



El mite de Prometeu. Rubens. Museu d'Art de Filadèlfia.

TESI DOCTORAL XAVIER ALDEGUER I MANTE

LA INTERLEUCINA-6 SECRETADA PER LES CÈL·LULES
DE KUPFFER ÉS LA RESPONSABLE DE LA INICIACIÓ DEL
PROCÉS DE REGENERACIÓ HEPÀTICA POST-HEPATECTOMIA
PARCIAL EN UN MODEL ANIMAL EXPERIMENTAL

Girona, 16 de novembre de 2003

Agraïments i dedicatòria

Aquesta tesi no hauria estat possible sense l'ajut, col·laboració i suport emocional de molta gent amb la que em sento deutor d'una manera o una altra. Humilment, dedico aquesta tesi a tothom al llarg de la vida que m'hagi acompanyat i ajudat a assolir els meus objectius professionals i acadèmics. Però, específicament dedico aquesta tesi i agraeixo:

- Els tutors de la meva tesi, els Doctors Miquel Angel Gassull i Abraham Shaked pel seu mestratge en la realització d'aquest treball.
- La Doctora Kim Olthoff, cap del meu equip de Laboratori de Trasplantament Hepàtic del Departament Harrison de Recerca Quirúrgica de la Universitat de Pensilvània, Filadèlfia als EEUU, a on he realitzat aquest estudi per l'oportunitat que em va donar, així com el Dr. John Rombeau per haver-me acceptat inicialment a la Universitat de Pensilvània.
- Els meus companys i amics de l'equip de laboratori, especialment i per sobre de tots, els Doctors en Biologia Fotini Debonera i Andrew Gelman amb qui he compartit hores interminables de feina i sense l'ajuda tècnica dels quals aquest treball hauria tingut moltes dificultats per a dur-se a bon port.
- Tot l'equip del Servei de Digestiu de l'Hospital Universitari "Doctor Josep Trueta" de Girona compostat pel seu cap Dr Acero, el Dr. González-Huix, Dra. Figa, Dra Hombrados i Dra Fort, del qual n'estic orgullòs de formar-hi part, per haver-me donat l'oportunitat de reincorporar-me a la tasca mèdica al meu país.
- L'entitat "La Caixa" per haver-me proveït del suport econòmic per a la meva estada als EEUU a través de la seva Beca per a post-graduats.

- El Dr. Adolfo Río pels seus consells científics.
- La meva colla de Filadèlfia, Oriol, Xavi, Pau (i la Roser), Marco, Massi, Eileen, Ruth, Jean i els meus companys de pis carregats de paciència, Mònica i Javi, per la seva amistat i companyonia tan apreciada quan un es troba lluny de casa.
- Els meus avis, Joan i Engràcia, que van mostrar una paciència i amor infinits durant els meus estudis de carrera a Barcelona.
- Els meus germans, Lluís i Carles, per la seva solidaritat sense límits amb el seu “germà gran”.
- Els meus pares, Lluís i Paquita, pel seu amor que m’ha sabut mostrar el camí a seguir i el seu suport incondicional sense el qual aquest treball i molts dels objectius assolits al llarg de la meva vida no haurien estat possibles.
- A la meva dona, Teresa, per acceptar el repte de compartir la seva vida amb mi.

INDEX

INTRODUCCIÓ	1
Regeneració hepàtica i control de la massa cel.lular hepàtica. Definició.	1
■ Factors de creixement: Mitògens, adjuvants i inhibidors	6
■ Factor de creixement de l'hepatòcit (HGF)	8
■ Factor de creixement transformant a (TGF-a) i factor de creixement epitelial (EGF).....	10
■ Factor de creixement epidèrmic amb capacitat d'unió a l'heparina (HB-EGF)	12
■ Factor de creixement àcidic del fibroblast (aFGF)	13
■ Factor de creixement dels queratinòcits (KGF)	14
■ Augmentador de la regeneració hepàtica (ALR).....	14
■ Insulina	15
■ Noradrenalina	16
■ Factor de creixement similar a la insulina tipus 2 (IGF-2)	16
Expressió de gens del cicle cel.lular durant la regeneració hepàtica	17
Activació de factors de transcripció després d'hepatectomia parcial	18
■ NF-kB	19
■ STAT3	23
■ AP-1	24
■ C/EBP	25
■ Altres factors	27

Etapes en la resposta proliferativa durant la regeneració hepàtica:	
Sensibilització i progressió	28
■ Etapa de sensibilització o "priming". Paper de TNF i IL-6.	28
■ TNF (Factor de necrosi tumoral)	30
■ Interleucina 6 (IL-6)	34
La font específica d'interleucina 6 en la fase de sensibilització	
de la regeneració hepàtica: Una qüestió no resolta	40
■ Cèl.lules sinusoidals	41
■ Cèl.lules de Kupffer	44
■ Cèl.lules del sistema immunològic al fetge	56
HIPÒTESI I OBJECTIUS	64
MATERIAL I MÈTODES	67
Animals	67
■ Ratolins IL-6 knockout:	67
■ Ratolins SCID	68
■ Ratolins RAG 2 knockout.....	69
■ Ratolins SCID-beige	70
Trasplantament de moll d'os	70
Procediment quirúrgic	72
Aïllament de les cèl.lules de Kupffer	72

Activitat de l'esterasa no específica en les cèl.lules de Kupffer purificades	73
Extracció d'ADN i reacció de la polimerasa en cadena (PCR) per a SRY i neogen IL-6	74
Aïllament d'esplenòcits	75
Extracció d'ARNm i mesura semiquantitativa de citocines per transcripció inversa de la reacció en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	75
Extractes Nuclears i Assaig Electroforètic de Mobilitat "Shift" (EMSA)	77
Immunohistoquímica per a Bromodesoxiuridina (BrdU)	80
Aïllament de limfòcits intrahepàtics	81
Citometria de flux	82
Anàlisi estadística	82
RESULTATS	83
Empeltament exitós en el fetge de les cèl.lules derivades del moll d'os trasplantat	83
Grups d'estudi i supervivència post-irradiació i post-hepatectomia parcial	86
Capacitat de secreció d'IL-6 en els animals IL-6 -/- quimèrics	87
Producció d'IL-6 intrahepàtica en els animals IL-6 -/- quimèrics	89

Restauració de l'activació d'STAT3 post-hepatectomia parcial.	91
Síntesi d'ADN i regeneració hepàtica normal en els animals IL-6 +/- quimèrics	93
Patró regeneratiu en els animals immunodeficients.....	96
Anàlisi de les cèl.lules NK T intrahepàtiques en els animals immunodeficients	97
Discussió	99
Index d'il.lustracions	108
Bibliografia	110

Introducció

REGENERACIÓ HEPÀTICA I CONTROL DE LA MASSA CEL·LULAR HEPÀTICA. DEFINICIÓ.

El fetge és un dels pocs òrgans en repòs en situació normal, que és capaç de regular el seu creixement i tamany per a recuperar la seva massa original després de pèrdua tissular tant sigui funcional (insult tòxic, infeccions, isquèmic...) com física (hepatectomia parcial...) en un procés conegut com a regeneració hepàtica.

La regeneració hepàtica és un fenomen que, probablement, ha aparegut en el procés evolutiu de les espècies per a protegir els animals de l'efecte deleteri en la funció hepàtica que comporta la ingesta de toxines d'origen alimentari. Aquest fenomen era ja conegut pels antics grecs com queda palès en el mite de Prometeu. Aquest, havent tingut la "gosadia" de robar el secret del foc als déus de l'Olimp, va ésser castigat per Zeus. El seu turment consistia en una àliga que es nodria d'una porció del seu fetge cada dia. El fetge recuperava de nou el seu tamany natural al llarg de la nit, amb el que la condemna esdevenia eterna.

A l'era moderna, la majoria dels coneixements que es compten sobre aquest fenomen s'han obtingut d'un model més fidedigne i reproduïble, l'estudi de la regeneració hepàtica després d'hepatectomia parcial (HP) en ratolins i rates. Aquest sistema, fou introduït per Higgins i Anderson¹ ja fa uns 70 anys, i consisteix en una simple operació en la que s'extreuen dos terços del fetge dels rossegadors. El procés és dut a terme pels lòbuls residuals que augmenten de tamany fins a assolir la mateixa massa que ocupaven els lòbuls extrets. Aquesta regeneració es duu a terme en un període de 5-7 dies en aquests

animals. Aquest sistema experimental permet l'estudi dels processos que condueixen a la replicació hepatocitària i el seu retorn al seu estat no proliferatiu habitual. L'hepatectomia parcial és l'estímul regeneratiu més emprat perquè ofereix dos grans avantatges² quan es compara amb altres mètodes basats en la inducció de toxicitat hepàtica (com ara el tetraclorur de carboni (CCl₄)). Per una banda, en aquest no s'hi associen factors derivats de la lesió tissular i de la inflamació que poden entorpir o confondre els resultats i, per l'altra, hi podem establir amb precisió l'inici del procés (l'extracció dels lòbuls). Encara que els aspectes moleculars del creixement hepàtic en humans no s'han establert en detall, els estudis amb animals han fet avançar en la comprensió dels processos reguladors del creixement hepàtic que permetran aportar informació important per a l'estudi del procés regeneratiu als humans.

Encara que aquest treball es focalitzarà en el model de resposta regenerativa del fetge després d'hepatectomia parcial, caldria assenyalar, arribats a aquest punt, que el fenomen de regeneració hepàtica es pot incloure en un procés més general que podríem anomenar *remodelació* hepàtica i que es definiria com el conjunt de processos involucrats en el control del tamany del fetge³. Hi ha evidències que demostren que la massa hepàtica està íntimament regulada i que senyals provinents del propi organisme poden tenir un efecte tant positiu com negatiu². Un efecte o un altre dependrà de la relació constant entre la massa hepàtica i la massa corporal de l'individu. Els mecanismes de *remodelació* hepàtica es posen en funcionament en processos que disminueixen la massa hepàtica com ara l'hepatectomia parcial o el trasplantament "parcial" de fetge (trasplantaments de mig fetge)⁴o en processos de lesió o mort cel·lular com hepatitis d'origen tòxic o infeccios. De la mateixa manera, situacions d'excés tissular, com els trasplantaments a infants de fetges adults o la hiperplàsia induïda per fàrmacs, són compensades un cop s'elimina la causa d'aquesta hiperfuncionalitat. Aquestes observacions són corroborades en estudis en animals de gran tamany (gossos i primats) en els que s'evidencia que la resposta regenerativa és proporcional a la quantitat de fetge extret.

També ha quedat demostrat que en el trasplantament de fetges de gossos de tamany gran a gossos de tamany més petit, el fetge trasplantat es redueix⁵. En canvi, fetges de mandrils trasplantats a humans ràpidament s'han engrandit (1 setmana) fins a adquirir el tamany humà⁶. Els processos reguladors de la *remodelació* hepàtica són per sí mateixos, sens dubte, un camp ampli i de desafiament científic però, com ja hem esmentat, el treball que aquí es presenta es basa en el model de regeneració hepàtica post-hepatectomia i és en aquest model on focalitzarem tota la nostra discussió.

En contrast amb d'altres teixits amb capacitat regenerativa (moll d'os, pell), la regeneració hepàtica no depèn d'un petit grup de cèl·lules progenitores o cèl·lules mare ("stem cells", en la seva nomenclatura anglesa). Aquesta asseveració, però, no es compleix en el 100% de les situacions, especialment, quan hi ha algun factor que inhibeix la proliferació dels hepatòcits madurs. En aquest cas, apareixen un nombre significatiu de cèl·lules mare que intenten suplir la incapacitat de les cèl·lules madures. Aquest ha estat un procés que ha quedat ben establert en diversos estudis⁷ i al qual ens tornarem a referir més endavant en aquest treball. En circumstàncies normals, apart dels hepatòcits, la regeneració hepàtica es duu a terme associada a la proliferació de totes les altres poblacions de cèl·lules madures que hi ha en el fetge. Així també hi ha proliferació de cèl·lules epitelials biliars (que constitueixen els conductes biliars), cèl·lules endotelials fenestrades (que conformen els sinusoides hepàtics), cèl·lules de Kupffer (macròfags hepàtics) i les cèl·lules d'Ito (cèl·lules estel·lades del fetge). La proliferació d'aquest conjunt de cèl·lules és necessària per a la recuperació de tot el teixit hepàtic perdut.

La sincronització del procés regeneratiu ha quedat establerta en la literatura³. Les primeres cèl·lules en replicar són els hepatòcits. Aquest procés està molt ben sincronitzat i involucra la replicació de més del 95% d'aquestes cèl·lules en les rates i ratolins joves^{8,9}. Després de l'hepatectomia parcial, els hepatòcits entren en una "fase pre-replicativa" que dura de 12 a 14 hores en rates i de 24 a 30 hores en ratolins. Durant aquesta fase el nivell de replicació d'ADN a l'hepatòcit no és molt diferent dels animals controls¹, però

s'acaba produint un pic de síntesi d'ADN a les 24 o 36 h en les rates i els ratolins, respectivament, seguida de mitosi. La proliferació s'inicia a les àrees periportals a on hi ha una major irrigació sanguínia i s'extén cap a les àrees pericentrals dels lòbuls. Després de l'hepatectomia parcial, hi ha una disminució en el nombre de molècules d'adhesió cel·lular i de proteïnes que conformen les unions *gap*. Els hepatòcits perden les seves interconnexions i, com a mitja, queden units a un sol hepatòcit quan, en normalitat, contacten amb 5 o 6 a l'hora. La primera onada de replicació succeeix abans de la remodelació dels sinusoides pel que les noves cèl·lules no són incorporades directament en una estructura acinar sinó que queden distribuïdes en agrupacions. La remodelació dels nous acins succeeix moltes hores després, amb l'aparició dels nous sinusoides, que són fruit de la transformació dels capil·lars que envolten aquestes agrupacions hepatocitàries inicials, i amb la síntesi de laminina per part de les cèl·lules d'Ito que comencen a contactar, amb els seus processos, amb els nous hepatòcits. Al voltant del 7è dia, la histologia hepàtica destaca perquè els lòbulets són més grans en tamany que abans de la regeneració però no queda clar encara si, al final, en aquesta restauració del tamany original de l'òrgan hi ha un increment net en el nombre de lòbulets o si és només dependent de l'increment de tamany en els lòbulets existents. Probablement es tracti d'una combinació d'ambdós fenòmens^{2, 10}.

Els estudis de regeneració hepàtica en els últims anys s'han centrat en la identificació del factor o factors que enllacen l'hepatectomia parcial amb el procés posterior que se'n deriva i que provoca la proliferació hepatocitària. Un gran nombre de treballs s'han dedicat a la caracterització de protooncogens, factors de creixement, i factors de transcripció com agents que poden connectar els fenòmens inicials post-hepatectomia parcial amb la síntesi d'ADN.

¹ Animals als que es practica una operació simulada, és a dir, obrir i tancar l'abdomen sense cap altre procediment.

Des d'una perspectiva purament biològica, la regeneració hepàtica representa el pas de les cèl·lules des d'un estat de repòs, conegut com a fase G_0 , a l'inici del cicle cel·lular, a un estat replicatiu o de mitosi (fase M). Les cèl·lules entren el cicle cel·lular (fase G_1), i progressen a través del cicle amb la síntesi d'ADN (fase S) i mitosi (fase M) com a culminació de tot el procés. Entre la síntesi d'ADN i la mitosi hi ha un interval conegut com a fase G_2 . Després de l'hepatectomia parcial, els hepatòcits es divideixen una o dues vegades i tornen al seu estat de repòs (G_0). Inicialment, el fetge, en conjunt, ja havia mostrat capacitat il·limitada de regenerar en experiments realitzats els anys 70, en el que el fetge tornava al seu tamany normal cada cop després de 12 hepatectomies successives¹¹. S'havia debatut durant molts anys si la capacitat replicativa de l'hepatòcit com a cèl·lula individual era també il·limitada. Aquesta possibilitat ha quedat demostrada per estudis per Rhim et al en dos models animals. Els dos models emprats en el primer estudi¹² són, per una banda, un animal amb hepatòcits que expressen gran quantitat d'urocinasa sota la influència d'un promotor de l'albumina el que provoca una destrucció continuada d'hepatòcits, l'altre és un model animal de tirosinèmia hereditària tipus I, una malaltia hepàtica causada per la deficiència de fumarilacetoacetat hidrolasa. Un nombre precís d'hepatòcits normals eren injectats en aquests fetges i entraven en replicació creant nòduls, restaurant la massa hepàtica i *rescatant* els animals. En el segon model¹³ es va evidenciar que només 1000 hepatòcits eren necessaris per a generar nòduls de cèl·lules normals, colonitzar, rescatar tot el fetge i establir una arquitectura normal. Les cèl·lules de la primera generació de nòduls es van aïllar i trasplantar seqüencialment a d'altres ratolins. Després de quatre generacions de trasplantament seqüencial, encara eren capaces de rescatar un altre animal, inclús havent ja tingut una expansió clonal completa en un hoste previ. Càlculs matemàtics derivats d'aquestes observacions conclouien que un hepatòcit era capaç de tenir un mínim de 34 divisions que resultaven en 1.7×10^{10} cèl·lules. Un fetge de rata té de mitja uns 3×10^8 hepatòcits, podem deduir que un simple hepatòcit podria, en aquestes condicions, arribar a generar 50 fetges.

Estudis en cultius també han demostrat que els hepatòcits, sota els efectes de factors de creixement com el factor de creixement de l'hepatòcit (HGF, en les seves sigles angleses: *Hepatocyte growth factor*) i el factor de creixement epidèrmic (EGF, en les seves sigles angleses: *Epidermal growth factor*), dels que parlarem tot seguit, són capaços de diferenciar-se, tenir una expansió clonal i rediferenciar-se un altre cop com a cèl·lules madures, el que demostra que els hepatòcits no són cèl·lules amb diferenciació terminal¹⁴. Contràriament, poden proliferar gairebé sense límit per assegurar la seva pròpia preservació. Totes aquestes troballes poden considerar-se inesperades si tenim en compte que: 1) els hepatòcits madurs tenen una gran ploidia i, 2) duen a terme funcions cel·lulars específiques i d'extrema complexitat. El que aquests experiments impliquen és que els hepatòcits tornen al seu estat normal de repòs, no perquè hagin esgotat la seva capacitat replicativa sinó perquè hi ha un control estricte en tot el procés, tant pel que fa als seus senyals iniciadors com de finalització que eviten una proliferació incontrolada..

FACTORS DE CREIXEMENT: MITÒGENS, ADJUVANTS I INHIBIDORS

El senyal iniciador de la regeneració hepàtica ha estat la principal àrea de recerca en el fenomen de la regeneració hepàtica. Els primers estudis ja havien apuntat cap a la presència de senyals activadors en la circulació durant la regeneració hepàtica. Així, un estudi inicial trasplantava hepatòcits aïllats d'una rata als coixinets de les potes d'una rata singènica. Aquests hepatòcits tenien una replicació basal que augmentava si es practicava una hepatectomia parcial a l'animal receptor ¹⁵. De la mateixa manera, en rates, mantingudes connectades de tal manera que compartien el mateix corrent circulatori o circulació parabiòtica, la que tenia el fetge intacte iniciava la regeneració des-

prés d'haver-se practicat una hepatectomia parcial en l'altre animal amb un efecte màxim quan aquesta hepatectomia era total¹⁶. La cerca d'aquests factors de creixement ha estat exhaustiva i se n'ha identificat un nombre relativament important que estan involucrats en l'estímul de la síntesi d'ADN per part dels hepatòcits. Tradicionalment, s'han dividit en dos grups ¹⁷. El grup dels factors "complets" que correspondria a aquells factors capaços d'iniciar la replicació en cultiu sense sèrum i absència de qualsevol altre factor, i, per l'altra banda, el grup d'adjuvants o augmentadors de l'acció dels factors del grup previ. En aquesta taula es mostren els principals d'aquests factors, el paper dels quals anirem desenvolupant breument un per un, a excepció de l'eix TNF - IL-6 que mereixerà un apartat especial.

1. Factors de creixement complets.

1. HGF: Factor de creixement de l'hepatòcit.
2. TGF- α .: Factor de creixement transformant α (*Transforming growth factor α*)
3. EGF: Factor de creixement epitelial.
4. HB-EGF: Factor de creixement epidèrmic amb capacitat d'unió a l'heparina (*Heparin binding epidermal growth factor*).
5. KGF: Factor de creixement del queratinòcit (*Keratinocyte growth factor*).
6. aFGF: Factor de creixement àcidic del fibroblast (*Acidic fibroblast growth factor*).
7. Eix TNF - IL-6. Factor de necrosi tumoral – Interleucina 6 (*Tumor necrosis factor, Interleukin-6*)

2. Adjuvants i augmentadors

1. ALR: Augmentador de la regeneració hepàtica (*Augmenter of liver regeneration*)
2. Insulina
3. IGF-2: Factor de creixement similar a la insulina tipus 2 (*Insulin-like growth factor 2*).
4. Noradrenalina.

■ Factor de creixement de l'hepatòcit (HGF)

L'HGF és una glicoproteïna heterodimèrica que consisteix en dues cadenes, una pesada (α) i una lleugera (β) amb pesos moleculars de 6.400 a 32.000, respectivament. El seu aïllament i clonació fou realitzat per Michalopoulos et al el 1992¹⁸. Des del punt de vista de la concentració, és el mitogen més potent del fetge³. Després de l'hepatectomia parcial, els seus nivells en sang augmenten dins de la primera hora i es mantenen augmentats durant 4 a 6 h¹⁹. A més de la seva elevació en sang, l'expressió d'HGF, determinada per l'anàlisi de l'ARN, s'incrementa en el fetge més tard i arriba a un màxim a les 18-24 hores post-hepatectomia parcial²⁰. Els nivells més alts s'assoleixen en la insuficiència hepàtica fulminant quan es compara amb altres condicions hepàtiques com la cirrosi o hepatitis²¹. L'HGF és produït per cèl·lules mesenquimals de l'organisme i, específicament en el fetge, per les cèl·lules estel·lades, les cèl·lules de Kupffer i les cèl·lules endotelials, però no pels hepatòcits²².

Malgrat la seva alta potencialitat mitogènica, no està clar el paper d'HGF com a iniciador del senyal per a la regeneració hepàtica³. No s'ha trobat, fins ara, una bona correlació entre els nivells sanguinis i l'extensió del creixement hepàtic. De fet, a l'estar secretat per les pròpies cèl·lules no parenquimatoses del fetge, l'HGF podria actuar tant per un mecanisme endocrí (la circulació sanguínia) com paracrí (l'acció directa de l'HGF secretat per aquestes cèl·lules sobre els hepatòcits). Així, un dels primers problemes per avaluar la seva acció real és que no es coneix a quin nivell intervé un o altre mecanisme. A aquest problema s'hi afegeix que els nivells totals d'HGF no són indicatius de la seva funció local ja que aquest factor per esdevenir actiu necessita escindir-se en la seva estructura de cadena única. Aquesta escissió provoca l'aparició de dues cadenes homodimèriques que és l'estructura amb capacitat real per a unir-se al seu receptor²³. Aquesta escissió pot tenir lloc tant a la circulació sistèmica com a nivell local en els teixits on el factor és actiu. En aquest sentit, s'han evidenciat reaccions proteolítiques a l'i-

nici de la regeneració hepàtica²⁴ amb l'augment de l'expressió de certs factors de transcripció i expressió augmentada del receptor de la urocinasa que potencia l'acció d'aquest enzim que sembla jugar un paper clau en aquest procés. Se sap que aquest enzim té dues funcions que implicaria l'activació d'HGF a nivell local. Per una banda, activa metal·loproteïnases degradadores de la matriu hepàtica a on se sap que l'HGF es troba en elevades concentracions. Aquest fet explicaria l'elevació ràpida al plasma. En segon lloc, hi ha indicis experimentals que suggereixen que l'activador del plasminogen del tipus urocinasa pot escindir l'HGF (que, molecularment, té homologia amb el plasminogen) i convertir-lo en la seva forma activa, el que resultaria amb l'activació específica al fetge de l'HGF i explicaria que, malgrat el seu augment en la circulació general no actuï com a inductor de proliferació en cèl·lules de teixits extrahepàtics. Independentment de la seva activació post-hepatectomia parcial i forma d'actuació, hi ha important evidència que els hepatòcits en repòs *in vivo* són relativament resistents a l'acció de l'HGF. Sembla ésser, que com succeeix amb d'altres factors de creixement, es requereix que els hepatòcits hagin tingut un senyal preparatori previ o "priming" (o "sensibilització" en la seva traducció aproximada en català) per tal de respondre a l'acció dels factors de creixement. Recorrerem a aquest important concepte amb detall més endavant.

Per últim, per a copsar la seva funció, caldria fer esment al fenotip dels ratolins transgènics i deficients ("knockout") per a HGF.

Hi ha dos estudis a la literatura que descriuen dos animals transgènics per a HGF. En un d'ells, l'expressió d'HGF és controlada per promotors de l'albumina²⁵, mentre que a l'altre és controlat pel promotor del gen de la metal·lotioneïna²⁶. Ambdós presenten hepatòcits de menor tamany amb major nombre de diploidies i amb una recuperació de fins a 3 vegades més ràpida del tamany normal del fetge després d'hepatectomia parcial. En aquest punt, s'hi observa una interessant diferència entre un model i l'altre, malgrat el seu índex proliferatiu és idèntic; en el primer estudi, el fetge torna al seu tamany normal post-hepatectomia parcial, mentre en el segon estudi, en canvi, el fetge dobla el seu

tamany. Els autors basen aquesta diferència en el fet que, en comparança amb el fetge d'animals genèticament normals, en aquest segon model animal hi ha 10 vegades més hepatòcits diploides en el fetge en repòs respecte el primer model. Apart del fetge, en ambdós models també s'observen alteracions en altres òrgans com el ronyó.

En el cas dels animals knockout, cal ressaltar que moren durant el desenvolupament embrionari. No queda clara la causa, ja que hi ha dos estudis contradictoris en els que en un cas no s'observen anormalitats hepàtiques²⁷ que sí són aparents en l'altre estudi²⁸ amb una disminució del tamany de l'òrgan en el seu desenvolupament inicial i defecte de placenta que produeix la mort de l'embrió. El grup d'aquest segon treball ha pogut revertir aquest defecte placentari amb la injecció intraamniòtica d'HGF el dia 9.5 del desenvolupament²⁹

■ **Factor de creixement transformant α (TGF- α) i factor de creixement epitelial (EGF)**

L'expressió de TGF- α en el fetge està associada a la proliferació hepatocitària post-hepatectomia parcial. L'ARNm de TGF- α s'indueix als hepatòcits a les 2 hores post-hepatectomia i els seus nivells arriben al seu màxim (9 vegades els nivells basals) al voltant de les 24 hores i es mantenen elevats fins a 48 hores³⁰. En humans, els nivells en sang es correlacionen bé amb el grau de regeneració post-hepatectomia parcial³¹. TGF- α és produït pels propis hepatòcits pel que el seu efecte és autocrí. La seva seqüència manté un 35% d'homologia amb EGF i s'uneix al seu mateix receptor. Aquest receptor és molt abundant en els hepatòcits i forma part del circuit autocrí d'acció de TGF- α , és a dir, els hepatòcits produeixen TGF- α que s'uneix al receptor d'EGF a la seva pròpia membrana³. A més, TGF- α , amb l'addició inicial de l'efecte d'EGF, augmenta la seva pròpia expressió

i secreció, el que crea un circuit tancat amb retroalimentació positiva que amplifica encara més la seva acció.

TGF- α se sintetiza en forma de molècula precursora de 160 aminoàcids que queda ancorada a la membrana cel·lular amb dominis extra, trans i intracel·lulars³². TGF- α pot actuar tant amb aquesta forma o en la seva forma difussible fruit de l'escissió del domini extracel·lular. L'expressió d'ARNm s'incrementa a les 4 hores post-hepatectomia parcial i assoleix el seu màxim poc abans del pic de síntesi d'ADN. Els nivells del pèptid augmenten entre les 24-48 hores però, curiosament, els nivells de la forma difussible no s'observen fins després de la principal onada de replicació hepatocitària. Els nivells tornen a la normalitat una vegada el procés regenerador ha finalitzat. Un estudi molt recent³³ amb hepatòcits *in vitro* observa que el contingut cel·lular de TGF- α , així com la replicació hepatocitària augmenten amb l'addició d'HGF en forma dosi dependent. Encara més interessant és que l'efecte estimulador de la replicació d'aquest últim factor es veu bloquejada, en presència d'anticossos o oligonucleòtids antisentit per a l'ARNm de TGF- α , donant a entendre que l'acció d'HGF seria mitjançada per l'increment endogen de TGF- α en els hepatòcits. No hi ha estudis realitzats fins al moment que ens permetin discernir si això també és el que succeeix *in vivo*. Ratolins amb sobreexpressió constitucional de TGF- α ³⁴ presenten en els primers mesos de vida un increment en els índexs proliferatius dels hepatòcits, en comparança amb els animals normals, que es tradueix amb l'aparició de displàsia entre els 8 i 15 mesos i, finalment, en tumors hepàtics en un 85% dels animals més enllà dels 15 mesos. Contràriament al previsible per l'increment de la capacitat replicativa hepatocitària, el fetge no augmenta de tamany perquè aquest fenomen es veu compensat per un gran recanvi cel·lular. En contrapartida, i de forma sorprenent, els animals knockout tenen una capacitat regenerativa post-hepatectomia parcial intacta³⁵. Aquesta és una mostra clara de la redundància dels factors de creixement per una probable superposició de funcions que en aquest cas podria correspondre a un efecte compensatori d'EGF. De fet, i refermant aquesta idea, els animals knockout per al

receptor d'EGF (comú per a ambdós factors) moren durant el desenvolupament embrionari o, com a molt, abans d'arribar a les dues setmanes de vida.

Com ja hem comentat, EGF sembla actuar en el mateix context que TGF- α i a través del mateix receptor, per bé que probablement exerceixi la seva acció en una fase més inicial. Donat que EGF és una proteïna produïda per les glàndules mucoses, la regeneració hepàtica es veu afectada després d'una sialedectomia. En contrast, l'augment dels seus nivells és només del 30% després d'hepatectomia parcial³⁶. Aquestes dues observacions, aparentment contradictòries, s'explicarien si aquest increment relativament mins comportés un augment exponencial de l'EGF a disposició dels hepatòcits. EGF es troba disponible al fetge habitualment per la seva producció continuada a les glàndules duodenals de Brunner³⁷. En situació d'hepatectomia parcial, la disminució de la massa hepàtica fa que la relació d'EGF per unitat de pes hepàtic es multipliqui, al menys, per un factor de tres. A més a més, la noradrenalina, que té una elevació exponencial post-hepatectomia parcial, actua estimulants la secreció d'EGF per part de les glàndules de Brunner que pot incrementar encara més la disponibilitat d'aquest factor³⁸. A més, la inactivació per fosforil·lació tirosina-específica i la regulació negativa del receptor d'EGF en un curt interval de temps post-hepatectomia parcial fan pensar en un paper real *in vivo* d'aquesta molècula en el procés regeneratiu².

■ **Factor de creixement epidèrmic amb capacitat d'unió a l'heparina (HB-EGF)**

Aquesta molècula purificada a partir de cultius amb cèl·lules U-937, cèl·lules amb característiques similars als macròfags, es considera pertanyent a la família d'EGF³⁹. La seva estructura està composta per un pèptid senyalitzador, un domini hidrofílic amb afini-

tat per l'heparina, un domini similar a EGF i un domini transmembrana⁴⁰. La proteïna activa és fruit de l'escissió d'aquesta estructura i consta de 86 AA que integren el domini similar a EGF i l'afí a l'heparina. HB-EGF s'uneix al receptor d'EGF i és un potent mitogen de les cèl·lules musculars llises i fibroblasts. Havent demostrat capacitat de provocar replicació hepatocitària dosi dependent *in vitro*, es va comprovar que l'expressió d'ARNm és més inicial que la d'HGF amb pic a les 6 hores post-hepatectomia parcial en rates⁴¹. La seva expressió gènica es localitza a les cèl·lules de Kupffer i cèl·lules endotelials però no als hepatòcits⁴². En humans, s'ha observat que el grau de regeneració post-hepatectomia parcial (percentatge de l'increment del fetge remanent) es correlaciona amb l'augment dels seus nivells en sèrum. Per aquest fet, s'ha suggerit la seva possible validesa com a marcador de regeneració hepàtica en humans a l'espera de estudis més amplis que ho confirmin⁴³.

■ Factor de creixement àcidic del fibroblast (aFGF)

aFGF pertany a la família dels factors de creixement dels fibroblasts que presenten una gran afinitat per l'heparina i per als proteoglican-heparin-sulfats que són presents a la superfície cel·lular i a la matriu peri- i extracel·lular. Tant els FGF àcids com els bàsics juguen un paper important en el desenvolupament embrionari, són mitogènics per a varis tipus de cèl·lules i participen en la diferenciació cel·lular, migració i angiogènesi. aFGF és un agent promotor de la replicació en cultius d'hepatòcits en presència d'heparina⁴⁴. La seva funció específica *in vivo* no es coneix amb exactitud encara que s'ha objectivat el seu augment tant en cèl·lules parenquimatoses com no parenquimatoses després d'hepatectomia parcial⁴⁵. Curiosament, el seu augment ha estat més significatiu en condicions en les que s'ha inhibit la regeneració hepàtica (per un producte quí-

mic, en aquest cas 2-acetaminofluorè) en comparança amb la regeneració en condicions normals ⁴⁶. En aquest cas, s'observava una producció molt elevada a les cèl·lules estel·lades i a les cèl·lules ovals, cèl·lules que s'han identificat com a cèl·lules mare (stem cells) hepàtiques⁷.

■ **Factor de creixement dels queratinòcits (KGF)**

Aquest factor es va identificar com a mitogen específic del queratinòcit en una línia cel·lular de fibroblasts pulmonars. En un experiment en el que s'administrava KGF *in vivo* amb dosis farmacològiques⁴⁷, el pes del fetge augmentava el primer dia en un efecte depenent de la proliferació hepatocitària. No obstant, aquest efecte es perdia després d'aquestes primeres hores sense que en quedés aclarida la causa. Curiosament, el fetge no expressa el receptor per a KGF en condicions normals, pel que s'havia suggerit la possibilitat que no hi hagi proliferació dels hepatòcits malgrat hi hagi KGF circulant. Això es va descartar per la demostració que KGF és mitogènic directe de l'hepatòcit⁴⁸. Fins al moment, no hi ha hagut més experiments confirmant aquestes troballes inicials i que, per tant, ens permetin dilucidar els mecanismes d'actuació i la importància real en el procés regeneratiu d'aquesta molècula..

■ **Augmentador de la regeneració hepàtica (ALR).**

Aquest és un pèptid identificat recentment i purificat del citosol de rates en el moment del deslletament⁴⁹. Aquesta proteïna no té cap activitat mitogènica en els hepatòcits en

cultiu primari ni en el fetge en repòs *in vivo*, en canvi es veu estimulada la seva síntesi en rates després d'un 40% d'hepatectomia parcial o en gossos després d'un shunt porto-cava⁵⁰. S'ha comprovat que té una activitat immunosupressora específica al fetge que està mitjançada per les cèl·lules assassines naturals (Natural Killers, NK)⁵¹. Aquestes cèl·lules perden la seva capacitat citotòxica durant la regeneració hepàtica. S'ha suggerit que l'acció afavoridora de la regeneració hepàtica d'aquesta proteïna és per un mecanisme indirecte a través d'aquesta immunosupressió. Els seus nivells no augmenten després d'hepatectomia parcial i no es coneix la cèl·lula responsable de la seva producció.

■ Insulina

L'acció de la insulina com a factor coadjuvant de la regeneració hepàtica és coneguda de fa temps⁵². Els illets pancreàtics proveeixen d'insulina el fetge de forma continuada. En els primers shunts porto-caves duts a terme -en els que es deriva la sang portal-, ja el propi Starzl, famós cirurgista pioner en el camp del trasplantament, va observar que el fetge s'atrofiava i que aquesta atròfia es revertia amb la injecció d'insulina⁵³⁻⁵⁵. En aquesta línia, varis estudis, en posterioritat, han objectivat que la regeneració hepàtica està alterada en els animals diabètics⁵⁶⁻⁶⁰. Tanmateix, la insulina necessita de la presència d'altres factors de creixement per a que estimuli la replicació hepatocitària en cultiu i la seva injecció en fetge en repòs no té cap efecte mitogènic⁶¹.

■ Noradrenalina

La noradrenalina amplifica els senyals mitogènics tant de l'HGF com de l'EGF en cultius d'hepatòcits a través de l'acció en receptors adrenèrgics^{62, 63}. Els nivells d'aquesta catecolamina augmenten en el marge d'una hora post-hepatectomia parcial. Un dels seus mecanismes d'acció és indirecte a través de la inducció de la secreció d'EGF de les glàndules de Brunner³⁸. La prazosina, un bloquejador específic del receptor α_1 adrenèrgics, així com la denervació simpàtica produeix un decrement significatiu de la síntesi d'ADN durant les primeres 24 hores, encara que hi ha un retorn als nivells normals al voltant de les 48-72 hores⁶⁴. Cal ressaltar que la noradrenalina és capaç de contrarrestar l'efecte inhibitori que s'observa amb l'addició de TGF- β de la proliferació dels hepatòcits *in vitro* que s'han aïllat en el moment fase inicial de la regeneració⁶⁵. Les dades, doncs, semblen confirmar un paper de la noradrenalina en el procés regeneratiu hepàtic, però resta pendent de la demostració dels mecanismes pels que hi actua.

■ Factor de creixement similar a la insulina tipus 2 (IGF-2)

L'IGF-2 és un factor de creixement d'especial importància en el desenvolupament fetal⁶⁶a. El seu possible paper en la regeneració hepàtica es va suggerir arran d'un estudi en rates que va evidenciar que després d'una hepatectomia parcial hi havia un increment dels receptors per IGF-2⁶⁷. Aquest increment s'observava a la membrana plasmàtica a les 24 hores post-hepatectomia parcial fins a 4 vegades respecte el fetge en repòs. Aquesta observació suggeria una translocació del receptor des de reservoris intracel·lulars, es mantenia elevat durant 72 hores i disminuïa a les 120 hores. De la mateixa manera, l'ARNm per aquests receptors tenia una cinètica similar. El resultat

final és un increment net a la superfície cel·lular d'aquest receptor durant el període inicial post-hepatectomia parcial amb retorn a la normalitat un cop aquest procés ha finalitzat. Malgrat aquests resultats inicials, no hi ha estudis posteriors que hagin pogut corroborar aquestes dades i establir el paper definitiu de l'IGF-2 en aquest context.

EXPRESSIÓ DE GENS DEL CICLE CEL·LULAR DURANT LA REGENERACIÓ HEPÀTICA

L'addició de sèrum o altres mitògens en cèl·lules mesenquimals i epitelials en cultiu es tradueix en un increment en l'expressió d'un conjunt de gens específics⁶⁸. A aquesta resposta se la coneix com a resposta gènica primària immediata precoç perquè succeeix en els pocs minuts. Els primers gens identificats després de l'hepatectomia parcial foren els protooncogens *c-fos*, *c-jun* i *c-myc*⁶⁹. Els ARNm per a aquests gens s'incrementaven molt ràpidament amb pic a l'hora i fins a 3 hores post-hepatectomia parcial amb tornada als nivells normals al voltant de la quarta hora. Els mecanismes que regulen l'expressió d'aquests protooncogens en la resposta immediata precoç no estan desxifrats en tota la seva extensió. Només cal dir que involucren mecanismes transcripcionals i post-transcripcionals³. Els treballs de Taub *et al* van evidenciar la participació d'aquests gens i fins a 70 gens més en el fetge després de l'hepatectomia parcial⁷⁰. Aquests enzims no comparteixen, en la majoria de casos, funcions comunes i no estan necessàriament relacionats amb la síntesi d'ADN. Entre aquests gens s'hi troben proteases, fosfatases, inhibidors i estimuladors de factors de transcripció, proteïnes amb capacitat d'unió a factors de creixement i enzims metabòlics. Ha estat molt important l'estudi amb animals transgènics i deficients per aquests gens per a permetre esbrinar quins d'aquests estan directament involucrats en la síntesi d'ADN.

Molts dels gens activats en aquest període codifiquen per a factors de transcripció. Això vol dir que, a partir d'aquesta resposta primerenca, es posa en marxa l'activació de tot un reguitzell de nous grups de gens que estableixen una fase d'activació retardada que es coneix com a resposta secundària. Aquesta resposta comporta l'expressió incrementada de gens relacionats amb el cicle cel·lular, incloent-hi les ciclines i les seves cinases associades. Aquesta expressió té lloc quan els hepatòcits progressen en la fase G₁ i assolixen l'estadi replicatiu^{71,72}. Els components més significatius de la resposta secundària són *p53*, *mdm2*, *p21* i *ciclina D*. Tots aquests gens presenten un increment d'expressió transitori entre les 8 i 24 hores després de l'hepatectomia parcial en rates i condueix al pic de síntesi d'ADN a les rates que és a les 24 hores. Cal assenyalar que alguns dels senyals són inhibidors com és el cas de *p21* i *p53*. L'aparició d'aquests senyals inhibidors durant la regeneració hepàtica fan pensar en mecanismes contrarreguladors en el propi òrgan per a evitar un efecte descontrolat dels estimuladors.

Estudis en detall dels mecanismes que regulen l'expressió d'un gran nombre de gens durant la regeneració hepàtica han evidenciat que, malgrat l'augment en els nivells d'ARNm, el ritme de transcripció no varia respecte a la fase de repòs prèvia a l'hepatectomia parcial. Contràriament, sembla que els mecanismes són post-transcripcionals encaminats a incrementar l'estabilitat de l'ARN citoplasmàtic⁷³. Alguns gens reglats d'aquesta forma són ciclines A, B1, D1, D3 i E, cinasa dependent de ciclines 1, *p53* i *mdm2*, entre d'altres.

ACTIVACIÓ DE FACTORS DE TRANSCRIPCIÓ DESPRÉS D'HEPATECTOMIA PARCIAL

Els factors de transcripció son proteïnes que s'uneixen a una zona específica de reco-

neixement en els gens per a iniciar o incrementar la seva expressió. Generalment, aquests factors no són únics per a un determinat gen sinó que tenen diversitat de reconeixement que els permet l'activació de gens diferents. A la vegada, un mateix gen pot unir-se a diversos factors de transcripció. L'escenari, doncs, és un sistema que permet als factors de transcripció propagar el seu senyal a través de l'activació de varis gens, mentre que la interacció entre diversos factors de transcripció és un altre sistema regulador de l'activació gènica.

El descobriment que la regeneració hepàtica comporta l'activació de diversos factors de transcripció ha suposat un gran pas endavant per a començar a entendre aquest procés. L'activació d'aquests factors no requereix de síntesi proteïca, depèn només de canvis post-traduccionals⁶⁹.

Els factors de transcripció que, amb més importància, s'activen en aquest procés són, en les seves sigles angleses, NF- κ B (factor nuclear de la cadena kappa dels limfòcits B), STAT3 (senyal transductors i activadors de la transcripció 3), AP-1 (proteïna activadora 1), C/EBP β (proteïna que s'uneix al senyal estimulador CAAT) i, inclòs més recentment en aquest grup, Egr-1 (gen de resposta de creixement precoç-1). Malgrat s'hi afegeixi una ressenya de tots ells, la nostra discussió se centrarà en els dos primers factors, NF- κ B i STAT3, doncs, la seva activació depèn de les citocines TNF i IL-6 , respectivament, i amb elles integren conceptualment l'eix central de l'activació de la regeneració hepàtica a partir del qual es basteix aquest treball.

■ NF- κ B

NF- κ B abarca una família de proteïnes que formen homo- i heterodímers i forma part de la família de l'oncogen *rel*⁷⁴. S'havia descrit originalment en els limfòcits com a factor

nuclear necessari per a la transcripció de la cadena kappa dels limfòcits B, d'aquí el seu nom. A l'actualitat s'ha detectat la presència d'NF- κ B a virtualment tots els tipus cel·lulars i sembla segura la seva participació en mecanismes de defensa, reaccions immunològiques i en processos de proliferació cel·lular.

Com hem mencionat, NF- κ B és un dímer compost de dos membres de la família rel de proteïnes. Cada membre de la família conté una regió N-terminal conservada de 300 aminoàcids que es coneix com el domini de l'homologia rel. Aquesta regió és la responsable de la dimerització i de les interaccions amb molècules I κ B. L'heterodímer més comú de la família, i al que es fa referència habitualment en parlar de NF- κ B (en el nostre cas), està compost per les subunitats p50/p65 (les xifres fan referència als seus pesos moleculars en Kdaltons).

L'activació d'NF- κ B és un procés molt ràpid que pot produir-se per molt diferents tipus d'estímuls. Aquests estímuls comuniquen a la cèl·lula dany cel·lular (com ara oxidants, llum ultraviolada) o infecció - com ara endotoxines (lipopolisacàrid, LPS), proteïnes transactivadores virals o dobles cadenes d'ARN. Alguns dels inductors són, alhora, subproductes de la pròpia cascada del senyal de transducció (TNF, interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), esfingomielina) ⁷⁵.

Els gens diana d' NF- κ B són, entre d'altres, immunoglobulines de superfície, molècules d'adhesió, citocines, gens de resposta de fase aguda, *c-myc* i varis virus com ara el virus de la immunodeficiència adquirida (VIH).

La forma habitual al citoplasma de l'NF- κ B és la que es presenta unida a una molècula inhibidora coneguda com I κ B (inhibidor de κ B). L'activació d'aquest factor depèn de la degradació d'I κ B i la subsegüent dissociació del dímer p50/p60. Aquesta degradació s'assoleix en dues etapes. En un primer pas I κ B es fosforil·la a través de dues cinases (IKK α i IKK β). El segon pas consisteix en la ubiquïinització (unió a la ubiquïinina) de l'I κ B fosforil·lat. Amb aquesta reacció, la molècula esdevé diana del complex de proteases del citosol cel·lular conegut com a proteasoma. Cal ressaltar que ni la fosforil·lació ni la

ubiquïinització provoquen la dissociació d'I κ B del complex NF- κ B/I κ B; és pròpiament la degradació d'I κ B, per part del proteasoma citosòlic, el que alliberarà NF- κ B i provocarà la seva activació⁷⁵. Hi ha mecanismes de blocatge d'NF- κ B que es basen en la inducció de la síntesi d'I κ B com és el cas dels glucocorticoides. De fet, es creu que gran part de l'efecte immunosupressor d'aquests fàrmacs és conseqüència d'aquesta acció.

Com hem esmentat, la fosforil·lació de l'I κ B corre a càrrec d'un complex de dues cinases de recent identificació, se les coneix com IKK α i IKK β i semblen respondre a la inducció de diferents estímuls com ara compostos reactius d'oxigen. Mentre IKK α és necessària per al desenvolupament embrionari de la pell i extremitats⁷⁶, la deficiència d'IKK β es tradueix en apoptosi massiva del fetge i letalitat embrionària⁷⁷. Aquests són efectes molt similars a la deficiència del component p65 de l'NF- κ B⁷⁸. D'aquesta manera, l'absència de p65 durant el desenvolupament embrionari, ja sigui per absència d'un dels seus components com per manca de dissociació del seu inhibidor I κ B, comporta apoptosi al fetge⁷⁹. Aquest estudi confirmava un treball previ en el es bloquejava NF- κ B a través d'un vector adenoviral que expressava I κ B condueix a apoptosi i incapacitat per a desenvolupar una regeneració hepàtica adequada després d'hepatectomia parcial⁸⁰.

L'increment en l'activació d'NF- κ B es detecta als 30 minuts post-hepatectomia parcial⁸¹, indicant que aquest factor de transcripció és un component de la resposta dels hepatòcits a aquesta operació. Al fetge normal, les cèl·lules no parenquimatoses també contenen NF- κ B però no s'hi observa augment de la seva capacitat d'unió als seus llocs de reconeixement a l'ADN genòmic, signe d'activació del factor, després d'hepatectomia parcial. L'activació d'NF- κ B s'ha objectivat també després de 30% d'hepatectomia parcial, però no en operació quirúrgica fictícia (obertura i tancament de l'abdomen), el que suggereix la seva implicació en el desenvolupament inicial de la regeneració hepàtica⁷⁰. No obstant, l'activació d'NF- κ B per si sola no és suficient per a tirar endavant el procés regeneratiu com ho demostra el fet que no hi ha inici de regeneració hepàtica després de 30% hepatectomia parcial i sí, com hem mencionat, activació d'NF- κ B, tot i que els

hepatòcits esdevenen capaços de respondre a factors de creixement.

La ràpida activació de l'NF- κ B en els hepatòcits després de l'operació determina, en gran part, que després d'hepatectomia parcial el senyal arribi al nucli cel·lular quasi immediatament. En aquest punt, resulta de suma importància la identificació dels senyals activadors d'NF- κ B. Una activació similar d'NF- κ B a la que s'observa post-hepatectomia parcial es pot objectivar després de la injecció intraperitoneal de 5 μ g de TNF en rates en les que no s'hi havia realitzat cap altre procediment⁸². L'activació de la capacitat d'unió al nucli d'NF- κ B per part de TNF s'ha comprovat també *in vitro* en cultius d'hepatòcits en els que l'addició d'aquesta citocina provoca increments en l'activació d'NF- κ B i nivells d'ARNm de *c-myc* similars als que provoquen l'addició de sèrum⁸³. Cal afegir que l'activació d'NF- κ B post-hepatectomia parcial pot dependre a més de factors que actuen directament en la fosforil·lació i degradació proteolítica d'I κ B. Com hem esmentat prèviament, les cinases per a I κ B s'activen en presència de compostos reactius d'oxigen i el consegüent canvi en l'estat redox intracel·lular. Es pot deduir fàcilment que, post-hepatectomia parcial, hi hagi un augment en radicals lliure d'oxigen fruit d'una més gran despesa metabòlica a la que s'imposa als lòbuls hepàtics que romanen després de l'operació. La producció d'aquests radicals seria una conseqüència normal de la fosforil·lació oxidativa mitocondrial. No obstant, en la situació post-hepatectomia, la quantitat d'aquests productes pot excedir la capacitat del fetge remanent per a capturar-los i eliminar-los.

En resum, l'activació d'NF- κ B en la regeneració hepàtica sembla ésser clau per a que aquest fenomen es desenvolupi en normalitat. Les evidències experimentals apunten a que l'activació d'NF- κ B, en aquest context, depèn, en gran part, de l'augment en TNF i canvis en el redox intracel·lular, fruit d'un augment en la despesa metabòlica a la que se sotmet a la porció de fetge que roman després de l'operació.

■ STAT3

Les proteïnes del grup STATs són factors de transcripció latents que s'activen per fosforil·lació d'una tirosina (aprop del residu 700), típicament en resposta a lligands extracel·lulars. Es coneixen més de 40 lligands polipeptídics, fins al moment, capaços de produir fosforil·lació d'STATs. Aquests receptors, un cop activats, transmeten el senyal a través cinases del tipus Jak associades o a través de factors de creixement (EGF, per exemple) que actuen a través de tirosin-cinases que són intrínseques del propi receptor^{84, 85}. S'han descrit fins a 7 proteïnes STAT: 1, 2, 3, 4, 5a, 5b i 6⁸⁶. Els STATs, en general, en fosforil·lar-se, es dimeritzen amb un altre STAT constituint el que és la seva forma activa. Aquesta dimerització es forma per interaccions recíproques entre el domini sulfhidril segon (SH2) d'un dels monòmers i la tirosina fosforil·lada de l'altre monòmer⁸⁷. Els dímers s'acumulen al nucli, reconeixen elements específics d'ADN i activen la transcripció. Posteriorment, les proteïnes STAT són inactivades per defosforil·lació de la tirosina i retornen al citoplasma.

L'activació dependent de lligands dels STATs està sovint relacionada amb diferenciació i/o regulació de creixement, mentre la seva activació basal (és a dir, sense requeriment conegut de polipèptids extracel·lulars) està associada sovint amb disregulació de creixement⁸⁸.

STAT3, conegut en un primer moment com a factor de resposta de fase aguda (APRF, en les seves sigles angleses), fou identificat inicialment com a proteïna amb capacitat d'unir-se a l'ADN, de caràcter induïble, que s'unia als elements de resposta de tipus 2 de la interleucina 6 dins dels promotors dels gens de les proteïnes de la fase aguda hepàtica⁸⁹. APRF es va detectar en el fetge de ratolins 5 minuts després de la injecció d'IL-6, amb un màxim al quart d'hora i disminució a partir de l'hora. APRF es va purificar a partir d'extractes nuclears de fetges utilitzant cromatografia d'afinitat d'ADN i ADNc que codificava per a APRF i es va clonar basats en seqüències parcials d'aminoàcids.

La fosforil·lació d'STAT3 corre a càrrec de cinases tipus Jak (1, 2 i 3) associades a receptors del tipus gp130⁹⁰. L'activació d'aquests receptors es produeix per citocines del tipus IL-6 i que corresponen des de la pròpia IL-6 fins a factor inhibitori de leucèmia, oncostatina M, factor neurotròfic ciliar, factor estimulador de colònia granulocitària, leptina, IL-11 i cardiotrofina⁹¹. També s'activa en resposta al factor de creixement epidèrmic. Els ratolins knockout per a STAT3 exhibeixen un defecte greu en el desenvolupament fetal que duu a una mort fetal precoç⁹². La causa d'aquesta letalitat roman encara per dilucidar. Recentment, s'han generat knockouts condicionals del locus d'STAT3 específic per a tipus concrets cel·lulars. Així, pel sistema Cre-loxP d'inactivació gènica específica, s'han generat animals amb manca d'STAT3 específicament als limfòcits T i aquests no proliferen en resposta a IL-6 i IL-2⁹³. Utilitzant el mateix sistema, animals amb manca d'STAT3 exclusivament als macròfags no responen a la IL-10⁹⁴.

STAT3 s'activa després d'hepatectomia parcial però la seva activació és més lenta que per a l'NF-κB. La seva detecció comença a les 2 hores i es perllonga més enllà de 6 hores⁹⁵. Probablement, aquest factor de transcripció transactiva gens involucrats en la resposta immediata precoç així com gens del cicle cel·lular que integren la resposta secundària.

■ AP-1

El factor de transcripció AP-1 està compost per heterodímers de c-Fos i un membre de la família Jun o per homodímers de la família Jun⁹⁶. A més hi ha un factor en el fetge regeneratiu conegut com a factor de la regeneració hepàtica 1 (LRF-1, en les seves sigles angleses) format per complexes entre un membre de c-Fos i Jun B i c-Jun⁹⁷. Els factors de creixement són importants activadors d'AP-1 en cultius de cèl·lules mesenquimals i

sembla que és el mateix que succeeix en la regeneració hepàtica. L'activació d'AP-1 després d'hepatectomia parcial és ràpida i transitòria, i normalment torna a la normalitat en unes 6 hores⁷⁰. La capacitat d'unió de c-Jun en el complex AP-1 s'incrementa durant la primera hora. S'ha suggerit que la composició dels diferents complexos d'AP-1 canvien progressivament durant les primeres hores post-hepatectomia parcial⁷⁰. D'aquesta faisó, les respostes immediata precoç i secundària podrien ésser transactivades per varis complexos de la família d'AP-1 al llarg de la regeneració hepàtica.

■ C/EBP

C/EBP (proteïna que s'uneix a l'estimulador CAAT) són factors de transcripció que comp- ten amb una cremallera de leucina que s'heterodimeritzen amb d'altres proteïnes C/EBP i que retenen afinitats similars d'ADN. Les isoformes d'aquest factor de transcripció solen diferir en les seves propietats de transactivació, que els hi venen donades pels seus dominis N-terminal. Les isoformes α i β són les que s'expressen més en el fetge en repòs^{98, 99}.

La importància de C/EBP rau en els estudis que l'han involucrat en el manteniment de l'homeòstasi hepàtica després de l'hepatectomia parcial. Així, mentre el fetge està pro- liferant pel procés regeneratiu, l'òrgan ha de mantenir les seves funcions específiques per a assegurar la supervivència de l'individu. Per exemple, en resposta a la ràpida pèr- dua del glicogen emmagatzemat, el fetge regeneratiu incrementa la producció de gluco- sa amb la inducció de gens d'activació precoç que codifiquen per a enzims gluconeogè- nics com ara PEPCK i G6Pasa¹⁰⁰. Malgrat que el conjunt de mecanismes implicats en el manteniment homeostàtic del fetge no es coneixen prou bé, sí que s'assumeix en base a la literatura que la C/EBP, amb les seves dues isoformes hepàtiques, hi està implicada.

Es coneix que l'expressió de C/EBP α és important per a l'homeòstasi de la glucosa al moment del naixement. Els knockout per a aquesta isoforma moren poc després del naixement per una profunda hipoglucèmia i es mostren incapaços d'induir l'expressió de PEPCK i G6Pasa¹⁰¹. No es coneix tan bé el paper de la isoforma β en el metabolisme glucídic. Els knockout tenen una reducció del 50% en el percentatge esperat d'homozi-gots per a aquest defecte segons les lleis de Mendel. S'ha vist que aquest subgrup d'animals moren al naixement d'hipoglucèmia i són incapaços d'expressar ARNm de PEPCK o mobilitzar glicogen hepàtic. Els animals que arriben a sobreviure de 4 a 6 mesos desenvolupen anormalitats limfoproliferatives associades a augment progressiu d'IL-6 en el sèrum.

En el fetge regeneratiu, l'activitat de C/EBP β s'incrementa en relació a C/EBP α durant la fase G1 del cicle cel·lular de l'hepatòcit^{102, 103}. L'estudi dels knockout per a C/EBP β després d'hepatectomia parcial ha evidenciat una disminució del 25% en la síntesi d'ADN per part dels hepatòcits en respecte la normalitat¹⁰⁴. Addicionalment, s'hi observava una hipoglucèmia perllongada que no es correlacionava ni amb els nivells d'expressió de C/EBP α ni amb els de gens gluconeogènics. S'hi observa una disminució en l'expressió, també, de varis gens del grup d'expressió immediata precoç que inclou el factor de transcripció Egr-1, la fosfatasa del residu de tirosina de la cinasa MAP (MKP-1) i un gen del grup d'expressió retardada, anomenat HRS, que codifica per a una proteïna per a l's -*plicing* d'ARNm. De la mateixa forma, es pot observar una disminució acusada de les ciclines B i E mentre l'expressió de ciclina D es manté normal. Cal ressaltar que els gens afectats eren diferents dels que s'havien observat en knockout d'IL-6 (i per tant dependents de les vies d'activació d'NF- κ B i STAT3, com veurem més endavant).

C/EBP β es transactiva per la fosforil·lació de serines per part de MAP cinases¹⁰⁵. Aquests enzims s'activen ràpidament en hepatòcits en proliferació en resposta a factors de creixement¹⁰⁶. D'aquesta manera, C/EBP β podria constituir-se com un factor que s'activaria al llarg de les vies que es posen en funcionament per les MAP cinases d'una forma simi-

lar al que succeeix amb NF- κ B i STAT3, i, per tant, actuar en el mateix context que aquests dos factors de transcripció però de manera complementària, amb especificitat per a gens diferents i per un procés independent de la presència d'IL-6¹⁰⁷.

■ **Altres factors**

En aquest punt, cal fer esment que s'ha evidenciat l'expressió de gens amb independència de la IL-6 i C/EBP β , com és el cas de PRL-1 que pot tenir importància per a vies de fosforil·lació i defosforil·lació de tirosines a proteïnes. Aquest gen sembla activar-se per unió del factor de transcripció Egr-1¹⁰⁸. La producció d'ARNm per aquest factor augmenta després d'hepatectomia parcial tant a animals normals com knockout per a IL-6, fet que no es produeix en animals knockout per a C/EBP β a on fins i tot, disminueix, com hem comentat més amunt¹⁰⁴. Malgrat aquesta manca de producció d'ARNm, sí que s'hi continua observant en aquests animals un augment en la capacitat d'unió a l'ADN d'Egr-1 donant a entendre que hi ha una modificació posterior a la traducció proteïca i que aquesta és independent tant d'IL-6 com C/EBP β ¹⁰⁷.

Totes aquestes dades es comenten per a fer patent que existeixen altres vies independents dels factors de transcripció que he descrit en aquest apartat: NF- κ B, STAT3, AP-1 i C/EBP β . Aquestes vies queden fora de l'objectiu d'aquest treball però de ben segur que també deuen jugar un paper rellevant en el procés regeneratiu hepàtic.

ETAPES EN LA RESPONSA PROLIFERATIVA DURANT LA REGENERACIÓ HEPÀTICA: SENSIBILITZACIÓ I PROGRESSIÓ

La descripció de forma individual dels factors de creixement i de transcripció, que actuen en la regeneració hepàtica, ens deixa mancats d'una idea de conjunt de quina és la seva influència en els esdeveniments que tenen lloc en aquest procés i que culminen en la divisió cel·lular dels hepatòcits. Els passos principals en el procés regeneratiu es podrien resumir en el següent esquema:

Hepatectomia parcial ⇒ Senyal ràpid ⇒ Modificació post-traducció d'NF-κB i STAT3 i altres factors ⇒ resposta genètica primària ⇒ resposta genètica secundària ⇒ Progressió del cicle cel·lular³.

■ Etapa de sensibilització o "priming". Paper de TNF i IL-6.

La descripció dels factors de creixement fa pensar que la regeneració hepàtica és conseqüència de la sobreexpressió d'aquests factors.

Donat que l'HGF augmenta molt ràpidament al sèrum després d'hepatectomia parcial, contribuiria a fer considerar aquest com un bon candidat a jugar aquest paper central. La millor manera de saber-ho seria amb la caracterització de la regeneració hepàtica en animals knockout per a aquest factor. No obstant, ja hem esmentat que aquests animals moren durant el desenvolupament embrionari. Per tant, sense poder conèixer encara el paper exacte que hi juga, una de les característiques de la seva acció ens hi pot ajudar: la seva manca d'actuació específica en un sol teixit.

HGF és un factor mitogènic per a un gran nombre de tipus cel·lulars de l'organisme¹⁰⁹ i s'incrementa en la circulació tant en la regeneració hepàtica com en el creixement renal

després de nefrectomia. Malgrat això, la resposta mitogènica és específica, i així, després d'hepatectomia parcial tenim síntesi d'ADN hepàtic i no renal, i viceversa en el cas de nefrectomia¹¹⁰. Aquests fets, fan pensar que l'activitat del factor de creixement en el teixit depèn de factors locals que poden determinar la capacitat de les cèl·lules de respondre a l'estimulació d'HGF, més que no pas els nivells que aquest factor pugui assolir en un moment determinat a la circulació.

No podem oblidar la possibilitat de que d'altres factors puguin ésser els vertaders iniciadors, no obstant això, hi observem fenòmens similars que el descrit amb HGF. Així, EGF sembla ésser imprescindible per a la regeneració hepàtica com ho demostra el fet que aquest procés es veu francament reduït en animals amb adenectomia de les glàndules salivars, una de les fonts principals d'aquest factor³⁶. Com hem assenyalat prèviament, HGF, TGF α i d'altres factors tenen un efecte potent en la síntesi d'ADN dels hepatòcits en cultius primaris. No obstant, els hepatòcits del fetge, en repòs, no tenen cap sensibilitat especial envers aquests factors. La infusió d'EGF, TGF α o HGF directament a la vena portal durant 24 hores té un efecte mínim en la divisió dels hepatòcits¹¹¹. La combinació, en infusió, d'aquests factors tampoc ha demostrat cap efecte especial. A més, en normalitat, sense infusió d'aquests factors, hi ha un canvi mínim en la síntesi de l'ADN hepàtic després de 30% d'hepatectomia parcial quan es compara amb el model habitual de 70% d'hepatectomia. No obstant, es pot "sensibilitzar" els hepatòcits *in vivo* perquè responguin a la infusió d'aquests factors. Així, si aquesta infusió es practica en animals després d'un 30% d'hepatectomia parcial o amb la perfusió prèvia de concentracions de col·lagenasa, els hepatòcits responen de forma vigorosa amb augment considerable de la síntesi d'ADN¹¹¹. També cal dir que la resposta de síntesi és igual tant es tracti d'HGF com TGF α , indicant que l'efecte derivat d'aquests procediments no es limita a un sol factor de creixement i sembla improbable que sigui conseqüència de l'activació d'un receptor específic per a un d'aquests factors de creixement¹¹¹.

El conjunt d'aquestes evidències suggereixen que els hepatòcits en repòs necessiten

assolir un estat general "receptiu" abans de poder respondre als estímuls proliferatius que es deriven de l'hepatectomia parcial. La teoria més acceptada és que aquest procés de "sensibilització", "capacitació" o "priming", inclou, en el seu primer pas, l'activació d'NF- κ B i STAT3, seguit d'aprop per l'activació d'AP1¹¹². De fet, el concepte de "sensibilització" dels hepatòcits no és nou. Ja l'any 70, Moolten *et al*¹¹³ van observar que la pràctica d'un estrés quirúrgic en forma de laparotomia en un temps previ a l'hepatectomia parcial o el pre-tractament de rates amb hormona del creixement accelerava l'augment en la síntesi d'ADN després d'hepatectomia parcial. D'alguna manera aquests procediments havien fet entrar als hepatòcits en el cicle cel·lular traduint-se en l'escurçament de l'interval en el qual assolien el pic de síntesi d'ADN. Estudis posteriors amb altres tipus d'estímuls (com ara realimentació proteïca en animals en dejú per varis dies¹¹⁴) no han fet més que confirmar aquestes observacions inicials.

Les evidències experimentals que exposarem tot seguit semblen reservar aquest paper d'agents "sensibilitzadors" a les citocines TNF i IL-6.

■ TNF (Factor de necrosi tumoral)

El TNF és una citocina multifuncional proinflamatòria que forma part d'una família més àmplia de citocines que inclou factors i receptors, amb similitud estructural, coneguda com família del TNF (amb 18 membres al moment actual) i que inclou els seus dos receptors, TNFRI (p55) i TNFRII (p75)¹¹⁵. Fou descrit originalment com el factor responsable de l'hemorràgia induïda pel lipopolisacàrid (LPS) en tumors d'animals¹¹⁶ i posteriorment, i de forma independent¹¹⁷, identificat com el factor conegut com "caquectina", el factor responsable per a la caquèxia que s'observa en processos tumorals o infecciosos crònics. La seva principal font cel·lular són els macròfags, encara que, amb l'adequat

estímul, també es pot secretar per part dels limfòcits T, B, assassins naturals ("Natural killers", NK), cèl·lules endotelials, queratinòcits, cèl·lules del múscul llis, mastòcits, neutròfils, astròcits i cèl·lules de la glia¹¹⁸. Entre els seus factors estimuladors es compta amb varis productes bacterians, especialment LPS, però també zimosan, ésters de forbol, llum ultraviolada, infeccions víriques, protozous i d'altres microorganismes, i limfòcits B al·logènics (en limfòcits T). Per altra banda, l'augment en la producció de TNF pot ésser fruit de l'acció de gran varietat de citocines i mediadors endògens com ara el mateix TNF, IL-1, interferó γ (IFN- γ), IFN- α , factor estimulador de les colònies granulocítiques i macrofàgiques (GM-CSF, en les seves sigles angleses), IL-2, factor de creixement transformant β ("Transforming growth factor β ", TGF- β), substància P i factor activador de les plaquetes. Mentrestant, altres factors endògens contraregulen la seva síntesi i en aquest grup s'hi inclouen les prostaglandines, corticosteroides, IL-4, IL-6 i TGF- β (aquest últim, segons el context pot induir o suprimir). El fet que tants agents exògens i endògens puguin afectar la producció de TNF ens apunta a la complexitat dels esdeveniments que regulen l'expressió d'aquesta citocina en l'organisme intacte. Malgrat que la producció de TNF sigui activada inicialment per un factor exogen, el procés està controlat de molt aprop per un complex circuit regulador constituït per la pròpia xarxa de citocines.

TNF s'ha revelat, a mesura que s'ha avançat en la seva recerca, com la citocina amb l'espectre més ampli d'activitats pleiotròpiques. La seva funció biològica més evident és la seva contribució a la resistència de l'hoste a les infeccions, sobretot, als patògens intracel·lulars¹¹⁹. Aquest efecte beneficiós del TNF en la resistència de les infeccions és el resultat de l'augment de la seva producció a nivell local. Contràriament, la seva producció en grans quantitats, amb la seva distribució sistèmica pot conduir a efectes adversos i, fins i tot, la mort, ja que es constitueix com el mediador fonamental en la patogènesi del xoc sèptic i la toxicitat derivada del LPS¹²⁰. TNF també s'ha implicat en la resistència immunològica al càncer i en la patogènia de malalties autoimmunes (artri-

tis reumatoidal, malaltia de Crohn,...)^{121, 122}

TNF, en el fetge, actua com a mediador de la resposta de fase aguda i es constitueix com un agent citotòxic en molts tipus de lesió hepàtica com la lesió secundària a isquèmia/reperfusió de l'òrgan en el context del trasplantament, hepatopatia alcohòlica, esteatohepatitis... La citotoxicitat per TNF pot venir donada per dos mecanismes diferents, la lesió oxidativa (sobretot mitocondrial) directa, com ara la formació d'anormalitats morfològiques a la mitocondria que inhibeix la respiració hepàtica mitocondrial¹²³; o bé, l'estimulació de l'apoptosi hepatocitària per activació directa del receptor TNFR-1¹²⁴. Malgrat el que s'ha esmentat prèviament, en condicions fisiològiques, a nivell hepàtic, el TNF s'ha revelat com una citocina clau en el procés de regeneració hepàtica. El seu paper potencial en aquest procés ja s'intuïa després de la demostració d'una disminució de la capacitat regenerativa hepàtica en animals resistent a l'acció d'LPS (ratolins de la soca C3H/HeJ)¹²⁵. Un estudi posterior va evidenciar aquest fet amb la verificació que la síntesi d'ADN després d'hepatectomia parcial pot ésser parcialment bloquejada amb l'administració d'anticossos (Ac) anti-TNF¹²⁶. En aquest estudi primerenc, no es van poder detectar nivells sèrics de TNF en cap dels grups estudiats; ja conegut el fet que TNF d'alguna manera controlava la producció d'IL-6¹²⁷, van incloure la mesura dels nivells d'aquesta darrera citocina en sèrum i van comprovar que disminuïen coincidint amb l'administració dels Ac. Un altre estudi, en la mateixa línia conceptual, va emprar un inhibidor de la transcripció de TNF, E3330, i va evidenciar el mateix efecte del dèficit de TNF en la regeneració hepàtica¹²⁸. En un treball posterior, s'hi va afegir l'evidència que l'addició d'Ac anti-TNF també resultava amb la disminució en la producció de *c-Jun*¹²⁹, suggerint que, per algun mecanisme, en aquells moments pendent de definir, TNF controlava l'expressió gènica que condueix a la divisió hepatocitària post-hepatectomia parcial.

La confirmació definitiva de totes aquestes observacions inicials i amb ella, la primera teoria del seu mecanisme d'acció va arribar amb l'estudi de ratolins knockout. Yamada

et al ¹³⁰ van emprar dues línies de ratolins deficients en TNFR-1 i TNFR-2, respectivament. Els animals deficients per a TNFR-2 van tenir una síntesi d'ADN normal, malgrat un retràs en l'activació d'AP-1 i C/EBP. Un treball paral·lel, pel mateix grup ¹³¹, va comprovar que aquests animals també mantenien una regeneració normal, quan eren comparats amb els animals genòtipicament normals, en el model de lesió hepàtica per tetraclorur de carboni, el que indica que el receptor TNFR-2 no juga un paper essencial en aquests processos. En canvi, els animals knockout per a TNFR-1 tenien una disminució molt acusada de la síntesi d'ADN (<1/3 en comparança amb els WT) amb una mortalitat molt alta dintre de les 24-48 hores. Coneixent la influència de TNF en l'activació del factor de transcripció NF- κ B ⁷⁵, es va incloure la valoració de l'activació d'aquest factor a través de la mesura de la seva capacitat d'unió a una sonda d'ADN amb la seva seqüència de reconeixement específica. S'hi va mesurar l'activació d'altres factors de transcripció implicats en el procés regeneratiu com ara AP-1, STAT3 i C/EBP. Es va poder observar que l'activació d'NF- κ B i STAT3 estava pràcticament abolida en els animals knockout mentre els altres dos factors mantenien una activació comparable als WT. Basant-se amb el fet que hi havia una elevació molt ràpida de TNF i IL-6 post-hepatectomia parcial en condicions normals, aquest grup va observar un augment de TNF en els animals knockout, però no d'IL-6, que gairebé no variava. En vista d'aquest fet, els autors procediren a la injecció d'IL-6 recombinant que va resultar amb la recuperació de la capacitat regenerativa normal en aquests animals. A més, aquest darrer fenomen es va produir sense que s'observés l'activació d'NF- κ B però sí d'STAT3. Els resultats d'aquest treball clau van permetre entrellucar una interrelació funcional entre TNF i IL-6 en l'inici de la regeneració hepàtica que s'evidencia amb claredat en els estudis amb ratolins knockout per a IL-6 dels que parlarem en el següent apartat.

Malgrat l'esmentat, cal dir que, més recentment, un treball demostra que els ratolins knockout per a TNF ¹³² tenen una regeneració hepàtica normal, comparable a l'observada en els controls, amb manteniment de la funció hepàtica i una supervivència post-

hepatectomia parcial similar. De forma interessant, els nivells d'IL-6 sèrica són iguals pel grup experimental i control. El mateix grup, en un estudi previ en el que descriuen el fenotip dels ratolins TNF knockout¹³³ observen que la producció d'IL-6 després de la injecció d'LPS es manté intacta. Aquestes observacions posen en dubte l'acció directa de TNF com activador de la IL-6 en el context de la regeneració hepàtica, i apunten a la possibilitat d'una superposició de funcions amb algun altre factor que actuaria activant el el propi receptor TNFR-1. No obstant, altres suposicions són possibles a l'espera de nous estudis en aquests animals, sobretot, els que avaluin les vies d'activació d'IL-6 en absència de TNF.

■ Interleucina 6 (IL-6)

La IL-6 forma part de la família de citocines que porten el seu nom i que mantenen en comú que utilitzen la proteïna transmembrana gp130 com a molècula transductora de senyal. Aquesta família, apart de la IL-6 inclou IL-11, oncostatina M (OSM), factor inhibidor de la leucèmia (LIF), factor neurotròfic ciliar (CNTF) i cardiotrofina 1(CT-1)^{134, 135}.

IL-6 fou el primer membre reconegut de la família. Originalment, es va identificar i clonar com a factor diferenciador dels limfòcits B que estimulava la seva diferenciació/maduració en cèl·lules plasmàtiques productores d'Ac.¹³⁶. Tanmateix, IL-6 també actua sobre el creixement i diferenciació dels limfòcits T, indueix la diferenciació de la línia mieloide a macròfags, indueix la síntesi proteïca en la reaccio de fase aguda hepàtica, i actua en queratinòcits, cèl·lules mesangials, cèl·lules mare hematopoètiques, desenvolupament d'osteoclasts i diferenciació neural de cèl·lules PC-12¹³⁵.

La interacció de la IL-6 amb el seu receptor és especialment interessant i val la pena fer-hi esment. El receptor d'IL-6 (IL-6R) és una molècula de 80 kD amb un domini citoplas-

màtic relativament curt¹³⁷. Aquest detall té importància, doncs s'ha vist que aquest domini no intervé en la transmissió del senyal activador; només funciona com a element d'ancoratge a la membrana. A més, IL-6R compta amb una forma soluble d'IL-6R que també és capaç d'unir-se a IL-6. Així IL-6R pot interaccionar amb IL-6 tant ancorat des de la membrana com amb la seva forma soluble, però la unió amb activitat és aquesta darrera mentre que el primer actua com a competidor. El complex format per IL-6-IL-6Rsoluble s'uneix al receptor gp130 que es troba a la membrana cel·lular¹³⁸. Aquesta interacció provoca l'homodimerització de gp130, procés que comporta l'activació i transmissió del senyal intracel·lular. De fet, s'ha vist que la interacció real és entre dos complexos IL-6-IL-6R i dues molècules gp130 (un dímer d'un trímer)¹³⁹.

El receptor gp130 és una molècula conformada per sis mòduls de fibronectina tipus III amb una estructura intracel·lular amb residus de tirosina capaços de fosforil·lar-se i produir l'activació de cinases associades de la família Jak (1, 2 i 3) que conseqüentment permetran la transmissió del senyal amb l'activació d'STAT3 com havíem comentat en apartats anteriors^{134, 140}. Aquesta interacció de IL-6 i el seu receptor permet, d'una banda, explicar la redundància d'efectes entre alguns dels membres d'aquesta família de factors, i per l'altra costat fan que l'acció d'IL-6 no es limiti només a les cèl·lules que expressin el seu receptor sinó a qualsevol cèl·lula que expressi gp130.

La IL-6 és un mediador d'especial importància en la "reacció de fase aguda" hepàtica. En situacions d'estrés (inflamació, hormones corticoïdals) s'estimula l'expressió del receptor per a IL-6 en els hepatòcits, que, en situació de repòs, l'expressen a un nivell baix¹⁴¹. La IL-6, secretada en la seva major part per les cèl·lules de Kupffer, ja sigui per estimulació per LPS o viral, s'uneix al seu receptor i activa la síntesi de "proteïnes de fase aguda"¹⁴². Aquestes proteïnes són transportades a la circulació sistèmica i serveixen com a inhibidors de proteases o proteïnes transportadores. Malgrat els monòcits sanguinis secreten molta més IL-6 per cèl·lula que les cèl·lules de Kupffer, la proximitat dels macròfags hepàtics als hepatòcits, i el fet que el fetge conté més cèl·lules de

Kupffer que monòcits són fets que subratllen la importància de la IL-6 derivada de les cèl·lules de Kupffer en la reacció de fase aguda.

El paper de la IL-6 en la regeneració hepàtica va quedar ben establert amb el treball de Cressman et al¹⁴³ amb ratolins knockout per a IL-6. En aquest estudi es comprovava que la interacció d'STAT3 amb l'ADN (que indica la seva activació) en el fetge remanent post-hepatectomia parcial dels animals WT, estava induïda de forma vigorosa ja a la primera hora post-cirurgia amb pic a les 2 hores, mentre que aquesta activació era nul·la en els animals knockout. El nombre d'hepatòcits en la fase S del cicle cel·lular, mesurats a través de la incorporació de bromodesoxiuridina (BrdU), era molt més alta en els animals WT quan es comparava amb els animals deficients que es traduïa en una supervivència quatre vegades més gran en els animals genotípicament normals. A més, l'expressió de gens d'activació precoç com *c-fos* i *jun-B* que, com hem indicat amb anterioritat, s'activen durant la regeneració hepàtica i requereixen de l'activació d'STAT3, estaven fortament reduïts en els animals deficients. Finalment, el paper clau d'IL-6 es posava de manifest amb la injecció d'IL-6 recombinant en els animals deficients, maniobra que restituïa una capacitat regenerativa pràcticament normal en aquests animals. La injecció d'IL-6 recombinant també restaurava els nivells normals d'aquests gens. Un fenomen similar s'observava en quant a la presència de la ciclina D que es trobava disminuïda. Com ja hem comentat, però, es mantenia l'expressió de certs gens de fase precoç que no semblaven alterar-se per la presència o no d'IL-6 (mecanismes independents d'IL-6), així com la síntesi d'ADN per cèl·lules no parenquimatoses, i cal esmentar que un terç dels animals deficients eren capaços de dur a terme un procés regeneratiu pràcticament normal, només marcat per un retard en el pic de síntesi d'ADN que s'acostava a les 48 hores enlloc de les 36 del grup WT.

Més evidència del paper d'IL-6 en la proliferació hepatocitària s'ha establert amb l'estudi de ratolins doble transgènics per a IL-6 i IL-6R sota el control de promotors específics hepàtics¹⁴⁴. Aquests animals presentaven espontàniament a partir de les 4 setmanes

d'edat, una hiperplàsia multifocal hepatocel·lular a les àrees periportals rodejat per àrees de necrosi areactiva i peliosi; cap d'aquestes alteracions s'havia observat en els transgènics per a un dels factors només.¹⁴⁵ Per a descartar si aquesta proliferació era reactiva a la necrosi que s'hi observava, es van escollir animals doble transgènics sense necrosi hepatocel·lular i es va comprovar que proliferaven el 92% dels hepatòcits amb la tinció nuclear amb l'anticòs monoclonal que reconeix PCNA, una proteïna sintetitzada en la fase S del cicle cel·lular. D'acord amb aquestes observacions, el mateix grup ha descrit que, amb el temps, aquests animals arriben a desenvolupar nòduls hiperplàsics similars a la hiperplàsia nodular regenerativa dels humans¹⁴⁶. Tanmateix, cal assenyalar que, probablement, aquest efecte proliferatiu de la IL-6 sobre els hepatòcits és dosi-dependent. Així, un estudi preliminar en animals transgènics per a IL-6R¹⁴⁷, observava que després de practicar una hepatectomia parcial i amb l'administració d'IL-6 recombinant, aquests animals tenien una activació d'STAT3 que es perllongava més de 48 hores després de la injecció. Però, aquest fet, en contra del que es podria pensar, s'associava a un retràs proliferatiu en el pic de síntesi d'ADN a les 48 hores enlloc de les 36 hores i una disminució neta de la capacitat regenerativa de fins el 50%. El mecanisme no queda clar, encara que els autors semblen associar-ho a una hiperactivació dels inhibidors de Cdk (cinases de ciclina, en les seves sigles angleses), imprescindible per a la fosforil·lació de les ciclines i la progressió del cicle cel·lular i que s'anomenen p21 i p27. La funció rellevant de la IL-6 en els processos regeneratius hepàtics no s'acaba només en la regeneració hepàtica post-hepatectomia parcial sinó que abarca molts altres processos patofisiològics que poden afectar el fetge. D'aquesta manera, IL-6 ha demostrat un efecte protector de la lesió hepàtica en el model d'isquèmia i reperfusió hepàtica normotèrmica (que consisteix en el bloqueig de la vena porta durant durant 90' i descompressió posterior) en animals knockout per IL-6, quan s'ha donat per la proteïna recombinant^{148*}. Aquests animals, de base, presentaven una lesió més greu que els WT. Seguint aquesta línia argumental, el mateix grup ha realitzat un estudi posterior en el que

descriuen la regeneració hepàtica en un model d'isquèmia (induïda durant 30') post-hepatectomia parcial¹⁴⁹. L'administració d'IL-6 recombinant restaura la capacitat regenerativa a nivells equivalents a la regeneració posterior a una hepatectomia sola i ho fa tant en els WT com en els IL-6 knockout, que d'entrada tenien la regeneració hepàtica molt més afectada que els WT als que es sometia al mateix procediment. L'administració de concanavalina A (conA) constiuteix un altre model de lesió hepàtica mitjançat per l'acció citotòxica dels limfòcits T. L'administració conjunta de conA amb IL-6 recombinant també va resultar en efecte protector a aquesta lesió en un altre estudi¹⁵⁰.

Per últim, destacar dos estudis recents^{151 152} en el que els dos grups han utilitzat per separat una proteïna recombinant formada per la fusió d'IL-6 i el seu receptor (IL-6/IL-6R). Com hem vist aquesta és l'estructura que activa el receptor gp130. Aquesta proteïna ha demostrat la capacitat de rescatar rates amb insuficiència hepàtica fulminant per injecció de D-galactosamina. Destaquen en els seus resultats, els elevats nivells de replicació hepatocitària, 40-50% dels hepatòcits, que s'observen després de l'administració de la proteïna de fusió.

Recapitulant tot l'exposat, l'esquema de la hipòtesi de l'inici de la regeneració hepàtica més ampliament acceptat (Fig 1) és el que presenta aquesta fase inicial, necessària però no suficient, en la qual els hepatòcits entren en fase G_1 . Aquesta fase seria reversible i els hepatòcits podrien retornar a un estat de repòs si, per exemple, no hi arribéssim a aplicar l'hepatectomia parcial. En la fase següent que es coneix com etapa de progressió, l'hepatòcit entra en una fase irreversible del cicle cel·lular en la que ja no pot retornar al seu estat de repòs inicial. Per completar l'esquema, allò que els estudis no han pogut esbrinar encara és el punt en el que els factors de creixement actuen, ja sigui en els hepatòcits prèviament "sensibilitzats" per l'acció de les citocines o simultàniament amb aquestes.

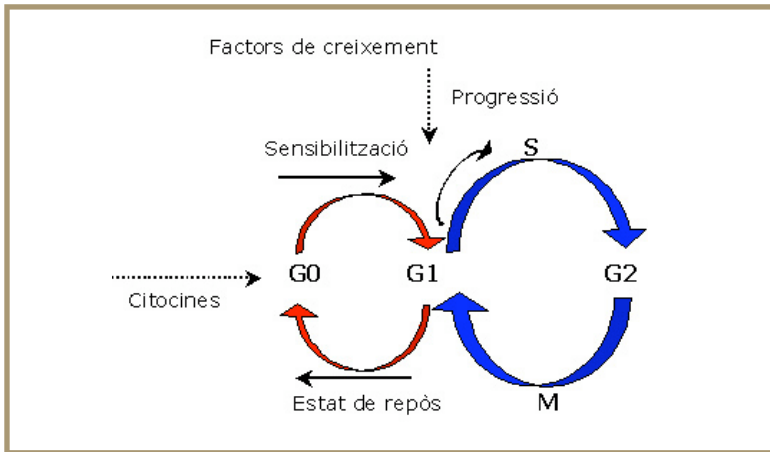


Fig. 1 Esquema de la hipòtesi de la fase inicial de la regeneració hepàtica³.

Les citocines responsables correspondrien a TNF i IL-6. Està ben establert el paper d'IL-6 en la regeneració hepàtica i queda clarament patent que la seva acció es produeix a través de l'activació específica d'STAT3. Aquests resultats, junt amb els estudis que hem descrit amb TNF i NF- κ B permeten concebre un patró inicial d'activació que s'iniciaria amb l'expressió de TNF, que actuaria a través de TNFR-1 per a iniciar la regeneració hepàtica utilitzant una cadena de senyals que involucren l'activació i/o expressió (segons ens referim a factor de transcripció o a citocina) d'NF- κ B, IL-6 i STAT3, en aquest ordre, en un esquema que s'estructuraria de la següent manera:

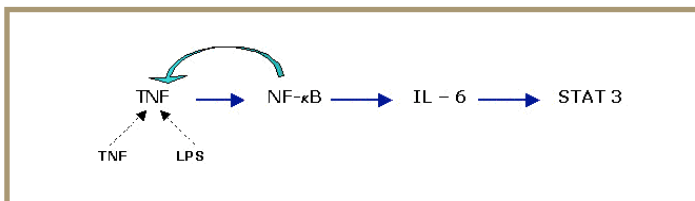


Fig. 2

Aquest esquema es constitueix com la via més clara de la “sensibilització” o “priming” dels hepatòcits i constituirà l’eix del present treball. Tanmateix, i com ja hem descrit prèviament, no hem d’oblidar que : 1) Hi ha d’altres vies independents de l’eix TNF-IL-6 que també són necessàries per a l’inici del procés regeneratiu (C/EBP, Egr1...) 2) Encara no s’ha esbrinat l’encaix exacte dels factors de creixement en aquest moment inicial, és a dir, si actuen simultàniament amb les citocines o en un pas immediatament posterior sobre l’hepatòcit ja prèviament sensibilitzat.

LA FONT ESPECÍFICA D’INTERLEUCINA 6 EN LA FASE DE SENSIBILITZACIÓ DE LA REGENERACIÓ HEPÀTICA: UNA QÜESTIÓ NO RESOLTA

Arribats en aquest punt, queda exposada abastament la importància de la IL-6 en el desenvolupament normal del procés regeneratiu. No obstant, els dubtes en aquest procés vénen a l’hora d’establir la font cel·lular d’aquesta interleucina.

El paper de les cèl·lules parenquimatoses, els hepatòcits, en la secreció de la IL-6 no ha estat estudiat. Ha quedat demostrat en estudis *in vitro*¹⁵³ que algunes línies cel·lulars derivades dels hepatòcits tenen capacitat de secretar IL-6, però no en totes les línies analitzades. Fins i tot, en un estudi recent¹⁵⁴, en el que s’avaluava l’expressió de múltiples gens de citocines a la línia cel·lular d’hepatocarcinoma humà HepG2 es reflectia aquest fet. Així, tot i que demostraven l’expressió d’ARNm d’un nombre important de factors com ara IFN- γ , TNF, TGF- β , factor estimulant de colònies macrofàgiques (M-CSF), oncostatina M, molècula d’adhesió intercel·lular (ICAM-1), IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12 i el receptor per a IL-6 (IL-6R), no es detectava la presència d’IL-6. Juntament amb aquesta, es constata l’absència d’altres citocines com IL-1, IL-2, IL-3, del receptor per a IL-2 (IL-2R) i per a la molècula CD40 (CD40 ligand). No hi ha cap estudi que hagi analit-

zat la capacitat i el perfil de secreció d'IL-6 dels hepatòcits *in vivo*. No obstant, en vista del seu potencial de secreció d'aquesta citocina, la possibilitat d'un mecanisme d'acció autocrí de la IL-6 en el propi hepatòcit no pot descartar-se absolutament; i menys, si hi afegim la dada que demostra la presència a la superfície hepatocitària del receptor per a LPS¹⁵⁵, factor, com hem vist, considerat clau en l'inici de la regeneració hepàtica, doncs, la seva absència resulta en un detriment important d'aquest procés¹²⁵. No obstant, sembla poc probable en condicions normals, una acció directe de l'LPS sobre els hepatòcits *in vivo*, doncs LPS contactaria inicialment amb els receptors de les cèl·lules sinusoidals que actuen com a barrera de separació i filtre entre el flux sanguini i les cèl·lules parenquimatoses hepàtiques.

El protagonisme sembla recaure en algun o alguns dels grups cel·lulars de les cèl·lules no parenquimatoses hepàtiques en que sí que s'hi ha observat la seva secreció d'IL-6 *in vivo*. En general, podem dividir aquestes cèl·lules en dos grans grups, les cèl·lules sinusoidals i les cèl·lules del sistema immunològic amb les cèl·lules de Kupffer i "pit cells" a cavall entre els dos grups, ja que són cèl·lules immunològiques localitzades, sobretot, en els sinusoides hepàtics.

■ Cèl·lules sinusoidals

Les cèl·lules que constitueixen els sinusoides hepàtics es divideixen en dues poblacions cel·lulars diferenciades: a) cèl·lules endotelials, b) cèl·lules d'Ito, cèl·lules estel·lades o emmagatzamadores de greix.

Aquestes cèl·lules estan localitzades dins i al voltant del sinusoides hepàtic, cada tipus cel·lular amb les seves característiques morfològiques pròpies, dinàmica de proliferació i població i patró de funcions i reaccions a les malalties.

■ Cèl·lules endotelials

Les cèl·lules endotelials conformen l'estructura dels sinusoides hepàtics i constitueixen el sedàs que filtra els fluids que s'intercanvien entre la llum sinusoidal i l'espai de Dissé. Els sinusoides hepàtics són formacions vasculars a mode de capil·lars però més estrets i amb presència de fenestracions sense diafragma ni presència de membrana basal¹⁵⁶. Aquestes dues característiques dels sinusoides són conferides per aquestes cèl·lules endotelials i, junt amb la seva capacitat per a dur a terme l'endocitosi de partícules fins a un tamany de 0.1 μm , fan d'aquestes cèl·lules un subgrup diferenciat respecte d'altres cèl·lules endotelials del reste de l'economia. No es coneix amb certesa quin paper juguen en l'alliberament de citocines i altres substàncies biològiques actives però se sap que la producció del factor activador de les plaquetes per aquestes cèl·lules està afectat per la presència d'IL-1 i metabòlits de l'àcid araquidònic¹⁵⁷. En interès del tema que ens ocupa, cal destacar que és coneguda la seva capacitat per a secretar IL-1 i IL-6 i que ho fan amb una cinètica similar a les cèl·lules de Kupffer. Com en aquestes últimes, l'estimulació de la secreció d'IL-6 *in vitro* amb LPS succeeix només quan s'han preincubat durant 24 hores¹⁵⁸.

■ Cèl·lules estel·lades o d'Ito

Les cèl·lules d'Ito són cèl·lules similars als fibroblasts excepte per la presència de vesícules de greix intracitoplasmàtiques. Es localitzen sempre en l'espai de Dissé i estan sempre separades del lumen per les cèl·lules endotelials¹⁵⁹. Per tant, només es poden connectar amb la llum sinusoidal a través del filtre d'una cèl·lula endotelial. Aquestes cèl·lules tenen dues formes diferenciades segons estiguin en repòs o activades¹⁶⁰. La

forma en repòs correspon a la cèl·lula tal com l'hem descrit a l'inici, és a dir, amb les seves vesícules grasses que corresponen majoritàriament a l'emmagatzament de vitamina A o retinol. En activar-se, aquestes cèl·lules perden les seves vesícules grasses i adquireixen una morfologia similar als miofibroblasts, és a dir, cèl·lules amb espícules amb una forma que els ha valgut el nom de cèl·lules estel·lades. En aquesta transformació inicien la producció i secreció de nous factors que no produïen en la seva forma inactiva. Entre aquests factors s'hi compten la proteïna actina del múscul llis α , un espectre ampli de productes de la matriu extracel·lular i col·lagen, predominantment del tipus I¹⁶¹. Les cèl·lules d'Ito en la seva forma activa juguen un paper clau en el procés de fibrosi hepàtica pel que aquestes cèl·lules són motiu de recerca intensa a l'actualitat. El patró comú dels processos que condueixen a la fibrosi s'inicia amb una afectació de les cèl·lules parenquimatoses que provoca alliberament de mitògens de les cèl·lules d'Ito que es troben en la forma de repòs, la qual cosa provoca la seva transformació¹⁶². Durant la subseqüent inflamació, les cèl·lules de Kupffer alliberen factors que mantenen la transformació (entre ells, el més important sembla ésser TGF- β) de les cèl·lules estel·lades. Per un mecanisme d'estimulació paracrina, elles mateixes contribueixen a perpetuar la fibrogènesi, àdhuc després de la desaparició de l'element patogènic. La proliferació d'aquestes cèl·lules després d'hepatectomia parcial és un fet conegut¹⁶³. Estudis realitzats *in vitro* han descrit la seva capacitat de produir IL-6 entre d'altres citocines de forma basal^{164, 165}. Curiosament, aquesta capacitat que s'observa en cèl·lules estel·lades de fetges normals de rata, es perd en cèl·lules estel·lades provinents d'animals que s'han tractat amb CCl₄. De la mateixa manera, estudis *in vitro* han identificat LPS, IL-1 i TNF com a potents estimuladors de la secreció basal d'IL-6 en aquestes cèl·lules¹⁶⁶.

■ Cèl·lules de Kupffer

Les cèl·lules de Kupffer constitueixen la població més gran de macròfags de l'organisme abarçant, aproximadament, un 80 % del total. Es troben ancorades o inserides al llarg de l'estructura en línia que constitueixen les cèl·lules endotelials al lumen sinusoidal. Tenen una morfologia irregular amb múltiples invaginacions que els hi configuren una forma estel·lada amb microvellositats a tot el llarg de la seva superfície cel·lular³. Les cèl·lules de Kupffer tenen la funció de recollidor de tot tipus de materials innecessaris, alterats o estranys que circulen a la sang com són: reticulòcits envellits, deixalles cel·lulars, paràsits, bacteries, virus i cèl·lules tumorals³. Les cèl·lules de Kupffer contenen receptors per al fragment constant de les immunoglobulines (Fc) i del complement que els permet reaccionar vigorosament a l'arribada de qualsevol material estrany amb la seva adhesió i posterior fagocitosis.

L'activació de les cèl·lules de Kupffer ha estat estudiada extensament. Les endotoxines bacterianes són un dels seus principals estímuls. A més a més, altres factors estimulants són les situacions de xoc, en general, l'interferon- γ , l'àcid araquidònic, factors estimulants de colònies o el propi TNF¹⁶⁷.

Es consideren signes d'activació l'alliberament d'un llistat de productes, majoritàriament citocines, la mitosi i augment de la rugositat de la superfície cel·lular. Les cèl·lules de Kupffer secreten productes amb efectes biològics potents com radicals d'oxigen, H_2O_2 , òxid nítric, proteases, TNF, IL-1, IL-6, IL-10, TGF- β , interferon- α o - γ , eicosanoides com prostaglandina D_2 , àcid hidroxieicosatetranoic (HETE), prostaglandina A_2 i E_2 i àcid araquidònic¹⁴².

Es considera obvi que alguns dels productes alliberats per les cèl·lules de Kupffer exerceixen una activitat sobre elles mateixes mitjançant un mecanisme autocrí. A més, alguns d'aquests productes poden tenir un efecte de retroalimentació negativa com ara el TNF que estimula la prostaglandina E_2 substància que a l'hora és un inhibidor de la

pròpia secreció de TNF¹⁶⁸.

Al fetge, les cèl·lules de Kupffer són les úniques cèl·lules sinusoïdals amb capacitat secretora de TNF¹⁶⁹. Curiosament, al fetge, altres cèl·lules no sinusoïdals amb capacitat per a la seva secreció són les cèl·lules epitelials canaliculars biliars i de l'endoteli de les branques intrahepàtiques de la vena porta^{142, 170} després de l'estimulació amb clorur de gadolini (GDCL3).

El patró de secreció d'aquests productes sembla dependre dels estímuls. Així, les cèl·lules de Kupffer sense estimulació produeixen quantitats insignificants de prostaglandina E₂ i IL-6, però després de l'estimulació amb endotoxina s'observa un ràpid increment en la producció de TNF, seguit per una secreció lenta però continuada de prostaglandina E₂, IL-1 i IL-6.^{142, 171}

L'activació i alliberament de citocines sembla ésser lleugerament diferent entre les cèl·lules de Kupffer humanes i de les rates¹⁷². Les humanes estimulades secreten IL-1, IL-6, TNF, TGF-β i prostaglandina E₂, però a diferència de les de rata no secreten òxid nítric. També, a les cèl·lules de Kupffer humanes la prostaglandina E₂ no era capaç d'inhibir la resposta a l'estimulació amb endotoxina. Finalment, cèl·lules de Kupffer aïllades del fetge humà secreten IL-10, inhibidor a la vegada de la secreció de TNF i IL-6, cosa que no s'observa en les cèl·lules de Kupffer de rates.

La secreció dels productes de les cèl·lules de Kupffer pot esdevenir tòxica per al parènquima hepàtic amb l'aparició de balonització cel·lular i necrosi, febre i amb el bloqueig de certs processos bioquímics¹⁷³. Com hem comentat prèviament², TNF té un efecte citotòxic sobre els hepatòcits¹²³. A més, l'alliberament d'aquesta citocina provoca la tumefacció de les cèl·lules endotelials i l'adherència dels glòbuls blancs. Sembla que TNF indueix l'adherència dels leucòcits polimorfonuclears a les cèl·lules endotelials, des-

¹ Veure apartat **TNF**

prés del qual els polimorfonuclears es degranulen i alliberen radicals d'oxigen que causen un dany afegit al teixit¹⁷³. Els reactius de fase aguda protegeixen contra l'efecte tòxic d'aquesta citocina.

Malgrat l'ús d'immunofenotipatge, l'origen i cinètica de les cèl·lules de Kupffer són encara motiu de controvèrsia, nosaltres només tractarem de la seva cinètica i funció. No obstant, considero interessant esmentar alguns dels principals treballs que han tractat aquest tema. Varis són els models que s'han emprat per a estudiar ja sigui la seva proliferació com l'influx de macròfags dins del fetge. Diversos estudis han confirmat el potencial mitòtic d'aquestes cèl·lules *in situ*^{174, 175} Naito *et al*¹⁷⁶ van demostrar la seva capacitat proliferativa en una situació de monocitopènia greu després de l'administració d'estronci-89. Dos estudis simultanis^{177, 178} van presentar evidències de que el reclutament de macròfags sinusoïdals des del moll d'os després d'irradiació de la població resident de cèl·lules de Kupffer. En un d'aquests estudis, es va descriure que, després de trasplantament de moll d'os, la majoria de macròfags hepàtics eren del donant, mentre que, al cap de 35 setmanes, aquestes cèl·lules del donant havien pràcticament desaparegut¹⁷⁸. Aquest estudi és important, doncs, ha estat la base del model experimental del present treball, com veurem més endavant. Altres teixits com la melsa, el moll d'os o el sac vitelí poden proveir de precursors dels macròfags residents¹⁷⁷. Les cèl·lules de Kupffer poden proliferar i migrar a les àrees hepàtiques lesionades als estadis inicials de fibrosi¹⁷⁹.

La idea general, que es manté en l'actualitat i que es va apuntar ja fa uns anys, és que les cèl·lules de Kupffer poden tant proliferar localment com ésser suplementades per la immigració de macròfags d'origen extrahepàtic¹⁸⁰. La importància relativa d'aquests mecanismes sembla dependre de les condicions experimentals o patològiques. Així, la proliferació local sembla ésser especialment important durant la regeneració hepàtica, mentre que el reclutament extrahepàtic tindria més importància en situacions en les que la població de cèl·lules de Kupffer ha estat eliminada. De fet, la cinètica d'aquestes

cèl·lules evidenciada en els diversos estudis és comptatible amb un model que contem-
pli l'existència de dos tipus de macròfags al fetge.: un tipus resident (les cèl·lules de
Kupffer, pròpiament dites) i un tipus derivat dels monòcits sanguinis³. Aquestes dues
poblacions es poden distingir morfològicament: les cèl·lules de Kupffer tenen un reticle
endoplasmàtic rugós que és positiu per a peroxidases, tenen gran capacitat fagocítica
per a partícules de làtex de 0.8 µm i tenen un citoplasma gran i irregular amb molts liso-
somes, mentre que que els monòcits tenen grànuls peroxidasa-positius, són menys
fagocítics pel làtex quan resideixen al fetge, són mes petits i tenen una característiques
morfològiques diferenciades. Finalment, cal dir que les cèl·lules de Kupffer i els monò-
cits són capaços de proliferar en els sinusoides hepàtics ¹⁸¹i ambdós poden, probable-
ment, migrar cap a dins i cap enfora del fetge.

■ **Paper de les cèl·lules de Kupffer en la regeneració hepàtica: Eliminació selectiva com a mètode d'estudi**

El paper de les cèl·lules de Kupffer a la regeneració hepàtica ha estat objecte d'estudi al llarg de molts anys. De forma molt preliminar, ja existia algun estudi que intentava avaluar la influència de les cèl·lules de Kupffer a la regeneració hepàtica. La injecció de cèl·lules de Kupffer aïllades al 4art dia post-hepatectomia parcial en una rata recent hepatectomitzada tenia un efecte supressor sobre aquest procés regeneratiu¹⁸². No obstant, no es va realitzar cap estudi posterior per a analitzar la naturalesa d'aquest efecte.

Els treballs més consistents en aquest camp han vingut dels estudis derivats de l'eliminació química de les cèl·lules de Kupffer. Una estratègia per a l'estudi de la funció fisiològica o paper patogènic d'un determinat element, ja sigui una cèl·lula o substància és

comprovar quines variacions es provoquen en la seva absència. Els animals knockout són una eina especialment útil en aquest sentit ja que ens permeten observar la manifestació fenotípica conseqüència de l'absència de l'element a estudi. Així, els ratolins knockout per a IL-6 han estat útils per a esbrinar el paper que la IL-6 podia jugar en el fenomen de la regeneració hepàtica, ja que han evidenciat que amb la seva absència la regeneració hepàtica no és capaç de desenvolupar-se. Desafortunadament, per a l'estudi de les funcions de les cèl·lules de Kupffer, no es compta, fins el moment, amb animals específicament knockout per a aquestes cèl·lules. Els animals que s'aproximarien més a l'ideal serien els knockout per al factor estimulador de colònies macròfagiques coneguts com ratolins osteopetròtics (op-/op)¹⁸³. Aquests animals no compten amb cèl·lules de la línia macròfàgica, però, el gran nombre d'anomalies morfològiques associades (òssies, cutànies...) i la seva extrema labilitat, els descarten per a estudis que requereixin algun tipus de manipulació, ja sigui per a l'estudi de l'efecte de noxes com ara alguns tòxics o ja sigui en el cas de manipulació quirúrgica.

Com a estratègia alternativa s'han desenvolupat mètodes químics que permeten l'eliminació específica de les cèl·lules de Kupffer. Dos són els models amb els que es compten a l'actualitat i que es basen en la injecció respectiva de dues substàncies: clorur de gadolini ($GdCl_3$) i difosfonat de diclorometil·lè (CL2MDP) encapsulat en liposomes.

■ Model amb $GdCl_3$

El $GdCl_3$ és capaç de bloquejar la fagocitosi i provocar l'eliminació selectiva de les cèl·lules de Kupffer. El primer estudi en evidenciar aquest efecte fou dut a terme ja l'any 73¹⁸⁴ però l'avaluació d'aquest fenomen no es faria fins més endavant per Hardonk *et al*¹⁸⁵. Els autors van comprovar que l'administració endovenosa d'una dosi única de

GdCl₃ (0.75mg per 100 g de pes corporal) resultava en l'eliminació de les cèl·lules de Kupffer de major tamany ubicades a la zona periportal demostrada per l'ús d'anticossos específics, amb pèrdua de la capacitat fagocítica demostrada per la incapacitat de captar partícules de carbó al fetge després de la injecció. Aquest efecte no s'observava en els macròfags esplènics, que eren menys vulnerables, amb només una lleugera disminució de la seva població macrofàgica i on, fins i tot, s'hi constata un increment en la capacitat de captar aquestes partícules. La repoblació cel·lular del fetge s'iniciava als 4 dies i, un cop aquesta es duia a terme, les "noves" cèl·lules de Kupffer tenien la mateixa sensibilitat al GdCl₃ que les seves predecessores. Els autors postulen que el mecanisme d'acció d'aquesta substància es basa en el fet que adquireix una consistència col·loidal en $\text{pH} > 6$, el que, després de la seva unió a proteïnes, permetria la seva fagocitosis per les cèl·lules de Kupffer de més gran tamany (això explicaria la persistència de cèl·lules de Kupffer de menor tamany que tenen una menor capacitat fagocitària i que, amb tota probabilitat, correspondrien a la població derivada dels monòcits sanguinis). En l'interior dels lisosomes, la disminució del pH faria que el GdCl₃ es tornés un altre cop soluble i els ions que se'n deriven en l'ambient àcidic s'unirien als components de la membrana lisosomal bloquejant els canals del Ca^{2+} , un efecte ja conegut d'aquest element. El reciclatge fisiològic continu dels lisosomes amb membrana aberrant a la membrana plasmàtica acabaria determinant la destrucció cel·lular.

A partir d'aquest estudi amb la descripció d'aquest model d'eliminació selectiva, es derivaren diversos treballs que analitzaven el paper de les cèl·lules de Kupffer en diverses situacions fisiopatològiques del fetge. Així, l'eliminació de les cèl·lules de Kupffer per aquest mètode en el model de toxicitat aguda per CCl₄, en el que GdCl₃ s'administrava una hora prèvia a l'administració del tòxic, va evidenciar una disminució en la lesió dels animals tractats respecte els controls¹⁸⁶. De la mateixa faïso, l'eliminació de les cèl·lules de Kupffer per aquest mètode protegia el fetge de la lesió precoç induïda per l'alcohol¹⁸⁷. Els animals tenien una disminució significativa de les aminotransferases respec-

te els controls, acompanyat per un menor acúmulo de greix, inflamació i necrosi. En un model de reperfusió hepàtica, la lesió també es veia reduïda¹⁸⁸. Aquests estudis, doncs, assenyalaven les cèl·lules de Kupffer com a elements clau en el desenvolupament de toxicitat i inflamació hepàtica i confirmaven el model del GdCl₃ com a un mètode vàlid per a l'estudi del paper de les cèl·lules de Kupffer en diversos processos fisiopatològics hepàtics.

En vista dels resultats descrits, el grup de Rai *et al*¹⁸⁹ va estudiar la influència d'aquestes cèl·lules en la regeneració hepàtica utilitzant aquest mètode. Aquests autors esperaven que l'eliminació d'aquestes cèl·lules provocaria un efecte similar al que resultaria de neutralitzar TNF. Per a formular aquesta hipòtesi es basaven en les dades següents: a) les cèl·lules de Kupffer són els productors més importants de TNF en el fetge, b) situacions de baixa endotoxèmia redueixen la capacitat regenerativa¹²⁵ i, c) un conunt de dades pròpies del seu grup de treball en les que prevenien la regeneració amb l'ús d'anticossos anti-TNF.

En el seu model experimental, el GdCl₃ s'administrava 24 hores abans de la pràctica de l'hepatectomia parcial. Malgrat comprovaven experimentalment l'eliminació de les cèl·lules de Kupffer, inesperadament van observar que la capacitat regenerativa hepàtica es veia augmentada. Aquest fet s'acompanyava per un augment dels nivells de ARNm de TNF hepàtic respecte els controls que s'arriba a mantenir durant 24 hores i augment d'IL-6 sèrica a les primeres 3 hores post-hepatectomia parcial. També s'hi observava augment dels nivells proteïcs dels factors de transcripció C/EBP i augment activitat d'AP-1, tots ells relacionats amb el procés de regeneració hepàtica³. En vista dels resultats, el grup de treball justifica que deuen existir altres fonts de TNF diferents a les cèl·lules de Kupffer.

¹ Veure apartats anteriors

En un intent d'aprofundir en l'estudi del fenomen observat en l'estudi previ, el mateix grup comprovava en un estudi posterior que l'administració de GdCl₃ produïa una disminució acusada d'IL-10¹⁹⁰ (conegut inhibidor de la funció macrofàgica i de la síntesi de TNF en models d'endotoxèmia) a les fases inicials post-hepatectomia parcial en comparança amb el grup control. Els autors suggereixen que aquesta reducció seria la responsable de l'augment observat de TNF.

Per contra, un estudi posterior en rates, amb administració d'LPS per via portal en perfusió contínua durant 10 minuts a les 48 hores post-hepatectomia parcial, amb o sense injecció de GdCl₃, 20 hores abans, i recollida de l'efluent per venes suprahepàtiques, objectivava una abolició de TNF en l'efluent hepàtic en els animals amb GdCl₃ que no d'IL-6 que no es veia afectada.

Paral·lelament a aquest estudi, un altre grup¹⁹¹ va objectivar que el GdCl₃ tenia un efecte proliferatiu en els hepatòcits *in vivo* en fetges en repòs que es mantenia fins a 48 hores, el que, d'entrada, limita l'ús d'aquest reactiu en l'avaluació de qualsevol procés proliferatiu hepàtic.

Una anàlisi recent d'aquest fenomen paradoxal, l'efecte estimulador que té en la regeneració hepàtica l'eliminació selectiva per GdCl₃ de les cèl·lules de Kupffer¹⁹² indicava que aquest efecte es podia contrarrestar amb l'administració d'anticossos anti-TNF en la fase inicial post-hepatectomia parcial. En canvi, no és el cas si s'administraven passades 24 hores. Els autors demostraven que el final d'aquest període ja no es detectava la presència de les cèl·lules de Kupffer. Aquest fet suggeria que el TNF només intervenia en el moment inicial del procés regeneratiu. El mateix estudi, contradint resultats d'estudis previs que hem descrit, demostrava que GdCl₃ no era un mitogen directe dels

¹ Línia cel·lular derivada de cèl·lules de leucèmia promielocítica humana que es transformen amb macròfags amb l'addició d'acetat de forbol.

hepatòcits quan es trobaven aïllats en cultiu. En canvi, amb l'ús de cultiu condicionat amb una línia cel·lular macrofàgica (HL-60⁴) i una línia cel·lular d'hepatòcits (HepG2) alhora, s'aconseguia la proliferació dels hepatòcits amb la presència de nivells elevats de TNF al sobrenadant quan es comparava amb el cultiu control, el que subratllava el requeriment de la presència de cèl·lules de Kupffer per a la producció de TNF en el moment inicial. Per últim, destacar que l'efecte proliferatiu *in vitro* també es prevenia amb l'ús d'anticossos anti-TNF.

En vista dels resultats descrits, semblaria que abans de la seva destrucció, GdCl₃ seria un estimulador de la producció de TNF per part de les cèl·lules de Kupffer. Aquesta conclusió ens planteja l'interrogant de quina és la interacció real entre GdCl₃ i les cèl·lules de Kupffer. En aquest sentit, cal destacar que hi ha alguns estudis^{193, 194} que semblen suggerir que, de fet, GdCl₃ no elimina les cèl·lules de Kupffer sinó que l'únic que fa és canviar el seu fenotip. L'estudi de Rai *et al*¹⁹³, el mateix grup del treball que va avaluar l'efecte dels anticossos antiTNF, va comprovar la desaparició del receptor específic de les cèl·lules de Kupffer, KCR, que en treballs previs s'havia considerat signe d'eliminació d'aquestes cèl·lules. No obstant, l'administració de partícules fluorescents 2 hores abans de l'administració de GdCl₃ resultava en fluorescència hepàtica, signe que aquestes partícules han estat fagocitades, només que la distribució d'aquest senyal fluorescent canviava respecte els controls i ara prenia una distribució panacinar en comparança a la distribució periportal del grup control. La intensitat de la fluorescència era similar entre el grup control i experimental, el que inidica la integritat de les cèl·lules de Kupffer, doncs, altrament, la destrucció macrofàgica alliberaria aquestes partícules i serien drenades fora del fetge pels sinusoides. Addicionalment, els autors demostraven la presència de l'ARN del gen Pu-1 que és específic de les cèl·lules de Kupffer i monocítiques. La conclusió del treball era que el GdCl₃ no eliminava físicament les cèl·lules de Kupffer sinó que canviava el seu fenotip, distribució i capacitat fagocítica.

En resum, podem concloure que el conjunt d'aquests treballs corroboren la dificultat de

la interpretació dels resultats que s'observen amb aquest model i en limiten la utilitat com a model de referència per a l'estudi del paper de les cèl·lules de Kupffer en la regeneració hepàtica.

■ Model de CL2MDP

L'altre model d'eliminació selectiva de cèl·lules de Kupffer és el que utilitza CL2MDP. Aquest sistema aprofita el fet de que els macròfags fagociten els liposomes. Així, l'encapsulament d'un fàrmac o substància dins un liposoma permet que sigui internalitzat pels macròfags i la substància és alliberada al seu interior tant bon punt la bicapa fosfolipídica es degrada per influència de les fosfolipases que es troben als compartiments lisosomals cel·lulars. L'estudi de Van Rooijen *et al*¹⁹⁵ demostra, amb l'ús d'anticossos monoclonals macròfag-específics, que la injecció de CL2MDP encapsulat en un liposoma per via intravenosa en ratolins elimina els macròfags del fetge i de la melsa en rates. Aquesta eliminació és efectiva als dos dies després de la injecció i es manté durant 1 setmana en el fetge. Els macròfags esplènics de la polpa vermella presenten un perfil d'eliminació similar al del fetge, mentre que els de la polpa blanca pateixen un canvi en la distribució de marcadors cel·lulars però sense ésser eliminades, fet que els autors atribueixen a una menor distribució del CL2MDP encapsulat en aquesta zona. En el cas de les cèl·lules de Kupffer a través de l'ús de marcadors específics, s'objectiva una eliminació del 90% de les de gran tamany i un 50% de les de tamany menor.

Aquest mètode també ha estat emprat per a l'estudi del paper de les cèl·lules de Kupffer en la regeneració hepàtica. Tres són els estudis a la literatura que ho analitzen. En el primer d'ells¹⁹⁶, s'injectava liposomes encapsulats de CL2MBP en ratolins 24 hores abans de l'hepatectomia parcial i es comparava l'índex proliferatiu amb un grup control amb

hepatectomia amb injecció només de sèrum i un altre amb sèrum més liposomes sense contingut. Inesperadament, per allò previst pels autors, objectivaren que el grup d'animals tractats amb liposomes amb CL2MBP tenien a les 24 hores un índex hepatocitari replicatiu superior (mesurat per incorporació de bromodesoxiuridina (BrdU)) quan es comparaven als controls. Per a descartar la possibilitat que el CL2MBP tingués un efecte directe sobre la síntesi d'ADN dels hepatòcits, van utilitzar cultius hepatocitaris als que afegiren, respectivament, CL2MBP sol i encapsulat en liposomes. Mentre els hepatòcits d'aquest últim grup no presentaven cap efecte objectivable en quant a replicació i viabilitat, el grup amb CL2MBP sol tenien una síntesi d'ADN i una viabilitat hepatocitària reduïda. El pic de replicació en normalitat post-hepatectomia parcial és entre les 24-48 hores. Una possibilitat que plantegen els autors per aquests resultats seria que el pic de replicació s'hagués avançat en els animals on s'han eliminat les cèl·lules de Kupffer. Aquesta possibilitat es descarta amb l'observació que no hi ha un augment de l'índex replicatiu quan s'obtenien les mostres a les 12 hores. Al mateix temps, es va comprovar que animals injectats amb CL2MBP encapsulat també presentava un augment de la replicació hepatocitària en fetge en repòs al que no s'ha practicat hepatectomia parcial. En conseqüència, en un intent d'explicar aquestes observacions en el seu conjunt, es va mesurar la producció de certs factors que actuen com a estimuladors o limitants de la regeneració hepàtica. En el conjunt de factors estimuladors, van evidenciar una reducció d'un 47% en els nivells d'HGF en el grup experimental. Mentre en el conjunt de factors inhibidors, objectivaren una reducció similar a HGF en els nivells de TGF- β (56%). No obstant, la diferència més acusada era en l'expressió d'IL-1 β , que era absent en el grup experimental. Aquests resultats porten a concloure als autors que l'augment de la proliferació es el resultat net de la reducció en l'expressió de factors inhibidors del procés de regeneració hepàtica, que, presumiblement, serien secretats per les cèl·lules de Kupffer.

Els altre dos treball, realitzat amb posterioritat, que avaluaven la regeneració hepàtica

després d'eliminació selectiva de les cèl·lules de Kupffer amb l'ús de CL2MDP encapsulat evidenciava un efecte contrari a l'estudi que hem descrit. En el primer estudi¹⁹⁴ per ordre cronològic, els autors injectaven CL2MDP encapsulat 3 dies post-hepatectomia parcial en ratolins i comprovaven l'eliminació de les cèl·lules de Kupffer amb anticossos monoclonaus específics (F4/80 i BM8). En el grup experimental, la regeneració hepàtica, mesurada pel pes hepàtic, i la proliferació dels hepatòcits, per incorporació de timidina marcada, disminuïa durant 7 dies i no recuperava els nivells del control fins al 14è dia. S'observava una disminució en la producció de diverses citocines, com IL-6 i TNF, en el grup experimental però amb recuperació posterior i certa perllongació que coincideix amb la reaparició de les cèl·lules de Kupffer al fetge. El segon i més exhaustiu estudi¹⁹⁷, establia un protocol experimental en el que es practicava una esplenectomia a les rates, 7 dies abans de l'hepatectomia parcial. Aquesta maniobra es justifica pels autors perquè en els estudis inicials que hem descrit el CL2MDP encapsulat afecta també a subpoblacions de macròfags esplènics, d'aquesta manera volen assegurar que s'està observant el paper exclusivament de les cèl·lules de Kupffer. Finalment, l'hepatectomia parcial es practica 48 hores després de la injecció del complex liposòmic. En aquestes condicions, la regeneració hepàtica es retrassa, demostrada per la incorporació de BrdU, amb una clara diferència a les 48 hores i restauració posterior de la síntesi d'ADN a les 96 hores. En aquest mateix període de temps, es confirma per la disminució mitja del percentatge de pes inicial de la part de fetge remanent després de l'hepatectomia respecte els controls. Aquestes observacions es correlacionen amb una reducció important de l'expressió hepàtica de TNF i IL-6, en el cas d'aquesta última també es reflecteix en els seus nivells sèrics, entre les 4 i 24 hores. També observen una disminució de les citocines contrarreguladores IL-10 i TGF- β sense que sembli derivar-se'n cap efecte objectivable.

Encara que aquest últim estudi apunta cap el paper activador de les cèl·lules de Kupffer, l'ús d'aquest mètode experimental no sembla el més ideal per al seu estudi doncs ens

requereix una manipulació important del sistema que el fa poc pràctic, difícil de reproduir i l'allunya del procés normal *in vivo*.

■ Cèl·lules del sistema immunològic al fetge

Les funcions fisiològiques del fetge com a centre d'aclariment de patògens i antígens de la sang, síntesi proteïca i metabolisme, requereix d'una resposta immunològica que estigui regulada localment i adaptada a aquestes tasques. Els microorganismes patogènics han d'ésser eliminats apropiadament mentre, alhora, cal crear una tolerància immunològica per als antígens derivats del tracte gastrointestinal. De fet, és conegut que el fetge és un òrgan que promou la tolerància immunològica més que estimular la resposta inflamatòria¹⁹⁸. No només estaria involucrat en la tolerància al trasplantament sinó que contribueix a la tolerància dels antígens administrats per via oral (que entren el fetge per la vena porta)¹⁹⁹ i la contenció de la resposta immunològica sistèmica (pels antígens que entren al fetge de la circulació sistèmica per l'artèria hepàtica).

A grans trets, ja que queda més enllà dels objectius del present treball, resumirem a continuació alguns aspectes especials del funcionament del sistema immunològic al fetge. Així, encara que els hepatòcits constitueixen la població cel·lular més nombrosa hepàtica, no tenen una interacció directa amb els leucòcits de la circulació. Les cèl·lules endotelials sinusoidals i les cèl·lules de Kupffer són les que interactuen directament amb els leucòcits circulants. En el fetge, l'aclariment dels antígens de la sang corre a càrrec principalment de les cèl·lules endotelials per una endocitosi molt eficaç mitjançada per receptor²⁰⁰. Aquestes cèl·lules expressen constitutivament totes les molècules necessàries per a la presentació d'antigen (CD54, CD80, CD86, antígens d'histocompatibilitat tipus I i II i CD40) i poden funcionar com a cèl·lules presentadores d'antigen per

a limfòcits T CD4⁺ i CD8⁺²⁰¹. D'aquesta manera, aquestes cèl·lules probablement contribueixen a la vigilància immunològica hepàtica per activació de limfòcits T efectors. Per altra banda, l'activació d'aquests limfòcits es veu molt influenciada pel microambient local. Aquest microambient es caracteritza per la presència fisiològica de constituents bacterials com l'endotoxina i per l'alliberament local de mediadors immunosupressius com IL-10, prostaglandina E₂ i TGF-β²⁰¹. L'equilibri d'aquests factors establirà si la resposta immunològica és de tipus inflamatori o tolerogènica.

Les cèl·lules de Kupffer situades, sobretot, en àrees on la circulació sanguínia entra el fetge, com ara la zona periportal, aclareixen la sang de material en forma de partícules per fagocitosi, ja siguin antígens o microorganismes patogènics³. Les cèl·lules de Kupffer col·laboren també amb els neutròfils en l'eliminació de les bacteries opsonitzades. El resultat net d'aquestes accions es que el fetge rarament s'infecta per bacteries i contribueix a l'aclariment de les infeccions bacterianes sistèmiques. Les cèl·lules de Kupffer i els neutròfils son part de la immunitat innata i estan disponibles immediatament, aquesta velocitat de resposta és clau per a evitar la infecció hepàtica.

L'entramat de cèl·lules endotelials i els macròfags, representats per les cèl·lules de Kupffer, junt amb els limfòcits circulants constitueixen, com hem vist, la base de la resposta immunològica hepàtica.

Malgrat el fet conegut que les cèl·lules del sistema immunològic tenen capacitat de secretar IL-6, la influència específica en la secreció d'aquest factor per part sistema immunològic en el context de la regeneració hepàtica no ha estat analitzada a la literatura. Sí, en canvi, s'han fet alguns estudis encaminats a comprovar la influència general del sistema immunològic en procés regeneratiu hepàtic. El primer treball va consistir en l'estudi de la regeneració hepàtica en ratolins sense timus ("nude")¹²⁵. S'evidenciava que aquests animals presentaven una regeneració hepàtica disminuïda. No obstant, un estudi posterior, presentava uns resultats que semblen entrar en contradicció amb aquest primer estudi. En aquest treball ²⁰², presentat com a resultat preliminar, s'utilitzaven

rates amb irradiació total subletal (750 roentgens) a les que es reconstituïa només amb limfòcits T. Es comprovava que la regeneració hepàtica en aquests animals¹ era reduïda respecte del grup control, pel que els autors atribuïen un efecte supressor dels limfòcits T en la regeneració hepàtica.

En l'estudi de la influència de la xarxa de citocines que participen en la resposta immunològica en el procés regeneratiu, es troba aquest estudi que avalua l'efecte de l'administració d'interferon- γ i IL-2 en el model d'hepatectomia parcial²⁰³. L'administració d'ambdues citocines tant per separat com donades conjuntament, en aquest cas amb un efecte sinèrgic, inhibeixen la regeneració hepàtica. Aquests autors havien determinat prèviament que hi ha augment de l'expressió d'antígens d'histocompatibilitat tipus II en una hepatectomia parcial en animals controls i que immunosupressors que acceleren la regeneració hepàtica, com l'FK-506²⁰⁴, inhibeixen l'expressió d'aquests antígens. En canvi, en el cas de l'administració d'interferon- γ i/o IL-2, els autors observen un augment important de l'expressió d'aquests antígens en la superfície de les cèl·lules de Kupffer en comparança amb les cèl·lules derivades de rates hepatectomitzades a les que s'ha injectat sèrum fisiològic. En vista dels resultats, els autors atribueixen un paper a l'expressió dels antígens d'histocompatibilitat tipus II, i suggereixen un mecanisme que consistiria en la seva presentació, per part de les cèl·lules de Kupffer com a autoantígens als limfòcits T que, al seu torn, suprimirien el procés regeneratiu. En estudis posteriors, aquest mateix grup atribueix aquesta funció a la població intrahepàtica extratímica de limfòcits T, com veurem tot seguit.

El fetge presenta poblacions de cèl·lules immunològiques intrahepàtiques específiques que estan constituïdes per les cèl·lules "pit" o cèl·lules "natural-killers" (NK) intrahepàtiques i la població limfocitària intrahepàtica extratímica representada, sobretot, pels lim-

¹ Basat en la mesura dels índexs mitòtics en tincions hepàtiques amb hematoxil·linaeosina.

fòcits T Natural killers o cèl·lules NK T, en les seves sigles angleses. Ens aturarem en la seva descripció, especialment, parant atenció a la seva possible influència en el procés de regeneració hepàtica.

■ Cèl·lules “pit” o natural killers intrahepàtiques

Les cèl·lules “pit” foren descrites inicialment l’any 76²⁰⁵. Es troben localitzades als sinusoides al llarg de tota la barrera endotelial. La seva acció destructora és espontània, ocorre sense activació de cap tipus, i no està restringida a les cèl·lules amb presentació d’antígens d’histocompatibilitat tipus II com ara les les cèl·lules tumorals o infectades per virus²⁰⁶ el que defineix aquestes cèl·lules com les natural killers (NK) residents hepàtiques. En l’actualitat, en vista que s’ha observat la presència de cèl·lules NK també al voltant dels hepatòcits²⁰⁷, en general, es tendeix a limitar l’ús del terme cèl·lules “pit” a les cèl·lules NK residents als sinusoides, però aquest són encara termes emprats indistintaments en la majoria de la literatura.

Les cèl·lules “pit” aïllades tenen un nivell d’activitat “natural killer” molt elevada, comparable al que presentarien les cèl·lules NK de la sang quan s’estimulen amb IL-2²⁰⁶. Aquest fet, es demostra amb la co-incubació amb cèl·lules de la línia cel·lular de leucèmia Yac-1 durant 4 hores. Aquestes cèl·lules contenen cromi-51 que s’allibera amb la seva destrucció fet que es considera una mesura de la seva capacitat general de citòlisi. En aquest cas, amb una relació cèl·lula efectora/cèl·lules diana d’ 1/10 es destrüien un 40% d’elles. Però, de forma interessant, les cèl·lules “pit” no només presenten una activitat NK sinó també citotoxicitat natural directa. Aquesta activitat addicional es mesura amb l’ús de cèl·lules aïllades de tumors sòlids. Aquest tipus de citotoxicitat difereix de la de les cèl·lules de Kupffer en que aquestes últimes requereixien d’un estímulo

adequiat i en les "pit" és espontània. Es creu que l'activitat NK es basa en l'alliberament de productes preexistents mentre la citotòxica es basa en productes sintetitzats *de novo*³. Aquesta doble activitat té lògica si pensem en la diferència de sensibilitat de diferents línies cel·lulars tumorals a una forma o una altra de citotoxicitat.

El reclutament de cèl·lules NK de la sang al fetge sembla dependre en gran manera del TNF com ho demostra que anticossos bloquejadors d'aquesta citocina elimina l'influx intrahepàtic de cèl·lules NK. Les cèl·lules de Kupffer, per la seva part, juguen també un paper en la diferenciació de les NK als sinusoides com s'evidencia perquè l'eliminació de cèl·lules de Kupffer per CL2MDP encapsulat provoca la desaparició de les cèl·lules "pit" que és gradual i màxima a les 2 setmanes¹⁹⁵.

Les cèl·lules "pit" tenen un comportament especial durant la regeneració hepàtica. L'únic estudi que ha analitzat aquest comportament⁵¹ valorava els canvis el fenotip i la funció de les cèl·lules NK o "pit" després d'un 70% d'hepatectomia parcial en rates. El procés total de regeneració es completava al 14è dia. Contràriament, el nombre de cèl·lules NK residents (mesurat per anàlisi fluorocitomètrica del marcador NKR-P1^{bright}) al fetge es completava al 3er dia. No obstant, les funcions espontànies o induïdes per les cèl·lules NK eren clara i consistentment suprimides durant les primeres 24 hores. Emperò, la capacitat d'unir-se a les cèl·lules diana es trobava intacta pel que la supressió de la capacitat citotòxica de les cèl·lules NK es trobava al nivell efector, no al nivell de reconeixement cel·lular. Aquesta supressió funcional es mantenia durant els 14 dies que durava el procés regeneratiu en pràcticament tots els casos, però, curiosament, l'augment de la capacitat citotòxica per IL-2 contra cèl·lules de la línia YAC-1 i la proliferació, també induïda per IL-2, de cèl·lules NK residents al fetge, només es suprimien les primeres 24 hores, s'incrementava entre els 2 i 7 dies i retornaven a la normalitat al 14è dia. Sorprenentment, aquest perfil era paral·lel al que s'observava en limfòcits T residents al fetge en la seva resposta proliferativa a ConA. Cap d'aquests canvis s'objectivava en cèl·lules NK de la circulació sistèmica o de la melsa post-hepatectomia parcial.

Una observació interessant és que, mentre els hepatòcits son resistent a la lisi per cèl·lules NK en situació normal, en el període inicial de la regeneració hepàtica els hepatòcits es tornen sensibles a aquesta acció citotòxica quan es posen en contacte amb NKs extretes de fetge normal. En canvi, les cèl·lules NK de fetge en regeneració són incapaces de dur a terme aquesta lisi, tot i la sensibilitat demostrada pels hepatòcits en aquest període. Tant la resistència dels hepatòcits com la capacitat citotòxica envers ells quan es troben en regeneració de les cèl·lules NK torna a la normalitat entre els dies 7 i 14. Finalment, l'eliminació *in vivo* de les cèl·lules NK amb anticossos anti-NKR-P1 va resultar en un augment significatiu de la regeneració hepàtica, mesurada pel pes hepàtic en relació al de l'animal al 4rt dia post-hepatectomia parcial. En base a aquests resultats, els autors concluen que les cèl·lules NK residents al fetge estaven involucrades en la regulació de l'extensió de la regeneració hepàtica.

Un estudi posterior pel mateix grup ²⁰⁸constata que l'administració sistèmica de factors de creixement estimuladors de la regeneració hepàtica com l'augmentador de la regeneració hepàtica (ALR), el HGF i l'IGF-II, en rates normals provocava les mateixes alteracions en les cèl·lules NK que s'observaven en l'estudi previ. No obstant, cèl·lules NK aïllades de fetges normals i en les que s'afegia un dels factors *in vitro* no presentaven aquests canvis, el que apuntava als autors a algun mediador intrahepàtic desconegut, fin ara, que seria responsable d'aquest efecte. Curiosament, l'administració conjunta dels tres factors no té un efecte sinèrgic en aquestes alteracions funcionals de les cèl·lules NK.

■ Limfòcits T Natural killers o cèl·lules NK T

La primera descripció d'una població de timòcits que expressaven els receptors $\alpha\beta$ dels limfòcits T (TCR) però que eren negatius per als receptors CD4 i CD8 fou publicat l'any 87²⁰⁹. Aquests subgrup de limfòcits se'ls coneix com limfòcits T Natural Killers i es caracteritzen per: 1) presentar un repertori del TCR limitat, amb més del 50% utilitzant de família del gen $V\beta 8$ en la recombinació gènica per a la formació del TCR, el que limita la seva variabilitat de reconeixement²¹⁰, 2) secretar de forma abundant certes citocines, en especial, la IL-4 i, per últim, 3) expressar un receptor típic de les cèl·lules NK, l'antigen NK1.1, fet que els dona el nom.

Al timus, la majoria dels timòcits $CD4^- CD8^- TCR \alpha\beta^+$ són d'aquesta subpoblació. Fora del timus, la localització es concentra al moll d'os i fetge, encara que també s'han descrit en la làmina pròpia del budell prim, melsa i ganglis limfàtics²¹⁰.

La seva funció continua essent una incògnita. Poden reconèixer autoantígens (com glicolceramida) en el context d'antígens d'histocompatibilitat monomòrfics de classe I (CD1, sobretot). Aquest antígen d'histocompatibilitat està mancat del polimorfisme de les famílies habituals d'antígens d'histocompatibilitat pel que, en conjunt, no presenten tanta variabilitat de presentació antigènica. Aquest fet concordaria amb la manca de variabilitat, que hem descrit, del receptor dels limfòcits NK T. La seva capacitat de produir IL-4, una citocina inductora important de la resposta immunològica del tipus cèl·lules T "helper" 2 (Th2), fan pensar que puguin jugar un paper en decantar la balança de la xarxa de citocines a dirigir la resposta immunològica cap el fenotipus Th2. Per altra banda, la seva estimulació amb IL-2 les diferencia de cèl·lules amb característiques NK amb respostes antibacterianes, antivirals i antitumorals. També s'ha especulat que puguin tenir un paper supressor, això sumat al seu gran nombre al moll d'os²¹¹ i amb la capacitat demostrada de destrucció de timòcits $CD4^+ CD8^+$ immadurs²¹², fa que s'hagi suggerit que puguin ésser reguladors negatius de l'hematopoesi i timopoesi.

La seva alta concentració al fetge també fa pensar en una funció específica en aquest òrgan. La població extratímica intrahepàtica expressa de forma constitutiva la cadena β del receptor de la IL-2 ($IL-2R\beta^+$) i una densitat disminuïda en l'expressió del complex TCR-CD3 ($CD3^{int}$)²¹³⁻²¹⁷. Hi ha dues subpoblacions, la $NK1.1^+$, que corresponen a les cèl·lules NK T, i $NK1.1^-$. Aquest últim subgrup, sembla que reconeix autoantígens en el context d'antígens d'histocompatibilitat polimòrfics tipus I, a diferència de les cèl·lules NK T que, com hem mencionat, els reconeix en context d'antígens d'histocompatibilitat monomòrfics. En general ambdues subpoblacions es troben en una proporció 1:1 en el fetge.

Hi ha un estudi que ha avaluat el comportament d'aquestes poblacions limfocitàries en la regeneració hepàtica²¹⁸. En aquest treball s'evidencia que hi ha una expansió clonal de les cèl·lules NK T en la fase precoç post-hepatectomia parcial (tan aviat com a les 12 hores i fins a 4 dies). Els autors, en cerca d'una resposta mecànica a aquest fenomen, es basen en la troballa que els limfòcits T extratímics tenen receptors β -adrenèrgics en la seva superfície i que la seva expansió s'activa per estimulació nerviosa simpàtica²¹⁹. D'aquesta manera, l'administració d'un antagonista β -adrenèrgic suprimeix aquesta expansió clonal observada. De forma interessant, els autors descriuen que les cèl·lules NK T en el moment de la regeneració hepàtica són capaces de produir un efecte citotòxic sobre els hepatòcits en regeneració, pel que plantegen la possibilitat que aquestes cèl·lules tinguin una funció en la regulació de la magnitud de la regeneració hepàtica, possibilitat que està pendent de demostrar en el moment actual.

Hipòtesi i objectius

De les cèl·lules sinusoidals, apart de les cèl·lules de Kupffer, ha quedat abastament clar en la literatura, la capacitat potencial de secreció d'IL-6 per part de les cèl·lules endotelials i estel·lades. De la mateixa manera, en la introducció d'aquest treball, s'han presentat evidències experimentals sobre la relació entre el sistema immunològic i la regeneració hepàtica. No obstant, cap d'ells ha analitzat fins a quin grau cadascun d'aquests tipus cel·lulars intervé en la secreció d'IL-6, en l'eix $TNF \rightarrow NF-\kappa B \rightarrow IL-6 \rightarrow STAT3$, responsable de la iniciació del procés regeneratiu. Tampoc, fins ara, ha quedat inequívocament aclarit el paper de les cèl·lules de Kupffer en el procés regeneratiu, i encara més, no hi ha hagut cap model capaç de respondre fefaentment a la pregunta de si aquestes cèl·lules són la font principal d'IL-6 en aquest moment inicial.

El coneixement que l'LPS és necessari com a senyal iniciador en la regeneració hepàtica estimulant la secreció de TNF, la seva àmplia distribució en tota l'economia hepàtica i la seva coneguda capacitat de secretar IL-6, assenyalen les cèl·lules de Kupffer com les principals candidates a representar la font principal d'IL-6 en la fase de sensibilització o "priming" de la regeneració hepàtica.

La hipòtesi d'aquest estudi es basa en la demostració de que les cèl·lules de Kupffer són la principal font d'IL-6 en la fase de sensibilització de la regeneració hepàtica.

Per a demostrar aquesta hipòtesi, l'estudi es dividirà en dos grans objectius que consistiran en:

- 1) Demostració que la font d'IL-6 prové de les cèl·lules derivades del moll d'os.
Per a assolir aquest objectiu, s'ha establert un model experimental en el que el moll d'os d'animals genèticament deficients per a IL-6 és reemplaçat per moll d'os d'animals genèticament normals. L'empelt d'aquestes cèl·lules s'acompana

yaria d'una repoblació al fetge amb una població cel·lular que pot proveir la citocina essencial per a l'inici de la regeneració hepàtica. En aquestes circumstàncies, s'esperaria que el patró regeneratiu post-hepatectomia parcial en els animals knockout per a IL-6 als que s'ha realitzat el trasplantament de moll d'os fos similar al patró dels animals de genotip normal.

L'aplicació d'aquest model requerirà de dues fases diferenciades:

- a) Confirmació de la validesa del model amb la demostració:
 - a.1) del reemplaçament de les cèl·lules de Kupffer en el fetge amb el trasplantament singènic de moll d'os de ratolins mascles a receptors femelles a través de la detecció de la regió SRY del cromosoma Y, tant a nivell intrahepàtic com a cèl·lules de Kupffer aïllades.
 - a.2) del gen interromput de la IL-6 en les cèl·lules de Kupffer dels animals genèticament normals als que s'ha trasplantat moll d'os dels animals deficients en IL-6.
 - a.3) de l'augment en l'expressió d'IL-6 en el fetge després de l'hepatectomia parcial a animals deficients en IL-6 que reben moll d'os d'animals genotípicament normals.

- b) Confirmar que la IL-6 secretada per aquesta població cel·lular es capaç d'iniciar la regeneració hepàtica, demostrat per l'activació d'STAT3 i seguit de la proliferació dels hepatòcits post-hepatectomia parcial en animals deficients per a IL-6 que han estat trasplantats amb moll d'os d'animals genotípicament normals.

- 2) Un cop demostrada que la font d'IL-6 es troba entre les cèl·lules derivades del moll d'os, l'anàlisi del procés regeneratiu hepàtic i la constatació de la seva normalitat, amb la corresponent secreció d'IL-6, en animals deficients per a alguns

dels grups cel·lulars que es deriven del moll d'os (limfòcits B i T, cèl·lules NK) però que mantenen intacta la població de cèl·lules de Kupffer, permetria afirmar que aquesta cèl·lula és la principal responsable d'aquesta secreció.

Material i mètodes

ANIMALS

Tots els ratolins emprats són de la soca C57BL/6 per a descartar qualsevol variabilitat depenent de la soca. L'edat dels animals en el moment de la pràctica de l'hepatectomia parcial ha estat entre 12-16 setmanes. Es van utilitzar un nombre de 6 animals per grup d'estudi i per experiment realitzat. Els animals es van mantenir sota condicions aprovades pel Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) de la Universitat de Pensilvània (Filadèlfia, EEUU). Les condicions de manteniment eren en gàbies amb micro-aïllament en estabulari sense virus i amb alimentació específica per a ratolins *ad libitum*.

■ Ratolins IL-6 knockout

Els animals emprats han estat proveïts pel laboratori dirigit per la Dra. Taub del Departament de Genètica de la Universitat de Pensilvània. Provenen de la soca descrita per Kopf *et al*²²⁰ i emprats en el primer estudi que demostrava que els ratolins deficients en IL-6 no eren capaços de generar el procés regeneratiu hepàtic post-hepatectomia parcial¹⁴³. Aquests animals s'han obtingut amb la interrupció del gen d'IL-6 amb la transfecció de les cèl·lules germinals amb un vector amb dos braços homòlegs que conté el cassette *neo* clonat a l'exó 2 del gen IL-6 flanquejat pel cassette HSVtk en l'extrem 3' d'homologia.

En la descripció fenotípica inicial d'aquests animals s'evidencia la seva viabilitat embrionària i desenvolupament normal. El desenvolupament del sistema limfoïdal no es troba afectat com ho demostra la presència de limfòcits T i B normals en la circulació, amb una reducció en nombre d'un 20% dels limfòcits T.

La resposta humoral en aquests animals es manté normal en quant a la IgM i està només lleugerament reduïda la seva producció d'IgG. La resposta d'anticossos depenent de les cèl·lules T contra el virus de l'estomatitis vesicular està afectada i no són capaços de controlar la infecció per *Listera monocytogenes* i virus vaccínia. La resposta inflamatòria de fase aguda després de lesió tissular o infecció està afectada, mentre que la resposta a LPS només està afectada lleugerament.

■ Ratolins SCID

Aquests ratolins foren obtinguts comercialment de Jackson Laboratories (Maine, EEUU). Els ratolins SCID (amb immunodeficiència severa combinada) són incapaços de produir limfòcits B i T. Aquests animals foren descrits iniciament pel grup de Bosma *et al* l'any 83²²¹ per mutació espontània que es transmetia de forma autosòmica recessiva. Aquests animals tenen un defecte en el re-arranjament dels al·lels per a la cadena β del receptor dels limfòcits T (TCR β) i la cadena pesada de la IgG degut a un defecte en la recombinació dels fragments D i J²²². Posteriorment, s'ha comprovat que aquest defecte es produeix per la manca de l'enzim proteïn-cinasa depenent de l'ADN²²³ responsable de la unió dels fragments d'ADN en el moment dels re-arranjaments de l'ADN genòmic per a la formació de variabilitat en els receptors de cèl·lules T i immunoglobulines. Aquest fet, provoca que els precursors limfocítics al moll d'os no presentin a la seva superfície aquests receptors, condició necessària per a la continuació del seu desenvolupament.

lupament, pel que les cèl·lules limfocitàries queden aturades en aquest estadi i no arriben a madurar. Un 2-25% d'aquests animals tenen "degoteig" ("leakage") de limfòcits, es a dir presència d'alguns limfòcits en circulació en edat jove (>20 setmanes), troballa que s'incrementa amb l'edat²²⁴, probablement per la capacitat de que es produeixin certs rearranjament espontanis. Cal especificar que aquest fet no s'observa en animals mantinguts en un ambient sense gèrmens. Finalment dir que aquests animals compten amb una presència normal de cèl·lules NK²²⁵.

■ **Ratolins RAG 2 knockout**

Aquests ratolins foren obtinguts comercialment de Jackson Laboratories (Maine, EEUU). L'expressió del gen es va eliminar per recombinació genètica²²⁶ amb la inclusió d'un vector amb el neogen PMC1 en el lloc del gen per a RAG-2. Aquests animals presenten incapacitat absoluta d'iniciar el procés de recombinació V(D)J per a la formació de variabilitat de reconeixement del receptor de limfòcits T i de les immunoglobulines. En conseqüència, tenen manca absoluta de limfòcits madurs a la circulació sanguínia com succeeix amb els animals SCID. Només s'hi observa la presència de formes immadures en òrgans limfoidals primaris. En aquest cas no s'hi observa "degoteig" de limfòcits amb l'edat. Apart del defecte de limfòcits, no s'hi associa cap altra anomalia.

■ Ratolins SCID-beige

Aquests ratolins foren obtinguts comercialment de Jackson Laboratories (Maine, EEUU). Aquests animals són fruit del creuament de ratolins SCID amb ratolins amb la mutació beige. Aquesta mutació espontània s'hereda de forma autosòmica recessiva i s'acompanya per una abolició absoluta de l'activitat citotòxica de les cèl·lules NK²²⁷. Aquesta afectació és deguda a un defecte en el transport de les veícules a la superfície cel·lular de les cèl·lules NK per una mutació al gen *Lyst*²²⁸. Aquest defecte és equivalent a una mutació als humans que es responsable de la malaltia de Chediak-Higashi.

TRASPLANTAMENT DE MOLL D'OS

El procediment segueix el protocol del grup del Dr. Rosengaard²²⁹ del Departament Harrison de Recerca Quirúrgica de la Universitat de Pensilvània (Filadèlfia, EEUU). Inicialment, els receptors, a les 6 setmanes d'edat, són tractats amb antibiòtic, neomicina i polimixina B (una ampolla en 1 litre d'H₂O), dos dies abans del procediment. Al final d'aquestes primeres 48 hores, són irradiats amb una dosi letal, que pels ratolins és de 1000 rads. Els donants són sacrificats i s'extreu el moll d'os dels fèmurs i les tíbies. Per a aconseguir-ho, en una cambra de flux laminar i amb guants estèrils, es procedeix a extracció dels ossos dels membres posteriors de l'animal el més nets possibles, és a dir, sense restes de múscul o tendons al seu voltant, doncs la seva presència pot dificultar el procediment posterior. S'han preparat un total de 5 cc de PBS (solució salina)/ Penicil·lina-estreptomicina (Pen-Estrep) (100U pen + 100 µg/ml estrep = 1 ml = 99 ml PBS). S'aspira 2-3 ml amb una jeringa de 3 cc amb una agulla de diàmetre 23. Mentre, en els ossos s'enretira la coberta cartil·laginosa de la zona articular de l'os i a l'altre

extrem s'escapça lleugerament per a permetre que el moll d'os pugui sortir d'una sola peça. En aquest moment, s'inserta l'agulla a l'extrem articular ossi i s'hi injecten els 2-3 ml per a fer pressió permetre la sortida del moll d'os per l'altre extrem a on serà recollit en el tub amb la solució de PBS/Pen-Estrep. A continuació, la suspensió amb els molls d'os es pipeteja repetidament per a alliberar-los de les cèl·lules de la matriu medullar, i es passen a través d'un filtre de 70 μm (tots els molls d'os del mateix tipus de donant es poden combinar en aquest punt). Les cèl·lules es centrifuguen durant 7 minuts a 1400 rpm i 4 ° C i es decanta i descarta el sobrenadant. Seguidament, s'hi afegeixen 5 cc de la solució ACK (solució lítica per als reticulòcits), es barreja enègicament i es deixa reposar 30 segons. Posteriorment, es centrifuga una altra vegada en dues ocasions, restituint-se amb la solució PBS/Pen-Estrep. La concentració final s'ha d'ajustar a 10^7 cèl·lules/ml.

Els animals irradiats reben 1 ml del resultat final de la solució de les cèl·lules dels molls d'os que hem descrit a les 6 hores post-irradiació. La injecció es fa per la vena de la cua. A aquests animals se'ls administra antibiòtic profilàctic a l'aigua 2 dies abans del procediment i fins a 2 setmanes després. Es deixen 6 setmanes en total després del trasplantament per a permetre l'empelt del nou moll d'os i la diferenciació de les cèl·lules a nivell perifèric. El procediment, doncs, es realitza en animals de 6-8 setmanes d'edat per a que tinguin 12-14 setmanes al moment de l'hepatectomia.

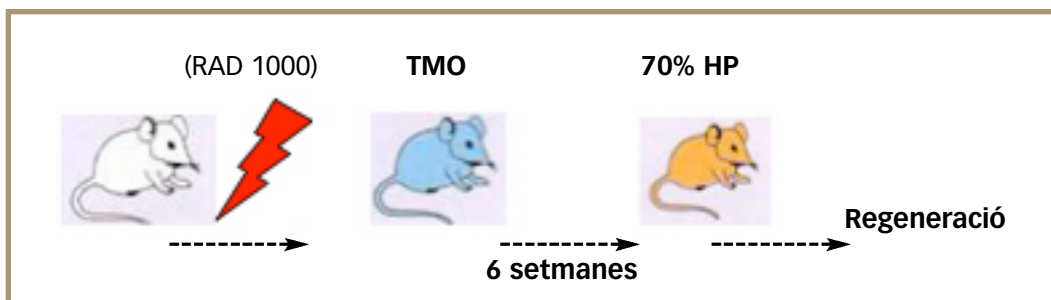


Fig. 3 Esquema TMO: Trasplantament moll d'os, HP: hepatectomia parcial.

PROCEDIMENT QUIRÚRGIC

El procediment quirúrgic de l'hepatectomia parcial es practica entre les 12-16 setmanes d'edat. El procediment té lloc en el laboratori en un ambient net però no estèril. En aquest cas, la inhalació de metofà s'ha utilitzat com a anestèsia. L'abdomen es secciona a nivell de la *línia alba*, es pressiona amb suavitat el fetge caudalment amb un palet de cotó i es secciona el lligament sagital que l'uneix al diafragma. Posteriorment, es pressiona lateralment l'abdomen fins que el fetge protueix per la zona cranial de l'obertura abdominal. El lòbul esquerre i caudat es mobilitzen fins que el lligament que connecta ambdós es fa aparent. Aquest lligament també es secciona. Seguidament, els lòbuls esquerre i medial (els que seran extrets) es mobilitzen suaument en direcció cranial amb un palet de cotó pel que se separen de la resta del fetge. Un fil de seda del 4-0 es lliga al voltant de la conjunció dels lòbuls que seran extrets, es practica un nus, es tiva fort i es procedeix a la secció dels lòbuls. Per al tancament de la cavitat abdominal s'utilitza un fil de seda 4-0 amb sutura contínua de les capes musculars i de pell alhora.

AÏLLAMENT DE LES CÈL·LULES DE KUPFFER

L'aïllament de les cèl·lules de Kupffer s'ha aconseguit seguint protocols descrits prèviament^{230, 231}. El procediment s'inicia amb el clapatge de les venes suprahepàtiques. Es perfora el fetge amb una bomba de flux continu a través de la vena cava infrahepàtica, inicialment amb solució tampó lliure de Ca^{2+} (8.3% NaCl, 0.5% KCl, 2.4% Hepes ph 7.4) i, posteriorment, amb 10 ml de 0.1% col·lagenasa H en la solució tampó per a la col·lagenasa (3.9% NaCl, 0.5% KCl, 24% Hepes, 0.7% $CaCl_2 \cdot H_2O$), durant 1 minut. Després d'aquest procediment, s'extreu el fetge i es disgrega la càpsula de Glisson en solució RPMI

1640 per sacseig suau del fetge mentre és subjectat amb pinces. Es manté l'òrgan en fred en tot moment. La suspensió es filtra a través d'una gassa de nylon estèril i es centrifuga un cop a 50g durant 15 minuts. El sobrenadant es recull i el sediment es descarta. Aquest sobrenadant correspon a les cèl·lules no parenquimatoses. El sobrenadant es centrifuga novament a 500g durant 7 minuts i el pòsit es resuspèn en 2 ml de RPMI 1640 i es diposita suaument sobre una solució de doble gradient de Percoll (20 i 50%). El gradient es centrifuga a 800g durant 15 minuts, La capa que es forma en la interfase 20-50% s'extreu i es restitueix amb RPMI i es centrifuga a 50g dues vegades. Les cèl·lules que es recullen es distribueixen en un plat de cultiu de plàstic a on es deixa que s'hi adhereixin durant 15 minuts. Després d'un rentat, es cultiva durant 24 hores amb l'addició de la solució RPMI 1640. Una part de la preparació s'utilitza per a la tinció de l'activitat no específica de l'esterasa i la resta són arrossegades de la paret per pipeteig i processades per a purificació d'ADN.

ACTIVITAT DE L'ESTERASA NO ESPECÍFICA EN LES CÈL·LULES DE KUPFFER PURIFICADES

La puresa de les cèl·lules de Kupffer aïllades s'ha verificat en recipients de tinció de Coplin (Sigma kit). Immediatament abans de la fixació de la mostra histològica, s'afegeix 1 ml de solució de Nitrit Sòdic a un ml de Solució bàsica BB Blau Ràpida en un tub. Es barreja per inversió i es deixa reposar durant al menys 2 minuts. El color canviarà des d'una tonalitat marronosa fins a groc intens. A continuació s'hi afegeixen 40 ml d'aigua deionitzada a 37 ° C a la solució prèvia i 5 ml de solució tampó concentrada de TRIZMAL a ph 7.6 amb 1 ml de solució d'acetat d' α -naftil. En aquest punt, la solució es torna de color verdós. Es barreja i es vessa en una gerra de Coplin. Les mostres es fixen, en

aquest moment, en solució de citrat-acetat-formaldehíd (CAF) durant 30 segons, sacsejant vigorosament els últims 5 segons. En aquest moment es netegen en aigua corrent deionitzada durant 45-60 segons i s'immergeixen les mostres en la solució d' α -naftil. S'incuba durant 30 minuts a 37 ° C a resguard de la llum. Al final d'aquest temps es reneten les mostres en aigua corrent deionitzada i es contratenyeix amb solució d'hematoxil·lina, Gill num. 3. Es neteja en aigua corrent i es deixa assecar. Al microscopi, es fa un comptatge de les cèl·lules tenyides respecte el total.

EXTRACCIÓ D'ADN I REACCIÓ DE LA POLIMERASA EN CADENA (PCR) PER A SRY I NEOGEN IL-6

L'ADN s'ha extret tant d'homogeïnats de fetge sencer com de cèl·lules de Kupffer aïllades per a realitzar l'assaig per al fragment SRY del cromosoma Y i per al neogen IL-6. La purificació d'ADN es va realitzar amb l'ús del MiniKit per extracció d'ADN de Qiagen. L'ADN es va amplificar en 50 μ l de solució per a la reacció que conté 0.3 mM dNTPs, 1X de solució tampó per a la PCR, 5 unitats de Taq polimerasa (Perkin Elmer, Connecticut, EEUU) i 0.6 μ M de "primers" 5' i 3'. Les temperatures del protocol de la reacció han estat: 95° C durant 30 segons, 60° C durant 30 segons, 72° C durant 45 segons en 36 cicles en total. Les bandes amplificades s'han fet córrer per electroforesi en un gel d'agarosa al 2.0% i escanejat per l'analitzador Gel Doc 2000 (Biorad). Els "primers" emprats per a l'amplificació del fragment SRY del cromosoma Y foren: 5"-AGAGCTGCACACCTGTACTCC, 3'-CATGAAACTGCTGCTGCTTCTGC, i els "primers" per a l'amplificació d'IL-6 foren els "primers" genèrics oIMR212/oIMR213 i per al neogen IL-6, oIMR013/oIMR014.

AÏLLAMENT D'ESPLENÒCITS

La melsa s'extreu al moment del sacrifici i es fracciona a través d'un fiiltre de nylon de 70 µm. Posteriorment, es centrifuguen dues vegades a 50g durant 7 minuts en solució d'RPMI 1640. Després de la lisi dels reticulócits, es cultiva la suspensió en el medi RPMI 1640 amb 50µM β-mercaptoetanol, amb i sense lipopolisacàrid, durant 48 hores. Els sobrenadants resultants s'han utilitzat per al kit d'ELISA per a IL-6 (Cytoscreen mouse IL-6, Biosource, Califòrnia, EEUU).

EXTRACCIÓ D'ARNM I MESURA SEMIQUANTITATIVA DE CITOCINES PER TRANSCRIPCIÓ INVERSA DE LA REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)

Per a l'extracció de l'ARN, es pren un fragment de fetge en el moment del sacrifici. El fragment s'embolcalla en paper d'alumini i s'introdueix immediatament en nitrogen líquid. A continuació, i mantenint el fragment dins del paper d'alumini, es pulveritza el fragment a cops de martell sobre superfície dura fins a tres vegades intercalant-se amb la introducció en bany de nitrogen líquid una altra vegada (per a contrarrestar l'escalfor generada per la fricció amb els cops). A continuació, s'homogenitza en una solució de 1200 µl de RLT (Qiagen) i 36 µl de β-mercaptoetanol fent 10 passis a través d'una xeringa de diàmetre 25 i es purifica amb columnes Qiagen RNeasy segons protocol del MiniKit d'extracció d'ARN (Qiagen). Per a l'RT-PCR, s'han utilitzat 500 ng d'ARN que s'han transcrit de forma inversa i amplificat en 50 µl de solució per a la reacció que conté 0.3 mM dNTPs, 1X de 5X solució tampó EZ RTth Taq, 5 unitats d' RTth Taq polimerasa (Perkin Elmer, Connecticut, EEUU) i 0.6 µM de "primers" 5' i 3'. Les temperatures del protocol de

la reacció han estat: 60° C durant 30 minuts, 95° C durant 30 segons, 60° C durant 1.5 minuts per 30 cicles. Les bandes amplificades s'han fet córrer en un gel d'electroforesi al 2.0% d'agarosa i s'han escanejat amb l'analitzador Gel Doc 2000 (Biorad). La quantitat total d'ARN i el nombre de cicles per a cada citocina s'ha ajustat per a obtenir una correlació lineal entre la quantitat d'ARN i la llum fluorescent visible després per l'eti-di emprant l' NIH Image Analysis, normalitzat amb un control intern d'RT-PCR estàndard, la β -actina. Els "primers" per a amplificar IL-6 i la β -actina han estat els següents: IL-6 -5'-TTCCATCCAGTTGCCTTCTT; IL-6-3'-CAGAATTGCCATTGCACAAC; β -actina 5'- TGA-GAGGGAAATCGTGCGTGAC; β -actina 3'-TCATGCATGCCACAGGATTCC.

HIBRIDITZACIÓ IN SITU

La hibridització *in situ* s'ha realitzat amb mètode descrit prèviament²³². Les cadenes complementàries d'ARN sentit i antisentit per a l'ARNm d'IL-6 s'han generat a partir de la transcripció *in vitro* d'un plàsmid pBluescript que conté el gen complet d'IL-6 de ratolí (cedit amablement pel Dr. D. Geller, Pittsburgh, Pensilvània, EEUU), en presència de digoxigenina (DIG) marcada amb 11-UTP (Boehringer Mannheim, EEUU). El plàsmid s'ha linearitzat amb l'enzim de restricció *HindIII* i sintetitzat per a la cadena complementària amb el sentit del gen amb l'enzim ARN polimerasa T7. En canvi, la cadena complementària antisentit s'ha obtingut amb linearització amb *BamHI* i la seva síntesi amb la polimerasa T3.

La hibridització *in situ* per a l'ARNm d'IL-6 s'ha practicat en teixit hepàtic parafinat. Les seccions es desparafinen, hidraten i tracten amb 100 μ g/ml de proteïnasa K (Boehringer Mannheim) en solució salina tamponada amb fosfat durant 20 minuts a 30°C, seguit de tractament amb 0.25% (vol/vol) d'anhidrid acètic en 0.1 mol/l de trietanolamina HCl (ph

8.0) (Sigma, EEUU) durant 10 minuts a temperatura ambient. Les seccions han estat llavors deshidratades i delipidificades en cloroform, rehidratades i assecades amb aire. Arribats a aquest punt, les seccions es deixen hibriditzar tota la nit a 45°C amb un tampó d'hibridització consistent amb 0.5 mg/ml de cadena complementària antisentit marcada amb DIG, 50% de formamida, 1X de solució de Denhardt, 100 µg/ml de transferidor d'ARN, 10% de sulfat dextrà i 5X de sèrum salí. La cadena complementària sentit generada del mateix plàsmid s'ha utilitzat com a control negatiu. Després de la hibridització, s'han rentat amb sèrum salí 2X durant 15 minuts a temperatura ambient amb dos canvis i 0.1X a 37°C durant 1 hora amb 4 canvis. Per a la detecció immunològica s'han seguit les instruccions del fabricant. Bàsicament, s'han rentat durant 1 minut en solució tampó 1 (100 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl (ph 7.5) i incubats en solució tampó 2 (100 mmol/l Tris, 100 mmol/l NaCl, 50 mmol/l MgCl₂ (ph 9.5) que conté 0.3% Tritó X-100 (Sigma) durant 30 minuts a temperatura ambient. Els anticossos anti-DIG conjugats amb fosfatasa alcalina s'han diluït 1:500 amb solució tampó 1 i afegit a les seccions durant tota la nit. En aquest moment, les seccions s'han rentat en solució 1 durant 10 minuts, seguit de 10 minuts amb solució 2. L'anticòs es detecta posteriorment amb la seva reacció amb clorur de 4-nitroblau tetrazoli i fosfat 5-bromo-4-clor-3-indolil.

EXTRACTES NUCLEARS I ASSAIG ELECTROFORÈTIC DE MOBILITAT "SHIFT" (EMSA)

Els extractes nuclears hepàtics es preparen segons el protocol del laboratori de la Dra. Taub de la Universitat de Pensilvània⁹⁵. Inicialment es preparen les 4 solucions tampó: **a)** d'homogenització (H): N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(àcid 2-etansulfònic) (HEPES)(ph 7.6), 10 mM KCl, 1mM MgCl₂, 0.1 mM, àcid etil-len-diamín-tetraacètic (EDTA), 0.1 mM

etil·len-glicol-bis(β -aminoetil-èter)-N,N,N',N'-àcid tetraacètic (EGTA), 0.1 mM espermina, 0.5 mM espermidina, 0.3 M sucrosa i aigua, **b**) amortidora (A, cushion buffer): 10mM HEPES, 10 mM KCl, 1mM MgCl₂, 0.1mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.1 mM espermina, 0.5 mM espermidina, 2.2 M sucrosa i aigua, **c**) de barreja (B): 20mM HEPES, 0.2 mM EDTA, 420 mM Na Cl, MgCl₂ i aigua, **d**) de diàlisi (D): 20 mM HEPES, 0.2 mM EDTA, 100 mM/l KCl, 20% glicerol i aigua.

Les solucions H i A s'han de preparar el mateix dia de l'extracció hepàtica. En el moment immediatament previ a la utilització de les solucions, cal afegir una combinació d'inhibidors de proteases consistent en ditiotreitòl (1 mM), fluorat de fenil-metil-sulfonyl (0.1 mM), fluorat de sodi (1mM), Molibdat de sodi (1mM), antipaïna (2 μ g/ml), aprotinina (2 μ g/ml), bestatina (2 μ g/ml) i leupeptina (2 μ g/ml).

El fetge s'extreu i es col·loca en una plat de Petri que es manté en gel a 4 ° C (tot el procediment s'ha de mantenir a aquesta temperatura), s'afegeixen 7 ml de solució H i s'esmicola amb una fulla d'afaitar. Es transfereix el fetge esmicolat a un tub de vidre i es procedeix a la seva homogenització amb l'homogenitzador elèctric a una velocitat de 3. L'homogenat es transfereix a un tub de centrifugació de Corex de 15 ml en el que prèviament s'hi havien afegit 8 ml de solució A per a crear un gradient de sucrosa. En aquest punt, s'ultracentrifuga a 27.000 rpm durant 50 minuts. El pòsit al fons del tub que s'hi forma correspon als nuclis cel·lulars. Es descarta tot el sobrenadant i els nuclis es barregen amb 150 μ l de solució C en un tub d'Eppendorf d'1.5 ml. Es sacceja durant mitja hora. Al final d'aquest període es centrifuga a 14.000 rpm durant 30 minuts. El sobrenadant es transfereix a una cambra de diàlisi i es dialitza durant un mínim de 12 hores amb solució D. Al final d'aquest temps, es recullen els extractes nuclears dialitzats i es conserven a -70 ° C.

Els extractes nuclears s'incuben amb una sonda d'ADN com es descriurà a continuació. La unió del factor de transcripció amb la sonda d'ADN, i per tant, l'aparició de senyal en el gel, només es produeix en el cas de que el factor es trobi activat. Hem escollit aquest

mètode perquè es considera que aquest és el millor per a detecció de l'activitat del factor de transcripció. En condicions normals aquests factors es troben en el citoplasma cel·lular sense que això vulgui dir que estiguin activats. Aquest fet fa que els resultats amb altres mètodes de detecció com la PCR puguin dur a equívocs al moment de la seva interpretació.

S'incuben de 5 a 10 µg d'extracte durant 20 minuts amb oligonucleòtid ràdiomarcant (1 ng) amb solució tampó d'unió (10 mmol/l de Hepes, pH 7.9, 50 mmol/l de NaCl, 1 mmol/l EDTA, 10% glicerol) i es fan córrer en un gel d'electroforesi vertical amb gel no desnaturitzant amb 5% de poliacrilamida en 0.5X de tampó TBE. Els gels es dessequen i s'exposen a una pel·lícula radiogràfica. En cada reacció s'empra 1µg de poli(dI-dC) s'utilitza com a competidor no específic de l'ADN. La sonda per a STAT3 és un oligonucleòtid de doble cadena pre-anellat i purificat per HPLC de l factor induïble al sèrum del promotor de *c-fos* (5'-GATCCTCCAGCATTCCCGTAAATCCTCCAG-3') i es marca al seu extrem amb (γ -³²P) ATP.

Per dur a terme el "supershift", que permet demostrar l'especificitat de la unió de la sonda d'ADN amb el factor de transcripció, s'incuben els extractes amb 1µl dels anticossos per a STAT5 i STAT3 (Santa Cruz Biotechnology, Califòrnia, EEUU) a 4 ° C durant 16 hores abans de l'addició de la sonda d'ADN. El complex que consistiria l'anticòs unit a la sonda d'ADN i el factor STAT3 hauria d'observar-se en el gel com a "supershift" (és a dir, una banda més enlentida en el gel), per l'augment de la seva massa, en respecte al complex de la sonda i STAT3, mentre que la columna amb anticossos per a STAT5 no haurien d'aparèixer enlentides en el revelat, el que demostra l'especificitat de la sonda emprada.

IMMUNOHISTOQUÍMICA PER A BROMODESOXIURIDINA (BRDU)

Un subgrup de ratolins ha estat sacrificat a les 36 hores post-hepatectomia parcial, considerat el temps de màxima síntesi d'ADN segons la literatura prèvia ¹⁴³ i confirmat per l'autor d'aquest estudi. Els animals reben una injecció intraperitoneal de 50 mg/kg de BrdU 1 hora abans del sacrifici. S'extreu el fetge, es talla i es fixa en formalina durant 24 hores i es processa de forma rutinària en parafina. Per a la tinció, s'utilitzen seccions de 6µm de gruix. S'inicia la desparafinització amb l'escalfament de la mostra a 60 ° C durant 15 minuts i de forma seriada es manté dos minuts en solució de xilè (dos cops), 100%, 95%, 90%, 80% i 70% d'etanol i, finalment, en immersió en aigua. S'introdueix en una solució tampó de àcid cítric 10mM (ph 6.0) i s'incuba durant 14 minuts en microones. Després de deixar-ho refredar s'introdueix en una solució amb 190ml d'aigua i 10 ml de peròxid d'hidrogen (H₂O₂) durant 15 minuts per a inactivar les peroxidases endògenes que podrien alterar el senyal al final del procediment. Es procedeix, a conitnuació, a un seguit de passos encaminats a disminuir la unió inespecífica de l'anticòs. Primerament, un cop rentat amb aigua, es bloqueja amb el reactiu Avidina D (Vecta) durant 15 minuts, seguit del reactiu Biotina (Vecta), previ rentat. Finalment, s'hi afegeix un agent bloquejador inespecífic de proteïna durant 10-15 minuts. Sense rentar l'excés de bloquejador, s'hi afegeix l'anticòs de ratolí antiBrdU (mouse antiBrdU-Boehringer) diluït 1:500 en la solució 10% del bloquejador en PBS i s'incuba a 37 ° C durant 45 minuts. Seguidament, després d'haver rentat la mostra, s'aplica l'anticòs secundari (cabra anti ratolí, adsorbit en rata, Vector Laboratories) diluït 1:100 en PBT (43.5 ml aigua, 5 ml 10X PBS, 0.5 ml 10% BSA, 1.0 ml 10% Triton X-100) i es deixa incubar a 37 ° C durant 30 minuts. Al final d'aquest període, i després d'haver rentat, s'incuba el mateix període de temps amb el reactiu ABC del kit "Elite" (Vecta) conjugat amb horse radish peroxidase. El pas final és el revelat del senyal que s'aconsegueix a partir del ("DAB Substrate Kit for Peroxidase", Vector Laboratories). S'aplica la solució i s'espera un temps que pot variar entre 3-6

minuts per a revelar el senyal. Es contratenyeix amb Hematoxil·lina #2 (Fisher), es rehidrata la mostra seguint el procediment en sentit contrari de la desparanifització i es cobreix per a la seva observació al microscopi.

Les cèl·lules que proliferen es tenyeixen de marró en el seu nucli, mentre que les cèl·lules en repòs tenen el seu nucli clar. Els nuclis positius són quantificats per a cada mostra per comptatge del nombre de cèl·lules tenyides en tres camps a baix augment per dos observadors cecs i s'hi extreu la mitja.

L'anàlisi histològica de mostres tenyides per hematoxil·lina-eosina fou interpretada per un anatomopatòleg únic també cec.

AÏLLAMENT DE LIMFÒCITS INTRAHEPÀTICS

L'aïllament dels limfòcits s'ha realitzat seguint procediments descrit prèviament a la literatura²³³. El fetge s'extreu de l'animal sacrificat i s'esmicola amb tisores. Es pressiona a través d'un filtre metàl·lic i es suspèn en medi essencial mínim d'Eagle amb 5 mmol/l de Heps i 2% de sèrum boví. Posteriorment, es centrifuga a 1400 rpm durant 7 minuts, es resuspèn la mostra en 5 ml de medi. La separació es fa per gradient de Percoll del 35%. Un equivalent derivat del fetge es barreja vigorosament amb pipeta en 15 ml amb la solució Percoll. Aquesta solució es centrifuga a 500g durant 10 minuts a 20° C amb acceleració màxima. Les cèl·lules limfocitàries sedimenten al tub mentre que la resta de cèl·lules no arriben a atravesar la interfase de la superfície del gradient. El sediment es resuspèn en 10 ml de medi i es centrifuga a 370g durant 10 minuts a 4 ° C. Es resuspèn i s'ajusta a 10⁷ cèl·lules/ ml per la seva anàlisi en la citometria de flux.

CITOMETRIA DE FLUX

El fenotip de les cèl·lules NK T s'ha analitzat amb la determinació de la presència dels seus marcadors específics utilitzant anticossos monoclonals en conjunció amb el test d'immunofluorescència de doble color. Anti-CD3 conjugat amb isocianat de fluoresceïna (145-2C11) i antiNK 1.1⁺ conjugat amb R-ficoeritrina (PK136), ambdós de Pharmigen Co. (Califòrnia, EEUU). La fluorescència de les cèl·lules s'ha estudiat per FAC Scan (Becton Dickinson, Califòrnia, EEUU).

ANÀLISI ESTADÍSTICA

Les dades es presenten com a mitja +/- desviació estàndard. El test T d'Student s'ha emprat per a comparar la replicació hepatocitària. $P < 0.05$ com a límit de significació.