

Resultats

EMPELTAMENT EXITÓS EN EL FETGE DE LES CÈL·LULES DERIVADES DEL MOLL D'OS TRASPLANTAT

El primer pas consisteix en la demostració de la validesa del sistema experimental proposat. Això vol dir que cal demostrar que les cèl·lules trasplantades al moll d'os s'han empeltat al fetge.

El grup escollit per a aquests experiments és el grup experimental, és a dir el grup de ratolins IL-6 $-/-$ (knockout) als que s'ha trasplantat moll d'os dels animals IL-6 $+/+$.

Cal ressaltar d'entrada que la simple constatació de la supervivència d'animals irradiats amb una dosi que en qualsevol altre cas seria letal és ja una prova inicial de que el trasplantament de moll d'os ha estat exitós. Així, cap dels animals control no trasplantats, sobrevivia més enllà de 10 dies post-irradiació, confirmant la letalitat de la dosi d'irradiació administrada, 1000 rads.

El següent pas que s'ha considerat és la demostració que aquestes cèl·lules han colonitzat el fetge i s'hi han diferenciat. Per a assolir aquest objectiu, s'ha considerat necessari un sistema per a poder identificar les cèl·lules trasplantades al fetge. El primer sistema escollit es basa en el trasplantament d'animals mascles a animals femelles. Les cèl·lules dels animals mascles contenen el cromosoma Y que no és present en cap de les cèl·lules de l'animal femella. L'objectiu, en aquest cas, es demostrar la presència de cèl·lules de Kupffer portadores del cromosoma Y al fetge al final de les 6 setmanes post-irradiació. Com podem observar a la figura 4A, tots els trasplantament mascle femella independentment que sigui de WT a KO o de KO a WT permeten detectar el cromosoma Y a l'animal femella receptor. Caldria assenyalar que el període de temps d'empelta-

ment post-trasplantament ha estat escollit de forma empírica com a temps suficient per a permetre l'empeltament hepàtic. Si els resultats haguessin estat diferents, s'haurien considerat temps d'empeltament superiors. Per altra banda, s'ha pensat que temps inferiors podrien ésser massa curts, però no s'ha arribat a comprovar aquesta possibilitat. Per a poder analitzar específicament l'empeltament de les cèl·lules de Kupffer, cal encara fer una consideració prèvia, i és la constatació que el sistema d'aïllament d'aquestes cèl·lules del fetge és fiable i obté un grau de puresa acceptable, altrament, un aïllament amb una proporció considerable d'altres poblacions cel·lulars faria perdre validesa a les observacions. El factor limitant, en la majoria de casos, és el temps d'adhesió en el plat de plàstic. Pràcticament, les úniques cèl·lules amb capacitat d'adherir-s'hi són les cèl·lules de Kupffer i aquesta afirmació és més certa quant més temps passa. No obstant, a més temps, també menys cèl·lules hi romanen adherides ja que es desprenen pel que cal trobar el temps ideal per aconseguir la màxima puresa amb un nombre de cèl·lules raonable. El temps escollit en aquest estudi és de 15 minuts.

La tècnica emprada per a la comprovació de la validesa d'aquest mètode és per la presència de l'enzim esterasa de l' α -naftil acetat. Aquest enzim és específic dels macròfags i és un dels mètodes d'identificació més contrastats per a la identificació d'aquest grup cel·lular. L'aplicació d'aquest mètode en aquest estudi ha permès objectivar un grau de puresa > 95% pel comptatge al microscopi de cèl·lules tenyides respecte al total.

L'altra evidència de la validesa del sistema d'aïllament de les cèl·lules de Kupffer en el present estudi es basa en l'estudi descrit dels animals mascle trasplantats amb moll d'os d'animal femella. Lògicament, aquests animals tenen el cromosoma Y en totes les seves cèl·lules excepte en aquelles que provenguin del moll d'os. Per tant, com podem veure a la figura 4B a les línies 3 i 4 dels trasplantats de mascle a femella, s'amplifica el locus SRY en els aïllats de cèl·lules de Kupffer. No obstant, el resultat més significatiu és el de la manca d'amplificació de l'ADN del gen del locus SRY en les cèl·lules aïllades dels animals trasplantats de femella a mascle. Això vol dir que, tenint en compte l'alta sen-

sibilitat d'aquesta tècnica, és una prova determinant de la validesa del mètode d'aïllament emprat. Aquest resultat ens diu que no hem agafat cap cèl·lula del parènquima hepàtic sinó només les cèl·lules de Kupffer que provenen del donant. Basats en aquesta dada, podem afirmar amb confiança que les condicions de l'aïllament són prou restrictives doncs només que una cèl·lula parenquimatososa s'hagués trobat dins de les cèl·lules aïllades ja s'hauria reflectit en forma de banda.

Aquests resultats permeten assumir amb confiança l'estudi de les cèl·lules de Kupffer en els animals femella amb cèl·lules del moll d'os de mascle. Els resultats per amplificació d'ADN per PCR confirmen, doncs, que el cromosoma Y és present en les cèl·lules de Kupffer aïllades en aquests animals. Aquest fet evidencia que en el període de 6 setmanes, no només s'ha aconseguit rescatar l'animal després de la irradiació sinó que aquestes cèl·lules han estat capaces d'empeltar-se al fetge i diferenciar-s'hi.

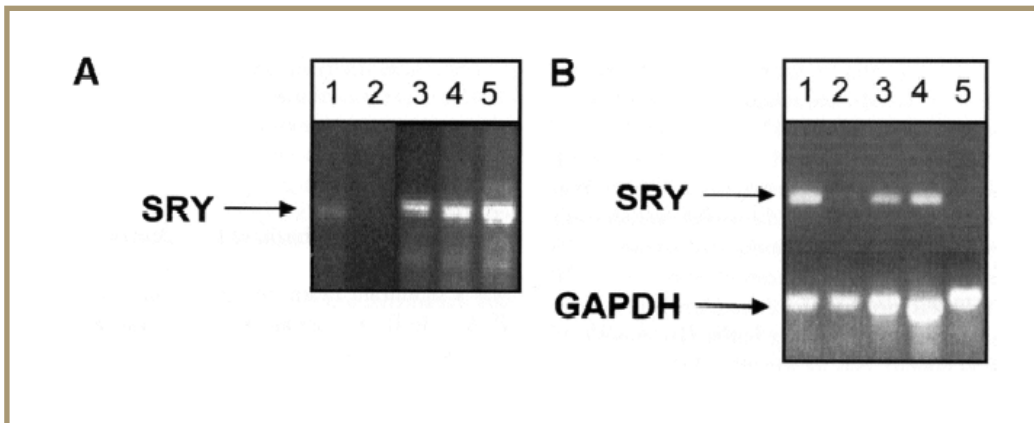


Fig. 4

- A) PCR per a detecció del locus SRY del cromosoma Y en teixit hepàtic de: Línia 1.- WT mascle Línia 2.- WT femella Línies 3 i 4.- WT mascle Δ KO femella Línia 5.- KO mascle Δ WT femella.
- B) PCR per al locus SRY del cromosoma Y de cèl·lules de Kupffer aïllades de: 1.- WT mascle 2.- WT femella 3 i 4.- WT mascle Δ KO femella 5.- WT femella Δ KO mascle.

De la mateixa manera, i un cop demostrat l'empeltament amb la detecció del fragment SRY del cromosoma Y, s'ha pogut evidenciar la presència del gen IL-6 i neogen IL-6 en els aïllats de cèl·lules de Kupffer ja sigui en els trasplantats WT → KO o en els KO → WT, respectivament (figura 5).

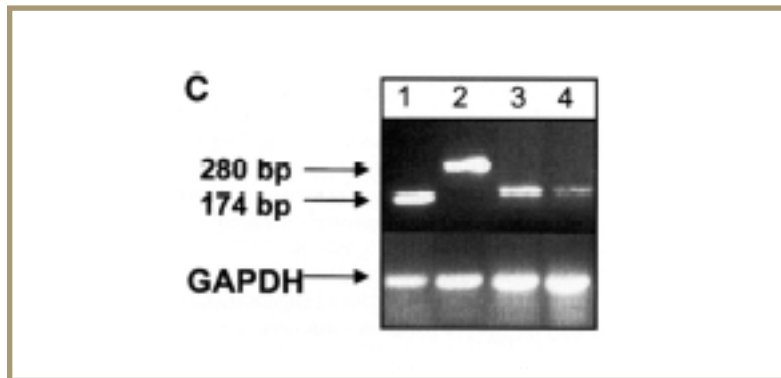


Fig. 5

Detecció per PCR a aïllats de cèl·lules de Kupffer del gen d'IL-6 (174 bp) i IL-6 interromput (280 bp): 1.- WT 2.- KO Æ WT 3 i 4.- WT Æ KO

GRUPS D'ESTUDI I SUPERVIVÈNCIA POST-IRRADIACIÓ I POST-HEPATECTOMIA PARCIAL

El grup experimental s'estableix en els animals IL-6 $-/-$ trasplantats amb moll d'os animals IL-6 $+/+$. Els grups controls, el constitueixen en primer lloc els animals IL-6 $+/+$, que són el control positiu de referència, i els IL-6 $-/-$ com a control negatiu de referència. L'altre grup control important és el dels animals IL-6 $+/+$ trasplantats amb moll d'os d'animals IL-6 $-/-$. Si la hipòtesi de treball d'aquest estudi es correcta, aquests animals s'haurien de comportar com a IL-6 $-/-$. La supervivència en el període d'empeltament de

6 setmanes post-irradiació ha estat >80% en tots aquests grups. No s'ha realitzat un estudi de supervivència postoperatòria a llarg plaç en els animals de cada grup.

En els animals que han arribat al moment de l'operació, sense tenir en compte la mortalitat postoperatòria relacionada directament amb la cirurgia (sagnat, anestèsia), hi ha hagut una mortalitat postoperatòria estadísticament significativa les primeres 36 hores superior en els grups d'IL-6 -/-, 27.5%, i IL-6+/+ quimèric (és a dir, animal IL-6+/+ trasplantat amb moll d'os d'IL-6-/-) del 17% en comparança amb els animals IL-6 +/+ i IL-6 -/- quimèrics (IL-6-/- trasplantats amb moll d'os d' IL-6 +/+) que era 0%.

Aquest estudi havia previst inicialment incloure un 5è grup control que consistiria en IL-6 -/- trasplantats amb moll d'os d'animals IL-6-/- amb la intenció d'observar l'efecte net que la irradiació podria tenir en els animals knockout. No obstant, s'ha objectivat una mortalitat post-irradiació en aquest grup del 80%. Aquest fet, va fer reconsiderar la utilització d'aquest grup control i finalment no s'ha inclòs en els resultats finals.

CAPACITAT DE SECRECIÓ D'IL-6 EN ELS ANIMALS IL-6 -/- QUIMÈRICS.

Un cop demostrat l'empeltament exitós cal comprovar si aquestes cèl·lules una vegada empeltades són funcionals, i, sobretot, assumint l'objectiu d'aquest estudi, si són capaces de secretar IL-6.

Inicialment, per a la demostració d'aquest fet, s'ha volgut objectivar si les cèl·lules sanguínies, en general, dels animals IL-6 -/- quimèrics (és a dir amb cèl·lules de moll d'os d'un altre animal, en aquest cas IL-6 +/+) són capaces de secretar IL-6. Per això s'han aïllat esplenòcits a les 6 setmanes post-irradiació. Aquestes cèl·lules s'han cultivat, amb i sense presència de lipopolisacàrid, i el sobrenadant s'ha analitzat per la presència d'IL-6 per la tècnica d'ELISA. Es pot comprovar a la figura 6 que l'addició d'LPS incrementa

de forma clara la producció d'IL-6 en el grup IL-6 +/+ i no suposa cap canvi en les cèl·lules de l'animal IL-6 -/-, ambdós grups emprats com a controls positiu i negatiu, respectivament. En els animals IL-6 -/- quimèrics, la producció d'IL-6 és comparable als controls positius, mentre que en els animals IL-6 +/+ quimèrics, és a dir, trasplantats amb moll d'os d'animals IL-6 -/-, la producció d'IL-6 està fortament disminuïda.

Aquest experiment ens permet asseverar que, amb el trasplantament de moll d'os, hem transferit la capacitat de produir IL-6 a les cèl·lules d'animals que altrament no podrien fer-ho.

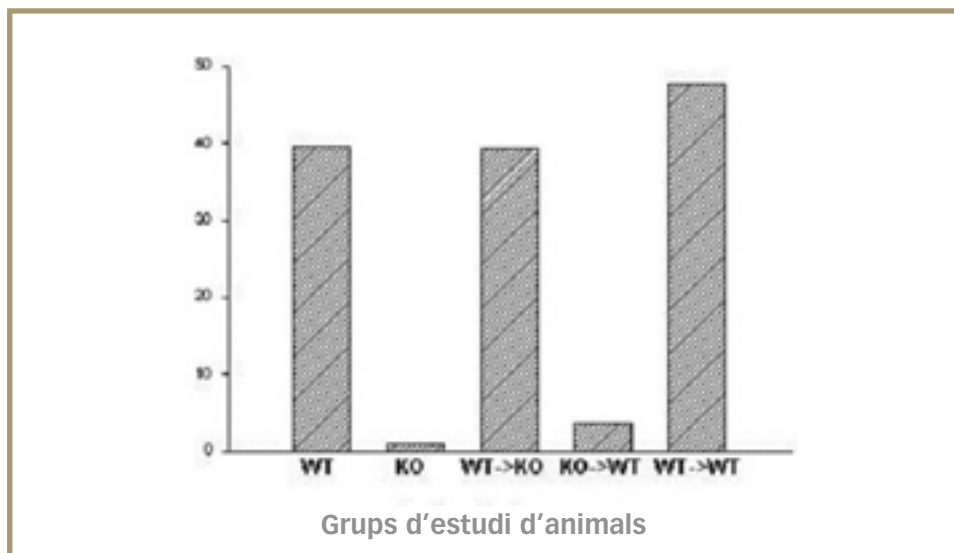


Fig. 6 Producció d'IL-6 detectada per ELISA en el sobrenadant de cultius d'esplenòcits estimulats en els animals dels diferents grups d'estudi.

PRODUCCIÓ D'IL-6 INTRAHEPÀTICA EN ELS ANIMALS IL-6 $-/-$ QUIMÈRICS.

El patró d'expressió de l'ARNm d'IL-6 a nivell intrahepàtic post-hepatectomia parcial en l'animal IL-6 $+/+$ es pot observar en la figura 7. L'expressió màxima és a les 2-4 hores post-hepatectomia parcial. Per aquest fet, s'ha escollit les 2 hores com el període ideal per a l'estudi de l'expressió d'ARNm dels altre grups a estudi. Cal ressaltar que existeix una expressió basal prehepàtica que s'evidencia en el fragment hepàtic extret en el moment de l'hepatectomia parcial.

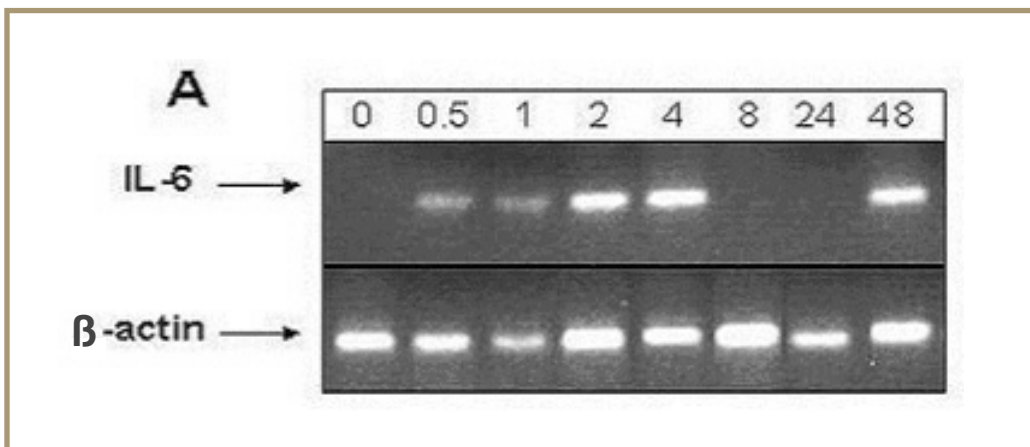


Fig. 7 Detecció ARNm d'IL-6 intrahepàtica per RT-PCR en control WT a on es demostra una major expressivitat a les 2 i 4 hores. Les 2 hores foren escollides com a punt representatiu.

El grup experimental, els animals IL-6 $-/-$ quimèrics, tenen augment en l'expressió d'IL-6 post-hepatectomia parcial que és absolutament comparable al nivell expressat pels animals genèticament normals. En canvi, els animals del grup IL-6 $+/+$ quimèrics, no presenten aquest augment d'expressió i ni tan sols s'arriba a evidenciar la secreció basal d'IL-6 pre-resecció. Com era d'esperar, els animals IL-6 $-/-$ no presenten expressió d'IL-6 (Figura 8)

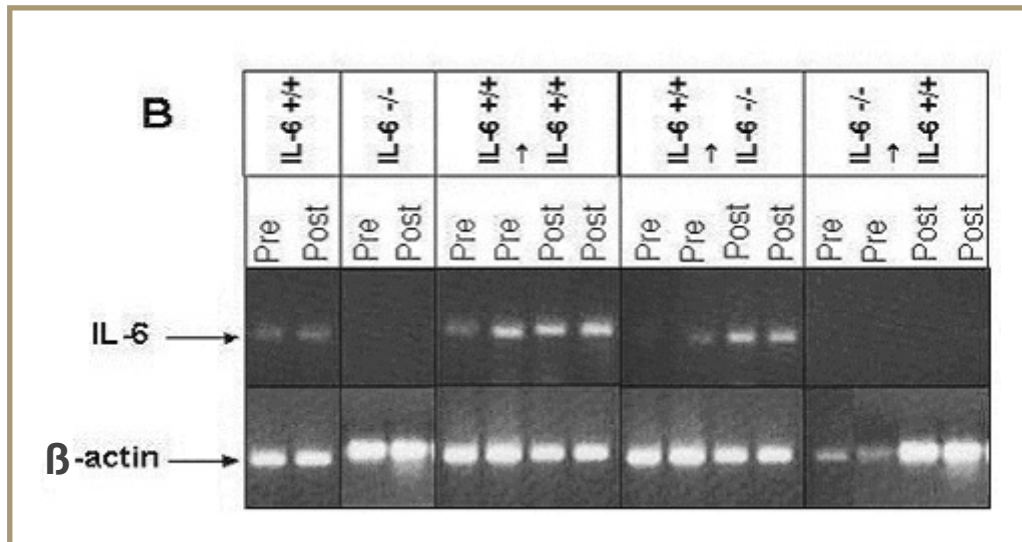


Fig. 8 ARNm per a IL-6 per RT-PCR constitutiu prehepatectomia i a les 2 hores posthepatectomia en els diferents grups a estudi.

Paral·lelament als estudis per detecció ARN, s'ha volgut també evidenciar aquest fet per tècniques morfològiques. Per aquest fet, es va escollir la tècnica d'hibridització in situ. Com podem comprovar a la Figura 9, les cèl·lules que han expressat l'ARN d'IL-6 en el grup d'IL-6 -/- quimèric són aquelles amb morfologia corresponent a cèl·lules de Kupffer.

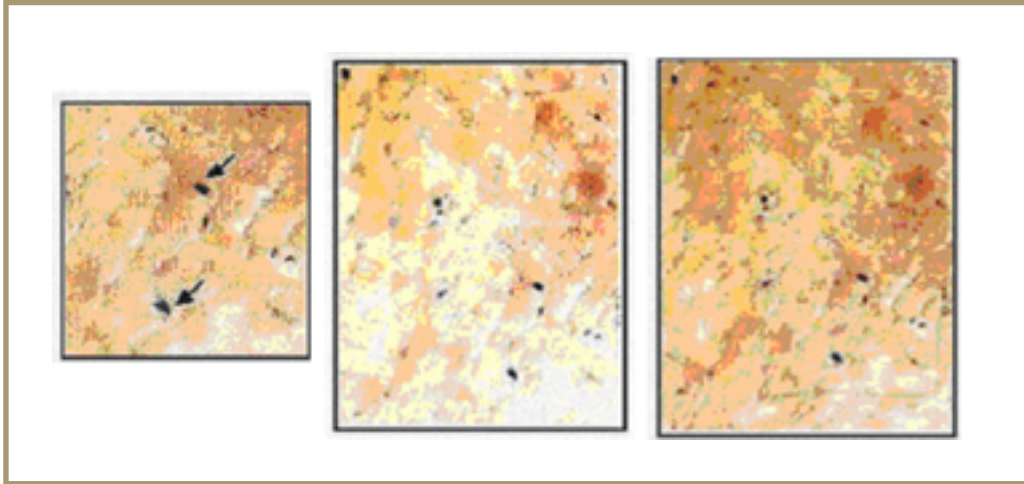


Fig. 9 Hibridització in situ per a la presència del gen IL-6 en cèl·lules de Kupffer 2 hores posthepatectomia a on es demostren (magnificació 40X) cèl·lules fortament tenyides (fletxes) amb morfologia corresponent a les cèl·lules de Kupffer.

RESTAURACIÓ DE L'ACTIVACIÓ D'STAT3 POST-HEPATECTOMIA PARCIAL

De la mateixa manera que és important la constitució de la capacitat d'expressar IL-6 per part del grup d'estudi, cal comprovar si aquesta secreció és capaç d'iniciar el senyal d'activació que ha de dur a la regeneració hepàtica. Per això, i basant-nos en l'eix de resposta després de l'hepatectomia parcial, TNF \rightarrow IL-6 \rightarrow STAT3. Gens de fase precoç immediata s'ha volgut mesurar l'activació del factor de transcripció STAT3 post-hepatectomia parcial.

En aquest cas, la correlació en l'activació del factor de transcripció es correspon directament amb l'expressió d'IL-6. D'aquesta faisó, els animals IL-6 $+/+$ i IL-6 $-/-$ quimèrics tenen una unió a la sonda d'ADN en el gel d'electroforesi de mobilitat "shift" en un patró

similar a les 2 i 4 hores (també és el cas del grup control IL-6 +/- a IL-6 +/-, malgrat que en dos animals no s'hi detectava banda. Una anàlisi posterior confirma que aquest fet fou conseqüència de la degradació de les mostres). No és el cas aquest en els altres dos grups, IL-6 -/- i IL-6 +/- quimèric (Figura 10). La presència de "supershift", és a dir la formació d'una banda enlentida i més gruixuda a l'afegir els Ac antiSTAT3 i no quan afegim els antiSTAT5 confirma l'especificitat de l'assaig per a STAT3. (Figura 11).

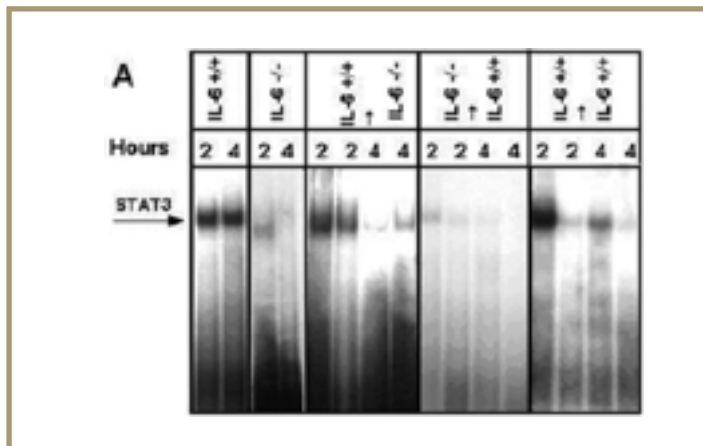


Fig. 10 Detecció de l'activació del factor de transcripció STAT3 detectada per tècnica d'EMSA als diferents grups d'estudi.

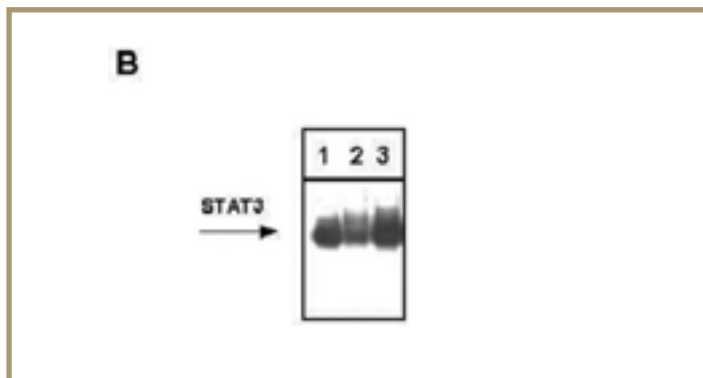


Fig. 11 "Supershift" (Carril 1 sense Ac, Carril 2 Ac anti STAT1, Carril 3 Ac anti STAT3).

SÍNTESI D'ADN I REGENERACIÓ HEPÀTICA NORMAL EN ELS ANIMALS IL-6 +/+ QUIMÈRICS.

La progressió del cicle cel·lular a través de les fases precoç i mitja de G1, la fase S amb la síntesi d'ADN i la subsegüent mitosi cel·lular, està perfectament documentada en els animals IL-6 +/+ amb el pic de replicació a les 36 hores post-hepatectomia parcial amb l'ús del mètode immunohistoquímica per a la comprovació de la captació cel·lular de BrdU. Les anàlisis histològiques dels animals IL-6 -/- permeten observar una capacitat de síntesi abolida, mentre que els mateixos animals però amb trasplantament de cèl·lules de moll d'os d'animals IL-6 +/+ tenen una replicació igual als animals IL-6 +/+ i estadísticament més elevada ($p < 0.005$) que els knockout. Els animals del grup IL-6 +/+ quimèrics també tenen una disminució de la regeneració hepàtica estadísticament significativa.

Aquests resultats encara es veuen reforçats en l'anàlisi histològica de l'arquitectura hepàtica post-hepatectomia parcial en els IL-6 -/- i els IL-6 +/+ quimèrics. En aquests fetges s'hi observen àrees de necrosi i degeneració en "ballooning" que concorden amb les observacions descrites a la literatura¹⁴³.

Aquests resultats demostren la important contribució de les cèl·lules del moll d'os, amb més probabilitat les cèl·lules de Kupffer, com a font d'IL-6 i el seu potencial paper com a reguladores de la iniciació de la regeneració hepàtica.

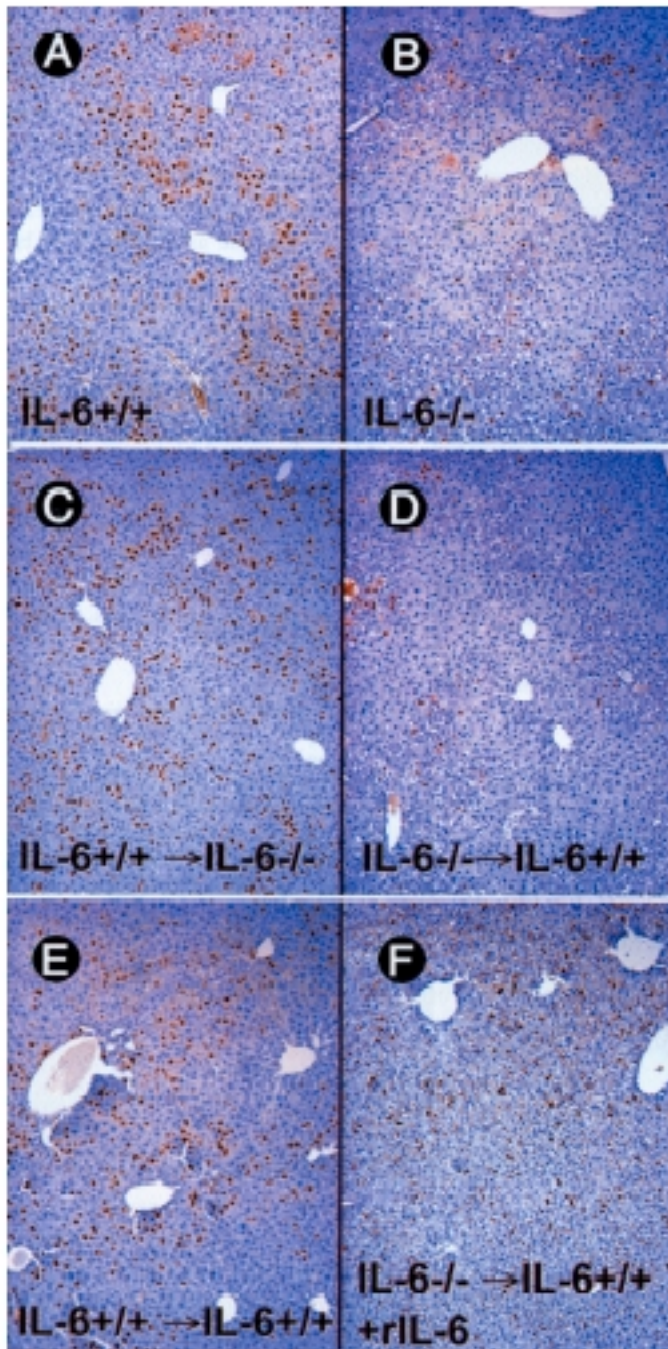


Fig. 12
Immunohistoquímica per a la detecció de la incorporació de BrDU en mostres histològiques hepàtiques a les 36 hores posthepatectomia parcial en els diferents grups a estudi.

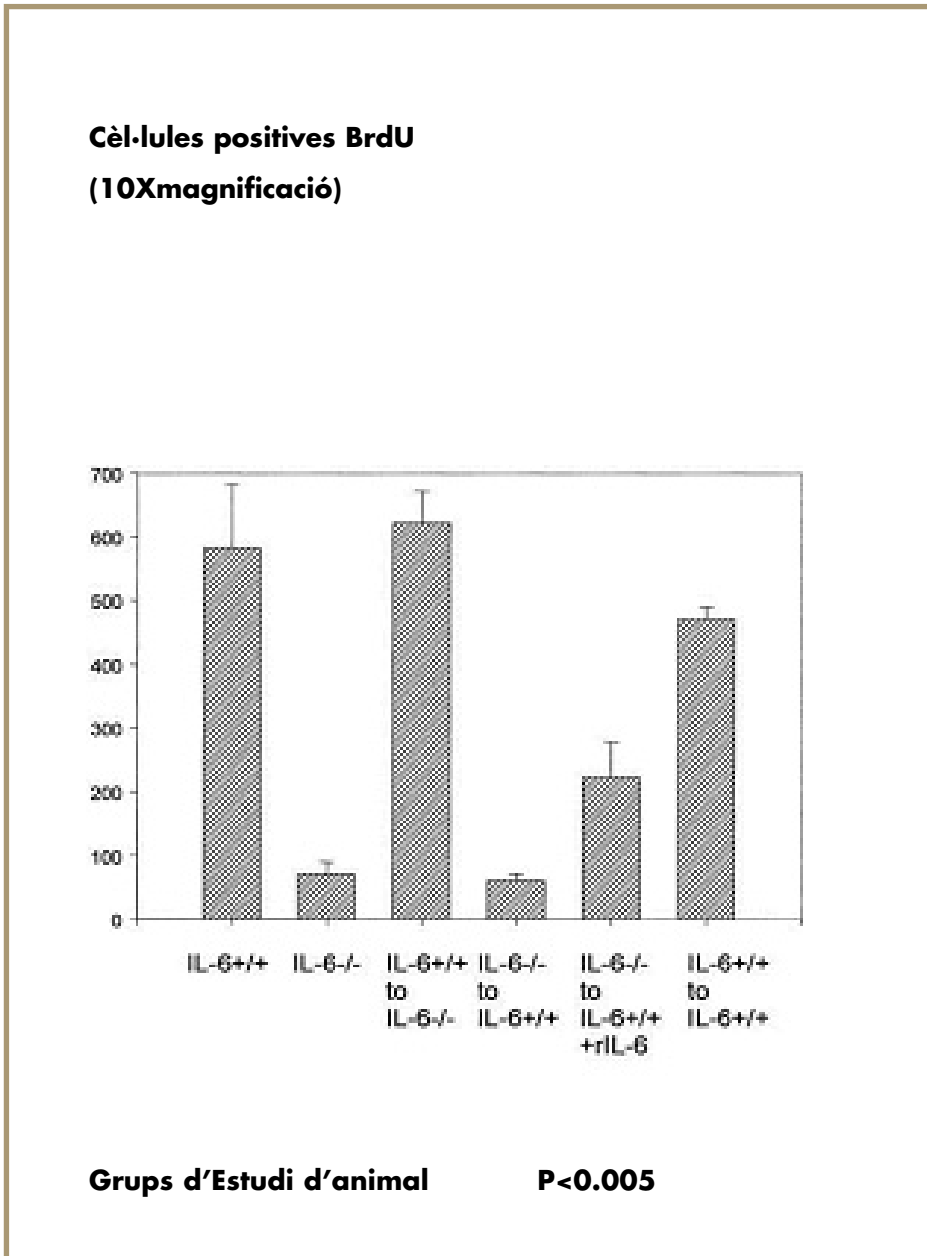


Fig. 13 Anàlisi numèrica del nombre de nuclis tenyits per camp amb una magnificació de 10 augments.

PATRÓ REGENERATIU EN ELS ANIMALS IMMUNODEFICIENTS

En vista dels resultats descrits, fins ara, la participació clau de les cèl·lules derivades del moll d'os en el procés regeneratiu és clara. En les cèl·lules derivades del moll d'os, apart de la línia mieloide, hi ha el grup de cèl·lules de la línia limfoide que no es pot descartar absolutament que puguin jugar algun paper en els resultats previs. Per a acotar més quin dels grups cel·lulars està més implicat i pensant en que aquest paper recau en les cèl·lules de Kupffer, s'ha estudiat la regeneració en ratolins deficients en cèl·lules B i T (RAG-2 knockout i SCID) i en cèl·lules B i T i NK (SCID beige).

L'estudi del pic regeneratiu a les 36 hores per immunohistoquímia ha evidenciat un nivell regeneratiu comparable a l'animal genèticament normal en les tres soques de ratolins, el que indica que la regeneració hepàtica pot desenvolupar-se en normalitat amb l'absència de les cèl·lules del sistema immunitari i mantenint només les cèl·lules de Kupffer com a única línia funcionant.

S'ha comprovat si la regeneració hepàtica es correlaciona amb l'expressió d'ARNm d'IL-6 i l'activació d'STAT3. S'ha estudiat en la soca RAG knockout i s'evidencia que els nivells són absolutament comparables amb els animals normals, el que demostra que aquesta normalitat en la síntesi d'ADN és, amb tota probabilitat, fruit del manteniment intacte de l'eix d'activació d'IL-6 (Veure figures 14 i 15).

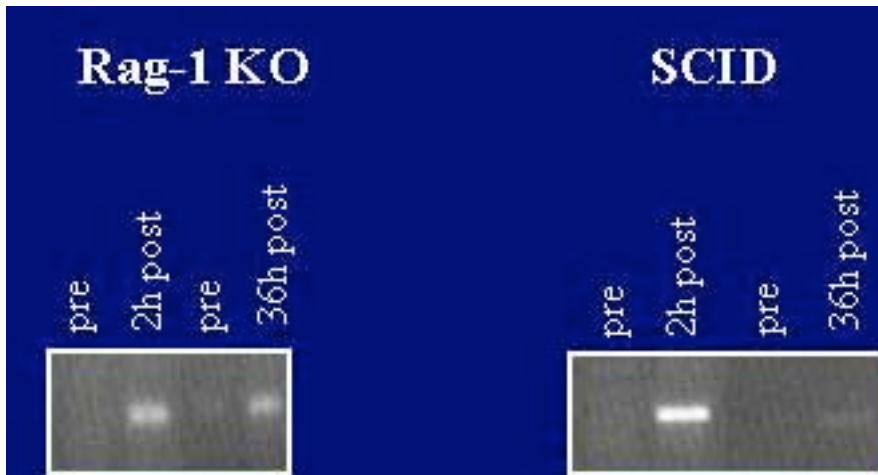


Fig. 14 ARNm per a IL-6 a teixit hepàtic de ratolins Rag-2 i SCID

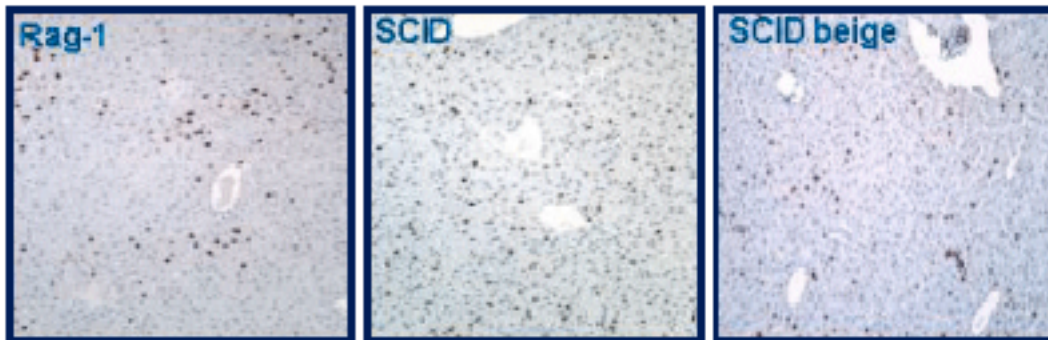


Fig. 15 Immunohistoquímica per a la incorporació de BrDU en els animals immunodeprimits

ANÀLISI DE LES CÈL·LULES NK T INTRAHEPÀTIQUES EN ELS ANIMALS IMMUNODEFICIENTS.

S'ha comentat prèviament la presència d'una població limfocitària intrahepàtica que està formada en la seva major part per cèl·lules NK T. També s'ha descrit l'estudi que assenyalava l'expansió clonal d'aquest grup cel·lular al moment inicial de la regeneració

hepàtica²¹⁸. En aquest treball, s'ha volgut descartar la presència d'aquest grup cel·lular en els animals immunodeficients, una vegada confirmat que la regeneració hepàtica procedeix en normalitat en aquests animals.

Per anàlisi de citometria de flux s'ha cercat la presència de cèl·lules limfocitàries aïllades del fetge amb els marcadors CD3, específic per als limfòcits, i el marcador NK1.1, específic per les cèl·lules NK . La presència d'ambdós marcadors en una cèl·lula és el que defineix aquesta població limfocitària de la que encara no es coneix amb claredat quina funció desenvolupen. Mentre es confirmava la seva presència en animals genèticament normals, no s'ha evidenciat la presència d'aquest grup cel·lular en cap de les soques d'animals immunodeficients estudiades, és a dir, RAG 2 knockout i SCID (s'assumeix que si els SCID no en tenen, la soca SCID beige tampoc en presentarà). En base a l'observació d'aquest treball, no sembla que tinguin un paper en el senyal inicial d'activació de la regeneració hepàtica.

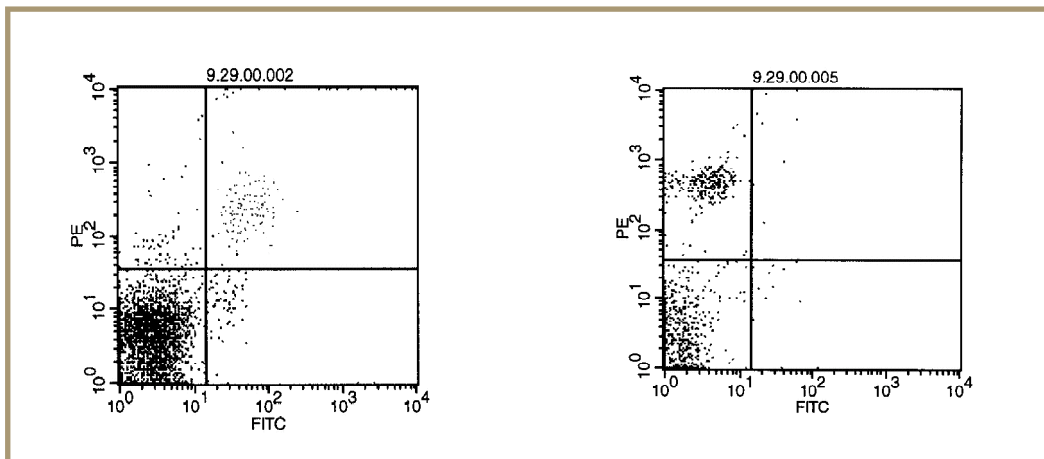


Fig. 16 FACS anàlisi amb marcadors anti NK 1.1 i anti CD3 per a la presència de limfòcits NK T en animal WT (esquerre) i Rag-2 KO (dreta).

Discussió

La comprensió dels mecanismes cel·lulars involucrats en la regeneració hepàtica té una gran rellevància clínica, ja que la pèrdua de parènquima hepàtic té lloc en un ampli ventall de malalties del fetge. La regeneració hepàtica és un component important de la recuperació després de resecció i després de lesió isquèmica en l'empelt hepàtic i s'ha implicat en multitud de condicions patològiques com ara hepatitis i cirrosi.

En l'estudi del procés regeneratiu, de forma aïllada, s'utilitza el model animal d'hepatectomia parcial ja que ens permet establir un punt exacte en l'inici del procés i les variacions resultants de processos inflamatoris associats són mínimes. Aquest, doncs, fora d'altres consideracions, ha estat el model en el que s'ha decidit centrar tots els experiments que es descriuen en aquest treball. L'animal escollit ha estat el ratolí per la disponibilitat de soques ben establertes, referides en estudis previs, amb els diversos genotips adients per al desenvolupament del present estudi.

En la introducció, s'han apuntat el gran nombre de factors de creixement que d'una manera o altra influencien en aquest procés. Per a aconseguir el desenvolupament de la regeneració hepàtica cal que es posi en funcionament una xarxa de múltiples factors actuant coordinadament. Queda clar en els estudis presentats, que un paper predominant es reserva per a l'HGF, TGF- α i EGF en aquest procés. No obstant, aquests són factors necessaris però no suficients. La injecció d'aquests factors en fetges en repòs no es tradueix en una replicació hepatocitària.

En vista del cúmul d'evidències proveïdes, sembla derivar-se'n que els hepatòcits necessiten un condicionament previ, el que es refereix en el món anglosaxó com "priming". Aquest condicionament, es basa en les vies inicials que acabaren per permetre l'activa-

ció dels grups de gens que condueixien l'hepatòcit a la fase G_1 , directament en l'entrada a la fase S o replicativa. Fins ara, no s'ha trobat una sola via que permeti, de forma independent i única, l'assoliment d'aquest estat condicionat dels hepatòcits. Les vies descrites inclouen l'eix TNF-IL-6, el factor de transcripció C/EBP β i la d'activació del factor de transcripció Egr-1. L'eix TNF-IL-6 és la via que està més clarament identificada i sembla desprendre-se'n, a la llum dels estudis més recents, que la seva interrelació i acció és mediatitzada per factors de transcripció específics: TNF \rightarrow C/EBP β \rightarrow IL-6 \rightarrow STAT3. No obstant, moltes són les preguntes a aclarir i punts foscos, per exemple quin és el senyal indicador de l'inici de tot el procés, un cop s'ha practicat l'hepatectomia parcial; alguns estudis semblen indicar algun paper a l'increment intraportal de lipopolisacàrid o canvis en el flux portal^{125, 234}, però manquen estudis en més detall per a confirmar aquestes observacions i explicacions mecanístiques. S'ha comentat que algun treball suggereix que allò important per a la integritat de l'eix és el manteniment del senyal provinent del receptor de TNF, no tant la pròpia citocina¹³², però no està aclarit quin prodria ésser aquest altre factor que substituiria o actuaria en conjunció amb TNF. També, i assumint el paper de TNF, queda per establir el dintell en el que TNF es converteix en un factor deleteri per al funcionalisme hepàtic (com succeeix en situacions de xoc sèptic). De totes aquestes qüestions, aquest treball s'ha centrat en una que no ha estat resolta fins el moment, quina cèl·lula o cèl·lules són les responsables de la secreció d'aquests factors, i en concret de la IL-6 que intervé en aquesta fase, davant el potencial de secreció d'aquesta citocina per una àmplia varietat dels tipus cel·lulars que resideixen al fetge. La capacitat de secretar IL-6, al menys *in vitro*, és compartida per les cèl·lules endotelials, les cèl·lules d'Ito i les cèl·lules de Kupffer així com pels propis hepatòcits^{153 158 164, 165}, encara que per aquest últim tipus cel·lular no s'ha demostrat la seva capacitat des d'hepatòcits aïllats sinó per línies cel·lulars que se n'han derivat. Tradicionalment, s'ha considerat que les cèl·lules de Kupffer haurien d'ésser el grup cel·lular més probable en la secreció d'IL-6. La seva ubiqüitat i la capacitat de secretar

aquesta citocina com a resposta a varis dels estímuls habituals com LPS, l'han fet un candidat probable.

La manca de disponibilitat i viabilitat d'animals genèticament deficients en macròfags ha estimulat la realització de múltiples treballs que han procurat constatar aquesta teoria basant-se en l'eliminació selectiva d'aquestes cèl·lules a través de productes químics. El problema de l'ús d'aquests productes és la seva inespecificitat d'acció; resulta difícil esbrinar els canvis que pot exercir en la funció de les cèl·lules de Kupffer, en si, i en els altres grups cel·lulars, en general. D'aquesta manera, i com hem anat comentant, els resultats obtinguts amb els estudis que han utilitzat GdCl₃ han d'ésser posats en quarantena, davant l'evidència de que l'efecte real d'aquest producte pot no ésser l'eliminació sinó el canvi de fenotip i redistribució d'aquestes cèl·lules¹⁹³. Aquest fet explicaria els resultats contradictoris dels estudis basats amb aquesta substància química en el que l'eliminació de les cèl·lules de Kupffer sembla ésser, de fet, un estímul regeneratiu mediat per TNF. Mentre, en el cas dels estudis amb CL2MDP encapsulat en liposomes, hi ha hagut resultats també contradictoris. Els dos estudis més recents han estat els primers en evidenciar que l'absència de cèl·lules de Kupffer comporta una disminució en la capacitat regenerativa, però per arribar a aquesta conclusió han hagut de manipular el sistema de diverses maneres. En el primer cas, i tenint en compte l'existència de dades que apunten a l'acció d'aquesta molècula en els macròfags esplènics, els autors inclueixen l'esplenectomia en el protocol experimental¹⁹⁷. Malgrat que d'aquesta manera confirmen la seva hipòtesi, amb l'extracció de la melsa estan introduint un element artificial al model general i, a més, no fan més que confirmar que aquesta substància química té una acció inespecífica amb una influència real en l'acció dels macròfags de la melsa. Aquesta acció limita el seu ús en estudis més específics dels mecanismes d'acció i d'activació de les cèl·lules de Kupffer ja que no es coneix com l'eliminació de la influència fisiopatològica de la melsa en el context de la regeneració hepàtica post-hepatectomia parcial pot variar la resposta específica de les cèl·lules de Kupffer que té

lloc en la situació normal. De la mateixa manera, en l'altre estudi¹⁹⁴, el fet d'injectar el CL2MDP en el 3er dia post-hepatectomia parcial valora la influència de les cèl·lules de Kupffer de forma parcial, quan el procés regeneratiu ja està en curs pel que aquest sistema no permet plantejar estudis que analitzin la influència d'aquestes cèl·lules en la fase inicial de la regeneració hepàtica, en la fase de "priming" dels hepatòcits, que correspon al moment de la secreció d'IL-6 que és l'objectiu del present treball.

El mètode experimental que proposa aquest treball es basa en l'assumpció que si s'aconsegueix crear un sistema en que les cèl·lules de Kupffer siguin les úniques cèl·lules del fetge que puguin secretar IL-6, l'observació del desenvolupament de la regeneració en aquest cas haurà d'ésser reflex exclusiu de la influència de la capacitat secretora d'IL-6 per part d'aquestes cèl·lules.

La situació que més s'acosta a l'assumpció proposada s'esdevé en la creació d'un animal quimera, és a dir un animal amb dos grups cel·lulars diferenciats al seu organisme. En aquest cas un animal en que constitutivament cap de les seves cèl·lules no és capaç de produir IL-6 (IL-6 knockout), però en el que es practica un trasplantament de moll d'os d'animals productors d'IL-6 (genotípicament normals), que fa que totes les cèl·lules derivades del moll d'os (i, per tant, les cèl·lules de Kupffer), i només aquestes, siguin capaces de produir IL-6.

En teoria, existeixen altres possibilitats de transferència de grups cel·lulars. Les opcions podrien haver estat la injecció directa de monòcits o bé cèl·lules de Kupffer normals en l'animal deficient. La creació d'"espai" en el fetge per a que aquestes cèl·lules pugessin assentar-s'hi es podria solventar amb una irradiació parcial de l'àrea hepàtica. No obstant, els criteris que han desaconsellat inicialment l'aplicació d'aquests sistemes han estat diversos. En primer lloc, no es coneix amb exactitud quins són els mecanismes de constitució i diferenciació de la població macrofàgica al fetge. Com hem assenyalat a la introducció d'aquest treball, es creu que conviuen dues poblacions cel·lulars macrofàgiques hepàtiques de diferent origen, una que constituïrien les cèl·lules de Kupffer pròpia-

ment dites i que es desenvoluparien a partir de precursors en el propi fetge, i una altra població derivada directament de l'entrada al fetge dels monòcits sanguinis³. Aquest fet, qüestiona, d'entrada, la capacitat de les cèl·lules de Kupffer madures de colonitzar el fetge, funció que potser estar reservada a uns precursors immadurs pendents d'identificar. De la mateixa manera, l'administració de monòcits pot conduir a la colonització del fetge per una població macrofàgica esbiaixada per a cèl·lules d'origen monocitari i no representativa de la població macrofàgica hepàtica en situació fisiològica. Adhuc, l'administració combinada d'ambdues poblacions es veuria afectada per un tercer problema, la competició per a la repoblació hepàtica per part de les cèl·lules del moll d'os del propi animal receptor. La pràctica d'una irradiació parcial deixa intacte el moll d'os de l'animal, el que permet que les seves cèl·lules continuïn repoblant el fetge. D'aquesta manera, l'aplicació d'aquest sistema podria resultar en una repoblació hepàtica de caràcter mixt que restaria el nombre de cèl·lules del donant disponibles al fetge i podria resultar amb un emmacament de l'efecte derivat d'aquestes cèl·lules pel seu nombre insuficient. En definitiva, aquestes inquietuds han desaconsellat l'ús d'aquests sistemes per al present treball. La utilitat de la transferència cel·lular de cèl·lules madures i la resposta als problemes plantejats *a priori* en l'estudi de la regeneració hepàtica queden pendents d'avaluació i van més enllà de l'objectiu d'aquest estudi.

L'ús del trasplantament de moll d'os per a aconseguir animals quimèrics és un sistema emprat àmpliament a la literatura, sobretot en l'àmbit de la immunologia. S'havia descrit un cop a la literatura el reemplaçament de les cèl·lules de Kupffer del donant en el receptor després d'aquest procediment però amb un protocol diferent de l'emprat aquí¹⁷⁸. A la constatació de l'èxit del protocol experimental del trasplantament de moll d'os en aquest estudi, com s'evidencia, per la supervivència dels animals post-irradiació letal, s'hi afegeix la comprovació de cèl·lules de Kupffer del donant colonitzant el fetge del receptor. Aquesta constatació es demostra clarament amb la presència del cromosoma Y del donant en les cèl·lules de Kupffer aïllades i la capacitat de secretar IL-6 per

aquestes cèl·lules en animals knockout per a IL-6.

El grup experimental, el que ha de permetre la demostració de la hipòtesi que es planteja, és el d'animals IL-6 $-/-$ amb trasplantament de soca IL-6 $+/+$. Els estudis presentats constaten amb claredat que amb aquest procediment es restaura la capacitat regenerativa normal en l'animal IL-6 $-/-$ que, altrament, seria incapaç de dur-la a terme. S'observa en aquests animals, un augment en l'expressió d'ARNm d'IL-6, activació d'STAT3 i síntesi d'ADN marcada post-hepatectomia parcial similar als animals control genotípicament normals. D'aquesta manera, s'estableix amb claredat que amb les cèl·lules derivades del moll d'os com a única font possible d'IL-6, la regeneració hepàtica es desenvolupa amb normalitat, el que està d'acord amb la hipòtesi suggerida en el present treball.

No obstant, la confirmació de la hipòtesi ha de venir amb la comprovació que el grup contrari, és a dir, l'animal IL-6 $+/+$ trasplantantat amb moll d'os de ratolins knockout té una capacitat regenerativa deprimida com així s'ha evidenciat en els resultats presentats. Aquest animal té capacitat de secretar IL-6 per part de totes les seves cèl·lules excepte per les que vinguin del moll d'os. L'observació d'un procés regeneratiu alterat suggereix clarament que les cèl·lules parenquimatoses i no parenquimatoses del fetge que no són d'origen del moll d'os (hepatòcits, cèl·lules endotelials, d'Ito) no són capaces de secretar la IL-6 necessària per a l'inici de la regeneració.

A més, aquesta observació permet rebatre un punt crític d'aquest estudi que se'n deriva a l'hora de la interpretació d'aquests resultats. És evident a partir dels resultats d'estudis recents que cèl·lules mare derivades del moll d'os poden migrar al fetge i diferenciar-se en hepatòcits sobretot en situacions de lesió aguda hepàtica i mieloablació induïda per irradiació total^{235, 236}. D'aquests resultats podria deduir-se'n que en el grup experimental algunes de les cèl·lules del moll d'os acaben convertint-se en hepatòcits amb capacitat per a secretar IL-6 que podria fer que no poguessin descartar en el grup experimental que una part de l'efecte observat vingui d'aquesta secreció. Sense ésser un

dels objectius d'aquest treball, és cert que el disseny experimental d'aquest estudi no permet esbrinar si algunes de les cèl·lules del moll d'os del donant esdevenen hepatòcits. Assumint aquesta afirmació, la constatació que el grup d'IL-6 +/+ trasplantats amb cèl·lules d'IL-6 -/- perd la capacitat regenerativa fa pensar que la contribució dels hepatòcits no és significativa i que, per tant, l'assumpció que algunes cèl·lules derivades del moll d'os esdevinguin hepatòcits no exclou que, alhora, es pugui afirmar que la font d'IL-6 responsable de l'inici d'aquest procés prové de les cèl·lules derivades del moll d'os convencionals, és a dir de cèl·lules del sistema immunològic i no de les cèl·lules que participen en la diferenciació en cèl·lules parenquimatoses. Es més, i en favor d'aquesta afirmació, cal afegir que els estudis mencionats, utilitzant el cromosoma Y com a marcador, posen de manifest un nombre relativament petit de cèl·lules parenquimatoses derivades d'aquest grup cel·lular del moll d'os, el que fa encara més improbable una contribució significativa per la seva part en la IL-6 total secretada. Finalment, l'estudi morfològic amb la hibridització *in situ* evidencia que les cèl·lules productores d'IL-6 en l'animal IL-6-/- quimera tenen característiques corresponents a cèl·lules de Kupffer (forma triangular i espiculada).

Aquest model, no obstant, no pot descartar absolutament una petita contribució en la producció d'IL-6 extrahepàtica per part de cèl·lules del sistema immunològic diferents a les cèl·lules de Kupffer. La localització i la ràpida resposta de l'expressió d'IL-6 en el fetge recolza fortament un mecanisme de senyal paracrí, és a dir des del propi fetge que deixa oberta la possibilitat de la contribució de poblacions del sistema immunològic intrahepàtiques apart de les cèl·lules de Kupffer. Per a analitzar aquesta possibilitat, s'ha plantejat una segona part de l'estudi que ha consistit en la utilització d'animals immunodeficients i comprovar el desenvolupament de la seva regeneració. Els animals emprats han estat els SCID i RAG-2 knockout en que manquen les línies cel·lulars dels limfòcits T i B, i els SCID beige en que a més s'hi associa una deficiència de cèl·lules NK. L'elecció de dues soques amb el mateix defecte fenotípic (SCID i RAG knockout), es va decidir ini-

cialment per a descartar que les diferències que es podrien observar fossin soca-específiques. La regeneració hepàtica normal amb l'augment de l'expressió de la IL-6 en nivells similars en animals genèticament normals, demostren que aquests grups cel·lulars no són imprescindibles per a l'inici de la regeneració hepàtica i confirmen que aquesta pot dur-se a terme amb la sola presència de les cèl·lules de Kupffer com a cèl·lules derivades del moll d'os al fetge.

Aquests resultats entren en contradicció amb l'observat en l'únic estudi plantejat fins al moment en que s'ha analitzat un animal amb immunodeficiència específica, els animals "nude" o atímics ¹²⁵, deficientes per als limfòcits T, i en els que s'havia descrit que tenien una regeneració hepàtica deprimida. Aquestes diferències observades es podrien justificar per alteracions pròpies de la soca a estudi. Els animals "nude" tenen associades certes alteracions estructurals fenotípiques com ara l'absència de pèl en tot el cos, així com un tamany general menor quan es compara en animals normals de la mateixa edat i sexe. No es pot descartar, doncs, que alteracions de tipus estructural del fetge (matriu hepàtica) com a responsable d'aquestes observacions. Altres possibilitats, mecanísticament mes improbables, com ara que els limfòcits B tinguessin un efecte repressor contrarrestat per la presència dels limfòcits T, són possibles però requeriran de l'ús d'altres animals, diferents als "nude", deficientes en limfòcits T per a poder comparar el comportament regeneratiu. No obstant, aquests experiments i l'anàlisi del paper dels limfòcits T per si sols, en aquest context, queda mes enllà dels objectius del present estudi.

Per últim, es coneix poc sobre la funcions de la població intrahepàtica de cèl·lules NK T, fins el moment, només suggerides de forma especulativa. Aquí, simplement s'ha volgut constatar la seva absència en els animals estudiats, el que senzillament corrobora que la regeneració hepàtica es pot iniciar sense la presència d'aquestes cèl·lules.

En vista, doncs, de totes les evidències experimentals presentades, podem afirmar que les cèl·lules de Kupffer són la principal font d'IL-6 en la fase inicial de la regeneració hepàtica. Aquest fet evidencia la importància del manteniment d'un eix macròfag-hepa-

tòcit intacte per a que els processos regeneratius en el fetge es puguin dur a terme en normalitat.

Aquestes troballes permeten establir la base de futurs estudis que busquin situacions en les que es pugui manipular la funció macrofàgica per a modular la resposta regenerativa. Obviament, també ha de fer pensar en la conveniència dels règims immunosupressors actuals en situacions en les que els processos regeneratius hepàtics són requerits. Per exemple, situacions com la recuperació de l'empelt hepàtic post-trasplantament en les que s'utilitzen règims immunosupressors potents, i es pot plantejar l'ús de teràpies encaminades a potenciar la funció macrofàgica que permeti ajudar en aquests processos de recuperació.

Paral·lelament a aquestes consideracions per a la pràctica clínica, amb aquest treball es presenta un model experimental que té el potencial de permetre l'estudi en detall de la relació específica entre el macròfag i l'hepatòcit. Aquesta interrelació ha estat descrita en nombroses condicions patològiques com la toxicitat induïda per l'alcohol, l'esteatohepatitis no alcohòlica, carcinogènesi, lesió tòxica o lesió per isquèmia/reperfusió que es segueix al trasplantament hepàtic^{187, 237-243}. El reemplaçament de les cèl·lules de Kupffer natives per macròfags expressant un senyal determinat en relació a l'objecte d'estudi particular per a cada cas proveeix a la comunitat científica amb una eina per a delimitar la influència de les cèl·lules de Kupffer i les seves vies associades sobre la funció hepatocitària en els diferents contextos fisiopatològics hepàtics.

Index d'il·lustracions

Fig. 1	Hipòtesi de la fase inicial de la regeneració hepàtica	39
Fig. 2	39
Fig. 3	Esquema TMO: Trasplantament moll d'os, HP: hepatectomia parcial.....	71
Fig. 4	85
Fig. 5	86
Fig. 6	Producció d'IL-6 detectada per ELISA en el sobrenadant de cultius d'esplenòcits estimulats en els animals dels diferents grups d'estudi	88
Fig. 7	Detecció ARNm d'IL-6 intrahepàtica per RT-PCR en control WT a on es demostra una major expressivitat a les 2 i 4 hores. Les 2 hores foren escollides com a punt representatiu.....	89
Fig. 8	ARNm per a IL-6 per RT-PCR constituïu prehepatectomia i a les 2 hores posthepatectomia en els diferents grups a estudi	90
Fig. 9	91
Fig. 10	Detecció de l'activació del factor de transcripció STAT3 detectada per tècnica d'EMSA als diferents grups d'estudi.....	92
Fig. 11	"Supershift" (Carril 1 sense Ac, Carril 2 Ac anti STAT1, Carril 3 Ac anti STAT3)	92

Fig. 12	Immunohistoquímica per a la detecció de la incorporació de BrDU en mostres histològiques hepàtiques a les 36 hores posthepatectomia parcial en els diferents grups a estudi.....	94
Fig. 13	Anàlisi numèrica del nombre de nuclis tenyits per camp amb una magnificació de 10 augments	95
Fig. 14	ARNm per a IL-6 a teixit hepàtic de ratolins Rag-1 i SCID.....	97
Fig. 15	Immunohistoquímica per a la incorporació de BrDU en els animals immunodeprimits.....	97
Fig. 16	FACS anàlisi amb marcadors anti NK 1.1 i anti CD3 per a la presència de limfòcits NK T.....	98

Bibliografia

1. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931; 12:186-202.
2. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997; 276:60-6.
3. Bircher J, Benhamou J, McIntyre N, Rizzetto M, Rodes J. *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*. Vol. 1. Oxford: Oxford University Press, 1999.
4. Kawasaki S, Makuuchi M, Ishizone S, Matsunami H, Terada M, Kawarazaki H. Liver regeneration in recipients and donors after transplantation. *Lancet* 1992; 339:580-1.
5. Francavilla A, Ove P, Polimeno L, et al. Regulation of liver size and regeneration: importance in liver transplantation. *Transplant Proc* 1988; 20:494-7.
6. Starzl TE, Fung J, Tzakis A, et al. Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet* 1993; 341:65-71.
7. Fausto N. Liver stem cells. In: Arias L, Boyer J, Fausto N, Jakoby W, Schachter D, Schafritz D, eds. *The Liver: Biology and Pathobiology*. New York: Raven Press, 1994:1501-1518.
8. Krawitt EL, Betel I, Potter VR. A study of the cytidine kinase pathway of nucleotide biosynthesis in regenerating rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1969; 174:763-5.
9. Yanagi S, Potter VR. Sequential changes in ornithine decarboxylase thymidine kinase, and other enzyme activities in regenerating liver in rats on controlled feeding schedules. *Life Sci* 1977; 20:1509-19.
10. Ogawa K, Medline A, Farber E. Sequential analysis of hepatic carcinogenesis: the

- comparative architecture of preneoplastic, malignant, prenatal, postnatal and regenerating liver. *Br J Cancer* 1979; 40:782-90.
11. Stocker E, Wullstein HK, Brau G. [Capacity of regeneration in liver epithelia of juvenile, repeated partially hepatectomized rats. Autoradiographic studies after continuous infusion of ³H-thymidine.]. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1973; 14:93-103.
 12. Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science* 1994; 263:1149-52.
 13. Rhim JA, Sandgren EP, Palmiter RD, Brinster RL. Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:4942-6.
 14. Block GD, Locker J, Bowen WC, et al. Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. *J Cell Biol* 1996; 132:1133-49.
 15. Jirtle RL, Michalopoulos G. Effects of partial hepatectomy on transplanted hepatocytes. *Cancer Res* 1982; 42:3000-4.
 16. Michalopoulos G, Houck KA, Dolan ML, Leutteke NC. Control of hepatocyte replication by two serum factors. *Cancer Res* 1984; 44:4414-9.
 17. Michalopoulos GK. Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control. *Faseb J* 1990; 4:176-87.
 18. Michalopoulos GK, Zarnegar R. Hepatocyte growth factor. *Hepatology* 1992; 15:149-55.
 19. Lindroos PM, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology* 1991; 13:743-50.

20. Webber EM, FitzGerald MJ, Brown PI, Bartlett MH, Fausto N. Transforming growth factor-alpha expression during liver regeneration after partial hepatectomy and toxic injury, and potential interactions between transforming growth factor-alpha and hepatocyte growth factor. *Hepatology* 1993; 18:1422-31.
21. Shiota G, Okano J, Kawasaki H, Kawamoto T, Nakamura T. Serum hepatocyte growth factor levels in liver diseases: clinical implications. *Hepatology* 1995; 21:106-12.
22. Maher JJ. Cell-specific expression of hepatocyte growth factor in liver. Upregulation in sinusoidal endothelial cells after carbon tetrachloride. *J Clin Invest* 1993; 91:2244-52.
23. Gak E, Taylor WG, Chan AM, Rubin JS. Processing of hepatocyte growth factor to the heterodimeric form is required for biological activity. *FEBS Lett* 1992; 311:17-21.
24. Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *Am J Pathol* 1993; 143:949-58.
25. Shiota G, Wang TC, Nakamura T, Schmidt EV. Hepatocyte growth factor in transgenic mice: effects on hepatocyte growth, liver regeneration and gene expression. *Hepatology* 1994; 19:962-72.
26. Sakata H, Takayama H, Sharp R, Rubin JS, Merlino G, LaRochelle WJ. Hepatocyte growth factor/scatter factor overexpression induces growth, abnormal development, and tumor formation in transgenic mouse livers. *Cell Growth Differ* 1996; 7:1513-23.
27. Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 1995; 373:699-702.
28. Uehara Y, Minowa O, Mori C, et al. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 1995; 373:702-5.
29. Uehara Y, Mori C, Noda T, Shiota K, Kitamura N. Rescue of embryonic lethality in

- hepatocyte growth factor/scatter factor knockout mice. *Genesis* 2000; 27:99-103.
30. Mead JE, Fausto N. Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:1558-62.
 31. Tomiya T, Fujiwara K. Serum levels of transforming growth factor-alpha in patients after partial hepatectomy as determined with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Hepatology* 1993; 18:304-8.
 32. Massague J. Transforming growth factor-alpha. A model for membrane-anchored growth factors. *J Biol Chem* 1990; 265:21393-6.
 33. Tomiya T, Ogata I, Yamaoka M, Yanase M, Inoue Y, Fujiwara K. The mitogenic activity of hepatocyte growth factor on rat hepatocytes is dependent upon endogenous transforming growth factor-alpha [In Process Citation]. *Am J Pathol* 2000; 157:1693-701.
 34. Webber EM, Wu JC, Wang L, Merlino G, Fausto N. Overexpression of transforming growth factor-alpha causes liver enlargement and increased hepatocyte proliferation in transgenic mice. *Am J Pathol* 1994; 145:398-408.
 35. Russell WE, Kaufmann WK, Sitaric S, Luetkeke NC, Lee DC. Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor-alpha-targeted mice. *Mol Carcinog* 1996; 15:183-9.
 36. Jones DE, Tran-Patterson R, Cui DM, Davin D, Estell KP, Miller DM. Epidermal growth factor secreted from the salivary gland is necessary for liver regeneration. *Am J Physiol* 1995; 268:G872-8.
 37. Skov Olsen P, Boesby S, Kirkegaard P, et al. Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatology* 1988; 8:992-6.
 38. Skov Olsen P, Kirkegaard P, Poulsen SS, Nexø E. Adrenergic effects on renal secretion of epidermal growth factor in the rat. *Regul Pept* 1985; 11:17-25.
 39. Higashiyama S, Abraham JA, Miller J, Fiddes JC, Klagsbrun M. A heparin-binding

- growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science* 1991; 251:936-9.
40. Higashiyama S, Lau K, Besner GE, Abraham JA, Klagsbrun M. Structure of heparin-binding EGF-like growth factor. Multiple forms, primary structure, and glycosylation of the mature protein. *J Biol Chem* 1992; 267:6205-12.
 41. Kiso S, Kawata S, Tamura S, et al. Role of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a hepatotropic factor in rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology* 1995; 22:1584-90.
 42. Vaughan TJ, Pascall JC, Brown KD. Tissue distribution of mRNA for heparin-binding epidermal growth factor. *Biochem J* 1992; 287:681-4.
 43. Yamada A, Kawata S, Tamura S, et al. Plasma heparin-binding EGF-like growth factor levels in patients after partial hepatectomy as determined with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 246:783-7.
 44. Houck KA, Zarnegar R, Muga SJ, Michalopoulos GK. Acidic fibroblast growth factor (HBGF-1) stimulates DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures. *J Cell Physiol* 1990; 143:129-32.
 45. Kan M, Huang JS, Mansson PE, Yasumitsu H, Carr B, McKeenan WL. Heparin-binding growth factor type 1 (acidic fibroblast growth factor): a potential biphasic autocrine and paracrine regulator of hepatocyte regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86:7432-6.
 46. Marsden ER, Hu Z, Fujio K, Nakatsukasa H, Thorgeirsson SS, Everts RP. Expression of acidic fibroblast growth factor in regenerating liver and during hepatic differentiation [see comments]. *Lab Invest* 1992; 67:427-33.
 47. Housley RM, Morris CF, Boyle W, et al. Keratinocyte growth factor induces proliferation of hepatocytes and epithelial cells throughout the rat gastrointestinal tract. *J Clin Invest* 1994; 94:1764-77.
 48. Itoh T, Suzuki M, Mitsui Y. Keratinocyte growth factor as a mitogen for primary

- culture of rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192:1011-5.
49. Giorda R, Hagiya M, Seki T, et al. Analysis of the structure and expression of the augments of liver regeneration (ALR) gene. *Mol Med* 1996; 2:97-108.
 50. Francavilla A, Hagiya M, Porter KA, Polimeno L, Ihara I, Starzl TE. Augments of liver regeneration: its place in the universe of hepatic growth factors. *Hepatology* 1994; 20:747-57.
 51. Vujanovic NL, Polimeno L, Azzarone A, et al. Changes of liver-resident NK cells during liver regeneration in rats. *J Immunol* 1995; 154:6324-38.
 52. Simek J, Husakova A, Deml F, Dvorackova I. Hepatic DNA synthesis after partial hepatectomy in rats treated with protamin-Zn-insulin under different nutritional conditions. *Experientia* 1969; 25:791-2.
 53. Starzl TE, Francavilla A, Halgrimson CG, et al. The origin, hormonal nature, and action of hepatotrophic substances in portal venous blood. *Surg Gynecol Obstet* 1973; 137:179-99.
 54. Starzl TE, Porter KA, Putnam CW. Insulin, glucagon, and the control of hepatic structure, function, and capacity for regeneration. *Metabolism* 1976; 25:1429-34.
 55. Starzl TE, Watanabe K, Porter KA, Putnam CW. Effects of insulin, glucagon, and insulinglucagon infusions on liver morphology and cell division after complete portacaval shunt in dogs. *Lancet* 1976; 1:821-5.
 56. Johnston DG, Johnson GA, Alberti KG, Millward-Sadler GH, Mitchell J, Wright R. Hepatic regeneration and metabolism after partial hepatectomy in diabetic rats: effects of insulin therapy. *Eur J Clin Invest* 1986; 16:384-90.
 57. Nakata R, Tsukamoto I, Miyoshi M, Kojo S. Liver regeneration in streptozotocin-diabetic rats. *Biochem Pharmacol* 1986; 35:865-7.
 58. Barra R, Hall JC. Liver regeneration in normal and alloxan-induced diabetic rats. *J Exp Zool* 1977; 201:93-9.
 59. Vunder VP. Regeneration of the liver in alloxan diabetes. *Bull Exp Biol Med* 1974;

77:175-7.

60. Cornell RP, Hinck BK, Halley RE. Hepatocyte and Kupffer cell functions during liver regeneration in streptozotocin-diabetic rats. *Hepatology* 1981; 1:424-30.
61. Jeejeebhoy KN, Ho J, Mehra R, Bruce-Robertson A. Hepatotrophic effects of insulin on glucose, glycogen, and adenine nucleotides in hepatocytes isolated from fed adult rats. *Can J Biochem* 1980; 58:1004-11.
62. Cruise JL, Michalopoulos G. Norepinephrine and epidermal growth factor: dynamics of their interaction in the stimulation of hepatocyte DNA synthesis. *J Cell Physiol* 1985; 125:45-50.
63. Cruise JL, Houck KA, Michalopoulos GK. Induction of DNA synthesis in cultured rat hepatocytes through stimulation of alpha 1 adrenoreceptor by norepinephrine. *Science* 1985; 227:749-51.
64. Cruise JL, Knechtle SJ, Bollinger RR, Kuhn C, Michalopoulos G. Alpha 1-adrenergic effects and liver regeneration. *Hepatology* 1987; 7:1189-94.
65. Houck KA, Michalopoulos GK. Altered responses of regenerating hepatocytes to norepinephrine and transforming growth factor type beta. *J Cell Physiol* 1989; 141:503-9.
66. Geenen V, Achour I, Robert F, et al. Evidence that insulin-like growth factor 2 (IGF2) is the dominant thymic peptide of the insulin superfamily. *Thymus* 1993; 21:115-27.
67. Scott CD, Ballesteros M, Baxter RC. Increased expression of insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor in regenerating rat liver. *Endocrinology* 1990; 127:2210-6.
68. Herschman HR. Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu Rev Biochem* 1991; 60:281-319.
69. Fausto N, Shank PR. Oncogene expression in liver regeneration and hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 1983; 3:1016-23.

70. Taub R. Liver regeneration 4: transcriptional control of liver regeneration. *Faseb J* 1996; 10:413-27.
71. Loyer P, Glaise D, Cariou S, Baffet G, Meijer L, Guguen-Guillouzo C. Expression and activation of cdk2 (1 and 2) and cyclins in the cell cycle progression during liver regeneration. *J Biol Chem* 1994; 269:2491-500.
72. Trembley JH, Kren BT, Steer CJ. Posttranscriptional regulation of cyclin B messenger RNA expression in the regenerating rat liver. *Cell Growth Differ* 1994; 5:99-108.
73. Kren BT, Steer CJ. Posttranscriptional regulation of gene expression in liver regeneration: role of mRNA stability. *Faseb J* 1996; 10:559-73.
74. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:225-60.
75. Liou HC, Baltimore D. Regulation of the NF-kappa B/rel transcription factor and I kappa B inhibitor system. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5:477-87.
76. Hu Y, Baud V, Delhase M, et al. Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of I kappa B kinase [see comments]. *Science* 1999; 284:316-20.
77. Li Q, Van Antwerp D, Mercurio F, Lee KF, Verma IM. Severe liver degeneration in mice lacking the I kappa B kinase 2 gene [see comments]. *Science* 1999; 284:321-5.
78. Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D. Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 1995; 376:167-70.
79. Plumpe J, Malek NP, Bock CT, Rakemann T, Manns MP, Trautwein C. NF-kappaB determines between apoptosis and proliferation in hepatocytes during liver regeneration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278:G173-83.
80. Iimuro Y, Nishiura T, Hellerbrand C, et al. NFkappaB prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration [published erratum appears in *J Clin Invest* 1998 Apr 1;101(7):1541]. *J Clin Invest* 1998; 101:802-11.

81. Cressman DE, Greenbaum LE, Haber BA, Taub R. Rapid activation of post-hepatectomy factor/nuclear factor kappa B in hepatocytes, a primary response in the regenerating liver. *J Biol Chem* 1994; 269:30429-35.
82. Webber EM, Bruix J, Pierce RH, Fausto N. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. *Hepatology* 1998; 28:1226-34.
83. Kirillova I, Chaisson M, Fausto N. Tumor necrosis factor induces DNA replication in hepatic cells through nuclear factor kappaB activation. *Cell Growth Differ* 1999; 10:819-28.
84. Shuai K, Ziemiecki A, Wilks AF, et al. Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. *Nature* 1993; 366:580-3.
85. Domanski P, Yan H, Witte MM, Krolewski J, Colamonici OR. Homodimerization and intermolecular tyrosine phosphorylation of the Tyk- 2 tyrosine kinase. *FEBS Lett* 1995; 374:317-22.
86. Imada K, Leonard WJ. The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol* 2000; 37:1-11.
87. Shuai K, Horvath CM, Huang LH, Qureshi SA, Cowburn D, Darnell JE, Jr. Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 1994; 76:821-8.
88. Ihle JN, Kerr IM. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* 1995; 11:69-74.
89. Fujitani Y, Nakajima K, Kojima H, Nakae K, Takeda T, Hirano T. Transcriptional activation of the IL-6 response element in the junB promoter is mediated by multiple Stat family proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 202:1181-7.
90. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998; 334:297-314.
91. Takeda K, Akira S. STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000; 11:199-207.

92. Takeda K, Noguchi K, Shi W, et al. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:3801-4.
93. Takeda K, Kaisho T, Yoshida N, Takeda J, Kishimoto T, Akira S. Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J Immunol* 1998; 161:4652-60.
94. Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, et al. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 1999; 10:39-49.
95. Cressman DE, Diamond RH, Taub R. Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration. *Hepatology* 1995; 21:1443-9.
96. Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1995; 270:16483-6.
97. Hsu JC, Laz T, Mohn KL, Taub R. Identification of LRF-1, a leucine-zipper protein that is rapidly and highly induced in regenerating liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:3511-5.
98. Lee YH, Williams SC, Baer M, Sterneck E, Gonzalez FJ, Johnson PF. The ability of C/EBP beta but not C/EBP alpha to synergize with an Sp1 protein is specified by the leucine zipper and activation domain. *Mol Cell Biol* 1997; 17:2038-47.
99. Stein B, Cogswell PC, Baldwin AS. Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction. *Mol Cell Biol* 1993; 13:3964-74.
100. Haber BA, Mohn KL, Diamond RH, Taub R. Induction patterns of 70 genes during nine days after hepatectomy define the temporal course of liver regeneration. *J Clin Invest* 1993; 91:1319-26.
101. Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, et al. Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 1995; 269:1108-12.

102. Rana B, Xie Y, Mischoulon D, Bucher NL, Farmer SR. The DNA binding activity of C/EBP transcription factor is regulated in the G1 phase of the hepatocyte cell cycle. *J Biol Chem* 1995; 270:18123-32.
103. Greenbaum LE, Cressman DE, Haber BA, Taub R. Coexistence of C/EBP alpha, beta, growth-induced proteins and DNA synthesis in hepatocytes during liver regeneration. Implications for maintenance of the differentiated state during liver growth. *J Clin Invest* 1995; 96:1351-65.
104. Greenbaum LE, Li W, Cressman DE, et al. CCAAT enhancer-binding protein beta is required for normal hepatocyte proliferation in mice after partial hepatectomy. *J Clin Invest* 1998; 102:996-1007.
105. Luc PV, Adesnik M, Ganguly S, Shaw PM. Transcriptional regulation of the CYP2B1 and CYP2B2 genes by C/EBP-related proteins. *Biochem Pharmacol* 1996; 51:345-56.
106. Clarkson RW, Chen CM, Harrison S, Wells C, Muscat GE, Waters MJ. Early responses of trans-activating factors to growth hormone in preadipocytes: differential regulation of CCAAT enhancer-binding protein-beta (C/EBP beta) and C/EBP delta. *Mol Endocrinol* 1995; 9:108-20.
107. Taub R, Greenbaum LE, Peng Y. Transcriptional regulatory signals define cytokine-dependent and -independent pathways in liver regeneration. *Semin Liver Dis* 1999; 19:117-27.
108. Diamond RH, Peters C, Jung SP, et al. Expression of PRL-1 nuclear PTPase is associated with proliferation in liver but with differentiation in intestine. *Am J Physiol* 1996; 271:G121-9.
109. Diehl AM. Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunol Rev* 2000; 174:160-71.
110. Kono S, Nagaike M, Matsumoto K, Nakamura T. Marked induction of hepatocyte growth factor mRNA in intact kidney and spleen in response to injury of distant

- organs. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 186:991-8.
111. Webber EM, Godowski PJ, Fausto N. In vivo response of hepatocytes to growth factors requires an initial priming stimulus. *Hepatology* 1994; 19:489-97.
 112. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000; 32:19-31.
 113. Moolten FL, Oakman NJ, Bucher NL. Accelerated response of hepatic DNA synthesis to partial hepatectomy in rats pretreated with growth hormone or surgical stress. *Cancer Res* 1970; 30:2353-7.
 114. Mead JE, Braun L, Martin DA, Fausto N. Induction of replicative competence ("priming") in normal liver. *Cancer Res* 1990; 50:7023-30.
 115. Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992; 13:151-3.
 116. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72:3666-70.
 117. Beutler B, Mahoney J, Le Trang N, Pekala P, Cerami A. Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J Exp Med* 1985; 161:984-95.
 118. Paul W. *Fundamental immunology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999.
 119. Pasparakis M, Alexopoulou L, Douni E, Kollias G. Tumour necrosis factors in immune regulation: everything that's interesting is...new! *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7:223-9.
 120. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 1987; 330:662-4.
 121. Breese EJ, Michie CA, Nicholls SW, et al. Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1994; 106:1455-66.
 122. Ziff M. Role of cytokines in rheumatoid synovitis. *Recenti Prog Med* 1988; 79:318-22.

123. Stadler J, Bentz BG, Harbrecht BG, et al. Tumor necrosis factor alpha inhibits hepatocyte mitochondrial respiration. *Ann Surg* 1992; 216:539-46.
124. Fraser A, Evan G. A license to kill. *Cell* 1996; 85:781-4.
125. Cornell RP, Liljequist BL, Bartizal KF. Depressed liver regeneration after partial hepatectomy of germ-free, athymic and lipopolysaccharide-resistant mice. *Hepatology* 1990; 11:916-22.
126. Akerman P, Cote P, Yang SQ, et al. Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol* 1992; 263:G579-85.
127. Mantovani L, Henschler R, Brach MA, et al. Differential regulation of interleukin-6 expression in human fibroblasts by tumor necrosis factor-alpha and lymphotxin. *FEBS Lett* 1990; 270:152-6.
128. Kimura T, Sakaida I, Terai S, Matsumura Y, Uchida K, Okita K. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha production retards liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 231:557-60.
129. Westwick JK, Weitzel C, Leffert HL, Brenner DA. Activation of Jun kinase is an early event in hepatic regeneration. *J Clin Invest* 1995; 95:803-10.
130. Yamada Y, Webber EM, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Analysis of liver regeneration in mice lacking type 1 or type 2 tumor necrosis factor receptor: requirement for type 1 but not type 2 receptor [comment]. *Hepatology* 1998; 28:959-70.
131. Yamada Y, Fausto N. Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor. *Am J Pathol* 1998; 152:1577-89.
132. Fujita J, Marino MW, Wada H, et al. Effect of TNF gene depletion on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Surgery* 2001; 129:48-54.
133. Marino MW, Dunn A, Grail D, et al. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:8093-8.
134. Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev*

- Immunol 1997; 15:797-819.
135. Hibi M, Nakajima K, Hirano T. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J Mol Med* 1996; 74:1-12.
 136. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986; 324:73-6.
 137. Kishimoto T, Akira S, Taga T. IL-6 receptor and mechanism of signal transduction. *Int J Immunopharmacol* 1992; 14:431-8.
 138. Peters M, Muller AM, Rose-John S. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood* 1998; 92:3495-504.
 139. Hirano T, Matsuda T, Nakajima K. Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the interleukin 6 related cytokine subfamily. *Stem Cells* 1994; 12:262-77.
 140. Taga T. IL6 signalling through IL6 receptor and receptor-associated signal transducer, gp130. *Res Immunol* 1992; 143:737-9.
 141. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994; 15:74-80.
 142. Decker K. The response of liver macrophages to inflammatory stimulation. *Keio J Med* 1998; 47:1-9.
 143. Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, et al. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 1996; 274:1379-83.
 144. Peters M, Schirmacher P, Goldschmitt J, et al. Extramedullary expansion of hematopoietic progenitor cells in interleukin (IL)-6-sIL-6R double transgenic mice. *J Exp Med* 1997; 185:755-66.
 145. Schirmacher P, Peters M, Ciliberto G, et al. Hepatocellular hyperplasia, plasmacytoma formation, and extramedullary hematopoiesis in interleukin (IL)-6/soluble IL-6 receptor double-transgenic mice. *Am J Pathol* 1998; 153:639-48.

146. Maione D, Di Carlo E, Li W, et al. Coexpression of IL-6 and soluble IL-6R causes nodular regenerative hyperplasia and adenomas of the liver. *Embo J* 1998; 17:5588-97.
147. Wuestefeld T, Rakeman T, Kubicka S. Prolonged STAT3 activation leads to delayed cell proliferation after partial hepatectomy. *Hepatology* 1999; 30:404A.
148. Camargo CA, Jr., Madden JF, Gao W, Selvan RS, Clavien PA. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology* 1997; 26:1513-20.
149. Selzner M, Camargo CA, Clavien PA. Ischemia impairs liver regeneration after major tissue loss in rodents: protective effects of interleukin-6. *Hepatology* 1999; 30:469-75.
150. Mizuhara H, O'Neill E, Seki N, et al. T cell activation-associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6. *J Exp Med* 1994; 179:1529-37.
151. Galun E, Zeira E, Pappo O, Peters M, Rose-John S. Liver regeneration induced by a designer human IL-6/sIL-6R fusion protein reverses severe hepatocellular injury. *Faseb J* 2000; 14:1979-87.
152. Peters M, Blinn G, Jostock T, et al. Combined interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor accelerates murine liver regeneration. *Gastroenterology* 2000; 119:1663-71.
153. Matsuguchi T, Okamura S, Kawasaki C, Niho Y. Production of interleukin 6 from human liver cell lines: production of interleukin 6 is not concurrent with the production of alpha-fetoprotein. *Cancer Res* 1990; 50:7457-9.
154. Stonans I, Stonane E, Russwurm S, et al. HepG2 human hepatoma cells express multiple cytokine genes. *Cytokine* 1999; 11:151-6.
155. Su GL, Dorko K, Strom SC, Nussler AK, Wang SC. CD14 expression and production by human hepatocytes. *J Hepatol* 1999; 31:435-42.

156. Bouwens L, De Bleser P, Vanderkerken K, Geerts B, Wisse E. Liver cell heterogeneity: functions of non-parenchymal cells. *Enzyme* 1992; 46:155-68.
157. Mizoguchi Y, Ichikawa Y, Kioka K, Kawada N, Kobayashi K, Yamamoto S. Effects of arachidonic acid metabolites and interleukin-1 on platelet activating factor production by hepatic sinusoidal endothelial cells from mice. *J Gastroenterol Hepatol* 1991; 6:283-8.
158. Feder LS, Todaro JA, Laskin DL. Characterization of interleukin-1 and interleukin-6 production by hepatic endothelial cells and macrophages. *J Leukoc Biol* 1993; 53:126-32.
159. Geerts A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21:311-35.
160. Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21:397-416.
161. McCrudden R, Iredale JP. Liver fibrosis, the hepatic stellate cell and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Histol Histopathol* 2000; 15:1159-68.
162. Friedman SL. Stellate cell activation in alcoholic fibrosis—an overview. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23:904-10.
163. Burt AD, Robertson JL, Heir J, MacSween RN. Desmin-containing stellate cells in rat liver; distribution in normal animals and response to experimental acute liver injury. *J Pathol* 1986; 150:29-35.
164. Greenwel P, Schwartz M, Rosas M, Peyrol S, Grimaud JA, Rojkind M. Characterization of fat-storing cell lines derived from normal and CCl₄-cirrhotic livers. Differences in the production of interleukin-6. *Lab Invest* 1991; 65:644-53.
165. Greenwel P, Rubin J, Schwartz M, Hertzberg EL, Rojkind M. Liver fat-storing cell clones obtained from a CCl₄-cirrhotic rat are heterogeneous with regard to proliferation, expression of extracellular matrix components, interleukin-6, and connexin 43. *Lab Invest* 1993; 69:210-6.

166. Tiggelman AM, Boers W, Linthorst C, Brand HS, Sala M, Chamuleau RA. Interleukin-6 production by human liver (myo)fibroblasts in culture. Evidence for a regulatory role of LPS, IL-1 beta and TNF alpha. *J Hepatol* 1995; 23:295-306.
167. Winwood PJ, Arthur MJ. Kupffer cells: their activation and role in animal models of liver injury and human liver disease. *Semin Liver Dis* 1993; 13:50-9.
168. Yoshioka M, Ito T, Miyazaki S, Nakajima Y. The release of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1, interleukin- 6 and prostaglandin E2 in bovine Kupffer cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 66:301-7.
169. Hoffmann R, Grewe M, Estler HC, Schulze-Specking A, Decker K. Regulation of tumor necrosis factor-alpha-mRNA synthesis and distribution of tumor necrosis factor-alpha-mRNA synthesizing cells in rat liver during experimental endotoxemia. *J Hepatol* 1994; 20:122-8.
170. Loffreda S, Rai R, Yang SQ, Lin HZ, Diehl AM. Bile ducts and portal and central veins are major producers of tumor necrosis factor alpha in regenerating rat liver. *Gastroenterology* 1997; 112:2089-98.
171. Callery MP, Mangino MJ, Kamei T, Flye MW. Interleukin-6 production by endotoxin-stimulated Kupffer cells is regulated by prostaglandin E2. *J Surg Res* 1990; 48:523-7.
172. Roland CR, Goss JA, Mangino MJ, Hafenrichter D, Flye MW. Autoregulation by eicosanoids of human Kupffer cell secretory products. A study of interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, and nitric oxide. *Ann Surg* 1994; 219:389-99.
173. Schlayer HJ, Laaff H, Peters T, et al. Involvement of tumor necrosis factor in endotoxin-triggered neutrophil adherence to sinusoidal endothelial cells of mouse liver and its modulation in acute phase. *J Hepatol* 1988; 7:239-49.
174. Wisse E, Knook DL. Kupffer cells and other liver sinusoidal cells. Amsterdam:

- Elsevier, 1977.
175. Bouwens L, Baekeland M, De Zanger R, Wisse E. Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology* 1986; 6:718-22.
 176. Naito F. In: Wisse E, Knook DL, Balabaud C, eds. *Cells of the Hepatic Sinusoid*. Leiden, The Netherlands: The Kupffer Cell Foundation, 1996:394.
 177. Bouwens L, Knook DL, Wisse E. Local proliferation and extrahepatic recruitment of liver macrophages (Kupffer cells) in partial-body irradiated rats. *J Leukoc Biol* 1986; 39:687-97.
 178. Freudenberg N, Freudenberg MA, Hoess CD, Schrecker H, Galanos C. Investigation into the origin of mouse liver sinusoidal cells. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1986; 410:1-7.
 179. Geerts A, Schellinck P, Bouwens L, Wisse E. Cell population kinetics of Kupffer cells during the onset of fibrosis in rat liver by chronic carbon tetrachloride administration. *J Hepatol* 1988; 6:50-6.
 180. Bouwens L, Baekeland M, Wisse E. Importance of local proliferation in the expanding Kupffer cell population of rat liver after zymosan stimulation and partial hepatectomy. *Hepatology* 1984; 4:213-9.
 181. Bouwens L, Wisse E. Proliferation, kinetics, and fate of monocytes in rat liver during a zymosan-induced inflammation. *J Leukoc Biol* 1985; 37:531-43.
 182. Yoshimura S, Kamada N. Effect of cyclosporin A on liver regeneration following partial hepatectomy in the mouse. *Transplant Proc* 1989; 21:911-2.
 183. Wiktor-Jedrzejczak W, Urbanowska E, Szperl M. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor corrects macrophage deficiencies, but not osteopetrosis, in the colony-stimulating factor-1- deficient op/op mouse. *Endocrinology* 1994; 134:1932-5.
 184. Lazar G. The reticuloendothelial-blocking effect of rare earth metals in rats. *J*

- Reticuloendothel Soc 1973; 13:231-7.
185. Hardonk MJ, Dijkhuis FW, Hulstaert CE, Koudstaal J. Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride-induced elimination and repopulation. *J Leukoc Biol* 1992; 52:296-302.
 186. Edwards MJ, Keller BJ, Kauffman FC, Thurman RG. The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; 119:275-9.
 187. Adachi Y, Bradford BU, Gao W, Bojes HK, Thurman RG. Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology* 1994; 20:453-60.
 188. Zhong Z, Connor HD, Mason RP, et al. Role of Kupffer cells in reperfusion injury in fat-loaded livers from ethanol-treated rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275:1512-7.
 189. Rai RM, Yang SQ, McClain C, Karp CL, Klein AS, Diehl AM. Kupffer cell depletion by gadolinium chloride enhances liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Am J Physiol* 1996; 270:G909-18.
 190. Rai RM, Loffreda S, Karp CL, Yang SQ, Lin HZ, Diehl AM. Kupffer cell depletion abolishes induction of interleukin-10 and permits sustained overexpression of tumor necrosis factor alpha messenger RNA in the regenerating rat liver. *Hepatology* 1997; 25:889-95.
 191. Hardonk MJ, Dijkhuis FWJ, Jonker AM. Selective depletion of Kupffer cells by gadolinium chloride attenuates both acute galactosamine-induced hepatitis and carbon tetrachloride toxicity in rats. In: Wisse E, Knook DL, Balabaud C, eds. *Cells of the Hepatic Sinusoid*. Leiden, The Netherlands: The Kupffer cell Foundation, 1996:28-32.
 192. Rose ML, Bradford BU, Germolec DR, Lin M, Tsukamoto H, Thurman RG. Gadolinium chloride-induced hepatocyte proliferation is prevented by antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 170:39-45.
 193. Rai RM, Zhang JX, Clemens MG, Diehl AM. Gadolinium chloride alters the acinar distribution of phagocytosis and balance between pro- and anti-inflammatory

- cytokines. *Shock* 1996; 6:243-7.
- 194.** Takeishi T, Hirano K, Kobayashi T, Hasegawa G, Hatakeyama K, Naito M. The role of Kupffer cells in liver regeneration. *Arch Histol Cytol* 1999; 62:413-22.
- 195.** Van Rooijen N, Kors N, vd Ende M, Dijkstra CD. Depletion and repopulation of macrophages in spleen and liver of rat after intravenous treatment with liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Cell Tissue Res* 1990; 260:215-22.
- 196.** Boulton RA, Alison MR, Golding M, Selden C, Hodgson HJ. Augmentation of the early phase of liver regeneration after 70% partial hepatectomy in rats following selective Kupffer cell depletion. *J Hepatol* 1998; 29:271-80.
- 197.** Meijer C, Wiezer MJ, Diehl AM, et al. Kupffer cell depletion by Cl²MDP-liposomes alters hepatic cytokine expression and delays liver regeneration after partial hepatectomy. *Liver* 2000; 20:66-77.
- 198.** Thomson AW, Lu L, Murase N, Demetris AJ, Rao AS, Starzl TE. Microchimerism, dendritic cell progenitors and transplantation tolerance. *Stem Cells* 1995; 13:622-39.
- 199.** Ilan Y, Chowdhury JR. Induction of tolerance to hepatitis B virus: can we 'eat the disease' and live with the virus? *Med Hypotheses* 1999; 52:505-9.
- 200.** Limmer A, Knolle PA. Liver sinusoidal endothelial cells: a new type of organ-resident antigen-presenting cell. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2001; 49:S7-11.
- 201.** Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* 2000; 174:21-34.
- 202.** Kim YI, Joo DH. Suppression of liver regeneration by T lymphocytes. *Transplant Proc* 1998; 30:3260-2.
- 203.** Sato Y, Tsukada K, Matsumoto Y, Abo T. Interferon-gamma inhibits liver regeneration by stimulating major histocompatibility complex class II antigen expression by regenerating liver. *Hepatology* 1993; 18:340-6.

204. Sato Y, Tsukada K, Yoshida K, Muto T, Matumoto Y. FK 506 suppresses class II antigen expression in regenerating livers following partial hepatectomy in the rat. *Transplant Proc* 1992; 24:1628-30.
205. Wisse E, van't Noordende JM, van der Meulen J, Daems WT. The pit cell: description of a new type of cell occurring in rat liver sinusoids and peripheral blood. *Cell Tissue Res* 1976; 173:423-35.
206. Bouwens L, Wisse E. Immuno-electron microscopic characterization of large granular lymphocytes (natural killer cells) from rat liver. *Eur J Immunol* 1987; 17:1423-8.
207. Hata K, Zhang XR, Iwatsuki S, Van Thiel DH, Herberman RB, Whiteside TL. Isolation, phenotyping, and functional analysis of lymphocytes from human liver. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 56:401-19.
208. Francavilla A, Vujanovic NL, Polimeno L, et al. The in vivo effect of hepatotrophic factors augments liver regeneration, hepatocyte growth factor, and insulin-like growth factor-II on liver natural killer cell functions. *Hepatology* 1997; 25:411-5.
209. Fowlkes BJ, Kruisbeek AM, Ton-That H, et al. A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family. *Nature* 1987; 329:251-4.
210. Vicari AP, Zlotnik A. Mouse NK1.1+ T cells: a new family of T cells. *Immunol Today* 1996; 17:71-6.
211. Sykes M. Unusual T cell populations in adult murine bone marrow. Prevalence of CD3+CD4-CD8- and alpha beta TCR+ NK1.1+ cells. *J Immunol* 1990; 145:3209-15.
212. Arase H, Arase N, Kobayashi Y, Nishimura Y, Yonehara S, Onoe K. Cytotoxicity of fresh NK1.1+ T cell receptor alpha/beta+ thymocytes against a CD4+8+ thymocyte population associated with intact Fas antigen expression on the target. *J Exp Med* 1994; 180:423-32.
213. Watanabe H, Iiai T, Kimura M, et al. Characterization of intermediate TCR cells in

- the liver of mice with respect to their unique IL-2R expression. *Cell Immunol* 1993; 149:331-42.
- 214.** Watanabe H, Miyaji C, Kawachi Y, et al. Relationships between intermediate TCR cells and NK1.1+ T cells in various immune organs. NK1.1+ T cells are present within a population of intermediate TCR cells. *J Immunol* 1995; 155:2972-83.
- 215.** Sato K, Ohtsuka K, Hasegawa K, et al. Evidence for extrathymic generation of intermediate T cell receptor cells in the liver revealed in thymectomized, irradiated mice subjected to bone marrow transplantation. *J Exp Med* 1995; 182:759-67.
- 216.** Kawachi Y, Watanabe H, Moroda T, et al. Self-reactive T cell clones in a restricted population of interleukin-2 receptor beta+ cells expressing intermediate levels of the T cell receptor in the liver and other immune organs. *Eur J Immunol* 1995; 25:2272-8.
- 217.** Ohtsuka K, Hasegawa K, Sato K, et al. A similar expression pattern of adhesion molecules between intermediate TCR cells in the liver and intraepithelial lymphocytes in the intestine. *Microbiol Immunol* 1994; 38:677-83.
- 218.** Minagawa M, Oya H, Yamamoto S, et al. Intensive expansion of natural killer T cells in the early phase of hepatocyte regeneration after partial hepatectomy in mice and its association with sympathetic nerve activation. *Hepatology* 2000; 31:907-15.
- 219.** Suzuki S, Toyabe S, Moroda T, et al. Circadian rhythm of leucocytes and lymphocytes subsets and its possible correlation with the function of the autonomic nervous system. *Clin Exp Immunol* 1997; 110:500-8.
- 220.** Kopf M, Baumann H, Freer G, et al. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 1994; 368:339-42.
- 221.** Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 1983; 301:527-30.
- 222.** Schuler W, Weiler IJ, Schuler A, et al. Rearrangement of antigen receptor genes is

- defective in mice with severe combined immune deficiency. *Cell* 1986; 46:963-72.
- 223.** Boubnov NV, Weaver DT. scid cells are deficient in Ku and replication protein A phosphorylation by the DNA-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 1995; 15:5700-6.
- 224.** Carroll AM, Bosma MJ. Detection and characterization of functional T cells in mice with severe combined immune deficiency. *Eur J Immunol* 1988; 18:1965-71.
- 225.** Dorshkind K, Pollack SB, Bosma MJ, Phillips RA. Natural killer (NK) cells are present in mice with severe combined immunodeficiency (scid). *J Immunol* 1985; 134:3798-801.
- 226.** Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, et al. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 1992; 68:855-67.
- 227.** Roder J, Duwe A. The beige mutation in the mouse selectively impairs natural killer cell function. *Nature* 1979; 278:451-3.
- 228.** Barbosa MD, Nguyen QA, Tchernev VT, et al. Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes. *Nature* 1996; 382:262-5.
- 229.** Krasinskas AM, Eiref SD, McLean AD, et al. Replacement of graft-resident donor-type antigen presenting cells alters the tempo and pathogenesis of murine cardiac allograft rejection. *Transplantation* 2000; 70:514-21.
- 230.** Smedsrod B, Pertoft H. Preparation of pure hepatocytes and reticuloendothelial cells in high yield from a single rat liver by means of Percoll centrifugation and selective adherence. *J Leukoc Biol* 1985; 38:213-30.
- 231.** Yoshioka M, Nakajima Y, Ito T, et al. Primary culture and expression of cytokine mRNAs by lipopolysaccharide in bovine Kupffer cells. *Vet Immunol Immunopathol* 1997; 58:155-63.
- 232.** Zhu XL, Pacheco ND, Dick EJ, Rollwagen FM. Differentially increased IL-6 mRNA expression in liver and spleen following injection of liposome-encapsulated hae-

- moglobin. *Cytokine* 1999; 11:696-703.
- 233.** Goossens PL, Jouin H, Marchal G, Milon G. Isolation and flow cytometric analysis of the free lymphomyeloid cells present in murine liver. *J Immunol Methods* 1990; 132:137-44.
- 234.** Rokicki M, Rokicki W. Liver regeneration in rats after complete and partial occlusion of the portal blood influx. *Res Exp Med (Berl)* 1993; 193:305-13.
- 235.** Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284:1168-70.
- 236.** Theise ND, Badve S, Saxena R, et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000; 31:235-40.
- 237.** Imamura H, Sutto F, Brault A, Huet PM. Role of Kupffer cells in cold ischemia/reperfusion injury of rat liver. *Gastroenterology* 1995; 109:189-97.
- 238.** Kukan M, Vajdova K, Horecky J, Nagyova A, Mehendale HM, Trnovec T. Effects of blockade of Kupffer cells by gadolinium chloride on hepatobiliary function in cold ischemia-reperfusion injury of rat liver. *Hepatology* 1997; 26:1250-7.
- 239.** Lieber A, He CY, Meuse L, et al. The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors. *J Virol* 1997; 71:8798-807.
- 240.** Lichtman SN, Lemasters JJ. Role of cytokines and cytokine-producing cells in reperfusion injury to the liver. *Semin Liver Dis* 1999; 19:171-87.
- 241.** Peters JM, Rusyn I, Rose ML, Gonzalez FJ, Thurman RG. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is restricted to hepatic parenchymal cells, not Kupffer cells: implications for the mechanism of action of peroxisome proliferators in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21:823-6.
- 242.** Zhong Z, Connor H, Mason RP, et al. Destruction of Kupffer cells increases survival and reduces graft injury after transplantation of fatty livers from ethanol-treated rats. *Liver Transpl Surg* 1996; 2:383-7.

243. Kono H, Rusyn I, Yin M, et al. NADPH oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J Clin Invest* 2000; 106:867-72.

Conclusions

- El trasplantament del moll de l'os singènic s'ha confirmat com un mètode experimental útil per aconseguir el reemplaçament de les cèl·lules de Kupffer del donant en el fetge del receptor a través de:
 - A) La demostració en trasplantament singènic de moll d'os de ratolins mascles en receptors ratolins femelles amb la detecció posterior de la regió SRY del cromosoma Y dins del fetge i en les cèl·lules de Kupffer aïllades.
 - B) La localització dels al·lels del gen d' IL-6 en les cèl·lules de Kupffer i l'augment en la producció d'IL-6 dins del fetge, també específicament a les cèl·lules de Kupffer, en el moment en que es practica l'hepatectomia parcial en animals IL-6 KO que han rebut moll d'os de la soca salvatge.
- La IL-6 secretada a nivell intrahepàtic per cèl·lules derivades del moll de l'os, amb les cèl·lules de Kupffer com a font més probable, és la responsable del senyal iniciador de la regeneració hepàtica post-hepatectomia parcial per la demostració de l'activació d'STAT3, seguit per la replicació hepatocitària després d'hepatectomia parcial en ratolins IL-6 KO rescatats amb moll d'os de la soca salvatge.
- Els animals immunodeficients Rag-1 KO, SCID i SCID beige no contenen una població de cèl·lules NK T al seu fetge.
- La regeneració hepàtica post-hepatectomia parcial es desenvolupa en normalitat en els animals deficients immunològicament abans esmentats que només compten amb la línia macrofàgica com a normofuncionant. Aquest fet que reforça el paper de les cèl·lules de Kupffer com a les úniques necessàries i suficients per a fer possible l'activació de la regeneració hepàtica.
- De les conclusions anteriors se'n deriva que una funció macrofàgica intacta és fonamental per a la posada en moviment del procés de regeneració hepàtica, fet a tenir

molt en compte a l'hora de l'establiment de teràpies adequades en situacions d'immunosupressió i en que participen fenòmens de regeneració com ara el trasplantament hepàtic.

- Finalment, el present treball estableix el trasplantament de moll d'os com una nova eina experimental per a l'estudi de la interacció específica de l'eix macròfag-hepatòcit en multitud de processos fisiològics i fisiopatològics al fetge