotografiándose de 4 a 6 campos seleccionados de manera aleatoria. Las fotografías se realizaron a través de un microscopio Leica DMi1 conectado a un ordenador, que capturó las imágenes por medio del programa Leica Application Suite (LAS) (figura 16).

En cada una de estas fotografías se procedió a contabilizar el número de núcleos presentes en un área de 10.000 μm^2 (figura 17). Además, se calculó el área ocupada por estos núcleos (μm^2); para ello se utilizó el programa ImageJ del National Institute of Health de Estado Unidos. Se redondearon, uno por uno, al menos 50 núcleos por cada imagen obtenida (figura 18), asegurando poder contabilizar 1000-1500 núcleos por cada grupo de estudio.

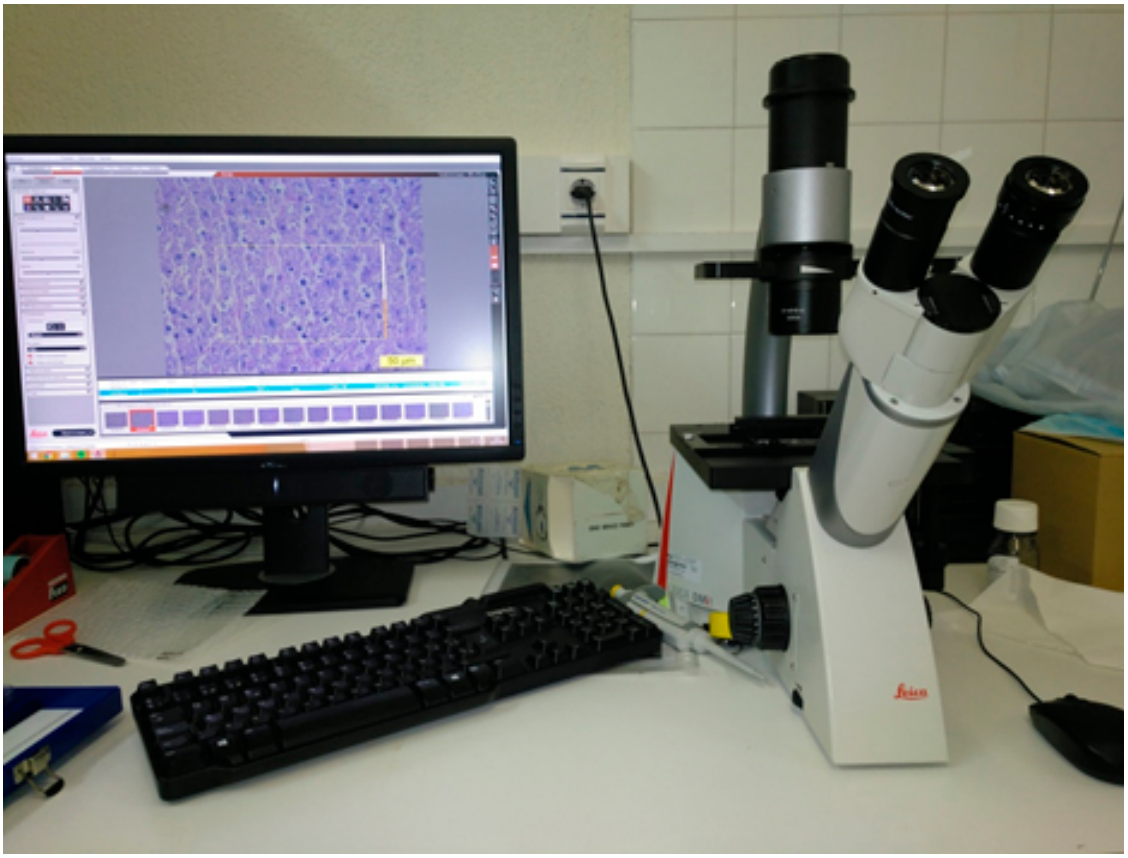
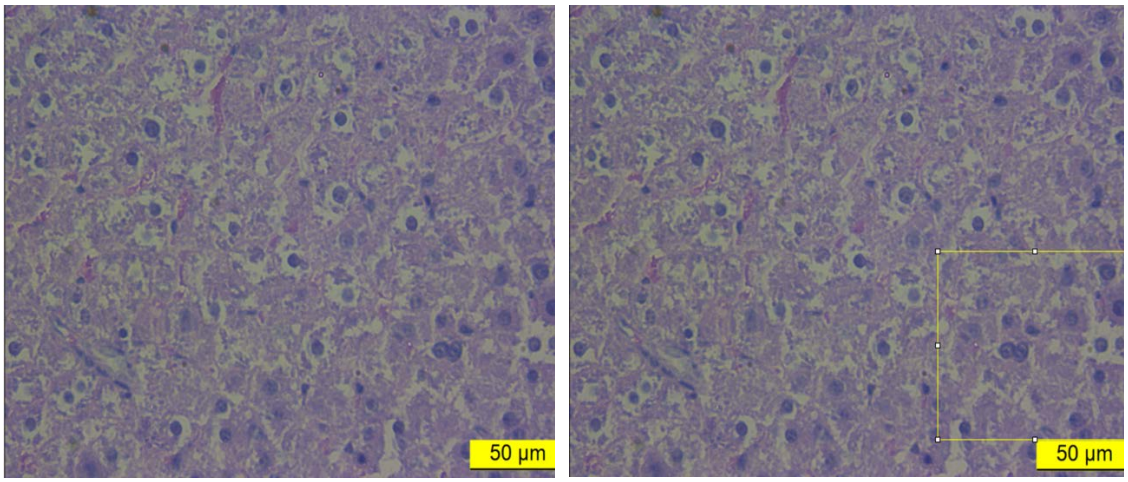
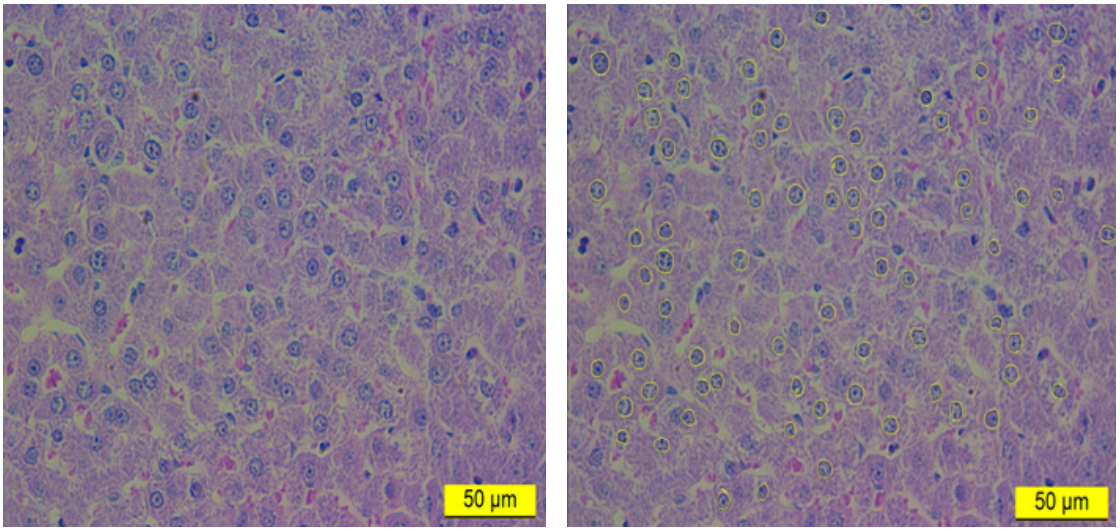


Figura 16. Microscopio Leica DMi1 conectado al ordenador para la obtención de las imágenes



A B

Figura 17. Secciones hepáticas teñidas con hematoxilina-eosina. A: visión normal al microscopio B: área de 10.000 µm^2



A B

Figura 18. Secciones hepáticas teñidas con hematoxilina-eosina: A: núcleos poliploides en proceso de proliferación, B: Núcleos redondeados para el cálculo de su área

Análisis estadístico de los resultados

Dado que los resultados cuantitativos obtenidos en nuestro estudio se ajustaron a una distribución Normal, se describen utilizando la media y la desviación estándar. Gráficamente se representan como diagramas de barras o de líneas.

El análisis estadístico de las variables cuantitativas se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA). Cuando este Test mostró diferencias significativas ($p<0,05$), la posterior comparación entre los diferentes grupos se realizó el Test de Comparación Múltiple de Tukey, aceptando un nivel mínimo de significación de $p< 0,05$.

Por otro lado, las variables cualitativas del estudio histológico de las muestras se analizaron por medio de la prueba de Chi cuadrado y del Test exacto de Fisher.

Todos los análisis fueron realizados con el programa GraphPad Prism 6®.

RESULTADOS

En este apartado exponemos nuestros resultados en el siguiente orden: parámetros ponderales de los sujetos de estudio (corporal y de su hígado), marcadores séricos analizados y estudios histológicos.

Parámetros ponderales

Describimos en este epígrafe la evolución del peso de los animales a lo largo del experimento, así como el peso del hígado (absoluto y en relación al peso corporal) y su distribución entre los diferentes lóbulos hepáticos.

Evolución ponderal del animal

El peso medio de los animales utilizados en el estudio fue de 244,25 g, con una desviación estándar (DS) de 17,4 (tabla 2). En cada grupo experimental la distribución de pesos se ajustó a una distribución normal (Kolmogorov-Smirnof). Aunque el ANOVA informó diferencias significativas en las desviaciones ($p<0,05$), el análisis posterior con el Test de Comparación Múltiple de Tukey no mostró diferencias significativas entre ninguno de los grupos. Sin embargo, por prudencia, en los análisis posteriores de evolución ponderal y de peso hepático se incluirán valores estandarizados según peso individual.

Tabla 2. Peso de los animales de los diferentes grupos experimentales

	Control	Fólico	5-Fluorouracilo	Fólico + 5-FU
Animal 1	235,8	234,0	220,0	237,0
Animal 2	225,0	234,5	259,0	236,0
Animal 3	254,5	235,0	233,0	234,0
Animal 4	233,3	237,0	275,0	251,0
Animal 5	231,8	235,0	268,0	270,0
Animal 6	240,0		286,0	262,0
Media ± DS	237 ± 4,1	235 ± 0,5	257 ± 10,4	248 ± 6,2

En el momento del sacrificio se procedió de nuevo al pesaje del animal para conocer las modificaciones ponderales inducidas por nuestros tratamientos (Tabla 3). La disminución de peso respecto al inicial fue una constante en todos los grupos, siendo ésta más llamativa en el grupo con ácido fólico; objetivando un descenso de 235 g a 227 g de media.

Tabla 3. Peso de los animales en el momento del sacrificio (g)

	Control	Fólico	5-Fluorouracilo	Fólico + 5-FU
Animal 1	238,7	226,3	218	232
Animal 2	220,6	225,1	260	230
Animal 3	251,4	231,3	228	228
Animal 4	230,9	229,3	272	242
Animal 5	227,3	225,0	263	264
Animal 6	236,3		282	253
Media ± DS	234 ± 4,3	227 ± 1,2	254 ± 10,3	242 ± 5,9

En el grupo control, la ligadura selectiva de ramas portales se acompañó de una ligera pérdida de peso, salvo en uno de los animales en el que objetivo un ligero ascenso (de 235,8 g a 238,7 g) (tabla 4). La comparación de los pesos inicial y final mediante una T de Student para muestras pareadas muestra que la diferencia registrada alcanza significación estadística ($p<0,05$).

Tabla 4. Evolución ponderal de los animales del grupo Control (g)

	Peso inicial	Peso final	Incremento absoluto	% respecto inicial
Animal 1	235,8	238,7	2,9	101,2
Animal 2	225,0	220,6	-4,4	98,0
Animal 3	254,5	251,4	-3,1	98,8
Animal 4	233,3	230,9	-2,4	99,0
Animal 5	231,8	227,3	-4,5	98,1
Animal 6	240,0	236,3	-3,7	98,5
Media ± DS	237 ± 4,1	234 ± 4,3	-2,5 ± 1,1	98,9 ± 0,5

El estudio de la evolución ponderal del resto de los grupos, muestra un comportamiento similar al del control, en lo que a evolución ponderal se refiere (tabla 5). En los grupos

tratados con un solo fármaco la pérdida de peso alcanza significación estadística ($p<0,05$); y en el grupo que recibió los dos fármacos, la diferencia es aún más significativa ($p<0,0001$).

Tabla 5. Evolución ponderal (% respecto peso inicial) de los animales en los grupos experimentales

	Control	Fólico	5-Fluorouracilo	Fólico + 5-FU
Animal 1	101,2	96,7	99,1	97,9
Animal 2	98,0	96,0	100,4	97,5
Animal 3	98,8	98,4	97,9	97,4
Animal 4	99,0	96,8	98,9	96,4
Animal 5	98,1	95,7	98,1	97,8
Animal 6	98,5		98,6	96,6
Media ± DS	98,9 ± 0,5	96,7 ± 0,5	98,8 ± 0,3	97,3 ± 0,3

Utilizando el porcentaje de peso con respecto al inicio, la comparación entre grupos con ANOVA detecta diferentes comportamientos entre ellos ($p<0,001$). La posterior comparación entre grupos utilizando el Test de Tukey confirma lo que se aprecia en la tabla 5: no hay diferencia en cuanto a pérdida de peso entre control y 5-FU, ni entre Fólico y Fólico+5-FU. Pero afirma que el mayor descenso en peso observado en los dos grupos de animales que recibieron Fólico alcanza significación estadística: $p<0,01$ al comparar el grupo Fólico con los otros dos, y $p<0,05$ cuando se compara el grupo Fólico+5-FU frente a los no tratados con fólico (figura 19).

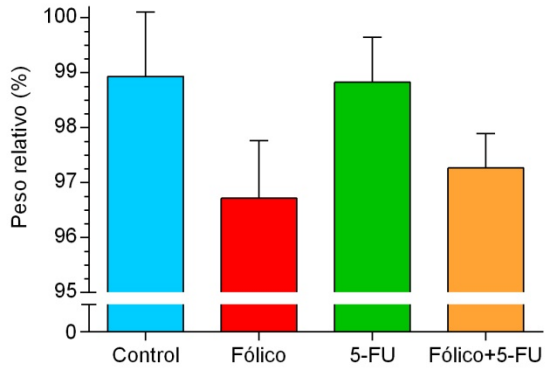


Figura 19. Peso final de los animales expresado en % respecto al peso inicial.

Peso hepático total

En el momento del sacrificio, los animales que no recibieron ningún tratamiento presentaron un peso hepático de 7,03 g., con una escasa dispersión, comportándose de hecho con ajuste a una distribución normal (tabla 6). En cambio, los animales tratados con ácido fólico presentaron un peso hepático más reducido (6,21 g) que los no tratados y que los que recibieron 5-FU. En estos últimos, no se observan diferencias en el peso hepático como consecuencia del tratamiento con Fo (tabla 6).

Tabla 6. Peso del hígado en el momento del sacrificio (g)

	Control	Fólico	5-Fluorouracilo	Fólico + 5-FU
Animal 1	7,15	6,09	7,63	7,73
Animal 2	7,59	6,46	8,47	7,90
Animal 3	6,89	6,20	7,59	6,97
Animal 4	6,64	6,33	8,17	8,19
Animal 5	7,65	5,96	8,27	9,04
Animal 6	6,28		8,25	9,33
Media ± DS	7,03 ± 0,22	6,21 ± 0,09	8,06 ± 0,15	8,19 ± 0,36

La comparación entre los grupos mediante ANOVA pone de manifiesto que las diferencias que se observan (figura 20) alcanzan significación estadística ($p<0,0001$). El análisis con el test de Tukey indica que, si exceptuamos la comparación entre grupo control y tratados con fólico, y entre los dos que recibieron 5-FU, todas las diferencias que se aprecian en la figura 20 alcanzan significación estadística. Sin embargo, como también los pesos de los animales de los grupos tratados con 5-FU fueron ligeramente superiores, es necesario realizar un análisis en el que la masa hepática esté relativizada al peso del animal, para eliminar la diferencia debida a las diferencias entre pesos.

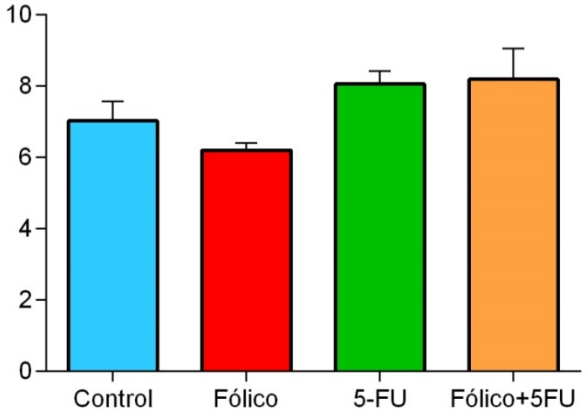


Figura 20. Peso del hígado extraído (expresado en g)

En la tabla 7 se detallan los valores del peso hepático expresado como porcentaje respecto al peso total del animal. A pesar de haber corregido en función del peso corporal, se aprecia el mismo comportamiento: los animales tratados con fólico muestran una menor masa hepática (respecto al control, con un porcentaje de 2,73% de media), mientras que los tratados con 5-FU (con o sin fólico) muestran un incremento (3,19% en el caso del grupo con 5-FU y 3,39% en el grupo de Fo+5-FU). El análisis con ANOVA ratifica que las diferencias observadas no pueden considerarse casuales ($p<0,005$).

Tabla 7. Peso del hígado como porcentaje respecto a peso corporal

	Control	Fólico	5-Fluorouracilo	Fólico + 5-FU
Animal 1	2,99	2,69	3,5	7,73
Animal 2	3,44	2,87	3,26	7,9
Animal 3	2,74	2,68	3,33	6,97
Animal 4	2,88	2,76	3	8,19
Animal 5	3,37	2,65	3,14	9,04
Animal 6	2,66		2,93	9,33
Media ± DS	3,01 ± 0,13	2,73 ± 0,04	3,19 ± 0,09	3,39 ± 0,09

La comparación múltiple entre grupos realizada con el Test de Tukey informa que pueden considerarse estadísticamente significativas las diferencias observadas entre los

animales tratados con fólico y los que recibieron 5-FU (solo o con fólico), así como la comparación entre el doble tratamiento y los controles (figura 21).

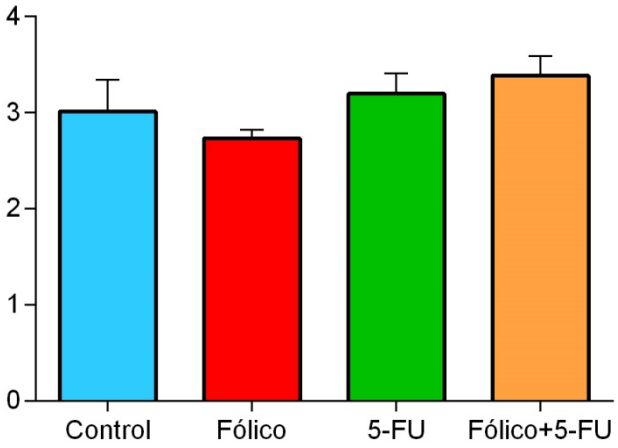


Figura 21. Peso del hígado expresado en % del peso corporal

Como síntesis, se puede resumir que los animales tratados con ácido fólico presentan una ligera reducción del coeficiente peso hepático / peso corporal (aunque sin alcanzar significación estadística), mientras que todos los que recibieron 5-fluouracilo mostraron un incremento de dicho índice ($p<0,05$).

Peso del hígado no ligado

El análisis de las masas de los hígados y lóbulos de los animales de referencia, no sometidos a intervención alguna (quirúrgica ni farmacológica), facilitó valores porcentuales de cada lóbulo respecto al total: 34,21% para el lóbulo paramediano, 32,87% para el lóbulo lateral izquierdo, 20,80% para el lóbulo lateral derecho y 12,12% para el lóbulo caudado.

En condiciones normales, la porción de hígado a la que se va a someter a ligadura selectiva de sus ramas portales supone el 50% del órgano. Transcurridas 36 horas desde

la ligadura portal selectiva la porción ligada reduce su tamaño hasta suponer tan sólo el 29,5% (tabla 8, figura 22). O lo que es lo mismo, con esta técnica se consigue que la zona no sometida a ligadura pase de suponer un 50% del total del órgano a superar el 70%.

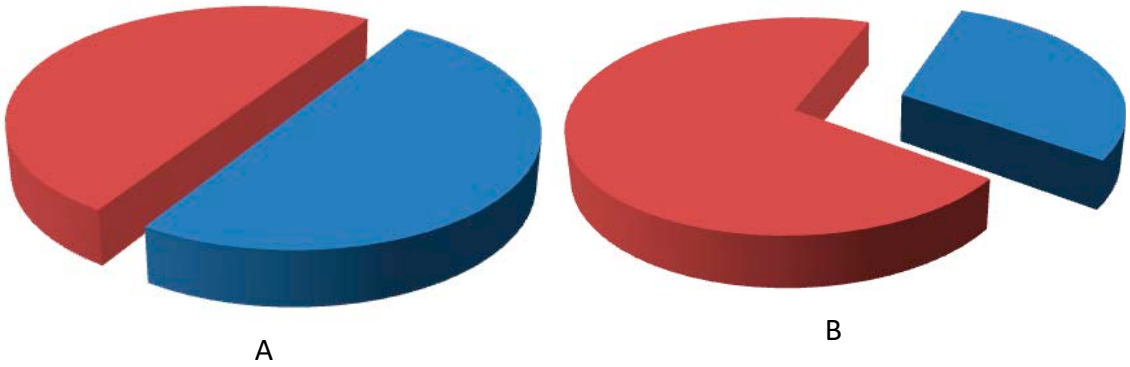


Figura 22. Distribución del peso del hígado entre las partes sometidas a ligadura portal (azul) y con flujo portal mantenido (rojo). A: antes de la ligadura. B: 36 horas después de la ligadura.

En el grupo de animales tratados con ácido fólico, la regresión en volumen porcentual del parénquima ligado es ligeramente inferior al control (33,4% vs 29,5%). En el inicio de nuestro trabajo, cuando únicamente habíamos realizado estas dos experiencias (controles y ácido fólico), la comparación la hicimos utilizando la t de Student, y la diferencia registraba una $p<0,05$. Sin embargo, al analizar en conjunto los cuatro grupos experimentales de nuestro trabajo con ANOVA, la diferencia no alcanzó niveles de significación estadística.

Algo parecido, pero en sentido contrario ocurre con los animales tratados con 5-FU. El parénquima ligado se reduce ligeramente más que en los controles, disminuyendo su valor porcentual desde un 29,5% en los controles hasta un 26,1% en los tratados. Pero el análisis con ANOVA muestra que la diferencia no alcanza significación estadística.

Tabla 8. Porcentaje sobre el hígado total que corresponde a las zonas sometidas a ligadura portal selectiva.

	Control	Fólico	5-Fluorouracilo	Fólico + 5-FU
Animal 1	28,60	32,62	27,94	32,48
Animal 2	28,37	37,14	25,01	33,09
Animal 3	32,24	30,89	30,52	30,15
Animal 4	25,22	34,24	22,10	29,66
Animal 5	30,43	32,02	25,73	26,07
Animal 6	32,02		25,54	26,96
Media ± DS	29,5 ± 1,08	33,4 ± 1,08	26,1 ± 1,16	29,7 ± 1,16

Por último, el grupo de animales que recibieron los dos fármacos muestran unos valores prácticamente idénticos a los controles: 29,5% vs 29,7% (figura 23).

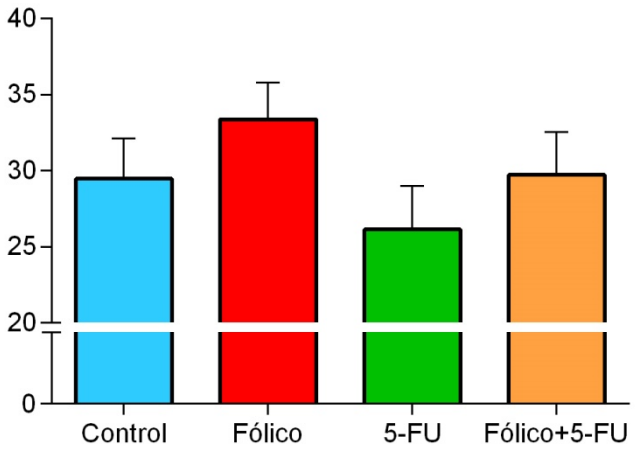


Figura 23. Porcentaje del peso total del hígado que corresponde al parénquima sometido a ligadura portal selectiva.

Hiperplasia del parénquima no sometido a ligadura portal

Para poder analizar la hiperplasia se ha calculado el porcentaje que los lóbulos no ligados suponen respecto al peso total del hígado al concluir el estudio. Para poder comparar los resultados de este parámetro sin que las diferencias se desdibujen por las variaciones de peso corporal entre los diferentes animales, los resultados los presentamos como porcentajes del peso hepático total para cada lóbulo.

Según lo objetivado en nuestros animales de referencia, el lóbulo paramediano derecho y el lateral derecho suponen aproximadamente un 35-40% del volumen hepático total, mientras que el caudado alcanza entorno a un 10%.

Si nos centramos en lo que ocurrió con los animales no tratados, vemos que los lóbulos no ligados suponen en torno al 70% del hígado, siendo pequeña la variabilidad intragrupo (tabla 9), y se ajustan a una distribución normal.

En el grupo control, 36 horas después de la ligadura portal selectiva del 50% del hígado, sigue conservándose la relación de volumen entre los lóbulos no sometidos a ligadura: paramediano derecho 26% y lateral derecho 30% (p>0,05), y caudado 14,5% (figura 24). Siendo más llamativo el crecimiento aislado obtenido en el lóbulo paramediano derecho y en el lateral derecho, que en el lóbulo caudado. Recordemos que los valores de referencia obtenidos eran 34,21% para el lóbulo paramediano (en su totatlidad), 20,80% para el lóbulo lateral derecho y 12,12% para el lóbulo caudado.

Tabla 9. Porcentaje sobre el hígado total que corresponde a cada uno de los lóbulos de los animales sometidos a ligadura portal selectiva (grupo control).

	Ligados	Paramed. dcho.	Lateral dcho.	Caudado
Animal 1	28,60	24,92	32,94	13,51
Animal 2	28,37	30,89	29,10	11,64
Animal 3	32,24	13,85	33,95	19,97
Animal 4	25,22	33,02	28,21	13,55
Animal 5	30,43	29,09	27,77	12,71
Animal 6	32,02	24,33	27,87	15,77
Media ± DS	29,5 ± 1,08	26,00 ± 2,79	30,00 ± 1,12	14,50 ± 1,22

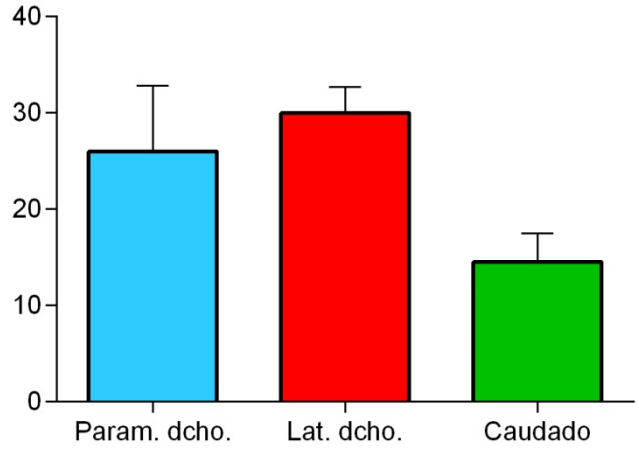


Figura 24. Porcentaje del volumen hepático total correspondiente a cada uno de los lóbulos no sometidos a ligadura portal selectiva.

En el grupo de animales sometidos a ligadura portal selectiva y tratados con ácido fólico, el comportamiento del crecimiento hepático compensador en los lóbulos no sometidos a ligadura portal mantiene el mismo patrón que en los controles (tabla 10). Es verdad que la pequeña diferencia (no significativa) que se observaba entre el paramediano derecho y el lateral derecho aumenta ligeramente, siendo de 23,57% y 29,37% respectivamente, pero sigue sin alcanzar significación estadística.

Tabla 10. Porcentaje sobre el hígado total que corresponde a cada uno de los lóbulos de los animales tratados con ácido fólico.

	Ligados	Paramed. dcho.	Lateral dcho.	Caudado
Animal 1	32,62	30,28	23,27	13,83
Animal 2	37,14	15,86	31,62	15,39
Animal 3	30,89	29,98	26,65	12,49
Animal 4	34,24	18,42	34,73	12,61
Animal 5	32,02	23,30	30,60	13,37
Animal 6				
Media ± DS	33,4 ± 1,08	23,57 ± 6,56	29,37 ± 4,47	13,54 ± 1,17

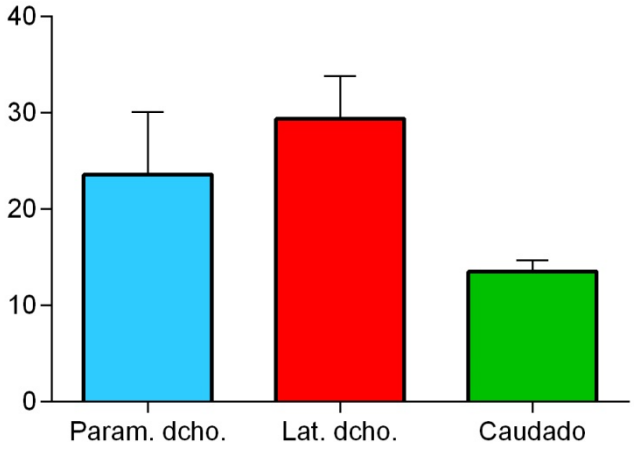


Figura 25. Grupo tratado con ácido fólico: porcentaje del volumen hepático total correspondiente a cada uno de los lóbulos no sometidos a ligadura portal selectiva**.**

Tampoco el tratamiento con 5-FU modificó el patrón de crecimiento hepático en la parte no sometida a ligadura, manteniéndose las proporciones fisiológicas entre los diferentes lóbulos (tabla 11): el paramediano derecho un 28%, muy ligeramente inferior al 31% del lateral derecho, sin que la diferencia alcance significación estadística, y exactamente la mitad el lóbulo caudado (15%). La representación gráfica en la figura 26 es indistinguible de la de los otros dos grupos experimentales previamente descritos.

Tabla 11. Porcentaje sobre el hígado total que corresponde a cada uno de los lóbulos de los animales tratados con 5-FU.

	Ligados	Paramed. dcho.	Lateral dcho.	Caudado
Animal 1	27,94	27,31	30,97	13,78
Animal 2	25,01	29,73	29,21	16,05
Animal 3	30,52	17,89	36,73	14,87
Animal 4	22,10	31,76	30,61	15,52
Animal 5	25,73	31,12	27,99	15,16
Animal 6	25,54	28,34	31,42	14,69
Media ± DS	26,1 ± 1,16	27,69 ± 5,08	31,16 ± 3,01	15,01 ± 0,77

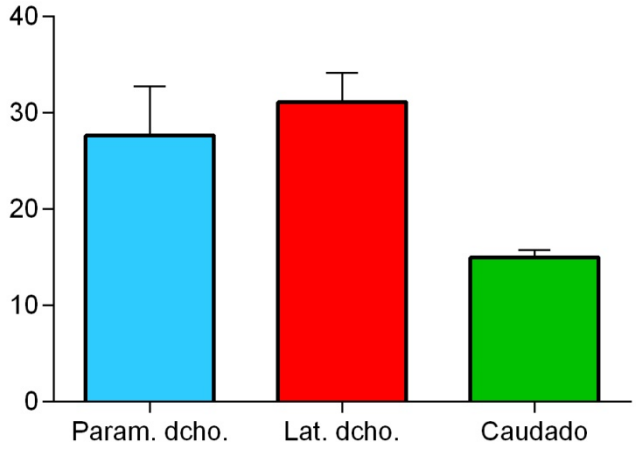


Figura 26. Grupo tratado con 5-FU: porcentaje del volumen hepático total correspondiente a cada uno de los lóbulos no sometidos a ligadura portal selectiva.

Por último, tenemos el grupo de animales que recibieron los dos fármacos: el ácido fólico y el 5-FU. Tal y como se puede ver en la tabla 12, en lo que respecta al lóbulo paramediano derecho, se aprecia algo diferente a los anteriores. La ligera diferencia a favor del lóbulo lateral derecho observada en el resto de los grupos, aquí se hace más manifiesta (figura 27): 22% el paramediano derecho frente a 34% el lateral derecho, y aquí sí que la diferencia alcanza significación estadística ($p<0,05$). De hecho, puede verse en la tabla 12 como tres de los seis animales presentan valores inferiores a 20% para el lóbulo paramediano derecho.

Tabla 12. Porcentaje sobre el hígado total que corresponde a cada uno de los lóbulos de los animales tratados con 5-FU.

	Ligados	Paramed. dcho.	Lateral dcho.	Caudado
Animal 1	32,48	18,96	33,54	15,03
Animal 2	33,09	12,86	38,95	15,10
Animal 3	30,15	26,37	30,40	13,24
Animal 4	29,66	13,99	39,47	16,89
Animal 5	26,07	30,01	30,64	13,28
Animal 6	26,96	29,64	31,57	11,83
Media ± DS	29,7 ± 1,16	21,97 ± 7,73	34,10 ± 4,12	14,23 ± 1,80

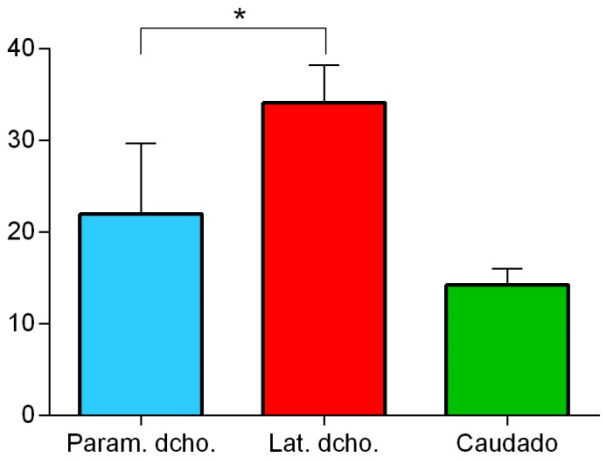


Figura 27. Grupo tratado con ácido fólico y 5-FU: porcentaje del volumen hepático total correspondiente a cada uno de los lóbulos no sometidos a ligadura portal selectiva **(* p<0,05)**

Por otra parte, el comportamiento del lóbulo caudado se mantiene dentro de los rangos habituales en el hígado normal de la rata, sin diferencia frente a lo registrado en los demás grupos experimentales.

Parámetros bioquímicos

En este apartado recogemos los resultados obtenidos a partir del análisis de los sueros obtenidos durante el sacrificio de nuestros animales.

Parámetros metabólicos

Como valoración indirecta de la funcionalidad hepática hemos analizado los niveles de glucosa y de albúmina en sangre.

En cuanto a la glucemia, no se han encontrado diferencias entre los cuatro grupos (ANOVA no significativa), que presentan medias que oscilan entre 156 y 164 mg/dl y que se admiten dentro del rango normal de glucemias medidas con los animales no sometidos a ayuno (106-184 mg/dl) (tabla 13).

Tabla 13. Niveles de glucemia en el momento del sacrificio (mg/dl)

	Normales	Control	Fólico	5-Fluorouracilo	Fólico + 5-FU
Animal 1	154	151	166	154	167
Animal 2	155	155	144	139	152
Animal 3	---	141	150	146	150
Animal 4	186	149	157	160	180
Animal 5	156	184	165	174	169
Animal 6		165		175	166
Media ± DS	156 ± 4,3	158 ± 15,2	156 ± 9,5	158 ± 14,6	164 ± 11,3

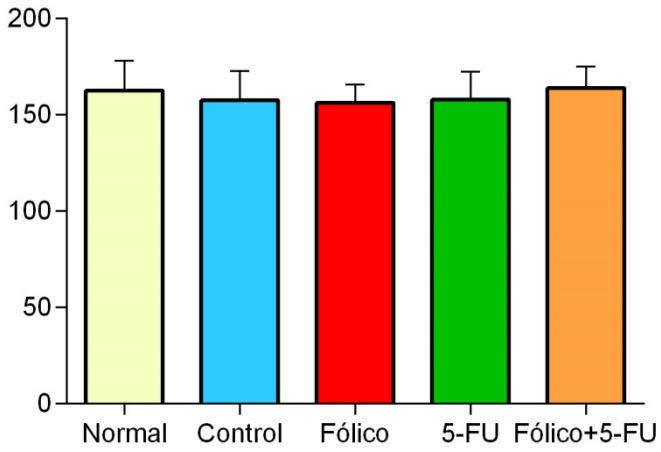


Figura 28. Representación gráfica de los valores de glucosa en sangre (mg/dl) por grupo

En el caso de la albúmina, el análisis de la varianza objetivó diferencias significativas entre los cuatro grupos experimentales, con una p = 0,024. Sin embargo, el posterior estudio estratificado con el Test de Comparación Múltiple de Tukey demostró que ninguno de los cuatro grupos experimentales mostraba diferencias significativas frente a los valores de animales normales (sanos). Únicamente detectó diferencia significativa entre el grupo de ácido fólico y el de ácido fólico + 5-Fluorouracilo (figura 29). Los animales tratados con los dos fármacos mostraron niveles significativamente menores (3,4 mg/dl) que los tratados con ácido fólico (3,8 mg/dl). En cambio, entre los grupos control y los tratados con un solo fármaco no hay diferencias (tabla14).

Tabla 14. Albúmina sérica en el momento del sacrificio (mg/dl)

	Normales	Control	Fólico	5-Fluorouracilo	Fólico + 5-FU
Animal 1	3,5	3,7	4		3,3
Animal 2	3,5	3,6	3,6	3,7	3,5
Animal 3	3,9	3,8	4,2	3,1	3,4
Animal 4	3,7	3,7	3,6	4	3,5
Animal 5	3,5	3,7	3,8	3,8	3,4
Animal 6		4		3,7	3,4
Media ± DS	3,62 ± 0,08	3,75 ± 0,14	3,84 ± 0,26	3,66 ± 0,34	3,42 ± 0,08

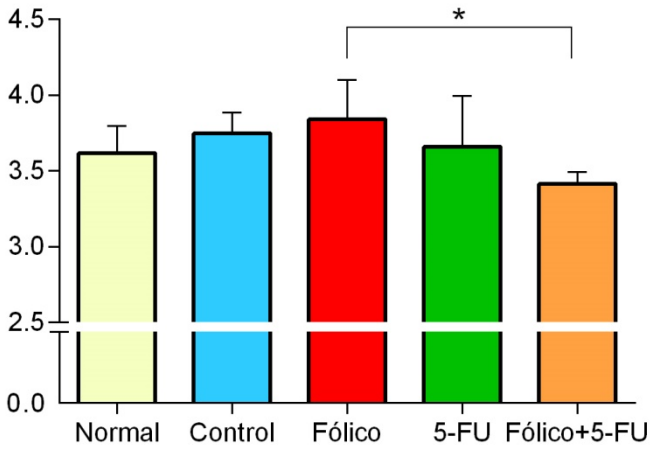


Figura 29. Representación gráfica de los valores de albúmina en sangre por grupo, mg/dl (* p<0,05)

Enzimas de colestasis-citólisis

En todas las muestras plasmáticas obtenidas el resultado de la bilirrubina total fue < 2 mg/dL, sin hallar diferencias entre grupos ni entre los individuos de un mismo grupo.

La fosfatasa alcalina no presentó valores significativamente elevados respecto al límite aceptado en la rata (30-130 UI/l), en ninguno de los grupos experimentales (tabla 15). Sin embargo, el Análisis de la Varianza detectó diferencias estadísticamente

significativas entre las medias de los grupos analizados, con una p<0,05. El análisis posterior con el Test de comparación múltiple de Tukey muestra que la ligera elevación de los niveles séricos de FA en los controles (157 UI/l) y los tratados con fólico (157 UL/l), frente al resto de los grupos, no alcanza significación estadística (además de que es una elevación clínicamente irrelevante). Por el contrario, los animales que recibieron 5-FU muestran una reducción de la concentración sérica de FA (110 UI/l) y el Test de Tukey confirma que la diferencia frente a los controles (una reducción del 30%) es significativa (p<0,05; figura 30). En el caso de los animales que recibieron los dos fármacos, la reducción es menor (20%) y no llega a niveles de significancia estadística.

Tabla 15. Fosfatasa alcalina sérica en el momento del sacrificio (UI/l)

	Normales	Control	Fólico	5-Fluorouracilo	Fólico + 5-FU
Animal 1	131	148	125	108	124
Animal 2	130	173	218	125	124
Animal 3	147	179	129	155	105
Animal 4	137	117	154	86	129
Animal 5	129	206	157	92	124
Animal 6		120		94	150
Media ± DS	135 ± 3,4	157 ± 14,4	157 ± 16,6	110 ± 10,7	126 ± 5,88

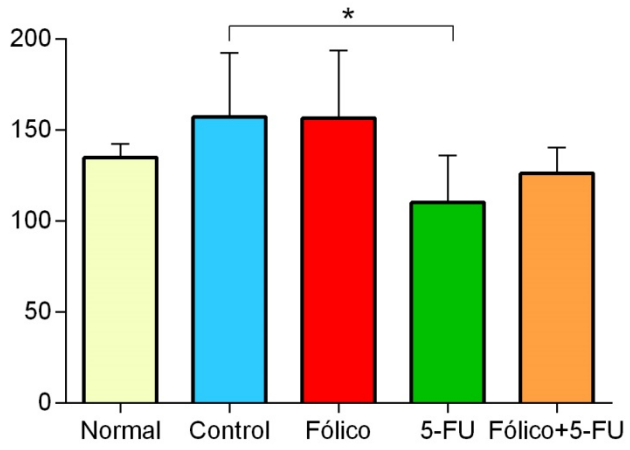


Figura 30. Fosfatasa Alcalina en sangre (mg/dl) por grupo (* p<0,05)

Por lo que respecta a las enzimas de citolisis, GOT (AST) y GPT (ALT), todos los animales presentan valores elevados respecto a los que se consideran de referencia en la rata: GOT 74-143 U/L y GPT 18-45 U/L.

El comportamiento de estos enzimas fue absolutamente idéntico en cada uno de los grupos experimentales, teniendo que destacar una variabilidad muy importante intragrupo, responsable de que las diferencias que se observan (tablas 16 y 17) no alcancen significación estadística.

Por otro lado, los resultados en ambos enzimas (GOT Y GPT) fueron calcados por cada grupo (figura 31). Especialmente en cuanto se refiere a lo que acontece en los animales tratados con ácido fólico, en los que los niveles séricos de estos enzimas alcanzan valores un 50% mayores que los de los animales no tratados.

Tabla 16. GOT (AST) sérica en el momento del sacrificio (UI/l).

	Normales	Control	Fólico	5-Fluorouracilo	Fólico + 5-FU
Animal 1	46	342	619	460	519
Animal 2	59	1226	2084	1205	829
Animal 3	46	950	1209	1077	282
Animal 4	46	451	1388	557	832
Animal 5	58	1469	999	374	1337
Animal 6	58	703		594	1550
Media ± DS	52,2 ± 2,8	857 ± 180	1260 ± 243	711 ± 140	892 ± 196

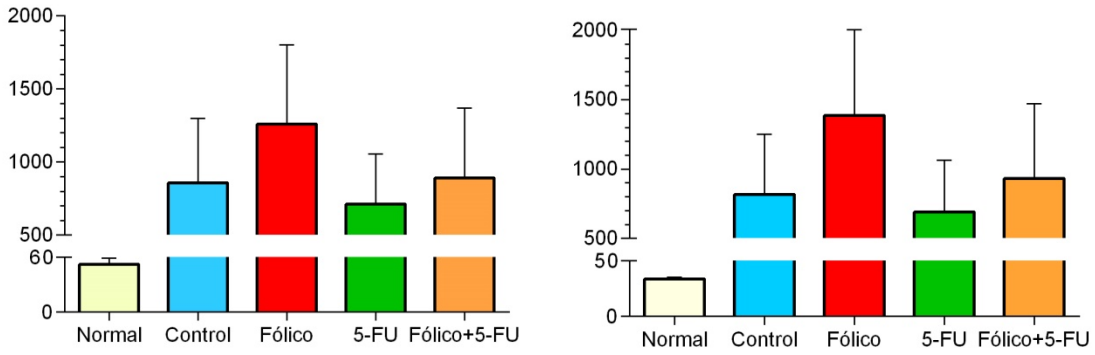


Figura 31. GOT (izquierda) y GPT (derecha) en sangre (mg/dl) por grupo

Tabla 17. GPT (ALT) sérica en el momento del sacrificio (UI/l).

	Normales	Control	Fólico	5-Fluorouracilo	Fólico + 5-FU
Animal 1	31	307	659	394	418
Animal 2	35	1331	2254	1364	1059
Animal 3	33	916	1314	852	263
Animal 4	33	478	1694	599	811
Animal 5	35	1296	1003	374	1408
Animal 6	35	585		569	1631
Media ± DS	33,7 ± 0,7	819 ± 176	1385 ± 276	692 ± 152	932 ± 220

Por último, el análisis de la relación GOT/GPT mostró unos valores significativamente disminuidos en los cuatro grupos experimentales, respecto a los valores de los animales sanos ($p<0,0001$). En cambio ninguno de los tratamientos indujo modificaciones en este parámetro (comparado con el grupo control, no tratado) tampoco arrojó diferencias atribuibles a los tratamientos (tabla 18).

Tabla 18. Relación GOT/GPT en el momento del sacrificio (UI/l).

	Normales	Control	Fólico	5-Fluorouracilo	Fólico + 5-FU
Animal 1	1,48	1,11	0,94	1,17	1,24
Animal 2	1,69	0,92	0,92	0,88	0,78
Animal 3	1,39	1,04	0,92	1,26	1,07
Animal 4	1,39	0,94	0,82	0,93	1,03
Animal 5	1,66	1,13	1,00	1,00	0,95
Animal 6	1,66	1,20		1,04	0,95
Media ± DS	1,55 ± 0,06	1,06 ± 0,05	0,92 ± 0,03	1,05 ± 0,06	1,00 ± 0,06

Análisis Histológico

En este apartado recogemos los resultados del recuento de número de núcleos por unidad de superficie (densidad de núcleos de hepatocitos en el tejido hepático), el tamaño medio de esos núcleos (indicativo de actividad de síntesis de DNA) y el análisis descriptivo de las muestras.

Recuento nuclear

En los cortes histológicos obtenidos del hígado de animales tratados con ácido fólico se aprecia un significativo aumento de la densidad nuclear, subiendo desde una media de 15,2 en los controles hasta 24,4 en este grupo (tabla 19).

En cambio, los animales tratados con 5-FU muestran una densidad de núcleos en su hígado totalmente superponible a la registrada en los animales no tratados (figura 32).

Tabla 19. Recuento de núcleos en el parénquima hepático (nº de núcleos/100µm^2).

	Control	Fólico	5-Fluorouracilo	Fólico + 5-FU
Animal 1	15,4	20,8	15,8	17,6
Animal 2	13,8	25,4	11,4	30,8
Animal 3	21,8	17,5	14,4	16
Animal 4	10,5	34	15,6	29,8
Animal 5	15,4	24,4	16,4	16
Animal 6	14,4		19,8	19,8
Media ± DS	15,2 ± 1,51	24,4 ± 2,77	15,6 ± 18,4	21,7 ± 2,79

Por último, en los animales que recibieron los dos fármacos se encuentra una media netamente superior a la de los controles (21,7 nº de núcleos/100µm^2), aunque ligeramente inferior a lo registrado en los animales tratados exclusivamente con ácido fólico.

Al someter nuestros resultados a un Análisis de Varianza, se concluye que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p<0,0001$). La posterior comparación entre grupos realizada con el Test de Tukey concluye que los resultados del grupo tratado con fólico muestran que la diferencia observada alcanza una gran significación estadística tanto frente al control como frente al grupo tratado con 5-FU ($p<0,00001$). En cambio, la ligera diferencia observada frente a los animales que recibieron doble tratamiento no alcanza significación estadística. Por último, también alcanza significación estadística el incremento observado en los animales con doble tratamiento, tanto frente a los controles ($p<0,01$) como frente a los animales tratados con 5-FU ($p<0,05$).

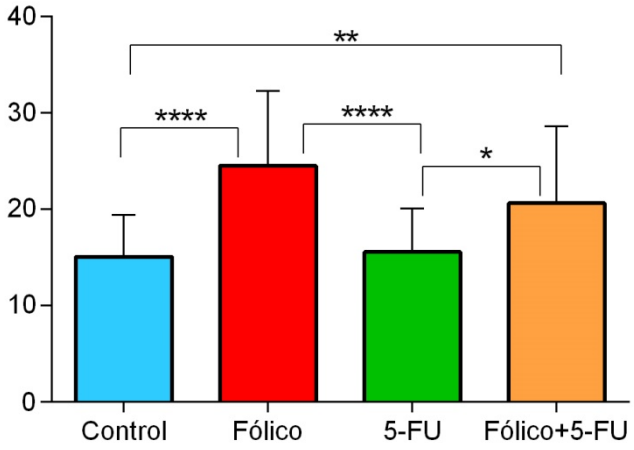


Figura 32. Recuento de núcleos en secciones histológicas (nº de núcleos/100µm^2) (* p<0,05, ** p<0,01, **<0.0001)**

Tamaño de los núcleos

El resultado de la medición del tamaño de los núcleos de hepatocitos obtuvo valores que en cada uno de los grupos experimentales se adecuaron a una distribución normal. De cada uno de los animales se realizó un mínimo de cinco recuentos diferentes, por lo que los resultados pudieron analizarse con el Test de Normalidad de "D'Agostino & Person". Los valores medios obtenidos para cada animal, se detallan en la tabla 20.

El grupo con mayor tamaño medio de núcleos fue el grupo de Fo, con 121 µm^2, seguido del grupo de Fo+FU con 111 µm^2. En este último grupo el resultado fue idéntico al obtenido con el grupo control, aunque con una variabilidad ligeramente mayor.

Tabla 20. Tamaño medio de los núcleos medidos en los cortes estudiados (µm^2).

	Control	Fólico	5-Fluorouracilo	Fólico + 5-FU
Animal 1	112,0	121,0	100,6	113,7
Animal 2	105,5	120,0	97,5	99,8
Animal 3	113,6	129,3	105,9	116,0
Animal 4	114,2	114,7	107,4	117,3
Animal 5	106,1	121,3	107,7	115,9
Animal 6	116,1		104,0	102,3
Media ± DS	111 ± 1,80	121 ± 2,34	104 ± 1,66	111 ± 3,15

La representación gráfica de los resultados (figura 33) hace evidente que no se trata de grupos similares, lo que quedó confirmado con el Análisis de la Varianza (p<0,0001). De hecho, en los animales tratados con ácido fólico se ha registrado un incremento del tamaño medio de los núcleos de un 10%. Esta diferencia alcanza una elevada significación estadística (p<0,00001). Lo contrario ocurre con los animales que fueron tratados con 5 fluorouracilo, que presentan una reducción del tamaño medio de sus núcleos de un 6,5%; siendo esta diferencia también altamente significativa (p<0,0001).

En los animales en los que se combinan ambos tratamientos el tamaño medio de los núcleos es indistinguible del registrado en los controles.

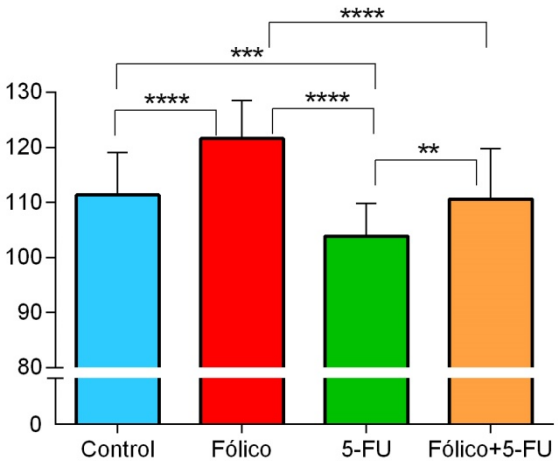


Figura 33. Tamaño medio de los núcleos de cada grupo experimental (µm²). No existe diferencia significativa entre el control y el doble tratamiento **(* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, ****<0.0001)**

Análisis histológico del parénquima

En este último apartado recogemos el resultado del estudio histológico del parénquima hepático. Las variables analizadas, de tipo cualitativo, fueron: zonas de isquemia, áreas de mitosis-regeneración, necrosis y apoptosis. Además de su distribución anatómica y lobulillar.

Tal y como se ha mencionado en el apartado de "Material y Métodos" en el "Procesamiento de las muestras", la necrosis y la apoptosis se diferenció en base al componente inflamatorio objetivado en las muestras histológicas. Los resultados se recogen con detalle en las tablas 21 a 24.

En el grupo control, salvo un animal, el parénquima del lóbulo no ligado presentaba un aspecto similar a hígado isquémico prenecrótico, pero con abundantes mitosis; imagen sugestiva de un hígado en regeneración. Sin embargo, en uno de los animales se apreciaron focos aislados de apoptosis en el tejido centrolobulillar perivenular (tabla 21).

Tabla 21. Análisis histológicos de los hígados en el grupo control

Control	
Animal 1	**HÍGADO EN REGENERACIÓN** Parénquima de aspecto isquémico prenecrótico, con abundantes mitosis.
Animal 2	**HÍGADO EN REGENERACIÓN** Parénquima de aspecto isquémico prenecrótico, con abundantes mitosis.
Animal 3	**REGENERACIÓN HEPÁTICA + FOCOS DE APOPTOSIS CELULAR**, centrolobulillar, afectan al **30-40%**
Animal 4	**HÍGADO EN REGENERACIÓN** Parénquima de aspecto isquémico prenecrótico, con abundantes mitosis.
Animal 5	**HÍGADO EN REGENERACIÓN** Parénquima de aspecto isquémico prenecrótico, con abundantes mitosis.
Animal 6	**HÍGADO EN REGENERACIÓN** Parénquima de aspecto isquémico prenecrótico, con abundantes mitosis.

En el grupo con ácido fólico, el número de animales con imágenes histológicas de apoptosis aumentó. En todos los casos, dichos focos de apoptosis fueron en el tejido perivenular del área centrolobulillar o zona III; observándose estigmas sugestivos de regeneración en el resto del parénquima. Al igual que en el grupo control, no se llegó a superar el 40% de tejido con células en apoptosis. En uno de los animales, las áreas de mitosis fueron más aisladas, con focos de inflamación dispersos a lo largo de toda la sección histológica (tabla 22).

Tabla 22. Análisis histológicos de los hígados en el grupo con ácido fólico

Fólico	
Animal 1	Parénquima conservado con **focos de inflamación**
Animal 2	**REGENERACIÓN HEPÁTICA + FOCOS DE APOPTOSIS CELULAR**, centrolobulillar, afecta al **40%**
Animal 3	**HÍGADO EN REGENERACIÓN** Parénquima de aspecto isquémico prenecrótico, con abundantes mitosis.
Animal 4	**REGENERACIÓN HEPÁTICA + FOCOS DE APOPTOSIS CELULAR**, centrolobulillar, afecta al **5-10%**
Animal 5	**HÍGADO EN REGENERACIÓN** Parénquima de aspecto isquémico prenecrótico, con abundantes mitosis.

Con 5-Fluorouracilo y sin ácido fólico no se pudieron demostrar focos de apoptosis. Todos los hígados mostraron una imagen sugestiva de regeneración hepática (hígado isquémico prenecrótico con abundantes mitosis). A diferencia que con el ácido fólico, donde la regeneración fue periportal predominantemente, con el 5-FU, ésta fue difusa a lo largo de todo el lobulillo (tabla 23).

Tabla 23. Análisis histológicos de los hígados en el grupo con 5-Fluorouracilo

5-FU	
Animal 1	**HÍGADO EN REGENERACIÓN** Parénquima de aspecto isquémico prenecrótico, con abundantes mitosis.
Animal 2	**HÍGADO EN REGENERACIÓN** Parénquima de aspecto isquémico prenecrótico, con abundantes mitosis.
Animal 3	**HÍGADO EN REGENERACIÓN** Parénquima de aspecto isquémico prenecrótico, con abundantes mitosis.
Animal 4	**HÍGADO EN REGENERACIÓN** Parénquima de aspecto isquémico prenecrótico, con abundantes mitosis.
Animal 5	**HÍGADO EN REGENERACIÓN** Parénquima de aspecto isquémico prenecrótico, con abundantes mitosis.
Animal 6	**HÍGADO EN REGENERACIÓN** Parénquima de aspecto isquémico prenecrótico, con abundantes mitosis.

La tendencia observada con el ácido fólico se repitió al asociarlo al 5-Fluorouracilo, apreciándose focos de apoptosis embebidos en tejido en regeneración. Dichos focos de apoptosis, al igual que ocurría en el grupo con ácido fólico, fueron de distribución centrolobulillar, prevaleciendo la regeneración hepatocitaria a nivel periportal. En las muestras sin apoptosis, el tejido hepático mostró un aspecto isquémico prenecrótico con abundante apoptosis, sugestivo de regeneración (tabla 24).

Tabla 24. Análisis histológicos de los hígados en el grupo ácido fólico + 5-Fluorouracilo

Fo + 5-FU	
Animal 1	**REGENERACIÓN HEPÁTICA + FOCOS DE APOPTOSIS CELULAR**, centrolobulillar, afecta al **5-10%**
Animal 2	**REGENERACIÓN HEPÁTICA + FOCOS DE APOPTOSIS CELULAR**, centrolobulillar, afecta al **15-20%**
Animal 3	**HÍGADO EN REGENERACIÓN** Parénquima de aspecto isquémico prenecrótico, con abundantes mitosis.
Animal 4	**REGENERACIÓN HEPÁTICA + FOCOS DE APOPTOSIS CELULAR**, centrolobulillar, afecta al **<5% subcapsular**
Animal 5	**HÍGADO EN REGENERACIÓN** Parénquima de aspecto isquémico prenecrótico, con abundantes mitosis.
Animal 6	**HÍGADO EN REGENERACIÓN** Parénquima de aspecto isquémico prenecrótico, con abundantes mitosis.

En definitiva, los resultados podrían discriminarse según la existencia de focos de apoptosis celular. A pesar de que el porcentaje de individuos con apoptosis por grupo fuera diferente, no se llegaron a objetivar diferencias estadísticamente significativas (figura 34). Dicha apoptosis fue inferior al 20% en la mayoría de las ratas, sin llegarse a superar en ningún caso el 40%.

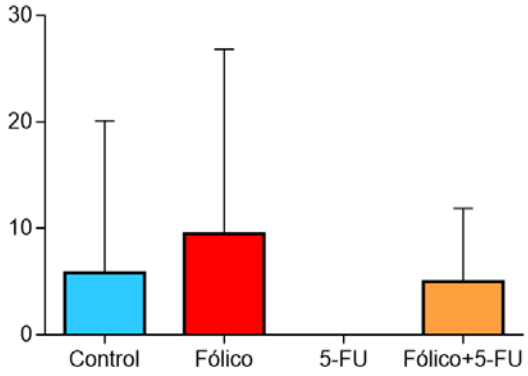
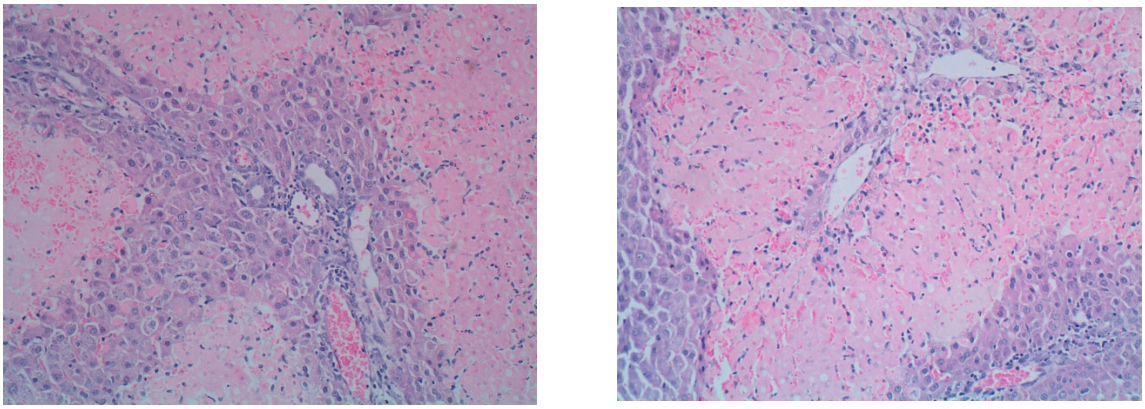


Figura 34. Representación gráfica del % de individuos con apoptosis por grupo

Los focos de apoptosis siguieron un patrón de distribución claro, delimitándose en la mayoría de las muestras a la zona III o perivenular del lobulillo (figura 35). Por otro lado, dichas muestras presentaron una regeneración predominantemente periportal o de la zona I lobulillar (figura 35).



A B

Figura 35. Imágenes histológicas con focos aislados de apoptosis. A: animal 2 grupo Fo, espacio periporta preservado B: animal 2 grupo Fo, focos de apoptosis en zona III perivenular.

La tendencia a una regeneración predominantemente periportal que existió en los grupos tratados con ácido fólico nos llevó a comparar dichas ramas (Fo y Fo+5-FU) frente

al resto, contabilizando y sumando el número de animales por cada grupo. El resultado se expresa en la siguiente tabla de contingencia (tabla 25/Figura 36):

Tabla 25. Regeneración principalmente periportal en animales tratados con Fo frente a no tratados.

	Si Regeneración	No Regeneración
Si Fo	**5**	**6**
No Fo	**1**	**11**

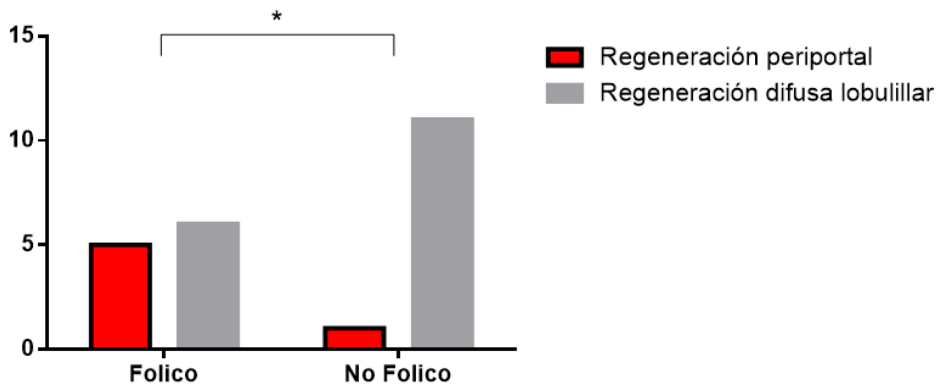


Figura 36. Regeneración periportal en individuos tratados con Fo y sin Fo. (* p<0,05)

La diferencia en número de animales con regeneración de predominio periportal que existió en las ratas tratadas con ácido fólico fue estadísticamente significativa al usar una prueba de Chi Cuadrado ($p< 0,05$), sin que pudiera llegarse a confirmar por medio del Test exacto de Fisher ($p = 0,069$).

DISCUSIÓN

La regeneración hepática ha sido una incógnita durante muchos años. Así, el proceso de cómo y por qué el hígado es capaz de restaurar su función ha mantenido intrigado al mundo médico y científico durante mucho tiempo. Su capacidad de regeneración, de hipertrofia e hiperplasia, lo hacen único entre el resto de los órganos del cuerpo humano.

A lo largo de los últimos años, y por medio de estudios experimentales en animales con silenciamiento genético, se han ido identificando múltiples rutas moleculares que explican la regeneración hepática. Este conocimiento de cómo transcurre el proceso permite entrever posibles estrategias para su modulación.

Por otro lado, el hígado es el intermediario digestivo entre el medio externo e interno, almacenando los nutrientes absorbidos y neutralizando los tóxicos. Además supone una piedra angular en la homeostasis metabólica e inmunológica del organismo. Es el filtro, y en muchas ocasiones, el asiento de metástasis de otros tejidos, entre los que destaca el aparato digestivo. Ejemplo de ello es la metástasis del CCR, cuyo control y tratamiento mejora la supervivencia de los pacientes.

Todo ello conlleva situaciones en las que el parénquima hepático es parcialmente resecado a expensas de su capacidad regenerativa. A lo largo de este estudio se ha tratado de entender como la quimioterapia de primera línea del CCR afecta directamente a dicho proceso, sabiendo que el ácido fólico (leucovorina) podría potenciarlo.

Idoneidad de la hipótesis

Volviendo a nuestra hipótesis inicial, cabe recordar que el ácido fólico ha sido previamente empleado en otros estudios experimentales con influencia demostrada para la regeneración hepática[98,104].

La finalidad última de la regeneración hepática es la multiplicación y crecimiento nuclear, celular y tisular; devolviendo la capacidad de hacer frente a las necesidades metabólicas del organismo. Es lógico por tanto pensar que los metabolitos que actúan directamente sobre el proceso de producción de DNA puedan influir también en la regeneración hepática. En este sentido el ácido fólico se ha ensayado en múltiples estudios con resultados prometedores, ya que es un sustrato de la enzima Timidilato Sintetasa (TYMS) y ayuda a la síntesis de nucleótidos.

De la misma manera se entiende que los fármacos que afecten negativamente a la producción de DNA podrían retrasar el proceso de crecimiento hepatocitario. Esto defendería e iría a favor de nuestra segunda hipótesis, "la quimioterapia de primera línea del CCR frena la regeneración hepática". Este es el caso del 5-FU, que al igual que el ácido fólico, influye también sobre la TYMS[30]. De hecho, se ha descrito una relación directamente proporcional entre la administración ácido fólico y el efecto del 5-FU[31], potenciando la acción de éste último al asociarlo con la leucovorina (ácido folínico).

El aclarar la interrogante de cómo la quimioterapia de primera línea del CCR, 5-FU + leucovorina, afecta sobre la regeneración hepática podría suponer un empuje en la utilización precoz y sinérgica de tratamientos con beneficio clínico demostrado[127]. Es decir, podría implicar que se implementara de manera precoz la cirugía hepática y la quimioterapia para afrontar la metástasis hepática del CCR.

Es bien sabido que cuando un paciente con metástasis hepáticas del CCR es subsidiario de tratamiento, empieza un proceso clínico con múltiples terapias que coordinar, sistémicas (quimioterapia) y quirúrgicas. El establecimiento de todas estas intervenciones y el tiempo obligado que transcurre entre ellas facilita impases que favorecen la progresión de la enfermedad.

Según nuestra hipótesis, la administración de ácido fólico (leucovorina) podría frenar el efecto deletéreo del 5-FU sobre la regeneración hepática. De esta manera, la quimioterapia de primera línea del CCR podría no afectar tanto a la recuperación tisular hepática y sin embargo conservar su efecto anti-tumoral.

Fármacos

En las últimas décadas la cirugía radical de la metástasis del CCR ha demostrado ser un procedimiento eficaz en la curación de la enfermedad. No obstante, solo se ha podido hacer frente a las limitaciones actuales de la cirugía por medio de tratamientos multidisciplinares que integran tanto procedimientos intervencionistas como quimioterápicos. Sin embargo, la influencia de los quimioterápicos en la regeneración hepática sigue siendo una incógnita. Además, la habitual asociación del 5-FU con la leucovorina o folinato cálcico, pone en duda la capacidad proliferativa del ácido fólico durante el tratamiento quimioterápico.

Ácido fólico y 5-FU

El ácido fólico y sus derivados son esenciales en múltiples procesos celulares, entre los que destacan la síntesis de nucleótidos y aminoácidos. Es por ello que la implementación de un aporte añadido de ácido fólico podría facilitar la síntesis de dichas moléculas y así potenciar la proliferación celular.

Parece que el ácido fólico podría ayudar a la regeneración del hepatocito tras una cirugía hepática, sin embargo, existen trabajos que defienden que un aporte extra de ácido fólico también podría facilitar la proliferación de la célula tumoral. Le Leu RK et al[116] encontraron que la deficiencia nutricional de ácido fólico en ratas disminuía de manera significativa la aparición de tumores de origen colorrectal. En 2007 Cole BF et al[117] llegaron a la misma conclusión al objetivar un aumento en adenomas colónicos en pacientes en los se había dado un suplemento de ácido fólico. El mismo grupo de investigación acabó por encontrar, a largo plazo, una relación estadísticamente significativa entre el ácido fólico y la aparición de pólipos serrados[117], además de hallar una incidencia incrementada de CCR, aunque ésta última sin significación estadística.

Por tanto, cabe concluir que el ácido fólico ayuda a la proliferación celular, siendo un arma de doble filo que pudiera facilitar la progresión tumoral. No obstante, resulta crucial recordar que el ácido fólico funciona como cofactor de la TYMS, y que ésta se encuentra anulada una vez haya unido al 5-fluoro-2´-deoxiuridin-5´-monofosfato

(FdUMP), metabolito activo del 5-fluorouracilo. De hecho, será el folinato cálcico o leucovorina, la que, asociada al 5-FU, potenciará la función de la TYMS y su consecuente unión con el FdUMP.

Por otro lado, cabe discutir el hecho de que la aplicación de ácido fólico durante este trabajo haya sido intraperitoneal. En general, el folinato cálcico suele administrarse de manera intravenosa. De hecho, la administración femoral de ácido fólico en ratas parece potenciar la regeneración hepática[98,104]. El retorno venoso femoral drenará su sangre al sistema venoso iliaco y finalmente a la vena cava, sin pasar a través del hígado. La administración intraperitoneal probablemente pudiera ser más adecuada para lograr su efecto sobre la célula hepática, ya que el retorno venoso de la capa visceral peritoneal pasará por la vena porta y el hígado. Dicha razón podría ser la que explicara la disparidad de resultados de nuestro trabajo en relación a los previos hallados[104], obteniendo una regeneración tisular comparativamente mayor durante este trabajo.

De la misma manera, considerando que existen protocolos en los que se infunde de manera selectiva la quimioterapia a nivel arterial[24], el hecho de haber aplicado a nivel intraperitoneal el ácido fólico adquiere relevación clínica. El drenaje portal del sistema venoso peritoneal facilitará que los hepatocitos asimilen el ácido fólico. De la misma manera, la administración intraarterial de la quimioterapia condenaría a la célula tumoral a su efecto citotóxico, sin que este llegará a afectar directamente al hepatocito. Esta hipótesis adquiere una connotación clínica muy relevante, ya que un suplemento intraperitoneal de ácido fólico, asociado a una quimioterapia intraarterial, podría facilitar una potenciación de la regeneración hepática junto al efecto antitumoral buscado.

Idoneidad del modelo animal utilizado

Con intención de poder rescatar para la cirugía a pacientes con enfermedad hepática extendida, se han desarrollado múltiples intervenciones que tratan de incrementar el volumen del hígado residual. Ejemplo de ello es la embolización portal preoperatoria (PVE). No obstante, la aparición de éstas nuevas técnicas ha afectado directamente a la

funcionalidad y viabilidad del hígado remanente. De esta manera, son frecuentes los escenarios en los que el paciente ha de superar un postoperatorio duro e incierto.

La técnica de embolización portal (PVE) es ya un método extendido a nivel clínico y con eficacia probada para incrementar el volumen hepático residual. Múltiples autores han previamente demostrado su aplicabilidad en la rata[100,102,103,104]. Tras someter a los animales a diferentes grados de ligadura portal concluyeron que es una técnica segura con resultados reproducibles[102].

Existe bibliografía que demuestra que las ratas tienen una gran tolerancia a la ligadura portal. Se han llegado a realizar ligaduras de hasta el 90% con éxito[102] y sin reportarse insuficiencia hepática postquirúrgica. En cambio, la resección del 90% del parénquima hepático en la rata se ha utilizado como modelo de fracaso hepático agudo, que termina en la muerte del animal si no hay una terapéutica de soporte[115].

El modelo experimental en ratas nos facilita un ejemplo científicamente aceptado con el que validar nuestra hipótesis. Son innumerables los ejemplos de modelos experimentales de cirugía hepática en la rata que se han trasladado a la clínica en el humano. El ejemplo más notorio de ello es el trabajo de Higgins y Anderson[67], por el cual se inició el camino para las hepatectomías seriadas y repetidas en un mismo órgano. Por otro lado, la experimentación en la rata ha aportado una ingente información sobre la regeneración hepática, siendo ésta muy similar a la que ocurre en el humano. Ejemplo de ello es la concentración de HGF: su nivel en el suero de humanos tras una intervención quirúrgica es la misma a la que se ha demostrado su máxima efectividad in vitro[114]. Todo ello hace pensar que la cirugía hepática en la rata (especie Rattu Norvegicus Albinus) es un modelo fiel y reproducible del comportamiento molecular y celular de la regeneración tisular.

Además, mientras que la regeneración hepática en el humano se cuenta en semanas y meses, en la rata podemos objetivarla en horas o días[67]; ventaja temporal que permite probar nuestra hipótesis en un tiempo razonable.

Con idea de representar un ambiente de estrés quirúrgico que simule el postoperatorio de un paciente en el que se haya realizado una embolización portal, en nuestro trabajo hemos procedido a realizar una ligadura portal selectiva en el hígado de la rata. La ligadura portal de los lóbulos hepáticos murinos resulta técnicamente fácil dada su división anatómica e hiliar. Sin embargo, la división lobular del hígado de la rata impone un sesgo comparativo con el hígado del humano, dada la existencia, en éste último, de comunicaciones vasculares entre ambos lóbulos hepáticos. Es por dicha razón que finalmente se decidió realizar una ligadura del flujo venoso portal de LLI y del LMI, existiendo de esta forma una conexión venosa entre parénquima ligado y parénquima no-ligado (los lóbulos paramedianos). Asimismo, con esta técnica, se obtuvieron volúmenes de oclusión venosa similares a los que se refieren en clínica humana (obstrucción del 50% del flujo portal que se produce con la embolización).

Conscientes de esta realidad y de la gran tolerancia de la rata, procedimos a administrar dosis elevadas de los fármacos a estudio. Esto nos ayudó a simular una circunstancia de alto estrés fisiológico. Todo ello nos permite inferir resultados que asemejan el postoperatorio extremo de los pacientes con metástasis hepática del CCR.

Modelo de atrofia hepática parcial

En los siguientes apartados procederemos a analizar la utilidad y reproducibilidad del modelo de la ligadura portal, comparando nuestros resultados con los hallados en la bibliografía.

Un aspecto importante a considerar previo a la discusión de la misma técnica es que no existieron complicaciones postquirúrgicas reseñables. La resistencia de la rata como animal de investigación facilita un modelo con poca variabilidad en cuanto a las complicaciones se refiere, sin poder ser en modo alguno extrapolable a la clínica humana.

Ligadura portal selectiva en nuestro modelo animal

En este estudio hemos realizado una ligadura portal que afectó al LLI y al LMI. El LM comparte vascularización entre sus dos lobulillos, por lo que su isquemia parcial aporta información sobre la capacidad residual del LM para regenerarse, ejemplificando la conexión vascular que pudiera existir entre el hígado izquierdo y derecho humano.

Atendiendo al procedimiento técnico, el hígado se evisceró parcialmente. Para ello se seccionó el ligamento falciforme y se procedió a la eversión del LLI y del LM, logrando exponer su superficie interna y su paquete vascular. Tal y como se ha explicado en el apartado de "Material y Métodos" en la sección de "Procedimiento Quirúrgico", relevancia aparte adquirió la existencia de una rama posterior de la arteria hepática lobar, dado que su lesión se correlaciona directamente con sangrado e isquemia arterial parcheada del LLI.

Por otro lado, la ligadura se limitó obligadamente a un pequeño segmento del pedículo lobar, ya que la distancia entre las ramificaciones hiliares para el LMD, LMI y LII nacen a pocos milímetros unas de otras. A pesar de que la técnica finalmente se pudo realizar sin mayor dificultad, cabe discutir la posibilidad de realizar una isquemia portal delimitada únicamente al LLI o que englobe el LLI y LM por completo; siendo probablemente un método más fácil de llevar a cabo sin grandes diferencias en el resultado final.

De resultados obtenidos en ratas de mayor edad y peso, no expuestos en esta memoria y publicados en trabajos previos por nuestro mismo grupo de investigación[104], se deduce que la división lobular e hiliar adquiere una diferenciación más evidente en ratas de mayor tamaño, lo que debe de facilitar la ligadura individualizada de los lóbulos hepáticos en la rata.

Para poder defender la eficacia de la técnica y la fiabilidad de los resultados, en los siguientes apartados se analiza la función hepática tras la ligadura.

Valoración de la función hepática

Una de las grandes limitaciones de la cirugía hepática es la operabilidad del paciente, determinada por la viabilidad y funcionalidad del remanente hepático postquirúrgico[56].

Como parámetros básicos con los que valorar la función hepática hemos medido la glucosa y la albúmina, además de la bilirrubina sérica. También intentamos medir la actividad de los factores de coagulación a través del tiempo de protrombina por medio de un medidor del Ratio Internacional Normalizado (INR), sin llegar a obtener resultados medibles, por lo que finalmente no se prosiguió con su análisis.

Los niveles basales de glucosa en la rata de laboratorio descritos en la bibliografía son de 70-208 mg/dL[106]. Por lo tanto, todos los valores hallados en nuestros sujetos de experimentación se encuentran dentro de lo que podemos denominar rango de normalidad. De hecho, nuestro valor más bajo (que se registró en el grupo de ácido fólico: 156 mg/dL) se encuentra muy lejos del mínimo aceptado como normal. Y lo mismo ocurre con nuestro valor más alto (que se registró en el grupo de ácido fólico + 5-fluorouracilo: 164 mg/dL) que está muy por debajo del límite superior del rango aceptado.

Durante el proceso de regeneración hepática el hígado trata de suplir las necesidades corporales energéticas a través de la gluconeogénesis[85]. Una insuficiencia hepática fulminante conllevaría una hipoglucemia aguda-subaguda de difícil control.

Además, si la función hepática se hubiera visto afectada, los niveles séricos de bilirrubina total hubieran ascendido sobre los valores de referencia, 0,05-0,15 mg/dL / 0,86-2,57 µmol/L[106]. Durante nuestro trabajo los niveles de bilirrubina total se mantuvieron inferiores a < 0,2 mg/dL o 3,42 µmol/L, sin existir diferencias entre las diferentes ramas a estudio. La limitación de nuestro laboratorio para obtener niveles inferiores impide analizar variaciones más sutiles, no obstante, la ausencia de elevaciones sobre el límite superior estipulado defiende una correcta función hepática.

Estudios previos de ligadura portal en ratas describen niveles de bilirrubina inferiores a 1,71 µmol/L o 0,10 mg/dL al primer día postoperatorio[100,103], coincidiendo con los obtenidos por nuestro grupo. Sin embargo, el pico de bilirrubina, en ambos trabajos, se describe a las 72 horas tras la cirugía, siendo éste igual o inferior a 2,57 µmol/L o 0,15 mg/dL.

La precocidad en la obtención de las muestras para nuestro análisis sanguíneo, a pesar de no discrepar con los hallados en la bibliografía, obliga a analizar los resultados con cautela. Poder asegurar una bilirrubina dentro de los rangos de normalidad pasadas las 36 horas podría resultar interesante en estudios sucesivos.

Por último, y tal como se ha mencionado previamente, el hígado dirigirá su anabolismo hacia el metabolismo glucídico[85], por lo que una agresión hepática severa disminuiría los niveles de producción proteíca[124]. Los rangos habituales descritos para albúmina son de 3,4-4,8 g/dL[106], siendo la media de nuestro estudio de 3,67 g/dL. Llama la atención la diferencia significativa hallada entre el grupo de ácido fólico y el de ácido fólico + 5-Fluorouracilo, siendo de 3,42 mg/dL y de 3,84 mg/dL respectivamente. A pesar de que ambos valores se encuentran dentro de los rangos de normalidad, un proceso de regeneración intenso significaría un estrés celular mayor. Lejos de la hipoproteinemia que conllevaría un fallo hepático severo, la disminución objetivada en el grupo con ácido fólico podría ser compatible con una mayor regeneración hepática.

Objetivación del sufrimiento hepático

El hígado es un órgano intensamente vascularizado, llegando a albergar un tercio de todo el gasto cardíaco. De todo el flujo sanguíneo que recibe, un 20-25% procede de la arteria hepática, mientras que un 75-80% del flujo portal. Considerando que la sangre venosa aporta menos cantidad de sangre oxigenada, el aporte de oxígeno procede de ambos sistemas sanguíneos a partes iguales.

El flujo portal variará según el retorno venoso esplácnico, pudiendo ser mayor o menor según la sangre que reciba desde en tracto gastrointestinal. Ello obligará a una compensación del riego arterial para mantener un flujo sanguíneo constante a nivel de los sinusoides hepáticos. Dicha respuesta se conoce como "Respuesta Compensadora de la Arteria Hepática" o "Hepatic Arterial Buffer Response" (HABR)[110,111,133]. De esta manera, la variación en el flujo arterial garantizará una oxigenación mínima del parénquima hepático. Esto se traduce en una isquemia sin necrosis tras la oclusión portal; y la posterior atrofia cursa igualmente sin necrosis.

Por otro lado, existe bibliografía que correlaciona los niveles de enzimas de citólisis con un mayor o menor grado de daño tisular; por lo que a mayor isquemia, mayor necrosis y citólisis. Así pues, las enzimas de citólisis serán un marcador fidedigno del sufrimiento hepático.

Parámetros de Citólisis

El valor de las enzimas de citólisis y colestasis, mayor o menor según el daño celular ejercido, da información certera sobre el grado de daño orgánico impuesto. Para nuestro trabajo hemos optado por analizar tanto la GPT como la GOT, ya que la variación individual de los niveles de cada una de ellas, amén de su relación fraccional, aporta información crucial sobre el estado funcional del hígado.

Dentro de las enzimas de colestasis hemos cuantificado la FA. También intentamos la medición de gamma glutamil transpeptidasa (GGT), pero resulto técnicamente imposible en las muestras de suero extraídas. La GGT es una enzima con gran afinidad por las proteínas séricas, adhiriéndose a ellas y disminuyendo su fracción libre. La escasa cantidad de suero obtenido, asociado a su manipulación y centrifugación, dificultó su medición. Por otra parte, también es posible que exista una diferencia entre la GGT murina y la humana, que impidan el correcto funcionamiento de los analizadores que hemos empleado. O quizás sea una combinación de ambas cuestiones.

Transaminasas

Los valores habituales para ratas de laboratorio (Rattus Norvegicus Albinus-Rata Wistar) de GOT y GPT son de 74-143 U/L y de 18-45 U/L respectivamente[106]. En nuestro laboratorio los valores de referencia hallados han sido algo diferentes de lo expuesto en la literatura. Así el valor medio para la GOT encontrado en ratas no tratadas (33,7 U/L) se sitúa por debajo del margen inferior de referencia. En cambio, en el caso de la GPT, los valores hallados en los animales de nuestro laboratorio (52.2 U/L) superaron los valores considerados como normales. Una alimentación diferente, disparidades en las condiciones de mantenimiento de las ratas y/o cualquier estresante que afectara al animal podrían explicar la disparidad de valores. No obstante, para la sucesiva discusión consideraremos como basales los valores obtenidos en nuestras ratas.

Durante el estudio actual los resultados de enzimas de citólisis para el grupo control (operado, no tratado) fueron 15,7 veces superiores a los basales (819 ± 432 U/L) para la GPT y 25,4 veces (857 ± 441 U/L) para la GOT. Los valores más elevados se hallaron en el grupo de ácido fólico, con unos valores de GPT 24,1 veces superiores a los basales (1260 ± 542 U/L) y 41,1 veces (1385 ± 618 U/L) en el caso de la GOT. Estos resultados se asemejan a los descritos en la literatura.

Héctor M. et al[100] en su artículo original del "Desarrollo de un modelo experimental de ligadura portal asociada a transección parenquimatosa (ALPPS) en ratas" realizaron una ligadura portal del lóbulo medio con transección hepática del parénquima circundante al mismo, y extracciones sanguíneas los días 1, 3, 7 y 14. A las 24 horas obtuvieron los valores más elevados de enzimas de citólisis: 888 ± 700 U/mL para la GPT y 1422 ± 808 U/mL para la GOT.

Por otro lado, Kawaguchi et al[103] obtuvieron resultados en torno a 500-750 U/L para la GPT y 750-1000 U/L para la GOT. Estos resultados se incrementaron 5 veces al asociar una oclusión venosa suprahepática a la ligadura portal.

Con una técnica quirúrgica similar, aunque con un modelo de isquemia portal inferior al 40%, nuestro grupo ha objetivado valores de enzimas de citólisis 16 veces y 8,5 veces

superiores a los niveles de referencia (546 ± 145 U/L para la GPT y 443 ± 108 U/L para la GOT), obtenidas a las 36 horas de la intervención[104]. Una vez administrado el ácido fólico, los valores disminuyeron a 9,4 veces y 5,8 veces por encima de los valores basales.

Tratando de entender la disparidad de resultados, cabe mencionar por un lado que los porcentajes de isquemia portal en cada trabajo fueron diferentes. No obstante, en el trabajo de Kawaguchi et al[103] los autores procedieron a realizar un 90% de isquemia portal, obteniendo resultados ligeramente menores a los hallados durante nuestro estudio.

A nivel técnico, durante nuestro trabajo, realizamos alguna modificación a los procedimientos quirúrgicos descritos en la literatura. Con objeto de conseguir una isquemia mayor y que afectara parcialmente al lóbulo mediano (a su segmento izquierdo), la ligadura portal se realizó más proximal al hilio hepático. Para facilitar dicho proceso, al igual que describen en su artículo Héctor M. et al[100], se seccionó el ligamento falciforme; lo que facilita la evisceración completa del hígado, eversión de los lóbulos (LLI y LP) y exposición del hilio hepático y sus ramas. Dicho proceso de eversión supuso una compresión parcial y temporal del flujo suprahepático. El tiempo quirúrgico durante el cual el hígado permaneció eviscerado, luxado y con compresión temporal del retorno venoso suprahepático fue de 30-40 minutos, pudiendo explicar un sufrimiento hepático mayor y una elevación de las enzimas de citólisis. Defensa de dicha hipótesis es la elevación significativa hallada por Kawaguchi et al[103] en su rama con ligadura suprahepática.

No podemos obviar el hecho de que las técnicas de Héctor M. et al[100] y Kawaguchi et al[103] no fueron idénticas a la nuestra, asociando una partición hepática en uno de ellas y una oclusión venosa suprahepática en la otra. Sin embargo, en ambos estudios los resultados de enzimas de citólisis fueron similares a las que obtuvimos nosotros.

Todo ello hace suponer que probablemente el cambio de la técnica quirúrgica, independientemente al grado de isquemia realizado, podría ser causa de la leve disparidad de los resultados. Por otro lado, la similitud de los valores hallados con

respecto a estudios previos con ligadura portal en ratas sugiere que la técnica y el procedimiento quirúrgico usado no añadió un sufrimiento mayor al esperado, aportando validez externa a los resultados.

Significado de la Fracción GOT/GPT en nuestro modelo

Los valores de las enzimas de citólisis alcanzados durante este trabajo fueron similares para la GOT y la GPT, patrón que se repite a lo largo de todas las ramas de estudio (no se llegó a superar el valorar fraccional de 1,1 en ninguno de los grupos).

Existen patrones que correlacionan los niveles séricos de enzimas de citólisis y su fracción con diversos tipos de hepatopatía no vírica[109]. En general, la relación entre ambas enzimas suele alcanzar un valor numérico de 1, cuyo ascenso y/o descenso representa una patología hepática específica[109]. En pocos trabajos se habla de la fracción entre GOT/GPT, siendo muy escasos los estudios en modelos experimentales que expongan sus resultados de citólisis de manera fraccional. En su trabajo de 1980, Ludwig S. y Kaplowitz N.[107], estudiaron la funcionalidad hepática en hígados murinos con deficiencia de piridoxina tras un estímulo hepatotóxico con bromobenceno, reportando los niveles de enzimas de citólisis y su fracción. Lejos de correlacionar sus resultados con los nuestros, la fracción entre GOT/GPT que hallaron en su grupo control fue ligeramente superior a 1. De la misma manera, el valor obtenido en ratas a las que nuestro grupo en estudios previos ha realizado una ligadura portal ha sido de 1,55 (DS ± 0,13)[104].

En otros trabajos en los que se ha realizado una ligadura portal[100,103], y/o en los que se hayan expuesto valores basales de enzimas de citólisis[106], la relación entre ambas parece alcanzar un valor comprendido entre 1,5-2; sin embargo, la falta de conocimiento individualizado de todos los resultados hace que esa estimación sea aproximada. De esta manera, y basándonos en estudios previos, nuestro resultado actual muestra similitudes con lo expuesto en la bibliografía[106], y además, asemeja valores de citólisis considerados como normales en el ser humano[106], por lo que podría interpretarse que la agresión quirúrgica llevada a cabo durante este estudio no ha precipitado un patrón de citólisis aberrante.

Cabe mencionar por otro lado que la elevación paralela de ambas enzimas puede estar en relación a un proceso isquémico hepático y/o de Shock Hepático. En dicho caso se podría llegar a objetivar una elevación 50 veces superior sobre los valores normales de ambas enzimas[133].

No obstante, los valores individuales de citólisis hallados parecen estar dentro de los rangos de normalidad expuestos por otros autores[99, 100, 102], habiendo descrito valores llamativamente superiores al haber realizado modificaciones a la misma técnica[103]. Además, el hecho de haber administrado moléculas con un potencial regenerativo supuesto, exige suponer un mayor proceso de renueva celular y de demanda sanguínea, pudiendo explicar un ambiente de mayor carácter isquémico que explique nuestros resultados. De hecho, los mayores valores para enzimas de citólisis se hallaron en el grupo con ácido fólico, molécula con una supuesta capacidad potenciadora de la regeneración hepática[98,104].

Por otro lado, una isquemia hepática global podría desencadenar una insuficiencia hepática fulminante[126]. Los resultados en nuestro estudio demuestran una correcta función hepática en las muestras sanguíneas, tal y como se menciona en el apartado anterior. No obstante, dichos resultados deben ser analizados con prudencia, habiendo sido recogidos en las primeras horas tras la intervención y sin haberse recogido valores de manera secuencial.

Estudio de la Colestasis

Durante este trabajo los valores de FA que se han obtenido entran dentro de los rangos considerados como normales, sin existir disparidades significativas entre los grupos a estudio. Para ratas Wistar de 8-16 semanas los valores no patológicos oscilan en torno a 62-230 U/L[106].

A pesar de que a nivel de los hepatocitos el aporte sanguíneo corra a partes iguales por el sistema arterial y venoso, a nivel del árbol biliar, el aporte sanguíneo procede principalmente de la arteria hepática[133]. Por lo que, atendiendo a los niveles de

bilirrubina y de FA hallados, no existen datos objetivos que defiendan un daño del árbol biliar, deduciéndose un correcto aporte arterial y una ausencia de necrosis tisular.

Análisis de los resultados

Una vez validado el proceso de ligadura portal y la consistencia de nuestros resultados, en los siguientes apartados se discute la confirmación de nuestra hipótesis.

A continuación se debatirán secuencialmente los resultados biométricos y de crecimiento hepático, para finalmente hablar de los cambios a nivel nuclear e histológico.

Datos biométricos

En este apartado se analizan los datos de peso corporal y hepático; además de los pesos de cada lóbulo.

Peso corporal

Según nuestro modelo experimental, el estrés inducido a la rata deberia haber supuesto un catabolismo aumentado y una disminución del peso inicial del animal.

En ese sentido, como cabría esperar, la pérdida de peso a las 36 horas se apreció en todas las ramas a estudio, con una disminución media en gramos de 5,02 (2,05% del peso medio); a pesar de haber administrado una dieta tipo “Pellet” común desde el postoperatorio inmediato.

Esa pérdida fue significativamente mayor en los grupos con ácido fólico, tanto en el grupo con ácido fólico único, como en el grupo en el que se combinó ácido fólico con 5-fluororuracilo. La evolución ponderal (% respecto peso inicial) de los animales en los grupos con ácido fólico fue comparativamente inferior a la objetivada en el resto de las ramas.

Comparando estos resultados con los descritos en la bibliografía, llama la atención que en el grupo de Héctor et al[100] la mayor pérdida porcentual se objetivara al tercer día de la intervención, siendo está superior al 10% de media. Higgins y Anderson[67], en su modelo de hepatectomía murina, describieron el acmé de la pérdida de peso a los 8-10 días, tanto para ratas con laparotomía en blanco como para aquellas con hepatectomía asociada. Los resultados en el estudio de Higgins y Anderson[67] se exponen de manera secuencial, coincidiendo con una pérdida de entorno al 10% al tercer día en ratas hepatectomizadas, y siendo del 5-10% a las 36-48 horas.

Estos datos critican la precocidad de nuestros resultados, pudiendo haber apreciado mayores diferencias a lo largo del tiempo, sin poder aseverar un patrón paralelo al visualizado en las primeras 36 horas.

No obstante, el hecho de que la pérdida en las primeras horas fuera significativamente mayor en el grupo de ácido fólico podría sugerir un estrés postquirúrgico y una pérdida de masa magra mayor. Estos resultados coinciden con los apreciados en las bioquímicas, habiéndose objetivado en la rama de ácido mayor desnutrición proteica.

De la misma manera, un proceso regenerativo intenso exigiría un aporte nutricional con requerimientos metabólicos mayores. A pesar de no existir literatura que lo refrende, la diferencia en la pérdida de peso nos hace pensar podría ser debido una proliferación hepatocitaria mayor.

Tras una agresión quirúrgica el balance metabólico se decantará hacia un ambiente catabólico. En este sentido, el hígado tratará de mantener los niveles glucídicos a expensas de la gluconeogénesis. No obstante, la suelta catecolaminérgica que se objetiva tras una intervención quirúrgica, conllevará una resistencia periférica a la insulina y a un requerimiento energético inmediato. Esto producirá inicialmente un aumento de lipogénesis corporal, que rápidamente dará paso a la proteolisis. De hecho, un rasgo distintivo de la desnutrición postquirúrgica será la merma de la masa magra corporal.

Un proceso de inflamación perpetuado se traducirá en una dificultad de asimilación de las calorías alimentarias, es decir, en una incapacidad del aparato gastrointestinal para absorber los nutrientes alimentarios. Todo ello hará que el estado catabólico postquirúrgico sea difícilmente reversible a través de un aporte nutricional normal.

Peso hepático

En nuestro trabajo el mayor peso hepático se halló en el grupo tratado con 5-FU+Fo (8,19 ± 0,87 gramos); el menor, por otro lado, en el grupo tratado con ácido fólico (6,21 ± 0,2 gramos). Sin embargo, estos resultados son poco representativos, dado que en el grupo con ácido fólico las ratas a estudio tenían un peso corporal medio menor que en el resto de los grupos. Resulta lógico pensar que a menor peso corporal, el peso hepático también será menor; controlado según el índice de regulación hepatoestática.

En modelos de hepatectomía experimental en ratas la recuperación del 100% del peso hepático se obtiene a las 2-3 semanas[67]. En modelos de ligadura portal, los lóbulos hepáticos no ligados obtienen un crecimiento en meseta a las 120-180 horas[102], es decir, a los 5-7 días; a pesar de que el mayor índice mitótico se alcance a las 36 horas[103,104].

En la bibliografía generalmente solo se expresa la diferencia de peso hallada entre las diferentes ramas a estudio[99], sin detallar el peso absoluto hepático de cada grupo. De hecho, en la mayoría de los trabajos se correlaciona dicho peso con el peso corporal total del animal, según el índice hepatoestático. De esta manera, poca información se puede inferir del peso absoluto hepático sin correlacionarlo con el peso corporal de la rata.

Índice de regulación hepatoestática

Durante el proceso de regeneración hepática el crecimiento del hígado estará rigurosamente controlado por medio de la "regulación hepatoestática"[75,76,77], característica regenerativa por la cual el hígado crecerá hasta representar el 2,5% del peso corporal en el humano. Es por ello que exige prudencia el análisis entre grupos del peso hepático total, ya que dependerá mucho del peso de cada animal.

Examinando los resultados obtenidos del ratio peso hígado/cuerpo, cabe mencionar no obstante, que los datos hallados se asemejan mucho a lo objetivado con los pesos absolutos hepáticos. El grupo con mayor relación porcentual fue el de Fo +5-FU seguido del grupo de 5-FU; resultando ambos significativamente mayores respecto al grupo de ácido fólico. Todos los resultados fueron inferiores a lo esperado como normal[67]. Esto probablemente sea debido a que en modelos de ligadura portal los lóbulos hepáticos no ligados adquieren su mayor crecimiento a las 120-180 horas[102].

En la rata de experimentación, Higgins y Anderson[67] describieron un ratio de 3,58% en animales de 125-225 g. En nuestros grupos control hallamos valores de 3,42% con pesos de 226 g y 3,47% con 253 g. A pesar de que en nuestro laboratorio a mayor peso corporal el ratio ascendiera ligeramente, según lo expuesto en la bibliografía, el ratio tiende a disminuir a mayor peso del animal, obteniendo valores similares al del humano[112]. Piao et al[113] han llegado a describir un porcentaje peso hígado/cuerpo de 2,5% con ratas de 470 g.

A pesar de que dichos resultados defienden un incremento de masa hepática en los grupos con 5-FU respecto al resto, esto no tiene necesariamente porque suponer un proceso regenerativo mayor. Cuando Higgins y Anderson[67] estudiaron el proceso de regeneración hepática, apreciaron que además de la mitosis celular, en los 2-3 primeros días tras una hepatectomía segmentaria, el hígado aumentaba de peso a través del incremento congestivo del parénquima residual. Por lo que, una regeneración celular mayor, sin un incremento congestivo asociado, podría arrojar valores de peso inferiores.

Peso por lóbulos

En el siguiente apartado se discute la hiperplasia de los lóbulos no sometidos a ligadura portal.

Distribución normal

En los estudios anatómicos del hígado de la rata[65,67], el porcentaje de masa descrito para cada lóbulo es el siguiente: lóbulo mediano 30%, lóbulo lateral izquierdo 40%, lóbulo

lateral derecho 20% y lóbulo caudado 10%. Según esta distribución, durante nuestro procedimiento se habría realizado una isquemia portal del 50-55%.

Al analizar los pesos de los lóbulos sometidos a una ligadura portal de ratas control, llamó la atención que en discordancia con los volúmenes citados, los pesos hallados para ratas Wistar (Rattus Norvegicus, cepa WAG/RijHsd) de 3-4 meses de edad con un peso de 223-253 g fue del 44%. De hecho, el porcentaje en masa para cada lóbulo hepático para ratas de 226 g hallado en nuestro laboratorio fue el siguiente: 34,21% para el lóbulo paramediano, del 32,87% para el lóbulo lateral izquierdo, 20,80% para el lóbulo lateral derecho y del 12,12% para el lóbulo caudado. No se puede obviar que la diferente alimentación y/o la cepa animal empleada podría ser la explicación para todo esto.

Estos resultados difieren ligeramente de lo expuesto por Higgins y Anderson[67], no obstante, son porcentajes similares a los hallados por otros autores[64,65]. Por otro lado, a mayor edad y peso de las ratas, la división lobular adquiere una diferenciación más evidente[104]; lo que probablemente acabé por asentar volúmenes lobares similares a los descritos en la literatura[67].

Para sucesivas descripciones y su entendimiento, habrá que suponer que la isquemia realizada fue inferior al 50%.

Grupos de estudio

Al igual que ocurría con el peso absoluto hepático, la tendencia por cada lóbulo fue similar, pudiéndose objetivar una masa mayor en los lóbulos en los que se utilizó 5-FU.

No obstante, llama la atención lo del lóbulo paramediano o central derecho, ya que en este caso el peso hallado entre los grupos fue similar sin arrojar grandes diferencias. Cabe mencionar que, asemejando el hígado humano, éste lóbulo presenta una pequeña conexión parenquimatosa con el lóbulo paramediano o central izquierdo. La atrofia del LMI podría haber estado parcialmente mitigada por el aporte sanguíneo recibido a través del LMD.

Cierto es que Sakai N. et al[99] encontraron que tanto en el lóbulo con isquemia portal como en los que recibieron un hiperaflujo, la cascada de citocinas y de moléculas proinflamatorias asciende; siendo más llamativo en los lóbulos isquémicos. De este hecho se puede inferir que la existencia de un aporte sanguíneo supletorio a nivel del LMI podría disminuir la intensidad del ambiente regenerativo; resultando en una menor atrofia éste, con una inferior hiperplasia paralela de su lóbulo homólogo.

Por otro lado, el crecimiento en los lóbulos restantes fue comparativamente mayor, protagonizado principalmente por el lóbulo lateral derecho. Esto es fácilmente explicable al entender que en ausencia de los lóbulos lateral izquierdo y paramediano, el lóbulo lateral derecho será el predominante y de mayor tamaño; obligado a crecer y suplir las exigencias corporales.

Aceptando dicha hipótesis, y como viene siendo una constante, la rama en la que mayor crecimiento se vio fue a la que se administró 5FU + Fo. No obstante, tal y como se ha mencionado previamente, es necesario correlacionar dicho crecimiento con las características histológicas del parénquima, ya que un crecimiento a expensas de un proceso congestivo mayor podría arrojar resultados que fueran poco representativos de la funcionalidad del parénquima.

De hecho, existen estudios[28,42] que han correlacionado la esteatosis hepática con el uso del 5-fluorouracilo, pudiendo explicar un aumento de masa hepática al haber aumentado el componente graso del parénquima. Si esto fuera así, a pesar de tener mayor peso hepático, el hígado residual podría tener una peor función.

Por otro lado, el crecimiento hallado con el grupo de 5-FU fue mayor siempre que a éste se la añadiera ácido fólico. El ácido fólico ha sido usado en estudios previos obteniendo resultados que pudieran sugerir un aumento de regeneración hepática[98], por lo que, a pesar de no haber obtenido significación estadística, la tendencia objetivada entre las ramas de 5-FU y 5-FU + Fo, a favor de ésta última, podría defender una respuesta proliferativa mayor al haberle añadido ácido fólico.

Morfología celular

Para analizar la regeneración hepática que obtuvimos en nuestros grupos, se procedió a calcular el área nuclear y el número de núcleos. El área nuclear se usó como indicador indirecto de la poliploidia celular reportada en la regeneración hepática[75,93,94,95], y el número de núcleos como símbolo de mitosis y proliferación hepatocitaria.

Proliferación celular

En modelos murinos de ligadura portal, el proceso de regeneración hepática expuesto parece tener un pico de proliferación celular a las 36 horas[103,104]. Estudios en modelos de hepatectomía mayor en ratas infieren que a las 24 horas se da un incremento en la síntesis de DNA, entrando en mitosis a las 48 horas[75].

Durante dicho proceso de síntesis de DNA y de mitosis, los hepatocitos en fase quiescente entrarán nuevamente en su ciclo celular, dando como resultado células poliploides, mayoritariamente mononucleadas[75,94,95]. De este hecho se puede deducir que un proceso de regeneración intenso arrojará un área nuclear mayor, además de un aumento cuantitativo en el número de hepatocitos.

En nuestro experimento, la extracción de los hígados se realizó a las 36 horas tras la realización de la ligadura portal, con objeto de obtener una muestra representativa de del proceso de proliferación celular.

Área nuclear

La medición del área nuclear de los hepatocitos arrojó resultados a favor del uso del ácido fólico. La media del área nuclear al añadir ácido fólico fue significativamente mayor en comparación con el resto de los grupos (121 ± 5,24 μm^2).

El uso del 5-FU por otro lado, y en defensa de nuestra hipótesis inicial, disminuyó de media el área nuclear hepatocitario. Resulta interesante puntualizar que la asociación de ácido fólico al 5-FU aumento el área nuclear, con valores que se asemejan a los hallados en el grupo control y que podrían sugerir un proceso de regeneración parejo al existente en hígados en ausencia de quimioterapia.

En trabajos previos publicados por nuestro mismo grupo de investigación, Portugal et al[98] demostraron el efecto hepatotrófico del ácido fólico en un modelo de hepatectomía mayor en ratas. No resulta raro pensar que dichos resultados pudieran ser reproducibles en otros modelos de regeneración hepática, a pesar de que existiera una agresión tisular diferente.

De hecho, en estudios posteriores realizados en modelos de ligadura portal[104], los resultados arrojaron un valor a favor de la regeneración hepática al administrar ácido fólico a los animales de investigación. En este trabajo, la poliploidía celular se analizó por medio del aumento en el área nuclear de los hepatocitos, siendo ésta estadísticamente superior 36 horas después de la administración de ácido fólico. De dicho trabajo también obtuvimos la media basal del área nuclear hepatocitaria sin estímulos regenerativos, 43 ± 16 μm^2. A lo largo de nuestro trabajo, los resultados hallados fueron superiores a dos veces dicho valor tras la ligadura portal (111 ± 4,41 μm^2); y prácticamente se triplicó al añadir ácido fólico (121 ± 5,24 μm^2).

Esto trae consigo una discusión interesante, pudiendo significar que la asociación de ácido fólico a la quimioterapia con 5-fluorouracilo podría resultar en una regeneración hepática similar a la que se obtiene tras una cirugía hepática. El 5-FU es un quimioterápico con acción probada frente a la célula del CCR[6,9,30], por lo que probar que no afecta la regeneración hepática al asociarlo al ácido fólico y/o leucovorina (asociación con efecto quimioterápico probado[6,9,31]), podría traer implicaciones prometedoras para la terapéutica multidisciplinar de la metástasis del CCR. De hecho, podría facilitar escenarios en los que se administrase quimioterapia precozmente tras la cirugía, sin afectar al proceso de regeneración hepático.

Existen trabajos que han demostrado que la célula tumoral residual prolifera durante la regeneración hepática[43,99]. El control de las micrometástasis inadvertidas al añadir quimioterapia podría traer mayor eficacia a los tratamientos oncológicos del CCR.

Mitosis celular

La suma total de núcleos en 100 μm^2 de muestra histológica mostró valores a favor de la aplicación del ácido fólico. El contaje de núcleos en la rama de ácido fólico (24,4 ± 6,20 núcleos) fue significativamente mayor que en el grupo control y que en el grupo con 5-FU.

Por otro lado, la asociación del ácido fólico a la rama con 5-FU aumento la mitosis celular en un 39,10% (21.7 ± 6,84 núcleos) respecto al grupo con 5-FU únicamente.

Todo esto, al igual que con el área nuclear, defiende que la asociación de ácido fólico al 5-fluorouracilo podría paliar el efecto antiproliferativo del fármaco, sin afectar sobre la regeneración hepática y pudiendo mantener su capacidad antitumoral.

Existen trabajos[31] que defienden la necesidad de asociar folinato cálcico, leucovorina, al 5-fluorouracilo para intensificar su acción. En este contexto, la asociación de ácido fólico al 5-fluorouracilo afectaría a la duplicación del DNA y por tanto a la mitosis y proliferación celular, tanto a nivel tumoral como hepatocitario. No obstante, pendiente de probar nuestros resultados en futuros trabajos y en un modelo con células tumorales del CCR, la posible ventaja competitiva de la célula tumoral al obtener nutrientes, acompañado de un aumento en la dosis de leucovorina y/o asociación de ácido fólico, podría mantener el efecto antitumoral del fármaco a la par de estimular la regeneración hepática. Esta hipótesis se entiende al suponer una sobrecarga de ácido fólico que pudiera llegar tanto a la célula tumoral afecta por el 5-fluorouracilo como al hepatocito.

Sakai N. et al[99] en su trabajo sobre el crecimiento tumoral en un modelo de ligadura portal demostraron un crecimiento incrementado tumoral en los lóbulos ligados. Este hecho es lógico si se valora el proceso desde un punto de vista fisiológico, es decir, mientras que la célula hepática depende mayoritariamente del flujo sanguíneo portal, la célula tumoral dependerá del flujo arterial; por lo que, el ambiente proliferativo que se aprecia en el lóbulo atrófico supondrá una ventaja para la célula superviviente. Esta ventaja competitiva haría que la célula tumoral fuera la primera en captar también el 5-

fluorouracilo, dejando menor cantidad de fármaco para el resto de las células en proliferación. En resumen, obteniendo el objetivo antitumoral y proliferativo buscado.

Histología

Del análisis histológico de las muestras llamó la atención la tendencia que existió por objetivar focos de apoptosis en las ramas tratadas con ácido fólico, tanto en el grupo con ácido fólico como único fármaco, como en la rama con ácido fólico y 5-fluorouracilo.

La existencia de una mayor incidencia de muerte celular (apoptosis) con el ácido fólico defiende los niveles de citólisis observados durante el estudio. Sin embargo, a pesar del daño tisular que pudiera implicar dicha elevación enzimática, en ningún caso se objetivó una función hepática insuficiente; o dicho de otro modo, no existió isquemia con necrosis asociada.

Por otro lado, cabe recordar que las ramas con fólico fueron las que presentaron mayor índice mitótico y de área nuclear global. Probablemente, la apoptosis aislada existente se relacione con focos de mayor regeneración en el parénquima restante.

Si aceptamos la premisa de que el ácido fólico es un potenciador de la proliferación celular, demostrado en múltiples estudios y en el presente[98,104,116,117]; y que por el contrario, el 5-FU inhibe dicho crecimiento al anular la TYMS[30]; las diferencias histológicas halladas debieran ser consecuencia de dicho efecto. Es decir, la presencia de apoptosis en el grupo con Fo, y la ausencia de ella en el grupo con 5-FU; en correlación con los resultados obtenidos a nivel del recuento y del área nuclear, debieran insinuar un mayor estímulo regenerativo con el ácido fólico. De la misma manera, la presencia de apoptosis en el grupo de Fo+5-FU refrendaría dicho efecto proliferativo.

Cabe mencionar que la distribución de los parches de apoptosis siguió un patrón claro, restringiéndose al área centrolobulillar o perivenular (zona III). La zona I periportal, considerada la más vascularizada, se mantuvo íntegra y con imágenes histológicas de mitosis y regeneración intensa. Es lógico pensar que en un modelo de estrés inducido por isquemia hepática, un potente estímulo de regeneración podría producir un rápido crecimiento de los hepatocitos que más cantidad de oxígeno, nutrientes y ácido fólico

recibieran; es decir, aquellas células que se encontrasen cerca del flujo sanguíneo portal. La administración del ácido fólico fue intraperitoneal, por lo que el fármaco llego al hígado a través de la circulación portal. Existe bibliografía que defiende que la función de los hepatocitos difiere según en qué zona de lobulillo hepático se encuentren[120,121]. Además, parece que ésta función cambia en el hígado en regeneración; proceso en el que los hepatocitos del área intermedia y perivenular adquieren más función metabólica para compensar una proliferación intensa de los hepatocitos periportales[122,123]. Dicha alteración funcional parece que ocurre entre las 4-36 horas iniciales tras la lesión hepática[123], rango temporal que coincide con el del estudio actual.

Finalmente, debemos recordar que el modelo experimental en ratas nos facilita un ejemplo en el que representar un ambiente de estrés quirúrgico extremo. La regeneración hepática en la rata ocurre en horas y días[67,102,103,104]; mientras que la regeneración hepática en el humano se cuenta en semanas y meses. Dicho de otra manera, el estrés extremo del estímulo proliferativo ejercido sobre la regeneración de hígado murino, extrapolado al hígado humano; podría suponer una agresión más atenuada en tiempo, y por lo tanto, sin la consiguiente apoptosis celular.

.

CONCLUSIÓN

A continuación se enumeran las conclusiones que se pueden inferir de este estudio.

Del modelo de ligadura portal en rata se puede concluir que:

1. La ligadura portal produce una atrofia sin necrosis del parénquima ligado; además de una hipertrofia del parénquima no ligado.
2. Se trata de un modelo técnicamente reproducible y con resultados comparables.
3. La ligadura del 50% del hígado en la rata resulta segura tras 36 horas, sin afectar sobre la función hepática.

De los resultados obtenidos con las moléculas a estudio se puede concluir que:

1. El ácido fólico intraperitoneal, en un modelo de isquemia como el actual, aumenta la regeneración periportal, el número de mitosis y el área nuclear.
2. El 5-Fluorouracilo intraperitoneal, en un modelo de isquemia como el actual, disminuye el número de mitosis y área nuclear.
3. No se puede demostrar una proliferación predominantemente periportal al añadir 5-Fluorouracilo, aunque no puede excluirse un efecto distinto con dosis diferentes a las actuales.
4. La asociación del ácido fólico al 5-fluorouracilo, a las dosis y vía empleadas en este estudio, y en un modelo de ligadura portal del 50%, contrarresta el efecto deletéreo del 5-fluorouracilo sobre la regeneración hepática.
5. La asociación del ácido fólico al 5-fluorouracilo, a las dosis y vía empleadas en este estudio, y en un modelo de ligadura portal del 50%, aumenta el número de mitosis y el área nuclear.

ÍNDICE DE FIGURAS

1 El águila de Zeus comiendo el hígado de Prometeo, encadenado al monte Cáucaso 2
2 División hepática en ocho segmentos..... **5**
3 División hepática en 4 segmentos. Visión en proyección caudal del hígado murino .. **6**
4 Pedículo portal para Lóbulo Lateral Izquierdo y Lóbulo Paramediano Izquierdo..... **7**
5 Distribución funcional del acino hepático **8**
6 Transformación intracelular del folato **16**
7 Resección de una única lesión ocupante de espacio (LOE) (*Ilustración*). **18**
8 Partición hepática con ligadura portal (ALPPS) (*Ilustración*) **21**
9 Esquema de la regeneración hepatocitaria en un modelo murino **35**
10 Metabolismo celular del ácido fólico, distribuido por cada compartimento celular: citoplasmas, núcleo y mitocondria..... **39**
11 Cámara de inducción conectada a toma de gases e isofluorano **46**
12 Hilio hepático murino **47**
13 Pedículo portal para Lóbulo Lateral Izquierdo y Lóbulo Paramediano Izquierdo .. **48**
14 Microscopio quirúrgico Leica Wild M651 para microcirugía..... **49**
15 Hígado extraído 36 h tras la ligadura **50**
16 Microscopio Leica DMi1 conectado al ordenador para la obtención de las imágenes **55**
17 Secciones hepáticas teñidas con hematoxilina-eosina **55**
18 Secciones hepáticas teñidas con hematoxilina-eosina **56**
19 Peso final de los animales expresado en % respecto al peso inicial..... **59**
20 Peso del hígado extraído (expresado en g) **61**
21 Peso del hígado expresado en % del peso corporal **62**
22 Distribución del peso del hígado entre las partes sometidas a ligadura portal y con flujo portal mantenido..... **63**
23 Porcentaje del peso total del hígado que corresponde al parénquima sometido a ligadura portal selectiva **64**
24 Porcentaje del volumen hepático total correspondiente a cada uno de los lóbulos no sometidos a ligadura portal selectiva..... **66**
25 Grupo tratado con ácido fólico: porcentaje del volumen hepático total correspondiente a cada uno de los lóbulos no sometidos a ligadura portal selectiva .. **67**
26 Grupo tratado con 5-FU: porcentaje del volumen hepático total correspondiente a cada uno de los lóbulos no sometidos a ligadura portal selectiva..... **68**
27 Grupo tratado con ácido fólico y 5-FU: porcentaje del volumen hepático total correspondiente a cada uno de los lóbulos no sometidos a ligadura portal selectiva **.. 69**

28 Representación gráfica de los valores de glucosa en sangre por grupo **70**
29 Representación gráfica de los valores de albúmina en sangre por grupo **71**
30 Fosfatasa Alcalina en sangre por grupo **72**
31 GOT y GPT en sangre por grupo **73**
32 Recuento de núcleos en secciones histológicas (nº de núcleos/100µm2) **76**
33 Tamaño medio de los núcleos de cada grupo experimental **77**
34 Representación gráfica del % de individuos con apoptosis por grupo **81**
35 Imágenes histológicas con focos aislados de apoptosis **77**
36 Regeneración periportal en individuos tratados con Fo y sin Fo **78**

INDICE DE TABLAS

1 Toxicidad hepática de la quimioterapia **14**
2 Peso de los animales de los diferentes grupos experimentales **57**
3 Peso de los animales en el momento del sacrificio (g) **58**
4 Evolución ponderal de los animales del grupo Control (g) **58**
5 Evolución ponderal (% respecto peso inicial) **de los animales en los grupos experimentales** **59**
6 Peso del hígado en el momento del sacrificio (g) **60**
7 Peso del hígado como porcentaje respecto a peso corporal **61**
8 Porcentaje sobre el hígado total que corresponde a las zonas sometidas a ligadura portal selectiva **64**
9 Porcentaje sobre el hígado total que corresponde a cada uno de los lóbulos de los animales sometidos a ligadura portal selectiva (grupo control) **65**
10 Porcentaje sobre el hígado total que corresponde a cada uno de los lóbulos de los animales tratados con ácido fólico **66**
11 Porcentaje sobre el hígado total que corresponde a cada uno de los lóbulos de los animales tratados con 5-FU **67**
12 Porcentaje sobre el hígado total que corresponde a cada uno de los lóbulos de los animales tratados con 5-FU **68**
13 Niveles de glucemia en el momento del sacrificio (mg/dl) **70**
14 Albúmina sérica en el momento del sacrificio (mg/dl) **71**
15 Fosfatasa alcalina sérica en el momento del sacrificio (UI/l) **72**
16 GOT (AST) sérica en el momento del sacrificio (UI/l) **73**
17 GPT (ALT) sérica en el momento del sacrificio (UI/l) **74**
18 Relación GOT/GPT en el momento del sacrificio (UI/l) **74**
19 Recuento de núcleos en el parénquima hepático (nº de núcleos/100µm2) **75**
20 Tamaño medio de los núcleos medidos en los cortes estudiados **76**
21 Análisis histológicos de los hígados en el grupo control **78**
22 Análisis histológicos de los hígados en el grupo con ácido fólico **79**
23 Análisis histológicos de los hígados en el grupo con 5-Fluorouracilo **79**
24 Análisis histológicos de los hígados en el grupo ácido fólico + 5-Fluorouracilo **80**
25 Regeneración principalmente periportal en animales tratados con Fo frente a no tratados **82**

BIBLIOGRAFIA

1. Manterola C, del-Sol M, Ottone N, Otzen T. Anatomía Quirúrgica y Radiológica del Hígado. Fundamentos para las Resecciones Hepáticas. International Journal of Morphology. 2017;35(4):1525-1539.
2. Wood CB, Gillis CR, Blumgart LH. A retrospective study of the natural history of patients with liver metastases from colorectal cancer. Clin Oncol. 1976;2(3):285-288
3. Wagner J, Adson M, Van Heerden J, Adson M, Ilstrup D. The Natural History of Hepatic Metastases from Colorectal Cancer. Annals of Surgery. 1984;199(5):502-508.
4. Nikfarjam M, Shereef S, Kimchi E, Gusani N, Jiang Y, Avella D et al. Survival Outcomes of Patients with Colorectal Liver Metastases Following Hepatic Resection or Ablation in the Era of Effective Chemotherapy. Annals of Surgical Oncology. 2008;16(7):1860-1867.
5. Choti M, Sitzmann J, Tiburi M, Sumetchotimetha W, Rangsin R, Schulick R et al. Trends in Long-Term Survival Following Liver Resection for Hepatic Colorectal Metastases. Annals of Surgery. 2002;235(6):759-766.
6. D'Angelica M, Shoup M, Nissan A. Randomized Clinical Trials in Advanced and Metastatic Colorectal Carcinoma. Surgical Oncology Clinics of North America. 2002;11(1):173-191.
7. Rashidian N, Alseidi A, Kirks RC. Cancers Metastatic to the Liver. Surg Clin North Am. 2020 Jun;100(3):551-563. doi: 10.1016/j.suc.2020.02.005. Epub 2020 Apr 3. PMID: 32402300.
8. Kobuchi S, Ito Y, Sakaeda T. Population Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Modeling of 5-Fluorouracil for Toxicities in Rats. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics. 2016;42(4):707-718.
9. De Gramont A, Bosset J, Milan C, Rougier P, Bouché O, Etienne P et al. Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: a French intergroup study. Journal of Clinical Oncology. 1997;15(2):808-815.
10. Douillard J, Cunningham D, Roth A, Navarro M, James R, Karasek P et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. The Lancet. 2000;355(9209):1041-1047.
11. De Gramont A, Figer A, Seymour M, et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. J Clin Oncol. 2000;18(16):2938-2947. doi:10.1200/JCO.2000.18.16.2938
12. Goldberg R, Sargent D, Morton R, Fuchs C, Ramanathan R, Williamson S et al. A Randomized Controlled Trial of Fluorouracil Plus Leucovorin, Irinotecan, and Oxaliplatin Combinations in Patients With Previously Untreated Metastatic Colorectal Cancer. Journal of Clinical Oncology. 2004;22(1):23-30
13. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C et al. Phase III Trial of Infusional Fluorouracil, Leucovorin, Oxaliplatin, and Irinotecan (FOLFOXIRI) Compared With Infusional Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan (FOLFIRI) As First-Line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer: The Gruppo Oncologico Nord Ovest. Journal of Clinical Oncology. 2007;25(13):1670-1676.
14. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W et al. Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. New England Journal of Medicine. 2004;350(23):2335-2342.
15. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A et al. Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. New England Journal of Medicine. 2004;351(4):337-345.
16. Jonker D, O'Callaghan C, Karapetis C, Zalcberg J, Tu D, Au H et al. Cetuximab for the Treatment of Colorectal Cancer. New England Journal of Medicine. 2007;357(20):2040-2048.

17. Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B et al. Open-Label Phase III Trial of Panitumumab Plus Best Supportive Care Compared With Best Supportive Care Alone in Patients With Chemotherapy-Refractory Metastatic Colorectal Cancer. Journal of Clinical Oncology. 2007;25(13):1658-1664.
18. Van Cutsem E, Köhne C, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien C, Makhson A et al. Cetuximab and Chemotherapy as Initial Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. New England Journal of Medicine. 2009;360(14):1408-1417.
19. Mitry E, Fields A, Bleiberg H, Labianca R, Portier G, Tu D et al. Adjuvant Chemotherapy After Potentially Curative Resection of Metastases From Colorectal Cancer: A Pooled Analysis of Two Randomized Trials. Journal of Clinical Oncology. 2008;26(30):4906-4911.
20. Fong Y, Fortner J, Sun R, Brennan M, Blumgart L. Clinical Score for Predicting Recurrence After Hepatic Resection for Metastatic Colorectal Cancer. Annals of Surgery. 1999;230(3):309.
21. Engstrand J, Nilsson H, Strömberg C, Jonas E, Freedman J. Colorectal cancer liver metastases - a population-based study on incidence, management and survival. BMC Cancer. 2018 Jan 15;18(1):78. doi: 10.1186/s12885-017-3925-x. PMID: 29334918; PMCID: PMC5769309.
22. Bismuth H, Adam R, Lévi F, Farabos C, Waechter F, Castaing D et al. Resection of Nonresectable Liver Metastases from Colorectal Cancer After Neoadjuvant Chemotherapy. Annals of Surgery. 1996;224(4):509-522.
23. Adam R, Delvart V, Pascal G, Valeanu A, Castaing D, Azoulay D et al. Rescue Surgery for Unresectable Colorectal Liver Metastases Downstaged by Chemotherapy. Transactions of the Meeting of the American Surgical Association. 2004;CXXII(&NA;):242-256.
24. Adam R, Pascal G, Castaing D, Azoulay D, Delvart V, Paule B et al. Tumor Progression While on Chemotherapy. Annals of Surgery. 2004;240(6):1052-1064.
25. Clavien P, Selzner N, Morse M, Selzner M, Paulson E. Downstaging of hepatocellular carcinoma and liver metastases from colorectal cancer by selective intra-arterial chemotherapy. Surgery. 2002;131(4):433-442.
26. Elias D, Lasser P, Rougier P, Ducreux M, Bognel C, Roche A. Frequency, technical aspects, results, and indications of major hepatectomy after prolonged intra-arterial hepatic chemotherapy for initially unresectable hepatic tumors. J Am Coll Surg. 1995;180(2):213-219
27. Rubbia-Brandt L, Audard V, Sartoretti P, Roth A, Brezault C, Le Charpentier M et al. Severe hepatic sinusoidal obstruction associated with oxaliplatin-based chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. Annals of Oncology. 2004;15(3):460-466.
28. Parikh A. Perioperative complications in patients undergoing major liver resection with or without neoadjuvant chemotherapy. Journal of Gastrointestinal Surgery. 2003;7(8):1082-1088.
29. Fong Y, Bentrem D. CASH (Chemotherapy-Associated Steatohepatitis) Costs. Annals of Surgery. 2006;243(1):8-9.
30. Heidelberger C, Chaudhuri N, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L, Duschinsky R et al. Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds. Nature. 1957;179(4561):663-666.
31. Tsukihara H, Tsunekuni K, Takechi T. Folic Acid-Metabolizing Enzymes Regulate the Antitumor Effect of 5-Fluoro-2'-Deoxyuridine in Colorectal Cancer Cell Lines. PLOS ONE. 2016;11(9):e0163961.
32. Karoui M, Penna C, Amin-Hashem M, Mitry E, Benoist S, Franc B et al. Influence of Preoperative Chemotherapy on the Risk of Major Hepatectomy for Colorectal Liver Metastases. Annals of Surgery. 2006;243(1):1-7.
33. Nakano H, Oussoultzoglou E, Rosso E, Casnedi S, Chenard-Neu M, Dufour P et al. Sinusoidal Injury Increases Morbidity After Major Hepatectomy in Patients With Colorectal Liver Metastases Receiving Preoperative Chemotherapy. Annals of Surgery. 2008;247(1):118-124.
34. Heinrich S, Lang H. Liver metastases from colorectal cancer: Technique of liver resection. J Surg Oncol. 2013; 107:579-84
35. Pawlik TM, Scoggins CR, Zorzi D, et al. Effect of surgical margin status on survival and site of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases. Ann Surg 2005;241(5):715–22
36. Chakedis J, Schmidt C. Surgical Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. Surgical Oncology Clinics of North America. 2018;27(2):377-399.
37. Adam R, Hoti E, Bredt L. Oncosurgical strategies for metastatic liver cancer. Cirugía Española. 2011;89(1):10-19.

38. Petrowsky, H., Gonen, M., Jarnagin, W., Lorenz, M., DeMatteo, R., Heinrich, S., Encke, A., Blumgart, L. and Fong, Y., Second Liver Resections Are Safe and Effective Treatment for Recurrent Hepatic Metastases from Colorectal Cancer. Annals of Surgery, 2002 235(6), pp.863-871.
39. Adam R, Pascal G, Azoulay D, Tanaka K, Castaing D, Bismuth H. Liver resection for colorectal metastases: the third hepatectomy. Ann Surg. 2003;238:871–83
40. Adam R, Laurent A, Azoulay D, Castaing D, Bismuth H. Two stage hepatectomy: a planed strategy to treat irresecable liver tumors. Ann Surg. 2000;232:777–85.
41. Makuuchi M, Thai BL, Takayasu K, et al. Preoperative portal embolization to increase safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma: a preliminary report. Surgery. 1990;107(5):521-527.
42. Madoff DC, Abdalla EK, Vauthey JN. Portal vein embolization in preparation for major hepatic resection: evolution of a new standard of care. J Vasc Interv Radiol. 2005;16:779–90
43. García-Alonso I, Palomares T, Alonso A, Portugal V, Castro B, Caramés J, Méndez J. Effect of hepatic resection on development of liver metastasis. Rev Esp Enferm Dig. 2003 Nov;95(11):771-6, 765-70
44. Elias, D.; De Baere, T.; Roche, A; Mducreux; Leclere, J. & Lasser, P. During liver regeneration following right portal embolization the growth rate of liver metastases is more rapid than that of the liver parenchyma. Br. J. Surg.1999, 86(6):784-8.
45. Schlitt HJ, Hackl C, Lang SA. 'In-Situ Split' liver resection/ALPPS-historical development and current practice. Visc Med 2017;33:408-412
46. Baumgart J, Lang S, Lang H: A new method for induction of liver hypertrophy prior to right trisectionectomy: A report of three cases. HPB 2011;13(Suppl. 2):1–145.
47. Björnsson, B.; Sparrelid, E.; Hasselgren, K.; Gasslander, T.; Isaksson, B. & Sandström, P. Associating liver partition and portal vein ligation for primary hepatobiliary malignancies and non-colorectal liver metastases. Scand. J. Surg. 2016, 105(3):158-62.
48. Manterola, C. and Otzen, T., 2020. Asociación De Partición Hepática Y Ligadura Portal Para Hepatectomía Por Etapas (ALPPS).
49. Lang H, Baumgart J, Mittler J. Associated Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy (ALPPS) Registry: What Have We Learned?. Gut and Liver. 2020.
50. Fukami Y, Kurumiya Y, Kobayashi S. Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS): an analysis of tumor activity. Updates Surg. 2014;66(3):223-225. doi:10.1007/s13304-014-0256-1Pioug`9iugbvsfvs
51. Oldhafer KJ, Stavrou GA, van Gulik TM; Core Group. ALPPS: where do we stand, where do we go?: eight recommendations from the first international expert meeting. Ann Surg 2016;263:839-841.
52. Helling T. Liver failure following partial hepatectomy. HPB. 2006;8(3):165-174.
53. Huang J, Rudnick D. Elucidating the Metabolic Regulation of Liver Regeneration. The American Journal of Pathology. 2014;184(2):309-321.
54. Hammond JS, Guha IN, Beckingham IJ, Lobo DN. Prediction, prevention and management of postresection liver failure. Br J Surg. 2011;98(9):1188-1200. doi:10.1002/bjs.7630
55. Clavien PA, Oberkofler CE, Raptis DA, Lehmann K, Rickenbacher A, El-Badry AM. What is critical for liver surgery and partial liver transplantation: size or quality?. Hepatology. 2010;52(2):715-729.
56. Schindl MJ, Redhead DN, Fearon KC, Garden OJ, Wigmore SJ; Edinburgh Liver Surgery and Transplantation Experimental Research Group (eLISTER). The value of residual liver volume as a predictor of hepatic dysfunction and infection after major liver resection. Gut. 2005;54(2):289-296.
57. Brooks A, Hammond J, Girling K, Beckingham I. The Effect of Hepatic Vascular Inflow Occlusion on Liver Tissue pH, Carbon Dioxide, and Oxygen Partial Pressures: Defining the Optimal Clamp/Release Regime for Intermittent Portal Clamping. Journal of Surgical Research. 2007;141(2):247-251.
58. Ben-Porath I, Weinberg RA. When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. J Clin Invest. 2004;113(1):8-13.

59. Hessheimer AJ, Fondevila C, Taurá P, et al. Decompression of the portal bed and twice-baseline portal inflow are necessary for the functional recovery of a "small-for-size" graft. Ann Surg. 2011;253(6):1201-1210.
60. Vauthey JN, Pawlik TM, Ribero D, et al. Chemotherapy regimen predicts steatohepatitis and an increase in 90-day mortality after surgery for hepatic colorectal metastases. J Clin Oncol. 2006;24(13):2065-2072.
61. Antoniades CG, Berry PA, Wendon JA, Vergani D. The importance of immune dysfunction in determining outcome in acute liver failure. J Hepatol. 2008;49(5):845-861.
62. Demetris AJ, Seaberg EC, Wennerberg A, Ionellie J, Michalopoulos G. Ductular reaction after submassive necrosis in humans. Special emphasis on analysis of ductular hepatocytes. Am J Pathol. 1996;149(2):439-448.
63. Möller Bredo R, Vazquez Odo N. Anatomía del Hígado de la Rata Wistar (Rattus norvegicus). 76Int. J. Morphol.2011,29(1):76-79.
64. Aller MA, Lorente L, Prieto I, Moquillaza LM, Arias J. Hepatectomies in the rat: A look at the caudate process through microsurgery. Dig Liver Dis. 2009 Oct;41(10):695-9. doi: 10.1016/j.dld.2009.01.012. Epub 2009 Mar 3. PMID: 19261550.
65. Martins PN, Neuhaus P. Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. Liver Int. 2007 Apr;27(3):384-92. doi: 10.1111/j.1478-3231.2006.01414.x. PMID: 17355461.
66. Waynforth H, Flecknell P. Experimental and surgical technique in the rat. London: Academic Press; 1992.
67. Higgins G., Anderson R. Experimental Pathology of the liver. Restoration of the liver of de White Rat following partial surgical removal. Arch Pathol. 1931; 12:186-202.
68. Kurinna S, Barton MC. Cascades of transcription regulation during liver regeneration. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2011 Feb;43(2):189-197Vadevsavdaa
69. Palestino-Domínguez M, Clavijo-Cornejo D, Gutiérrez-Ruiz MC, et al. El factor de crecimiento de hepatocitos y su receptor C-MET en la protección contra el daño hepático inducido por el alcohol. Rev Educ Bioquimica. 2012;31(4):118-126
70. Shimabukuro R, Kawanaka H, Tomikawa M, Akahoshi T, Konishi K, Yoshida D et al. Effect of thrombopoietin on platelet counts and liver regeneration after partial hepatectomy in a rat model. Surgery Today. 2009;39(12):1054-1059.
71. Huang W, Ma K, Zhang J, et al. Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. Science. 2006;312(5771):233-236.
72. Kalinichenko VV, Major ML, Wang X, et al. Foxm1b transcription factor is essential for development of hepatocellular carcinomas and is negatively regulated by the p19ARF tumor suppressor. Genes Dev. 2004;18(7):830-850.
73. Ruderman NB, Xu XJ, Nelson L, et al. AMPK and SIRT1: a long-standing partnership?. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010;298(4):E751-E760
74. Chen L, Zhang W, Liang H, Zhou Q, Ding Z, Yang H et al. Activin A induces growth arrest through a SMAD- dependent pathway in hepatic progenitor cells. Cell Communication and Signaling. 2014;12(1):18.
75. Cienfuegos Javier A., Rotellar Fernando, Baixauli Jorge, Martínez-Regueira Fernando, Pardo Fernando, Hernández-Lizoáin José Luis. Regeneración hepática; el secreto mejor guardado: Una forma de respuesta al daño tisular. Rev. esp. enferm. dig. [Internet]. 2014 Mar [citado 2020 Sep 10] ; 106(3): 171-194
76. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. Hepatology. 2006;43(2 Suppl 1):S45-S53.
77. Michalopoulos GK. Principles of liver regeneration and growth homeostasis. Compr Physiol. 2013;3(1):485-513. Gbvrevberbe
78. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. Annu Rev Immunol. 1994;12:991-1045.
79. Leemans JC, Cassel SL, Sutterwala FS. Sensing damage by the NLRP3 inflammasome. Immunol Rev. 2011;243(1):152-162.
80. Mastellos D, Papadimitriou JC, Franchini S, Tsonis PA, Lambris JD. A novel role of complement: mice deficient in the fifth component of complement (C5) exhibit impaired liver regeneration. J Immunol. 2001;166(4):2479-2486.
81. DeAngelis RA, Markiewski MM, Kourtzelis I, et al. A complement-IL-4 regulatory circuit controls liver regeneration. J Immunol. 2012;188(2):641-648.

82. Nocito A, Georgiev P, Dahm F, Jochum W, Bader M, Graf R et al. Platelets and platelet-derived serotonin promote tissue repair after normothermic hepatic ischemia in mice. Hepatology. 2007;45(2):369-376.
83. Lesurtel M, Graf R, Aleil B, et al. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. Science (New York, N.Y.). 2006 Apr;312(5770):104-107.
84. Matondo, R., Punt, C., Homberg, J., Toussaint, M., Kisjes, R., Korporaal, S., Akkerman, J., Cuppen, E. and de Bruin, A. Deletion of the serotonin transporter in rats disturbs serotonin homeostasis without impairing liver regeneration. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2009 296(4), pp.G963-G968
85. Haber B, Chin S, Chuang E, Buikhuisen W, Naji A, Taub R. High levels of glucose-6-phosphatase gene and protein expression reflect an adaptive response in proliferating liver and diabetes. Journal of Clinical Investigation. 1995;95(2):832-841.
86. Huang W. Nuclear Receptor-Dependent Bile Acid Signaling Is Required for Normal Liver Regeneration. Science. 2006;312(5771):233-236.
87. Kalinichenko V. Foxm1b transcription factor is essential for development of hepatocellular carcinomas and is negatively regulated by the p19ARF tumor suppressor. Genes & Development. 2004;18(7):830-850.
88. Wang X, Krupczak-Hollis K, Tan Y, et al. Increased hepatic Forkhead Box M1B (FoxM1B) levels in old-aged mice stimulated liver regeneration through diminished p27Kip1 protein levels and increased Cdc25B expression. The Journal of Biological Chemistry. 2002 Nov;277(46):44310-44316.
89. Campbell J, Riehle K, Brooling J, Bauer R, Mitchell C, Fausto N. Proinflammatory Cytokine Production in Liver Regeneration IsMyd88-Dependent, but Independent ofCd14,Tlr2, andTlr4. The Journal of Immunology. 2006;176(4):2522-2528.
90. Moustakas A, Heldin C. The regulation of TGF signal transduction. Development. 2009;136(22):3699-3714.
91. Chen L, Zhang W, Liang H, Zhou Q, Ding Z, Yang H et al. Activin A induces growth arrest through a SMAD- dependent pathway in hepatic progenitor cells. Cell Communication and Signaling. 2014;12(1):18.
92. Jin J, Hong I, Lewis K, Iakova P, Breaux M, Jiang Y et al. Cooperation of C/EBP family proteins and chromatin remodeling proteins is essential for termination of liver regeneration. Hepatology. 2014;61(1):315-325.
93. Gentric G, Desdouets C. Polyploidization in liver tissue. Am J Pathol. 2014 Feb;184(2):322-31. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.06.035. Epub 2013 Oct 17. PMID: 24140012.
94. Wang MJ, Chen F, Lau JTY, Hu YP. Hepatocyte polyploidization and its association with pathophysiological processes. Cell Death Dis. 2017 May 18;8(5):e2805. doi: 10.1038/cddis.2017.167. PMID: 28518148; PMCID: PMC5520697.
95. Miyaoka Y, Ebato K, Kato H, Arakawa S, Shimizu S, Miyajima A. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. Curr Biol. 2012 Jul 10;22(13):1166-75. doi: 10.1016/j.cub.2012.05.016. Epub 2012 May 31. PMID: 22658593.
96. Bockhorn M, Frilling A, Benkö T, Best J, Sheu S, Trippler M et al. Tri-Iodothyronine as a Stimulator of Liver Regeneration after Partial and Subtotal Hepatectomy. European Surgical Research. 2007;39(1):58-63.
97. Kimura M, Moteki H, Uchida M, Natsume H, Ogihara M. L-ascorbic acid- and L-ascorbic acid 2-glucoside accelerate in vivo liver regeneration and lower serum alanine aminotransaminase activity in 70% partially hepatectomized rats. Biol Pharm Bull. 2014;37(4):597-603.
98. Portugal V, García-Alonso I, Méndez J. Hepatotrophic Effect of Folinic Acid in Rats. Journal of Surgical Research. 1996;61(2):527-530.
99. Sakai N, N Clarke C, Schuster R, Blanchard J, D Tevar A, Edwards M et al. Portal vein ligation accelerates tumor growth in ligated, but not contralateral lobes. World Journal of Gastroenterology. 2010;16(30):3816-26.
100. Héctor M. Almau Trenard, Luis E. Moulin, Juan M. Padín, Pablo Stringa, Gabriel E. Gondolesi, Pablo Barros Schelotto. Desarrollo de un modelo experimental de ligadura portal asociada a transección parenquimatosa (ALPPS) en ratas. Cirugía Española. 2014;92(10):676-681.

101. Chang-jun Jia, Hao Sun, Chao-liu Dai. Autophagy Contributes to Liver Regeneration After Portal Vein Ligation in Rats. Med Sci Monit. 2019; 25: 5674–5682.
102. Lauber DT, Tihanyi DK, Czigány Z, et al. Liver regeneration after different degrees of portal vein ligation. J Surg Res. 2016;203(2):451-458. doi:10.1016/j.jss.2016.03.032
103. Kawaguchi D, Hiroshima Y, Kumamoto T, et al. Effect of Portal Vein Ligation Plus Venous Congestion on Liver Regeneration in Rats. Ann Hepatol. 2019;18(1):89-100.
104. Gutierrez Saenz de Santa Maria J, Gutierrez Sanchez G, Garcia-Alonso I, Iturrizaga S, Mar Medina C, Herrero de la Parte B. Influence of folic acid on liver hypertrophy after selective portal ligature in laboratory rats. BJS. 2020; 107: 13-13.
105. Hessheimer AJ, Martínez de la Maza L, Adel Al Shwely F, Espinoza AS, Ausania F, Fondevila C. Somatostatin and the "Small-For-Size" Liver. Int J Mol Sci. 2019 May 22;20(10):2512. doi: 10.3390/ijms20102512. PMID: 31121844; PMCID: PMC6566601.
106. Giknis Mary L.A., Clifford Charles B. Clinicas Laboratory Parameters for Crl:WI (Han). Charles River. March, 2008.
107. Ludwig S, Kaplowitz N. Effect of pyridoxine deficiency on serum and liver transaminases in experimental liver injury in the rat. Gastroenterology. 1980;79(3):545-549.
108. Miyake S. The mechanism of release of hepatic enzymes in various liver diseases. II. Altered activity ratios of GOT to GPT in serum and liver of patients with liver diseases. Acta Med Okayama. 1979;33(5):343-358.
109. Mukai M, Ozasa K, Hayashi K, Kawai K. Various S-GOT/S-GPT ratios in nonviral liver disorders and related physical conditions and life-style. Dig Dis Sci. 2002;47(3):549-555. doi:10.1023/a:1017959801493.
110. Lautt WW: Role and control of the hepatic artery. In Lautt WW (eds): Hepatic circulation in health and disease. New York: Raven Press, 1981. pp. 203-226
111. Richter S, Vollmar B, Mücke I, Post S, Menger MD. Hepatic arteriolo-portal venular shunting guarantees maintenance of nutritional microvascular supply in hepatic arterial buffer response of rat livers. J Physiol. 2001;531(Pt 1):193-201. doi:10.1111/j.1469-7793.2001.0193j.
112. Leach KG, Karran SJ, Wisbey ML, Blumgart LH. In vivo assessment of liver size in the rat. J Nucl Med. 1975 May;16(5):380-5. PMID: 1194991.
113. Piao Y, Liu Y, Xie X. Change trends of organ weight background data in sprague dawley rats at different ages. J Toxicol Pathol. 2013 Mar;26(1):29-34. doi: 10.1293/tox.26.29. Epub 2013 Apr 22. PMID: 23723565; PMCID: PMC3620211.
114. Otte JM, Schmitz F, Kiehne K, Stechele HU, Banasiewicz T, Krokowicz P, Nakamura T, Fölsch UR, Herzig K. Functional expression of HGF and its receptor in human colorectal cancer. Digestion 2000; 61: 237-46
115. Gaub J, Iversen J. Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy. Hepatology. 1984 Sep-Oct;4(5):902-4. doi: 10.1002/hep.1840040519. PMID: 6383999.
116. Le Leu RK, Young GP, McIntosh GH. Folate deficiency reduces the development of colorectal cancer in rats. Carcinogenesis. 2000 Dec;21(12):2261-5. doi: 10.1093/carcin/21.12.2261. PMID: 11133816.
117. Power C, Rasko J. Whither Prometheus' Liver? Greek Myth and the Science of Regeneration. Annals of Internal Medicine. 2008;149(6):421.
118. Cole BF, Baron JA, Sandler RS, Haile RW, Ahnen DJ, Bresalier RS, McKeown-Eyssen G, Summers RW, Rothstein RI, Burke CA, Snover DC, Church TR, Allen JI, Robertson DJ, Beck GJ, Bond JH, Byers T, Mandel JS, Mott LA, Pearson LH, Barry EL, Rees JR, Marcon N, Saibil F, Ueland PM, Greenberg ER; Polyp Prevention Study Group. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial. JAMA. 2007 Jun 6;297(21):2351-9. doi: 10.1001/jama.297.21.2351. PMID: 17551129.
119. Passarelli MN, Barry EL, Rees JR, Mott LA, Zhang D, Ahnen DJ, Bresalier RS, Haile RW, McKeown-Eyssen G, Snover DC, Cole BF, Baron JA. Folic acid supplementation and risk of colorectal neoplasia during long-term follow-up of a randomized clinical trial. Am J Clin Nutr. 2019 Oct 1;110(4):903-911. doi: 10.1093/ajcn/nqz160. PMID: 31401653; PMCID: PMC6766439.
120. Garcia-Alonso I, Mendez J, Barbera-Guillem E. Changes in succinate dehydrogenase zonation following cyclosporin-treatment in normal and regenerating rat liver. Cell Mol Biol. 1988;34(6):605-14. PMID: 3219696.

121. James J, Frederiks WM, van Noorden CJ, Tas J. Detection of metabolic changes in hepatocytes by quantitative cytochemistry. Histochemistry. 1986;84(4-6):308-16. doi: 10.1007/BF00482955. PMID: 2424866.
122. Brinkmann A, Katz N, Sasse D, Jungermann K. Increase of the gluconeogenic and decrease of the glycolytic capacity of rat liver with a change of the metabolic zonation after partial hepatectomy. Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 1978 Nov;359(11):1561-71. doi: 10.1515/bchm2.1978.359.2.1561. PMID: 215501.
123. Andersen B, Zierz S, Jungermann K. Alteration in zonation of succinate dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase in regenerating rat liver. Histochemistry. 1984;80(1):97-101. doi: 10.1007/BF00492778. PMID: 6321405.
124. Penglase C. Greek myths and Mesopotamia. Taylor & Francis; 2005.
125. The liver in antiquity and the beginnings of anatomy,? by Prof. Morris Jastrow.University of Pennsylvania Medical Bulletin, Vol. XX, No. 11, January, 1908. ?An omen school text;? Old testament and semitic studies in memory of William Rainey Harper, vol. II, Chicago, 1908
126. Ortiz Hurtado H, Arias Díaz J. Cirugía colorrectal. Madrid: Arán; 2012.
127. Robles Campos R, Parrilla Paricio P. Cirugía hepática: Guías Clínicas de la Asociación Española de Cirujanos. 2nd ed. Ediciones Arán; 2004.
128. Jarnagin W, Blumgart L, Chapman W, D'Angelica M, DeMatteo R, Do R et al. Blumgart's surgery of the liver, biliary tract, and pancreas. Philadelphia: Elsevier; 2017.
129. Sabiston, Townsend C. Tratado de cirugía. 18th ed. Amsterdam: Elsevier; 2018.
130. Boyer, T. D., Manns, M. P., Sanyal, A. J., & Zakim, D. Zakim and Boyer's hepatology: A textbook of liver disease. 6-7º edición. Saunders/Elsevier; 2012.
131. Protocolo de actuación para el manejo del paciente con metástasis hepáticas de adenocarcinoma de colon-recto. Hospital Universitario Donostia. 2012.
132. Kierszenbaum A. Histología y biología celular. 2nd ed. Barcelona [etc.]: Elsevier; 2008.
133. Klatt E, Robbins S, Cotran R. Robbins y Cotran. Atlas de Anatomía Patológica 1st ed. Madrid: Elsevier; 2007.
134. García Pérez R. Estudio comparativo de regeneración hepática inducida por técnica ALPPS versus ligadura portal en un modelo experimental en rata [Internet]. Hdl.handle.net. 2015. Disponible en: http://hdl.handle.net/10803/334167
135. Ross A. Modern nutrition in health and disease. 1st ed. Wolters Kluwer Health Adis; 2012.
136. Feldman M., Fiedman L. S., Brandt L. J. Sleisenger y Fordtran. Enfermedades digestivas y hepáticas, 10.ª ed. Elsevier España. 2018
137. Hine R. L., Marschal K. Stoelting's Anesthesia and Co-Existing Disease. 7th ed. Elsevier. 2018

BIBLIOMETRÍA

En la siguiente tabla se presenta cada referencia bibliográfica junto a su revista de publicación (nombre, año de publicación y factor de impacto) y número de veces citado. Se han excluido las referencias a libros.

Titulo	Revista	Año	Factor de impacto	Citas
Anatomía Quirúrgica y Radiológica del Hígado. Fundamentos para las Resecciones Hepáticas	International Journal of Morphology	2017	0,336	14
A retrospective study of the natural history of patients with liver metastases from colorectal cancer	Clinical Oncology	1976	Ø	511
The Natural History of Hepatic Metastases from Colorectal Cancer	Annals of Surgery	1984	Ø	849
Survival Outcomes of Patients with Colorectal Liver Metastases Following Hepatic Resection or Ablation in the Era of Effective Chemotherapy	Annals of Surgical Oncology	2008	8,46	94
Trends in Long-Term Survival Following Liver Resection for Hepatic Colorectal Metastases	Annals of Surgery	2002	6,073	1606
Randomized Clinical Trials in Advanced and Metastatic Colorectal Carcinoma	Surgical Oncology Clinics of North America	2002	Ø	8
Cancers Metastatic to the Liver	Surgical Oncology Clinics of North America	2020	2	5
Population Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Modeling of 5-Fluorouracil for Toxicities in Rats	European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics	2016	1,4	9
Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: a French intergroup study	Journal of Clinical Oncology	1997	7,878	1127
Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial	The Lancet	2000	10,232	3773
Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer	Journal of Clinical Oncology	2000	8,773	4622
A Randomized Controlled Trial of Fluorouracil Plus Leucovorin, Irinotecan, and Oxaliplatin Combinations in Patients With Previously Untreated Metastatic Colorectal Cancer	Journal of Clinical Oncology	2004	9,835	2728
Phase III Trial of Infusional Fluorouracil, Leucovorin, Oxaliplatin, and Irinotecan (FOLFOXIRI) Compared With Infusional Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan	Journal of Clinical Oncology	2007	15,484	1239

(FOLFIRI) As First-Line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer: The Gruppo Oncologico Nord Ovest				
Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer.	New England Journal of Medicine	2004	38,57	11873
Cetuximab Monotherapy and Cetuximab plus Irinotecan in Irinotecan-Refractory Metastatic Colorectal Cancer	Medicine	2004	3,727	5902
Cetuximab for the Treatment of Colorectal Cancer	New England Journal of Medicine	2007	52,589	2155
Open-Label Phase III Trial of Panitumumab Plus Best Supportive Care Compared With Best Supportive Care Alone in Patients With Chemotherapy-Refractory Metastatic Colorectal Cancer	Journal of Clinical Oncology	2007	15,484	2187
Cetuximab and Chemotherapy as Initial Treatment for Metastatic Colorectal Cancer	New England Journal of Medicine	2009	47,05	4150
Adjuvant Chemotherapy After Potentially Curative Resection of Metastases From Colorectal Cancer: A Pooled Analysis of Two Randomized Trials	Journal of Clinical Oncology	2008	17,157	555
Clinical Score for Predicting Recurrence After Hepatic Resection for Metastatic Colorectal Cancer	Annals of Surgery	1999	5,647	3810
Colorectal cancer liver metastases - a population-based study on incidence, management and survival.	BMC Cancer	2018	2,933	201
Resection of Nonresectable Liver Metastases from Colorectal Cancer After Neoadjuvant Chemotherapy	Annals of Surgery	1996	Ø	1210
Rescue Surgery for Unresectable Colorectal Liver Metastases Downstaged by Chemotherapy.	Transactions of the Meeting of the American Surgical Association	2004	Ø	1784
Tumor Progression While on Chemotherapy	Annals of Surgery	2004	5,907	790
Downstaging of hepatocellular carcinoma and liver metastases from colorectal cancer by selective intra-arterial chemotherapy	Surgery	2002	2,631	105
Frequency, technical aspects, results, and indications of major hepatectomy after prolonged intra-arterial hepatic chemotherapy for initially unresectable hepatic tumors	Journal of american college of surgery	1995	Ø	152
Severe hepatic sinusoidal obstruction associated with oxaliplatin-based chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer	Annals of Oncology	2004	4,335	1013
Perioperative complications in patients undergoing major liver resection with or without neoadjuvant chemotherapy	Journal of Gastrointestinal Surgery	2003	1,881	226
CASH (Chemotherapy-Associated Steatohepatitis) Costs	Annals of Surgery	2006	7,678	125
Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds	Nature	1957	Ø	1968
Folic Acid-Metabolizing Enzymes Regulate the Antitumor Effect of 5-Fluoro-2'-Deoxyuridine in Colorectal Cancer Cell Lines	PLOS ONE	2016	2,806	14
Influence of Preoperative Chemotherapy on the Risk of Major Hepatectomy for Colorectal Liver Metastases	Annals of Surgery	2006	7,678	776

Sinusoidal Injury Increases Morbidity After Major Hepatectomy in Patients With Colorectal Liver Metastases Receiving Preoperative Chemotherapy	Annals of Surgery	2008	8,46	452
Liver metastases from colorectal cancer: Technique of liver resection	Journal of surgical oncology	2013	2,843	35
Effect of surgical margin status on survival and site of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases.	Annals of Surgery	2005	6,328	1208
Surgical Treatment of Metastatic Colorectal Cancer	Surgical Oncology Clinics of North America	2018	2,34	31
Oncosurgical strategies for metastatic liver cancer	Cirugía Española	2011	0,874	15
Second Liver Resections Are Safe and Effective Treatment for Recurrent Hepatic Metastases from Colorectal Cancer	Annals of Surgery	2002	6,073	381
Liver resection for colorectal metastases: the third hepatectomy	Annals of Surgery	2003	5,937	381
Two stage hepatectomy: a planned strategy to treat irresecable liver tumors	Annals of Surgery	2000	5,987	850
Preoperative portal embolization to increase safety of major hepatectomy for hilar bile duct carcinoma: a preliminary report	Surgery	1990	Ø	1262
Portal vein embolization in preparation for major hepatic resection: evolution of a new standard of care	Journal of Vascular and Interventional Radiology	2005	2,675	235
Effect of hepatic resection on development of liver metastasis	Revista Española de Enfermedades Digestivas	2003	0,348	23
During liver regeneration following right portal embolization the growth rate of liver metastases is more rapid than that of the liver parenchyma	British Journal of Surgery	1999	2,732	409
'In-Situ Split' liver resection/ALPPS-historical development and current practice	Visc Med	2017	1,941	21
A new method for induction of liver hypertrophy prior to right trisectionectomy: A report of three cases	HPB	2011	1,604	113
Associating liver partition and portal vein ligation for primary hepatobiliary malignancies and non-colorectal liver metastases	Scandinavian Journal of Surgery	2016	2,197	17
Asociación De Partición Hepática Y Ligadura Portal Para Hepatectomía Por Etapas (ALPPS)	International Journal of Morphology	2020	0,499	1
Associated Liver Partition and Portal Vein Ligation for Staged Hepatectomy (ALPPS) Registry: What Have We Learned?	Gut and Live	2020	3,141	4
Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS): an analysis of tumor activity	Updates in Surgery	2014	Ø	26
Core Group. ALPPS: where do we stand, where do we go?: eight recommendations from the first international expert meeting	Annals of Surgery	2016	8,98	87
Liver failure following partial hepatectomy	HPB	2006	Ø	89
Elucidating the Metabolic Regulation of Liver Regeneration	The American Journal of Pathology	2014	4,591	99

Prediction, prevention and management of postresection liver failure	British Journal of Surgery	2011	4,606	178
What is critical for liver surgery and partial liver transplantation: size or quality?	Hepatology	2010	10,885	121
Edinburgh Liver Surgery and Transplantation Experimental Research Group (eLISTER). The value of residual liver volume as a predictor of hepatic dysfunction and infection after major liver resection	Gut	2005	7,692	501
The Effect of Hepatic Vascular Inflow Occlusion on Liver Tissue pH, Carbon Dioxide, and Oxygen Partial Pressures: Defining the Optimal Clamp/Release Regime for Intermittent Portal Clamping	Journal of Surgical Research	2007	1,836	46
When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence	Journal of Clinical Investigation	2004	14,204	460
Decompression of the portal bed and twice-baseline portal inflow are necessary for the functional recovery of a "small-for-size" graft	Annals of Surgery	2011	7,492	60
Chemotherapy regimen predicts steatohepatitis and an increase in 90-day mortality after surgery for hepatic colorectal metastases	Journal Clinical Oncology	2006	13,598	1363
The importance of immune dysfunction in determining outcome in acute liver failure	Journal of Hepatology	2008	7,056	317
Ductular reaction after submassive necrosis in humans. Special emphasis on analysis of ductular hepatocytes	American Journal of Pathology	1996	Ø	144
Anatomía del Hígado de la Rata Wistar (Rattus norvegicus)	International Journal of Morphology	2011	0,244	7
Hepatectomies in the rat: A look at the caudate process through microsurgery	Digestive and liver disease	2009	2,972	19
Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat	Liver International	2007	2,559	160
Experimental and surgical technique in the rat	London: Academic Press	1992	Ø	1290
Experimental Pathology of the liver. Restoration of the liver of de White Rat following partial surgical removal	Archive of Pathology	1931	Ø	6209
Cascades of transcription regulation during liver regeneration	The International Journal of Biochemistry & Cell Biology	2011	5,183	48
El factor de crecimiento de hepatocitos y su receptor C-MET en la protección contra el daño hepático inducido por el alcohol	Revista Educación Bioquimica	2012	Ø	7
Effect of thrombopoietin on platelet counts and liver regeneration after partial hepatectomy in a rat model	Surgery Today	2009	1,05	38
Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration	Science	2006	30,028	660
Foxm1b transcription factor is essential for development of hepatocellular carcinomas and is negatively regulated by the p19ARF tumor suppressor	Genes & Development	2004	16,385	430

AMPK and SIRT1: a long-standing partnership?	American Journal Physiology and Endocrinological Metabolism	2010	4,686	661
Activin A induces growth arrest through a SMAD-dependent pathway in hepatic progenitor cells	Cell Communication and Signaling	2014	3,378	32
Regeneración hepática; el secreto mejor guardado: Una forma de respuesta al daño tisular	Revista espoñala de enfermedades digestivas	2014	1,414	1
Liver regeneration	Hepatology	2006	10,446	1674
Principles of liver regeneration and growth homeostasis	Comprehensive Physiology	2013	1,685	209
Tolerance, danger, and the extended family	Annual Review of Inmunology	1994	Ø	5871
Sensing damage by the NLRP3 inflammasome	Inmunological Reviews	2011	11,148	268
A novel role of complement: mice deficient in the fifth component of complement (C5) exhibit impaired liver regeneration	The journal of inmunology	2001	Ø	260
A complement-IL-4 regulatory circuit controls liver regeneration	The journal of inmunology	2012	5,52	57
Platelets and platelet-derived serotonin promote tissue repair after normothermic hepatic ischemia in mice	Hepatology	2007	10,734	168
Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration	Science	2006	30,028	796
Deletion of the serotonin transporter in rats disturbs serotonin homeostasis without impairing liver regeneration	American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology	2009	3,258	52
High levels of glucose-6-phosphatase gene and protein expression reflect an adaptive response in proliferating liver and diabetes	Journal of Clinical Investigation	1995	Ø	163
Nuclear Receptor-Dependent Bile Acid Signaling Is Required for Normal Liver Regeneration	Science	2006	30,028	660
Foxm1b transcription factor is essential for development of hepatocellular carcinomas and is negatively regulated by the p19ARF tumor suppressor	Genes & Development	2004	16,385	430
Increased hepatic Forkhead Box M1B (FoxM1B) levels in old-aged mice stimulated liver regeneration through diminished p27Kip1 protein levels and increased Cdc25B expression	The Journal of Biological Chemistry	2002	Ø	158
Proinflammatory Cytokine Production in Liver Regeneration IsMyd88-Dependent, but Independent ofCd14,Tlr2, andTlr4.	The Journal of Immunology	2006	Ø	121
The regulation of TGF signal transduction	Development	2009	7,194	912
Activin A induces growth arrest through a SMAD-dependent pathway in hepatic progenitor cells	Cell Communication and Signaling	2014	3,378	32

Cooperation of C/EBP family proteins and chromatin remodeling proteins is essential for termination of liver regeneration	Hepatology	2014	11,055	49
Polyploidization in liver tissue	American Journal of Pathology	2014	4,591	157
Hepatocyte polyploidization and its association with pathophysiological processes	Cell Death & Disease	2017	5,638	78
Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration	Current Biology	2012	9,494	303
Tri-Iodothyronine as a Stimulator of Liver Regeneration after Partial and Subtotal Hepatectomy	European Surgical Research	2007	0,92	38
L-ascorbic acid- and L-ascorbic acid 2-glucoside accelerate in vivo liver regeneration and lower serum alanine aminotransaminase activity in 70% partially hepatectomized rats	Biological & Pharmaceutical Bulletin	2014	1,828	5
Hepatotrophic Effect of Folinic Acid in Rats	Journal of Surgical Research	1996	Ø	7
Portal vein ligation accelerates tumor growth in ligated, but not contralateral lobes	World Journal of Gastroenterology	2010	2,24	13
Desarrollo de un modelo experimental de ligadura portal asociada a transección parenquimatosa (ALPPS) en ratas	Cirugía Española	2014	0,743	1
Autophagy Contributes to Liver Regeneration After Portal Vein Ligation in Rats	Medical Science Monitor	2019	1,918	2
Liver regeneration after different degrees of portal vein ligation	Journal of Surgical Research	2016	2,187	12
Effect of Portal Vein Ligation Plus Venous Congestion on Liver Regeneration in Rats	Annals of Hepatology	2019	2,125	3
Influence of folic acid on liver hypertrophy after selective portal ligature in laboratory rats	British Journal of Surgery	2020	5,676	0
Somatostatin and the "Small-For-Size" Liver	International Journal of Molecular Sciences	2019	4,556	7
Clinicas Laboratory Parameters for Crl:WI (Han)	Charles River	2008	Ø	0
Effect of pyridoxine deficiency on serum and liver transaminases in experimental liver injury in the rat	Gastroenterology	1980	Ø	36
The mechanism of release of hepatic enzymes in various liver diseases. II. Altered activity ratios of GOT to GPT in serum and liver of patients with liver diseases	Acta Medica Okayama	1979	Ø	19
Various S-GOT/S-GPT ratios in nonviral liver disorders and related physical conditions and life-style	Digestive and Sciences	2002	1,438	61
Role and control of the hepatic artery. In Lautt WW (eds): Hepatic circulation in health and disease	New York: Raven Press	1981	Ø	75
Hepatic arteriolo-portal venular shunting guarantees maintenance of nutritional microvascular supply in hepatic arterial buffer response of rat livers	Journal of physiology	2001	Ø	106

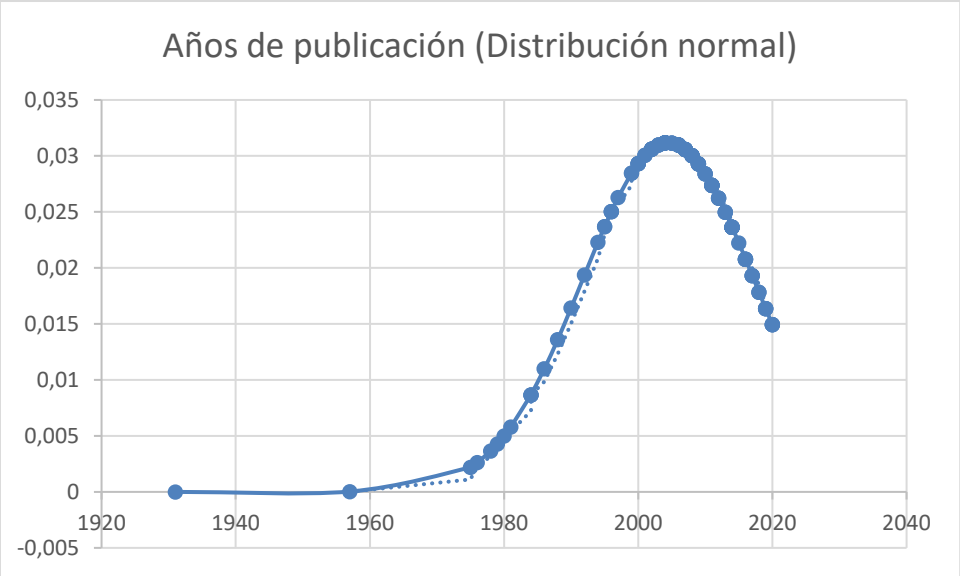
In vivo assessment of liver size in the rat	Journal of nuclear medicine	1975	Ø	14
Change trends of organ weight background data in sprague dawley rats at different ages	Journal of Toxicologic Pathology	2013	0,943	148
Functional expression of HGF and its receptor in human colorectal cancer	Digestion	2000	1,78	89
Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy	Hepatology	1984	Ø	211
Folate deficiency reduces the development of colorectal cancer in rats	Carcinogenesis	2000	Ø	91
Whither Prometheus' Liver? Greek Myth and the Science of Regeneration	Annals of Internal Medicine	2008	17,457	47
Polyp Prevention Study Group. Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial	JAMA	2007	Ø	1074
Folic acid supplementation and risk of colorectal neoplasia during long-term follow-up of a randomized clinical trial	American Journal of Clínical Nutrition	2019	6,766	4
Changes in succinate dehydrogenase zonation following cyclosporin-treatment in normal and regenerating rat liver	Celular and Molecular Biology	1988	Ø	2
Detection of metabolic changes in hepatocytes by quantitative cytochemistry	Histochemistry	1986	Ø	16
Increase of the gluconeogenic and decrease of the glycolytic capacity of rat liver with a change of the metabolic zonation after partial hepatectomy	Hoppe Seylers Z Physiol Chem	1978	Ø	84
Alteration in zonation of succinate dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase in regenerating rat liver	Histochemistry	1984	Ø	46
Estudio comparativo de regeneración hepática inducida por técnica ALPPS versus ligadura portal en un modelo experimental en rata	Hdl.handle.net.	2015	Ø	1

Distribución normal y análisis gráfico de los datos

Con intención de organizar los datos y representarlos gráficamente se procedió a ordenar los años de publicación, factores de impacto y citas bibliográficas según una distribución normal.

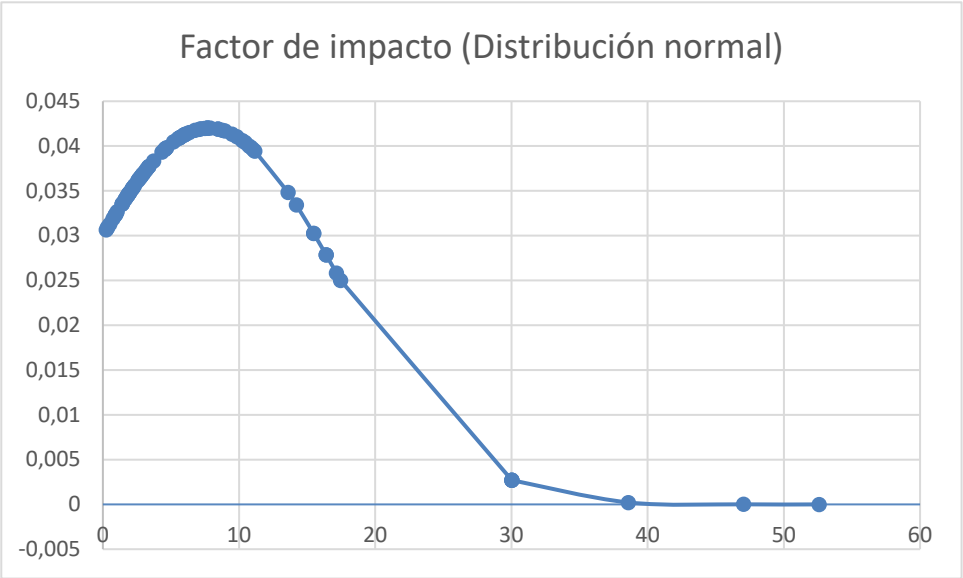
Años de publicación

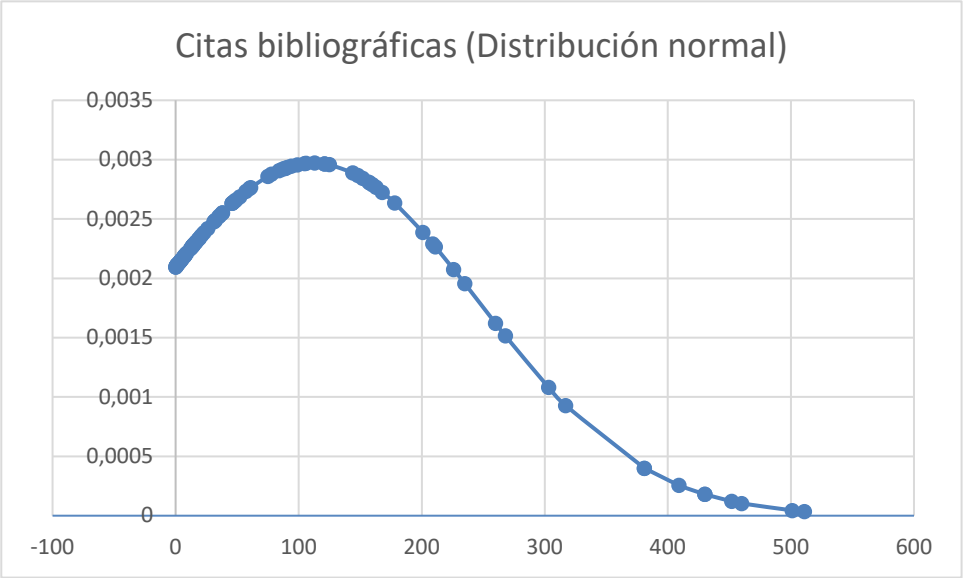
De las 124 referencias bibliográficas referidas en la tabla previa, el año de publicación medio fue el 2004, habiéndose publicado la referencia más antigua en 1931, y la más reciente en el 2020. La distribución normal obtenida fue la siguiente:



Factor de impacto (estratificado por año de publicación)

De entre todas las referencias utilizadas no se pudo obtener el factor de impacto en un 26,61% de las revistas. El año de publicación de las referencias sin factor de impacto fue anterior a 1996 en el 60,60% de los casos. La media del factor de impacto del resto de todas las referencias fue 7,78, con una desviación estándar de 9,50. La distribución normalizada de los resultados se puede observar en la siguiente campana de Gauss:



Citas bibliográficas

La media de las citas bibliográficas de las referencias utilizadas en este trabajo fue de 112,17, con una desviación estándar de 134,23. En el siguiente gráfico se observa su distribución normalizada: