

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III



**TESIS DOCTORAL**

**Fuente celular de la interleucina (IL)-6 y su relevancia en la  
regeneración hepática**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Carolina Fernández Mena**

Directores

**Javier Vaquero Martín**  
**Rafael Bañares Cañizares**  
**Marta Puerto Cantero**

**Madrid, 2018**

**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Medicina**

**Programa de Doctorado En Bioquímica, Biología  
Molecular y Biomedicina  
(RD 1393/2007)**

**Departamento De Bioquímica y Biología molecular III**



**TESIS DOCTORAL**

***FUENTE CELULAR DE LA INTERLEUCINA (IL)-6***

***Y SU RELEVANCIA EN LA REGENERACIÓN***

***HEPÁTICA***

**Doctorando: Carolina Fernández Mena**

**Directores: Dr. Javier Vaquero Martín**

**Dr. Rafael Bañares Cañizares**

**Dra. Marta Puerto Cantero**

**Madrid 2017**





**Universidad Complutense**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III**

Don Rafael Bañares Cañizares, Don Javier Vaquero Martín y Dña Marta Puerto Cantero,

CERTIFICAN

Que el trabajo de investigación titulado **“FUENTE CELULAR DE LA INTERLEUCINA (IL)-6 Y SU RELEVANCIA EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA”**, presentado por CAROLINA FERNÁNDEZ MENA, se ha realizado bajo nuestra dirección y supervisión y consideramos que reúne todos y cada uno de los requisitos necesarios para ser presentado como Tesis Doctoral, y defendida ante el Tribunal correspondiente para optar al grado de Doctor en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Madrid a 27 de Febrero del 2017.

  
Rafael Bañares

  
JAVIER VAQUERO

  
MARTA PUERTO



**La humanidad también necesita soñadores, para quienes el desarrollo de una tarea sea tan cautivante que les resulte imposible dedicar su atención a su propio beneficio**

Marie Curie

**El universo no tiene una historia, sino cualquier historia posible**

Stephen Hawking



**A mis padres**

**A mi hermana**

**A Carlos**



## **AGRADECIMIENTOS**

Cuando empiezas a escribir la tesis doctoral, parece que nunca va a llegar este momento que para mí es uno de los más reconfortantes. Después de realizar este trabajo tan arduo, al que he dedicado muchas horas, alegrías y frustraciones puedo compartir este momento con las personas que me han enseñado, ayudado, apoyado y me han dado ánimos en momentos de flaqueza y con las que han hecho posible que este trabajo salga adelante. Ahora que he cambiado mi carrera profesional, con mucha nostalgia recuerdo cada una de las etapas que he vivido en el laboratorio, momentos de agobio cuando no salía un experimento o cuando no llegabas a los plazos de entrega de un póster o beca, momentos de frustración por la inestabilidad de este trabajo, momentos reconfortantes cuando conseguías por fin poner a punto una técnica y tu esfuerzo se veía recompensado pero para mí los momentos más importantes son lo que he compartido con mi familia del laboratorio y al recordarlos, se me dibuja una sonrisa en la cara porque han supuesto momentos de alegría a nivel personal y profesional, que han sido fundamentales para el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Y por ello, en las siguientes líneas quiero agradecer a todos los que hayan hecho de este tiempo, una experiencia para mí tan enriquecedora.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis directores de Tesis Doctoral. Al Dr. **Rafael Bañares**, para mí Rafa, por apostar por mí, por dirigir esta tesis doctoral, por compartir su gran perspectiva científica conmigo y por apoyarme y permitir empezar mi carrera profesional en su laboratorio. Al Dr. **Javier Vaquero**, para mí Javi, por apostar por mí y rescatarme tras mi primer intento fallido en ciencia, por ser el coprotagonista de esta Tesis doctoral, porque sin sus ideas y esfuerzo, nunca hubiera podido realizarse. Pero sobre todo le quiero agradecer su paciencia y el trato que ha tenido conmigo a nivel

personal. Nunca olvidaré los momentos compartidos en el quirófano de ratones entre cirugía y cirugía y con "mascarilla incluida", donde escuchaba mi opinión siempre y guiaba mis pasos a lo largo de toda esta etapa y sobre todo con lo que me quedo y le doy las gracias es por enseñarme a disfrutar de la ciencia y a tener su mismo entusiasmo a nivel profesional. Y entre mis directores, se encuentra una de mis consejeras y amiga a nivel personal y profesional, la Dra. **Marta Puerto**, o mi madre en el laboratorio. Gracias a ella, he aprendido a realizar muchas técnicas del laboratorio como los ELISAS que son una parte fundamental de esta tesis y sin su ayuda, no hubiera sido posible realizar todos los experimentos (Genotipado y PCRs). Nunca olvidaré nuestro viaje a San Francisco, donde compartimos momentos inolvidables y el gran apoyo que me ha prestado siempre no sólo a nivel profesional, sino a nivel económico y personal. Gracias por estar pendiente de mí siempre y aunque te lo he dicho muchas veces ya sabes que tienes una amiga para lo que necesites.

Mi más sincero agradecimiento a mi tutora, la Dra. **Elena Vargas**, por su ayuda en momentos tan estresantes como es el depósito de la tesis doctoral y por recibirme siempre con tanta amabilidad. También quería agradecer al Dr. **Albert Quintana** y Dr. **Juan Hidalgo** que amablemente nos cedieran los ratones floxeados de IL-6 para realizar estos experimentos y a la Dra. **Ángela Valverde** y **Águeda**, por enseñarme como hacer cultivos primarios de hepatocitos y ayudarme con los experimentos del trabajo Fin de Máster que precede a esta Tesis. Así como al Dr. **Miguel Relloso** y **Laura**, por ayudarme con las citometrías de la Tesis y enseñarme a realizar el aislamiento de macrófagos.

Y a continuación, en mis agradecimientos no pueden faltar mis compañeros del laboratorio que han sido el motor de esta Tesis Doctoral. En

primer lugar a **Juan Antonio**, para mí Juanan, por haber sido mi padre en ciencia, gracias por enseñarme cómo debe ser un científico y transmitirme la pasión que tienes por este trabajo, gracias por tus consejos a nivel personal y profesional, por compartir tus experiencias conmigo y por tranquilizarme en muchos momentos. A **Bea**, gracias por ayudarme a organizar nuestras quedadas del laboratorio, como la de mi despedida que sé que sin tu ayuda y cariño no hubiera sido posible y en especial te agradezco que siempre hayas estado dispuesta a ayudarme en cualquier momento y haber compartido nuestras frustraciones y alegrías, pero siempre con una sonrisa. A **Iñaki, Luis** y **José Miranda**, por ser mis referentes a nivel médico y por su apoyo y cariño. Y por último, a todos los estudiantes que han pasado por el laboratorio (Natalia, Iris y Elena) y en especial a **Jorge** y **Juan**, que han colaborado en este proyecto y que gracias a su ayuda con las PCRs de genotipado, pude realizar otros experimentos y a **Kasia**, por su trabajo con los ELISAS de IL-6 en el peritoneo.

Y como no en estos agradecimientos tiene mención especial mis compañeros del laboratorio de Nefrología. En especial a **Alberto Lázaro**, por su inestimable ayuda a nivel personal y profesional, por apoyarme y darme buenos consejos cuando lo he necesitado. Nunca olvidaré nuestras largas charlas en el tren. Gracias por enseñarme a luchar y nunca rendirme y por lo buena persona que eres y por estar siempre ahí. Como siempre te digo, eres uno de los amigos que me llevo de este laboratorio y para mí ha sido un placer y un honor haberte conocido. Y también a **Gema**, por ayudarme con los formatos de la Tesis y demostrarme que cosas son las importantes y en especial también a **Blanca**, que desde el primer día que nos conocimos en la Universidad, siempre hemos estado juntas y desde entonces me has ayudado tanto a nivel personal como profesional. Eres mi compañera, amiga y guía en

todos los trabajos que he realizado, y sin ti, esta tesis sabes que no hubiera tenido lugar y no hubiera sido igual, gracias por estar siempre ahí. A **Juancar** y **Marian**, por todos los momentos que hemos compartido que han hecho que esta tesis sea menos dura, Marian en nada tú también presentas así que ya sabes que conmigo puedes contar y a **José Lázaro**, por sus visitas al laboratorio, sus consejos y apoyo con esta Tesis. Y al resto de compañeros del Experimental tanto de los laboratorios adyacentes como los del Animalario, en especial a Juan UCM, Laura, Maribel, Inma, Carla, Rafa Correa, Jacobo y Alicia, muchas gracias por vuestro apoyo incondicional y por sacarme siempre una sonrisa.

Pero esta tesis no tendría sentido sin dar las gracias a las personas que siempre han estado apoyándome, como es mi familia. A mis padres, les quiero agradecer que siempre me hayan apoyado y hayan estado cuando más lo he necesitado. Por hacerme ver las cosas de otra manera cuando estaba agobiada y ofrecirme otras alternativas. Por acompañarme en todo lo que me he embarcado y por no dudar un momento en que iba a conseguir un éxito. Papa, gracias por enseñarme que cosas son importantes en la vida y por estar siempre ahí cuando lo he necesitado. Mama, que haría yo si ti, te quiero tanto y te tendría que agradecer tanto que no sabría por dónde empezar. Gracias por transmitirme tu optimismo y en hacerme ver la vida a tu manera. Eres fantástica. A mi hermana **Cris**, ya sabes que te lo digo siempre que eres la más importante, que sin ti mi vida no tendría sentido, desde pequeña siempre me he sentido muy unida a ti y estoy orgullosa de ver en todo lo que te has convertido, gracias por tu apoyo incondicional. A mis abuelos que no están, gracias por enseñarme tanto y tratarme con tanto amor y cariño. Os echo mucho de menos y ojalá pudierais verme el día que presente la tesis. A mi abuela **Ambrosia**, gracias por apoyarme, enseñarme cosas importantes como

cocinar y quererme tanto. A mi familia política como **Marisol**, muchas gracias por ser tan buena conmigo y apoyarme tanto cuando lo he necesitado. Y al resto de mi familia, muchas gracias por los ánimos y confiar en mí siempre.

Y como no, no puedo dejar de dar las gracias por su comprensión y apoyo incondicional, a mis amigos. A **Marta, Laura y Susi**, mis tres pilares, gracias por estar siempre ahí, por escucharme y por vuestras palabras de ayuda, por nuestras quedadas para liberar tensión y sobre todo, por demostrarme que la vida son esos momentos y que sin vosotras no hubiera sido igual. A **Nadia**, por comprenderme tanto con la tesis y aunque no nos veamos tanto ahora, sabes que puedes contar conmigo. A **Pablo**, por ser un amigo incondicional y ayudar a desestresarme los fines de semana. A **Virginia**, por todo lo que hemos compartido durante nuestras vidas y que aunque no nos veamos, sé que siempre estarás ahí. A mis amigas de la Universidad y mis compañeros de inglés, por hacer más llevadero esta etapa y por compartir conmigo estos momentos.

Y por último, a **Carlos**, mi compañero de viaje y el que más ha compartido y sufrido esta Tesis Doctoral. Gracias cariño por ser mi sustento, por ayudarme y darme ánimos en momentos de flaqueza y por aguantarme en los momentos de mayor estrés. Por dar la vuelta a mis opiniones y hacer las cosas más fáciles y por tu humor irónico, que en el fondo me encanta. Gracias por caminar junto a mí y quererme tanto y compartir conmigo las ilusiones y en definitiva, gracias por hacerme feliz.



## ABREVIATURAS

A continuación, se recoge la relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En ocasiones se ha mantenido la correspondiente abreviatura y definición en inglés debido a su mayor uso en el lenguaje científico:

ABREVIATURA	DEFINICIÓN
<b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotropa
<b>ACTR</b>	Receptor de activina
<b>AD</b>	Dominio ácido
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico copia o complementario
<b>AKT</b>	Proteína quinasa B
<b>AlbCre</b>	Albumina Cre
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferasa
<b>AMPc</b>	Adenosin monofosfato cíclico
<b>Ang-2</b>	Angiopoyetina 2
<b>AP-1</b>	Proteína activadora 1
<b>AR</b>	Amfiregulina
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferasa
<b>BMP2</b>	Proteína morfogénica ósea 2

<b>BrdU</b>	Bromodesoxiuridina
<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>CCl<sub>4</sub></b>	Tetracloruro de carbono
<b>CDKs</b>	Quinasas dependientes de ciclinas
<b>C/EBP</b>	Proteínas potenciadoras de unión a CCAAT
<b>CNTF</b>	Factor neurotrófico ciliar
<b>CoR</b>	Co-represores transcripcionales
<b>CpG-ADN</b>	ADN rico en guanosina fosfato citidina
<b>CRP</b>	Proteína C reactiva
<b>CSF-1</b>	Factor estimulante de colonias de macrófagos 1
<b>CT-1</b>	Cardiotrofina 1
<b>CTRL FL</b>	Control floxeado
<b>EBI3</b>	Gen 3 inducido por el virus Epstein-Barr
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EGFR</b>	Receptor del EGF
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
<b>ERK</b>	Quinasas reguladas por señales extracelulares
<b>FAL</b>	Fosfatasa alcalina
<b>FERM</b>	Proteínas tipo 4.1, Ezrina, Radixina y Moesina.
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos
<b>FTC</b>	Factores de transcripción
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

<b>GdCl<sub>3</sub></b>	Gadolinio de cloro
<b>GFP</b>	De sus siglas en inglés "Green Fluorescent protein" (Proteína fluorescente verde)
<b>Gp130</b>	Glicoproteína 130
<b>GPL</b>	Receptor tipo gp130
<b>GRAN%</b>	Porcentaje de granulocitos
<b>HB-EGF</b>	Factor semejante al EGF ligado a la heparina
<b>HBx</b>	Proteína X del virus de la Hepatitis B
<b>HCC</b>	Hepatocarcinoma hepatocelular
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina y eosina
<b>HGF</b>	Factor de crecimiento de hepatocitos
<b>HGUGM</b>	Hospital General Universitario Gregorio Marañón
<b>HP</b>	Hepatectomía parcial
<b>HTC</b>	Hematocrito
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adhesión intercelular 1
<b>IFNAR</b>	Receptor de IFN $\alpha/\beta$
<b>IFNs</b>	Interferones
<b>IFN<math>\alpha/\beta</math></b>	Interferón $\alpha/\beta$
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón $\gamma$
<b>IGF</b>	Factor de crecimiento insulínico
<b>IGFBP1</b>	Proteína de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina 1

<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>ILs</b>	Interleucinas
<b>IiSGM</b>	Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IL-6 KO<sub>H</sub></b>	Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en hepatocitos
<b>IL-6 KO<sub>M</sub></b>	Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en células de origen mieloide
<b>IL-6R</b>	Receptor de IL-6
<b>ILK</b>	Integrina ligada a una quinasa
<b>JAK</b>	Proteínas tirosina quinasas Jano
<b>JH</b>	Holomología JAK
<b>JNK</b>	Quinasas c-Jun N-terminal
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>kDa</b>	KiloDalton
<b>KIR</b>	Región inhibidora quinasa
<b>KO</b>	Animal defectivo para un gen (del inglés: Knock-out)
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>LIF</b>	Factor inhibidor de leucemia
<b>LIFR</b>	Receptor de LIF
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>LT-β</b>	Linfotoxina β

<b>LYM%</b>	Porcentaje de linfocitos
<b>LysMCre</b>	Lisozima Cre
<b>Lyz2</b>	Lisozima 2
<b>M-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de macrófagos
<b>MAPK</b>	Quinasas activadas por mitógenos
<b>Mcp-1</b>	Proteína quimiotáctica de macrófagos 1
<b>ME</b>	Matriz extracelular
<b>MMPs</b>	Metaloproteinasas
<b>MMP9</b>	Metaloproteinasa 9
<b>MON%</b>	Porcentaje de monocitos
<b>MPM</b>	Marcador de peso molecular
<b>MyD88</b>	Factor de diferenciación mieloide 88
<b>NFAT</b>	Factor nuclear de células T activadas
<b>NFκB</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<b>NIH</b>	Instituto nacional de Salud
<b>NNT-1</b>	Neurotrofina 1 Novel
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NO OP</b>	No operados
<b>NPCs</b>	De sus siglas en inglés “Non-Parenchymal Cells” (“Células no parenquimatosas”)
<b>NPN</b>	Neuropoyetina

<b>OCT</b>	Medio de corte óptimo
<b>OSM</b>	Oncostatina M
<b>OSMR</b>	Receptor de OSM
<b>P21</b>	Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina
<b>Pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCNA</b>	Antígeno nuclear de células en proliferación
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3 quinasa
<b>PIAS</b>	Proteínas inhibidoras de los STATs activados
<b>PINIT</b>	Prolina-Isoleucina-Asparagina-Isoleucina-Treonina
<b>PLT</b>	Plaquetas
<b>PPAR</b>	Receptor activado por proliferadores del peroxisoma
<b>PTPs</b>	Proteínas tirosina fosfatasas
<b>RasGAP</b>	Proteína activadora de la GTPasa Ras
<b>RBC</b>	Recuento de glóbulos rojos
<b>Ref-1</b>	Factor redox 1
<b>RING</b>	De sus siglas en inglés "Really Interesting New Gene" ("Nuevo Gen Realmente Interesante")
<b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RTK</b>	Receptores tirosina quinasa

<b>SAA</b>	Suero amiloide A
<b>sgp130</b>	Glicoproteína 130 soluble
<b>s-IL6R</b>	Receptor soluble de IL-6
<b>S/T</b>	Serina/Treonina
<b>SCF</b>	Factor de células madre
<b>SH2</b>	Homología 2 a Scr
<b>SHAM</b>	Grupos control con operaciones simuladas
<b>SHP-1</b>	Proteína tirosina fosfatasa 1 compuesta de dominios SH2
<b>SHP-2</b>	Proteína tirosina fosfatasa 2 compuesta de dominios SH2
<b>STATs</b>	Transductores de señal y activadores de la transcripción
<b>STAT-3</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
<b>SMAD</b>	De sus siglas en inglés “small mothers against decapentaplegic”
<b>SOCS</b>	Supresores de la señalización por citocinas
<b>SOCS-3</b>	Supresor de la señalización por citocinas 3
<b>SUMO</b>	Pequeños modificadores parecidos a la ubiquitina
<b>TACE</b>	Enzima que convierte TNF
<b>TBP</b>	Proteína de unión a TATA
<b>TBS</b>	Tampón tris salino
<b>TBST</b>	TBS Tween 20

<b>TdEGF</b>	De sus siglas en inglés "Tomato-dye-EGFP"
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	Factor de crecimiento transformante alfa
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	Factor de crecimiento transformante beta 1
<b>TGF-<math>\beta</math>RII</b>	Receptor II del factor de crecimiento transformante beta
<b>TLRs</b>	Receptores tipo <i>toll</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>TNFR1</b>	Receptor de TNF tipo 1
<b>uPA</b>	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa
<b>VCAM-1</b>	Molécula de adhesión celular vascular 1
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelio-vascular
<b>Veh</b>	Vehículo
<b>WBC</b>	Recuento de glóbulos blancos

## **ÍNDICE**

<b>I.- RESUMEN.....</b>	<b>41</b>
<b>II.- SUMMARY .....</b>	<b>49</b>
<b>III.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>57</b>
1.- REGENERACIÓN HEPÁTICA .....	59
1.1.- EL HÍGADO .....	59
1.2.- PERSPECTIVAS HISTÓRICAS DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA..	62
1.3.- GENERALIDADES DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA.....	64
1.4.- FASES DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA .....	72
1.4.1.- Fase inicial de “preparación o cebado” .....	75
1.4.2.- Fase de progresión .....	84
1.4.3.- Interacciones entre citocinas y factores de crecimiento .....	90
1.4.4.- Fase de terminación .....	94
1.5.- MODELOS ANIMALES .....	101
1.5.1.- Ventajas y limitaciones del modelo actual de HP .....	103
1.5.2.- Métodos usados para cuantificar la regeneración hepática .....	108
2.- INTERLEUCINA-6 (IL-6) .....	111
2.1.- IL-6 Y SU SEÑALIZACIÓN .....	111
2.1.1.- Receptores de IL-6.....	114
2.1.2.- Vías de señalización de la IL-6 .....	123
2.2.- IL-6 EN EL SISTEMA INMUNE .....	142
2.3.- IL-6 Y LA RESPUESTA DE FASE AGUDA.....	150
2.4.- IL-6 EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA.....	153
2.4.1.- Efectos pro-proliferativos de IL-6 .....	154
2.4.2.- Efectos pro-supervivencia y de hepatoprotección de la IL-6 .....	157
2.4.3.- Efectos anti-proliferativos de la IL-6.....	159
2.5.- STAT-3 EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA .....	164
2.6.- SOCS-3 EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA.....	170
3.- FUENTE CELULAR DE IL-6 EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA.....	173

3.1.- PERCEPCIÓN CLÁSICA DE LA FUENTE CELULAR DE IL-6 EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA .....	173
3.2.- CAPACIDAD DE LOS HEPATOCITOS PARA PRODUCIR IL-6 .....	175
3.3.- PRODUCCIÓN DE IL-6 POR OTROS TIPOS CELULARES .....	177
<b>IV.- HIPÓTESIS .....</b>	<b>181</b>
<b>V.- OBJETIVOS .....</b>	<b>185</b>
<b>VI.- MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>191</b>
1.- EXPERIMENTOS IN VIVO .....	193
1.1.- ANIMALES.....	193
1.1.1.- Generación de ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células específicas .....	194
1.1.1.1.- Ratones KO condicionales de IL-6 en células de estirpe mieloide (IL-6 KO <sub>M</sub> ).....	198
1.1.1.2.- Ratones KO condicionales de IL-6 en hepatocitos (IL-6 KO <sub>H</sub> ) .....	199
1.1.2.- Ratones reporteros de linaje celular .....	201
1.1.2.1.- Ratones reporteros de células de estirpe mieloide .....	202
1.1.2.2.- Ratones reporteros de hepatocitos .....	204
1.1.3.- Genotipaje de ratones.....	205
1.1.3.1.- Extracción de ADN .....	206
1.1.3.2.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	206
1.1.4.- Características basales de ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células específicas.....	212
1.1.4.1.- Recuento de células sanguíneas .....	212
1.1.4.2.- Determinación de parámetros bioquímicos en plasma .....	213
1.1.4.3.- Evaluación del peso corporal .....	214
1.2.- MODELOS EXPERIMENTALES .....	214
1.2.1.- Hepatectomía parcial (HP) de 2/3 (70%).....	214
1.2.1.1.- HP tradicional con dos ligaduras .....	217
1.2.1.2.- HP modificada con tres ligaduras.....	219

1.2.2.- Hepatectomía parcial del 30%.....	222
1.2.3.- Inyección de lipopolisacárido (LPS) .....	223
1.2.4.- Monitorización de los animales tras la realización de los modelos experimentales .....	224
2.- EXPERIMENTOS IN VITRO .....	226
2.1.- AISLAMIENTO Y CULTIVO PRIMARIO DE MACRÓFAGOS PERITONEALES.....	226
2.1.1.- Extracción de macrófagos peritoneales .....	228
2.1.2.- Separación de macrófagos peritoneales en columnas magnéticas.....	229
2.1.3.- Cultivo primario de macrófagos peritoneales .....	232
2.1.4.- Recuento de macrófagos peritoneales mediante citometría de flujo. .....	233
3.- DISEÑO EXPERIMENTAL.....	234
4.- MÉTODOS Y TÉCNICAS UTILIZADAS.....	242
4.1.- CUANTIFICACIÓN DE MASA/TEJIDO HEPÁTICO.....	242
4.1.1.- Determinación de la variabilidad en la cantidad de tejido resecado .....	242
4.1.2.- Determinación de la cantidad de tejido remanente del lóbulo medio.....	243
4.1.3.- Relación del peso del hígado frente al peso corporal (índice hepático) .....	244
4.2.- COMPLICACIONES DE LAS TÉCNICAS DE HP TRADICIONAL Y HP MODIFICADA. ....	245
4.3.- RT-PCR EN TIEMPO REAL .....	246
4.3.1.- Extracción de ácido ribonucleico (ARN) .....	246
4.3.2.- Síntesis de ADN copia o complementario (ADNc).....	247
4.3.3.- RT-PCR en tiempo real .....	247
4.4.- ENSAYO POR INMUNOADSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA) DE IL-6 .....	248

4.4.1.- En plasma (IL-6 circulante) .....	248
4.4.2.- En líquido peritoneal.....	249
4.4.3.- En medio de cultivo de macrófagos peritoneales .....	249
4.5.- HISTOLOGÍA .....	251
4.5.1.- Inmunohistoquímica (IHQ) de BrdU .....	251
4.5.2.- IHQ de PCNA.....	252
4.5.3.- Tinción de Hematoxilina & Eosina (H&E) .....	254
4.6.- INMUNOFLUORESCENCIA .....	256
4.6.1.- Procesado de las muestras hepáticas .....	256
4.6.2.- Inmunofluorescencia y captura de imágenes .....	257
4.7.- WESTERN BLOT.....	258
4.7.1.- Extracción de proteínas totales de tejido hepático .....	258
4.7.2.- Western blot.....	259
4.8.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	261
<b>VII.- RESULTADOS.....</b>	<b>263</b>
1.- OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA QUIRÚRGICA DE HEPATECTOMÍA PARCIAL (HP) EN RATONES.....	265
1.1.- OBJETIVO 1A. COMPARACIÓN DE LA REPRODUCIBILIDAD DE DOS PROTOCOLOS DE HP.....	265
1.1.1.- Cantidad de tejido resecado.....	265
1.1.2.- Cantidad de tejido remanente de los lóbulos resecados .....	266
1.1.3.- Dinámica de la regeneración hepática.....	268
1.2.- OBJETIVO 1B: COMPARACIÓN DE LAS COMPLICACIONES DE LAS TÉCNICAS DE HP TRADICIONAL Y HP MODIFICADA.....	270
1.2.1.- Mortalidad intra-operatoria. ....	270
1.2.2.- Desarrollo de necrosis hepatocelular.....	271
1.2.3.- Parámetros de daño hepático.....	271
2.- OBJETIVO 2. DETERMINAR LA CONTRIBUCIÓN DE CADA TIPO CELULAR (HEPATOCITOS Y MACRÓFAGOS) A LA PRODUCCIÓN DE IL-6 Y LA	

RELEVANCIA DE LA FUENTE CELULAR DE IL-6 COMO FACTOR DETERMINANTE DE SUS EFECTOS SOBRE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA.....	272
2.1.- OBJETIVO 2A. VALIDAR LOS RATONES GENERADOS CON DEFICIENCIA SELECTIVA DE IL-6 EN CÉLULAS ESPECÍFICAS. ....	272
2.1.1.- Evaluación de la producción de IL-6 en cultivos primarios de macrófagos peritoneales.....	273
2.1.2.- Elevación de IL-6 circulante in vivo tras la administración de LPS en ratones. ....	277
2.1.3.- Selectividad y penetrancia de la recombinación inducida por los ratones LysMCre y AlbCre.....	280
2.2.- OBJETIVO 2B. CARACTERIZACIÓN BASAL DE RATONES CON DEFICIENCIA DE IL-6 EN CÉLULAS ESPECÍFICAS (CÉLULAS DE ESTIRPE MIELOIDE / HEPATOCITOS) .....	281
2.2.1.- Ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide. ....	281
2.2.2.- Ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos .....	284
2.3.- OBJETIVO 2C. CONTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS DE ESTIRPE MIELOIDE Y DE LOS HEPATOCITOS A LA PRODUCCIÓN DE IL-6 TRAS UNA HP .....	287
2.3.1.- Expresión del ARNm de IL-6 en tejido hepático. ....	288
2.3.2.- Producción de IL-6 circulante tras una HP .....	290
2.4.- OBJETIVO 2D. IMPACTO DE LA DEFICIENCIA DE IL-6 EN CÉLULAS DE ESTIRPE MIELOIDE O EN HEPATOCITOS SOBRE LA SEÑALIZACIÓN DE IL-6 EN EL HÍGADO TRAS UNA HP .....	291
2.4.1.- Ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide. ....	292
2.4.2.- Ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos .....	296
2.5.- OBJETIVO 2E. IMPACTO DE LA DEFICIENCIA DE IL-6 EN CÉLULAS DE ESTIRPE MIELOIDE O EN HEPATOCITOS SOBRE EL DESARROLLO DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA TRAS UNA HP.....	301

2.5.1.- Ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide. ....	301
2.5.2.- Ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos .....	307
3.- OBJETIVO 3. CONTRIBUCIÓN DE FUENTES EXTRA-HEPÁTICAS A LA ELEVACIÓN DE LA IL-6 CIRCULANTE TRAS UNA HP. ....	311
3.1.- NIVELES DE IL-6 EN LA CAVIDAD PERITONEAL .....	312
3.2.- EXPRESIÓN GÉNICA DE IL-6 EN DIVERSOS ÓRGANOS. ....	317
<b>VIII.- DISCUSIÓN .....</b>	<b>321</b>
1.- ¿ES POSIBLE MEJORAR LA REPRODUCIBILIDAD DE LA TÉCNICA DE HP EN RATONES PARA EL ESTUDIO DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA? .....	327
2.- ¿LOS RATONES CON DEFICIENCIA SELECTIVA DE IL-6 EN CÉLULAS DE ORIGEN MIELOIDE (CÉLULAS DE KUPFFER) O EN HEPATOCITOS CONSTITUYEN UNA HERRAMIENTA VÁLIDA PARA EL ESTUDIO DE LA FUENTE CELULAR DE IL-6? .....	334
3.- ¿LOS RATONES KO CONDICIONALES DE IL-6 EN CÉLULAS DE KUPFFER O EN HEPATOCITOS, PRESENTAN UN FENOTIPO NORMAL A NIVEL BASAL? .....	340
4.- ¿CUÁL ES LA FUENTE DE IL-6 TRAS UNA HP? .....	343
5.- ¿TIENE LA FUENTE CELULAR DE IL-6 UN IMPACTO SOBRE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE ESTA CITOCINA O SOBRE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA TRAS UNA HP? .....	346
6.- ¿EXISTEN FUENTES CELULARES EXTRAHEPÁTICAS DE IL-6 EN RATONES TRAS UNA HP? .....	353
<b>IX.- CONCLUSIONES .....</b>	<b>357</b>
<b>X.- BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>361</b>
<b>XI.- ANEXO .....</b>	<b>393</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig.1.</b> Estructura de los lobulillos hepáticos.....	61
<b>Fig.2.</b> Células hepáticas.....	62
<b>Fig.3.</b> Óleo en lienzo de Peter Paul Rubens: “Prometeo encadenado” pintado en 1611-1612.....	63
<b>Fig.4.</b> Hiperplasia compensatoria de los lóbulos remanentes de un hígado de ratón tras una hepatectomía parcial (HP).....	65
<b>Fig.5.</b> Diagrama de dos modelos de regeneración hepática.....	68
<b>Fig.6.</b> Representación de la cinética de la síntesis de ADN de los distintos tipos celulares presentes en el hígado de rata.....	70
<b>Fig.7.</b> Citocinas, factores de crecimiento y redes metabólicas en la regeneración hepática.....	74
<b>Fig.8.</b> Cascada de señalización de citocinas al inicio de la regeneración hepática.....	84
<b>Fig.9.</b> Cascada de señalización de factores de crecimiento en la regeneración hepática.....	90
<b>Fig.10.</b> Interacción entre citocinas y factores de crecimiento en la regeneración hepática.....	93
<b>Fig.11.</b> Interacciones entre TGF- $\beta$ y HFG al inicio de la regeneración hepática.....	98
<b>Fig.12.</b> La resección de mas hepática genera una serie de señales mitogénicas para los hepatocitos que estimulan la regeneración hepática.....	100
<b>Fig.13.</b> Esquema de la HP de 2/3 en ratones.....	103

<b>Fig.14.</b> Expresión diferencial de BrdU y PCNA en el ciclo celular.....	110
<b>Fig.15.</b> Representación de la estructura de IL-6.....	113
<b>Fig.16.</b> Esquema representativo de los receptores de la familia de IL-6.....	115
<b>Fig.17.</b> Esquema de los dos mecanismos de señalización de IL-6 en las células diana.....	117
<b>Fig.18.</b> Distribución de los receptores de IL-6 en las células que expresan IL-6R de membrana.....	121
<b>Fig.19.</b> Organización estructural de varios componentes de la señalización de IL-6.....	125
<b>Fig.20.</b> IL-6 activa la ruta de señalización JAK/STAT y la cascada de MAPK.....	127
<b>Fig.21.</b> El gen SOCS-3 es inducido por la cascada de MAPK y STAT-3.....	136
<b>Fig.22.</b> IL-6 activa la ruta de señalización PI3K/AKT.....	141
<b>Fig.23.</b> Propiedades pro-inflamatorias y anti-inflamatorias de IL-6...150	
<b>Fig.24.</b> Papeles de la IL-6 en la regeneración hepática.....	162
<b>Fig.25.</b> Efectos pro-proliferativos, anti-apoptóticos (hepatoprotección) y anti-proliferativos de la señalización de IL-6.....	163
<b>Fig.26.</b> Interacción de STAT-3 de células de estirpe mieloide (células de Kupffer) y de hepatocitos en la regeneración hepática.....	169
<b>Fig.27.</b> Descripción del sistema Cre/LoxP.....	195
<b>Fig.28.</b> Generación de ratones floxeados para IL-6.....	197
<b>Fig.29.</b> Estrategia de cruzamientos para obtener ratones KO condicionales de IL-6 en macrófagos (IL-6 KO <sub>M</sub> ).....	199

<b>Fig.30.</b> Estrategia de cruzamientos para obtener ratones KO condicionales de IL-6 en hepatocitos (IL-6 KO <sub>H</sub> ).....	201
<b>Fig.31.</b> Representación del vector ROSA <sup>mT/mG</sup> antes y después de la recombinación por la recombinasa Cre.....	203
<b>Fig.32.</b> Estrategia de cruzamiento para obtener ratones reporteros de linaje de células mieloide (LysMCre-TdEGFP).....	204
<b>Fig.33.</b> Estrategia de cruzamiento para obtener ratones fluorescentes en hepatocitos (AlbCre-TdEGFP).....	205
<b>Fig.34.</b> Electroforesis en gel de agarosa de las distintas PCRs.....	211
<b>Fig.35.</b> Medida del peso corporal en ratones con balanza de precisión.....	214
<b>Fig.36.</b> Representación de la colocación de las ligaduras en la HP tradicional frente a la HP modificada.....	220
<b>Fig 37.</b> Comparación de la resección del lóbulo medio en la HP tradicional frente a la HP modificada.....	221
<b>Fig.38.</b> Inyección de LPS/vehículo por vía intraperitoneal.....	224
<b>Fig.39.</b> Selección positiva de macrófagos peritoneales con bolas magnéticas anti-estreptavidina en separadores magnéticos con columnas Macs.....	227
<b>Fig.40.</b> Representación de la extracción y aislamiento de macrófagos peritoneales.....	231
<b>Fig.41.</b> Fórmula de la relación del peso del hígado resecado frente al peso corporal del animal en el día de la cirugía.....	242
<b>Fig.42.</b> Fórmula del porcentaje de hepatectomía.....	243

<b>Fig.43.</b> Relación del tejido viable en el muñón del lóbulo medio remanente frente al hígado viable total.....	244
<b>Fig.44.</b> Fórmula de la relación del tejido necrótico en el hígado remanente frente al hígado viable total.....	244
<b>Fig.45.</b> Fórmula de la relación del peso del hígado frente al peso corporal (índice hepático).....	245
<b>Fig.46.</b> Comparación del procedimiento de un ELISA estándar con el de un ELISA estándar junto con el kit de amplificación de la señal ELAST (PerkinElmer).....	250
<b>Fig.47.</b> Imágenes histológicas de secciones teñidas con H&E, BrdU y PCNA.....	256
<b>Fig.48.</b> Cantidad de tejido hepático resecado en ratones mediante las técnicas de HP tradicional y HP modificada.....	266
<b>Fig.49.</b> Proporción que representa el tejido viable y el tejido necrótico del remanente del lóbulo medio respecto al total de hígado viable remanente en ratones operados con una HP tradicional o una HP modificada.....	267
<b>Fig.50.</b> Concentración de IL-6 en plasma a las 4 horas tras una HP tradicional o una HP modificada en ratones.....	268
<b>Fig.51.</b> Dinámica de la regeneración hepática en ratones operados con una HP tradicional o con una HP modificada.....	270
<b>Fig.52.</b> Parámetros bioquímicos de daño hepático en ratones operados con las técnicas de HP tradicional y HP modificada, medidos en sangre obtenida por sangrado retro-orbitario a las 28 h tras la cirugía.....	271

<b>Fig.53.</b> Caracterización de poblaciones celulares, y concentración de IL-6 en el medio de cultivo de macrófagos peritoneales de ratones IL-6 KO <sub>M</sub> y de sus controles IL-6 floxeados (CTRL FL) tras administrar LPS durante 24 horas.....	275
<b>Fig.54.</b> Producción de IL-6 tras administrar LPS durante 24 horas en el medio de cultivo de poblaciones celulares del lavado peritoneal (pre- y post- aislamiento de macrófagos) obtenido de ratones control IL-6 floxeados (CTRL FL), ratones con deficiencia de IL-6 en células mieloides (IL-6 KO <sub>M</sub> ) y ratones IL-6 KO sistémicos.....	276
<b>Fig.55.</b> Concentración de IL-6 en el medio de cultivo a lo largo del tiempo tras la administración de LPS en cultivos de células del lavado peritoneal (pre-aislamiento) y de macrófagos peritoneales (grupo post-aislamiento) obtenidos de ratones controles (CTRL FL) y ratones IL-6 KO <sub>M</sub> .....	277
<b>Fig.56.</b> Concentración plasmática de IL-6 en ratones a los 90 min de la administración de suero salino (VEH) o de LPS.....	279
<b>Fig.57.</b> Expresión de EGFP y Tomato-dye en tejido hepático de ratones procedentes del cruce de ratones reporteros TdEGFP con ratones LysMCre (A-F) o con ratones AlbCre (G-L).....	281
<b>Fig.58.</b> Peso corporal en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide (IL-6 KO <sub>M</sub> ) y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).....	282
<b>Fig.59.</b> Índice hepático en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide (IL-6 KO <sub>M</sub> ) y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).....	282

<b>Fig.60.</b> Parámetros hematológicos en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide (IL-6 KO <sub>M</sub> ) y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).....	283
<b>Fig.61.</b> Parámetros bioquímicos en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide (IL-6 KO <sub>M</sub> ) y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).....	284
<b>Fig.62.</b> Peso corporal en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos (IL-6 KO <sub>H</sub> ) y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).....	285
<b>Fig.63.</b> Índice hepático en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos (IL-6 KO <sub>H</sub> ) y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).....	285
<b>Fig.64.</b> Parámetros hematológicos en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos (IL-6 KO <sub>H</sub> ) y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).....	286
<b>Fig.65.</b> Parámetros bioquímicos en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos (IL-6 KO <sub>H</sub> ) y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).....	287
<b>Fig.66.</b> Expresión del ARNm de IL-6 en tejido hepático de ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide (IL-6 KO <sub>M</sub> ) o en hepatocitos (IL-6 KO <sub>H</sub> ) y en sus respectivos ratones controles IL-6 floxeados (CTRL FL) no operados (NO OP) y a las 2 h tras una HP...	289
<b>Fig.67.</b> Concentración de IL-6 en plasma en ratones con A) deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide (IL-6 KO <sub>M</sub> ) o B) en	

hepatocitos (IL-6 KO <sub>H</sub> ), y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL) no operados (NO OP) y a las 4 y 6 horas tras una HP.....	291
<b>Fig.68.</b> Efecto de la deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide sobre la activación de STAT-3 en tejido hepático tras una HP.....	293
<b>Fig.69.</b> Efecto de la deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide sobre la activación de ERK1/2 en tejido hepático tras una HP.....	294
<b>Fig.70.</b> Efecto de la deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide sobre la activación de AKT en tejido hepático tras una HP...	295
<b>Fig.71.</b> Expresión del ARNm de SOCS-3 en tejido hepático de ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide tras una HP.....	296
<b>Fig.72.</b> Efecto de la deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos sobre la activación de STAT-3 en tejido hepático tras una HP.....	297
<b>Fig.73.</b> Efecto de la deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos sobre la activación de ERK1/2 en tejido hepático tras una HP.....	298
<b>Fig.74.</b> Efecto de la deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos sobre la activación de AKT en tejido hepático tras una HP.....	299
<b>Fig.75.</b> Expresión del ARNm de SOCS-3 en tejido hepático de ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos tras una HP.....	300
<b>Fig.76.</b> Síntesis de ADN en hepatocitos tras una HP en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide (IL-6 KO <sub>M</sub> ) y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).....	302

<b>Fig.77.</b> Recuento de hepatocitos con figuras mitóticas tras una HP en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).....	303
<b>Fig.78.</b> Número de hepatocitos con expresión de PCNA en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide y en sus respectivos ratones controles IL-6 floxeados (CTRL FL).....	304
<b>Fig.79.</b> Efecto de la deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide sobre la expresión de ciclina D1 en tejido hepático tras una HP.....	305
<b>Fig.80.</b> Evolución del índice hepático (ratio peso del hígado frente al peso corporal) tras una HP en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide y en sus correspondientes controles IL-6 floxeados (CTRL FL).....	306
<b>Fig.81.</b> Parámetros bioquímicos en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide y en sus correspondientes ratones controles IL-6 floxeados (CTRL FL) tras una HP .....	307
<b>Fig.82.</b> Síntesis de ADN en hepatocitos tras una HP en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).....	308
<b>Fig.83.</b> Recuento de hepatocitos con figuras mitóticas tras una HP en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).....	309
<b>Fig.84.</b> Evolución del índice hepático (ratio peso del hígado frente al peso corporal) tras una HP en ratones con deficiencia selectiva de IL-6	

en hepatocitos y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).....	310
<b>Fig.85.</b> Parámetros bioquímicos en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos tras una HP en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).....	311
<b>Fig.86.</b> Concentración de IL-6 en plasma y en el lavado peritoneal de ratones C57BL6/J no operados y operados de HP al 70%.....	313
<b>Fig.87.</b> Concentración de IL-6 en plasma y en el lavado peritoneal de ratones C57BL6/J no operados o tras laparatomías simples de 4, 8 o 16 minutos de duración.....	314
<b>Fig.88.</b> Concentración de IL-6 en plasma y en el lavado peritoneal de ratones C57BL6/J no operados o tras una laparatomía simple (SHAM), una HP del 30% o una HP del 70%.....	315
<b>Fig.89.</b> Correlación entre la concentración de IL-6 en plasma y en el lavado peritoneal en ratones NO OP o tras laparatomía SHAM, HP del 30% o HP del 70%.....	316
<b>Fig.90.</b> Concentración de IL-6 en el lavado peritoneal de ratones CTRL FL e IL-6 KOM no operados o tras una HP del 70%. Concentración de IL-6 en el lavado peritoneal de ratones CTRL FL e IL-6 KOM no operados o tras una HP del 70%.....	317
<b>Fig.91.</b> Expresión del ARNm de IL-6 en órganos de ratones C57Bl6/J no operados y a las 2 horas tras una HP.....	318
<b>Fig.92.</b> Expresión del ARNm de IL-6 en el mesenterio de ratones C57Bl6/J no operados y a las 2 horas tras una HP.....	319



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Cronología de los principales eventos que ocurren en las etapas iniciales de la regeneración hepática tras una HP.....	76
<b>Tabla 2.</b> Principales factores en la fase inicial de la regeneración hepática.....	78
<b>Tabla 3.</b> Genes y cebadores específicos para cada PCR de genotipaje.....	207
<b>Tabla 4.</b> Reactivos y cantidades de los reactivos de las distintas PCRs.....	208
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de amplificación de las distintas PCRs.....	209
<b>Tabla 6.</b> Parámetros sanguíneos analizados en un autoanalizador hematológico (Mindray BC 2800 Vet).....	213
<b>Tabla 7.</b> Parámetros bioquímicos analizados en el Departamento de Análisis Clínicos del HGUGM.....	213
<b>Tabla 8.</b> Criterios para la monitorización del dolor postoperatorio en ratones.....	225
<b>Tabla 9.</b> Descripción de los anticuerpos utilizados en citometría de flujo.....	234
<b>Tabla 10.</b> Descripción de los anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica.....	253
<b>Tabla 11.</b> Anticuerpos primarios utilizados en Western blot.....	260
<b>Tabla 12.</b> Anticuerpos secundarios utilizados en Western blot.....	261



## **I.- RESUMEN**

---



## **FUENTE CELULAR DE LA INTERLEUCINA (IL)-6 Y SU RELEVANCIA EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA**

### **INTRODUCCIÓN**

La Interleucina (IL)-6 es una citocina pleiotrópica con propiedades pro- y anti-inflamatorias, inductora de la respuesta de fase aguda, y moduladora de genes de diferenciación, supervivencia, apoptosis y proliferación celular. Aunque su importancia para la regeneración hepática tras una hepatectomía parcial (HP) está aceptada, diversos datos contradictorios han generado controversia sobre su papel. Adicionalmente, estudios recientes cuestionan el papel de las células de Kupffer (macrófagos residentes en el hígado) como responsables de la producción de IL-6 tras una HP, sugiriendo que otras células, incluyendo los hepatocitos, podrían contribuir a la misma.

### **HIPÓTESIS**

La **hipótesis general** del presente estudio fue que las células de Kupffer son la principal fuente celular de IL-6 tras la realización de una HP en ratones.

Las **hipótesis específicas** fueron las siguientes:

- La producción de IL-6 por células de Kupffer y por hepatocitos es necesaria para el desarrollo de una regeneración hepática normal.
- No existen fuentes celulares extrahepáticas relevantes de IL-6 tras la realización de una HP en ratones.

## **OBJETIVOS**

1. Optimizar la técnica quirúrgica de hepatectomía parcial (HP) en ratones.
2. Determinar la contribución de cada tipo celular (hepatocitos y macrófagos) a la producción de IL-6 y la relevancia de la fuente celular de IL-6 como factor determinante de sus efectos sobre la regeneración hepática.
3. Determinar la contribución de fuentes extra-hepáticas a la elevación de la IL-6 circulante tras una HP.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se realizaron diversos experimentos en ratones machos (8-14 semanas de edad) C57Bl6/J salvajes y en ratones con deficiencia selectiva del gen de la IL-6 en células de estirpe mieloide (**IL-6 KO<sub>M</sub>**) o en hepatocitos (**IL-6 KO<sub>H</sub>**) y en sus respectivos ratones controles IL-6 floxeados (**CTRL FL**). Los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** e **IL-6 KO<sub>H</sub>** fueron generados mediante el sistema Cre/LoxP, utilizando ratones con expresión de la Cre recombinasa bajo el control del promotor de la lisozima (**IL-6 KO<sub>M</sub>**) o de la albúmina (**IL-6 KO<sub>H</sub>**). En el Objetivo 1, ratones C57BL6 fueron sometidos a una HP del 70% tradicional de dos ligaduras (HP-trad) o a una HP modificada de tres ligaduras (HP-modif). En el Objetivo 2, utilizamos diversos modelos experimentales *in vivo* (administración de lipopolisacárido (LPS), ratones reporteros con marcaje fluorescente endógeno) e *in vitro* (cultivo de macrófagos y otras células del lavado peritoneal) para validar el uso de los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** e **IL-6 KO<sub>H</sub>**.

Seguidamente, se utilizó el modelo de HP-modif en los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** e **IL-6 KO<sub>H</sub>** y en sus respectivos controles (**CTRL FL**), terminando los experimentos a diversos tiempos tras la cirugía. En el Objetivo 3, se evaluaron ratones C57BL6 no operados o sometidos a una laparotomía simple (SHAM), o a una HP del 30% o del 70%. En los modelos descritos, se evaluaron la concentración de IL-6 en plasma y/o lavado peritoneal (ELISA), la expresión del ARNm de IL-6 en hígado y otros órganos (RT-PCR en tiempo real con sondas Taqman), la vía de señalización de la IL-6 en hígado (Western-blots de STAT-3 y pSTAT-3, ERK1/2 y pERK1/2, AKT y pAKT, y expresión génica de SOCS-3), y parámetros de proliferación celular (IHQ de BrdU y PCNA, conteo de figuras mitóticas, Western blot de ciclina D1 e índice hepático).

## **RESULTADOS**

Comparado con la técnica de HP tradicional, la HP modificada produjo una resección mayor de la masa hepática que fue más cercana al valor ideal del 70%, así como una mayor reproducibilidad en la cantidad de tejido hepático resecado. La HP-modif indujo una mayor elevación de IL-6 y tendió a aumentar y acelerar la proliferación de los hepatocitos, sin modificar las complicaciones.

En comparación con el grupo **CTRL FL**, el grupo de **IL-6 KO<sub>M</sub>** presentó una menor concentración de IL-6 en el medio de cultivo de macrófagos peritoneales ( $p < 0.01$ ) y de células del lavado peritoneal ( $p < 0.05$ ) tras la exposición a LPS. En comparación con ratones **CTRL FL**, la administración de LPS en ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>**, pero no en ratones **IL-6**

**KO<sub>H</sub>**, resultó en una menor elevación de IL-6 circulante (2311 pg/mL vs. 585 pg/mL,  $p < 0.01$ ). Ambas cepas de ratones KO condicionales presentaron una eliminación efectiva de secuencias floxeadas por parte de la Cre recombinasa, evaluada en ratones reporteros.

La deficiencia de IL-6 en células de estirpe mieloide o en hepatocitos no afectó parámetros generales fisiológicos, hematológicos o bioquímicos en ratones no operados. Tras una HP, los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** presentaron una atenuación de la inducción del ARNm de Il-6 en tejido hepático, pero ni los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** ni los **IL-6 KO<sub>H</sub>** presentaron alteraciones en la elevación de IL-6 circulante. Tras una HP, los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** y los **IL-6 KO<sub>H</sub>** presentaron solo sutiles alteraciones en la vía de señalización de la IL-6 en el hígado (aumento de activación de STAT-3 en las primeras horas tras la cirugía en ambas cepas) o en la regeneración hepática (inicio y terminación precoz de la fase S de los hepatocitos en ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>**).

En ratones C57Bl6/J salvajes, la realización de una HP resultó en una gran elevación de la concentración de IL-6 en la cavidad peritoneal que estuvo asociada a una inducción 55-fold del gen de la Il-6 en el mesenterio y, en menor medida, en el bazo, intestino y pulmón.

## **CONCLUSIONES**

1. La utilización de la técnica de HP modificada es preferible a la técnica tradicional en los estudios de regeneración hepática en ratones, ya que es más reproducible y cercana a la resección del 70% de masa hepática.

2. Los resultados en los ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide o en hepatocitos utilizados en el presente trabajo:
  - i. Apoyan la noción clásica de las células de Kupffer como principal fuente de IL-6 en el hígado tras una HP.
  - ii. Demuestran la existencia de fuentes celulares de IL-6, distintas de las células de estirpe mieloide y de los hepatocitos, que pueden ser las principales responsables del aumento de IL-6 en la circulación sanguínea tras una HP.
  - iii. Sugieren que la IL-6 producida por células de estirpe mieloide o hepatocitos solo tiene sutiles efectos moduladores negativos sobre la señalización precoz de IL-6 en hígado y sobre la regeneración hepática.
3. Revelan que la producción de IL-6 tras una HP no es un fenómeno limitado al hígado, sino que ocurre a nivel sistémico. En particular, la producción de IL-6 por el mesenterio y su liberación a la cavidad peritoneal podría ser el principal determinante de la elevación de la IL-6 en la circulación sanguínea tras una HP.



## **II.- SUMMARY**

---



## **INTRODUCTION**

Interleukin (IL)-6 is a pleiotropic cytokine with pro- and anti-inflammatory properties, inducer of the acute phase response, and modulator of genes related to differentiation, survival, apoptosis, and cellular proliferation. Even though its importance for liver regeneration after a partial hepatectomy (PH) is well accepted, diverse contradictory data have generated controversy regarding its real role. In addition, recent studies have questioned the role of Kupffer cells (liver tissue macrophages) as main players responsible for the production of IL-6 after a PH, suggesting that other cells, including hepatocytes, may also contribute.

## **HYPOTHESIS**

The **general hypothesis** of the present study was that Kupffer cells are the main cellular source of IL-6 after a PH in mice.

The **specific hypotheses** were the following:

- The production of IL-6 by Kupffer cells and hepatocytes is required for the normal development of liver regeneration.
- There are no relevant extrahepatic sources of IL-6 in mice after a PH.

## **AIMS**

1. To optimize the surgical technique of partial hepatectomy (PH) in mice.
2. To determine the contribution of each cell type (hepatocytes and macrophages) for the production of IL-6, and the relevance of the

cellular source of IL-6 as a factor determining its effects on liver regeneration.

3. To determine the contribution of extra-hepatic sources to the elevation of circulating IL-6 after a PH.

## **MATERIAL AND METHODS**

We performed diverse experiments in wild-type male C57Bl6/J mice (8-14 wk-o) and in mice with selective deficiency of the IL-6 gene in myeloid cells (**IL-6 KO<sub>M</sub>**) or in hepatocytes (**IL-6 KO<sub>H</sub>**) and in their respective IL-6 floxed control mice (**CTRL FL**). The **IL-6 KO<sub>M</sub>** and **IL-6 KO<sub>H</sub>** mice were generated by the Cre/LoxP system, using mice with the expression of Cre recombinase under the control of the lysozyme (**IL-6 KO<sub>M</sub>**) or the albumin (**IL-6 KO<sub>H</sub>**) promoters. In Aim 1, C57Bl6/J mice received a traditional 70% PH using two ligatures (Trad-HP) or a modified PH using three ligatures (Modif-PH). In Aim 2, we used diverse experimental models *in vivo* (lipopolysaccharide (LPS) administration, reporter mice with endogenous fluorescent markers) as well as *in vitro* (macrophage and peritoneal lavage cell cultures) to validate the use of the **IL-6 KO<sub>M</sub>** and **IL-6 KO<sub>H</sub>** mice. Next, we used the Modif-PH model in **IL-6 KO<sub>M</sub>** and **IL-6 KO<sub>H</sub>** mice and their corresponding controls (**CTRL FL**), finishing the experiments at diverse times after the surgery. In Aim 3, we evaluated non-operated C57Bl6/J mice and mice receiving a simple laparotomy (SHAM), a 30% PH or a 70% PH. In the previous models, we evaluated the IL-6 concentration in plasma and/or peritoneal lavage fluid (ELISA), the Il6 mRNA expression in the liver and

other organs (real time RT-PCT with Taqman probes), the IL-6 signaling pathway in the liver (Western-blot of pSTAT-3/STAT-3, pERK1/2/ERK1/2, pAKT/AKT, and the Socs3 gene expression), and cellular proliferation parameters (BrdU and PCNA immunohistochemistry, mitotic figures count, Western-blot of Cyclin D1, and the hepatic index).

## **RESULTS**

Compared with the Trad-PH technique, the Modif-PH technique resulted in a larger resection of liver mass that was closer to the 70% value, as well as a better reproducibility regarding the amount of the liver tissue resected. The Modif-PH induced a larger elevation of IL-6 and tended to increase and accelerate hepatocyte proliferation without increasing the rate of complications.

Compared with the **CTRL FL** group, the **IL-6 KO<sub>M</sub>** group showed decreased IL-6 concentration in the culture media of peritoneal macrophages ( $p < 0.01$ ) and of the mixed cells from the peritoneal lavage ( $p < 0.05$ ) after exposition to LPS. Compared with **CTRL FL** mice, LPS administration in **IL-6 KO<sub>M</sub>** mice, but not in **IL-6 KO<sub>H</sub>** mice, resulted in an attenuated elevation of circulating IL-6 (2311 pg/mL vs. 585 pg/mL,  $p < 0.01$ ). Both strains of conditional KO mice showed an effective deletion of floxed sequences in target cells, as assessed in reporter mice. IL-6 deficiency in myeloid cells or in hepatocytes did not affect general physiological, hematological or biochemical parameters in non-operated mice. After a PH, **IL-6 KO<sub>M</sub>** mice showed an attenuated

induction of the Il-6 mRNA in the liver, but neither **IL-6 KO<sub>M</sub>** mice nor **IL-6 KO<sub>H</sub>** mice showed alterations in the elevation of IL-6 in the circulation. After a PH, the **IL-6 KO<sub>M</sub>** and the **IL-6 KO<sub>H</sub>** mice showed only slight alterations in IL-6 signaling pathways in the liver (increased activation of STAT-3 in the first hours after the surgery) or in liver regeneration (early start and termination of S phase of hepatocytes in **IL-6 KO<sub>M</sub>** mice).

In C57Bl6/J wild-type mice, performance of a PH resulted in large elevations of IL-6 in the peritoneal cavity that was associated with a 55-fold induction of Il-6 mRNA in the mesentery and, to a considerable lesser extent, in the spleen, intestine and lung.

## **CONCLUSIONS**

1. The modified PH technique is preferable to the traditional PH technique in studies of liver regeneration in mice, given that it is more reproducible and closer to the resection of 70% of liver mass.
2. The results in mice with selective deficiency of IL-6 in myeloid cells or in hepatocytes used in the present study:
  - i. Support the traditional notion of Kupffer cells as the major source of IL-6 in the remnant liver after a PH.
  - ii. Demonstrate the existence of cellular sources of IL-6, different than myeloid cells (including Kupffer cells) and hepatocytes, that appear to be the main players responsible for the elevation of IL-6 in the systemic circulation after a PH.

- iii. Suggest that IL-6 produced by myeloid cells or hepatocytes has only slight negative modulatory effects on early IL-6 signaling in the liver and on liver regeneration.
3. Reveal that the production of IL-6 after a PH is not a phenomenon restricted to the liver, but is systemic in nature. In particular, the production of IL-6 by the mesentery and its release to the peritoneal cavity could be the main determinant of the elevation of IL-6 in the systemic circulation after a PH.



### **III.- *INTRODUCCIÓN***

---



## **1.- REGENERACIÓN HEPÁTICA**

### **1.1.- EL HÍGADO**

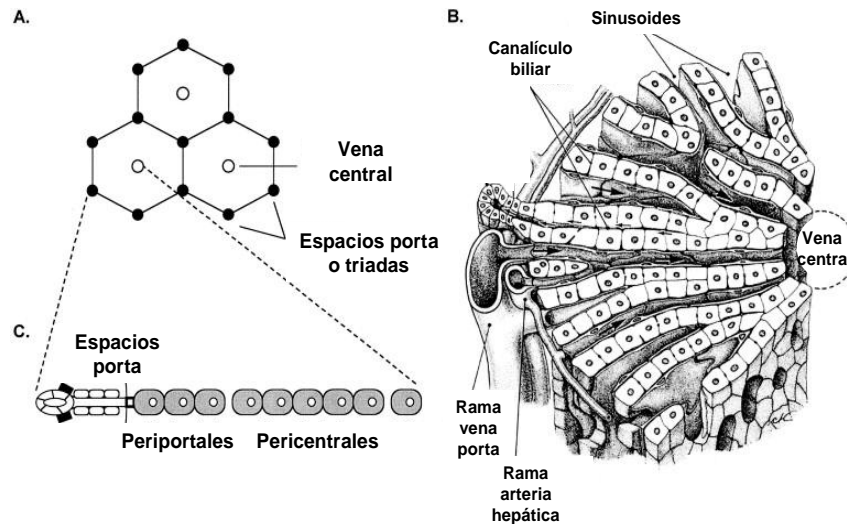
El hígado es uno de los órganos más grandes en mamíferos (aproximadamente el 4% de su peso corporal) y cumple importantes funciones homeostáticas y metabólicas. Así, el hígado es responsable del metabolismo, síntesis, almacenamiento y redistribución de nutrientes, carbohidratos, grasas y vitaminas. Actúa además como primer filtro natural para microorganismos y moléculas parcialmente tóxicas (xenobióticos) que llegan al hígado en la sangre procedente del intestino. Esta función de detoxificación del hígado se realiza a través de conversión metabólica y excreción biliar.

Distintos tipos celulares presentes en el hígado participan en las funciones necesarias para mantener la homeostasis del organismo. El tipo celular principal del parénquima hepático es el hepatocito, que constituye el 80% de las células hepáticas y desempeña la mayoría de las funciones descritas. El otro 20% está compuesto por células no parenquimatosas (NPCs, del inglés “**N**on-**P**arenchymal **C**ells”), que incluyen las células de Kupffer o macrófagos tisulares hepáticos, las células endoteliales sinusoidales hepáticas, las células epiteliales biliares, las células estrelladas o de Ito, y una población diversa de linfocitos y células NK y NKT (Michalopoulos, DeFrances 1997; Michalopoulos 2007; Taub 2004; Böhm , 2010).

El parénquima hepático está dividido en pequeñas unidades funcionales llamadas lobulillos hepáticos, que son estructuras hexagonales formadas por láminas de hepatocitos dispuestas en torno a una vena hepática central localizada en el centro del lobulillo. En los ángulos de los lobulillos hepáticos se localizan los espacios porta o triadas, que contienen una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta y un conductillo biliar. Entre los espacios porta y la vena central, se disponen láminas de hepatocitos que presentan hacia uno de sus lados unos capilares denominados sinusoides hepáticos y hacia el otro de sus lados, un canalículo biliar (Figura 1). La sangre fluye desde los espacios porta hasta la vena central. Dentro del lobulillo hepático, la sangre de la arteria hepática y de la vena porta confluye en los sinusoides hepáticos, los cuales desembocan en la vena hepática central. La bilis es producida por los hepatocitos y se vierte a los canalículos biliares en dirección opuesta a la sangre hacia los conductillos biliares de los espacios porta (Fausto N, Campbell JS, 2003).

Los hepatocitos localizados en la periferia del lobulillo hepático se denominan *periportales* mientras que los que se localizan en el centro del lobulillo se denominan *pericentrales*, *perivenulares* o *centrolobulares*. La posición de los hepatocitos en el lobulillo hepático determina su contenido enzimático y su función. Las funciones de catabolismo, ureagénesis, gluconeogénesis, producción de bilis, excreción de bilirrubina y protección frente a estrés oxidativo son llevadas a cabo principalmente por los hepatocitos periportales. Por el contrario, los

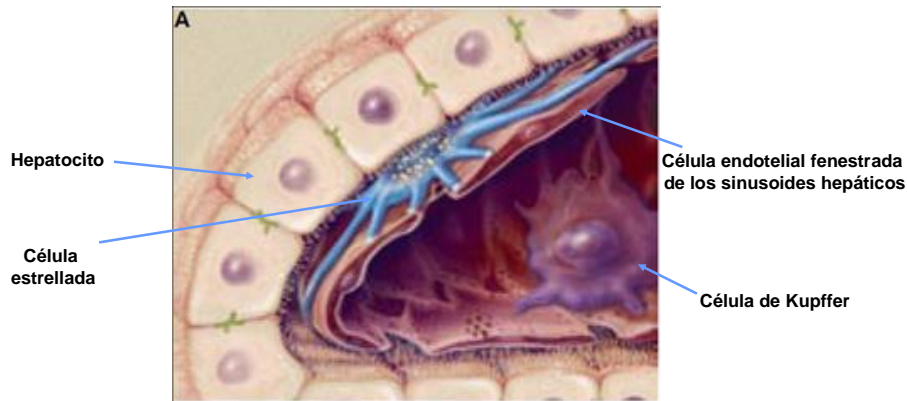
hepatocitos pericentrales tienen un papel más relevante en la glucólisis, la liponeogénesis, la ureagénesis y la biotransformación (Jungermann K, Katz N, 1982; Fausto N, Campbell JS, 2003).



**Figura 1: Estructura de los lobulillos hepáticos.** A. Tres lobulillos hepáticos son mostrados con espacios porta en los ángulos y una vena central en el centro. B. Estructura histológica de un lobulillo hepático con láminas de hepatocitos que se extienden desde la periferia hasta la vena central. C. Hepatocitos denominados periportales o pericentrales dependiendo de la distancia a los espacios porta. Imagen modificada de Fausto et al, 2003.

El espacio de Disse separa los hepatocitos de las *células endoteliales sinusoidales hepáticas*. Estas células constituyen un tipo particular de células endoteliales caracterizado por la presencia de un citoplasma fenestrado que favorece el intercambio metabólico y de gases entre la sangre y los hepatocitos. En este espacio también se encuentran las *células estrelladas* o *de Ito*, cuyas funciones principales son almacenar vitamina A, la regulación del tono sinusoidal, y la producción de matriz extracelular y fibrosis. Finalmente, las *células de Kupffer* son macrófagos residentes del hígado que se localizan en la luz de los sinusoides. Las células de Kupffer emiten prolongaciones hacia el espacio de Disse y juegan un papel en la defensa inmune (fagocitosis de

partículas extrañas, producción de citocinas) y en la proliferación celular (Suetmasu M, Aiso S, 2001; Fausto N, Campbell JS, 2003; Taub 2004) (Figura 2).



**Figura 2: Células hepáticas.** El espacio de Disse es un estrecho compartimento perisinusoidal que se encuentra entre la pared de los sinusoides y las láminas de hepatocitos. Contiene plasma, tejido conectivo y células estrelladas hepáticas que emiten prolongaciones hacia las células endoteliales para controlar el flujo sanguíneo sinusoidal. Las células de Kupffer se encuentran adheridas a las células endoteliales y emiten sus prolongaciones hacia el espacio de Disse. Imagen modificada de Friedman 2004.

## **1.2.- PERSPECTIVAS HISTÓRICAS DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA**

La regeneración hepática es uno de los fenómenos fisiológicos que más interés ha causado en científicos y médicos en el último siglo. Desde el punto de vista evolutivo, se piensa que la regeneración hepática se desarrolló para proteger a los animales salvajes de la pérdida de tejido hepático causado por la ingesta de comida contaminada con toxinas. La primera referencia que se tiene de este proceso data del año 750-700 A.C. donde ya los griegos describen la regeneración hepática en el mito de Prometeo. Según este mito, tras robar el secreto del fuego a los dioses y entregárselo a los humanos.

Prometeo fue condenado por Zeus a permanecer encadenado a una roca en el Cáucaso, donde sería torturado por un águila que se alimentaría cada día de su hígado. La regeneración de este órgano durante la noche convertía el castigo a Prometeo en un tormento interminable (Figura 3) (Steer 1995; Taub 2004; Tiniakos et al, 2010).



**Figura 3:** Óleo en lienzo de Peter Paul Rubens: “*Prometeo encadenado*” pintado en 1611-1612.

Tras el mito griego de Prometeo, hasta el año 1879 no se realizó la primera descripción científica de la regeneración hepática (Tiniakos et al, 2010). En los últimos 50 años, ha existido un gran interés en conocer los mecanismos básicos de la regeneración hepática, la respuesta génica en el hígado e identificar posibles aplicaciones clínicas (Riehle et al, 2011; Jia 2011). Un mejor conocimiento en estas áreas presumiblemente proporcionaría nuevas aproximaciones para el tratamiento de las enfermedades hepáticas. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares implicados en la regeneración hepática no han sido totalmente identificados.

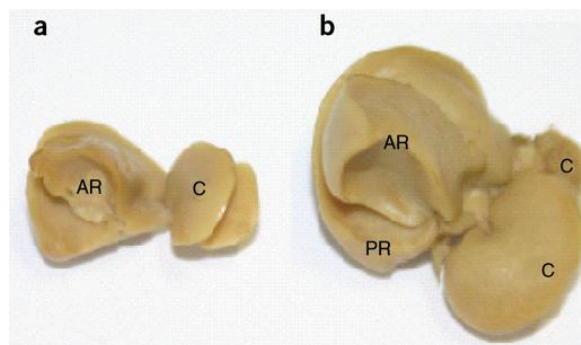
En enfermedades crónicas del hígado como la hepatitis por VHC o la cirrosis hepática, la capacidad regenerativa del hígado es insuficiente y resulta, en el peor de los casos, en un fallo hepático. Aunque gran parte de la población es afectada por estas enfermedades, las opciones terapéuticas son todavía insatisfactorias (Böhm et al, 2010; Jia 2011). El desarrollo de terapias específicas que aumenten la capacidad regenerativa del hígado podría conseguir mejorar la salud del ser humano. En los últimos 20 años, se han desarrollado estudios en humanos con la intención de aumentar la regeneración hepática. Estos estudios, basados en el trasplante de hepatocitos adultos o fetales en pacientes con fallo hepático agudo, han encontrado mejoras en el grado de encefalopatía hepática, pero no se ha registrado un gran beneficio clínico global (Riehle et al, 2011). En los próximos años, por tanto, es posible que el conocimiento de los mecanismos implicados en la regeneración hepática y la identificación de los factores que orquestan este proceso sean de gran utilidad para el tratamiento de estas enfermedades hepáticas.

### **1.3.- GENERALIDADES DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA**

El hígado tiene una gran capacidad de regeneración que se ha mantenido evolutivamente en todos los organismos vertebrados, desde el pez Zebra hasta el ser humano. La rápida restauración del volumen y de la función hepática tras un daño hepatocelular o tras una pérdida de masa hepática (p.ej. tras una hepatectomía parcial) constituye una estrategia de defensa del organismo para mantener las funciones

homeostáticas del hígado durante el proceso regenerativo (Michalopoulos 2007; Riehle et al, 2011).

La capacidad de regeneración en vertebrados adultos es una propiedad casi exclusiva del hígado. A diferencia de otros órganos que restauran su masa tras un daño por mecanismos de hipertrofia celular sin aumentar el número de células, la regeneración hepática se produce por aumento del número celular. En términos biológicos, la regeneración que ocurre tras la pérdida de un miembro en anfibios o en la piel, músculo y dedos consiste en la regeneración completa del tejido dañado o eliminado. El tejido perdido se regenera a partir del blastema formado por la dediferenciación de células adultas en células precursoras tejido-específicas. En la regeneración hepática, sin embargo, las partes del hígado que son eliminadas o dañadas no vuelven a crecer. En este caso, la recuperación de la masa hepática se debe a un fenómeno de hiperplasia compensadora, y no a una regeneración del tejido perdido como ocurre en vertebrados inferiores. Gracias a este fenómeno, el hígado remanente crece para compensar la pérdida de tejido y es capaz de reestablecer la masa hepática inicial en pocos días (Figura 4) (Steer 1995; Fausto et al, 2006).



**Figura 4: Hiperplasia compensadora de los lóbulos remanentes de un hígado de ratón tras una hepatectomía parcial (HP).** A. El hígado remanente tras una HP está constituido por el

lóbulo anterior (AR) y posterior (PR) del lóbulo derecho y el lóbulo caudado (C). B. Después de 10 días tras una HP, el hígado remanente da lugar a hiperplasia. Imagen obtenida de Boyce S, Harrison D, 2008.

A diferencia de otros tejidos como la piel o el intestino, la regeneración hepática no depende de la proliferación y diferenciación de células madre pluripotenciales (conocidas como *células ovales* en el hígado). Las células ovales son células progenitoras capaces de diferenciarse a hepatocitos y a colangiocitos (células del epitelio biliar), y se activan cuando el daño hepático es severo, como ocurre en determinadas hepatopatías crónicas, o cuando la proliferación de hepatocitos está abolida o es insuficiente (Lazaro et al, 1998; Fausto N, Campbell JS, 2003; Michalopoulos 2011; Riehle et al, 2011).

Tras la identificación de las células ovales, diversos estudios sugirieron que las células madre de médula ósea también eran capaces de diferenciarse a hepatocitos. Hasta ahora, no se ha demostrado que este fenómeno ocurra *in vivo*, y continúa la controversia con respecto a que estas células sólo se diferencian a hepatocitos en condiciones muy concretas (Petersen et al, 1999; Taub 2004; Riehle et al, 2011). Estudios recientes han indicado que este fenómeno podría ser debido a la fusión celular entre células procedentes de la médula ósea y hepatocitos más que a una verdadera transdiferenciación de las mismas. La mayoría de estudios coinciden en que la contribución de la médula ósea a la regeneración hepática normal es insignificante (Vassilopoulos et al, 2003; Fausto N, Campbell JS, 2003, Taub 2004, Riehle et al, 2011).

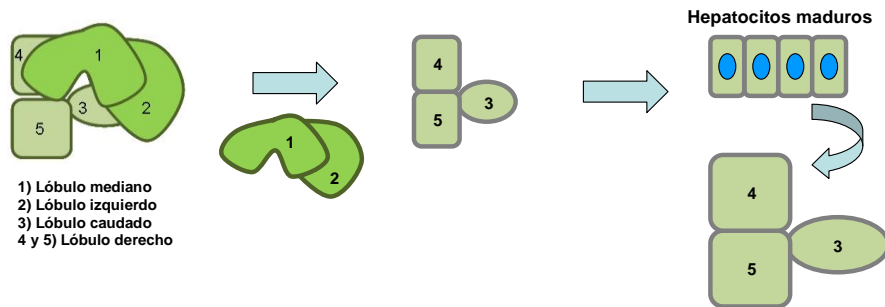
La regeneración hepática se debe a la proliferación de todas las poblaciones celulares maduras presentes en el hígado (hepatocitos y el resto de NPCs) y no a la proliferación de células madre pluripotenciales. En condiciones basales los hepatocitos permanecen en estado quiescente o fase G<sub>0</sub> del ciclo celular, pero mantienen la capacidad de reiniciar el ciclo celular en respuesta a la pérdida de tejido (hepatectomía parcial, HP) o lesión (Michalopoulos GK, DeFrances MC, 1997; Fausto 2000).

Se han descrito dos modelos de regeneración hepática que dependen de la proporción de tejido perdido y de la capacidad de proliferar de los distintos compartimentos celulares. Estas dos estrategias regenerativas se han desarrollado evolutivamente para mantener el tamaño del hígado en respuesta a diferentes tipos de daño hepático (Figura 5) (Riehle et al, 2011; Michalopoulos 2013):

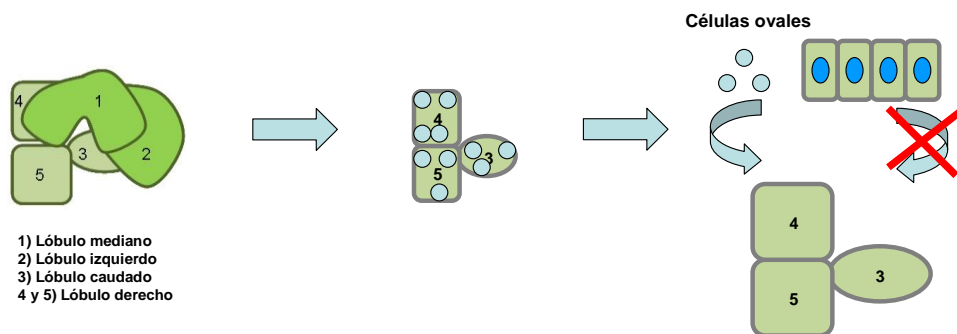
- En respuesta a una resección parcial (HP) o a un daño hepático agudo moderado, el tejido hepático perdido es reemplazado por la proliferación de las células maduras del hígado, principalmente hepatocitos. La técnica más utilizada para estudiar los mecanismos celulares y moleculares implicados en este fenómeno es la HP de 2/3 en roedores, que consiste en la eliminación quirúrgica del 70% de la masa hepática (Nevzorova et al, 2015).
- En respuesta a un fallo hepático fulminante o a un daño hepático crónico avanzado, el tejido hepático es reemplazado gracias a la activación de las células ovas.

Estas rutas de diferenciación restauran la masa hepática en determinadas enfermedades hepáticas crónicas o fulminantes.

**A. REGENERACIÓN HEPÁTICA TRAS UNA HEPATECTOMÍA PARCIAL DE 2/3**



**B. REGENERACIÓN HEPÁTICA CON SUPRESIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE HEPATOCITOS**



**Figura 5. Diagrama de dos modelos de regeneración hepática.** A. En la regeneración hepática tras una hepatectomía parcial (HP) de 2/3 en roedores, la eliminación de los dos lóbulos de mayor tamaño desencadena el crecimiento de los lóbulos hepáticos remanentes por proliferación de las células maduras del hígado mediante un mecanismo de hiperplasia compensatoria. El grado de hiperplasia es altamente regulado por las necesidades metabólicas, de forma que este proceso finaliza cuando el tamaño del hígado es proporcional al peso corporal. B. En la regeneración hepática en respuesta a un fallo hepático fulminante o un daño hepático crónico avanzado, la proliferación de los hepatocitos está impedida y son las células ovales las encargadas de restaurar la masa hepática.

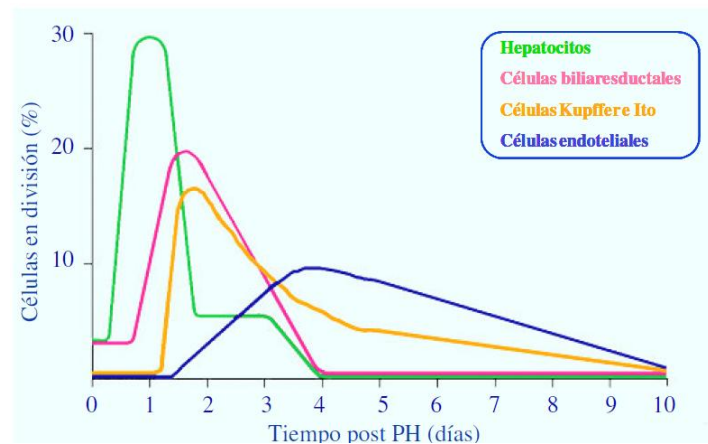
Tras la HP se activan una serie de cascadas de señalización en el hígado, y aproximadamente el 95% de los hepatocitos entran rápidamente en el ciclo celular (Stöcker E, Heine WD, 1971; Michalopoulos GK, DeFrances MC, 1997; Taub 2004).

La proliferación celular en el hígado se sucede en un orden cronológico y secuencial; primero se dividen los hepatocitos y, posteriormente, ocurre la replicación de las NPCs (Figura 6). En el

hígado de rata, la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) en hepatocitos comienza a aumentar a las 12 horas y alcanza su pico a las 24 horas tras una HP. Esta proliferación de los hepatocitos ocurre de forma bien sincronizada desde las áreas periportales a las áreas pericentrales del lobulillo (Rabes et al, 1976; Michalopoulos GK, DeFrances MC, 1997; Taub 2004; Michalopoulos 2007). Múltiples parámetros como la luz ambiental, la alimentación, la edad, la especie y otros, afectan a la duración del intervalo entre la HP y la síntesis de ADN en hepatocitos. A modo de ejemplo, el pico de síntesis de ADN en ratón ocurre entre las 36 y 48 horas tras la cirugía, mientras que en rata se produce más precozmente a las 24 horas de la misma (Michalopoulos GK, DeFrances MC, 1997; Taub 2004).

La proliferación de las células epiteliales biliares y de las células de Kupffer ocurre a las 48 horas, y la proliferación de células estrelladas y sinusoidales a los 2-4 días tras la HP, aumentando el tamaño de los lóbulos hepáticos remanentes (Figura 6) (Michalopoulos GK, DeFrances MC, 1997; Taub 2004; Michalopoulos 2007). La conexión entre los hepatocitos y el endotelio sinusoidal es necesaria para restaurar la estructura del hígado. Las células estrelladas se encargan de producir la matriz extracelular que restaura las conexiones entre el lecho vascular hepático y los cordones de hepatocitos. Finalmente, la restauración de la masa hepática se completa a los 5-7 días tras la cirugía en ratones y es un factor clave para que los hepatocitos puedan volver a alcanzar la fase G<sub>0</sub> del ciclo celular (Steer

1995; Michalopoulos GK, DeFrances MC, 1997; Taub 2004; Michalopoulos 2007).



**Figura 6. Representación de la cinética de la síntesis de ADN de los distintos tipos celulares presentes en el hígado de rata.** Cada tipo celular sintetiza ADN a distintos tiempos tras una HP. El pico de proliferación de los hepatocitos es a las 24 horas y el resto de células proliferan más tarde. Los hepatocitos en regeneración producen factores de crecimiento que pueden funcionar como mitógenos para el resto de células del hígado mediante un mecanismo paracrino. ADN: Ácido desoxirribonucleico, Imagen modificada de Michalopoulos GK, DeFrances MC, 1997.

La capacidad regenerativa del hígado es casi ilimitada. En un modelo de tirosinemia tipo I en el ratón, una enfermedad recesiva hepática causada por la deficiencia de la fumaril acetoacetato hidrolasa, el trasplante de hepatocitos corrigió el déficit metabólico. Cuando se aislaron los hepatocitos trasplantados, estos revirtieron el déficit enzimático en una segunda generación de ratones con tirosinemia tipo I e incluso se consiguió con estos hepatocitos rescatar a diez generaciones de ratones con esta enfermedad. Además, se ha estimado que un único hepatocito de rata tiene una gran capacidad clonogénica y es capaz de generar hasta 50 hígados de rata (Rhim et al, 1994; Grompe et al, 1998).

Estudios con resecciones hepáticas en animales superiores (perros y primates) y humanos han establecido que en la regeneración hepática existe una regulación estricta entre el volumen hepático y la superficie corporal, expresado como el índice hepático (relación peso del hígado/peso corporal x 100). Así, en experimentos con trasplante de hígados de perros grandes a perros pequeños, el tamaño del hígado trasplantado disminuyó hasta ser proporcional al nuevo peso corporal (Starzl et al, 1993; Francavilla et al, 1998). Estos estudios demuestran que la masa hepática es finamente regulada y que señales procedentes del organismo tienen efectos sobre el hígado hasta conseguir que éste alcance el tamaño adecuado.

El hígado es además uno de los órganos con mayor capacidad de mantener su integridad y responder a alteraciones del medio interno. Los hepatocitos son capaces de mantener sus funciones homeostáticas: síntesis de proteínas, factores de coagulación, detoxificación de xenobióticos, secreción de bilis y otras, mientras se están replicando. Resulta fascinante que puedan realizar estas funciones esenciales cuando, tras la HP de 2/3, sólo queda el 33% del órgano y el 90% de las células del hígado remanente están dividiéndose (Michalopoulos GK, DeFrances MC, 1997).

El estudio de la regeneración hepática ha demostrado que es un fenómeno complejo y bien orquestado, que permite al hígado restaurar cualquier pérdida de masa y ajustar su tamaño al del organismo, mientras que al mismo tiempo proporciona soporte completo para conseguir la homeostasis corporal. Estas propiedades han despertado

un gran interés en Biología Evolutiva en las últimas décadas y hacen que su comprensión sea útil para su posible uso con fines terapéuticos.

#### **1.4.- FASES DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA**

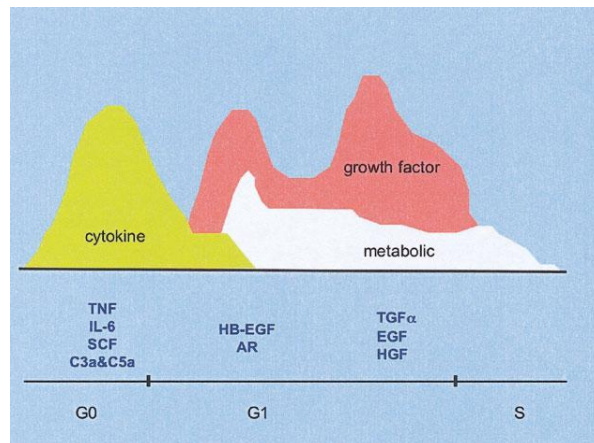
Una de las consecuencias inmediatas que se producen en la regeneración hepática tras una HP son los cambios hemodinámicos. Mientras que la cantidad de sangre arterial que va a los lóbulos remanentes es esencialmente la misma, la cantidad de sangre de la vena porta que va a cada lóbulo se triplica. La razón de este aumento es debido a que la HP de 2/3 reduce el hígado a un tercio de su tamaño original, pero continúa recibiendo el mismo flujo portal. Por este motivo, el flujo sanguíneo portal por hepatocito se triplica tras la HP (Michalopoulos 2007; Michalopoulos 2010; Debbaut et al, 2012; Michalopoulos 2013). Aunque todavía no está claramente definido el modo en que el hiperaflujo portal influye en la regeneración hepática, el aumento de la disponibilidad de factores circulantes parece jugar un papel importante en su inicio.

En 1967, Moolten y Bucher describieron que cuando se unía el sistema circulatorio de dos ratas, la HP de un miembro del par causaba la regeneración del hígado intacto del otro miembro. Este experimento mostró que existen factores de crecimiento en el plasma de ratas hepatectomizadas que tienen efectos mitogénicos sobre los hepatocitos de ratas normales. Desde entonces se han identificado múltiples citocinas, factores de crecimiento, hormonas y metabolitos que influyen

en el ciclo celular de los hepatocitos (Michalopoulos GK, DeFrances MC, 1997; Taub 2004; Böhm et al, 2010).

Es difícil probar que uno de estos factores sea imprescindible para la regeneración hepática, ya que ésta requiere la activación de múltiples rutas que no actúan de forma independiente. Estas rutas operan de forma simultánea y/o secuencial, pueden ocurrir en distintos tipos celulares, y están presentes en las distintas etapas de la regeneración.

Las rutas que operan en la regeneración hepática se han clasificado en tres tipos: citocinas, factores de crecimiento y redes metabólicas que son requeridas para que este proceso ocurra de forma eficiente (Figura 7). Existe una gran redundancia entre los componentes intracelulares de cada red, de forma que la eliminación de un gen individual rara vez supone una inhibición completa de la regeneración hepática (Fausto et al, 2006; Michalopoulos 2013). El desarrollo de ratones genéticamente modificados que sobreexpresan o tienen pérdida funcional de factores de crecimiento, citocinas o sus receptores ha resultado de gran ayuda para elucidar los eventos que tienen lugar en la regeneración hepática (Böhm et al, 2010).



**Figura 7. Citocinas, factores de crecimiento y redes metabólicas en la regeneración hepática.** Las citocinas aumentan rápidamente en el plasma tras una HP. Una vez que las células entran en la fase G1, los factores de crecimiento y metabolitos son esenciales para el desarrollo normal de la regeneración hepática. HP: Hepatectomía parcial Imagen obtenida de Fausto et al, 2006.

Fausto y cols. han propuesto dividir las rutas que comprenden los mecanismos moleculares y celulares de la regeneración hepática en tres fases (Fausto et al, 2006, Fausto N, Campbell JS, 2009):

- Fase inicial de “preparación” o “cebado”: paso de los hepatocitos quiescentes de la fase G<sub>0</sub> a la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, motivado por el efecto de determinadas citocinas.
- Fase de progresión: corresponde a la transición desde la fase G<sub>1</sub> hasta completar la mitosis (citocinesis). La progresión a través del ciclo celular requiere factores de crecimiento que permiten superar el punto de restricción de la fase G<sub>1</sub>.
- Fase de terminación: remodelación tisular y retorno a la fase G<sub>0</sub>.

#### **1.4.1.- Fase inicial de “preparación o cebado”**

Se ha descrito la activación de más de 100 genes de respuesta precoz inmediata durante la transición de los hepatocitos de la fase G<sub>0</sub> a la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular tras una HP (Haber et al, 1993; Su et al, 2002). La función de algunos de estos genes se relaciona con el ciclo celular mientras que el papel de otros no está claro (Taub 2004; Michalopoulos 2013). Entre estos genes se encuentran proto-oncogenes implicados en el crecimiento del cáncer como c-fos, c-myc y c-jun, responsables del inicio del ciclo celular. Estos cambios en la expresión génica liberan a los hepatocitos de la inhibición del crecimiento y les sirven para realizar ajustes específicos para llevar a cabo sus funciones esenciales mientras progresan en el ciclo celular (Steer 1995; Taub 2004; Michalopoulos 2007, Fausto N, Campbell JS, 2009).

En ratones, la fase de “preparación o cebado” tiene lugar principalmente en las primeras 4 horas tras una HP. La cronología de los principales eventos que ocurren en esta fase inicial de la regeneración hepática se resume en la Tabla 1. Uno de los cambios bioquímicos más tempranos es la activación de la uroquinasa o activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) que activa plasminógeno a plasmina. Esta activación desencadena una cascada proteolítica que sigue a la degradación de componentes específicos de la matriz extracelular (Kim et al, 1997). La matriz extracelular hepática contiene el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF) en su forma inactiva. La actividad uroquinasa es crucial para desencadenar la

degradación de la matriz extracelular y la liberación y activación de HGF, un potente mitógeno para los hepatocitos (Mars et al, 1995).

<b>TIEMPO TRAS LA HP</b>	<b>PRINCIPALES EVENTOS EN LA FASE INICIAL DE LA REGENERACIÓN</b>
<b>5-15 min</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Migración de <math>\beta</math>-catenina (Monga et al, 2001) y Notch (Köhler et al, 2004) al núcleo de los hepatocitos.</li> <li>➤ Incrementa la actividad de urokinasa (uPA)(Mars et al,1995).</li> </ul>
<b>30 min</b>	Activación de MMP9 (Kim et al, 2000) y NF $\kappa$ B (Yamada Y, Fausto N,1998).
<b>1h</b>	Activación de STAT3 (Cressman et al,1995) y de los receptores HGF (Stolz et al,1999) y EGF (Olsen et al,1985).
<b>1-3h</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Incremento de los niveles circulantes en plasma de HGF (Pediaditakis et al,2001), IL-6 (Cressman et al,1996), TNF (Yamada Y, Fausto N,1998), TGF<math>\beta</math> (Lamarre et al,1991), norepinefrina (Cruise et al,1985), ácidos biliares (Huang et al, 2006), serotonina (Lesurtel et al,2006) y ácido hialurónico (Michalopoulos GK, DeFrances MC,1997).</li> <li>➤ Liberación de HGF de la matriz extracelular (Mars et al, 1995).</li> </ul>

**uPA:** Activador del plasminógeno tipo uroquinasa. **MMP9:** Metaloproteinasa 9. **NF $\kappa$ B:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas. **STAT-3:** transductor de señal y activador de la transcripción 3. **HGF:** Factor de crecimiento de hepatocitos. **EGF:** Factor de crecimiento epidérmico. **IL-6:** Interleucina-6. **TNF:** Factor de necrosis tumoral. **TGF $\beta$ 1:** Factor de crecimiento transformante beta 1.

**Tabla 1.** Cronología de los principales eventos que ocurren en las etapas iniciales de la regeneración hepática tras una HP . Tabla adaptada de Michapoloulos 2007.

Otros eventos de señalización que ocurren rápidamente tras una HP es la migración de  $\beta$ -catenina y Notch al núcleo de los hepatocitos (Tabla 1). La participación de  $\beta$ -catenina y Notch en la regeneración hepática se apoya en estudios que han utilizado animales *Knock-out* (KO) y otras técnicas de manipulación genética así como la inhibición de la expresión de estas proteínas (Monga et al, 2001; Köhler et al, 2004; Tan et al, 2006; Michalopoulos 2013). La regeneración hepática también se ha relacionado con ligandos presentes en la circulación enterohepática como son los ácidos biliares, xenobióticos, lipopolisacárido (LPS) y componentes de la matriz extracelular (ácido hialurónico) (Tabla 1) (Cornell 1985; Cornell et al, 1990; Kim et al, 1997; Michalopoulos GK, DeFrances MC, 1997; Huang et al, 2006).

Factores de transcripción específicos son también activados rápidamente tras una HP, como por ejemplo el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF $\kappa$ B), el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT-3) y la proteína activadora 1 (AP-1) (Tabla 1). Estos factores son necesarios para la síntesis de “novo” de las proteínas reguladoras de la transición G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> y G<sub>1</sub>/S, resultando en la síntesis de ADN de los hepatocitos (Taub 2004; Fausto N, Campbell JS, 2009).

La activación de estos factores de transcripción inmediatamente después de una HP sugirió la idea de que las citocinas podrían regular la respuesta regenerativa (Taub 1999, Fausto 2000), ya que los niveles circulantes del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) y de la interleucina-6 (IL-6) aumentan rápidamente tras una HP (Tabla 1). Estas dos

citocinas junto con el óxido nítrico (NO) (Tabla 2) inician la fase de preparación o cebado de los hepatocitos (transición G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> en el ciclo celular) induciendo la expresión de genes de respuesta precoz inmediata en los hepatocitos. Además de la regeneración hepática, estos genes promueven en el hígado la respuesta de fase aguda y la protección frente al daño mediado por tóxicos hepáticos (Taub et al, 1999; Fausto et al, 2006; Fausto et al, 2012; Michalopoulos 2013). Como consecuencia de la inducción orquestada por estas citocinas, los hepatocitos se vuelven más sensibles a factores de crecimiento y, por tanto, más competentes para la replicación (Diehl AM, Rai RM, 1996; Fausto et al, 2006; Jia 2011).

<b>FACTORES QUE AFECTAN EN EL INICIO DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA</b>		
<b>FACTORES</b>	<b>DIANA</b>	<b>REFERENCIAS</b>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	TNF- $\alpha$ $\rightarrow$ Aumenta STAT-3 y NF $\kappa$ B $\rightarrow$ Activación de genes $\rightarrow$ Aumenta la susceptibilidad de los hepatocitos a factores de crecimiento.	Libermann TA, Baltimore D, 1990 Diehl AM, Rai RM, 1996 Yamada et al,1998
<b>IL-6</b>	IL-6 $\rightarrow$ Aumenta STAT-3 y ERK $\rightarrow$ Activación de genes $\rightarrow$ Mitosis $\rightarrow$ Aumenta la susceptibilidad de los hepatocitos a HGF. IL-6 $\rightarrow$ Supervivencia de los hepatocitos $\rightarrow$ Inhibición de caspasas.	Cressman et al,1996 Diehl AM, Rai RM, 1996 Li et al, 2002 Haga et al, 2003
<b>NO</b>	NO $\rightarrow$ Protección frente a apoptosis $\rightarrow$ Descenso de la actividad apoptótica de TNF- $\alpha$ a través de caspasa-3	Zeini et al, 2005

**TNF- $\alpha$** : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . **STAT-3**: transductor de señal y activador de la transcripción 3. **NF $\kappa$ B**: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas. **IL-6**: Interleucina-6. **ERK**: kinasas reguladas por señales extracelulares. **HGF**: Factor de crecimiento de hepatocitos. **NO**: Óxido nítrico.

**Tabla 2.** Principales factores en la fase inicial de la regeneración hepática.

La red de citocinas se inicia cuando TNF $\alpha$  se une al receptor de TNF tipo 1 (TNFR1) en las células de Kupffer. Esta unión desencadena la activación de NF $\kappa$ B, la producción de IL-6 por parte de los macrófagos del hígado y la activación de STAT-3 en hepatocitos (Libermann TA, Baltimore D, 1990; Fausto et al 2006; Jia 2011). STAT-3 induce la transcripción de un gran número de genes diana, como por ejemplo del supresor de la señalización por citocinas 3 (SOCS-3). Esta proteína ejerce un feed-back negativo, inhibiendo la fosforilación de STAT-3 y bloqueando la señalización de IL-6 (Figura 8) (Campbell et al, 2001).

La señalización por TNF- $\alpha$  es requerida para una normal respuesta proliferativa, como se ha demostrado con el uso de animales KO para TNFR1 (TNFR1-/-). Estos animales presentan una deficiente activación de NF- $\kappa$ B y de STAT-3 y un retraso en la regeneración hepática tras la HP, sugiriendo que la señalización por NF $\kappa$ B en las células de Kupffer es un elemento crucial en la respuesta a las citocinas (Yamada et al, 1997,1998).

Tras la liberación de TNF- $\alpha$ , la activación de NF $\kappa$ B en las células de Kupffer pone en marcha la transcripción y liberación de IL-6. El retraso en la regeneración hepática observada en los ratones KO para

TNFR1 (TNFR1<sup>-/-</sup>) parece ser mediado por IL-6, ya que el tratamiento con IL-6 corrige el defecto en la síntesis de DNA en estos ratones (Fujita et al, 2001). Sin embargo, los ratones KO para TNF $\alpha$  no presentan un retraso en la regeneración hepática (Fujita et al, 2001; Hayashi et al, 2005). Estos datos abren el debate sobre el papel preciso de cada citocina al inicio del proceso regenerativo y sugieren que TNF $\alpha$  puede no ser esencial para este proceso ya que otros ligandos como la linfotoxina alfa pueden activar también el TNFR1 (Knight B, Yeoh GC, 2005; Fausto et al, 2006; Böhm et al, 2010).

El papel de la IL-6 en la regeneración hepática es particularmente difícil de definir. Estudios en ratones con déficit de *Il-6* o de *Stat3* sugieren que hasta un 40% de los genes de respuesta precoz inmediata que son activados durante la regeneración hepática son regulados por IL-6 (Taub et al, 1999; Li et al, 2001; Fausto et al, 2006). Estos datos apoyan un papel relevante de la IL-6 en el inicio del proceso regenerativo.

Estudios con animales KO para el gen de la IL-6 (IL-6<sup>-/-</sup>) establecieron una función proliferativa para esta citocina durante la regeneración hepática, ya que la proliferación de los hepatocitos tras una HP estaba retrasada en los animales carentes de IL-6 (Cressman et al, 1996; Taub et al, 1999; Fausto et al, 2006; Böhm et al, 2010). Sin embargo, otros estudios en el mismo ratón observaron que algunos ratones KO para IL-6 no mostraban un retraso en la proliferación de los hepatocitos y que presentaban una regeneración hepática normal (Blindenbacher et al, 2003). Estos resultados sugieren que el efecto de

la IL-6 no es esencial para la regeneración hepática. Datos posteriores han sugerido que la IL-6 tiene efectos anti-apoptóticos y que promueve la supervivencia de los hepatocitos (Sakamoto et al, 1999; Blindenbacher et al, 2003; Wuestefeld et al, 2003). A la vista de estos resultados, parece que la IL-6 induce una respuesta adaptativa tras la HP que es requerida para la supervivencia de los hepatocitos, y que el nivel exacto de esta citocina tras una HP podría ser un factor crítico en determinar sus efectos (Blindenbacher et al, 2003; Zimmers TA, Pierce RH, et al, 2003).

El factor de células madre (SCF) y la oncostatina M (OSM) son dos moléculas que pueden aumentar los efectos de la IL-6 durante la regeneración hepática. SCF restaura el defecto en la proliferación de los hepatocitos observado en ratones KO para IL-6 tras una HP. Este factor es inducido por IL-6 y podría mediar los efectos mitogénicos de esta citocina en la regeneración hepática (Ren et al, 2003) (Figura 8). Otro mediador aguas abajo de la IL-6 es la OSM. Esta citocina es también importante en la regeneración hepática ya que se ha demostrado que la administración de OSM puede corregir la regeneración hepática tras daño hepático inducido por tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) en ratones KO carentes de IL-6 (Nakamura et al, 2004). Los efectos de estas citocinas (IL-6, SCF, OSM) son en parte redundantes porque todas ellas pueden activar STAT-3 en los hepatocitos y promover la expresión de múltiples genes importantes para la regeneración hepática (Fausto et al, 2006; Böhm et al, 2010).

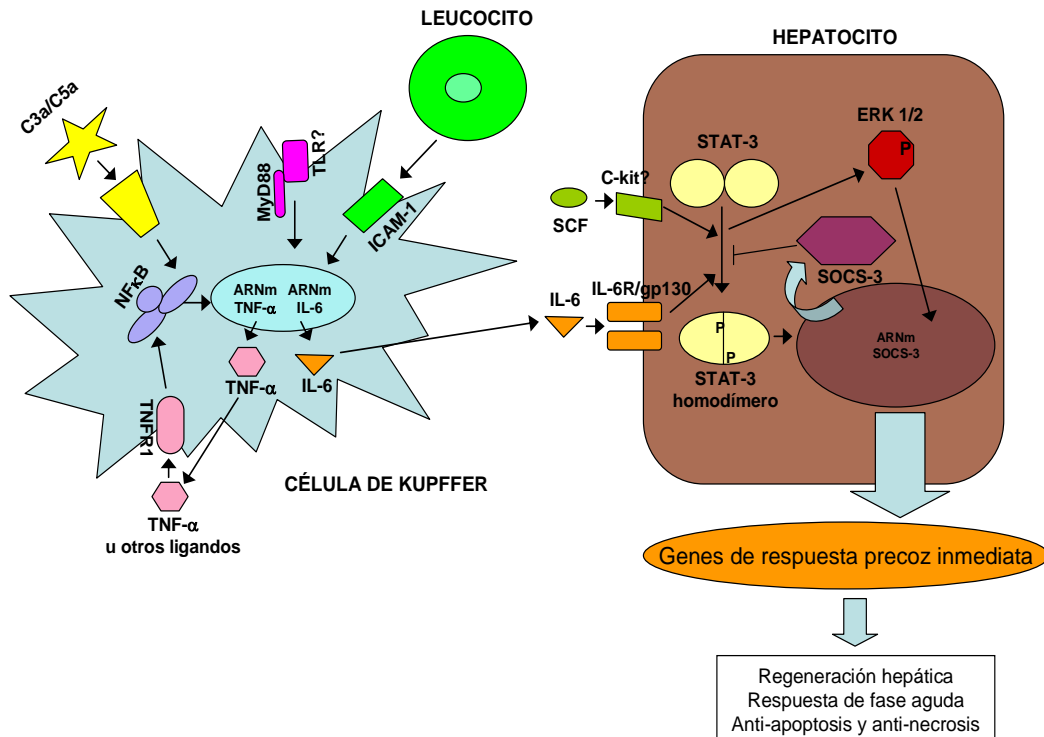
El sistema inmune innato es responsable en parte de la producción de TNF $\alpha$  y de IL-6 por las células de Kupffer. LPS es liberado por las bacterias del intestino a la circulación portal (Cornell 1985) e interacciona con receptores tipo *Toll* (TLR) en las células de Kupffer. Dicha unión activa múltiples rutas de señalización intracelulares, muchas de las cuales son dependientes del factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88), una proteína adaptadora que media la señalización intracelular de varios TLRs (Akira et al, 2001) (Figura 8).

En estudios iniciales en ratas con una producción restringida de LPS, se observó un retraso en la regeneración hepática tras una HP (Cornell et al, 1990). Sorprendentemente, estudios posteriores en ratones con deficiencia (KO) de distintos TLRs encontraron una activación normal de citocinas y una correcta regeneración tras una HP. En los ratones KO para MyD88 (myd88 $^{-/-}$ ), sin embargo, la activación de TNF $\alpha$ , de IL-6 y de STAT-3 estaba prácticamente bloqueada tras la HP (Seiki et al, 2005; Campbell et al, 2006; Fausto et al, 2006). Aunque el LPS se ha considerado un factor clave en el inicio de la regeneración hepática, actualmente se desconoce cuál es el ligando y el receptor que señala a través de MyD88 para iniciar la cascada de citocinas que se produce precozmente tras una HP.

Otro componente del sistema inmune innato que parece ser importante al inicio de la regeneración hepática es la cascada del complemento. Así, ratones KO para la fracción C3 (C3 $^{-/-}$ ) y la fracción C5 (C5 $^{-/-}$ ) del complemento presentaron un déficit en la regeneración hepática tras una HP. En dichos animales se encontró una reducción

de los niveles de TNF $\alpha$  y de IL-6, y una menor activación de los factores de transcripción NF $\kappa$ B y STAT-3 (Strey et al, 2003; Leslei 2012). Además, se encontró que la administración de un antagonista del receptor C5a producía un retraso en la proliferación de los hepatocitos (Mastellos et al, 2001), y que la fracción C3a inducía la síntesis de IL4 en linfocitos y estimulaba la síntesis de las proteínas del complemento y de IL-6 por las células de Kupffer en el inicio de la regeneración hepática (Figura 8) (DeAngelis et al, 2012). Estos datos, por tanto, apoyan un papel del complemento en la fase inicial de cebado de los hepatocitos. El sistema del complemento es el componente humoral más rápido para reconocer el daño tisular e iniciar la respuesta de reparación tisular. Las funciones reparadoras y tróficas de este sistema han suscitado, por ese motivo, un gran interés en el campo de la regeneración tisular (Mastellos et al, 2001; DeAngelis et al, 2012).

Finalmente, la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) es otro componente clave en la inducción de TNF $\alpha$  e IL-6 en las células de Kupffer. En animales KO para ICAM-1 (ICAM-1 $^{-/-}$ ), se observaron menores niveles de TNF $\alpha$  e IL-6 y una alteración severa de la regeneración hepática, sugiriendo que la activación de ICAM-1 por leucocitos en la fase inicial de la regeneración es requerida para la producción de estas citocinas por las células de Kupffer (Figura 8) (Selzner et al, 2003).



**Figura 8. Cascada de señalización de citocinas al inicio de la regeneración hepática.** Las células de Kupffer interactúan con los hepatocitos mediante la producción de citocinas que ejercen efectos paracrinos (otras NPCs podrían estar también implicadas). Los miembros de la cascada del complemento (C3a/C5a), la activación de MyD88 por ligandos como LPS a través de TLRs y la activación de ICAM-1 por leucocitos, inducen la expresión de TNF-α e IL-6 por las células de Kupffer tras una HP. La unión de TNF-α a su receptor (TNFR1) en las células de Kupffer aumenta la expresión de IL-6, la cual es liberada al suero para unirse a su receptor (IL-6R) en el hepatocito. IL-6 e IL-6R interactúan con dos subunidades de la glicoproteína 130 (gp130) en el hepatocito. Esta unión resulta en la fosforilación de los monómeros de STAT-3. Fosfo-STAT-3 dimeriza y se trasloca al núcleo donde media la transcripción de genes diana, incluyendo Socs3 que inhibe la fosforilación de STAT-3. SCF puede activar también a STAT-3 tras una HP. En paralelo a la fosforilación de STAT-3, la activación de gp130 conduce a la activación de la cascada de señalización de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) que implica la fosforilación de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2) y la regulación de múltiples genes importantes para la regeneración. NPCs: Células no parenquimatosas; MyD88: Factor de diferenciación mieloide 88; LPS: Lipopolisacárido; TLRs: Receptores tipo toll; ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1; TNF-α: Factor de necrosis tumoral α; IL-6: Interleucina-6; HP: Hepatectomía parcial; TNFR1: receptor de TNF tipo 1; IL-6R: Receptor de IL-6; Gp130: Glicoproteína 130; STAT-3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3; SOCS-3: Supresor de la señalización por citocinas 3; SCF: Factor de células madre; MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos; ERK: quinasas reguladas por señales extracelulares.

### 1.4.2.- Fase de progresión

La fase de progresión comprende desde la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular hasta la división celular. Esta es regulada por factores de crecimiento como HGF, EGF, factor de crecimiento endotelio-vascular (VEGF) y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF-α). Estos factores de crecimiento junto con co-mitógenos como norepinefrina y factores

potenciadores como la insulina, inducen a los hepatocitos a superar el punto de restricción presente al final de la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular y a progresar en la síntesis de ADN. La función de los factores de crecimiento es activar a los complejos de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que inician y promueven los cambios del ciclo celular: duplicación del huso mitótico y la replicación del ADN en la fase S del ciclo celular (Albrecht et al, 1993; Fausto 2000; Serandour et al, 2005; Fausto et al, 2006; Jia 2011).

Los efectos de los factores de crecimiento en la regeneración hepática están mediados por sus receptores. De forma similar a las citocinas, la mayoría de los factores de crecimiento transmiten la señal mitógena al núcleo a través de receptores de membrana y citoplasmáticos, induciendo la expresión de genes de respuesta precoz inmediata pro-proliferativos como c-fos, c-jun y c-myc (Locker et al, 2003; Fausto et al, 2012; Michalopoulos 2013).

HGF y la familia de ligandos que se unen al receptor de EGF (EGFR) son factores de crecimiento importantes en la regulación de la progresión del ciclo celular durante la regeneración hepática (Michalopoulos GK, Khan Z, 2005). HGF desempeña su actividad a través de la activación del receptor tirosina kinasa c-Met (Benvenuti S, Comoglio PM, 2007). La señalización generada por este receptor ejerce una variedad de funciones celulares en múltiples tejidos. Entre las principales funciones destacan sus efectos mitogénicos, morfogénicos y motogénicos (Nakamura et al, 1989; Fausto et al, 2006; Michalopoulos 2013).

El receptor c-Met está presente en células epiteliales y mesenquimales. Es un receptor multifuncional ya que su activación desencadena la inducción de la cascada de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) pero además es capaz de formar dímeros con otros receptores como el receptor de insulina. Esta unión contribuye a regular varios procesos metabólicos en hepatocitos y otros tipos celulares (Fafalios et al, 2011; Michalopoulos 2013).

HGF es capaz de señalizar a través de otros receptores como las quinasas tipo Janus que activan a factores de transcripción como STAT-3, NFκB y β-Catenina. La unión de HGF con c-Met fosforila la β-Catenina, lo cual promueve su traslocación al núcleo y la expresión de Ciclina D que es necesaria para la transición G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> del ciclo celular (Stolz et al, 1999; Comoglio 2001; Fausto N, Campbell JS, 2009; Michalopoulos 2013).

La síntesis de HGF es llevada a cabo por NPCs del hígado y actúa sobre los hepatocitos de forma paracrina (Schirmacher et al, 1993, LeCouter et al, 2003). El aumento de los niveles en plasma de HGF es uno de los eventos que tiene lugar en las primeras horas tras una HP (Tabla1) (Pediatakis et al, 2001). No está claro si el efecto de HGF sobre los hepatocitos es mediado por el aumento de HGF circulante o es debido a la activación de HGF almacenado de forma inactiva en la matriz extracelular (Mars et al, 1995; Michalopoulos 2013). Además, HGF es sintetizado en otros órganos extrahepáticos (pulmón, riñón y bazo) tras una HP, lo que apoya su efecto endocrino (Michalopoulos 2007; Nakamura et al, 2011; Michalopoulos 2013) (Figura 9).

Probablemente, sea necesaria la combinación de las distintas formas de producir HGF para conseguir el efecto de este factor de crecimiento sobre los hepatocitos.

La delección sistémica del gen HGF o c-Met conlleva letalidad en estado embrionario (Schmidt et al, 1995; Burr et al, 1998; Padiaditakis et al, 2001; Borowiak et al 2004; Huh et al, 2004). Para poder estudiar las funciones de HGF y su receptor en la regeneración hepática se han generado ratones con deficiencia del receptor c-Met exclusivamente en el hígado. El primer estudio con estos ratones demostró que la señalización HGF/c-Met era esencial para la entrada en el ciclo celular y la regeneración tras una HP, y que era responsable de la activación de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2) (Borowiak et al 2004; Fausto et al, 2006; Böhm et al, 2010). En un segundo estudio con estos ratones KO condicionales para c-Met en el hígado, se observó que la señalización HGF/c-Met era importante para promover hepatoprotección frente apoptosis en el hígado dañado (Huh et al, 2004).

Parte de los efectos de HGF están mediados por la activación de TGF- $\alpha$ , otro factor de crecimiento que desempeña su actividad mediante la unión al receptor EGFR (Gherardi E, Stoker M, 1990). Este receptor tiene una cinética semejante a c-Met con un pico de activación en la primera hora tras una HP (Stolz et al, 1999; Natajaran et al, 2007) que culmina con la inducción aguas abajo de MAPK (Figura 9) (Michalopoulos 2013).

La inhibición de EGFR resultó en el fallecimiento de 1/3 de los animales tras la realización de una HP, y los que sobrevivieron mostraron un retraso en la proliferación de los hepatocitos, probablemente relacionado con un retraso en la inducción de ciclina D1 (Natajara et al, 2007). Sin embargo, finalmente tenía lugar la regeneración completa del hígado. Esto sugiere que la señalización de EGFR es importante pero no esencial para la regeneración hepática (Böhm et al, 2010).

La familia de ligandos de EGFR que se sobreexpresan tras una HP incluye a EGF, TGF- $\alpha$ , el factor semejante al EGF ligado a la heparina (HB-EGF) y la amfiregulina (AR) (Michalopoulos 2007). EGF fue el primer ligando estudiado de EGFR. Este factor es mitógeno para los hepatocitos en cultivo (McGowan JA et al, 1981), y se ha observado que la infusión del mismo en ratas desencadena la síntesis de ADN en hepatocitos (Bucher et al, 1977). EGF es producido en múltiples sitios, incluyendo las glándulas salivares y las glándulas de Brunner del duodeno, desde donde llega al hígado a través de la circulación portal (Olsen et al, 1985) (Figura 9). La eliminación de las glándulas salivares a ratones que posteriormente fueron sometidos a una HP resultó en un retraso en la proliferación de los hepatocitos. Este fenotipo fue rescatado tratando con EGF recombinante a los ratones (Noguchi et al, 1991).

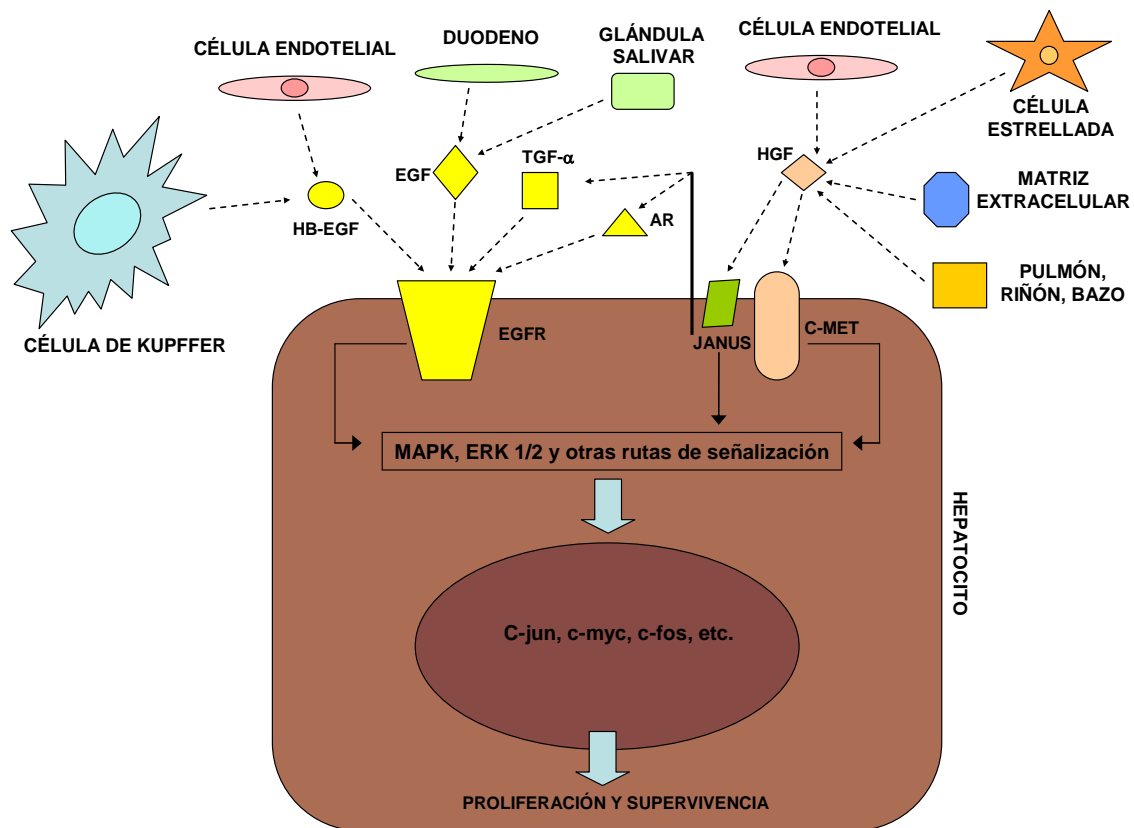
TGF- $\alpha$  es producido por los hepatocitos durante la regeneración hepática (Webber et al, 1993) (Figura 9). Este descubrimiento condujo a la idea de que podría actuar como un factor autocrino que dirigiría la

respuesta regenerativa (Mead JE, Fausto N, 1989). Sin embargo, los niveles de TGF- $\alpha$  aumentan a las 20 horas de iniciarse el ciclo celular en los hepatocitos y los ratones KO para TGF- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ -/-) presentan una regeneración hepática normal (Russel et al, 1996). Estos resultados sugieren que TGF- $\alpha$  podría ser en realidad una señal paracrina por la cual los hepatocitos estimulan la proliferación de las células adyacentes (Michalopoulos 2013), y que no es un factor indispensable en la regeneración hepática debido a la compensación por otros ligandos de EGFR (Fausto et al, 2006).

HB-EGF a diferencia de EGF y TGF- $\alpha$ , es producido por las células endoteliales y de Kupffer (Figura 9). En estudios con ratones KO para HB-EGF (HB-EGF-/-) se observó un retraso en la proliferación de los hepatocitos, aunque esta deficiencia fue parcialmente compensada por una sobrerregulación de TGF- $\alpha$  (Mitchell et al 2005). AR, proteína similar a TGF- $\alpha$ , es producida por los hepatocitos tras una HP (Figura 9). Animales con deficiencia del gen de AR (AR-/-) mostraron una alteración en la respuesta regenerativa tras una HP (Berasain et al, 2005).

La complejidad de la señalización de EGFR parece ser atribuible a los distintos ligandos para este receptor implicados en la regeneración hepática. Estos ligandos tienen funciones independientes pero parcialmente solapantes en el proceso regenerativo. La diversidad de la señalización de EGFR y c-Met es debido a la activación de numerosas rutas de señalización que regulan factores de transcripción implicados

en la regeneración hepática y cascadas metabólicas. Una de las cascadas de señalización particularmente relevante, ya que integra la señalización de citocinas y de factores de crecimiento, es la cascada que resulta en la activación de ERK 1/2 (Fausto et al, 2006) (Figura 9).



**Figura 9. Cascada de señalización de factores de crecimiento en la regeneración hepática.** Durante la regeneración hepática, EGFR es activado de manera autocrina por AR y TGF- $\alpha$ , de forma paracrina por HB-EGF producido por las células de Kupffer y células endoteliales, y de manera endocrina por EGF secretado por las glándulas salivares y las glándulas de Brunner en el duodeno. De forma similar, c-Met es activado de forma paracrina por HGF producido por las células estrelladas y células endoteliales o la matriz extracelular, y de manera endocrina por HGF secretado por el pulmón, riñón y bazo. Además, HGF puede activar a otros receptores tipo Janus. La activación de todos estos receptores induce numerosas rutas de señalización que regulan factores de transcripción implicados en la regeneración hepática, permitiendo la proliferación de los hepatocitos y su supervivencia tras una HP. EGFR: Receptor del EGF; AR: Amfiregulina; TGF- $\alpha$ : Factor de crecimiento transformante alfa; EGF: Factor de crecimiento epidérmico; HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos; HP: Hepatectomía parcial.

### 1.4.3.- Interacciones entre citocinas y factores de crecimiento

Las redes de citocinas y factores de crecimiento no actúan de forma independiente en la regeneración hepática, sino que interactúan durante las distintas fases del proceso regenerativo. Muchas de estas

redes son solapantes y esto hace que la eliminación de una ruta de señalización no impida que la regeneración hepática se lleve a cabo.

Un ejemplo de interacción entre citocinas y factores de crecimiento es la activación de metaloproteinasas (MMPs) por citocinas como TNF (Fausto et al, 2006). TNF puede activar a una MMP denominada TACE (enzima que convierte TNF) (Figura 10) y como consecuencia de esta activación, se desencadena la liberación de TGF- $\alpha$ , que al unirse al receptor EGFR promueve la activación de la cascada de señalización de ERK 1/2 (Argast et al, 2004). Además, la unión de TNF a su receptor también activa NF- $\kappa$ B y AKT (proteína kinasa B), estimulando la producción de citocinas y supervivencia celular. Por lo tanto, la cooperación entre citocinas (TNF) y factores de crecimiento (ligandos de EGFR) activa rutas necesarias para la supervivencia, crecimiento y proliferación de hepatocitos (Fausto et al, 2006).

Otro punto de intersección entre factores de crecimiento (HGF) y citocinas (TNF- $\alpha$ -IL-6) podría ser la regulación de factores de transcripción como la AP-1, implicada en la activación de proteínas que participan en proliferación celular (Behrens et al, 2002). IL-6 y HGF también interactúan en la regulación del gen de la proteína de unión al factor de crecimiento parecido a la insulina 1 (IGFBP1) (Taub 2004). Este gen codifica una proteína con funciones hepatoprotectoras y promitogénicas que es regulada por IL-6 en estudios *in vivo* (Leu et al, 2001) y por HGF en estudios *in vitro* (Weir et al, 1994).

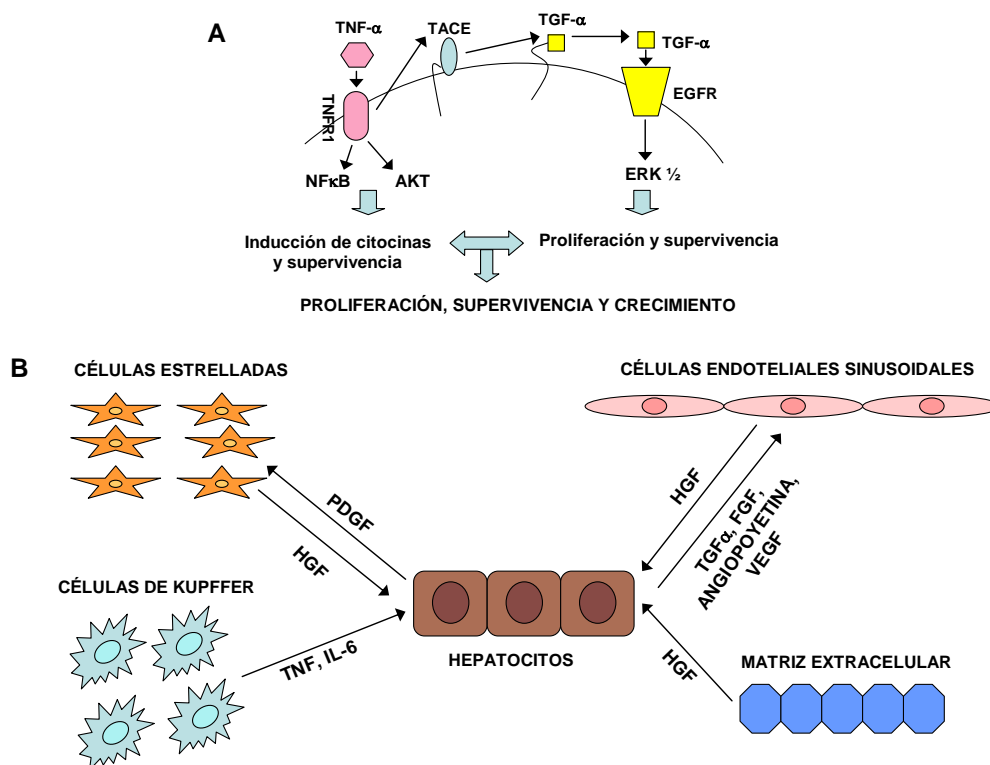
La producción de factores de crecimiento y citocinas por los distintos tipos celulares del hígado permite que se establezca un

complejo patrón de interacciones entre estas células en las distintas fases de la regeneración hepática. Estas interacciones permiten que el hígado restaure su masa hepática inicial y alcance la homeostasis corporal (Taub 2004; Fauto et al, 2006; Michalopoulos 2007).

Los hepatocitos son las primeras células que proliferan en función de una serie de estímulos externos como HGF que llega a los hepatocitos por remodelación de la matriz extracelular o a través de la síntesis de novo de este factor por células estrelladas o endoteliales a las 3 horas tras una HP (Mars et al, 1995; Michalopoulos 2013) (Figura 10.A). Además, los hepatocitos reciben estímulos para proliferar de otras células, como el TNF y la IL-6 producidas por las células de Kupffer. Como se comentó anteriormente, se piensa que estas citocinas promueven la activación de NF- $\kappa$ B y STAT-3 en las fases iniciales de la regeneración hepática y, como consecuencia, los hepatocitos son capaces de pasar de la fase G<sub>0</sub> a la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular.

Los hepatocitos, a su vez, también liberan factores que son mitógenicos para NPCs (Figura 10.B). En este sentido, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), producido por los hepatocitos, actúa de forma paracrina en células estrelladas (Pinzani 2002), y otros factores producidos por los hepatocitos como VEGF, el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), SCF, angiopoyetina y TGF- $\alpha$  actúan como mitógenos para las células endoteliales (Ross et al, 2001; Sato et al, 2001; Yu et al, 2003; Shimizu et al, 2005; Papastefanou et al, 2007). La proliferación de las células endoteliales es necesaria para restaurar la red de sinusoides en la regeneración hepática, y es posible

que las células endoteliales atraídas por VEGF penetren en los cordones recién formados de hepatocitos para restablecer la red sinusoidal (Michalopoulos 2007). La administración de VEGF a animales indujo la proliferación de células endoteliales y de hepatocitos, aunque VEGF no es mitogénico para los hepatocitos en cultivo. Esta proliferación de los hepatocitos podría ser debida a que la unión de VEGF (producido por los hepatocitos) a su receptor en las células endoteliales desencadena en las mismas la producción de HGF. Este escenario confirmaría que los hepatocitos y las células endoteliales establecen una red de producción de factores de crecimiento para estimular mutuamente su proliferación (LeCourter et al, 2003).



**Figura 10. Interacción entre citocinas y factores de crecimiento en la regeneración hepática.** A. Mecanismo de activación de EGFR a través de TACE. TNF se une a su receptor y activa NF- $\kappa$ B y AKT. Esta activación promueve la inducción de rutas de supervivencia y de citocinas. TNF, a su vez, también activa a TACE, desencadenando la liberación de TGF- $\alpha$  que se une a su receptor y promueve la activación de la cascada de ERK 1/2. La cooperación entre

factores de crecimiento y citocinas activa rutas necesarias para el crecimiento, supervivencia y proliferación de hepatocitos. B. Interacciones entre los distintos tipos celulares hepáticos durante la regeneración hepática. La proliferación de los hepatocitos es estimulada por factores de crecimiento y citocinas liberados por NPCs. Para restaurar la masa hepática inicial, estas células son también inducidas a replicarse por la liberación de factores de crecimiento por parte de los hepatocitos. EGFR: Receptor del EGF; TACE: Enzima que convierte TNF; TNF: Factor de necrosis tumoral; NFκB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; AKT: Proteína quinasa B; TGF- $\alpha$ : Factor de crecimiento transformante alfa; ERK: Quinasas reguladas por señales extracelulares; NPCs: Células no parenquimatosas.

### **1.4.4.- Fase de terminación**

La regeneración hepática termina con la restauración de la masa hepática inicial necesaria para realizar las funciones hepáticas. Al contrario que los estímulos iniciadores, las señales que determinan el final de la regeneración hepática no han sido tan intensamente estudiadas. Este hecho es sorprendente ya que el índice hepático es una de las propiedades más reguladas, que requiere un control estricto del cese del ciclo celular y una remodelación del tejido recién formado (Taub 2004; Jia 2011; Michalopoulos 2013).

El crecimiento de los hepatocitos está controlado por un balance entre factores que promueven y factores que inhiben el crecimiento. En este sentido, se han estudiado varios mediadores que inhiben directa o indirectamente el proceso regenerativo. Aunque la mayoría de los estudios se han centrado en los miembros de la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), el cese de la regeneración también se ha relacionado con factores que regulan rutas de señalización de citocinas o de factores de crecimiento y que podrían regular el tamaño del hígado. Entre estos factores destaca SOCS-3 (Taub 2004; Jia 2011; Michalopoulos 2013).

TGF- $\beta$  comprende una familia de citocinas (TGF- $\beta$  1-3) que ejercen sus funciones mediante la activación de receptores transmembrana tipo I y II que activan a reguladores de la transcripción, como las proteínas SMAD (del inglés small mothers against decapentaplegic), que ejercen su función mediante su traslocación al núcleo. (Shi Y, Massague J, 2003; Brown et al, 2007; Moustakas A, Heldin CH, 2009).

TGF- $\beta$  es un potente inhibidor del crecimiento para células epiteliales como los hepatocitos (Houck KA, Michalopoulos GK, 1989). Este factor es producido por las células estrelladas (Ikeda et al, 1998) y su aumento se ha relacionado con la producción de fibrosis hepática y cirrosis (Cain K, Freathy C, 2001). Aunque la expresión de este factor aumenta precozmente tras una HP, los hepatocitos son capaces de proliferar por una resistencia transitoria de los mismos a este factor, la cual podría ser debida a una disminución de la expresión de los receptores de TGF- $\beta$  y a una sobreexpresión de sus inhibidores. Tras la síntesis de ADN, dicha resistencia remite y los hepatocitos recuperan la sensibilidad a TGF- $\beta$ , el cual inhibe la proliferación celular y contribuye al cese de la regeneración (Figura 11) (Chari et al, 1995; Nishikawa et al, 1998; Macias-Silva et al, 2002).

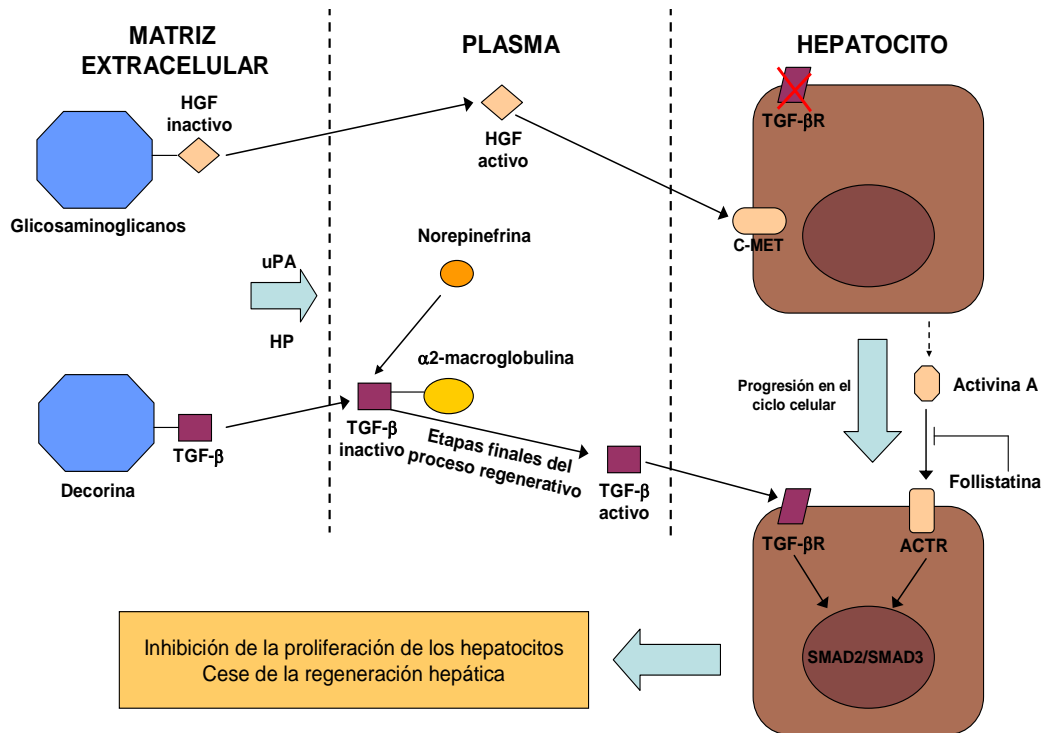
Además de la disminución de receptores de TGF- $\beta$ , existen otras posibles explicaciones de la resistencia de los hepatocitos al efecto de dicha citocina. Así, el aumento de los niveles de norepinefrina al inicio del proceso regenerativo (Tabla 1) también podría contribuir a la

resistencia de los hepatocitos proliferantes a TGF- $\beta$  (Houck et al, 1988). Otros estudios han mostrado que TGF- $\beta$  se une a decorina que es una proteína presente en la matriz extracelular del hígado (Dudas et al, 2001; Michalopoulos 2010). Dicha unión sugiere que la liberación de TGF- $\beta$  al plasma está relacionada con la remodelación de la matriz extracelular que tiene lugar al inicio del proceso regenerativo. Además, otros estudios han mostrado que TGF- $\beta$  en plasma se une a alfa-2 macroglobulina y esta unión podría ser un mecanismo efectivo para eliminar la disponibilidad de TGF- $\beta$  para los hepatocitos que van a proliferar (Webb et al, 2000). Los hepatocitos en la fase G<sub>0</sub> del ciclo están expuestos a la influencia de factores circundantes y, en este escenario, la remodelación de la matriz extracelular por la uroquinasa podría resultar en la liberación/activación de HGF y en la liberación e inactivación de TGF- $\beta$  por alfa-2 macroglobulina. Este desequilibrio permitiría que los hepatocitos pasaran de la fase G<sub>0</sub> a la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular (Michalopoulos 2013).

La sobreexpresión de TGF- $\beta$  en ratones transgénicos resultó en un retraso de la proliferación celular (Russel et al, 1988; Bouzahzah et al, 2000). Los ratones KO condicionales del receptor II de TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$  RII -/-) (TGF- $\beta$  RII-/-) en hepatocitos, sin embargo, presentaron una aceleración de la proliferación de los hepatocitos, pero no existieron diferencias en el cese de la regeneración frente a animales control, posiblemente debido a la existencia de otras vías inhibitorias de la síntesis de ADN como por ejemplo las activinas (Oe et al, 2004).

Las activinas son otros miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$ . La más conocida es la activina A (Werner S, Alzheimer C, 2006), que es producida por los hepatocitos y que puede tener un efecto autocrino (Michalopoulos 2013). La activina A es un factor pro-apoptótico de los hepatocitos que induce la activación de SMAD de forma similar a TGF- $\beta$  a través de sus receptores de tipo I y tipo II. Así, la administración de follistatina, un antagonista del receptor de la activina A, provocó un aumento de la síntesis de ADN en hepatocitos (Kogure et al, 2000; Oe et al, 2004). Estos resultados apoyan que la activina A es un inhibidor de la proliferación y un posible regulador del final de la regeneración (Böhm et al, 2010).

Activina A y TGF- $\beta$  se consideran que ejercen funciones complementarias (Figura 11). En ratones KO para el receptor II de TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$  RII-/-) se encontró un aumento de la expresión de activina A y de su receptor de tipo II. Este hallazgo indica una actividad compensatoria para activina A en ausencia de la señalización de TGF- $\beta$ , que permite que el cese de la regeneración tenga lugar (Oe et al, 2004). Estos resultados sugieren que activina y TGF- $\beta$  colaboran para inducir el fin de la proliferación de los hepatocitos, aunque otros factores adicionales también podrían contribuir (Böhm et al, 2010).



**Figura 11. Interacciones entre TGF-β y HGF al inicio de la regeneración hepática.** Los hepatocitos están expuestos a factores con funciones opuestas al inicio del proceso regenerativo. TGF-β es un inhibidor de la proliferación de hepatocitos mientras que HGF es mitógeno para estas células. HGF permanece inactivo al estar unido a glicosaminoglicanos de la matriz extracelular al igual que ocurre con TGF-β que se encuentra unido a decorina. Tras una HP, la activación de uPA produce la remodelación y degradación de componentes de la matriz extracelular. Como resultado, se libera HGF al plasma donde se activa y desempeña su efecto mitogénico sobre los hepatocitos a través del receptor c-Met. Mientras que HGF ejerce estas funciones desde el plasma, la función de TGF-β se neutraliza al unirse a α2-macroglobulina. El balance entre HGF y TGF-β es clave en las etapas iniciales de la regeneración hepática, permitiendo que los hepatocitos entren al ciclo celular y proliferen. Otras posibles explicaciones de la resistencia de los hepatocitos al efecto de TGF-β al inicio de la regeneración son: el aumento de factores en plasma tras una HP como norepinefrina que se une a TGF-β e inactiva su función o el aumento de inhibidores de TGF-β y descenso de los receptores de este factor (TGF-βR) en los hepatocitos al inicio del proceso regenerativo. En las etapas finales del proceso regenerativo, TGF-β y activina A activan a sus receptores en hepatocitos. Esta activación induce la expresión de SMAD2 y SMAD3, los cuales promueven la inhibición de la proliferación de los hepatocitos y, por consiguiente, el cese de la regeneración hepática. Follistatina inhibe a activina A y actúa como un regulador positivo de la regeneración. TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta; HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos; HP: Hepatectomía parcial. uPA: Activador del plasminógeno tipo uroquinasa; TGF-βRII: Receptor II del factor de crecimiento transformante beta; ACTR: Receptor de activina; SMAD: Del inglés “small mothers against decapentaplegic”.

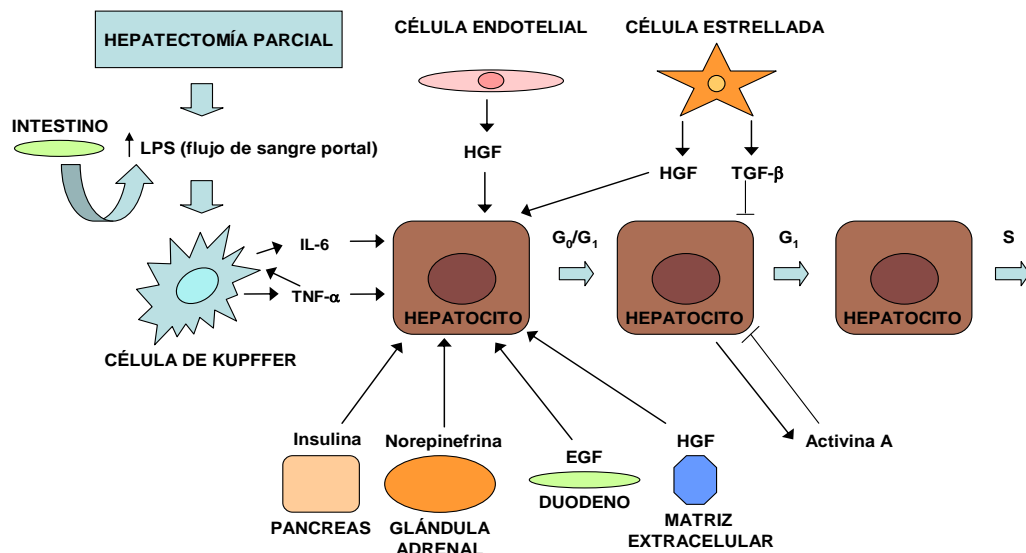
Se ha descrito que al inicio del proceso regenerativo se produce una importante remodelación de la matriz extracelular. Uno de los primeros eventos que tiene lugar tras una HP es la activación del activador del plasminógeno tipo uroquinasa (uPA) (Tabla 1), el cual induce una cascada proteolítica que desencadena la activación de

MMPs. Las MMPs liberan factores de crecimiento que se encuentran unidos a la ME de forma inactiva como HGF, degradan macromoléculas, y generan señalización mediante integrinas (Arthur 1997; Michalopoulos 2013).

Se ha demostrado un aumento de la proliferación de los hepatocitos y hepatomegalia en animales KO hepato-específicos para una integrina ligada a una quinasa (ILK) (ILK<sup>-/-</sup>) (Gkretsi et al, 2007). Estos ratones presentaron, además, una alteración del cese de la regeneración hepática tras una HP. En particular, se observó que la regeneración se prolongaba y que el hígado alcanzaba un peso un 58% mayor al del peso inicial (Gkretsi et al, 2007; Gkretsi et al, 2008; Apte et al, 2009). Por tanto, estos resultados indican que la matriz extracelular desempeña un importante papel en la regulación del cese de la regeneración hepática (Michalopoulos 2013).

El cese de la regeneración hepática también se ha relacionado con factores como SOCS-3. Se ha descrito que la IL-6 produce un aumento de SOCS-3 en el hígado. El aumento de SOCS-3 produce un descenso de la activación de STAT-3 que pone fin a la señal proliferativa de IL-6 (Campbell et al, 2001). Estos resultados explicarían por qué la sobreexpresión de IL-6 inhibe el crecimiento celular tras una HP (Wüstefeld et al, 2000), y demuestran el efecto de esta proteína en el bloqueo de la señalización de IL-6 y de otras citocinas que podría contribuir al cese de la regeneración (Taub 2004).

En resumen, distintos factores de crecimiento y citocinas son activados simultáneamente tras una HP. La cooperación entre estos factores permite que los hepatocitos superen los puntos de restricción del ciclo celular y progresen desde de la fase G<sub>1</sub> hasta la fase S del ciclo que conduce a la síntesis de ADN y a la proliferación de los hepatocitos. En el cese del proceso regenerativo intervienen la señalización de TGF-β y otros factores que inhiben la proliferación de los hepatocitos y permiten su regreso al estado quiescente inicial (Figura 12).



**Figura 12. La resección de masa hepática genera una serie de señales mitogénicas para los hepatocitos que estimulan la regeneración hepática.** Después de una HP, varias señales se activan simultáneamente en el hígado. Factores como LPS procedentes del intestino alcanzan el hígado a través de la circulación portal. En el hígado, LPS activa las células de Kupffer, induciendo la producción de TNF-α y de IL-6. Otros factores son liberados por el páncreas (insulina), el duodeno o glándulas salivares (EGF), la glándula adrenal (norepinefrina), las células endoteliales o estrelladas o la matriz extracelular (HGF). La integración de todas estas rutas de señalización permite que hepatocitos en estado quiescente entren al ciclo celular y progresen hasta la fase S donde se produce la síntesis de ADN y la proliferación celular. La señalización por TGF-β y otros factores como activina A que inhiben la proliferación de los hepatocitos, está bloqueada al inicio del proceso regenerativo. La restauración de esta señalización al final del proceso ayuda a regresar a los hepatocitos al estado quiescente inicial. HP: Hepatectomía parcial; LPS: Lipopolisacárido; TNF-α: Factor de necrosis tumoral α; IL-6: Interleucina-6; EGF: Factor de crecimiento epidérmico; HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos; ADN: Ácido desoxirribonucléico; TGF-β: Factor de crecimiento transformante beta.

## **1.5.- MODELOS ANIMALES**

La regeneración hepática se ha estudiado en múltiples modelos experimentales, desde cultivos celulares hasta modelos “*in vivo*” no quirúrgicos que inducen necrosis hepatocelular mediante la exposición a fármacos o hepatotóxicos (CCl<sub>4</sub>, galactosamina o tioacetamida) o modelos quirúrgicos como es la HP del 70% (Higgins GM, Anderson RM, 1931; Mitchell C, Willenbring H, 2008; Martins et al, 2008; Jia 2011; Nevzorova et al, 2015).

Los cultivos de hepatocitos se han usado como modelo para estudiar la regeneración hepática “*in vitro*”. En los años 70 se introdujo una técnica que permitió aislar y cultivar hepatocitos de diferentes especies (ratón, rata o humano) mediante la perfusión del hígado con colagenasa (Seglen 1976; Strom et al, 1982). La ventaja de esta técnica es que permite aislar hepatocitos directamente del hígado sin ser afectados por los cambios inducidos por el resto de NPCs. Estos cultivos han sido muy útiles en delimitar distintos aspectos de la biología de los hepatocitos y han permitido valorar la capacidad de distintas señales para estimular la síntesis de ADN en los mismos (Cruise et al, 1985; Block et al, 1996; Webber et al, 1998).

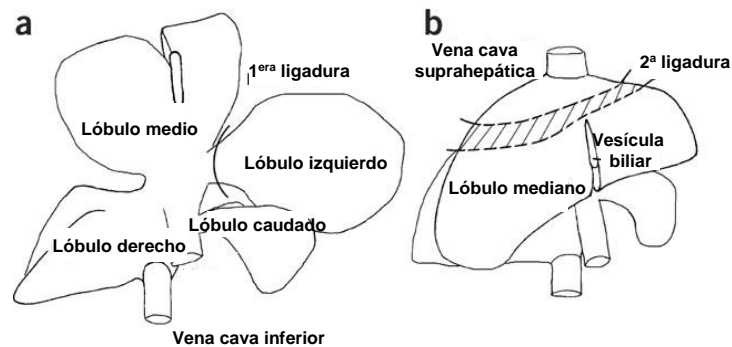
El principal inconveniente de utilizar cultivos celulares para estudiar la regeneración hepática es precisamente la falta de interacción entre los hepatocitos y el resto de NPCs del hígado. Esta interacción es necesaria, como se ha comentado anteriormente, para que la regeneración hepática se desarrolle con normalidad. Otros problemas

adicionales son la pérdida de diferenciación de los hepatocitos en cultivo y la presencia de respuestas fisiológicas distintas a las encontradas en experimentos “*in vivo*”. Todas estas limitaciones han motivado el uso de modelos animales para el estudio de la regeneración hepática (Michalopoulos 2010).

El modelo experimental “*in vivo*” más empleado y caracterizado es la HP de 2/3 descrita por Higgins en el año 1931 en ratas (Higgins GM, Anderson RM 1931). En este modelo, la masa hepática es restaurada tan sólo 14 días después de la eliminación quirúrgica del 70% del hígado. Esta técnica ha sido utilizada por la mayor parte de la comunidad científica para el estudio de las rutas de señalización implicadas en la regeneración hepática (Mitchell C, Willenbring H, 2008; Martins et al, 2008). La técnica quirúrgica original consistía en la ligadura en bloque del lóbulo medio e izquierdo del hígado seguido de su resección, y en el estudio de la regeneración del parénquima remanente consistente del lóbulo derecho y del caudado (Higgins GM, Anderson RM 1931).

Esta técnica ha sido adaptada a ratones para mejorar la reproducibilidad y seguridad (Greene AK, Puder M, 2003; Mitchell C, Willenbring H, 2008). En ratas se realiza la ligadura simultánea de los lóbulos izquierdo y medio. Si esta misma técnica se llevara a cabo en ratones se produciría necrosis en el lóbulo derecho remanente, probablemente debido a obstrucción vascular (Fausto et al, 2006). La adaptación consiste en resecar el lóbulo izquierdo y medio, con una ligadura en cada lóbulo para evitar la obstrucción vascular. Aún así, la

colocación de la sutura en el lóbulo medio no está completamente definida y varía en base al criterio del investigador y en cada cirugía individual. Como consecuencia, la cantidad de tejido resecado en cada intervención puede variar de forma importante (Mitchell C, Willenbring H, 2008) (Figura 13).



**Figura 13. Esquema de la HP de 2/3 en ratones.** A. La primera ligadura se coloca en la base del lóbulo izquierdo. B. La segunda ligadura se debe atar dentro del área con líneas discontinuas del lóbulo medio justo por encima de la vesícula biliar, pero no demasiado cerca de la vena cava suprahepática. HP: Hepatectomía parcial. Imagen modificada de Mitchell C, Willenbring H, 2008.

### **1.5.1.- Ventajas y limitaciones del modelo actual de HP**

Una ventaja importante del modelo quirúrgico de HP radica en que la eliminación del tejido resecado no se asocia con necrosis, la cual sí está presente en los modelos de daño hepático producido por tóxicos. Los lóbulos resecados son retirados intactos sin causar daño a los lóbulos que se conservan. Mientras que la respuesta regenerativa está asociada a inflamación crónica con infiltrado de macrófagos y leucocitos polimorfonucleares en los modelos de necrosis hepatocelular inducidos por toxinas, la respuesta regenerativa tras una HP no está influenciada por ningún otro factor que pudiera distorsionar su análisis (Michalopoulos 2007, Michalopoulos 2010).

Este modelo reúne otras importantes ventajas con respecto a otros modelos experimentales (Michalopoulos 2007, 2010, 2011; Nevzorova et al, 2015):

- El inicio del estímulo regenerativo está perfectamente definido en el tiempo, siendo la resección de los lóbulos hepáticos el tiempo 0.
- Es un proceso rápido y fácil de realizar.
- Es reproducible.
- Es una técnica bien tolerada que presenta una mortalidad reducida asociada al proceso quirúrgico.

Este modelo “*in vivo*” es considerado además atractivo porque permite estudiar el ciclo celular. Tras una HP, los hepatocitos que se encuentran en estado quiescente, se sincronizan y progresan de forma simultánea en el ciclo celular para replicarse (Boyce S, Harrison D, 2008). La reproducción de las fases del ciclo celular en la regeneración hepática ha suscitado un gran interés para conocer la expresión génica, los mecanismos de regulación y su traslación a otros campos como el estudio del cáncer (Kurinna S, Barton MC, 2010).

La utilización de este modelo de HP en roedores ha permitido también estudiar las rutas de señalización implicadas en la regulación de la regeneración hepática mediante la utilización de animales modificados genéticamente en los que se ha inducido la delección sistémica o condicional de un gen (animales KO) (Cressman et al, 1996; Taub 2004; Jia 2011). Por lo tanto, gracias al empleo de este modelo de

HP específicamente en ratones, se ha podido comparar la regeneración en animales KO para las moléculas de señalización potencialmente implicadas en este proceso, sus receptores y factores reguladores del ciclo celular con la de animales control (Fausto et al, 2012; Michalopoulos 2013). El uso de animales KO ha permitido obtener resultados interesantes e inesperados en cuanto a los mecanismos que regulan la regeneración hepática. Sin embargo, dichos mecanismos no han sido completamente elucidados. En el futuro es posible que la generación de nuevos animales KO permita resolver cuestiones o dilemas de este proceso pendientes de ser exploradas (Böhm et al, 2010).

Aunque el modelo de HP es ampliamente utilizado, existen una serie de limitaciones que abren posibles áreas de mejora. Una de ellas es que esta técnica implica la resección quirúrgica de la vesícula biliar (Mitchell C, Willenbring H, 2008). El daño de la vesícula biliar o la obstrucción de la vía biliar extrahepática o de la vena cava suprahepática puede conducir a necrosis de los lóbulos remanentes y a un fallo de la regeneración hepática (Nevzorova et al, 2015). La preservación de la vesícula biliar mediante el empleo de técnicas alternativas podría mejorar, por tanto, los resultados obtenidos.

Otra posible mejora es la disminución de la variabilidad existente en la cantidad de tejido resecaado mediante las técnicas actuales. Como se ha comentado anteriormente, la cantidad del lóbulo medio resecaado en la técnica descrita por Mitchel et al. es variable dependiendo de la colocación de la sutura por parte del investigador. El uso de técnicas

alternativas que permitan resecar la misma cantidad de tejido en cada cirugía probablemente mejoraría la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

Una de las complicaciones más frecuentes con la técnica actual incluye el sangrado de los vasos sanguíneos hepáticos y de la superficie del hígado (Boyce S, Harrison D, 2008). Estos problemas se pueden mejorar usando técnicas microquirúrgicas que faciliten la disección individual y ligadura de las ramas vascular y biliar de los lóbulos medio e izquierdo sin dañar las ramas de los lóbulos remanentes caudado y derecho (Aller et al, 2009). Esta técnica modificada de HP puede tener riesgos similares a los daños provocados por la ligadura en masa o la colocación de las suturas en el lóbulo medio. Uno de estos riesgos es que se produzca estenosis de la vena cava suprahepática y congestión hepática que puede ocasionar desarrollo de necrosis hepatocelular (Martins et al, 2008). Técnicas alternativas que permitan descender estos riesgos facilitarían la interpretación de los resultados obtenidos.

Actualmente se han descrito técnicas alternativas para la resección hepática. Estas técnicas son bien toleradas en roedores y presentan baja mortalidad operatoria:

- **Resección hepática con tres ligaduras** (Boyce S, Harrison D, 2008; Nevzorova et al, 2015). El uso de tres ligaduras puede ayudar a preservar la vesícula biliar y a disminuir la variabilidad en la cantidad de tejido resecado.
- **Resección hepática con clips** (Martins et al, 2008; Hori et al, 2012). Es una modificación de la técnica clásica que se

basa en el empleo de clips en lugar de suturas. Esta técnica es rápida y segura, pero lleva asociada las mismas complicaciones que la técnica tradicional.

➤ **Técnica microquirúrgica orientada a vasos.** Las ramas de la arteria hepática y la vena porta son ligadas antes de que se realice la resección del lóbulo y las venas hepáticas son ligadas dentro del lóbulo durante la resección del parénquima. Las ventajas de esta técnica son reducido riesgo de sangrado y reducida obstrucción de la vena cava (Kubota et al, 1997; Martins et al, 2008).

➤ **Resección hepática usando técnicas microquirúrgicas.** Esta técnica permite la disección individual y ligadura de las ramas vasculares y biliares de los lóbulos medio e izquierdo sin provocar daño a los lóbulos remanentes o complicaciones como la estenosis de la vena cava o la obstrucción del árbol biliar (Martins et al, 2008; Aller et al, 2009).

En el futuro, el uso de estas técnicas alternativas para el estudio de la regeneración hepática, probablemente disminuirá las complicaciones asociadas a la técnica tradicional y mejorará la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

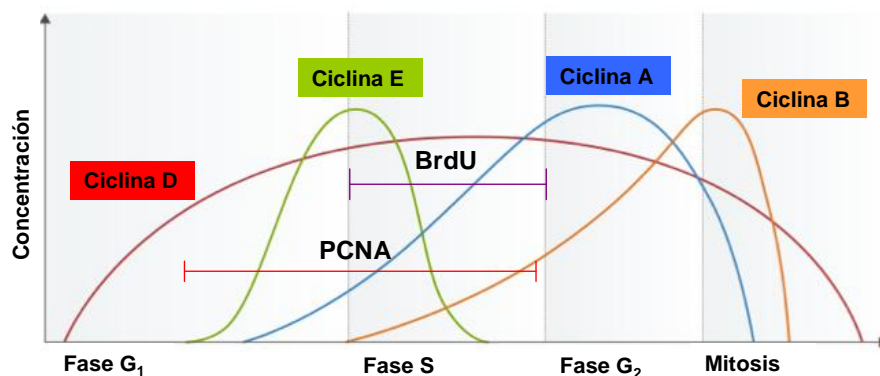
### 1.5.2.- Métodos usados para cuantificar la regeneración hepática

Se han descrito una gran variedad de métodos para estudiar la regeneración hepática. Estos métodos incluyen (Assy N, Minuk GY, 1997; Jia 2011):

- **Medida de la masa hepática.** Consiste en medir en gramos la cantidad de tejido remanente tras la cirugía y comparar esta medida con el peso corporal del animal en gramos en el día del sacrificio (índice hepático).
- **Recuento de figuras mitóticas.** El recuento de mitosis en hepatocitos se suele realizar sobre tinciones de hematoxilina y eosina (H&E). El principal inconveniente de esta técnica es que las mitosis representan un corto periodo del ciclo celular y las figuras mitóticas son poco frecuentes en la observación al microscopio óptico.
- **Medida de la síntesis de ADN.** Entre los métodos que se usan para medir la síntesis de ADN destacan:
  - ❖ *La incorporación de timidina tritiada.* Las limitaciones de esta técnica son el uso de isótopos radioactivos y la pre-inyección de los mismos para evaluar la síntesis de ADN.
  - ❖ *La incorporación del nucleótido sintético análogo a la timidina denominado bromodesoxiuridina (BrdU).* Requiere la pre-inyección de este análogo de la timidina dos horas antes del sacrificio y es una de las técnicas más utilizadas y validadas.

- ❖ *Citometría de flujo.* Es una técnica objetiva para evaluar la regeneración hepática. Su principal limitación es la necesidad de aislamiento de los hepatocitos y de la presencia de equipos sofisticados que pueden no estar disponibles en los laboratorios.
- ❖ *Técnicas inmunohistoquímicas basadas en el uso de antígenos nucleares.* Los antígenos nucleares más utilizados son el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), ki67 y la ADN polimerasa alfa. Estos métodos son comúnmente utilizados para monitorizar la actividad regenerativa. Sus principales limitaciones son estar sujetos a la variabilidad inter- e intra-observador.
- ❖ *Identificación de enzimas y proteínas asociadas con la regeneración hepática.* Entre ellas destacan la timidina quinasa, la ornitina descarboxilasa y la putrescina. Las principales limitaciones son su posible confusión con el estado nutricional del hospedador y la dificultad para la obtención de medidas precisas.
- ❖ *Test sanguíneos.* Estos test constituyen una herramienta no invasiva para evaluar la regeneración hepática. Se basan en las medidas en suero de timidina quinasa, fibronectina y  $\alpha$ -fetoproteína. Las principales limitaciones son que la sensibilidad y la especificidad de estos tests deben ser bien determinadas.

De todos los métodos descritos para evaluar la regeneración hepática, los más utilizados son la incorporación de BrdU y la expresión de PCNA. Ambos son dependientes del ciclo celular (Figura 14) y son considerados excelentes marcadores de la síntesis de ADN que precede a la división de los hepatocitos. El PCNA abarca más fases del ciclo celular y es un marcador reproducible y exacto de la regeneración hepática. Debido a las limitaciones inherentes de cada método, para cuantificar de forma correcta la regeneración hepática actualmente se recomienda realizar al menos dos marcadores independientes (Assy N, Minuk GY, 1997; Jia 2011).



**Figura 14. Expresión diferencial de BrdU y PCNA en el ciclo celular.** La expresión de PCNA y BrdU depende del ciclo celular. La expresión de PCNA se inicia en la fase final de G<sub>1</sub> y su máxima detección es en la fase S. Mientras que BrdU se incorpora sólo a las células que se encuentran en la fase S del ciclo celular. BrdU: bromodesoxiuridina; PCNA: Antígeno nuclear de células en proliferación. Imagen modificada de Cobb 2013.

## **2.- INTERLEUCINA-6 (IL-6)**

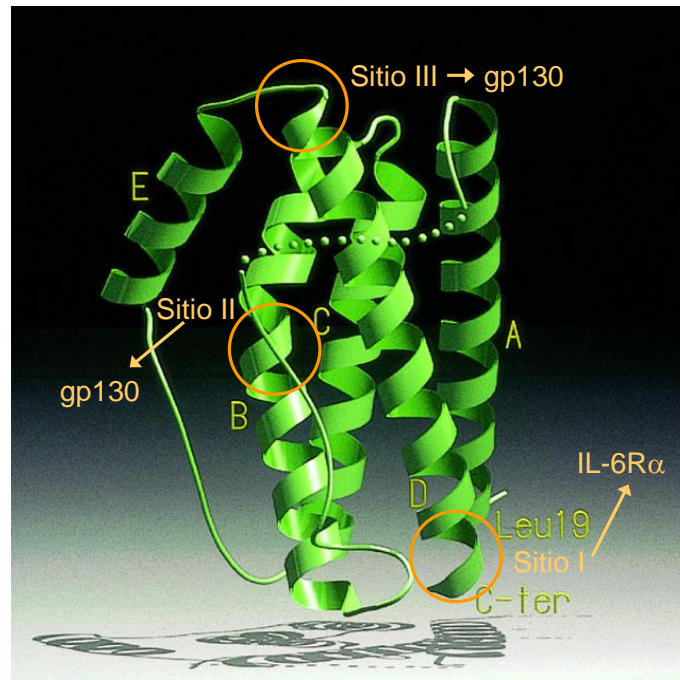
### **2.1.- IL-6 Y SU SEÑALIZACIÓN**

Las citocinas son pequeñas proteínas de señalización que facilitan las comunicaciones intercelulares entre varias células. Funcionan a través de receptores de superficie, mediante los cuales activan rutas de señalización que inducen cambios en el fenotipo y la función celular (Brockner et al, 2010). Estas moléculas son producidas por distintos tipos celulares e incluyen las interleucinas (ILs), interferones, factores estimulantes de colonias y muchos factores de crecimiento (Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011).

Las interleucinas son producidas en gran cantidad de respuestas inmunes. Su función es modular el crecimiento, la diferenciación y la activación celular durante una respuesta inmune, de forma que el resultado de una respuesta inflamatoria va depender del balance de citocinas producidas por las células implicadas en esa respuesta (Brockner et al, 2010; Commins et al, 2010; Hammerich L, Tacke F, 2014). Dependiendo del contexto, las interleucinas pueden tener funciones pro-inflamatorias o anti-inflamatorias. Esto hace que estas citocinas representen un grupo de proteínas con un gran potencial como dianas terapéuticas ya que son mediadores importantes en la respuesta fisiológica a infecciones y también contribuyen de forma significativa a la patofisiología de un amplio rango de trastornos (Brockner et al, 2010; Hammerich L, Tacke F, 2014).

La IL-6 es una citocina pequeña de 186 aminoácidos con estructura globular (Xu et al 1997). Esta citocina ejerce múltiples efectos biológicos *in vivo* en diferentes especies. La localización del gen que codifica para esta proteína es distinta según las especies. En el caso del hombre se localiza en el cromosoma 7 mientras que el gen de IL-6 murino se localiza en el cromosoma 5 (Sehgal et al, 1986; Mock et al, 1989). La IL-6 humana y de ratón tienen un bajo grado de homología de secuencia (solo el 40%) y además presentan importantes diferencias en la conservación de los dos sitios de unión de sus receptores (Veverka et al, 2012). Sin embargo, la estructura de esta proteína está bien conservada, lo que podría explicar que se hayan encontrado las mismas actividades biológicas de esta proteína en sistemas heterólogos (Xu et al 1997; Veverka et al, 2012).

La estructura de IL-6 se caracteriza por la presencia de 4 hélices  $\alpha$  (A, B, C y D) (Figura 15). Las hélices A y B se disponen en la misma dirección mientras que las hélices C y B van en la dirección opuesta. La disposición de estas hélices se corresponde a una topología up-up-down-down. La unión entre las hélices es posible gracias a un bucle largo que une las hélices A y B, un bucle corto que une las hélices B y C y finalmente un segundo bucle largo entre C y D. Además, existe una hélice adicional localizada fuera del haz que contiene las cuatro hélices  $\alpha$ , llamado hélice E (Somers et al, 1997; Xu et al 1997).



**Figura 15. Representación de la estructura de IL-6.** Las cuatro hélices principales están marcadas como A, B, C y D. La hélice extra al final del bucle está marcada como hélice E. En círculos de color naranja se muestran los sitios de unión al receptor. IL-6: Interleucina-6. Imagen modificada de Somers et al, 1997.

La IL-6 es una citocina con efectos tanto locales como sistémicos, y juega un papel importante en la respuesta inflamatoria aguda. Se considera una interleucina pleiotrópica porque está asociada con un amplio rango de funciones biológicas que incluyen la regulación de la respuesta inmune, la hematopoyesis, la inflamación y la oncogénesis (Kishimoto T, 2010). También se ha observado que la IL-6 activa genes implicados en diferenciación, supervivencia, apoptosis, proliferación y es capaz también de mediar ciertas respuestas anti-inflamatorias (Heinrich et al, 2003). Pertenece a una familia de citocinas que se ha englobado con el término de “familia de IL-6” que comprende a la IL-6, la IL-11, el factor inhibidor de leucemia (LIF), la OSM, el factor neurotrófico ciliar (CNTF), la cardiotrofina 1 (CT-1), la neurotrofina 1

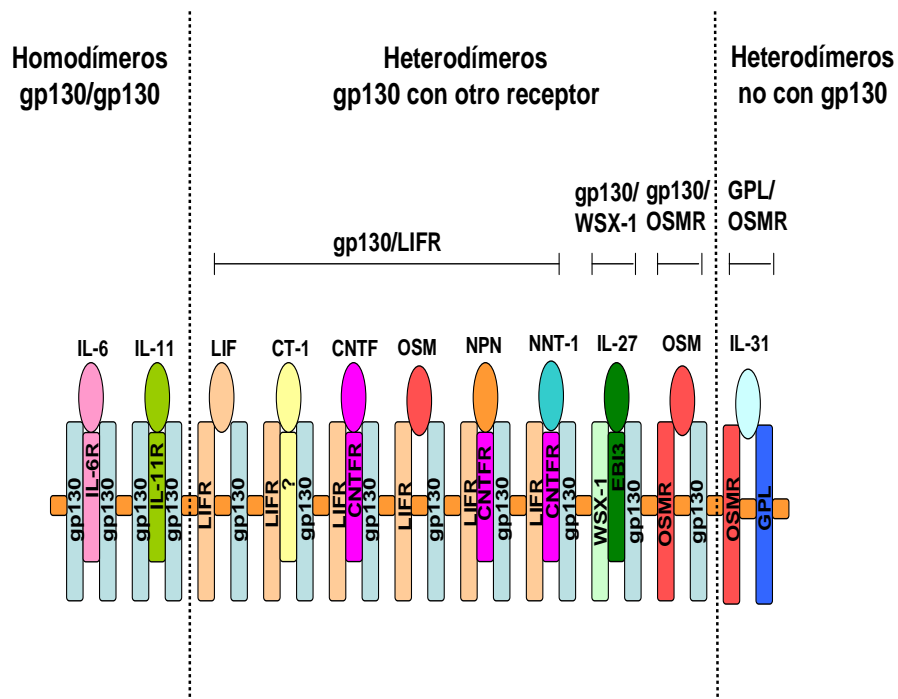
novel (NNT-1), la neuropoyetina (NPN), la IL-33 y la IL-27 (Heinrich et al, 2003; Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011; Hammerich L, Tacke F, 2014).

### **2.1.1.- Receptores de IL-6**

Los receptores que median las actividades biológicas de la IL-6 son el receptor de IL-6 de 80 kiloDalton (kDa) llamado IL-6R (también designado como CD126 o gp80) y la proteína transductora de la señal transmembrana gp130 (también designada como CD130) (Heinrich et al, 2003; Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011). Es bien conocido que la unión de IL-6 a IL-6R no produce señalización. Para que la señalización se inicie, es necesario que el complejo IL-6/IL-6R se asocie con un segundo receptor llamado gp130 (Heinrich et al, 2003; Scheller Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011; Schmidt-Arras D, Rose-John S, 2016).

La familia de la IL-6 se caracteriza por presentar un perfil de reclutamiento de receptores que en todos los casos implica al menos a una molécula de gp130, con la excepción de IL-31 (Figura 16). IL-6, IL-11, CT-1, CNTF, NPN, NNT-1 e IL-27 se unen específicamente a sus respectivas subunidades del receptor, antes de unirse al receptor gp130. Mientras que la IL-6 y la IL-11 son las únicas citocinas de la familia de IL-6 que señalizan vía homodímeros de gp130, el resto de la familia de IL-6 señaliza vía heterodímeros de gp130 y otro receptor. En el caso de LIF, CNTF, CT-1, NPN, NNT-1 y OSM señalizan vía heterodímeros de gp130 y el receptor de LIF (LIFR) mientras que en el

caso de IL-27 señala a través de un heterodímero formado por gp130 y WSX-1. La OSM es también capaz de señalar a través de un heterodímero de gp130 con el receptor de OSM (OSMR). Además, OSM y LIF son capaces de poner en marcha la señalización sin necesidad de reclutar subunidades adicionales de receptores específicos. En el caso de IL-31, se ha encontrado que es la única citocina de la familia de IL-6 que no requiere al receptor gp130 para desencadenar una ruta de señalización; en su lugar, induce la formación de un heterodímero entre un receptor tipo gp130 (GPL) y OSMR (Heinrich et al, 2003; Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011).

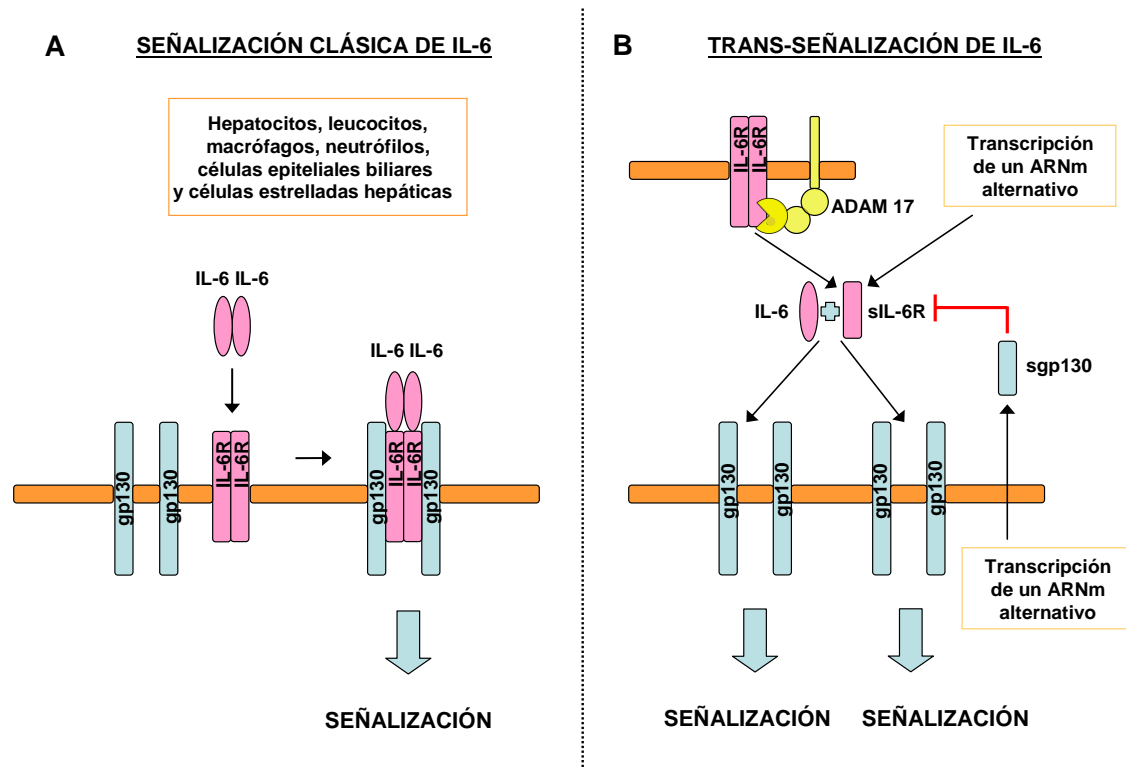


**Figura 16. Esquema representativo de los receptores de la familia de IL-6.** Todos los miembros de la familia de IL-6 señalizan a través de gp130, a excepción de IL-31. IL-6, IL-11 CNTF, CT-1, NPN, NNT-1 e IL-27 necesitan receptores específicos adicionales para posteriormente señalar a través de gp130. IL-6 e IL-11 señalizan vía homodímeros de gp130, LIF, CT-1, CNTF, OSM, NPN, NNT-1 vía heterodímeros gp130/LIFR, IL-27 vía heterodímeros gp130/WSX-1 y OSM puede además señalar a través de heterodímeros gp130/OSMR. IL-31 no señala por gp130 sino a través del heterodímero de GPL/OSMR. Gp130: Glicoproteína 130; IL-6: Interleucina-6; IL-31: Interleucina-31; IL-11: Interleucina-11; CNTF: Factor neurotrófico ciliar; CT-1: Cardiotrofina 1; NPN: Neuropoyetina; NNT-1: Neurotrofina 1 Novel; ; IL-27: Interleucina-27; LIF: Factor inhibidor de leucemia; OSM: Oncostatina M; LIFR: Receptor de LIF; OSMR: Receptor de OSM; GPL: Receptor tipo gp130; EBI3: Gen 3 inducido por el virus Epstein-Barr.

IL-6 presenta en su estructura 3 sitios distintos de unión para estos receptores que se han designado como (Figura 15) (Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011):

- Sitio I: está formado por los residuos C-terminal de la hélice D y la parte C-terminal del bucle AB. Este sitio es específico para la unión de IL-6R. IL-6 R se une por los dominios 2 y 3 al sitio I de IL-6 (Wiesinger et al, 2009).
- Sitio II: está formado por residuos localizados en el medio de las hélices A y C. Este sitio es necesario para reclutar a gp130, e IL-6 interactúa con los dominios 2 y 3 de esta glicoproteína (Boulanger et al, 2003).
- Sitio III: está constituido por los residuos localizados en la parte N-terminal del bucle AB (Sitio IIIa) y los residuos C-terminal de la hélice D (Sitio IIIb). Constituye el otro sitio de unión para gp130. El contacto se produce con el dominio 1 o dominio tipo Inmunoglobulina de gp130 (Boulanger et al, 2003).

IL-6R y gp130 son proteínas glicosiladas de membrana tipo I. Tanto IL-6R (Schuster et al, 2003) como gp130 (Giese et al, 2005; Tenhumberg et al, 2006) existen en forma de dímeros inactivos en la membrana plasmática. Estudios funcionales y estructurales sugieren que la IL-6 forma complejos de señalización hexaméricos que estarían formados por dos moléculas de IL-6, dos moléculas de IL-6R y dos moléculas de gp130 (Boulanger et al, 2003; Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011) (Figura 17.A).



**Figura 17. Esquema de los dos mecanismos de señalización de IL-6 en las células diana. A.** Señalización clásica de IL-6. La pueden presentar las células que expresan IL-6R en su membrana como es el caso de los hepatocitos, leucocitos, macrófagos, neutrófilos y algunas células epiteliales (células epiteliales biliares) y no epiteliales (células estrelladas hepáticas). El complejo de señalización está formado por dos moléculas de IL-6 que se unen a dos moléculas de IL-6R presentes en la membrana de las células diana. Esta unión provoca el reclutamiento de dos moléculas de gp130 que inducen la señalización aguas abajo de esta citocina. **B.** Trans-señalización de IL-6. Las células que sólo expresan gp130 en su membrana sólo pueden ser activadas por el complejo IL-6/sIL-6R. sIL-6R se generaría por la actividad proteolítica de ADAM 17 en células que expresan en su membrana IL-6R o por la transcripción de un ARNm alternativo. El complejo IL-6/sIL-6R se uniría posteriormente a gp130, proteína expresada de forma ubicua en la membrana de muchas células, induciendo la señalización de IL-6. Por transcripción de un ARNm alternativo, se puede generar sgp130, el cual puede unirse al complejo formado por IL-6 y sIL-6R evitando su unión a gp130 y, por tanto, inhibiendo la trans-señalización. IL-6: Interleucina-6; IL-6R: Receptor de IL-6; Gp130: Glicoproteína 130; s-IL6R: Receptor soluble de IL-6. sgp130: Glicoproteína 130 soluble.

Aunque la expresión de la glicoproteína gp130 es ubicua, el número de células que responden a IL-6 es limitado, ya que la expresión de las unidades específicas de IL-6R es restringida y estrictamente regulada (Heinrich et al, 2003). IL-6R se expresa en pocos tipos celulares como son hepatocitos, leucocitos, macrófagos, neutrófilos y algunas células epiteliales (células epiteliales biliares) y no epiteliales (como por ejemplo células estrelladas hepáticas) (Scheller J,

Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011; Rose-John S, 2006). Se ha encontrado que la IL-6 tiene afinidad por IL-6R pero no por gp130, y que el IL-6R por si sólo no tiene afinidad por gp130. Solo cuando se forma el complejo IL-6/IL-6R tiene lugar la unión a gp130. Por lo tanto, sólo las células que expresan IL-6R pueden responder a IL-6 por la vía clásica (Kishimoto 2005; Schmidt-Arras D, Rose-John S, 2016).

Los receptores solubles se han revelado como importantes reguladores de los efectos inflamatorios de la señalización de citocinas. Se han descrito dos mecanismos que permiten producir el receptor soluble de IL-6 (sIL-6R). Uno de ellos es dependiente de la actividad proteolítica de la metaloproteinasa ADAM 17 (TACE), que libera IL-6R de la membrana plasmática (Müllberg J, Schooltink H, et al, 1993). El otro mecanismo depende de la transcripción de un ARNm alternativo para IL-6R, que no tiene el dominio transmembrana y citosólico (Figura 17.B) (Lust et al, 1994; Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011). El sIL-6R producido por el ARNm alternativo sólo ha sido descrito en humanos y no se ha identificado en el ratón. Esto sugiere que el sIL-6R circulante en ratón procede exclusivamente de la actividad proteolítica de ADAM 17 (Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011).

La capacidad de unión a IL-6 por parte de sIL-6R se mantiene intacta. La formación del complejo IL-6/sIL-6R permite la asociación con gp130 y, por tanto, el inicio de la señalización intracelular (Mackiewicz et al, 1992). Esta señalización ocurre en células que no expresan IL-6R en su membrana y aumenta por tanto el número de

células diana para IL-6 (Mackiewicz et al, 1992; Schmidt-Arras D, Rose-John S, 2016). En resumen, existen dos mecanismos para activar gp130 en células diana:

- El primero implica la activación de células vía IL-6R de membrana, que tras su unión a la IL-6 provoca la unión a gp130 y desencadena la señalización intracelular. Este mecanismo se ha denominado como **señalización clásica** (Figura 17.A) (Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011; Schmidt-Arras D, Rose-John S, 2016).
- El segundo mecanismo consiste en la activación por el complejo IL-6/sIL-6R de células que sólo expresan gp130. Este mecanismo se ha denominado **trans-señalización** (Figura 17.B).

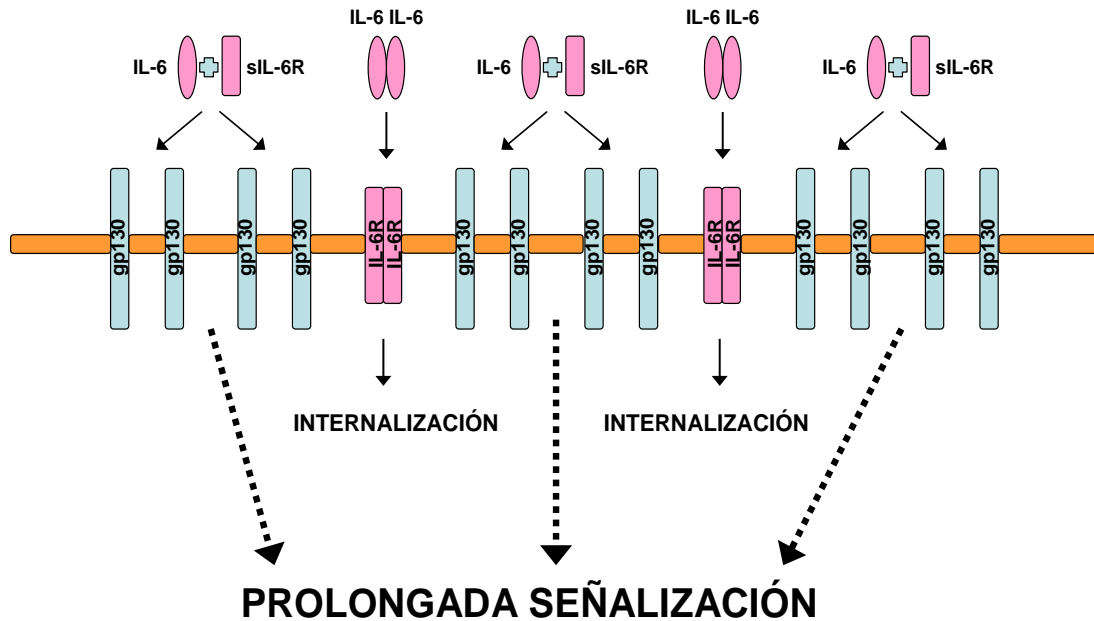
Estudios con ratones KO condicionales para IL-6R en hepatocitos han mostrado una reducción de los niveles en suero de sIL-6R del 32%. La delección condicional del gen de IL-6R en células hematopoyéticas resultó en una reducción de sIL-6R del 60%. La conclusión de estos estudios es que los hepatocitos y las células hematopoyéticas son las principales fuentes de sIL-6R circulante (McFarland-Mancini et al, 2010; Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011).

Otros estudios con ratones doble KO para IL-6/sIL-6R (IL-6-/-/sIL-6R-/-) han mostrado que estos ratones presentan hematopoyesis extramedular masiva y proliferación hepatocelular aumentada en comparación con ratones KO para IL-6 (IL-6-/-) (Peters et al, 1997; Maione et al, 1998). Dado que estos fenotipos no se han encontrado en

ratones KO para IL-6, la respuesta al complejo IL-6/sIL-6R *in vivo* parece ser substancialmente diferente a la respuesta a la IL-6 (Peters M, Müller A, et al, 1998). Se han planteado varias hipótesis para explicar esta respuesta celular a IL-6/sIL-6R (Figura 18) (Dittrich et al, 1994; Peters M, Blinn G et al, 1998):

- Las células que presentan en su superficie IL-6R expresan más unidades de gp130 en su membrana que IL-6R.
- La estimulación con IL-6 provoca una internalización rápida de esta citocina y, por tanto, conduce a un cese de la señalización. El complejo IL-6/sIL-6R, por el contrario, produciría poca internalización al unirse a las células diana y prolongaría la señalización.

El aumento de la señal debido a la presencia de más moléculas de gp130 en la membrana junto con una prolongada señalización debido a la no internalización del complejo IL-6/sIL-6R, resultaría en una respuesta celular distinta no solo a nivel cuantitativo sino también a nivel cualitativo (Rose-John 2012).



**Figura 18. Distribución de los receptores de IL-6 en las células que expresan IL-6R de membrana.** Las células, como los hepatocitos, que expresan IL-6R en su membrana presentan más moléculas de gp130 que IL-6R. La estimulación de IL-6 en estas células produce la activación de pocas moléculas gp130. Sin embargo, el complejo IL-6/sIL-6R estimularía a todas las moléculas gp130, produciendo una mayor amplitud de la señal. IL-6R: Receptor de IL-6; IL-6: Interleucina-6; Gp130: Glicoproteína 130; s-IL6R: Receptor soluble de IL-6. Imagen modificada de Rose-John 2012.

Interesantemente, se ha encontrado una forma soluble del receptor gp130 (sgp130) a altas concentraciones en la circulación (100/400 ng/mL en plasma humano) (Narazaki et al, 1993). Sgp130 es producido principalmente por “splicing” alternativo y se ha mostrado que se puede unir al complejo formado por IL-6/sIL-6R presente en la circulación. De esta forma, actuaría como inhibidor de la trans-señalización de IL-6. La señalización clásica, no obstante, no sería afectada por sgp130 (Figura 17B) (Müllberg J, Dittrich E, et al, 1993; Jostock et al, 2001; Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011).

En condiciones normales, los niveles de IL-6 en sangre son extremadamente bajos (1-5 pg/mL) (Scambia et al, 1994). Sin embargo, los niveles de sIL-6R y sgp130 se encuentran a elevadas concentraciones en la circulación (40-70 ng/mL y 100-400 ng/mL respectivamente) (Honda et al, 1992; Padberg et al, 1999; Rose-John 2012). Estas concentraciones sugieren que, una vez que la IL-6 es secretada, se une al sIL-6R en sangre y que el complejo IL-6/sIL-6R se une a sgp130. Esta unión provoca la supresión de la señalización de IL-6. Sólo cuando los niveles de IL-6 superan la concentración de sIL-6R, como ocurre en determinadas condiciones como en la inflamación severa, la IL-6 se puede unir al IL-6R de membrana en las células diana (Waage et al, 1989; Scheller J, Rose-John S, 2012). Sin embargo, este concepto podría no ser válido para condiciones fisiológicas en las que la IL-6 actúa de forma paracrina, como ocurre en el caso de la regeneración hepática. En el hígado, la IL-6 producida por las células de Kupffer va a actuar en los hepatocitos vecinos que presentan IL-6R en su membrana y son capaces de responder a una elevación de IL-6 local (Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011; Schmidt-Arras D, Rose-John S, 2016).

El polimorfismo de un solo nucleótido en el gen de IL-6R que resulta en el cambio del aminoácido glutamina por alanina, produce concentraciones elevadas en suero de sIL-6R. La elevación de sIL-6R en sangre es debida a que el aminoácido alterado se encuentra en el lugar donde se produce la escisión de IL-6R de membrana (Müllberg et al, 1994) y causa una mayor liberación de sIL-6R. Interesantemente, este

polimorfismo se ha relacionado con menor riesgo de padecer enfermedad cardiaca (IL6R Genetics Consortium Emerging Risk Factors Collaboration et al, 2012; Interleukin-6 Receptor Mendelian Randomisation Analysis (IL6RMR) Consortium et al, 2012). El resultado del efecto de este polimorfismo se ha explicado de dos formas diferentes:

- La liberación de IL-6R de la membrana de células como hepatocitos, macrófagos, monocitos, etc conduciría a una pérdida de la señalización clásica de IL-6 en estas células (Boekholdt SM, Stroes ES, 2012).
- Un aumento de los niveles de sIL-6R podría aumentar la unión de la IL-6 presente en sangre a este receptor y este complejo podría unirse a gp130. Esta unión provocaría la supresión de la señalización de IL-6 y por consiguiente, de la actividad de IL-6 (Scheller J, Rose-John S, 2012).

### **2.1.2.- Vías de señalización de la IL-6**

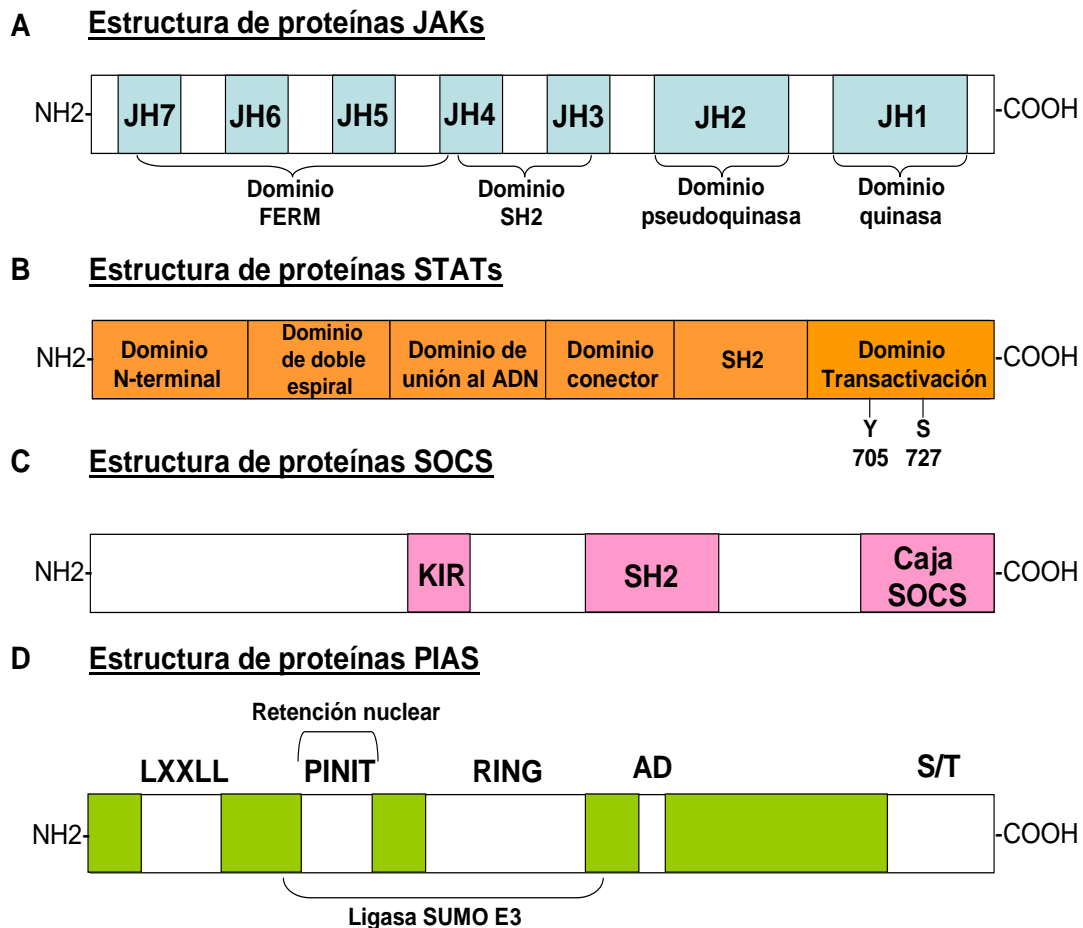
La unión de las citocinas de la familia de la IL-6 a sus receptores específicos induce la dimerización de gp130, LIFR y OSMR. Estos receptores son comunes para las distintas citocinas de la familia de IL-6, y su dimerización induce la activación de tirosina quinasas de la familia Janus (JAK) (Stahl et al, 1994; Radtke et al, 2002; Heinrich et al, 2003).

Los receptores transductores de la señal como gp130, LIFR y OSMR, no poseen una actividad quinasa intrínseca. Esta señalización es mediada por las tirosina quinasas JAK. Estas quinasas son proteínas

intracelulares de 120-140 kDa, de las cuales existen 4 miembros en mamíferos: JAK1, JAK2 y Tyk2, que son expresados en una amplia variedad de tejidos, y JAK3, cuya expresión está restringida al sistema hematopoyético (Verbsky et al 1996; Pellegrini S, Dusanter-Fourt I, 1997; Haan et al, 2001; Haan et al, 2006). La similitud de la secuencia de los miembros de la familia JAK sugiere que se caracterizan por presentar siete regiones de homología JAK (JH) (Figura 19.A) (Wilks et al 1991; Pellegrini S, Dusanter-Fourt I, 1997; Haan et al, 2001; Radtke et al, 2002; Wang SW, Sun YM, 2014):

- **JH1:** localizado en el extremo carboxilo terminal, constituye el único dominio con actividad enzimática y se le conoce como dominio quinasa.
- **JH2:** localizado junto al dominio JH1. A diferencia de éste no presenta actividad catalítica, pero es esencial para regular la actividad de la enzima y se ha designado como dominio pseudoquinasa.
- **JH3-JH4:** localizados junto al dominio JH2. Su función es unirse a péptidos que contienen fosfotirosina mediante puentes de hidrógeno y se les ha designado como dominio de homología 2 a Scr (SH2).
- **JH4-JH7:** localizados en el extremo amino terminal. Están implicados en la unión con el receptor de citocinas de la familia de IL-6 y además intervienen en la unión de las proteínas JAKs con la membrana plasmática. Se ha

designado como dominio de proteínas tipo 4.1, Ezrina, Radixina y Moesina (FERM).

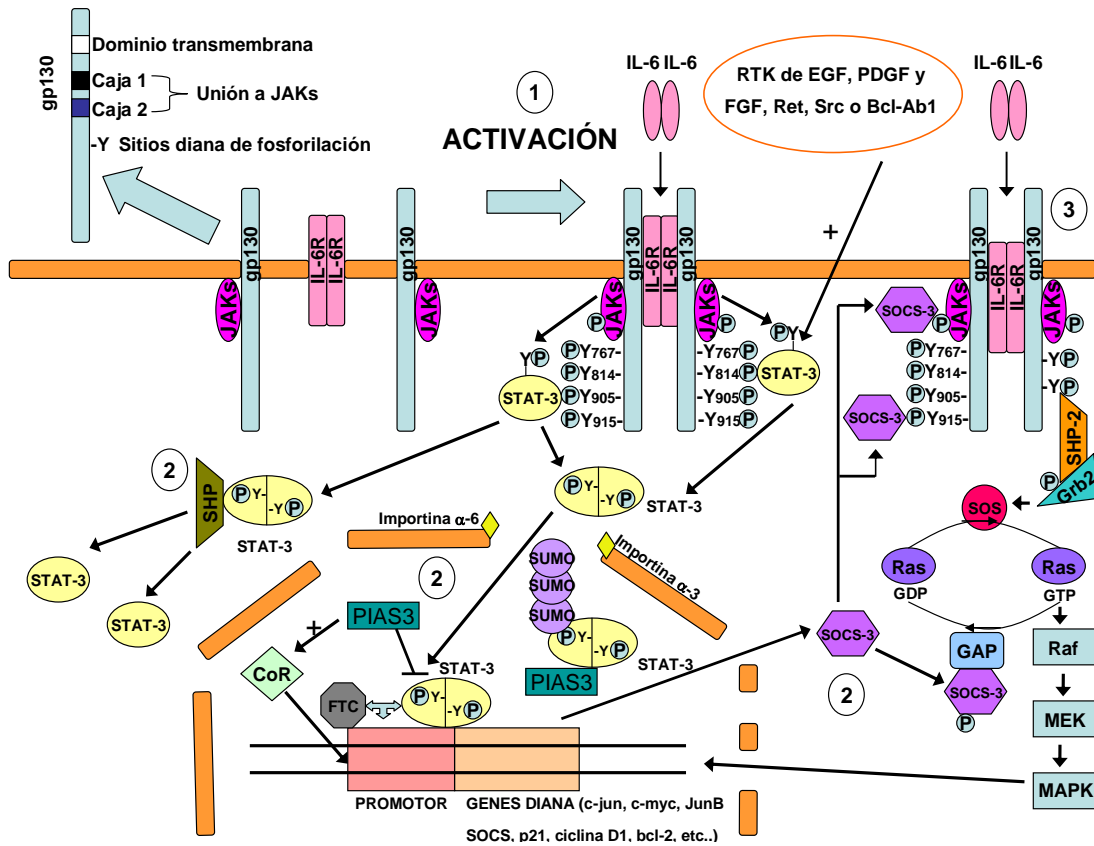


**Figura 19. Organización estructural de varios componentes de la señalización de IL-6.** A. Los dominios estructurales de las proteínas JAKs se han designado como regiones de homología JAK (JH1-JH7). Estas proteínas presentan cuatro dominios funcionales: dominio FERM, dominio SH2, dominio pseudoquinasa y dominio quinasa catalíticamente activo. B. La estructura de las proteínas STATs incluyen los siguientes dominios: dominio N-terminal, dominio de doble espiral, dominio de unión al ADN, dominio conector, dominio SH2 y dominio de transactivación que posee los sitios de fosforilación en los residuos de tirosina (Y705) y serina (S727). C. Las proteínas SOCS presentan en su estructura los siguientes dominios: dominio KIR, dominio central SH2 y dominio caja SOCS. D. La estructura de las proteínas PIAS incluye los siguientes dominios: dominio N-terminal con un motivo LXXLL, dominio PINIT implicado en la retención nuclear, dominio RING, dominio AD y dominio S/T. El dominio PINIT y RING están implicados en la actividad ligasa SUMO E3. JAK: Proteínas tirosina quinasas Jano; JH: Homología JAK; FERM: Proteínas tipo 4.1, Ezrina, Radixina y Moesina; SH2: Homología 2 a Scr. STATs: Transductores de señal y activadores de la transcripción; ADN: Ácido desoxirribonucleico; SOCS: Supresores de la señalización por citocinas; KIR: Región inhibidora quinasa; PIAS: Proteínas inhibidoras de los STATs activados; PINIT: Prolina-Isoleucina-Asparagina-Isoleucina-Treonina; RING: de sus siglas en inglés "Really Interesting New Gene" ("Nuevo Gen Realmente Interesante"); AD: Dominio ácido; S/T: Serina/Treonina.

Las proteínas JAKs se unen a los receptores de citocinas por la región próxima a la membrana, que contiene los motivos llamados caja

1 y caja 2 (Figura 20). El motivo caja 1 es rico en prolina y es una región muy conservada mientras que el motivo caja 2 es una secuencia dominada por aminoácidos hidrofóbicos seguidos por unos aminoácidos cargados (Heinrich et al, 1998). La delección de estos motivos mediante distintas técnicas suprime la unión de JAK a los receptores de citocinas y demuestra que la superficie de interacción entre los receptores de citocinas y JAKs implica múltiples sitios de contacto (Murakami et al 1991; Haan et al, 2000; Heinrich et al, 2003).

La familia de citocinas de IL-6 activa JAK1, JAK2 y Tyk2, aunque estudios con células deficientes en JAK1 han establecido que esta proteína quinasa juega un papel central en la transducción de la señal en esta familia de citocinas (Rodig et al, 1998; Radtke et al, 2002; Heinrich et al, 2003). En el caso de la IL-6, esta citocina activa a JAK1, JAK2 y Tyk2 (Stahl et al, 1994; Lütticken et al, 1994; Narazaki et al, 1994). Estudios con células procedentes de ratones KO para JAK1 (JAK1<sup>-/-</sup>) han mostrado que la respuesta biológica a la IL-6 está suprimida. Las células de ratones KO para JAK2 (-/-), por el contrario, son capaces de responder a la IL-6. Se ha observado además que la sobreexpresión de JAK2 mediante el empleo de un dominante negativo, reprime la vía de señalización de gp130 (Guschin et al, 1995, Rodig et al 1998; Neubauer et al, 1998; Heinrich et al, 1998). A la vista de estos resultados, JAK1 y JAK2 parecen competir por los sitios de unión al receptor y ser ambos importantes en la transducción de la señal de IL-6.



**Figura 20. IL-6 activa la ruta de señalización JAK/STAT y la cascada de MAPK.** (1) IL-6 se une al IL-6R y promueve la dimerización de dos moléculas gp130 y la activación de las proteínas JAKs asociadas por los motivos caja1 y caja2 a gp130. La activación de las proteínas JAKs desencadena la fosforilación en los residuos de tirosina de gp130 que sirven de sitios de unión para moléculas que contienen dominios SH2 como STAT-3. Las cuatro tirosinas más distales (Y767, Y814, Y905, Y915) del receptor gp130 sirven de sitio de unión para STAT-3. Tras unirse al receptor gp130, STAT-3 es fosforilado por JAKs en el residuo de tirosina localizado en el extremo C-terminal. La fosforilación de STAT-3 puede ser llevada a cabo por otros receptores como RTK de EGF, PDGF, FGF, receptores no asociados a tirosina quinasas como Ret, Src o la proteína de fusión Bcl-Ab1. La fosforilación en tirosina es clave para la interacción por los dominios SH2 entre 2 moléculas STAT-3 activadas (homodímeros) o entre una molécula STAT-3 activada con un STAT-1 activado (heterodímeros). Los dímeros STAT-3 se translocan al núcleo por un mecanismo dependiente de importina  $\alpha-3$  y  $\alpha-6$ . En el núcleo, se unen a secuencias consenso en el ADN dentro de los promotores de los genes diana para activar o reprimir la transcripción de estos genes. Además, STAT-3 puede cooperar con otros FTC para regular la expresión de numerosos genes. (2) Existen tres reguladores negativos de la ruta de señalización IL-6/JAK/STAT: SOCS-3, PIAS3 y PTPs. STAT-3 activa la expresión del gen SOCS-3. SOCS-3 puede inhibir la señalización de STAT-3 de dos maneras. Una es uniéndose al receptor de citocinas gp130. Esta unión resulta en el bloqueo del reclutamiento de transductores de la señal. La segunda manera sería uniéndose a las proteínas JAKs asociadas a gp130. Esta unión inhibe la actividad quinasa de JAKs. Además, SOCS-3 actúa como un regulador positivo de la cascada de MAPK. En respuesta a distintos factores de crecimiento, SOCS-3 es fosforilado en tirosina y se une e inactiva al regulador negativo de la señalización de Ras (RasGAP), promoviendo la ruta de señalización de las MAPK. La ruta de MAPK permanece siempre activa dado que RasGTP no se transforma en RasGDP porque RasGAP permanece inactivo. PIAS3 es el segundo regulador negativo de la ruta IL-6/JAK/STAT. Su mecanismo de acción consiste en unirse a STAT-3 y/o reclutar coR para inhibir la actividad transcripcional de STAT-3. Además, PIAS3 presenta actividad ligasa SUMO E3 y lleva a cabo la SUMOilación de STAT-3. Como resultado de este proceso, se reprime la actividad transcripcional de STAT-3. La tercera clase de reguladores negativos de la ruta de señalización IL-6/JAK/STAT son las PTPs. Las PTPs (SHP-1 y SHP-2) disminuyen la activación de STAT-3 por desfosforilación directa de los dímeros STAT-3, inhibiendo la actividad transcripcional de los mismos. (3) Las proteínas JAKs en respuesta a IL-6 también fosforilan la segunda tirosina más cercana a la membrana del receptor de citocinas gp130. Esta fosfotirosina sirve de sitio de unión para moléculas que contienen dominios SH2 como SHP2. Tras unirse a gp130, SHP2 es fosforilado por JAKs y promueve su asociación con

proteínas adaptadoras como Grb2. Esta unión induce el reclutamiento de SOS que estimula la cascada Ras-Raf-MAPK que promueve la expresión de genes relacionados con supervivencia. IL-6: Interleucina-6; JAK: Proteínas tirosina quinasas Jano; STAT: Transductor de señal y activador de la transcripción; MAPK: Quinasas activadas por mitógenos; IL-6R: Receptor de IL-6; Gp130: Glicoproteína 130; SH2: Homología 2 a Scr; STAT-3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3; RTK: Receptores tirosina quinasa; EGF: Factor de crecimiento epidérmico; PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas; FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos; ADN: Ácido desoxirribonucleico; FTC: Factores de transcripción; SOCS-3: Supresor de la señalización por citocinas 3; PIAS: Proteínas inhibidoras de los STATs activados; PTPs: Proteínas tirosina fosfatasas; RasGAP: Proteína activadora de la GTPasa Ras; CoR: Corepresores transcripcionales; SUMO: Pequeños modificadores parecidos a la ubiquitina. SHP-1: Proteína tirosina fosfatasa 1 compuesta de dominios SH2; SHP-2: Proteína tirosina fosfatasa 2 compuesta de dominios SH2.

La vía de señalización de la IL-6 comienza con la unión de esta citocina a su receptor (IL-6R), lo que induce la dimerización de gp130 (Figura 20). Este proceso promueve la activación de JAKs en las células. Esta activación es posible porque dos moléculas JAKs se encuentran próximas a los dominios citoplasmáticos de las dos subunidades del receptor gp130 y permiten la trans-fosforilación (Lütticken et al, 1994; Stahl et al, 1994; Fukada et al, 1996; Rawlings et al, 2004). La activación de estas proteínas JAKs desencadena la fosforilación de residuos de tirosina en los receptores gp130 (Taga T, Kishimoto T, 1997; Hirano 1998; Dierssen et al 2008). Estos residuos sirven de sitios de unión para moléculas que contienen dominios SH2, entre las que se encuentran los factores de transcripción STAT, SOCS-3, la proteína tirosina fosfatasa 2 compuesta de dominios SH2 (SHP-2) o la proteína adaptadora shc que puede contribuir a la activación de MAPK (Hirano et al, 1994; Kuropatwinski et al, 1997; Taga T, Kishimoto T, 1997; Schmitz et al 2000; Wang et al, 2000; Radtke et al, 2002).

La familia de proteínas STAT posee funciones duales, como la transducción de la señal en el citoplasma y la activación de la expresión de genes en el núcleo. Se han identificado siete miembros en

mamíferos: STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5 (STAT-5 $\alpha$  y STAT-5 $\beta$ ) y STAT-6. Existen aproximadamente 40 polipéptidos que son capaces de activar a uno o más STATs (Darnell JE Jr 1997; Zhang et al, 2000). La mayoría de los miembros de esta familia son ubicuamente expresados, a excepción de STAT-4 que presenta un mayor nivel de expresión en testículo y en células mieloides (Herrada et al, 1994; Zhong et al, 1994). La estructura de estas proteínas está muy conservada, presentando varios dominios funcionales (Figura 19.B) (Zhang et al, 2000; Wang SW, Sun YM, 2014):

- Dominio N-Terminal: este dominio promueve que los dímeros STATs interactúen y se unan a múltiples sitios en el ADN relacionados con rutas de señalización de crecimiento oncogénico (Xu et al 2005).
- Dominio de doble espiral "coiled-coil": localizado junto al dominio N-terminal, se ha relacionado con la interacción proteína-proteína (Zhang et al, 1999). Es además esencial para la unión al receptor gp130 a través de los dominios SH2 y para la activación posterior de STATs mediada por citocinas.
- Dominio de unión al ADN: localizado junto al dominio "coiled-coil", corresponde a la región central para las proteínas STATs (excepto para STAT-2), y su función es regular la unión al ADN específica para cada STAT (Ma J, Cao X, 2006).

- Dominio conector: es una  $\alpha$ -helice localizada antes del dominio clásico SH2.
- Dominio SH2: localizado junto al dominio conector, es esencial para formar dímeros entre dos monómeros STATs activados y para la interacción con los residuos de fosfotirosina del receptor gp130 (Subramaniam et al, 2013).
- Dominio C-terminal de transactivación: se relaciona con la formación de estructuras cuando se produce la interacción con otros complejos. En ese dominio en la posición 705 existe un residuo de tirosina que juega un papel importante en la activación de STAT (excepto para STAT-2 y STAT-6), y una serina conservada en la posición 727 que regula la actividad transcripcional de STAT (Shuai 1999).

Los factores de transcripción STATs se encuentran latentes en el citoplasma hasta que son activados (Reich NC, Liu L, 2006). La activación de STATs por distintos ligandos depende de las interacciones específicas entre los dominios SH2 de estas proteínas y los residuos en fosfotirosina de cada receptor (Subramaniam et al 2013; Wang SW, Sun YM, 2014). En el caso de las citocinas de la familia IL-6, se ha observado la activación de STAT-3 y en menor medida de STAT-1 (Heinrich et al 1998; Brantley EC, Benveniste EN, 2008). En la señalización de IL-6, en particular, es necesario el reclutamiento de STAT-3 que es producido por las proteínas JAKs activadas. Estas proteínas fosforilan las cuatro tirosinas más distales (Y767, Y814, Y905, Y915) de la membrana del receptor gp130, las cuales sirven de sitios de

unión para proteínas con dominios SH2 como STAT-3 (Stahl et al, 1995; Fukada et al, 1996; Gerhartz et al, 1996; Dierssen et al, 2008). Tras dicha unión, STAT-3 va a ser fosforilado por las proteínas JAKs en el residuo de tirosina localizado en el extremo C-terminal. Esta fosfotirosina va a permitir la interacción con el dominio SH2 de un segundo STAT-3 activado o con un STAT-1 activado para formar homo o heterodímeros respectivamente (Figura 20) (Rawlings et al, 2004; Brantley EC, Benveniste EN, 2008; Abroun et al, 2015).

Los dímeros de STATs se translocan al núcleo por un mecanismo dependiente de importina  $\alpha$  y de la actividad de la GTPasa Ran. En el caso de STAT-3, la translocación al núcleo se produce por la interacción con importina  $\alpha$ -3 y  $\alpha$ -6 mientras que STAT-1 interactúa con importina  $\alpha$ -5 (Liu et al, 2005; Sekimoto et al, 1996; Heinrich et al, 1998; Rawlings et al, 2004; Germain D, Frank DA, 2007). Una vez en el núcleo, se unen a secuencias consenso en el ADN dentro de los promotores de los genes diana como son c-jun, c-myc, Jun B, proteínas potenciadoras de unión a CCAAT (C/EBP) y genes de fase aguda, para activar o reprimir la transcripción de estos genes (Hibi et al, 1996; Akira 1997; Rawlings et al, 2004; Gao 2005; Reich NC, Liu L, 2006; Brantley EC, Benveniste EN, 2008; Abroun et al, 2015). Además, se ha observado que las proteínas STATs pueden cooperar con otros factores de transcripción (FTC) para regular la expresión de numerosos genes como bcl-2, bcl-xL, mcl-1, p21WAF1/CIP1, y ciclina D1 (Fukada et al, 1996; Grandis et al, 2000; Germain D, Frank DA, 2007; Brantley EC, Benveniste EN, 2008; Abroun et al, 2015).

Además de la IL-6, existen otros ligandos que son capaces de activar a STAT-3 como son IFNs, OSM, LIF, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), FGF, EFG, IL-5, IL-11, IL-22, CNTF, el factor estimulante de colonias de macrófagos 1 (CSF-1) y la proteína morfogénica ósea 2 (BMP2) (Figura 21) (Gao 2005; Heinrich et al, 2003; Brantley EC, Benveniste EN, 2008; Abroun et al, 2015). STAT-3 puede ser fosforilado también por otras quinasas distintas a las de la familia JAK, como son los receptores de tirosina quinasa (RTK) del EGF, PDGF y FGF o receptores no asociados a tirosina quinasas como Ret, Src o la proteína de fusión Bcl-Ab1 (Figura 20) (Brantley EC, Benveniste EN, 2008). La presencia de distintos ligandos y quinasas que pueden activar STAT-3 aumenta la posibilidad de que este factor de transcripción active o reprima la expresión de genes diana en distintos procesos celulares.

STAT-3 media la expresión de una gran variedad de genes y juega un papel importante en muchos procesos celulares como el crecimiento celular y apoptosis (Abroun et al 2015). Estos eventos celulares son críticos para la hematopoyesis, desarrollo inmune y otros procesos y, por tanto, la actividad de STAT-3 debe ser finamente regulada (Rawlings et al, 2004; Brantley EC, Benveniste EN, 2008; Abroun et al, 2015).

Existen tres clases principales de reguladores negativos de la ruta JAK/STAT (Greenhalgh CJ, Hilton DJ, 2001; Rawlings et al, 2004; Brantley EC, Benveniste EN, 2008; Abroun et al, 2015):

- Las proteínas SOCS.
- Las proteínas inhibidoras de los STATs activados (PIAS).

- Las proteínas tirosina fosfatasas (PTPs).

Las proteínas SOCS constituyen uno de los reguladores negativos de la ruta JAK/STAT. Es una familia de proteínas formada por al menos ocho miembros que contienen en su estructura un dominio central SH2 y un dominio llamado caja SOCS en el extremo C-terminal. En el caso de SOCS-3 y SOCS-1 existe además una región inhibidora quinasa (KIR) en el extremo N-terminal (Figura 19.C) (Heinrich et al, 1998; Rawlings et al, 2004; Yoshimura et al, 2007; Boyle et al, 2009; Brantley EC, Benveniste EN, 2008; Abroun et al, 2015). La expresión de estas proteínas está regulada por citocinas como IL-6, LIF, IL-11, IL-27 y OSM (Endo 1997; Naka et al, 1997; Starr et al 1997; Blanchard et al, 2001; Heinrich et al, 2003; Qin et al, 2007). Estas citocinas activan a los factores de transcripción STATs que estimulan la transcripción de los genes SOCS. Las proteínas SOCS resultantes atenúan la actividad de STATs mediante la unión a las proteínas JAKs y a los receptores de citocinas fosforilados, inhibiendo esta ruta de señalización. Este mecanismo de regulación negativa llevado a cabo por SOCS se realiza a tres niveles (Starr et al, 1997; Rawlings et al, 2004; Boyle et al, 2009; Brantley EC, Benveniste EN, 2008; Abroun et al, 2015):

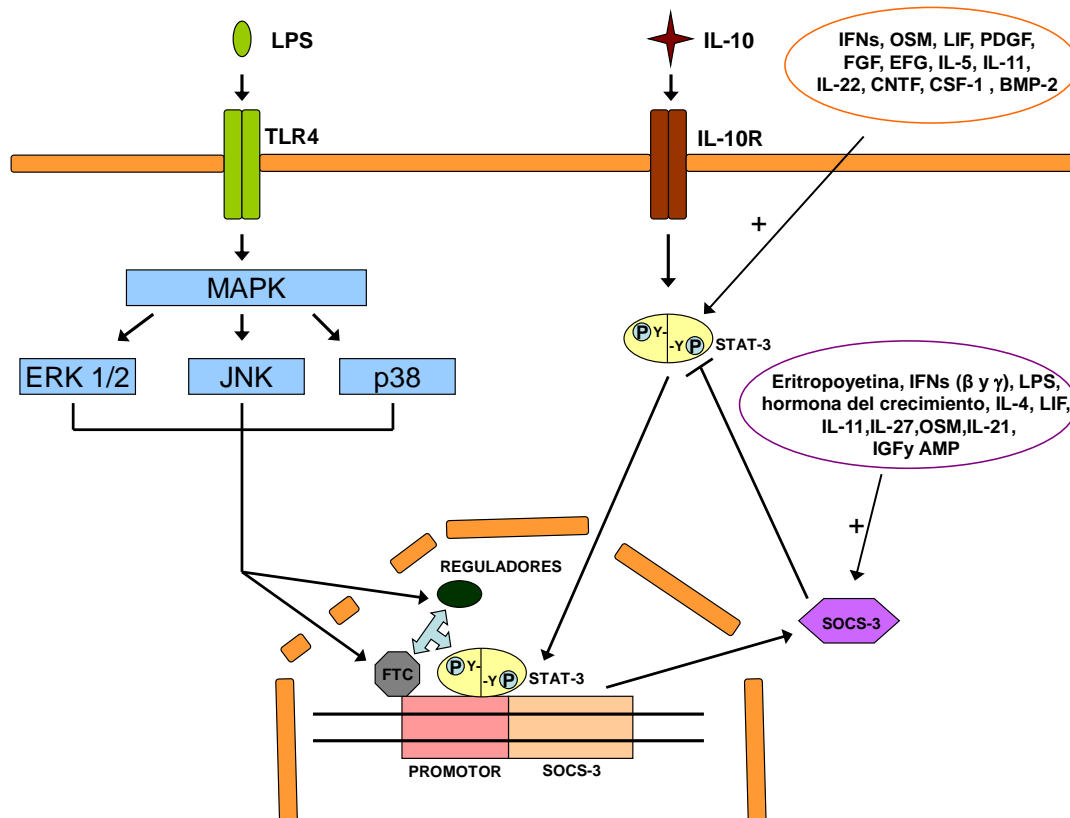
- Mediante el bloqueo del reclutamiento de transductores de la señal por la unión de estas proteínas mediante su dominio SH2 a los residuos de fosfotirosina de los receptores de citocinas.

- Mediante la inhibición de la actividad quinasa de las proteínas JAK por su unión directa a las proteínas JAKs o a los receptores de citocinas.
- Mediante la ubiquitinación de las proteínas JAKs por interacción de las proteínas SOCS con el complejo elongina BC y culina 2. Este proceso de ubiquitinación conduce a la degradación proteosomal de las proteínas JAKs y presumiblemente de los receptores de citocinas, y como consecuencia, disminuye la estabilidad de estas proteínas.

SOCS-1 y SOCS-3 inhiben la ruta de señalización de citocinas de la familia de IL-6. Su mecanismo de acción es actuar sobre las proteínas JAKs, y de esta forma inhibir la fosforilación de gp130, STATs y las proteínas JAKs en sí mismas (Starr et al, 1997; Naka et al, 1997; Heinrich et al, 2003). En la señalización de la IL-6, se activa STAT-3 que induce la expresión de SOCS-3 (Crocker et al, 2003; Qin et al, 2007; Brantley EC, Benveniste EN, 2008). Esta proteína inhibe la señalización de STAT-3 mediante la unión al receptor de citocinas gp130 y sus proteínas JAKs asociadas (Figura 20) (Starr et al, 1997; Brantley EC, Benveniste EN, 2008). SOCS-3 tiene un amplio espectro de acción y puede regular de forma positiva la ruta MAPK/ERK, inhibir la ruta de señalización de NFκB y actuar como antagonista de la señalización mediada por adenosin monofosfato cíclico (AMPc) (Cacalano et al, 2001; Hayashi et al, 2002; Bellezza et al, 2006; Qin et al, 2007).

Existen un gran número de estímulos distintos de la familia de la IL-6 que son capaces de inducir la expresión de SOCS-3 en función del

tipo celular, como por ejemplo la eritropoyetina, los IFNs ( $\beta$  y  $\gamma$ ), el LPS, la hormona del crecimiento, la IL-4, la IL-21, el factor de crecimiento insulínico (IGF) y el AMPc (Figura 21) (Adams et al, 1998; Bode et al, 1999 ; Stoiber et al, 1999; Jegalian AG, Wu H, 2002; Canfield et al, 2005; Yadav et al, 2005; Sands et al, 2006; Strengell et al, 2006; Qin et al, 2006; Qin et al, 2007). La inducción de SOCS-3 por estímulos pro-inflamatorios como LPS se produce mediante la activación de varias rutas de transducción de la señal, incluyendo la ruta de las MAPK (p38 MAPK, ERK 1/2 y quinasas c-Jun N-terminal (JNK)) y la ruta de señalización de STAT-3 mediada por IL-10. La inducción de estas rutas de señalización, junto con el reclutamiento de factores de transcripción y reguladores en el promotor del gen SOCS-3, coordina la expresión de este gen en determinados tipos celulares como los macrófagos o microglia (Qin et al, 2007). Así, no solo la activación de STAT-3 promueve la expresión de SOCS-3 sino que otras rutas de señalización, como las MAPK, son importantes en la inducción de este regulador negativo de la ruta JAK/STAT. La regulación de la señalización de citocinas es muy precisa ya que esta señalización es esencial para orquestar distintos procesos celulares (Qin et al 2007).



**Figura 21. El gen SOCS-3 es inducido por la cascada de MAPK y STAT-3.** LPS se une a su receptor (TLR4) y activa la cascada de las MAPK (ERK 1/2, JNK y p38), induciendo el reclutamiento de FTC y reguladores al promotor del gen SOCS-3. Por otro lado, IL-10 se une a su receptor y también promueve la activación de STAT-3. Además de la IL-6, existen otros ligandos capaces de activar STAT-3 como son IFNs, OSM, LIF, PDGF, FGF, EFG, IL-5, IL-11, IL-22, CNTF, CSF-1 y BMP2. Una vez activado, STAT-3 se transloca al núcleo donde también se une al promotor del gen SOCS-3. Por tanto, ambas rutas de señalización promueven la expresión del gen SOCS-3 en determinados tipos celulares. El esquema también muestra otros factores que también pueden estimular la expresión de SOCS-3 en función del tipo celular (eritropoyetina, IFNs (β y γ), LPS, hormona del crecimiento, IL-4, LIF, IL-11, IL-27, OSM, IL-21, IGF y AMPc). SOCS-3: Supresor de la señalización por citocinas 3; MAPK: Quinasas activadas por mitógenos; STAT-3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3; TLR4: Receptores tipo toll 4; ERK: Quinasas reguladas por señales extracelulares; JNK: Quinasas c-Jun N-terminal; FTC: Factores de transcripción; IL-10: Interleucina 10; IL-6: Interleucina-6; IFNs: Interferones; OSM: Oncostatina M; LIF: Factor inhibidor de leucemia; PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas; FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos; EFG: Factor de crecimiento epidérmico; IL-5: Interleucina 5; IL-11: Interleucina 11; IL-22: Interleucina 22; CNTF: Factor neurotrófico ciliar; CSF-1: Factor estimulante de colonias de macrófagos 1; BMP2: Proteína morfogénica ósea 2; LPS: Lipopolisacárido; IL-4: Interleucina 4; LIF: Factor inhibidor de leucemia; IL-11: Interleucina 11; IL-27: Interleucina 27; OSM: Oncostatina M; IL-21: Interleucina 21; IGF: Factor de crecimiento insulínico; AMPc: Adenosin monofosfato cíclico. Imagen modificada de Qin et al, 2007.

La segunda clase de reguladores negativos de la ruta de señalización JAK/STAT son las proteínas PIAS, que incluyen a los siguientes miembros PIAS1, PIAS2, PIAS3, PIAS4, PIASx y PIASy. A diferencia de las proteínas SOCS, cuya expresión es inducida, las

proteínas PIAS son expresadas constitutivamente en el núcleo. Estas proteínas se caracterizan por presentar en su estructura los siguientes dominios (Figura 19.D) (Shuai 2006; Brantley EC, Benveniste EN, 2008):

- Domino N-terminal con un motivo LXXLL, que tiene como función mediar las interacciones entre los receptores nucleares y sus co-reguladores (Glass CK, Rosenfeld MG, 2000).
- Dominio PINIT (Prolina-Isoleucina-Asparagina-Isoleucina-Treonina), implicado en la retención nuclear de PIAS3 y en la actividad ligasa de pequeños modificadores parecidos a la ubiquitina (SUMO) E3 (Duval et al, 2003).
- Dominio central de dedo de zinc "RING". El acrónimo "RING" proviene de sus siglas en inglés "Really Interesting New Gene". Es el dominio más conservado de esta familia de proteínas y es esencial para llevar a cabo la actividad ligasa SUMO E3 (Jackson 2001; Duval et al, 2003).
- Dominio ácido C-terminal (AD), contiene un motivo de interacción SUMO1 presente en todos los PIASs, excepto en PIASy (Minty et al, 2000).
- Dominio rico en serina/treonina (S/T), que se encuentra en todos los PIASs, excepto en PIASy.

Las proteínas PIAS inhiben la actividad transcripcional de las proteínas STATS mediante su unión a los dímeros STATs activados a través de su dominio N-terminal, evitando que se unan al ADN (Figura

20). En el caso de la señalización de IL-6, se ha observado que PIAS3 se une a STAT-3 y regula su actividad transcripcional (Chung et al, 1997; Brantley EC, Benveniste EN, 2008). Estas proteínas son capaces también de reclutar co-represores transcripcionales (CoR), como las histonas deacetilasas, en los promotores de los genes diana, inhibiendo de esta manera la transcripción de los mismos (Imoto et al, 2003; Long et al, 2003; Shuai 2006; Brantley EC, Benveniste EN, 2008). Además, algunas proteínas PIAS, como es el caso de PIAS3, presentan actividad ligasa SUMO E3 y son capaces de llevar a cabo un proceso denominado como SUMOilación. Este proceso consiste en una modificación postraduccional mediante la cual algunas proteínas celulares son covalentemente modificadas mediante la adición de otra pequeña proteína llamada SUMO que reprime la actividad transcripcional de la proteína que ha sufrido esta modificación. Entre las consecuencias de la SUMOilación, se encuentra la inhibición de la actividad transcripcional de varios FTC, entre los que se incluyen p53, c-Jun y c-Myb (Schmidt et al, 2002; Verger et al, 2003; Shuai K, Liu B, 2005; Sharrocks et al, 2006; Shuai 2006; Brantley EC, Benveniste EN, 2008).

La tercera clase de reguladores negativos de la ruta de señalización JAK/STAT son las PTPs. Estas proteínas revierten la actividad de las proteínas JAKs y, como consecuencia, inhiben la fosforilación de las proteínas diana de estas proteínas JAKs en el citoplasma y en el núcleo. La tirosina fosfatasa 1 compuesta de dominios SH2 (SHP-1) es una de las más caracterizadas. SHP-1 se une mediante sus dominios SH2 a las proteínas JAKs o receptores de

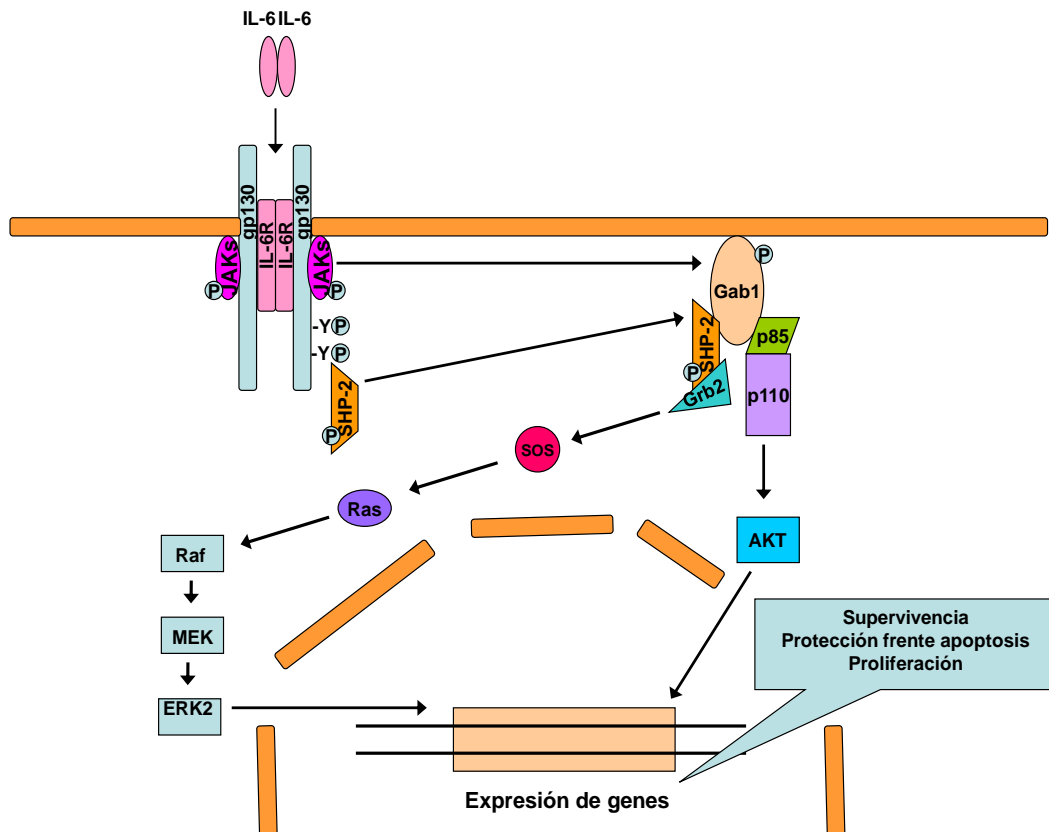
citocinas fosforilados, promoviendo la defosforilación de estas moléculas de señalización activadas (Rawlings et al, 2004; Brantley EC, Benveniste EN, 2008; Abroun et al, 2015). En la señalización de IL-6, las proteínas tirosina fosfatasas SHP-1 y SHP-2 son las que disminuyen la activación de STAT-3 por defosforilación directa de los complejos STAT-3, inhibiendo la actividad transcripcional de STAT-3 (Figura 20) (Rakesh K, Agrawal DK, 2005; Brantley EC, Benveniste EN, 2008).

La activación de la ruta de señalización JAK/STAT puede mediar el reclutamiento de otras moléculas implicadas en la transducción de la señal, como las quinasas de la familia Src, Ras-Raf-MAPK y la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K). La relación entre estas cascadas es compleja, existiendo cruces a múltiples niveles entre estas rutas de señalización (Rane SG, Reddy EP, 2000; Rawlings et al, 2004; Kim et al, 2009; Abroun et al, 2015). El mecanismo por el cual estas rutas de señalización se cruzan es a través de las proteínas JAKs. Estas proteínas activadas pueden fosforilar residuos de tirosinas en los receptores de citocinas asociados, que sirven como sitios de unión para proteínas adaptadoras de otras rutas de señalización que contienen dominios SH2.

En la señalización de la IL-6, se ha observado que las proteínas JAKs fosforilan la segunda tirosina más cercana a la membrana del receptor de citocinas gp130, y esta fosforilación se ha asociado con la ruta de señalización Ras/Erk (Figura 20) (Dierssen et al, 2008; Eulenfeld et al, 2012). La señalización de la IL-6 recluta a proteínas adaptadoras como SHP2, que se unen al receptor gp130 mediante sus

dominios SH2. Esta unión induce la fosforilación de SHP2 por parte de JAKs y su asociación con proteínas adaptadoras como Grb2. La unión de Grb2, induce el reclutamiento de SOS que estimula la cascada Ras-Raf-MAPK. Esta ruta es conocida por estar implicada en procesos celulares que mantienen la supervivencia celular (Ogata et al, 1997; Schiemann et al, 1997; Heinrich et al, 2003; Rawlings et al, 2004).

El mismo mecanismo estimula a otras cascadas de señalización, como la activación de la ruta PI3K/AKT. En respuesta a IL-6, el reclutamiento y la fosforilación de la proteína adaptadora Gab1 por parte de JAKs activadas, se relaciona con la unión a p85/p110 PI3K que conduce a la activación de AKT (Figura 22) (Takahashi-Tezuka et al, 1998; Heinrich et al, 2003). La activación inducida por IL-6 de la ruta PI3K/AKT está implicada en funciones como protección frente a apoptosis y en aumentar la proliferación de células de mieloma múltiple (Jee et al, 2002; Hsu et al, 2002; Heinrich et al, 2003).



**Figura 22. IL-6 activa la ruta de señalización PI3K/AKT.** IL-6 activa a las proteínas JAKs, las cuales reclutan y fosforilan a la proteína adaptadora Gab1. Esta proteína se une a PI3K (p85 y p110), activando AKT. AKT se transloca al núcleo donde promueve la expresión de genes relacionados con protección frente apoptosis y proliferación. Además, Gab1 está relacionado con la ruta de MAPK. En respuesta a IL-6, Gab1 es fosforilado por JAKs activadas e interactúa con la proteína adaptadora SHP2 que va a ser fosforilada por JAKs y va a unirse a otra proteína adaptadora Grb2. Esta unión induce el reclutamiento de SOS, el cual estimula la cascada Ras-Raf-ERK2 que promueve la expresión de genes relacionados con supervivencia. IL-6: Interleucina-6; PI3K: Fosfatidilinositol 3 quinasa; AKT: Proteína quinasa B; JAK: Proteínas tirosina quinasa Jano; MAPK: Quinasas activadas por mitógenos; SHP-2: Proteína tirosina fosfatasa 2 compuesta de dominios SH2; ERK: Quinasas reguladas por señales extracelulares. Imagen modificada de Takahashi-Tezuka et al, 1998.

El hecho de que Gab1 también está implicado en la activación de la cascada Ras-Raf-MAPK añade otro grado de complejidad. En respuesta a IL-6, Gab1 es fosforilado por las proteínas JAKs activadas e interactúa con la proteína adaptadora SHP2, resultando en la activación de ERK2 (Figura 22) (Takahashi-Tezuka et al, 1998; Heinrich et al, 2003).

Indirectamente, la ruta de señalización JAK/STAT también promueve la activación de Ras a través de la activación transcripcional de SOCS-3 (Figura 20). SOCS-3 es fosforilado en tirosina en respuesta a distintos factores de crecimiento, uniéndose e inactivando un regulador negativo de la señalización de Ras (RasGAP, proteína activadora de la GTPasa Ras). Como consecuencia, SOCS-3 puede promover la ruta de señalización de las MAPK al mantener activada a la proteína RasGTP (Cacalano et al, 2001; Heinrich et al, 2003; Rawlings et al, 2004).

Las funciones de las proteínas STATs activadas pueden además ser modificadas mediante la asociación con otros FTC y cofactores regulados por otras rutas de señalización. En definitiva, es necesario integrar todas las rutas de señalización implicadas tras la estimulación de IL-6 para entender las consecuencias biológicas de la estimulación por esta citocina (Heinrich et al, 2003; Rawlings et al, 2004).

## **2.2.- IL-6 EN EL SISTEMA INMUNE**

La inflamación es un proceso bien orquestado diseñado para combatir la infección o el daño en el tejido. La respuesta inflamatoria es una manera mediante la que el organismo reconoce y se defiende a sí mismo contra bacterias, virus y sustancias extrañas y dañinas. Así, la respuesta inflamatoria surge con el fin defensivo de aislar y destruir al agente dañino, así como de restaurar la arquitectura normal del tejido u órgano dañado. El control inapropiado de este mecanismo natural de

defensa contribuye a la progresión de enfermedades crónicas (Jones 2005).

El resultado del episodio inflamatorio va a depender de la comunicación entre leucocitos y las células residentes en el sitio donde se produce la infección o el daño. La existencia de mediadores que alteran el patrón de la respuesta inmune es clave para restaurar la arquitectura normal del tejido dañado y finalizar el proceso inflamatorio (Jones 2005). En 1968, se descubrió el papel de los linfocitos T y B en la producción de anticuerpos (Miller JF, Mitchell GF, 1968; Claman et al, 1968). Este descubrimiento permitió conocer que los linfocitos B necesitan la presencia de linfocitos T para producir anticuerpos. Estos resultados llevaron a la idea de que los linfocitos T podrían producir ciertos factores inductores del crecimiento y diferenciación de los linfocitos B (Kishimoto 2010). En este contexto, la primera función de IL-6 conocida fue como un factor que aumentaba la producción de anticuerpos en los linfocitos B (Hirano et al, 1985). Estudios posteriores mostraron que ratones IL-6 KO (IL-6<sup>-/-</sup>) presentaban una respuesta alterada a las infecciones, con defectos severos en la producción de anticuerpos regulada por linfocitos T (Kopf et al, 1994). Más recientemente, se ha observado que la IL-6 promueve la producción de anticuerpos en linfocitos B indirectamente mediante la inducción de IL-21 en linfocitos T CD4<sup>+</sup>, la cual actuaría posteriormente sobre los linfocitos B (Dienz et al, 2009; Eddahri et al, 2009; Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011). La IL-6 podría ser, por tanto, un potencial coadyuvante para aumentar la inmunidad humoral.

En la resolución de cualquier episodio inflamatorio es clave la transición de la respuesta inmune innata a respuesta inmune adquirida. La inflamación aguda se caracteriza por un infiltrado inicial de neutrófilos que tras 24-48 horas es reemplazado por monocitos y linfocitos T. Este reemplazamiento previene que en el sitio de la inflamación se produzca mayor daño por la acumulación de especies reactivas de oxígeno y proteasas liberadas por los neutrófilos (Topley et al, 1996; Jones 2005; Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D et al, 2011). El reclutamiento de neutrófilos en las fases iniciales de la inflamación es consecuencia de la liberación de quimiocinas producidas por células endoteliales y otros elementos vasculares activados. Sin embargo, el reemplazamiento posterior de neutrófilos a monocitos se produce por el reemplazo de las quimiocinas que atraen neutrófilos por las quimiocinas que atraen monocitos, un cambio que está regulado por la IL-6. Esta regulación es llevada a cabo mediante la trans-señalización de IL-6 en las células residentes del sitio inflamado. El procesamiento mediante proteólisis de IL-6R presente en la membrana de los neutrófilos que invaden el sitio inflamado, favorece que se produzca la trans-señalización de IL-6 en las células residentes y promueve el cambio de reclutamiento de neutrófilos a monocitos (Romano et al, 1997; Hurst et al, 2001; Marin et al, 2001; Jones 2005; Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011). Así, los ratones IL-6 KO (IL-6<sup>-/-</sup>) expuestos a LPS presentan un mayor infiltrado de neutrófilos en el sitio de infección que los ratones salvajes (Xing et al, 1998). Otros estudios han mostrado que la trans-señalización de IL-6 aumenta la

transmigración de leucocitos. El cambio en el patrón de quimiocinas necesario para el reclutamiento de monocitos se complementa por la capacidad de la trans-señalización de IL-6 de modular la expresión de moléculas de adhesión tipo ICAM-1, molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1), CD62E (selectina E) en células endoteliales y CD62L (selectina L) en linfocitos T (Oh et al, 1998; Kaplanski et al, 2003; Chen et al, 2004; Jones 2005; Chen et al, 2006; Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011).

Para la transición de la respuesta inmune innata a adquirida, no sólo es necesario el reclutamiento de monocitos, sino que también es preciso una eficiente activación de la apoptosis de leucocitos (Atreya et al, 2000; Pope 2002; Savill et al, 2002; Jones 2005). En este sentido, se ha observado que la IL-6 induce la apoptosis de neutrófilos que contribuye de forma substancial a la resolución del infiltrado de estos leucocitos (Kaplanski et al, 2003; Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011).

Estudios con ratones IL-6 KO (IL-6 -/-) han revelado que la IL-6 es necesaria también para el reclutamiento de linfocitos T. La trans-señalización de IL-6 desencadena la expresión de quimiocinas atrayentes de linfocitos T (McLoughlin et al, 2005; Jones 2005; Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011) y aumenta la adhesión de los linfocitos T por activación de CD62 (Chen et al, 2004; Jones 2005). Además, se ha observado que la IL-6 rescata a los linfocitos T de entrar en apoptosis y protege de la muerte celular mediada por Fas. El control de este proceso parece depender de STAT-3, el cual dirige la expresión

de reguladores anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>) y modula la expresión en superficie de Fas (Atreya et al, 2000; Kovalovich et al, 2001; Narimatsu et al, 2001; Curnow et al, 2004; Jones 2005; Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011).

Además del papel de IL-6 en el reclutamiento de monocitos y linfocitos T, la trans-señalización de IL-6 es capaz de cambiar la diferenciación de monocitos a macrófagos al inducir la expresión del receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) (Chomarat et al, 2000; Jones 2005; Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, 2011). Estudios con ratones Knock-in para gp-130 han mostrado que la expresión del receptor M-CSF está directamente relacionada con la expresión de la cascada de señalización MAPK-ERK vía gp130 e inversamente relacionada con la activación de STAT-3 vía gp130 (Jenkins et al, 2004; Jones 2005; Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011).

La IL-6 también influencia la diferenciación de células T nativas a células T reguladoras o células T activadoras (T helper). En este contexto, se ha descrito que la IL-6 promueve la diferenciación a células T<sub>H2</sub> y T<sub>H17</sub>. Mediante dos mecanismos moleculares independientes, la IL-6 promueve la diferenciación a células T<sub>H2</sub> y simultáneamente inhibe la polarización de T<sub>H1</sub>. Por un lado, la IL-6 activa la transcripción del factor nuclear de células T activadas (NFAT) que promueve la expresión de IL-4 en células T nativas y su diferenciación a células T<sub>H2</sub>. Por otro lado, la represión de la diferenciación de células T<sub>H1</sub> por IL-6 es dependiente de la inducción de la expresión de SOCS-1 que interfiere

con la señalización de  $\text{IFN}\gamma$  y en el desarrollo de las células  $\text{T}_{\text{H}1}$  (Diehl et al, 2002; Jones 2005; Sofi et al, 2009; Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011). Además, la IL-6 bloquea la diferenciación de las células T nativas a células T reguladoras mediante la inhibición de  $\text{TGF}\beta$ , y la combinación de  $\text{TGF}\beta$  e IL-6 promueve el desarrollo a células  $\text{T}_{\text{H}17}$ . Estas células están implicadas en el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Bettelli et al, 2006; Mangan et al, 2006; Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011). Es interesante que la trans-señalización de IL-6, y no sólo la IL-6, es la encargada de bloquear la diferenciación de células T nativas a células T reguladoras y de inducir la diferenciación a células  $\text{T}_{\text{H}17}$  (Dominitzki et al, 2007; Jones et al, 2010; Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011). Más recientemente, se ha demostrado que la diferenciación de células  $\text{T}_{\text{H}17}$  puede ocurrir en ausencia de  $\text{TGF}\beta$ , mediante la combinación de IL-6 con otras citocinas como la IL-23 y la IL-1 $\beta$ . En este sentido, la IL-6 es también importante para regular la expresión del receptor de IL-23 en células T nativas mediante la inducción de STAT-3 (Ghoreschi et al, 2010; Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011).

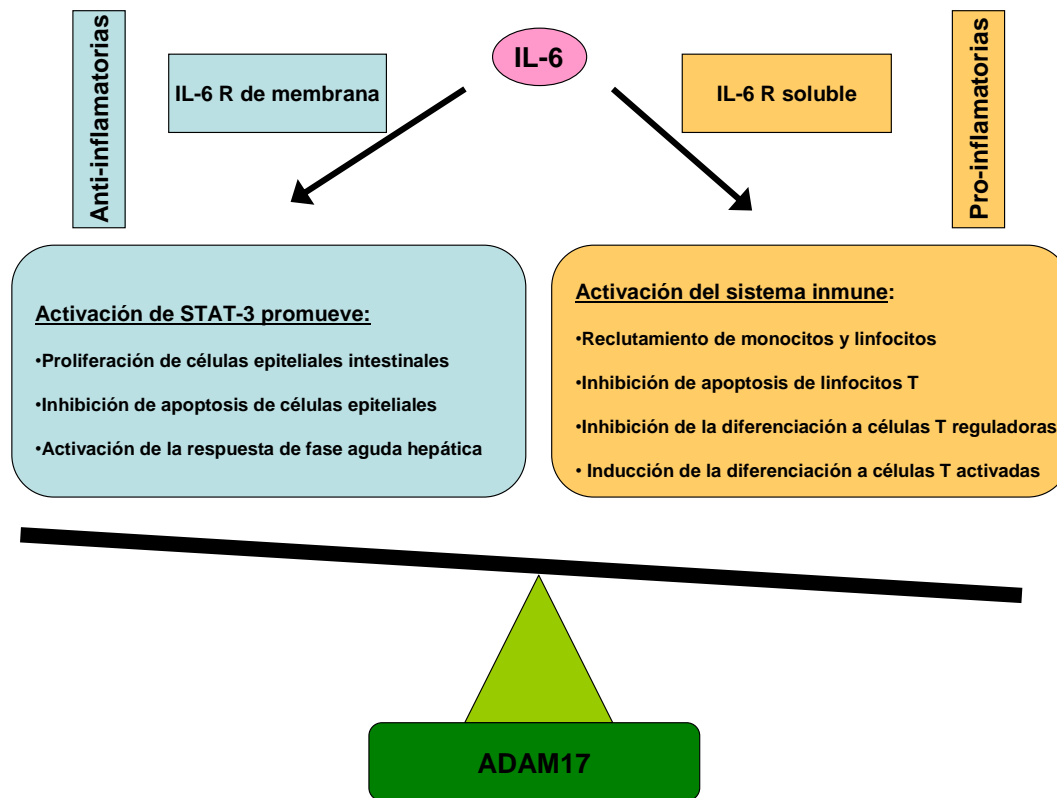
Todas estas observaciones, por tanto, sugieren que la IL-6 es una citocina pro-inflamatoria cuya principal función es activar al sistema inmune para eliminar a los patógenos que invaden el tejido dañado. En este sentido, es bien conocido que los niveles de IL-6 en suero aumentan rápidamente tras una infección o inflamación en un órgano. Esto explica que se utilice como un marcador diagnóstico para detectar condiciones inflamatorias, especialmente en sepsis (Karin et al, 2006;

Jekarl et al, 2013; Hammerich L, Tacke F, 2014). Cuando el estímulo que induce el daño es eliminado, la producción de interleucinas ya no es necesaria y la inflamación disminuye. Sin embargo, si la inflamación persiste puede llegar a ser crónica e inducir una gran variedad de enfermedades inflamatorias que pueden tener consecuencias letales para el organismo. De acuerdo con este escenario, se ha observado que los niveles de IL-6 en suero e intrahepáticos están elevados en pacientes con enfermedades crónicas y agudas hepáticas (Karin et al, 2006; Streetz KL, Tacke F, et al, 2003; Hammerich L, Tacke F, 2014).

La IL-6 es una citocina pleiotrópica con propiedades tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias. Se ha postulado que cada una de estas propiedades de la IL-6 pueden estar relacionadas con el tipo de señalización de la misma (Figura 23). Durante el desarrollo de inflamación en una infección, la IL-6 funciona como una citocina pro-inflamatoria mediante el sistema de trans-señalización de IL-6. La trans-señalización de IL-6 promueve el reclutamiento de monocitos y linfocitos, inhibe la apoptosis de linfocitos T, suprime el desarrollo de células T reguladoras y favorece la diferenciación a células T activadas. Sin embargo, la señalización clásica de IL-6 conduce a la activación de STAT-3 que promueve las propiedades anti-inflamatorias o regenerativas de esta citocina. Entre las propiedades anti-inflamatorias de IL-6 se encuentran la regeneración de las células epiteliales intestinales y la supresión de la apoptosis de células epiteliales. Así, se ha observado que los ratones KO para IL-6 (IL-6<sup>-/-</sup>) presentan mayor inflamación tras la aplicación de un daño que los ratones salvajes. Este

hecho se debe a que mediadores anti-inflamatorios como IL-6 son producidos para proteger al organismo de una respuesta inmune exagerada y limitar el daño en el tejido inflamado. Además, se ha observado que la presencia de la IL-6 es necesaria para que exista una regeneración de las células epiteliales intestinales dañadas. Esta capacidad regenerativa es dependiente de los efectos pro-proliferativos y pro-supervivencia de esta citocina mediados gracias a la activación de STAT-3 por la señalización clásica de IL-6. Como consecuencia, este tipo de señalización protege a las células epiteliales de la apoptosis y favorece su regeneración (Becker et al, 2004; Grivennikov et a, 2009; Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011; Rose-John 2012). También se ha observado que la IL-6 ejerce propiedades anti-inflamatorias, como la inhibición de la activación de la respuesta de fase aguda hepática. En un modelo de sepsis de ligadura cecal y punción, se observó que la activación de proteínas de fase aguda hepática, se inhibió con el bloqueo de IL-6 con anticuerpos, pero no con el bloqueo de la trans-señalización de IL-6. (Barkhausen et al, 2011; Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011; Rose-John 2012). Este ejemplo sugiere que las propiedades anti-inflamatorias de IL-6 se deben a la señalización clásica de esta citocina mediante IL-6R de membrana presente en las células epiteliales intestinales. IL-6R puede ser liberado principalmente por proteasas como ADAM 17. Estudios con ratones knock-in han demostrado el papel de ADAM17 en controlar la inflamación y la regeneración en los tejidos (Müllberg J, Schooltink H,

1993; Chalaris et al, 2010; Scheller J, Chalaris A, Garbers C et al, 2011; Rose-John 2012).



**Figura 23. Propiedades pro-inflamatorias y anti-inflamatorias de IL-6.** Las propiedades anti-inflamatorias de IL-6 dependen de la señalización clásica de esta citocina a través de IL-6R de membrana. IL-6R de membrana promueve la activación de STAT-3 y este factor de transcripción induce la regeneración de células epiteliales intestinales, inhibe la apoptosis de células epiteliales, y activa la respuesta de fase aguda hepática. Las propiedades inflamatorias de IL-6 dependen, por el contrario, de la trans-señalización de esta citocina a través de s-IL-6R. El receptor soluble junto con IL-6 inducen la activación del sistema inmune por el reclutamiento de monocitos y linfocitos al área inflamada, e inhiben la apoptosis de linfocitos T en la zona dañada y la diferenciación de células T nativas a células T reguladoras. Finalmente, la trans-señalización de IL-6 también promueve la diferenciación de células T nativas a células T activadas. IL-6: Interleucina-6; IL-6R: Receptor de IL-6; STAT-3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3; s-IL6R: Receptor soluble de IL-6. Imagen modificada de Rose-John 2012.

### 2.3.- IL-6 Y LA RESPUESTA DE FASE AGUDA

La respuesta de fase aguda es una respuesta del organismo a alteraciones en su homeostasis debido a una infección, un daño tisular, un crecimiento neoplásico o a trastornos inmunológicos. Esta respuesta

incluye fiebre, leucocitosis, disminución de concentraciones séricas de hierro y zinc, incremento en el ratio de sedimentación de eritrocitos, incremento en la secreción de hormona adrenocorticotropa (ACTH) y glucocorticoides, activación del complemento y cascadas de coagulación, balance negativo en el metabolismo del nitrógeno y modificación importante en la síntesis hepática de proteínas de fase aguda (Heinrich et al, 1990; Tanaka et al, 2014).

Estas proteínas de fase aguda son un conjunto de proteínas que aumentan su producción (proteínas de fase aguda positivas) y otras que disminuyen su producción (proteínas de fase aguda negativas). Entre las proteínas de fase aguda se incluyen la proteína C reactiva (CRP), el amiloide A en suero (SAA), la haptoglobina, el fibrinógeno y la  $\alpha$ 1-antiquimotripsina (Gauldie et al, 1987; Tanaka et al, 2014; Schmidt-Arras D, Rose-John S, 2016). Este grupo de proteínas desempeñan distintas funciones. Algunas proteínas de fase aguda son componentes del sistema del complemento y de la cascada de coagulación. Otras proteínas de fase aguda son inhibidores de proteasas, proteínas de transporte o participantes de respuestas inflamatorias como la fosfolipasa A2 secretada (Baumann H, Gauldie J, 1994; Gabay C, Kushner I, 1999; Schmidt-Arras D, Rose-John S, 2016). La IL-6 se considera el mayor inductor de las proteínas de fase aguda. La IL-6 es secretada en el sitio donde se produce el daño por neutrófilos, monocitos y macrófagos tras ser estimulados por antígenos como LPS. Además, la producción y secreción de la IL-6 puede proceder de otras células, como las células endoteliales y los fibroblastos. En estas

células, la producción de IL-6 es inducida por otras citocinas inflamatorias como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , que a su vez son secretadas por células mieloides activadas (Bode et al, 2012; Schmidt-Arras D, Rose-John S, 2016). La IL-6 sintetizada en el tejido dañado llega a través del torrente sanguíneo al hígado, donde estimula la producción por los hepatocitos de un amplio rango de proteínas de fase aguda (Gauldie et al, 1987; Heinrich et al, 1990; Tanaka et al, 2014; Schmidt-Arras D, Rose-John S, 2016).

La respuesta de fase aguda tras daño tisular o infección está inhibida en ratones IL-6 KO (IL-6 $^{-/-}$ ). Sin embargo, la respuesta de fase aguda tras la inyección de LPS es casi normal en estos ratones. Una posible explicación es que otras citocinas de la familia de la IL-6, como por ejemplo la IL-11, LIF, OSM, CNTF o CT-1, pueden inducir la síntesis de proteínas de fase aguda en hepatocitos o células de hepatoma. Por tanto, a estas citocinas de la familia de la IL-6 también se les considera participantes en la patofisiología hepática (Schooltink et al, 1992; Kopf et al, 1994; Richards et al, 1996; Schmidt-Arras D, Rose-John S, 2016).

La duración de la respuesta de fase aguda es de 24-48 horas, tras las cuales el organismo recupera la función hepática normal. En condiciones graves, como ocurre en un cáncer avanzado y en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, la respuesta de fase aguda se puede convertir en un estado crónico de inflamación (Baumann H, Gauldie J, 1994; Gabay C, Kushner I, 1999; Schmidt-Arras D, Rose-John S, 2016). En este contexto de estados crónicos de inflamación, la IL-6 ha sido identificada como el principal factor responsable de la

discrepancia entre sexos observada en el desarrollo de carcinoma hepatocelular (Naugler et al, 2007; Yeh SH, Chen PJ, 2010; Hammerich L, Tacke F, 2014). En pacientes con fallo hepático fulminante o en enfermedades crónicas del hígado, los niveles de IL-6 en suero y tejido hepático se correlacionan con progresión de la enfermedad (Streetz KL, Tacke F et al, 2003; Streetz KL, Wüstefeld T et al, 2003; Hammerich L, Tacke F, 2014). Al contrario que su papel patogénico en cáncer, la IL-6 parece tener una función protectora durante la fibrogénesis hepática (Kovalovich et al, 2000; Nasir et al, 2013; Hammerich L, Tacke F, 2014).

#### **2.4.- IL-6 EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA**

Tras una HP o un daño hepático, el LPS y otros factores procedentes del intestino activan a las células de Kupffer residentes en el hígado para producir IL-6. La secreción de esta citocina es dependiente de  $TNF\alpha$ , que tras su unión a su receptor TNFR1 induce la activación de  $NF\kappa B$  y estimula la síntesis de IL-6. La unión de IL-6 a IL-6R en los hepatocitos desencadena la activación de STAT-3. Este factor de transcripción es responsable de la inducción de hasta el 40% de los genes de respuesta precoz inmediata que son activados durante la regeneración hepática. En el hígado, la ruta de señalización de IL-6/JAK/STAT-3 promueve la expresión de genes implicados en la regeneración hepática, la respuesta de fase aguda y hepatoprotección. Además, esta citocina juega un papel importante en regular su propia ruta de señalización, induciendo a través de STAT-3 la expresión del

inhibidor SOCS-3 (Figura 8) (Libermann TA, Baltimore D, 1990; Taub 2004; Fausto et al 2006; Jia 2011).

En los últimos años ha existido una gran controversia en cuanto al papel exacto de la IL-6 en la regeneración hepática. Los primeros estudios establecieron un papel pro-proliferativo de esta citocina, pero estudios posteriores han demostrado que esta citocina tiene también efectos de pro-supervivencia y hepato-protección, así como efectos anti-proliferativos.

#### **2.4.1.- Efectos pro-proliferativos de IL-6**

El primer estudio que relaciona la IL-6 con la regeneración hepática fue realizado por Cressman et al en 1996, observando que la regeneración hepática tras una HP estaba retrasada en ratones KO para IL-6 (IL-6<sup>-/-</sup>). Estos ratones presentaban un retraso en la proliferación de hepatocitos y anomalías en la fase G1 del ciclo celular, incluyendo la falta de activación de STAT-3 y diversas irregularidades en la expresión génica. Estos defectos estaban limitados a los hepatocitos, ya que la síntesis de ADN fue normal en las NPCs. Los ratones IL-6 KO también presentaron tras la cirugía áreas de necrosis hepatocelular y fallo hepático, así como una mayor mortalidad que los ratones salvajes. Una única inyección de IL-6 antes de la cirugía pudo rescatar a este fenotipo (Cressman et al, 1996; Taub 2004; Böhm et al, 2010). Este estudio, por tanto, reveló un papel importante de la IL-6, mediado por la activación de STAT-3, en la proliferación de los hepatocitos.

El defecto que existe en la regeneración hepática en ratones IL-6 KO podría estar explicado por el gran número de genes que son activados por IL-6 en el hígado tras una HP. Es conocido que aproximadamente el 40% de los genes de respuesta precoz inmediata activados durante la regeneración hepática son regulados, al menos en parte, por IL-6. Sin embargo, la administración directa de IL-6 a ratones IL-6 KO en ausencia de HP induce muchos menos genes que los expresados tras esta cirugía. Estos datos indican que la IL-6 coopera con otros factores inducidos tras la HP para activar la expresión del resto de genes y, de esta forma, iniciar el proceso regenerativo (Li et al, 2001; Taub 2004).

Estudios posteriores usando los mismos ratones IL-6 KO, sin embargo, han realizado observaciones conflictivas en cuanto al papel de la IL-6 en la regeneración hepática. En 1999, Sakamoto et al. mostraron que el pico de proliferación de los hepatocitos sólo estaba reducido en el 20-30% de ratones IL-6 KO comparados con ratones salvajes tras una HP. Estos ratones IL-6 KO presentaban un retraso en la recuperación de la masa hepática pero no presentaban un incremento de mortalidad en comparación con los ratones salvajes (Sakamoto et al, 1999). En esta línea, dos estudios posteriores también demostraron que un número considerable de ratones IL-6 KO presentaban una regeneración hepática tras HP similar a los ratones salvajes (Wuestefeld et al, 2003; Sun et al; 2005). La administración de altos niveles de IL-6 en ratones inmunodeficientes, sin embargo, se asoció a un aumento de la proliferación de hepatocitos y hepatomegalia que estuvo mediado por la

activación de las vías de señalización de MAPK/ERK y STAT-3 (Zimmers TA, McKillop IH, et al, 2003). Una posibilidad es que estos resultados contradictorios con respecto al papel de la IL-6 en la regeneración hepática sean resultado de diferencias técnicas, como por ejemplo el uso de ratones con diferentes background genéticos, distintos procedimientos quirúrgicos, o diferentes procedimientos anestésicos (Böhm et al, 2010; Wang et al, 2011).

Otros estudios sugieren que el estímulo de la IL-6 es insuficiente para iniciar el proceso regenerativo y que es necesaria la presencia de IL-6 junto con su receptor soluble para inducir la regeneración hepática. En este sentido, estudios con modelos de ratones transgénicos para sIL-6R humano mostraron que este receptor actúa como una proteína transportadora en suero de IL-6, prolongando la vida media de la IL-6 en plasma. Ratones doble transgénicos que expresaban IL-6 humano y sIL-6R humano mostraron una proliferación de hepatocitos continua e hiperplasia hepatocelular. En estos ratones, el 90% de los hepatocitos se encontraban en fase S del ciclo celular, comparado con menos del 10% de los hepatocitos en ratones transgénicos para IL-6 o salvajes. Estas evidencias han llevado a plantear la hipótesis de que la IL-6 junto con su receptor soluble, y no solo la IL-6 de forma aislada, podrían ser el estímulo mitogénico necesario para la regeneración hepática. (Peters et al, 1996; Peters et al, 1997; Schirmacher et al, 1998; Peters et al, 2000; Schmidt-Arras D, Rose-John S, 2016).

El desarrollo de la herramienta Hiper-IL-6 ha permitido analizar la respuesta de las células a la IL-6 o al complejo de trans-señalización

de IL-6/sIL-6R. Hiper-IL-6 es una proteína de fusión artificial compuesta por IL-6 humana unida covalentemente por un péptido flexible a sIL-6R humano (Fischer et al, 1997). Cuando los ratones fueron tratados con Hiper-IL-6 tras una HP del 50%, el aumento del peso del hígado se aceleró entre las 36 y 72 horas de la cirugía, y este aumento de peso hepático fue debido principalmente a una rápida inducción de la proliferación de hepatocitos (Peters et al, 2000; Schmidt-Arras D, Rose-John S, 2016). Interesantemente, la administración de Hiper-IL-6 y no de IL-6, rescató del daño hepático inducido por D-galactosamina y mejoró la supervivencia de los animales. En ratones tratados con D-galactosamina, la administración de adenovirus codificantes de la proteína de fusión Hiper-IL-6 se asoció a la supervivencia del 90% de los ratones, comparado con solo el 21% de supervivencia en ratones que recibieron adenovirus codificantes de IL-6. Estos resultados sugieren que la trans-señalización de IL-6 via sIL-6R mejora y acelera la regeneración hepática, apoyando un papel fisiológico para sIL-6R en este proceso (Galun et al, 2000; Hecht et al, 2001; Jones SA, Rose-John S, 2002; Schmidt-Arras D, Rose-John S, 2016).

#### **2.4.2.- Efectos pro-supervivencia y de hepatoprotección de la IL-6**

En el año 2003, Blindenbacher et al. observaron que la IL-6 era importante para la supervivencia de los ratones tras una HP. Aunque los ratones IL-6 KO tenían una alta mortalidad, encontraron que la

proliferación de hepatocitos en aquellos ratones IL-6 KO que sobrevivían tras una HP era similar a la de los ratones salvajes (Blindenbacher et al, 2003). En esta misma línea, estudios posteriores observaron que la IL-6 podría tener un papel importante en proteger al hígado durante la regeneración hepática (Wuestefeld et al, 2003; Zimmers TA, Pierce RH, et al, 2003; Gao 2005). A la vista de todos estos resultados, se ha sugerido que el efecto mitogénico de la IL-6 en la regeneración hepática no es tan esencial como la respuesta adaptativa inducida por esta citocina tras la HP que es requerida para la supervivencia (Taub 2004; Böhm et al, 2010).

Los análisis más detallados sobre el papel de IL-6 en hepatoprotección se han realizado en ratones IL-6 KO (IL-6<sup>-/-</sup>). Estos ratones son mas susceptibles al daño hepático producido por múltiples compuestos, como el tetracloruro de carbono (Kovalovich et al, 2000), Fas (Kovalovich et al, 2001), el etanol (Hong F, Kim WH, et al, 2002), la concavalina A (Hong F, Jaruga B, et al, 2002) y el paracetamol (Masubuchi et al, 2003). Más aún, la administración de IL-6 ha demostrado proteger frente al daño inducido por Concavalina A (Hong F, Jaruga B, et al, 2002), isquemia/reperfusión (Camargo et al, 1997; Hong et al, 2004) y transplante de hígado parcial (Selzner et al, 2002). El tratamiento *in vitro* con IL-6 también previno de la mortalidad asociada al transplante de hígado graso en ratas, mediante la mejora de la microcirculación hepática y la protección frente a la muerte de células endoteliales y hepatocitos (Sun et al, 2003). El tratamiento *in vivo* con IL-6 mejoró también la enfermedad de hígado graso asociada a

obesidad y alcohol mediante la regulación decreciente de  $TNF\alpha$  y la inducción de la expresión del receptor activado por proliferadores del peroxisoma (PPAR) (Hong et al, 2004). Además, el pretratamiento con IL-6 en un modelo de daño hepático grave que se produce tras una HP extrema (HP del 87%), mejoró la recuperación y la supervivencia de estos animales mediante la inducción de rutas de proliferación, la reducción del estrés oxidativo y el mantenimiento de la función mitocondrial (Jin et al, 2007). Todos estos estudios evidencian un papel relevante de la IL-6 en la hepatoprotección del hígado dañado. Esta citocina, por tanto, es necesaria para el desarrollo de una regeneración hepática normal que requiere la supervivencia (Taub 2004; Gao 2005; Böhm et al, 2010).

#### **2.4.3.- Efectos anti-proliferativos de la IL-6**

El primer estudio que asoció IL-6 con un efecto no proliferativo en la regeneración hepática fue realizado por Sakamoto et al, en el año 1999. En este estudio se mostró que la apoptosis de hepatocitos fue menor en los ratones IL-6 KO en comparación con los ratones salvajes a las 96 horas tras una HP. El tratamiento de los ratones IL-6 KO con IL-6 exógena consiguió revertir el número total de cuerpos apoptóticos, sugiriendo que la IL-6 contribuye al estricto control de la recuperación de masa hepática tras una HP. En este contexto, la IL-6 estimularía junto con otros factores la entrada de los hepatocitos al ciclo celular para la restauración de la masa hepática. Esta respuesta tan robusta, sin embargo, puede generar hepatocitos excesivos que deben ser

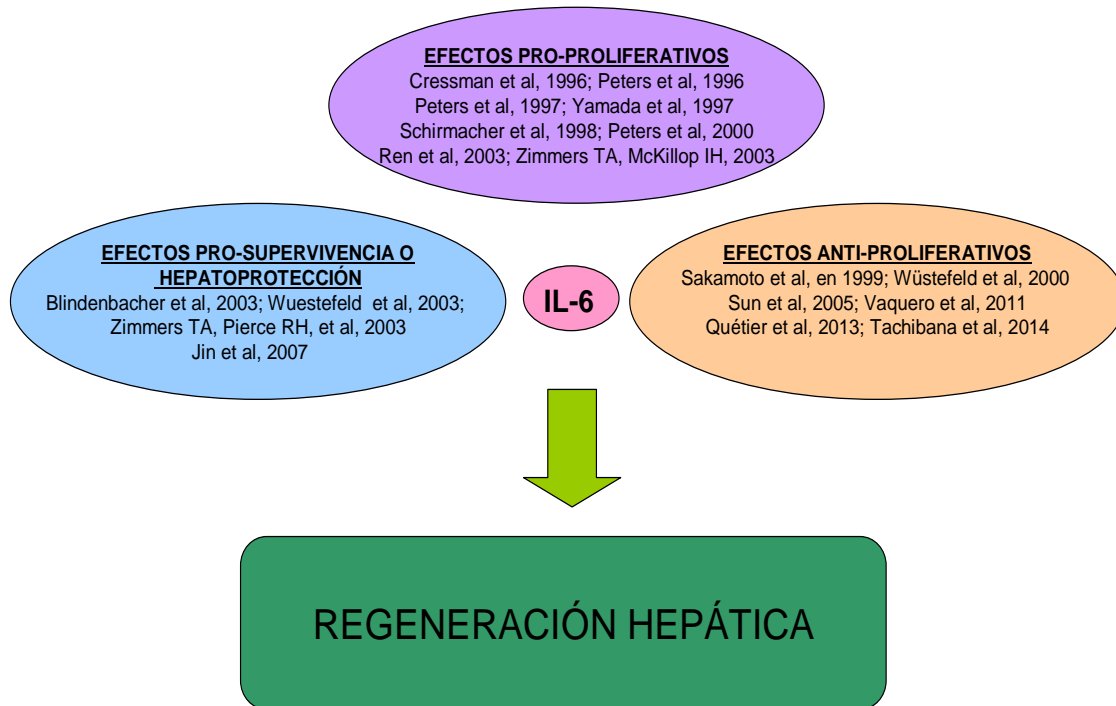
eliminados mediante apoptosis, como ocurre en otros procesos que implican el crecimiento de órganos. En este escenario, la IL-6 tendría un efecto de aumento de la apoptosis (efecto anti-proliferativo) para conseguir restaurar la masa hepática (Sakamoto et al, 1999).

Otros estudios también han mostrado un efecto anti-proliferativo de IL-6. La hiperestimulación con IL-6 antes de la HP en ratones transgénicos que sobreexpresan sIL-6R/IL-6R humano en hepatocitos, resultó en un retraso e inhibición del progreso del ciclo celular (Wüstefeld et al, 2000). En 2005, Sun et al. mostraron que la IL-6 inhibe la proliferación de los hepatocitos mediante un mecanismo dependiente de la expresión de p21 (Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina) (Sun et al, 2005). En el año 2011, se observó que los ratones KO para MyD88 (MyD88<sup>-/-</sup>), una proteína adaptadora para varios receptores TLRs donde el aumento inicial de IL-6 tras una HP estaba abolido, presentaban una reducción en la activación de STAT-3 y una inhibición de la expresión del gen SOCS-3. Inesperadamente, estos cambios se asociaron a una aceleración del inicio de la regeneración hepática, probablemente explicada por la activación prolongada y aumentada de ERKs encontrada en las primeras 6 horas tras la HP. En este estudio concluyeron que el papel de la IL-6 en la regeneración hepática no debe limitarse a sus efectos pro-proliferativos, sino que también se debería tener en cuenta sus efectos anti-proliferativos, posiblemente vía SOCS-3 (Vaquero et al, 2011).

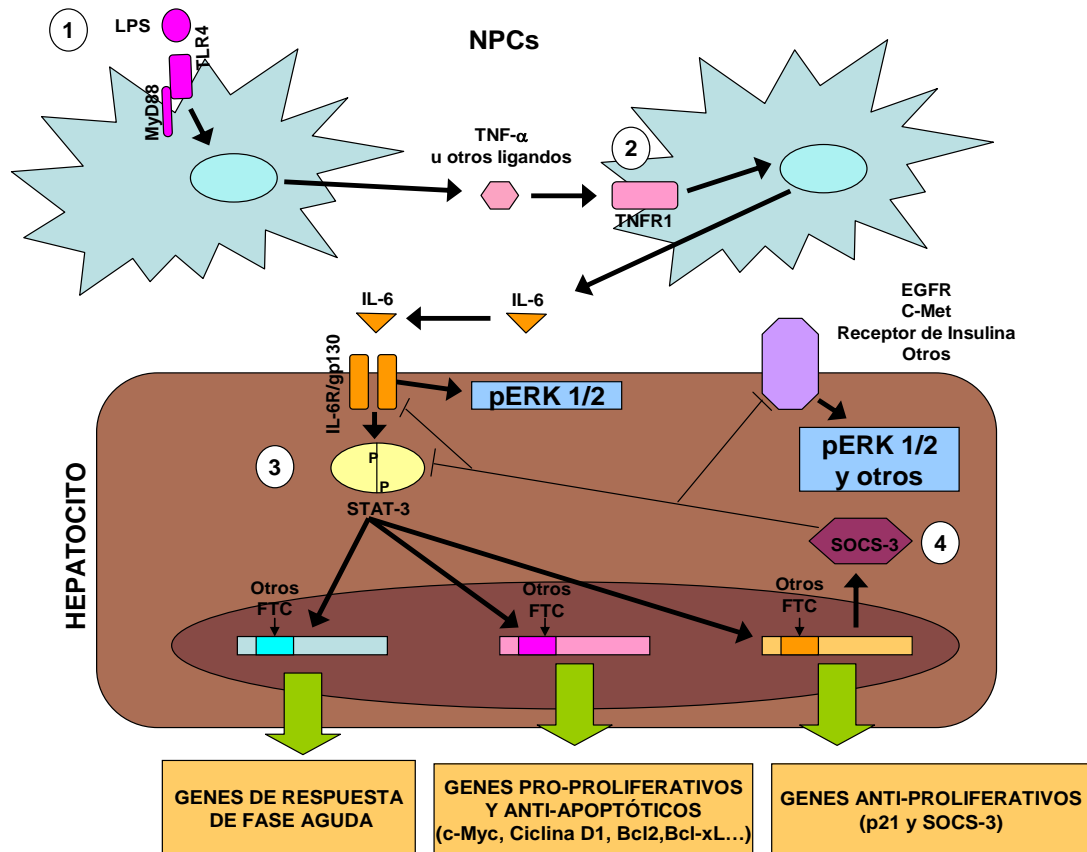
En 2013, Quétier et al. también demostraron que la sobreexpresión de IL-6 inducida por la proteína X del virus de la Hepatitis B (HBx) estaba implicada en el retraso de la proliferación de hepatocitos tras una HP (Quétier et al, 2013). De acuerdo con estos resultados, Tachibana et al. demostraron que la IL-6 causaba arresto del ciclo celular y retraso de la proliferación durante el primer día después de una HP. Este retraso se asoció con la activación de enzimas de reparación del ADN que producen una precisa replicación y restauración de la masa hepática. Estos resultados sugieren que la IL-6 ejerce sus efectos anti-proliferativos para permitir la reparación del ADN oxidado después de una HP y, de esta forma, tendría un papel hepatoprotector (Tachibana et al, 2014).

A pesar de todos los resultados contradictorios del papel de la IL-6 en la regeneración hepática, la mayoría de investigadores acepta que la IL-6 juega un papel importante en este proceso proliferativo (Figura 24) (Tumanov et al, 2009; Zorde-Khvaleyevsky et al, 2009; Teixeira-Clerc et al, 2010; Wang et al, 2011). En conjunto, todas las evidencias generadas apuntan a que la IL-6 tiene efectos pleiotrópicos en el hígado. La IL-6 es requerida para inducir una respuesta adaptativa a la HP mediada por los reactantes de fase aguda, para la inducción de la proliferación de los hepatocitos (efectos pro-proliferativos), de hepatoprotección (efectos anti-apoptóticos), y de sus efectos anti-proliferativos posiblemente mediados a través de SOCS-3 y p21 (Figura 25). La existencia de resultados contradictorios podría también reflejar que la ausencia de IL-6 en ratones modificados

genéticamente resulta en la activación de rutas compensatorias que permiten la supervivencia y el desarrollo de una regeneración hepática normal tras una HP (Zimmers TA, Pierce RH, et al, 2003 Taub 2004; Böhm et al, 2010).



**Figura 24. Papeles de la IL-6 en la regeneración hepática.** El estudio de los efectos de la IL-6 en la regeneración hepática ha generado resultados conflictivos. Estos resultados contradictorios podrían reflejar diferencias técnicas, activación de rutas compensadoras, o verdaderos efectos diversos de la IL-6. La IL-6 tiene distintos efectos en la regeneración hepática (efectos pro-proliferativos, pro-supervivencia y anti-proliferativos), pero está bien aceptado que estos efectos, junto con la respuesta de fase aguda que se desarrolla gracias a esta citocina, son necesarios para el desarrollo de una regeneración hepática normal tras una HP. IL-6: Interleucina-6; IL-6R: Receptor de IL-6; HP: Hepatectomía parcial.



**Figura 25. Efectos pro-proliferativos, anti-apoptóticos (hepatoprotección) y anti-proliferativos de la señalización por la IL-6.** (1) Tras una HP, LPS procedente de la vena porta activa la producción de citocinas en NPCs, principalmente vía receptores dependientes de la proteína adaptadora MyD88 que incluye a TLR-4. (2) Como resultado, TNF- $\alpha$  y otros ligandos son secretados y se unen a TNFR1 localizado en las células de Kupffer e inducen la expresión y liberación de IL-6 a la circulación. (3) IL-6 circulante se une a IL-6R e induce la dimerización de gp130 en la membrana plasmática de los hepatocitos y activa dos rutas de señalización: STAT-3 y ERK 1/2. Estas rutas inducen la expresión de múltiples genes implicados en la respuesta de fase aguda y en promover la proliferación de los hepatocitos (efectos pro-proliferativos) y hepatoprotección (efectos anti-apoptóticos). Además, STAT-3 también induce la expresión de genes que regulan de forma negativa la proliferación celular como son p-21 y SOCS-3. (4) SOCS-3 inhibe la señalización de IL-6 y puede regular de forma negativa a rutas de señalización implicadas en proliferación celular y crecimiento como la ruta de ERK 1/2 y rutas que implican a EGFR, c-Met, receptor de insulina y otros. El efecto de la IL-6 en la regeneración hepática depende del balance entre los efectos pro-proliferativos y anti-proliferativos, tras la integración de los efectos de otros factores de transcripción que actúan sobre los mismos genes sobre los que actúa la IL-6. IL-6: Interleucina-6; HP: Hepatectomía parcial; LPS: Lipopolisacárido; NPCs: Células no parenquimatosas; MyD88: Factor de diferenciación mieloide 88; TLR-4: Receptores tipo toll 4; TNF- $\alpha$  : Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ; TNFR1: Receptor de TNF tipo 1; IL-6R: Receptor de IL-6; gp130: Glicoproteína 130; STAT-3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3; ERK 1/2: Quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2; SOCS-3: Supresor de la señalización por citocinas 3; EGFR: Receptor del EGF; FTC: Factores de transcripción. Imagen modificada de Vaquero et al, 2011.

## **2.5.- STAT-3 EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA**

Citocinas de la familia de la IL-6, como OSM y CT-1, así como otras citocinas no pertenecientes a la familia de la IL-6, como la IL-22, pueden también promover la regeneración hepática en varios modelos experimentales (Bustos et al, 2003; Nakamura et al, 2004; Wang et al, 2011; Ren et al, 2010). Como la IL-6, estas citocinas también activan STAT-3 en los hepatocitos. Es precisamente la ruta de señalización IL-6/gp130/JAK/STAT-3 la que más se ha relacionado con el papel de la IL-6 en la regeneración hepática.

Estudios con ratones KO condicionales de gp130 en hepatocitos han mostrado un defecto en la proliferación de los hepatocitos menor de lo que se esperaba en base al fenotipo encontrado en ratones IL-6 KO. Sí se observaron defectos en la expresión de proteínas del ciclo celular (ciclina E y A) tras una HP, apoyando la idea que la señalización por gp130 es necesaria para una progresión normal del ciclo celular. Los ratones KO condicionales de gp130 en hepatocitos también presentaron mayor apoptosis en hepatocitos después de inyectar LPS 3 horas tras la HP, y una reducción de la supervivencia y de la síntesis de ADN que se asoció con el descenso de la proteína anti-apoptótica Bcl-xL. Estos resultados sugieren que gp130 activa rutas de hepatoprotección que permiten la proliferación de los hepatocitos tras una HP (Wuestefeld et al, 2003; Taub 2004; Dierssen et al, 2008; Böhm et al, 2010). En la misma línea, otros estudios también han observado que la delección condicional de gp130 en los hepatocitos promovía daño hepático

(Streetz KL, Wüstefeld T, et al 2003; Streetz KL, Tacke et al, 2003; Gao 2005).

En contraste a la IL-6, las citocinas de la familia de IL-6 (CT-1, LIF, CNTF, IL-11, OSM), la IL-22 y el IFN $\alpha/\beta$  (todas ellas citocinas que activan STAT-3 en hepatocitos), la citocina anti-inflamatoria IL-10 activa STAT-3 en células inmunes (macrófagos) pero no en hepatocitos. La expresión de IL-10 es inducida en el hígado tras una HP, y regula negativamente la regeneración hepática. El papel de esta citocina en el proceso regenerativo se descubrió gracias al uso de ratones IL-10 KO (IL-10 $^{-/-}$ ) sometidos a una HP. Estos ratones presentaban un aumento de la respuesta inflamatoria y de la regeneración hepática, mediada por una activación marcada de STAT-3 en el hígado. La eliminación específica de STAT-3 en hepatocitos de ratones IL-10 KO resultó en una reducción de la regeneración hepática. Estos resultados sugieren que la activación de la ruta de señalización IL-6/STAT-3 en el hígado era la responsable del aumento de la regeneración hepática encontrada en los ratones IL-10 KO (Wang et al, 2011; Yin et al, 2011).

La inducción de STAT-3 ha sido bien documentada en la regeneración hepática tras una HP (Cressman et al, 1996; Li et al, 2002; Blindenbacher et al, 2003; Wuestefeld et al, 2003; Wang et al, 2011). En ratas sometidas a esta cirugía, la activación de STAT-3 se produce inicialmente en las células de Kupffer y las células sinusoidales hepáticas, y posteriormente en los hepatocitos localizados en las zonas periportales de los lóbulos hepáticos (Sakuda et al, 2002; Wang et al, 2011). Debido a que la eliminación sistémica de STAT-3 produce una

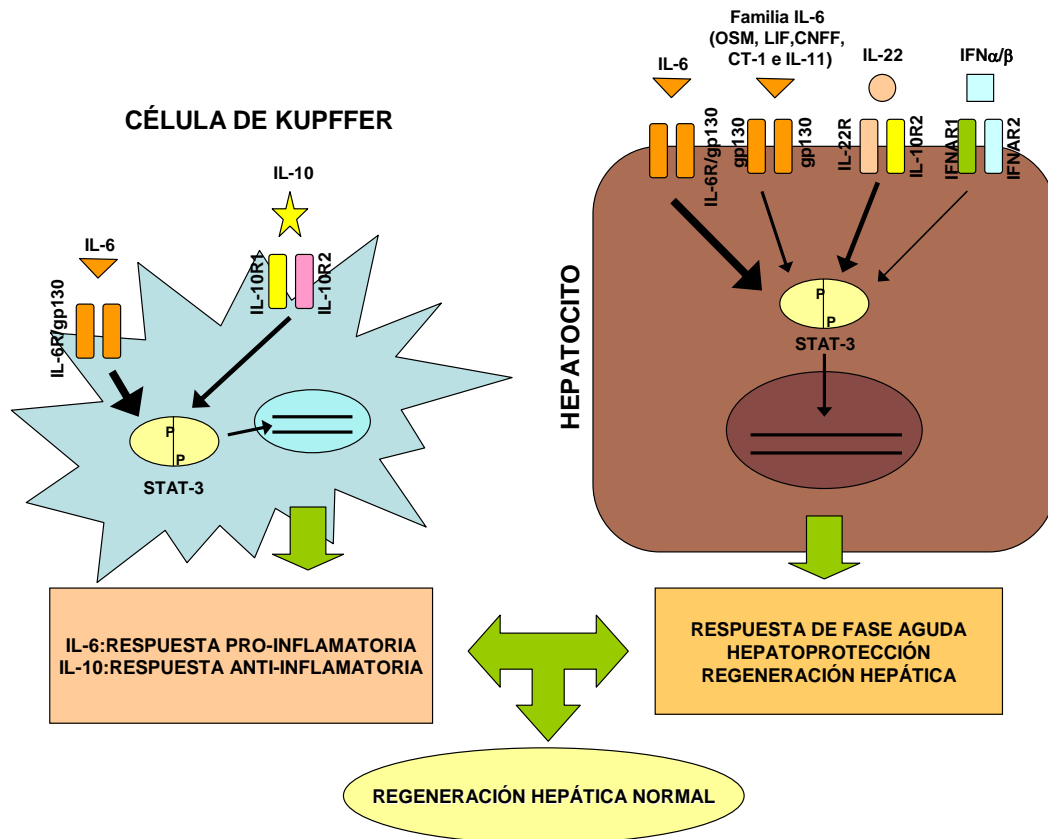
muerte embrionaria temprana en los animales, se generaron ratones KO condicionales para STAT-3 en hepatocitos para investigar el impacto biológico de STAT-3 en la regeneración hepática. Uno de los primeros estudios con estos ratones mostró que la eliminación del gen *Stat-3* en hepatocitos producía un defecto severo en la proliferación de los mismos tras una HP, estableciendo un papel para STAT-3 en la promoción de la proliferación celular mediante la regulación de la expresión de genes de respuesta precoz inmediata (Li et al, 2002; Böhm et al, 2010; Wang et al, 2011). Dicho efecto, sin embargo, pudo ser secundario a la obesidad y anormalidades metabólicas observadas en estos ratones (Böhm et al, 2010). En estudios posteriores con estos ratones, se observó que STAT-3 era requerido para la supervivencia de los animales mientras que la proliferación de hepatocitos y la restauración de la masa hepática estaba sólo ligeramente afectada en los ratones que sobrevivían (Moh et al, 2007; Böhm et al, 2010; Wang et al, 2011). La expresión constitutiva de STAT-3 en el hígado se ha asociado, por otra parte, a una reducción de la glucosa en sangre, de las concentraciones de insulina en plasma y de la expresión de genes gluconeogénicos en ratones diabéticos (Inoue et al, 2004; Gao 2005). La expresión constitutiva de STAT-3 en el hígado también fue protectora frente al daño hepático inducido por Fas, efecto asociado a la inhibición de caspasa-8 y caspasa-3 y a la inducción de la expresión de proteínas como FLIP, Bcl-2, Bcl-xL y el factor redox 1 (Ref-1) (Haga et al, 2003; Gao 2005). En este sentido, se han identificado varios genes diana de STAT-3 que contribuyen al efecto hepatoprotector y hepatomitogénico

de IL-6/STAT-3. Estos genes incluyen a ciclina D1 y c-myc, que inducen la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, y a genes que codifican para proteínas que protegen a los hepatocitos frente a la apoptosis como bcl-2, bcl-xL, mcl-1, FLIP y Ref-1 (Li et al, 2002; Taub 2003; Gao 2005; Wang et al, 2011). La inhibición de células T natural Killer podría ser otro mecanismo que contribuye al efecto hepatoprotector de IL-6 mediante la activación de STAT-3 (Sun et al, 2004; Gao 2005). El tratamiento *in vivo* con IL-6 o la expresión constitutivamente activa de STAT-3 también se ha asociado a una mejoría en la enfermedad de hígado graso (Hong et al, 2004; Inoue et al, 2004; Gao 2005). La activación directa de STAT-3 por IL-6, por tanto, parece jugar un importante papel en hepatoprotección, en la regeneración hepática, y en la homeostasis de glucosa mediante la inducción de proteínas anti-apoptóticas, mitógenicas, de proteínas implicadas en la homeostasis de glucosa y el metabolismo de lípidos (Gao 2005).

La activación de STAT-3 tras una HP no solo se produce en hepatocitos, sino que también es intensamente activado en células inmunes. La delección específica de STAT-3 en células de linaje mieloide resultó en un aumento de la respuesta inflamatoria y de la regeneración hepática. La eliminación condicional de STAT-3 de forma simultánea en hepatocitos y en células mieloides redujo drásticamente la supervivencia tras una HP en asociación con una elevada activación de STAT-1 y de apoptosis en hepatocitos, comparado con animales salvajes o con ratones KO condicionales sólo para hepatocitos o sólo para células

mieloides. La interacción de STAT-3 en hepatocitos y células mieloides, por tanto, juega un papel importante en asegurar el desarrollo de una regeneración hepática normal mediante un balance entre la respuesta inflamatoria innata del hígado y sistémica (Wang et al, 2010; Wang et al, 2011).

El papel de STAT-3 en hepatocitos ha sido investigado de forma intensiva. Actualmente, se piensa que la activación de STAT-3 en hepatocitos promueve su proliferación tras una HP o pérdida de tejido, mientras que la activación de STAT-3 en células mieloides parece suprimir la regeneración hepática mediante la inhibición de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, poco ha sido estudiado en cuanto al papel de STAT-3 en otras células inmunes y en células sinusoidales en la regeneración hepática. Además, es necesario seguir investigando la interacción entre los distintos tipos celulares que producen y activan STAT-3 en la regeneración hepática, ya que dicha interacción parece jugar un papel importante en el desarrollo de una respuesta regenerativa normal (Figura 26) (Wang et al, 2011).



**Figura 26. Interacción de STAT-3 de células de estirpe mieloide (células de Kupffer) y de hepatocitos en la regeneración hepática.** Las células de Kupffer son las principales productoras de citocinas pro-inflamatorias como IL-6 y de citocinas anti-inflamatorias como IL-10, y también son capaces de responder a las mismas. En su membrana presentan los receptores IL-10R1 y IL-10R2; tras la unión de IL-10, inducen la activación de STAT-3 inhibiendo la respuesta inflamatoria. Por el contrario, la unión de IL-6 con IL-6R/gp130 produce la activación de STAT-3 y la inducción de la respuesta inflamatoria. La respuesta inflamatoria es pasajera ya que STAT-3 activa a SOCS-3, que inhibe la activación de STAT-3 mediada por IL-6 pero no inhibe la activación de STAT-3 mediada por IL-10. Por otro lado, los hepatocitos expresan niveles elevados de gp130 en su membrana, que es el receptor de señalización común de IL-6 y de las citocinas de la familia de la IL-6 (OSM, LIF, CNTF, CT-1 e IL-11). La unión de estas citocinas con sus correspondientes receptores induce la dimerización de gp130 y la activación de STAT-3. Además, los hepatocitos expresan en su membrana niveles elevados de IL-22R1 e IL-10R2, que son necesarios para la señalización de IL-22. Las rutas de señalización de la IL-6, de las citocinas de la familia de la IL-6, y de la IL-22 son las que predominantemente activan STAT-3 en hepatocitos, pero también inducen una activación menor de otros STATs y MAPK. Los receptores IFNAR1 e IFNAR2 también se expresan a altos niveles en la membrana de los hepatocitos, y su unión a IFN $\alpha/\beta$  induce predominantemente la activación de STAT-1 y también, en menor medida, la de STAT-3. La activación de STAT-3 en hepatocitos induce la transcripción de genes que desempeñan una función importante en la respuesta de fase aguda, en promover la supervivencia de los hepatocitos y en la regeneración hepática. La interacción de STAT-3 de distintos tipos celulares durante la regeneración hepática parece jugar un papel importante en el desarrollo de una respuesta regenerativa normal. STAT-3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3; IL-6: Interleucina-6; IL-10: Interleucina-10; IL-10R1; Receptor de IL-10 1; IL-10R2; Receptor de IL-10 2; L-6R: Receptor de IL-6; gp130: Glicoproteína 130; SOCS-3: Supresor de la señalización por citocinas 3; OSM: Oncostatina M; LIF: Factor inhibidor de leucemia; CNTF; Factor neurotrófico ciliar; CT-1: Cardiotrofina 1; IL-11: Interleucina-11; IL-22R1; Receptor de IL-22 1; IL-22: Interleucina-22; STATs: Transductores de señal y activadores de la transcripción; MAPK: Quinasas activadas por mitógenos; IFNAR1: Receptor de IFN  $\alpha/\beta$  1; IFNAR2: Receptor de IFN  $\alpha/\beta$  2; IFN  $\alpha/\beta$ : Interferón  $\alpha/\beta$ ; STAT-1: Transductor de señal y activador de la transcripción 1. Imagen modificada de Wang et al, 2011.

## 2.6.- SOCS-3 EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

SOCS-3 es un importante inhibidor de la ruta de señalización mediada a través del receptor gp130 en el sistema hematopoyético y en el hígado (Croker et al, 2003; Riehle et al, 2008). La eliminación de SOCS-3 específicamente en macrófagos produjo un aumento marcado de la activación de STAT-3 por IL-6, resultando en el desarrollo de una respuesta pro-inflamatoria; sin embargo, no inhibió la activación de STAT-3 inducida por IL-10, relacionada con la respuesta anti-inflamatoria en estas células (Yasukawa et al, 2003; Qin et al, 2007). En estudios posteriores como el de Yang et al. demostraron que la IL-6 juega un papel importante en la expresión hepática de SOCS-3 durante procesos inflamatorios agudos *in vivo* (Yang et al, 2005; Riehle et al, 2008). Interesantemente, la expresión de SOCS-3 en un modelo de artritis en ratón suprimía la inducción y/o el desarrollo de la enfermedad (Shouda et al, 2001). Por todo ello, se considera que SOCS-3 es un regulador negativo de la respuesta inflamatoria.

La rápida elevación de los niveles de SOCS-3 entre las dos y las ocho horas tras una HP está bien documentada, y es similar al tiempo de expresión de STAT-3. Además, también se ha demostrado que la expresión de SOCS-3 es dependiente de IL-6 durante la regeneración hepática (Campbell et al, 2001; Riehle et al, 2008). Como la eliminación sistémica del gen de SOCS-3 en ratones produce una muerte embrionaria temprana por defectos en el desarrollo de la placenta (Roberts et al, 2001; Qin et al, 2007), se han utilizado ratones KO

condicionales de SOCS-3 en hepatocitos para estudiar el impacto biológico de esta proteína en la regeneración hepática. En estos ratones se produjo una prolongada activación de STAT-3 tras la HP que se correlacionó con una mayor proliferación de los hepatocitos y una acelerada restauración de la masa hepática (Riehle et al, 2008; Böhm et al, 2010). El comienzo acelerado de la regeneración hepática a pesar de la abolición del aumento de IL-6 y de la reducida activación de STAT-3 encontrada en ratones deficientes para MyD88 (MyD88<sup>-/-</sup>), también se acompañó de una importante inhibición de la inducción del gen SOCS-3 asociada a un aumento de la activación de ERK 1/2 (Vaquero et al, 2011). Dichos hallazgos están en consonancia con la presencia de una mayor respuesta regenerativa y una mayor tasa de activación de ERK 1/2 tras HP encontrada en ratones KO condicionales para SOCS-3 en hepatocitos en un estudio previo (Riehle et al, 2008). Estos estudios apoyan la noción de que el papel de la IL-6 en la regeneración hepática no sólo se limita a sus efectos proliferativos, sino que también se deben tener en cuenta sus efectos anti-proliferativos, posiblemente vía SOCS-3.

Estudios recientes han revelado un papel en la regeneración hepática para una proteína que, entre otras funciones, disminuye la expresión de SOCS-3. Esta proteína, llamada A20, es considerada un elemento clave en la respuesta anti-inflamatoria, ya que es un potente inhibidor de la activación de NFκB (Wertz et al, 2004; Da Silva et al, 2013). A20 tiene también efectos anti-apoptóticos mediante la supresión de la activación de caspasa-8 (Daniel et al, 2004; Da Silva et

al, 2013), y efectos pro-proliferativos, promoviendo la proliferación de hepatocitos mediante el descenso de expresión de p21 (Longo et al, 2005; Da Silva et al, 2013). Los ratones con deficiencia génica de A20 mueren a las 4-5 semanas del nacimiento principalmente por inflamación hepática desmesurada (Lee et al, 2000; Da Silva et al, 2013), sugiriendo un papel de A20 en la fisiología hepática. En ratones heterocigotos (A20+/-) sometidos a una HP del 78%, la inducción de A20 aumentaba la activación de STAT-3 inducida por IL-6 y descendía la expresión de SOCS-3 (Da Silva et al, 2013). Estos hallazgos se acompañaron de una mayor proliferación de hepatocitos en los ratones con inducción de A20 en comparación con los ratones controles. Así, se sugirió que la regeneración hepática era favorecida por A20 mediante el descenso en la expresión de SOCS-3, neutralizando así la inhibición de la ruta de señalización IL-6/STAT-3 (Da Silva et al, 2013).

En resumen, múltiples trabajos demuestran que la activación de STAT-3 induce la expresión de SOCS-3 en la regeneración hepática y que esta proteína actúa como un regulador negativo de la ruta de señalización de IL-6/JAK/STAT-3, contribuyendo a los efectos anti-proliferativos de la IL-6 en la regeneración hepática (Riehle et al, 2008; Böhm et al, 2010; Wang et al, 2011).

### **3.- FUENTE CELULAR DE IL-6 EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA**

#### **3.1.- PERCEPCIÓN CLÁSICA DE LA FUENTE CELULAR DE IL-6 EN LA REGENERACIÓN HEPÁTICA**

La mayoría de los estudios que se han centrado en el papel de la IL-6 en la regeneración hepática han usado ratones con deficiencia sistémica del gen de IL-6. Diferencias técnicas y del diseño experimental entre los estudios, la activación de vías compensadoras, o la posibilidad de que la IL-6 tenga la capacidad de ejercer efectos opuestos, son posibles explicaciones a las discrepancias encontradas en cuanto al papel de IL-6 en la regeneración hepática. Una posibilidad adicional, a la que se ha prestado escasa atención, es la potencial relevancia de la fuente celular de IL-6 para el proceso regenerativo. En otras palabras, la IL-6 originada en células distintas podría producir distintos efectos durante la regeneración hepática.

La producción de citocinas tras una HP se ha atribuido tradicionalmente a las células de Kupffer. Esta noción se basa principalmente en estudios realizados en ratones C3H/HeN con HP y con depleción de células de Kupffer mediante la administración de gadolinio de cloro, en los que se encontró una reducción de las elevaciones de TNF $\alpha$  e IL-6 en suero tras una HP y, secundariamente, alteraciones de la proliferación de hepatocitos y de la restauración de la masa hepática (Shiratori et al, 1996). En la misma línea, la eliminación completa de la producción de IL-6 en células de Kupffer usando ratones

quimera sometidos a transplante de médula ósea de donantes deficientes en el gen de la IL-6 se asoció a una regeneración hepática defectuosa tras una HP que fue parcialmente rescatada mediante la administración de IL-6. Estos resultados sugieren un mecanismo paracrino por el cual las células de Kupffer regulan la capacidad regenerativa de los hepatocitos a través de la expresión de IL-6 (Aldeguer et al, 2002).

Otros estudios, sin embargo, no reprodujeron los resultados anteriores. Así, la eliminación de las células de Kupffer con gadolinio de cloro no descendió los niveles de TNF $\alpha$  tras una HP y se asoció a un aumento de la regeneración hepática en ratas (Rai et al, 1996). Estos resultados sugerían que los macrófagos no eran los principales responsables de la producción de TNF $\alpha$  durante la regeneración hepática, sino que las células endoteliales o las células epiteliales biliares podían ser la fuente principal (Loffreda et al, 1997). Uno de los problemas asociados a la eliminación de macrófagos con gadolinio de cloro y que dificulta la interpretación de estos estudios, es la activación y daño que produce este compuesto en otras células hepáticas. Para evitar este efecto, Boulton et al. utilizaron liposomas encapsulados de diclorometileno bifosfonato que elimina macrófagos de forma selectiva sin activar o dañar a otras células hepáticas (Boulton et al, 1998). La eliminación de macrófagos mediante este sistema resultó en un aumento de la proliferación de hepatocitos tanto en el hígado quiescente como tras una HP, que se relacionó con la disminución de IL-1 (Boulton et al, 1998). El efecto de la IL-6 producida por las células de Kupffer,

por tanto, no ha sido completamente elucidado en la regeneración hepática. El uso de cepas de ratones KO condicionales para IL-6 en macrófagos, podría evitar las desventajas de las estrategias previas y ayudar a conocer el papel de las células de Kupffer como productores de IL-6 en la regeneración hepática.

A pesar de estos resultados aislados y contradictorios respecto a la fuente celular de IL-6 en la regeneración hepática, la noción de que las células de Kupffer son las principales productoras de IL-6 en este proceso está ampliamente generalizada en este campo (Taub 2004; Michalopoulos 2007; Böhm, et al 2010). En áreas distintas de la regeneración hepática, sin embargo, existen múltiples evidencias de que diversos tipos celulares distintos a las células de Kupffer son capaces de producir esta citocina.

### **3.2.- CAPACIDAD DE LOS HEPATOCITOS PARA PRODUCIR IL-6**

Diversos estudios sugieren que, además de las células inmunes (macrófagos), los hepatocitos también son capaces de producir citocinas en respuesta a LPS (Liu et al, 2002; Norris et al, 2014). Entre estas citocinas, estudios recientes sugieren que los hepatocitos son una fuente potencial de IL-6 (Lee et al, 2009; Xiang et al, 2011). La capacidad de los hepatocitos para producir IL-6 en respuesta a ciertos patrones moleculares asociados a patógenos ha sido demostrada *in vitro* (Takano et al, 2012). En la progresión de hepatocarcinoma hepatocelular (HCC), también se ha demostrado la producción de IL-6 de manera autocrina por células progenitoras de HCCs y por células

estrelladas hepáticas a través de la activación de NFκB (He et al, 2013; Li et al, 2016). En la infección por el virus de la hepatitis B, también se ha observado que proteínas específicas del virus inducen la expresión de IL-6 en células de hepatoma mediante la activación de las rutas de señalización de NFκB y p38MAPK (Li et al, 2016).

En el contexto de la regeneración hepática, la producción de IL-6 por los hepatocitos no ha sido prácticamente evaluada. Observaciones realizadas por Maeda et al. sugieren que los hepatocitos podrían ser una fuente de IL-6 (Maeda et al, 2003). En este estudio, la inactivación selectiva de NFκB en hepatocitos resultó en una producción muy tenue del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de IL-6 a las 4 horas tras la inyección de LPS en comparación con ratones controles. Como el defecto en NFκB era específico de hepatocitos y el tiempo en el que se producen los cambios en la síntesis de IL-6 es muy rápido, estos resultados sugerían que los hepatocitos podrían ser una fuente directa de IL-6 en la respuesta de fase aguda hepática (Maeda et al, 2003; Norris et al, 2014). En el estudio de Norris et al, mostraron que la IL-6 producida por hepatocitos podría contribuir a la producción de IL-6 tras la realización de una HP. En este estudio encontraron que los cultivos primarios de hepatocitos en condiciones libres de suero eran capaces de sintetizar IL-6. En estos cultivos los niveles de IL-6 estaban regulados por LPS y HGF. Estos autores mostraron también en experimentos *in vivo* que los hepatocitos eran capaces de sintetizar IL-6 tras el daño inducido por la administración de LPS o tras realizar una HP. Estudios previos habían mostrado que HGF suprime la producción de IL-6 en

cultivo de macrófagos a través del receptor de HGF (c-Met) (Coudriet et al, 2010; Norris et al, 2014). En el estudio de Norris et al, HGF pareció suprimir la producción de IL-6 mediada por macrófagos tras una HP mientras que simultáneamente indujo la producción de IL-6 en hepatocitos. Estos resultados indicarían que, bajo determinadas circunstancias, la regulación del receptor de IL-6 en hepatocitos podría ser autocrina en lugar de endocrina/paracrina (Klein et al, 2005; Norris et al, 2014), y revelan por primera vez que la regulación de la fuente celular de IL-6 podría ser un mecanismo biológico relevante que previamente había sido ignorado.

### **3.3.- PRODUCCIÓN DE IL-6 POR OTROS TIPOS CELULARES**

En un estudio realizado en ratones con diversas deficiencias de señalización por TLRs, el aumento de IL-6 tras una HP se encontró atenuado (~60%) en todas las cepas de ratones con alteraciones en la detección de LPS (TLR4 KOs, CD14 KOs, TLR2,4,9 triple-KOs, TLR2,4, caspasa1 triple-KOs y en ratones CH3/HeJ resistentes a LPS), apoyando la idea clásica de que la detección por células de Kupffer de productos derivados de bacterias intestinales podía ser el estímulo para la producción de IL-6. Sin embargo, la causa y la fuente celular que contribuye al 40% restante del aumento de IL-6 tras una HP no pudieron ser identificadas, abriendo la posibilidad de que otras fuentes celulares contribuyan a la producción de IL-6 durante la regeneración hepática (Vaquero et al, 2011).

Aunque es bien conocido que la IL-6 puede ser sintetizada por distintos tipos celulares como células T, células B, fibroblastos, células endoteliales, monocitos y macrófagos, en el contexto de la regeneración hepática el efecto de la IL-6 producida por otros tipos celulares no ha sido prácticamente estudiado (Schmidt-Arras D, Rose-John S, 2016). Observaciones realizadas en ratas con depleción de células de Kupffer mediante gadolinio de cloro sugirió que los macrófagos podían no ser los principales responsables de la producción de TNF $\alpha$  durante la regeneración hepática, sino que otras células presentes en el hígado como las células endoteliales y las células epiteliales biliares podían contribuir (Loffreda et al, 1997).

En procesos inflamatorios se ha demostrado que las células endoteliales expresan receptores TLRs y la proteína adaptadora MyD88 que media la señalización de varios TLRs. Cuando se produce una intoxicación crónica, los hepatocitos liberan ADN rico en guanósina fosfato citidina (CpG-ADN) que va actuar de forma paracrina en las células endoteliales y activa la ruta de señalización de NF $\kappa$ B y la secreción de citocinas como IL-1 $\beta$  e IL-6 (Martin-Armas et al, 2006; Wu et al, 2009; Jaeschke et al, 2012; Godoy et al, 2013). Durante la regeneración hepática no se ha investigado el efecto de la IL-6 producida por células endoteliales, pero sí se ha demostrado que las células endoteliales juegan un papel importante en establecer la microarquitectura hepática. En un estudio basado en la reconstitución de tejido con tecnología 3D y con modelos matemáticos, se ha observado que las células endoteliales sirven a los hepatocitos

regenerantes como guías y permiten que tenga lugar una reconstitución de la masa hepática apropiada (Hoehme et al, 2010; Godoy et al, 2013). Las células endoteliales son capaces también de coordinar la proliferación de los hepatocitos durante la regeneración hepática mediante la liberación de factores como HGF y Wnt2 que juegan un papel importante en la comunicación entre hepatocitos y células endoteliales durante este proceso (Ding et al, 2010; Godoy et al, 2013). Hu et al. mostraron que la expresión de la proteína angiopoietina 2 (Ang2) en las células endoteliales era regulada de forma dinámica después de una HP, de forma que en las fases iniciales de la regeneración hepática disminuían los niveles de Ang2 y, como consecuencia, las células endoteliales reducían la producción de TGF $\beta$  y permitían la proliferación de los hepatocitos. En las fases tardías de la regeneración hepática, por el contrario, la expresión de Ang2 por parte de las células endoteliales permitía la proliferación de estas células endoteliales hepáticas mediante el control de la expresión del receptor 2 de VEGF. Estos datos establecen que el control de la proliferación de los hepatocitos y células endoteliales durante la regeneración hepática está regulado por la expresión de una proteína secretada por las propias células endoteliales hepáticas (Hu et al, 2014). Actualmente, se necesitan más estudios para elucidar si otros factores secretados por las células endoteliales hepáticas, como podría ser el caso de la IL-6, tienen un efecto en la proliferación de los hepatocitos.

Las células epiteliales biliares también son capaces de secretar IL-6 bajo determinadas condiciones. En el estudio de Chen et al, se

encontró que la exposición al frío inducía la producción de IL-6 en células epiteliales biliares y la secreción de esta citocina promovía la regeneración de estas células tras el daño aplicado (Chen et al, 2011). Sin embargo, actualmente se desconoce si la IL-6 es secretada por las células epiteliales biliares durante la regeneración hepática y si esta citocina tendría un efecto en el proceso regenerativo.

Las células estrelladas hepáticas secretan proteínas como la IL-6, el TGF $\beta$  y la proteína quimiotáctica de macrófagos 1 (Mcp-1) cuando son expuestas a productos bacterianos como LPS (Brun et al, 2005; Godoy et al, 2013). Sin embargo, hoy en día se ignora el efecto de la IL-6 producida por células estrelladas hepáticas durante el proceso regenerativo.

Aunque se ha progresado en el conocimiento de la implicación de la IL-6 en la fisiología y patología del hígado, todavía quedan cuestiones pendientes por elucidar como la identidad y relevancia de la fuente celular de IL-6 en la regeneración hepática. En nuestro estudio, hemos usado el sistema Cre/LoxP para generar ratones deficientes de IL-6 específicamente en células mieloides (incluyendo las células de Kupffer) o hepatocitos para evaluar de forma concluyente la contribución y los efectos específicos de la IL-6 producida por macrófagos y hepatocitos en la regeneración hepática.

## **IV.- *HIPÓTESIS***

---



La mayoría de estudios sobre el papel de la IL-6 en la regeneración hepática han utilizado ratones con deficiencia sistémica de IL-6, y han proporcionado resultados difíciles de interpretar e incluso contradictorios. Diferencias en los diseños experimentales, la aparición de distintas vías compensadoras del déficit génico, o una verdadera capacidad de la IL-6 para producir efectos opuestos son posibles explicaciones a las discrepancias encontradas. Una explicación adicional que ha recibido escasa atención es la posible relevancia de la fuente celular de la IL-6, esto es, que la IL-6 procedente de distintas células produzca efectos distintos. En este sentido, siempre se ha considerado que las células de Kupffer son la principal fuente de IL-6 tras una HP (Shiratori et al, 1996; Aldeguer et al, 2002), pero evidencias recientes sugieren que otros tipos celulares pueden producir IL-6 en la regeneración hepática. Por ejemplo, los hepatocitos son capaces de producir IL-6 tras la administración de LPS o tras la realización de una HP (Norris et al, 2014). En el presente trabajo, hemos generado ratones, mediante el sistema Cre/LoxP, que presentan una deficiencia selectiva del gen de la IL-6 en células de origen mieloide (que incluyen las células de Kupffer) o en hepatocitos, con el fin de evaluar la contribución y los efectos específicos de la IL-6 producida por dichas células en la regeneración hepática. Basándonos en estudios previos (Cressman et al, 1996; Sakamoto et al, 1999; Wuestefeld et al, 2003; Moh et al, 2007), el presente trabajo evaluó la siguiente hipótesis general e hipótesis específicas:

## **HIPÓTESIS GENERAL**

Las células de Kupffer (macrófagos tisulares hepáticos) son la principal fuente celular de IL-6 tras la realización de una HP en ratones.

## **HIPÓTESIS ESPECÍFICAS**

- La producción de IL-6 por células de Kupffer y por hepatocitos es necesaria para el desarrollo de una regeneración hepática normal.
- No existen fuentes celulares extrahepáticas relevantes de IL-6 tras la realización de una HP en ratones.

## **V.- OBJETIVOS**

---



**El OBJETIVO GENERAL** del presente estudio fue **determinar la importancia de la fuente celular de la IL-6 (células de estirpe mieloide vs. hepatocitos) en el desarrollo de la regeneración hepática tras una HP en ratones.**

Para evaluar dicho objetivo, realizamos una HP del 70% en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de origen mieloide (que incluyen las células de Kupffer) o en hepatocitos. Dado que la técnica quirúrgica tradicional para la realización de una HP del 70% presenta una serie de limitaciones como la reproducibilidad en la cantidad de tejido resecado, la resección quirúrgica de la vesícula biliar, y el desarrollo de necrosis hepatocelular, realizamos además un estudio preliminar con el fin de elegir el protocolo técnico de HP del 70% que fuese más reproducible.

Los **OBJETIVOS ESPECÍFICOS** del presente trabajo fueron:

**1. Optimizar la técnica quirúrgica de hepatectomía parcial (HP) en ratones.** Para ello, comparamos:

**A. La reproducibilidad de dos protocolos de HP en ratones,** en concreto comparamos el protocolo tradicional de HP descrito por Higgins y Anderson en ratas en 1931 y modificado por Mitchell C et al. para ratones en 2008 (que utiliza dos ligaduras) con un protocolo modificado en el que se utilizan tres ligaduras para realizar la resección de la masa hepática. Evaluamos los siguientes parámetros:

i. Cantidad de tejido resecado.

- ii. Cantidad de tejido remanente de los lóbulos resecados.
- iii. Dinámica de la regeneración hepática:
  - Concentración de IL-6 en plasma tras una HP.
  - Síntesis de ADN y mitosis en hepatocitos.
  - Relación del peso del hígado frente al peso corporal (Índice hepático).

**B. Las complicaciones de la técnica de HP tradicional frente a la HP modificada. En concreto, evaluamos:**

- i. La mortalidad intra-operatoria.
- ii. El desarrollo de necrosis en el hígado remanente.
- iii. Parámetros bioquímicos de daño hepático

**2. Determinar la contribución de cada tipo celular (hepatocitos y macrófagos) a la producción de IL-6 y la relevancia de la fuente celular de IL-6 como factor determinante de sus efectos sobre la regeneración hepática.** Para ello, utilizamos la técnica de HP modificada (con tres ligaduras) y ratones con deficiencia selectiva del gen de la IL-6 en células de estirpe mieloide o en hepatocitos generados mediante el sistema Cre/LoxP. Nuestros sub-objetivos fueron:

**A. Validar los ratones generados con deficiencia selectiva de IL-6 en células específicas.** Para ello, evaluamos en dichos ratones:

- i. La producción de IL-6 en cultivos primarios de macrófagos peritoneales.
- ii. La elevación de la IL-6 circulante tras la administración de LPS.
- iii. La selectividad y penetrancia de la recombinación inducida por los ratones transgénicos LysM-cre y Alb-cre, cruzándolos con una cepa de ratón reportera de linaje celular (B6.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sortm26Sor<sup>tm4</sup>(ACTB-tdTomato,-EGFP)LUO/J, stock 007676 de Jackson Labs).

**B. Evaluar las características basales de ratones con deficiencia de IL-6 en células específicas (células de estirpe mieloide / hepatocitos).** Para ello, evaluamos en ratones no operados:

- i. El peso corporal.
- ii. La relación del peso del hígado frente al peso corporal (Índice hepático).
- iii. Parámetros hematológicos.
- iv. Parámetros bioquímicos.

**C. Determinar la contribución de las células de estirpe mieloide y de los hepatocitos a la producción de IL-6 tras una HP.** Para ello, evaluamos en las primeras horas tras la cirugía:

- i. La expresión de ARNm de IL-6 en tejido hepático.
- ii. Los niveles de IL-6 circulante.

**D. Determinar el impacto de la deficiencia de IL-6 en células de estirpe mieloide o en hepatocitos sobre la señalización de IL-6 en el hígado tras una HP.** Para ello, evaluamos diversos parámetros de las vías de señalización de la IL-6 (STAT3, ERK, AKT y SOCS-3) en tejido hepático.

**E. Determinar el impacto de la deficiencia de IL-6 en células de estirpe mieloide o en hepatocitos sobre el desarrollo de la regeneración hepática tras una HP.**

Para ello, evaluamos:

- i. La síntesis de ADN y las mitosis en hepatocitos.
- ii. Varios marcadores de proliferación celular.
- iii. La relación del peso del hígado frente al peso corporal (Índice hepático).
- iv. Parámetros bioquímicos de daño hepático.

**3. Determinar la potencial contribución de fuentes extra-hepáticas a la elevación de la IL-6 circulante tras una HP.** Para ello,

evaluamos en ratones sometidos a una HP:

- i. Los niveles de IL-6 en la cavidad peritoneal (lavado peritoneal).
- ii. La expresión génica de IL-6 en diversos órganos.

**VI.- MATERIALES Y  
MÉTODOS**

---



## **1.- EXPERIMENTOS IN VIVO**

### **1.1.- ANIMALES**

En el presente trabajo utilizamos ratones C57BL/6J (The Jackson Laboratory, Stock 0664), ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide (que incluye las células de Kupffer) (IL-6 KO<sub>M</sub>), ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos (IL-6 KO<sub>H</sub>), ratones con marcaje de EGFP endógeno en células de origen mieloide (cruces LysMCrexTdEGFP), ratones con marcaje de EGFP endógeno en hepatocitos (cruces AlbCrexTdEGFP), y ratones IL-6 KO (The Jackson Laboratory, Stock 002650). Todos los ratones utilizados en los experimentos fueron machos entre 8-14 semanas de edad (20-24 g de peso).

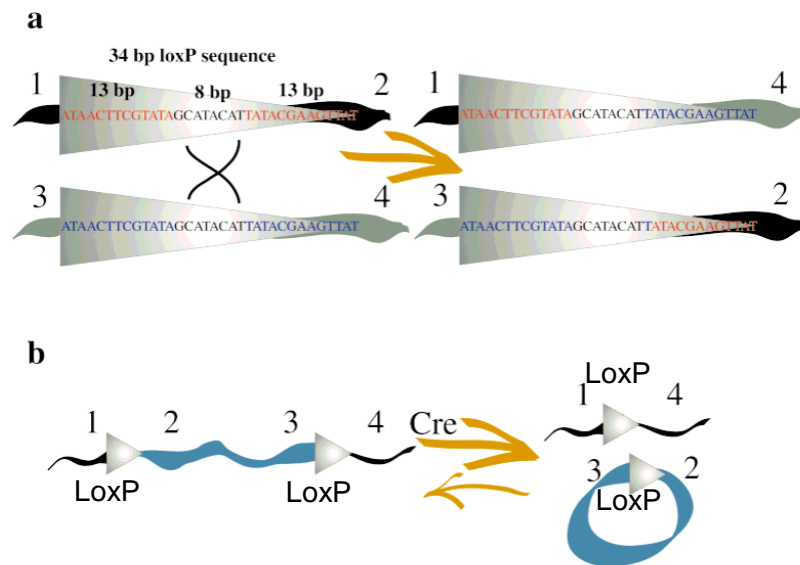
Todos los experimentos se realizaron en el laboratorio de Hepatología y Gastroenterología, sito en el Pabellón de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM), perteneciente al Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IiSGM) y a la Universidad Complutense de Madrid.

Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo a la Guía para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio (National Research Council, 1996) y en cumplimiento de la legislación de la Unión Europea (Directriz 2010/63/EU) y del Real Decreto RD53/2013 (European Commission, 2010), y fueron aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal del HGUGM (Madrid, España). Los ratones fueron estabulados en racks ventilados y se mantuvieron a una

temperatura y humedad constantes, con ciclos de 12 horas de luz-oscuridad. Los ratones tuvieron acceso *ad libitum* a pienso estándar y a agua de bebida, salvo la noche previa a la cirugía y en las primeras horas posteriores a la misma.

### **1.1.1.- Generación de ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células específicas**

Para conocer el papel de la IL-6 procedente de distintos tipos celulares en la regeneración hepática, se generaron ratones KO con deficiencia selectiva de IL-6 en células específicas. La generación de estos ratones KO condicionales se realizó mediante el empleo del sistema de recombinación Cre-LoxP (Akagi et al, 1997). Este sistema se basa en el empleo de la enzima derivada del bacteriófago P1, Cre recombinasa (Kilby et al 1993). Esta enzima reconoce secuencias de 34 pares de bases (pb) llamadas LoxP, que son introducidas en el ADN para flanquear al gen que se desea eliminar. Tras el reconocimiento de estas secuencias, la recombinasa Cre libera los fragmentos de ADN flanqueados por las secuencias LoxP mediante un proceso de recombinación homóloga en las cadenas de ADN remanentes (Figura 27) (Akagi et al, 1997).



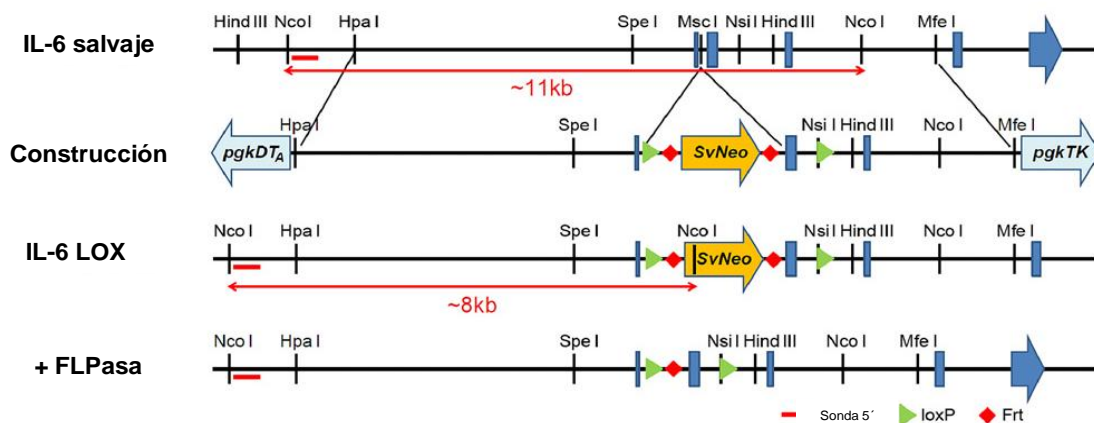
**Figura 27. Descripción del sistema Cre/LoxP.** A. Recombinación mediada por la Cre recombinasa entre dos secuencias LoxP de 34 pb. B. Representación esquemática de la escisión e integración llevada a cabo por la recombinasa Cre. Imagen modificada de Nagy 2000.

Avances en Genética Molecular y Embriología han hecho posible realizar mutaciones de genes específicos en la línea germinal de ratones. Sin embargo, estos modelos tienen una serie de limitaciones conocidas, ya que la delección de un determinado gen puede ser letal durante el desarrollo embrionario del ratón o puede causar efectos pleiotrópicos complejos que impiden el desarrollo de estos animales. Para superar estas limitaciones, se han generado estrategias que permiten eliminar de forma condicional y específica determinados genes en tipos celulares (Gordon et al 1980; Capecchi 1989; Copp et al 1995; Akagi et al, 1997). De esta manera, se pueden generar ratones que poseen la región del ADN que se quiere eliminar flanqueada por secuencias LoxP (ratones floxeados). Estas secuencias flanqueadas de ADN se pueden eliminar del genoma del ratón al cruzarlo con un ratón que exprese la Cre recombinasa. Además, esta delección se produce

sólo en tipos celulares determinados si la expresión de esta enzima está dirigida por promotores específicos. Con esta estrategia, no se suelen producir cambios fenotípicos tan severos en el estado embrionario y con el tiempo se ha podido demostrar que esta estrategia funciona en distintos escenarios (Thomas KR, Capecchi MR, 1987; Lakso et al 1992; Kühn et al, 1995).

Para obtener los ratones KO condicionales mediante el empleo de esta estrategia, es necesario en primer lugar generar un ratón floxeado para IL-6. Este ratón nosotros lo obtuvimos gracias a los Drs. Juan Hidalgo y Albert Quintana de la Universidad Autónoma de Barcelona que nos lo cedieron amablemente para realizar estos experimentos. En 2013, Quintana et al. describieron la generación de este ratón floxeado para IL-6, mediante la eliminación del exón 2 de dicho gen. La eliminación del exón 2 fue debida a que previamente se había demostrado que, si el exón 2 de este gen estaba truncado por la presencia de una cassette neo, no se producía esta proteína (Quintana et al, 2013; Kopf et al, 1994). Partiendo de la secuencia genómica de IL-6 y de un plásmido (disponible comercialmente en Invitrogen), se diseñó una construcción genética en la cual se clonó la secuencia del gen de IL-6 con dos secuencias LoxP flanqueando al exón 2 dentro un plásmido que contenía una *cassette* Neo para la selección positiva, y para la selección negativa también poseía los genes Pgk-DT<sub>A</sub> y HSV-TK. El cassette Neo estaba flanqueado por secuencias Frt que se usaron posteriormente para eliminar este cassette (Figura 28). Una vez verificado por secuenciación que la construcción genética contenía las

secuencias LoxP en la orientación y posición correctas, se introdujo en las células 129X1/SvJ ES por electroporación. Mediante Southern Blot, se seleccionaron 5 clones positivos de 138 analizados que fueron inyectados en blastocitos de ratones C57BL6. Estos blastocitos se implantaron en hembras receptoras de las que se obtuvo descendencia quimérica y se seleccionaron los animales con el transgen en la línea germinal. Posteriormente, se eliminó el cassette Neo mediante el cruce de estos ratones con ratones FLPer que expresaban la recombinasa FLP, la cual reconoce las secuencias Frt (Farley et al, 2000). Finalmente, se eliminó el gen FLPer cruzando la descendencia de estos animales con ratones C57BL6 y se estableció una colonia homocigota de ratones IL-6 floxeados (IL-6<sup>LOX/LOX</sup>) mediante el cruce de ratones IL-6<sup>LOX/+</sup> FLPer<sup>-/-</sup> consigo mismos.



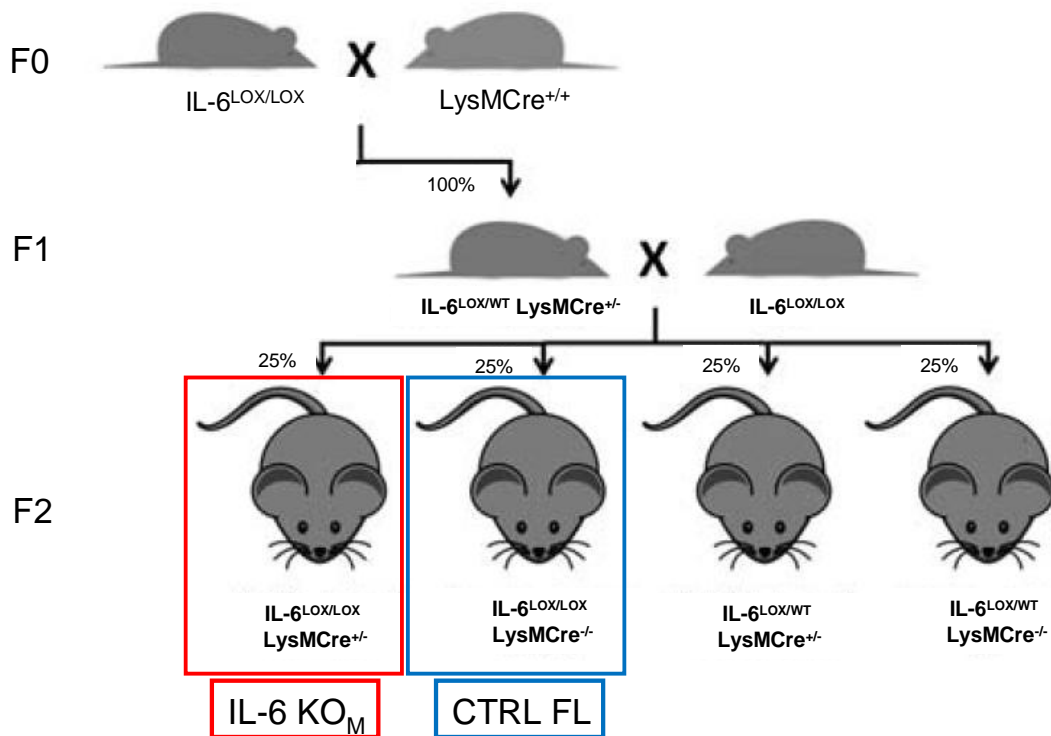
**Figura 28. Generación de ratones floxeados para IL-6.** Estrategia de modificación genética dirigida para la obtención del ratón floxeado para el gen de la IL-6. La detección de clones positivos se realizó por Southern Blot mediante la obtención de dos bandas, una banda de 11 kilobases (kb) para el alelo salvaje (IL-6<sup>+/+</sup>) y otra banda de 8 kb para el alelo floxeado (IL-6<sup>LOX/LOX</sup>). IL-6: Interleucina-6. Imagen modificada de Quintana et al, 2013.

**1.1.1.1.- Ratones KO condicionales de IL-6 en células de estirpe mieloide (IL-6 KO<sub>M</sub>)**

Para obtener los ratones KO condicionales de IL-6 en macrófagos y otras células de estirpe mieloide (IL-6 KO<sub>M</sub>) (Figura 29), se realizó un primer cruce entre el ratón floxeado para IL-6 (IL-6<sup>LOX/LOX</sup>) con un ratón en el que la expresión de la Cre recombinasa estaba dirigida por el promotor de la lisozima (LysMCre) (B6.129P2-Lyz2<sup>tm1(cre)lfo</sup>/J, The Jackson Laboratory, stock 4781). Los ratones LysMCre presentan la Cre recombinasa insertada en el primer codón del gen ATG de la lisozima 2 (Lyz2), de forma que esta inserción hace que la expresión de la Cre recombinasa esté dirigida por el promotor del gen Lyz2, que es específico de células de estirpe mieloide. La descendencia de este cruce se compone de ratones heterocigotos para el gen de la IL-6 floxeado y para el gen de la Cre recombinasa. Estos ratones sólo tendrían un alelo del gen de IL-6 intacto en las células de estirpe mieloide mientras que el otro alelo de IL-6 sería salvaje.

Para obtener los distintos genotipos utilizados en este estudio, se cruzaron los ratones heterocigotos para el gen de la IL-6 floxeado y para la Cre recombinasa con ratones homocigotos para el gen de la IL-6 floxeado (IL-6<sup>LOX/LOX</sup>). De este cruce, se obtuvieron ratones homocigotos para el gen de la IL-6 floxeado que poseían la Cre recombinasa, y como consecuencia, tendrían delecionados ambos alelos de IL-6 en las células de estirpe mieloide y no expresarían IL-6 en estas células (IL-6 KO<sub>M</sub>). En este trabajo, usamos como controles ratones de las mismas camadas

que son homocigotos para el gen de la IL-6 floxeado (IL-6<sup>LOX/LOX</sup>) pero que no expresan la Cre recombinasa (CTRL FL).



**Figura 29. Estrategia de cruzamientos para obtener ratones KO condicionales de IL-6 en macrófagos (IL-6 KO<sub>M</sub>).** En la generación F0, ratones homocigotos para la Cre recombinasa (LysMCre<sup>+/+</sup>) se cruzaron con ratones homocigotos floxeados para IL-6 (IL-6<sup>LOX/LOX</sup>). Todos los ratones de la primera generación (F1), fueron heterocigotos para ambos genes (IL-6<sup>LOX/WT</sup> LysMCre<sup>+/-</sup>). Estos ratones fueron cruzados con ratones homocigotos floxeados para IL-6 (IL-6<sup>LOX/LOX</sup>) y en la segunda generación (F2), se obtuvieron cuatro genotipos: IL-6<sup>LOX/LOX</sup> LysMCre<sup>+/-</sup>, IL-6<sup>LOX/LOX</sup> LysMCre<sup>-/-</sup>, IL-6<sup>LOX/WT</sup> LysMCre<sup>+/-</sup> y IL-6<sup>LOX/WT</sup> LysMCre<sup>-/-</sup>. Para los experimentos de este trabajo se compararon los ratones IL-6<sup>LOX/LOX</sup> LysMCre<sup>+/-</sup> (IL-6 KO<sub>M</sub>) con los ratones controles que no expresaban la Cre recombinasa, IL-6<sup>LOX/LOX</sup> LysMCre<sup>-/-</sup> (CTRL FL). IL-6: Interleucina-6.

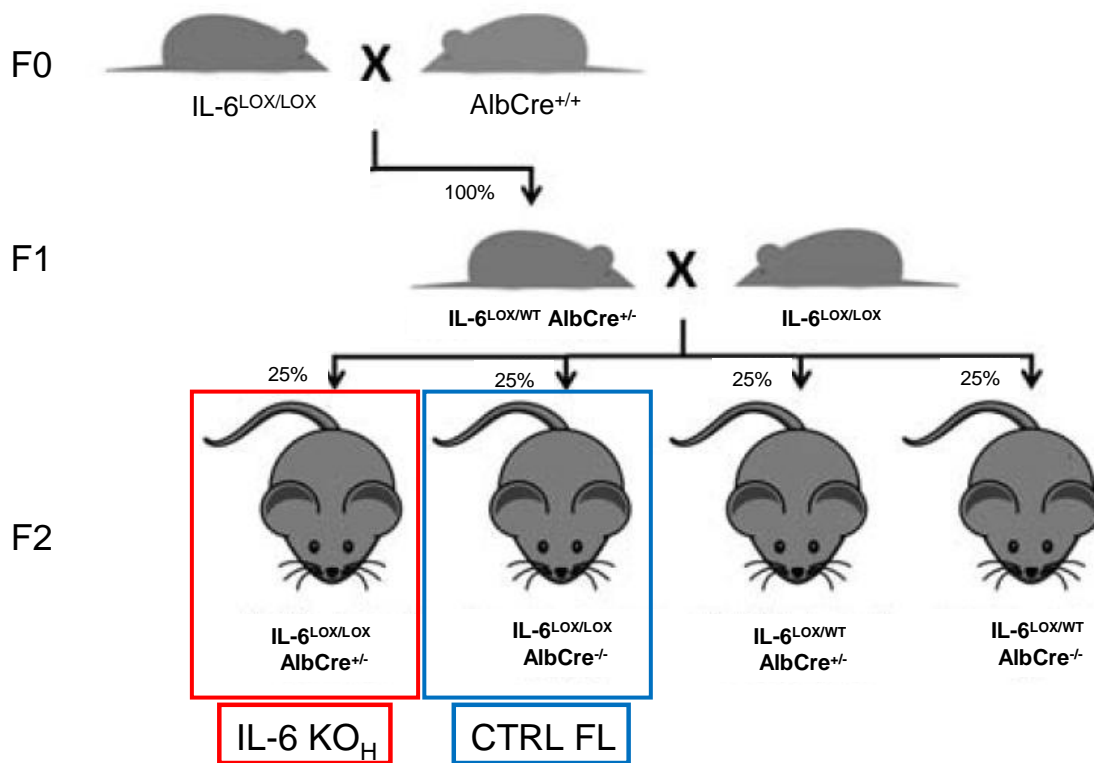
### 1.1.1.2.- Ratones KO condicionales de IL-6 en hepatocitos (IL-6 KO<sub>H</sub>)

Para obtener los ratones KO condicionales de IL-6 en hepatocitos (IL-6 KO<sub>H</sub>) se realizó la misma estrategia de cruzamientos que en los ratones IL-6 KO<sub>M</sub>, pero utilizando un ratón en el que la expresión de la Cre recombinasa estaba dirigida por el promotor de la albumina (AlbCre) (B6.Cg-Tg(Alb-cre)21Mgn/J, The Jackson Laboratory, stock 3574) en lugar de la lisozima (Figura 30). Los ratones AlbCre se han

utilizado para la delección de genes flanqueados por secuencias LoxP en hepatocitos, y se han generado mediante el desarrollo de una construcción genética que contenía el promotor de la albumina de 2.34 Kpb, la Cre recombinasa con secuencia de localización nuclear y un fragmento de 2.1 Kpb del gen de la hormona de crecimiento humana. Esta construcción genética fue inyectada a un pronúcleo B6D2(F2) y, posteriormente, estos ratones se cruzaron con ratones C57BL6/J (The Jackson Laboratory).

La descendencia del cruce de un ratón floxeado para IL-6 homocigoto (IL-6<sup>LOX/LOX</sup>) con un ratón AlbCre, fueron ratones heterocigotos para el gen de la IL-6 floxeado y para el gen de la Cre recombinasa. Estos ratones sólo presentan un alelo del gen de IL-6 intacto en hepatocitos mientras que el otro alelo de IL-6 es salvaje.

Para obtener los distintos genotipos utilizados en este estudio, se cruzo el ratón heterocigoto para el gen de la IL-6 floxeado y para la Cre recombinasa con ratones homocigotos para el gen floxeados de la IL-6 (IL-6<sup>LOX/LOX</sup>). De este cruce, se obtuvieron ratones homocigotos para el gen de la IL-6 que poseían la Cre recombinasa y, como consecuencia, que tenían delecionado ambos alelos de IL-6 en hepatocitos y no expresaban IL-6 en los mismos (IL-6 KO<sub>H</sub>). En este trabajo, usamos como controles ratones homocigotos floxeados de IL-6 (IL-6<sup>LOX/LOX</sup>) de las mismas camadas pero que no portaban el gen de la Cre recombinasa (CTRL FL).



**Figura 30. Estrategia de cruzamientos para obtener ratones KO condicionales de IL-6 en hepatocitos (IL-6 KO<sub>H</sub>).** En la generación F0, ratones homocigotos para la Cre recombinasa ( $AlbCre^{+/+}$ ) se cruzaron con ratones homocigotos para el gen floxeado de IL-6 ( $IL-6^{LOX/LOX}$ ). Todos los ratones de la primera generación (F1), fueron heterocigotos para ambos genes ( $IL-6^{LOX/WT} AlbCre^{+/-}$ ). Estos ratones fueron cruzados de nuevo con ratones homocigotos para el gen floxeado de IL-6 ( $IL-6^{LOX/LOX}$ ) y en la segunda generación (F2), se obtuvieron cuatro genotipos:  $IL-6^{LOX/LOX} AlbCre^{+/-}$ ,  $IL-6^{LOX/LOX} AlbCre^{-/-}$ ,  $IL-6^{LOX/WT} AlbCre^{+/-}$  y  $IL-6^{LOX/WT} AlbCre^{-/-}$ . Para los experimentos de este trabajo, comparamos los ratones  $IL-6^{LOX/LOX} AlbCre^{+/-}$  (IL-6 KO<sub>H</sub>) con los ratones controles que no expresan la Cre recombinasa,  $IL-6^{LOX/LOX} AlbCre^{-/-}$  (CTRL FL). IL-6: Interleucina-6.

### **1.1.2.- Ratones reporteros de linaje celular**

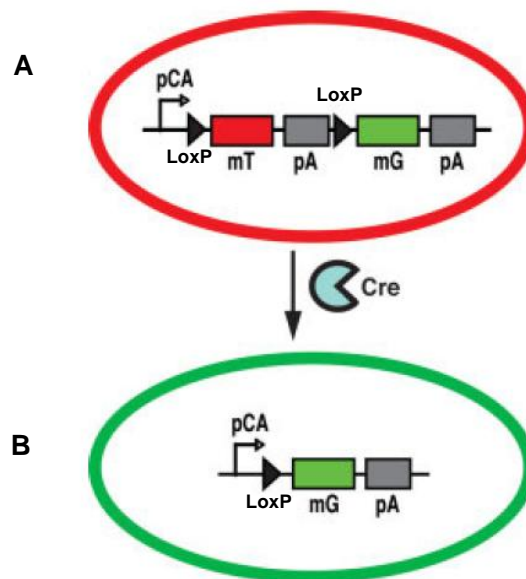
El sistema Cre/LoxP se utiliza habitualmente para generar ratones KO condicionales. En este sentido, los ratones reporteros de linaje celular son una herramienta útil para definir de forma espacial y temporal la extensión de la recombinación mediada por la enzima Cre recombinasa. La generación de ratones reporteros con marcaje endógeno de proteínas fluorescentes mediante el sistema Cre/LoxP permite visualizar dichos marcadores *in vivo* y en muestras fijadas de

tejidos obtenidos. El uso de estos ratones ha permitido delinear la morfología celular de las células estudiadas, destacar estructuras en la membrana de estas células y visualizar procesos celulares. Además, estos ratones han sido usados como una herramienta para estudiar el linaje celular, estudios de trasplante y análisis de la morfología celular *in vivo* (Muzumdar et al, 2007).

#### **1.1.2.1.- Ratones reporteros de células de estirpe mieloide**

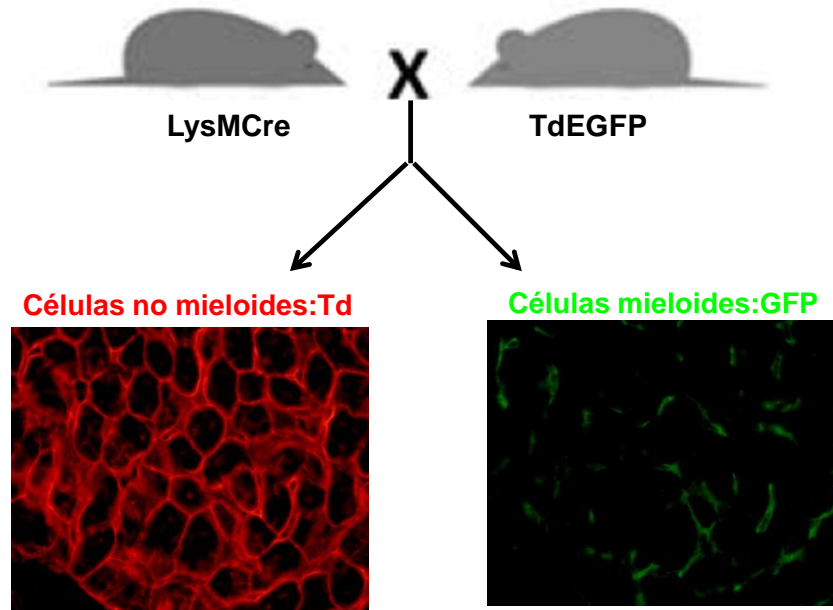
Para obtener ratones reporteros de células de origen mieloide se realizaron cruces entre un raton LysMCre (la expresión de la Cre recombinasa está dirigida por el promotor de la lisozima, de forma que está enzima se expresa en células de estirpe mieloide) y un raton Tomato-dye-EGFP (TdEGFP) (B6.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sort<sup>m4</sup>(ACTB-tdTomato,-EGFP)<sup>Luo</sup>/J, The Jackson Laboratory, stock 7676). El ratón TdEGFP está transfectado de forma estable con el vector ROSA<sup>mT/mG</sup>. Este vector lleva la proteína Tomato con un patrón de expresión de membrana (mT) flanqueado por secuencias LoxP, el promotor pCA y la secuencia de la proteína GFP con un patrón de expresión de membrana (mG) (Figura 31). Los ratones procedentes del cruce mencionado previamente expresan la proteína fluorescente roja Tomato-dye en la membrana plasmática de todas sus células, salvo en las células que expresan la Cre recombinasa. La expresión de Cre recombinasa en dichas células media la excisión de la secuencia STOP floxeada, pasando a expresar la

proteína fluorescente verde EGFP en su membrana plasmática (Muzumdar et al, 2007).



**Figura 31. Representación del vector ROSA<sup>mT/mG</sup> antes y después de la recombinação por la recombinasa Cre.** El vector ROSA<sup>mT/mG</sup> posee el cassette Tomato (td) con un patrón de expresión de membrana (mT) flanqueado por dos sitios loxP (representados por un triángulo) a cada lado del cassette. La expresión de este cassette está dirigida por el promotor pCA, y en este vector también se encuentra la secuencia con la proteína fluorescente verde (GFP) con un patrón de expresión de membrana (mG). A. Bajo la acción específica del promotor pCA, los ratones transfectados con el vector ROSA<sup>mT/mG</sup> (TdEGFP) tienen fluorescencia roja con localización de membrana en todos los tejidos. B. Cuando se cruzan estos ratones con otros que expresan la Cre recombinasa bajo la acción de un promotor específico de tejido o célula, la camada resultante sufre la delección del cassette mT en los tejidos que expresan la Cre recombinasa, ya que ésta reconoce los sitios loxP del cassette mT y mediante recombinação homóloga se produce la delección del mismo, permitiendo al promotor pCA dirigir la expresión de EGFP con una localización de membrana. PA son las secuencias de poliadenilación. Imagen modificada de Muzumdar et al, 2007.

La descendencia del cruce de un ratón LysMCre con un ratón TdEGFP está compuesta por ratones (LysMCre-TdEGFP) que tienen fluorescencia roja en la membrana de las células de todos los tejidos, salvo en las células que producen la lisozima (células de origen mielóide) que al expresar la Cre recombinasa son de color verde en su membrana (Figura 32).

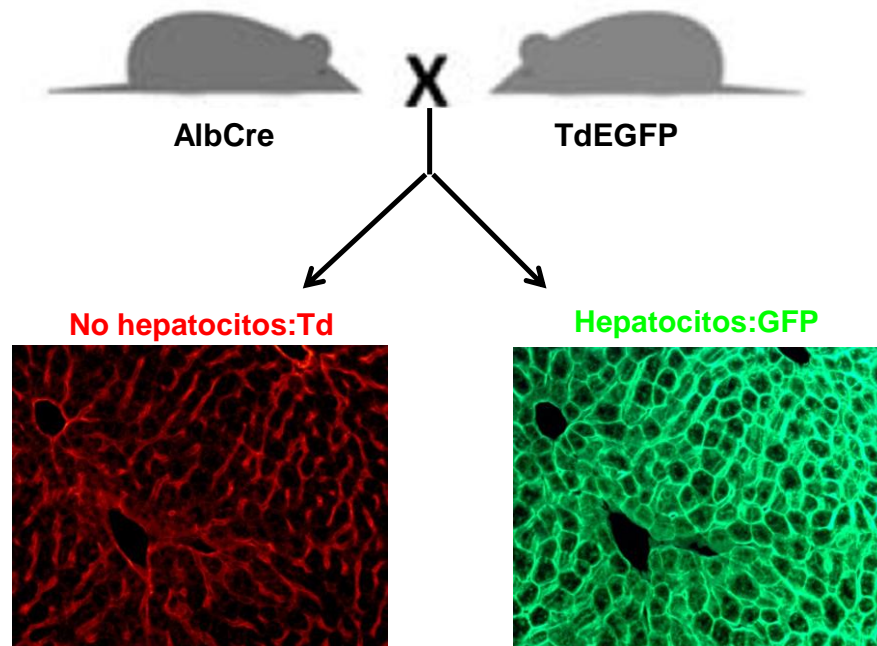


**Figura 32. Estrategia de cruzamiento para obtener ratones reporteros de linaje de células mieloide (LysMCre-TdEGFP).** Tras el cruzamiento de ratones LysMCre con ratones TdEGFP, se obtienen ratones que expresan la proteína tomate en la membrana de todas sus células (fluorescencia roja) salvo en las células que producen lisozima (células de origen mieloide) que expresan la proteína GFP en su membrana (fluorescencia verde). La visualización de la fluorescencia y las fotos a una amplificación de 40X fueron realizadas con la ayuda de un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E800) acoplado a una cámara (Nikon Digital Camera DXM1200F). LysMCre: Lisozima Cre; TdEGFP: De sus siglas en inglés "Tomato-dye-EGFP"; GFP: De sus siglas en inglés "Green Fluorescent protein" (Proteína fluorescente verde).

#### **1.1.2.2.- Ratones reporteros de hepatocitos**

Para obtener ratones reporteros con marcaje endógeno en hepatocitos se realizaron cruces entre ratones AlbCre (con la expresión de la Cre recombinasa dirigida por el promotor de la albumina, de forma que esta enzima se expresa en hepatocitos) y ratones Tomato-dye-EGFP (TdEGFP) (B6.129(Cg)-Gt(ROSA)26Sort<sup>m4</sup>(ACTB-tdTomato,-EGFP)<sup>Luo</sup>/J, The Jackson Laboratory, stock 7676). La descendencia de este cruce está compuesta por ratones (AlbCre-TdEGFP), que tienen fluorescencia roja en la membrana plasmática de todas las células, salvo en aquellas que producen albumina (hepatocitos), las cuales al expresar la Cre

recombinasa presentan expresión de la proteína fluorescente verde EGFP en su membrana (Figura 33).



**Figura 33. Estrategia de cruzamiento para obtener ratones fluorescentes en hepatocitos (AlbCre-TdEGFP).** Tras el cruzamiento de ratones AlbCre con ratones TdEGFP, se obtienen ratones que expresan la proteína Tomato-dye en la membrana de todas sus células (fluorescencia roja) salvo en aquellas que producen albumina (hepatocitos), las cuales expresan la proteína GFP en su membrana (fluorescencia verde). La visualización de la fluorescencia y las fotos a una ampliación de 20X fueron realizadas con la ayuda de un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E800) acoplado a una cámara (Nikon Digital Camera DXM1200F). AlbCre: Albumina Cre; TdEGFP: De sus siglas en inglés "Tomato-dye-EGFP"; GFP: De sus siglas en inglés "Green Fluorescent protein" (Proteína fluorescente verde).

### **1.1.3.- Genotipaje de ratones**

Los ratones se destetaron a los 21 días tras el nacimiento, se identificaron con etiquetas en las orejas y se separaron por sexos. Se les cortó un trocito de cola de menos de 0,5 cm que se almacenó en criotubos a -80°C para posteriormente extraer el ADN y genotipar a los animales por PCR. Este genotipaje fue confirmado de nuevo por muestras de oreja o de tejido hepático obtenido al final de cada experimento.

### **1.1.3.1.- Extracción de ADN**

Las muestras de tejido de cola u oreja se digirieron durante la noche con buffer de lisis (10 mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% SDS) y proteinasa K (Sigma-Aldrich) en rotación en un horno a 55°C. El ADN se aisló con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (Sigma-Aldrich) y se precipitó con etanol al 95% (VWR Chemical). Tras centrifugar, el pellet de ADN se resuspendió en buffer TE 10:1 (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0) y agua libre de nucleasas.

La concentración de ADN se determinó mediante la medida de la absorbancia a 260 nm con la ayuda de un Nanodrop (Nucliber). Se calculó la pureza de los extractos por la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm. En todos los casos esta relación fue cercana a 2. Una relación cercana a 2 indica ausencia de contaminación por proteínas en la muestra.

Finalmente, la concentración de ADN se normalizó a una concentración final de 100 µg/mL. Tras este paso, las muestras se usaron para realizar la PCR o bien se guardaron a 4°C para hacer posteriormente esta reacción.

### **1.1.3.2.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Para genotipar a los animales se uso la técnica de PCR. Los cebadores utilizados para las diferentes reacciones fueron los recomendados por la casa comercial The Jackson Laboratory o los aconsejados por el Dr. Hidalgo para los ratones floxeados de IL-6, y se resumen en la Tabla 3.

En todas las PCRs se utilizaron 2 $\mu$ L de ADN y 23  $\mu$ L de mezcla de reacción que contenía los distintos reactivos utilizados para cada PCR. En la Tabla 4 se resumen las proporciones por muestra de los diferentes reactivos utilizados en cada PCR.

Las PCRs fueron realizadas en un termociclador *iQ5 Multicolor Real Time PCR Detection System* (Bio-Rad) y los protocolos que se utilizaron para cada reacción se detallan en la Tabla 5.

<b>PCR</b>	<b>GEN</b>	<b>SECUENCIA</b>
<b>IL-6 floxeado</b>	IL6FL (Sentido)	5' CCC ACC AAG AAC GAT AGT CA 3'
	IL6FL (Antisentido)	5' GGT ATC CTC TGT GAA GTC CTC 3'
	IL6FL (Delta)	5' ATG CCC AGC CTA ATC TAG GT 3'
<b>Cre de Jackson</b>	GenCreJ (Sentido)	5' GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC 3'
	GenCreJ (Antisentido)	5' GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT 3'
	IPosC (Sentido)	5' CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT 3'
	IPosC (Antisentido)	5' GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C 3'
<b>LysMCre</b>	LysMCreJ-A	5' CCC AGA AAT GCC AGA TTA CG 3'
	LysMCreJ-B	5' CTT GGG CTG CCA GAA TTT CTC 3'
	LysMCreJ-C	5' TTA CAG TCG GCC AGG CTG AC 3'

**Tabla 3.** Genes y cebadores específicos para cada PCR de genotipaje.

<b>Reactivos</b>	<b>IL-6 floxeado</b>	<b>Cre de Jackson</b>	<b>LysMCre (salvaje)</b>	<b>LysMCre (cre)</b>
<b>10X buffer de reacción (Quiagen)</b>	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL
<b>25 mM MgCl<sub>2</sub> (Quiagen)</b>	3.5 µL	2 µL	-	-
<b>10 mM dNTPs (Sigma Aldrich)</b>	2 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
<b>50 uM cebador sentido</b>	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
<b>50 uM cebador antisentido</b>	0.5 µL	0.5 µL	0.0375 µL (20mM)	0.25 µL
<b>50 uM control interno sentido</b>	-	0.5 µL	-	-
<b>50 uM control interno antisentido</b>	-	0.5 µL	-	-
<b>Q Solution 5X (Quiagen)</b>	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL	2.5 µL
<b>5 U/uL Qiagen Taq (Quiagen)</b>	0.125 µL	0.125 µL	0.125 µL	0.125 µL
<b>H<sub>2</sub>O</b>	11.375 µL	13.375 µL	16.8375 µL	16.625 µL

**Tabla 4.** Reactivos y cantidades de los reactivos de las distintas PCRs.

Pasos	IL-6 floxeado			Cre de Jackson			LysMCre		
	T <sup>a</sup> (°C)	T (min)	N°	T <sup>a</sup> (°C)	T (min)	N°	T <sup>a</sup> (°C)	T (min)	N°
<b>Desnaturalización</b>	95	3	1	95	3	1	95	3	1
<b>Desnaturalización</b>	95	1	33	95	0,5	34	95	0,5	35
<b>Alineamiento</b>	57	1		53. 5	1		62	1	
<b>Elongación</b>	72	1		72	1		72	1	
<b>Elongación</b>	72	10	1	72	10	1	72	10	1
<b>Mantenimiento</b>	4	∞	1	4	∞	1	4	∞	1

**T<sup>a</sup>(°C):** Temperatura en grados centígrados. **T(min):**Tiempo en minutos. **N°:** Número de ciclos.

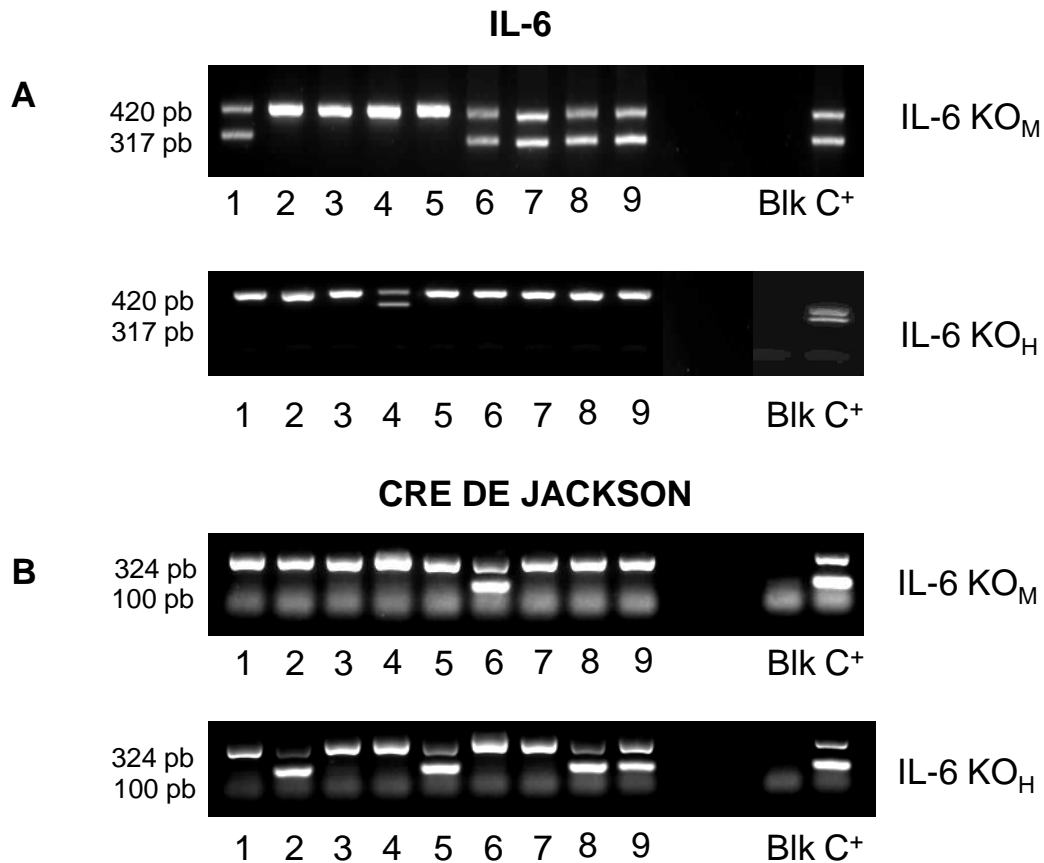
**Tabla 5.** Condiciones de amplificación de las distintas PCRs.

Los productos de cada PCR se evaluaron mediante electroforesis a 60 Voltios durante 1 hora en un gel de agarosa al 1% (Bio-Rad) teñido con Gelred® y posterior exposición a luz ultravioleta.

La PCR para detectar la presencia de los alelos floxeados se basaba en el empleo de dos cebadores (IL6FL sentido y antisentido) (Tabla 3). Uno de ellos reconocía una secuencia intrónica entre el exón 1 y exón 2 y el otro se unía al final del exón 2. Esta PCR de IL-6 generaba una banda de 317 pb para los ratones homocigotos para los alelos de IL-6 salvajes (sin modificaciones), una banda de 420 pb para los ratones homocigotos para los alelos de IL-6 floxeados y dos bandas de 317 pb y 420 pb para los ratones heterocigotos (un alelo de IL-6 salvaje y otro alelo floxeado) (Figura 34.A).

En la PCR utilizada para detectar la presencia de la Cre recombinasa en ratones IL-6 KO<sub>M</sub> y IL-6 KO<sub>H</sub> (PCR Cre de Jackson), se utilizaron los cebadores descritos en la Tabla 3. Esta PCR incluía un control interno positivo, de forma que aparecía una banda de 324 pb en todos los animales. Los animales que tenían el transgen (recombinasa Cre insertada en el genoma) presentaban una banda adicional de 100 pb (Figura 34.B).

Ocasionalmente, utilizamos una PCR para detectar la presencia de heterocigotos para la Cre recombinasa en ratones IL-6 KO<sub>M</sub> (PCR LysMCre); los cebadores utilizados figuran en la Tabla 3. Esta PCR generaba una banda de 350 pb para los ratones que no presentaban la Cre recombinasa en sus dos alelos, una banda de 700 pb para los ratones homocigotos para la Cre recombinasa y dos bandas de 350 pb y 700 pb para los ratones heterocigotos (un alelo presentaba la Cre recombinasa mientras que el otro alelo no la presentaba).



**Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa de las distintas PCRs.** El ADN amplificado se corrió en un gel de agarosa al 1% y se expuso a luz ultravioleta. Cada número corresponde a un animal. Blk es la muestra control que contenía H<sub>2</sub>O en lugar de ADN, y C<sup>+</sup> corresponde a un animal heterocigoto utilizado como control positivo. A. Resultados de la PCR de IL-6. Los ratones 2-5 IL-6 KO<sub>M</sub> son homocigotos para el alelo IL-6 floxeado mientras que el resto de los ratones son heterocigotos (alelo IL-6 floxeado y alelo IL-6 salvaje). En el caso de los ratones IL-6 KO<sub>H</sub>, el ratón 4 es heterocigoto mientras que el resto de los ratones son homocigotos para el alelo IL-6 floxeado. En ambas cepas de ratón, se usó como control positivo (C<sup>+</sup>) un ratón heterocigoto. B. Resultados de la PCR de Cre recombinasa de Jackson. Todos los ratones presentan una banda de control positivo interno de 324 pb. El ratón 6 IL-6 KO<sub>M</sub> presenta una banda de 100 pb que corresponde a la secuencia de la Cre recombinasa. En el caso de los ratones IL-6 KO<sub>H</sub>, los ratones 2, 5, 8 y 9 presentan una banda de 100 pb que corresponde a la secuencia de la Cre recombinasa. En ambas cepas de ratón, se usó como control positivo (C<sup>+</sup>) un ratón heterocigoto para la secuencia de la Cre recombinasa. IL-6: Interleucina-6; IL-6 KO<sub>M</sub>: ratón con deficiencia selectiva de IL-6 en células de origen mieloide; IL-6 KO<sub>H</sub>: ratón con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos.

#### **1.1.4.- Características basales de ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células específicas**

Los ratones KO condicionales para IL-6 tanto en células de origen mieloide como en hepatocitos fueron creados por primera vez para la realización de estos experimentos, por lo que para su caracterización basal medimos los siguientes parámetros:

- El recuento de células sanguíneas
- Parámetros bioquímicos en plasma
- El peso corporal

##### **1.1.4.1.- Recuento de células sanguíneas**

En ratones KO condicionales para IL-6 tanto de células de origen mieloide como de hepatocitos, y en sus respectivos controles, se midieron en plasma los parámetros descritos en la Tabla 6. Para realizar este análisis, recogimos muestras de sangre retro-orbitaria con capilares heparinizados en ratones no operados de 8-14 semanas de edad, como se describe en el apartado 3 de Material y Métodos. Estas muestras fueron medidas en un autoanalizador hematológico (Mindray BC 2800 Vet), siguiendo las indicaciones del fabricante.

<b>PARÁMETROS</b>	<b>UNIDADES</b>
<b>Contaje de glóbulos blancos (WBC)</b>	X 10 <sup>9</sup> /L
<b>Contaje de glóbulos rojos (RBC)</b>	X 10 <sup>12</sup> /L
<b>Plaquetas (PLT)</b>	X 10 <sup>9</sup> /L
<b>Porcentaje de linfocitos (LYM%)</b>	-
<b>Porcentaje de monocitos (MON%)</b>	-
<b>Porcentaje de granulocitos (GRAN%)</b>	-
<b>Hematocrito en porcentaje (HTC%)</b>	-

**Tabla 6.** Parámetros sanguíneos analizados en un autoanalizador hematológico (Mindray BC 2800 Vet).

#### **1.1.4.2.- Determinación de parámetros bioquímicos en plasma**

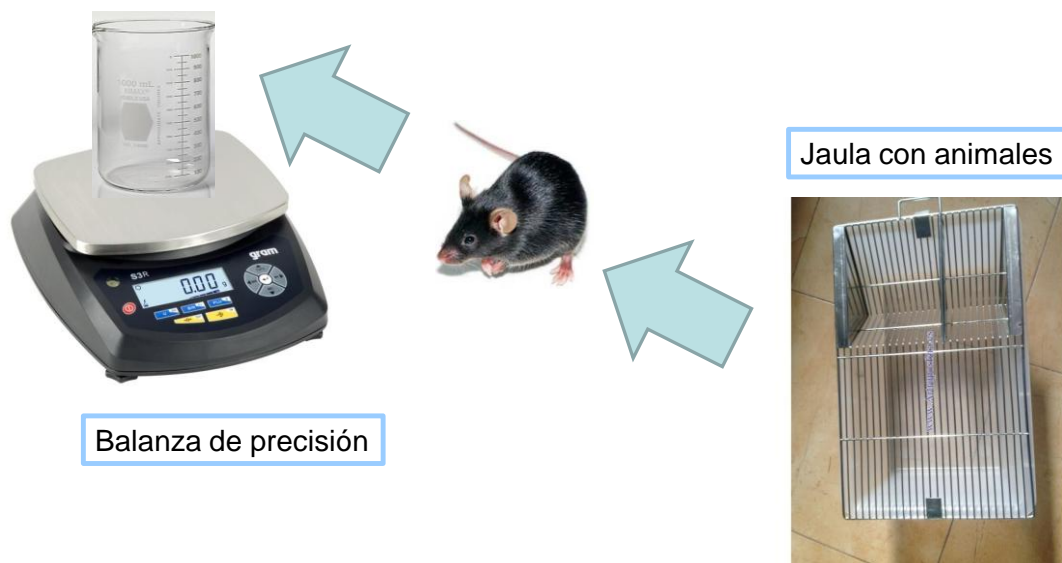
En ratones KO condicionales para IL-6 tanto de células de origen mieloide como de hepatocitos, y en sus respectivos controles, se midieron en plasma los parámetros bioquímicos descritos en la Tabla 7. Para realizar este análisis, recogimos muestras de sangre retro-orbitaria con capilares heparinizados en ratones no operados y en ratones sometidos a una HP modificada y sacrificados a las 32 horas tras la cirugía, como se describe en el apartado 3 de Material y Métodos. Estas muestras se analizaron con métodos de laboratorio comunes del Departamento de Análisis Clínicos del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM).

<b>PARÁMETROS BIOQUÍMICOS</b>	<b>UNIDADES</b>
<b>Alanina aminotransferasa (ALT)</b>	U/L
<b>Aspartato aminotransferasa (AST)</b>	U/L
<b>Fosfatasa alcalina (FAL)</b>	U/L
<b>Lactato deshidrogenasa (LDH)</b>	U/L
<b>Fosfato</b>	mg/dL

**Tabla 7.** Parámetros bioquímicos analizados en el Departamento de Análisis Clínicos del HGUGM.

### **1.1.4.3.- Evaluación del peso corporal**

En ratones KO condicionales para IL-6 de células de origen mieloide e hepatocitos y en sus respectivos controles, se midió a las 8-14 semanas de edad el peso corporal en gramos sobre una balanza de precisión, usando un vaso de precipitados previamente tarado para depositar el animal sobre el aparato (Figura 35).



**Figura 35. Medida del peso corporal en ratones con balanza de precisión.** Los ratones fueron recogidos uno a uno de sus jaulas y depositados en un vaso de precipitados previamente tarado sobre una balanza de precisión.

## **1.2.- MODELOS EXPERIMENTALES**

### **1.2.1.- Hepatectomía parcial (HP) de 2/3 (70%)**

El modelo experimental utilizado para inducir la regeneración hepática en ratones fue la realización de una HP de 2/3, que implica la resección del 70% del parénquima hepático. Los modelos de regeneración hepática requieren condiciones experimentales estandarizadas para evitar cambios en la reproducibilidad de los resultados. Además, la duración de la fase inicial de la regeneración

hepática, la intensidad y el momento de inicio de la síntesis máxima de ADN y el momento de comienzo de la mitosis que conllevan la inducción de la regeneración hepática varía en los animales dependiendo de los siguientes factores (LaBrecque et al, 1978; Nevzorova et al, 2015):

- la especie animal empleada.
- la edad.
- el status nutricional.
- el sexo.
- el ritmo circadiano.
- la anestesia empleada.

Para evitar el impacto de estos factores en la técnica quirúrgica, fueron escogidos ratones machos de 8-14 semanas de edad (peso de 20-25 gramos) del mismo background genético (C57BL6). Estos ratones fueron dejados en ayunas la noche previa a la cirugía, que siempre se llevó a cabo a la mañana siguiente entre las 8:00 y 14:00 horas.

En el momento de la cirugía, los ratones fueron anestesiados con sevoflurano inhalado (Abbvie). La profundidad de la anestesia se consideró suficiente cuando los animales no tenían reflejo pedal de retirada y no reaccionaban al corte de la piel o peritoneo. El equipamiento para administrar anestesia consistió en un regulador de flujo para suministrar oxígeno, un vaporizador para añadir sevoflurano (Abbvie) al flujo anterior en una proporción conocida, y una cámara de inducción y una mascarilla para la inducción y mantenimiento de la anestesia, respectivamente. Durante la fase de inducción, el flujo de aire y oxígeno fue de 1,5 L/min y la concentración de sevoflurano fue

del 5%, mientras que en la fase de mantenimiento se redujeron a 0.5 L/min y 3-4 %, respectivamente.

Los grupos control con operaciones simuladas (SHAM) deben ser siempre incluidos en estos estudios puesto que el estrés quirúrgico, la manipulación del hígado e incluso la anestesia, pueden iniciar el fenómeno de síntesis de ADN (Moolten et al, 1970). Por este motivo, incluimos dos tipos de grupos controles:

- **Ratones no operados** que no fueron sometidos al estrés quirúrgico, pero sí que fueron puestos en ayunas durante la noche anterior a la cirugía y la toma de muestras se realizó a la mañana siguiente.
- **Ratones SHAM** que fueron sometidos a una laparotomía media y una ligera manipulación con un bastoncito de algodón de los lóbulos hepáticos, pero sin realizar la resección de los mismos (Figura 36.A).

Las operaciones quirúrgicas se realizaron en ratones C57BL6, en ratones deficientes de IL-6 en células de origen mieloide o en hepatocitos, y en sus respectivos controles. La técnica de HP descrita en ratas por Higgins y Anderson R.M. en 1931 con la adaptación descrita para ratones de Mitchell C, Willenbring H. en 2008 es la técnica de uso más generalizado en la actualidad. Como este modelo de HP mostraba una serie de limitaciones en cuanto a la variabilidad de tejido resecado, la eliminación de la vesícula biliar, y el desarrollo de necrosis hepatocelular, en el presente trabajo realizamos un estudio preliminar para tratar de reducir dichas limitaciones. Para ello, evaluamos una

técnica quirúrgica de HP de 2/3 utilizando tres ligaduras separadas (HP modificada), y comparamos dicha técnica con la técnica de HP tradicional. Así, comparamos las dos técnicas de HP que se describen a continuación:

- HP tradicional con dos ligaduras.
- HP modificada con tres ligaduras.

#### **1.2.1.1.- HP tradicional con dos ligaduras**

La técnica de HP tradicional consiste en realizar una laparotomía media y reseca el lóbulo izquierdo y el lóbulo medio hepáticos que representan aproximadamente el 70% de la masa hepática. Esta cirugía se realiza con seda reabsorbible 3:0 y tijeras microquirúrgicas (Figura 36.B), como se describe por Mitchell C, Willenbring H, 2008.

En primer lugar, se afeitó el abdomen de los animales y se aplicó antisepsia con betadine y alcohol. Para acceder a la cavidad abdominal y antes de reseca los lóbulos hepáticos se realizaron los siguientes pasos:

- Cortar la piel con tijera gruesa en la línea media hasta el esternón y con tijera fina el peritoneo.
- Elevar la apofisis xifoides con una pinza. Separar la piel con separador; es importante tener cuidado para no perforar el diafragma en este paso, ni seccionar el pedículo vascular.
- Separar los lóbulos hepáticos con un bastoncillo de algodón humedecido para visualizar el ligamento falciforme y redondo.

- Cortar con tijera los ligamentos.

La resección del lóbulo lateral izquierdo se realizó siguiendo los siguientes pasos:

- Colocar la sutura (extremo corto a la izquierda) sobre el pedículo del lóbulo izquierdo.
- Realizar un nudo doble seguido de nudo simple para hacer la ligadura.
- Cortar un extremo de ligadura.
- Resecar lóbulo cerca de ligadura.
- Cortar el extremo de ligadura restante.

La resección del lóbulo medio (Figura 37.A) se realizó mediante la aplicación de los siguientes pasos:

- Colocar la sutura y traer lóbulo medio sobre ella con bastoncillo de algodón.
- Realizar un nudo doble seguido de nudo simple para fijar.
- Cortar un extremo de la ligadura.
- Resecar lóbulo cerca de ligadura.
- Cortar el extremo de ligadura restante.

El inconveniente de esta técnica es que la colocación de la sutura en el lóbulo medio no está completamente definida y se realiza en base al criterio del investigador. Como consecuencia, en cada cirugía la variabilidad de tejido resecaado puede variar considerablemente.

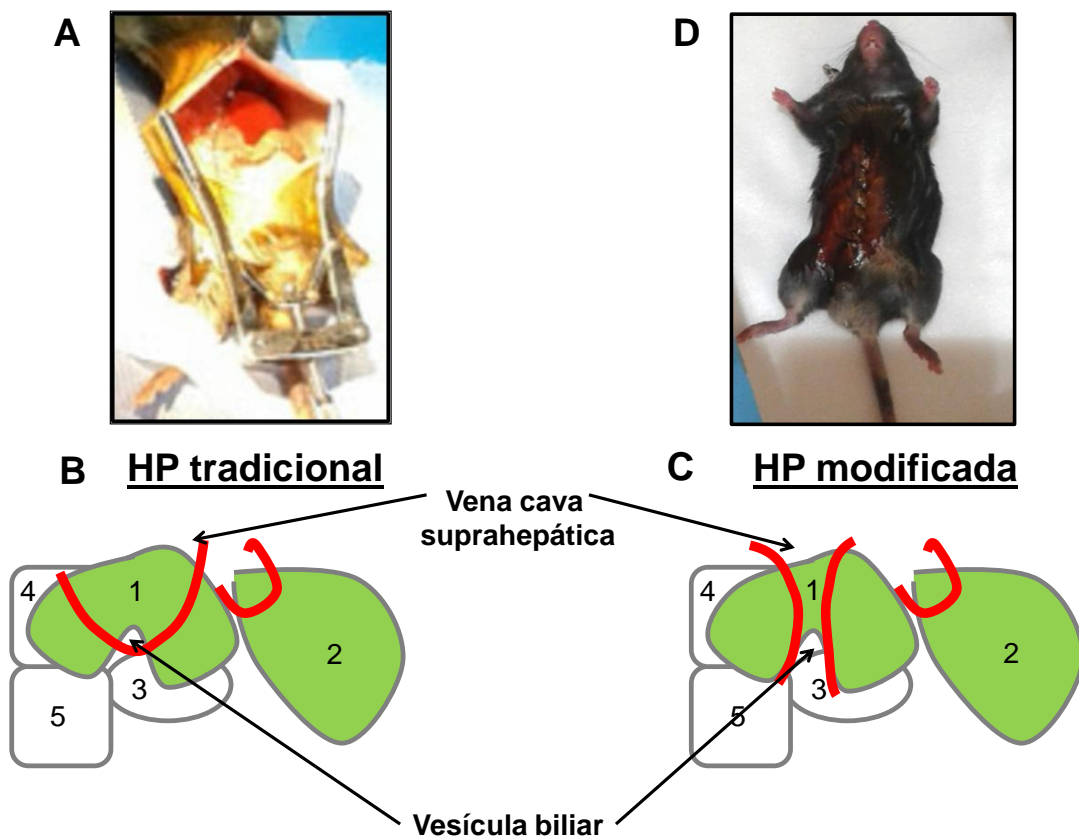
### **1.2.1.2.- HP modificada con tres ligaduras**

Esta técnica representa una ligera modificación de la HP tradicional. En lugar de 2 ligaduras, en esta versión se utilizan tres ligaduras para resecar el lóbulo izquierdo y el lóbulo medio hepáticos (Figura 36.C). La técnica modificada consistió en realizar una laparotomía media y similar a la técnica tradicional, la resección del lóbulo izquierdo se llevó a cabo con seda reabsorbible 3:0 colocada en la base del lóbulo izquierdo. Sin embargo, la resección del lóbulo medio se realizó utilizando dos suturas de 3:0 en lugar de una sola sutura (HP tradicional), mediante la aplicación de los siguientes pasos (Figura 37.B):

- Resecar la mitad izquierda del lóbulo medio:
  - ❖ Colocar ligadura de arriba hacia abajo a la izquierda de la vesícula biliar, dejando extremo corto de la ligadura abajo.
  - ❖ Traer lóbulo medio sobre ella con bastoncillo de algodón.
  - ❖ Realizar un nudo doble seguido de nudo simple para fijar.
  - ❖ Cortar un extremo de ligadura, resecar lóbulo y cortar extremo de ligadura restante.
- Resecar la mitad derecha del lóbulo medio:
  - ❖ Llevar remanente de lóbulo medio hacia diafragma con bastoncillo.

- ❖ Colocar ligadura de arriba hacia abajo a la derecha de la vesícula biliar, dejando extremo corto de la ligadura abajo.
- ❖ Traer lóbulo medio sobre ella con bastoncillo de algodón.
- ❖ Realizar un nudo doble seguido de nudo simple para fijar.
- ❖ Cortar un extremo de ligadura, resecar lóbulo y cortar extremo de ligadura restante.

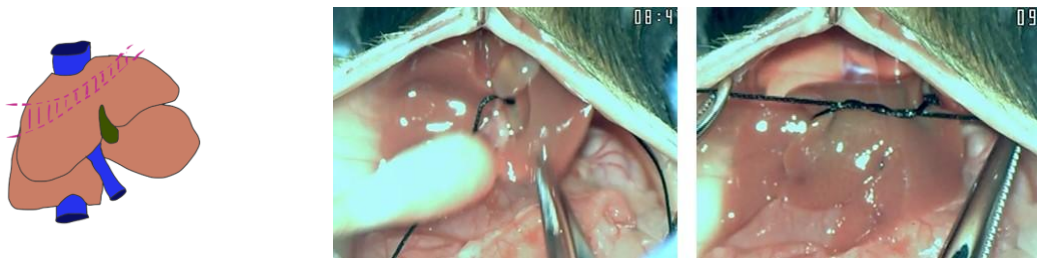
El fin de utilizar dos ligaduras en el lóbulo medio fue preservar la vesícula biliar e intentar reducir la variabilidad en la cantidad de tejido resecaado y el desarrollo de necrosis hepatocelular.



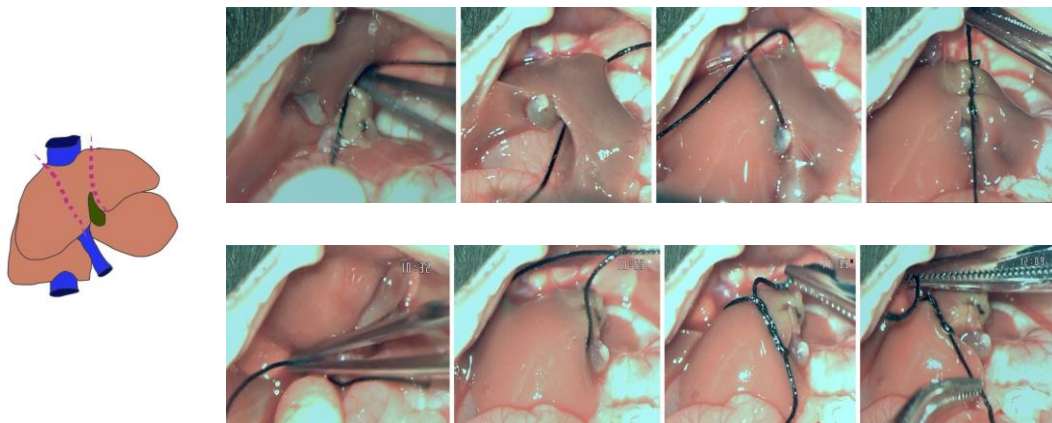
**Figura 36. Representación de la colocación de las ligaduras en la HP tradicional frente a la HP modificada.** A. Fotografía de una laparotomía media. B. HP tradicional. Los lóbulos hepáticos numerados del 1-5 corresponden: 1. Medio, 2. Izquierdo, 3. Caudado, 4-5. Derecho. En color rojo se representan las ligaduras. La colocación de la primera ligadura en la HP

tradicional es en la base del lóbulo izquierdo mientras que la segunda ligadura se debe colocar por encima de la vesícula biliar y el nudo no debe estar próximo a la vena cava suprahepática. El inconveniente de esta técnica reside en que la colocación de esta sutura varía según el criterio del investigador y es uno de los factores limitantes en el desarrollo de necrosis hepatocelular y la variabilidad en la cantidad de tejido resecado. C. HP modificada. La primera ligadura se coloca en la base del lóbulo izquierdo, al igual que en la HP tradicional. La segunda y tercera ligaduras se colocan paralelas una a la otra desde la base a la zona apical del lóbulo medio. Esta disposición permitiría preservar la vesícula biliar y podría reducir la variabilidad en la cantidad de tejido resecado y el desarrollo de necrosis hepatocelular. D. Fotografía de un ratón sometido a una HP y que permanece recuperándose en una caja con una manta térmica. El peritoneo y la piel se cerraron con una sutura de 3-0. HP: Hepatectomía parcial.

**A HP tradicional con dos ligaduras**



**B HP modificada con tres ligaduras**



**Figura 37. Comparación de la resección del lóbulo medio en la HP tradicional frente a la HP modificada.** A. HP tradicional con dos ligaduras. La resección del lóbulo medio se realizó colocando la ligadura y trayendo el lóbulo medio sobre ella con un bastoncillo de algodón, se realiza un nudo doble seguido de nudo simple para fijar, se corta un extremo de ligadura y finalmente se reseca el lóbulo cerca de la ligadura y se corta el extremo de ligadura restante. B. HP modificada de tres ligaduras. La resección del lóbulo medio se realizó en primer lugar resecando la mitad izquierda del lóbulo medio; Para ello, colocar ligadura de arriba hacia abajo a la izquierda de la vesícula biliar, dejando extremo corto de la ligadura abajo. Traer lóbulo medio sobre ella con bastoncillo de algodón. Realizar un nudo doble seguido de nudo simple para fijar. Y finalmente, cortar un extremo de ligadura, reseca lóbulo y cortar extremo de ligadura restante. En segundo lugar, se resea la mitad derecha del lóbulo medio; Para ello, llevar remanente de lóbulo medio hacia diafragma con bastoncillo. Colocar ligadura de arriba hacia abajo a la derecha de la vesícula biliar, dejando extremo corto de la ligadura abajo. Traer lóbulo medio sobre ella con bastoncillo de algodón. Realizar un nudo doble seguido de nudo simple para fijar. Y finalmente, cortar un extremo de ligadura, reseca lóbulo y cortar extremo de ligadura restante. HP: Hepatectomía parcial.

Los materiales requeridos para el desarrollo de ambas cirugías fueron: Betadine®, alcohol del 70% y desinfectantes, suero salino precalentado, soporte de la aguja quirúrgica, tijeras de microcirugía, pinzas quirúrgicas, cinta para fijación de los animales y tres lazos de sutura. Al final de ambas cirugías, se inyectó 0,5 ml de suero salino estéril precalentado para reponer la pérdida de fluidos corporales y se cerró la laparotomía en dos planos con sutura de 3-0. La sutura abdominal se desinfectó con Betadine® (Figura 36 D).

Ambas cirugías duraron menos de 20 minutos, y tras las mismas los ratones se recuperaron en una caja colocada sobre una manta térmica durante 15 min. Tras la recuperación, los animales eran devueltos a sus jaulas y pudieron tener acceso al agua de bebida *ad libitum* en todo momento. La comida se reintrodujo a las 6 horas tras la cirugía.

### **1.2.2.- Hepatectomía parcial del 30%**

Para evaluar si la extensión de una HP influye sobre la concentración de IL-6 en plasma y en el lavado peritoneal tras una HP, realizamos una HP del 30% en ratones C57Bl6/J salvajes. Al igual que en la HP del 70%, en este experimento dejamos a los ratones en ayunas la noche anterior y realizamos la HP por la mañana entre las 8:00 y 14:00 horas.

El protocolo anestésico empleado en esta cirugía fue similar al usado en la cirugía del 70%. La técnica quirúrgica consistió en reseca el lóbulo lateral izquierdo con una ligadura de 3:0, de forma similar a la

resección de este lóbulo en la HP del 70% tradicional y modificada. Tras la cirugía, al igual que se hizo con los animales tras la HP del 70%, los ratones se recuperaron sobre una caja depositada sobre una manta térmica durante 10 minutos y posteriormente, fueron devueltos a sus jaulas donde tuvieron acceso al agua de bebida *ad libitum* en todo momento y la comida se les reintrodujo a las 6 horas tras la cirugía.

### **1.2.3.- Inyección de lipopolisacárido (LPS)**

En algunos experimentos utilizamos un modelo de inyección de LPS para estimular la producción de IL-6, ya que el LPS es un posible factor en el inicio de la regeneración hepática (Seiki et al, 2005; Campbell et al, 2006; Fausto et al, 2006). En concreto, los ratones deficientes de IL-6 en células de origen mieloide y hepatocitos y sus respectivos controles, recibieron una inyección intraperitoneal de LPS de *E. coli* cepa 055 (1 mg/kg de peso corporal) o de suero salino (Vehículo) que constituía el diluyente del LPS (Figura 39). Tras la inyección, los animales se devolvían a sus jaulas hasta su sacrificio.

**INYECCIÓN DE LPS/ VEH (1 mg/kg de peso corporal i.p)**



**Figura 38. Inyección de LPS/vehículo por vía intraperitoneal.** Se administró LPS de E.coli o vehículo (suero salino) a una concentración de 1mg/kg de peso corporal del animal por vía intraperitoneal para estimular la producción de IL-6. LPS: Lipopolisacárido; IL-6: Interleucina-6.

**1.2.4.- Monitorización de los animales tras la realización de los modelos experimentales**

Los animales fueron monitorizados desde el comienzo de cada modelo experimental hasta el sacrificio de los mismos evaluando los parámetros descritos en la Tabla 8. Cuando algún ratón mostró un índice de dolor de 5 ó más, llamamos al Departamento de Veterinaria para examinar al animal y decidir si continuaba en el experimento o si, por el contrario, se sacrificaba y excluía del mismo.

<b>Puntuación</b>	<b>Aspecto del pelo</b>	<b>Ojos</b>	<b>Coordinación/postura</b>	<b>Condición general</b>
<b>0</b>	Normal, bien aseado, pelo lacio y brillante	Abiertos, alerta	Normal	Normal
<b>1</b>	No bien aseado	Entrecerrados	Camina raro o ligeramente encogido; todavía corre o se mueve espontáneamente	Mal aspecto pero actúa de forma normal
<b>2</b>	Pelo de mal aspecto, incisión sucia	Cerrados	Anda encogido o “en cascara de huevo”, no corre, anda despacio espontáneamente	Ligeramente deprimido, mal aspecto
<b>3</b>	Pelo de muy mal aspecto, pérdida de pelo, incisión sucia	-	Anda despacio con esfuerzo o solo cuando se le estimula golpeando la jaula con los dedos	Muy deprimido y muy mal aspecto
<b>4</b>	-	-	Encogido, tropieza, o debe ser empujado para moverse	-
<b>5</b>	-	-	Encogido, no anda incluso cuando se le empuja	-

**Tabla 8. Criterios para la monitorización del dolor postoperatorio en ratones.** Los ratones se observaban cada hora durante las primeras 4 horas tras la realización de la cirugía, y se les puntuaba a las 4 horas tras la cirugía, y después una vez al día hasta que eran sacrificados. Un índice de dolor se calculaba sumando la puntuación del Aspecto del pelo, Ojos, Coordinación/postura, y Condición general. Si un ratón recibía una puntuación de 5 o más, contactábamos al Departamento de Veterinaria para examinar al animal y decidir si continuaba en el experimento o si, por el contrario, se sacrificaba y se excluía del mismo.

## **2.- EXPERIMENTOS IN VITRO**

### **2.1.- AISLAMIENTO Y CULTIVO PRIMARIO DE MACRÓFAGOS PERITONEALES**

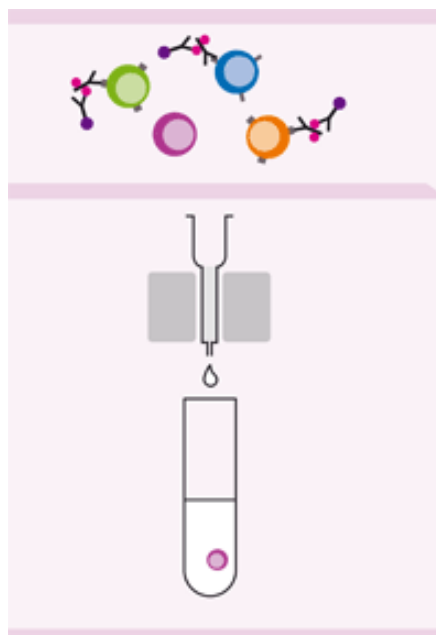
La cavidad peritoneal representa un lugar accesible para obtener un número moderado de macrófagos residentes, los cuales se han estudiado ampliamente. Gran parte del conocimiento que existe de los macrófagos residentes tisulares proviene del estudio de los macrófagos obtenidos de la cavidad peritoneal. La limitación del uso de estos macrófagos a nivel experimental proviene del bajo rendimiento de su obtención de la cavidad peritoneal, aproximadamente de  $0,5-1 \times 10^6$  macrófagos en el peritoneo de un ratón (Zhang et al, 2008).

Para aumentar el rendimiento del aislamiento se han diseñado varias estrategias. Una de ellas se basa en utilizar reactivos como tioglicolato que estimulan la migración de monocitos al peritoneo y como consecuencia aumentan la producción de macrófagos (Zhang et al, 2008).

La técnica empleada para la separación de los macrófagos peritoneales del resto de células del lavado peritoneal, se basó en la selección positiva de macrófagos peritoneales con bolas magnéticas anti-estreptavidina en separadores magnéticos (imanes) con columnas Macs (Miltenyi Biotec) (Figura 39).

Estas columnas han sido desarrolladas para la selección positiva de células animales y humanas a partir de una suspensión celular heterogénea. Esta tecnología se basa en el empleo de bolas magnéticas

pequeñas (50 nm) marcadas con el anticuerpo anti-estreptavidina que pueden unirse a las células de interés si estas células se marcan con un anticuerpo biotinilado. Debido a su pequeño tamaño, estas bolas no activan a las células y no saturan los epítomos de la superficie celular. De esta manera, cuando la suspensión con las células de interés marcadas con el anticuerpo biotinilado y las bolas magnéticas marcadas con anti-estreptavidina se somete a un campo magnético alto, se puede separar las células de interés del resto de células de la solución. En este trabajo, usamos columnas LS (Miltenyi Biotec) sobre separadores magnéticos (Miltenyi Biotec) que favorecen la retención de las células marcadas con bolas magnéticas anti-estreptavidina.



**Marcaje de macrófagos peritoneales con anticuerpo biotinilado y bolas magnéticas anti-streptavidina**

**Los macrófagos peritoneales son retenidos en las columnas localizadas sobre un separador magnético.**

**Las células que no son macrófagos peritoneales pasan a través la columna.**

**Figura 39. Selección positiva de macrófagos peritoneales con bolas magnéticas anti-estreptavidina en separadores magnéticos con columnas Macs.** Imagen modificada de Miltenyi biotec.

### **2.1.1.- Extracción de macrófagos peritoneales**

Para estimular la migración de monocitos al peritoneo, cuatro días antes de realizar la extracción de macrófagos se administró por vía intraperitoneal 1 mL de tioglicolato al 3% diluido 1:2 en salino. Tras la inyección, los animales se devolvieron a sus jaulas hasta el día en el que se realizó la extracción de macrófagos peritoneales. Durante este tiempo, se monitorizó la aparición de signos relacionados con el dolor (Tabla 8).

El día de la extracción, se realizó la eutanasia de los animales mediante inhalación de CO<sub>2</sub>. Tras la eutanasia, la pared abdominal fue desinfectada con etanol al 70% y la piel fue cortada con una tijera gruesa en la línea media hasta el esternón, con cuidado de no romper el peritoneo (Figura 40.A). Para extraer los macrófagos peritoneales, se utilizó una jeringa estéril precargada con 10 mL de tampón fosfato salino (PBS) frío y una aguja de 21G. La jeringa se introdujo a través de la pared peritoneal con la punta biselada de la misma mirando hacia el interior. En este paso hay que tener cuidado de no pinchar al intestino porque dificultaría la extracción de macrófagos peritoneales por contaminación con células de la sangre. Tras la inyección de PBS en la cavidad peritoneal, se agitó al animal y se aspiró lentamente el lavado peritoneal. La inyección y aspirado de PBS se repitieron 2 ó 3 veces para obtener un volumen final de 20-25 mL de lavado peritoneal.

### **2.1.2.- Separación de macrófagos peritoneales en columnas magnéticas**

El lavado peritoneal se centrifugó a 1500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 min a 4°C. Tras centrifugar y descartar el sobrenadante, se resuspendió el pellet de células en 10 ml de buffer Macs (PBS, 2mM EDTA, 0,5% de albumina de suero bovino, BSA) según las instrucciones del fabricante de las columnas y separadores magnéticos.

El recuento de células se realizó en una cámara de Neubauer y el aislamiento de macrófagos peritoneales se llevó a cabo en una campana de flujo laminar (Gelaire Flow Laboratories, modelo BSB 3A) para evitar la contaminación del cultivo posterior.

Alicuotas de la suspensión celular obtenidas antes de la separación de los macrófagos peritoneales se utilizaron para cultivar  $2 \times 10^5$  células del lavado peritoneal por pocillo (3-5 pocillos por cada condición y animal) en placas de 96 pocillos y  $0,5-1 \times 10^6$  células se guardaron a 4°C para posteriormente realizar una citometría con marcadores de monocito/macrófago. A este grupo de células las denominamos como **pre-aislamiento**. Las células del lavado peritoneal dispuestas en placas para el cultivo, fueron tratadas en presencia o ausencia de LPS de *E. coli* cepa 055 (100 ng/ml) (Sigma Aldrich). La concentración de LPS para estos experimentos fue elegida en base a estudios previos (Brown et al, 2004; Bondue et al, 2012). Las placas con el cultivo primario de células del lavado peritoneal se mantuvieron en un incubador (Heraeus) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 h, 6 h, 16 h y 24

horas con medio de cultivo en presencia o ausencia de LPS. La elección de estos tiempos de cultivo se basó en estudios previos (Soudi et al, 2013; Ling et al, 2014). A los tiempos indicados, se recogió el sobrenadante para determinar la producción de IL-6 mediante ELISA como se describe en el apartado 4.4.3 de Material y Métodos.

El resto del lavado peritoneal se centrifugó a 300 g durante 10 min a 4°C. Tras retirar el sobrenadante, se resuspendió el pellet de células en 200 µL de buffer Macs por cada 10<sup>6</sup> células y se incubó durante 20 min a 4°C con 1 µL de anticuerpo F4/80 biotinilado (Miltenyi Biotec) según las recomendaciones del fabricante. En este paso, los macrófagos peritoneales son marcados con el anticuerpo F4/80 biotinilado para su posterior aislamiento.

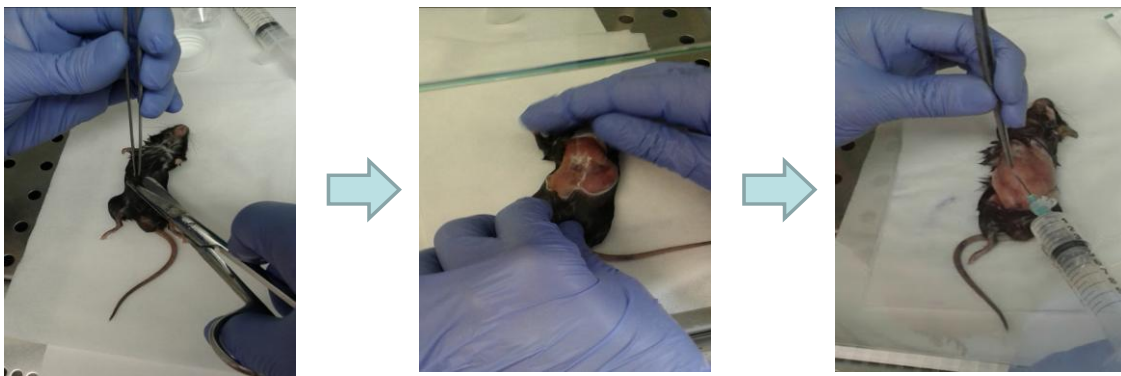
Tras la incubación, las células se lavaron con 2 mL de buffer macs y fueron centrifugadas a 300 g durante 10 min a 4°C. Tras retirar el sobrenadante, se resuspendió el pellet de células en 80 µL de buffer Macs por cada 10<sup>7</sup> células y se incubaron durante 15 min a 4°C con 20 µL de bolas magnéticas anti-estreptavidina (Miltenyi Biotec), según las recomendaciones del fabricante. En este paso, los macrófagos peritoneales marcados con el anticuerpo F4/80 biotinilado se unen a las microbolas magnéticas anti-estreptavidina.

Tras la incubación, las células se lavaron con 2 mL de buffer macs y fueron centrifugadas a 300 g durante 10 min a 4°C. Tras retirar el sobrenadante, se resuspendió el pellet de células en 0.5-3 mL de buffer Macs. La suspensión de células se paso a través de un filtro de 30 µm (Miltenyi Biotec) sobre las columnas LS (Miltenyi Biotec),

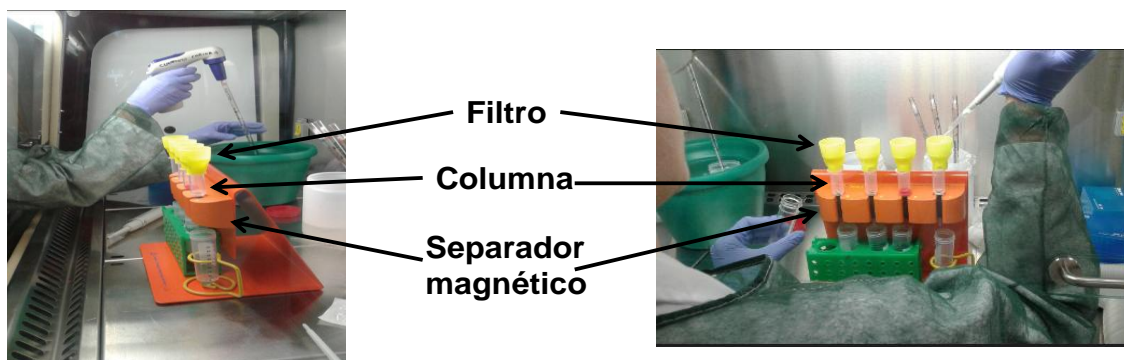
previamente lavadas con buffer Macs, colocadas sobre el separador magnético (Miltenyi Biotec) (Figura 40.B). El uso del filtro evita la formación de agregados celulares que pueden colapsar las columnas. En este paso, los macrófagos peritoneales marcados con el anticuerpo F4/80 biotinilado unidos a las microbolas magnéticas anti-estreptavidina son retenidos en las columnas LS y el resto de células son eluidas.

Finalmente, se lavaron tres veces las columnas con 3 mL de Buffer Macs y la obtención de los macrófagos peritoneales se realizó mediante la retirada de las columnas de los separadores magnéticos y la recogida de la suspensión de macrófagos peritoneales, eluidos con la ayuda de 5 mL de buffer Macs sobre la columna.

### **A Extracción de macrófagos peritoneales**



### **B Aislamiento de macrófagos peritoneales**



**Figura 40. Representación de la extracción y aislamiento de macrófagos peritoneales. A.**

Extracción de macrófagos peritoneales. Tras la eutanasia del animal, se desinfectó la piel con etanol al 70% y se cortó con una tijera gruesa en la línea media hasta el esternón. Los macrófagos peritoneales, se extrajeron con una jeringa estéril precargada con 10 ml de tampón fosfato salino (PBS) frío y una aguja de 21G. La jeringa se introdujo a través de la pared peritoneal con el final biselado de la misma mirando hacia el interior. B. Aislamiento de macrófagos peritoneales. El aislamiento de macrófagos peritoneales marcados con anticuerpos biotinilados y bolas magnéticas anti-estreptavidina, se realizó a través de un filtro de 30  $\mu\text{m}$  colocado sobre una columna depositada sobre un separador magnético (Miltenyi Biorec).

### **2.1.3.- Cultivo primario de macrófagos peritoneales**

Se realizó el recuento de los macrófagos peritoneales en una cámara de Neubauer. Los macrófagos peritoneales se cultivaron en una concentración de  $2 \times 10^5$  macrófagos peritoneales por pocillo (3-5 pocillos por cada condición y animal) en placas de 96 pocillos, y  $0,5-1 \times 10^6$  macrófagos peritoneales se guardaron a  $4^\circ\text{C}$  para posteriormente realizar una citometría con marcadores de monocito/macrófago. A este grupo de células las denominamos como grupo **post-aislamiento**. Los macrófagos peritoneales dispuestos en placas para el cultivo, fueron tratados en presencia o ausencia de LPS de *E. coli* cepa 055 (100 ng/ml) (Sigma Aldrich). La concentración de LPS para estimular la producción de IL-6 en macrófagos peritoneales fue elegida en base a estudios previos (Brown et al, 2004; Bondue et al, 2012).

Las placas con el cultivo primario de macrófagos peritoneales se mantuvieron en un incubador (Heraeus) a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$  durante 3 h, 6 h, 16 h y 24 horas con medio de cultivo en presencia o ausencia de LPS. Tras el tiempo de cultivo, se recogió el sobrenadante para determinar la producción de IL-6 mediante ELISA como se describe en el apartado 4.4.3 de Material y Métodos.

#### **2.1.4.- Recuento de macrófagos peritoneales mediante citometría de flujo.**

El recuento de macrófagos peritoneales se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia directa y posterior citometría de flujo. Las muestras del lavado peritoneal (grupo pre-aislamiento) o del aislamiento de los macrófagos peritoneales (grupo post-aislamiento) recogidas con el fin de realizar la citometría de flujo se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Tras centrifugar, se resuspendió el pellet de células en 50  $\mu$ L de medio de bloqueo (Inmunoglobulinas a 1 $\mu$ g/1mL en medio de cultivo) durante 10 min a 4°C para bloquear los sitios de unión inespecífica a través de la fracción Fc de los anticuerpos. En la citometría de flujo, es necesario realizar un control negativo para fijar las condiciones de las células que se van a pasar a través del citómetro. En nuestro experimento tuvimos dos tipos de controles negativos. Uno de ellos se realizó con una mezcla de células de lavado peritoneal estimuladas o no con LPS que fue incubada con un anticuerpo control isotipo mientras que el otro control estuvo formado por macrófagos peritoneales aislados y estimulados o no con LPS que fueron incubados con un anticuerpo control isotipo.

Para conocer el porcentaje de células que eran positivas para marcadores de monocito/macrófago, las células se incubaron tras el bloqueo con los anticuerpos de superficie celular que se describen en la Tabla 9 durante 30 min a 4°C, disueltos en medio con inmunoglobulinas a una concentración de 50  $\mu$ g/mL.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Origen</b>	<b>Concentración</b>	<b>Casa comercial</b>
<b>APC anti-Cd11b Clon M1/70</b>	Rata	100 µg/0,5 mL	BD Pharmingen
<b>PE anti-F4/80 Clon T45-2342</b>	Rata	100 µg/0,5 mL	BD Pharmingen

**Tabla 9.** Descripción de los anticuerpos utilizados en citometría de flujo.

Finalmente, las células se lavaron con 1 mL de PBS, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y se resuspendieron en 300 µL de PBS. Estas células se analizaron en un citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter), obteniendo los resultados como recuento de células frente a tamaño (FS; forward scatter) y complejidad (SS; sidescatter). Los datos se analizaron usando el programa FlowJo (Tree Star).

### **3.- DISEÑO EXPERIMENTAL**

El diseño experimental para cada uno de los objetivos planteados en este estudio fue el siguiente:

Objetivo 1A y 1B: Comparar la reproducibilidad y complicaciones de dos protocolos de HP en ratones

Se utilizaron ratones C57BL6 machos de 8-14 semanas de edad, divididos en dos grupos según la técnica utilizada para reseca el 70% de masa hepática:

- Grupo de HP tradicional (HP-tradicional), realizada con 2 ligaduras.

- Grupo de HP modificada (HP-modificada), realizada con 3 ligaduras.

Para evaluar la dinámica de la regeneración hepática, grupos de ratones fueron sacrificados a las 32 h, 36 h, 40 h, 48 h y 72 h tras la cirugía. A las 4 h tras la cirugía, se tomó una muestra de sangre retro-orbitaria con capilares heparinizados. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 4500 rpm a temperatura ambiente, y el sobrenadante fue almacenado a -80°C hasta su utilización. Esta técnica permite la supervivencia de los animales y, por tanto, disminuir el número de ratones utilizados. La toma de sangre retro-orbitaria se realizó bajo anestesia con sevoflurano (Abbvie) para evitar el sufrimiento del animal.

Al final de los experimentos, los ratones fueron anestesiados de nuevo con sevoflurano para tomar una nueva muestra de sangre retro-orbitaria, seguido inmediatamente de la eutanasia de los animales mediante inhalación de CO<sub>2</sub>. Tras la eutanasia, se tomaron nuevas muestras de sangre mediante punción cardiaca con jeringas precargadas con EDTA, así como muestras de tejido hepático, esplénico e intestinal (duodeno). Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 4500 rpm a temperatura ambiente, y el sobrenadante fue almacenado a -80°C hasta su utilización. El hígado y el bazo fueron disecados y pesados en una balanza de precisión. Las muestras de hígado fueron pesadas como se indica en el apartado 4.1.1. y 4.1.2. de Material y Métodos. Las muestras de hígado, bazo e intestino fueron fijadas en Methacarn (Metanol:Cloroformo:Ácido glacial acético 60:30:10) (Fisher Scientific) o Formalina (Panreac) para estudio histológico y parte de las

muestras de hígado fueron congeladas en nitrógeno líquido para análisis de proteínas y ARNm.

Objetivo 2A: Validar los ratones generados con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide o en hepatocitos.

Se hicieron tres tipos de experimentos para validar si los ratones KO condicionales de IL-6 en células de estirpe mieloide o en hepatocitos constituían una herramienta válida. El primero de ellos se basó en evaluar la producción de IL-6 basal y estimulada por LPS en macrófagos peritoneales aislados de ratones IL-6 KO<sub>M</sub> y de sus respectivos controles floxeados. Para ello, comparamos la concentración de IL-6 obtenida en muestras de medio de cultivo procedentes de:

- Grupos Medio pre-aislamiento (Med-pre, n=6/grupo/tiempo): cultivo de suspensión celular mixta obtenida del lavado peritoneal de ratones IL-6 KO<sub>M</sub> o de sus respectivos controles floxeados.
- Grupos Medio post-aislamiento (Med-post, n=6/grupo/tiempo): cultivo de macrófagos peritoneales aislados de ratones L-6 KO<sub>M</sub> o de sus respectivos controles floxeados.
- Grupos LPS pre-aislamiento (LPS-pre, n=3-4/grupo/tiempo): cultivo de suspensión celular mixta obtenida del lavado peritoneal de ratones IL-6 KO<sub>M</sub> o de sus respectivos controles floxeados, expuestos a LPS disuelto en el medio de cultivo.

- Grupos LPS post-aislamiento (LPS-post, n=3-4/grupo/tiempo): cultivo de macrófagos peritoneales aislados de ratones L-6 KO<sub>M</sub> o de sus respectivos controles floxeados, expuestos a LPS disuelto en el medio de cultivo.

El cultivo de macrófagos peritoneales se terminó a las 3 h, 6 h, 16 h y 24 h de la exposición a LPS o vehículo. En los tiempos indicados, pequeñas alícuotas del medio de cultivo fueron recogidas para determinar la producción de IL-6 mediante ELISA. En estos experimentos usamos como control negativo el lavado peritoneal y los macrófagos peritoneales aislados de ratones IL-6 KO (n=3).

Una segunda estrategia de validación consistió en evaluar las concentraciones circulantes de IL-6 tras la administración de LPS en ratones IL-6 KO<sub>M</sub> e IL-6 KO<sub>H</sub> y en sus respectivos controles floxeados. Para realizar este objetivo, se compararon:

- Grupos Vehículo (Veh): ratones IL-6 KO<sub>M</sub>, ratones IL-6 KO<sub>H</sub> y sus respectivos controles fueron inyectados i.p. con suero salino estéril.
- Grupos LPS (LPS): ratones L-6 KO<sub>M</sub>, ratones IL-6 KO<sub>H</sub> y sus respectivos controles floxeados fueron inyectados i.p. con LPS disuelto en suero salino.

A los 90 min de las inyecciones de Veh o LPS, los animales fueron anestesiados con sevoflurano y se obtuvo una muestra de sangre retro-orbitaria con un capilar heparinizado. Inmediatamente después, se realizó la eutanasia mediante inhalación de CO<sub>2</sub> y se tomó una nueva muestra de sangre mediante punción cardiaca con jeringas precargadas

con EDTA, y por último, se tomaron muestras de tejido hepático y esplénico.

La tercera estrategia de validación consistió en evaluar la penetrancia de la recombinación inducida por la Cre recombinasa utilizando ratones reporteros con expresión de EGFP en células de estirpe mieloide o en hepatocitos (LysmCrexTdEGFP y AlbCrexTdEGFP, respectivamente). Así, ratones machos LysmCrexTdEGFP y AlbCrexTdEGFP de 8-14 semanas fueron sacrificados mediante inhalación de CO<sub>2</sub>. En el sacrificio, se recogieron muestras de tejido hepático que se procesaron según el apartado 4.6.1 de Material y Métodos. Con este tejido hepático se realizó inmunofluorescencia y las imágenes de esta inmunofluorescencia se visualizaron en un microscopio confocal (Leica Microsystems) o un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E800).

Objetivo 2B: Evaluar las características basales de ratones con deficiencia de IL-6 en células de estirpe mieloide o en hepatocitos.

El peso corporal, la relación del peso del hígado frente al peso corporal (índice hepático), y diversos parámetros sanguíneos hematológicos y bioquímicos fueron medidos en ratones machos compañeros de camada de 8-14 semanas de edad pertenecientes a:

- Grupos CRTL FL: Ratones controles floxeados no operados.
- Grupos KO condicionales: Ratones IL-6 KO<sub>M</sub> y ratones IL-6 KO<sub>H</sub> no operados.

Objetivo 2C: Determinar la contribución de las células de estirpe mieloide y de los hepatocitos a la producción de IL-6 tras una HP.

Primeramente, evaluamos la expresión del ARNm de IL-6 en tejido hepático procedente de ratones machos (8-14 semanas de edad) IL-6 KO<sub>M</sub> e IL-6 KO<sub>H</sub> y de sus controles floxeados no operados o sometidos a una HP del 70%:

- Grupos CTRL no operados: Ratones no sometidos a cirugía.
- Grupos HP: Ratones sometidos a una HP del 70%.

Los ratones sometidos a una HP fueron sacrificados mediante CO<sub>2</sub> a las 2 horas de la cirugía, recogiendo muestras de tejido hepático que fueron congeladas en nitrógeno líquido para análisis de ARNm.

Como segunda estrategia, evaluamos la concentración de IL-6 circulante en ratones machos de 8-14 semanas de edad pertenecientes a:

- Grupos CTRL no operados: Ratones controles floxeados, ratones IL-6 KO<sub>M</sub> o ratones IL-6 KO<sub>H</sub> no sometidos a cirugía.
- Grupos HP: Ratones controles floxeados, ratones IL-6 KO<sub>M</sub> o ratones IL-6 KO<sub>H</sub> sometidos a una HP.

En todos los grupos, se tomaron muestras de sangre retro-orbitaria con capilares heparinizados a las 4 h y a las 6 h tras la cirugía para determinar la producción de IL-6 mediante ELISA (apartado 4.4.1 de Material y Métodos).

Objetivo 2.D y 2.E: Determinar el impacto de la deficiencia de IL-6 en células de estirpe mieloide o en hepatocitos para la señalización de IL-6 en el hígado y para el desarrollo de la regeneración hepática tras una HP.

Para llevar a cabo este objetivo, ratones machos IL-6 KO<sub>M</sub> e IL-6 KO<sub>H</sub> y sus respectivos controles floxeados de 8-14 semanas de edad fueron sometidos a una HP del 70% modificada, a una laparatomía SHAM o no fueron operados:

- Grupos CTRL no operados: Ratones no sometidos a cirugía.
- Grupos CTRL SHAM: Ratones sometidos a una laparotomía simple sin resección de masa hepática.
- Grupos HP: Ratones sometidos a una HP del 70%.

Para evaluar las vías de señalización de IL-6, los ratones fueron sacrificados a los 30 min, 2 h y 6 h tras la cirugía. Para evaluar la dinámica de la regeneración hepática, grupos de ratones fueron sacrificados con CO<sub>2</sub> a las 28 h, 32 h, 40 h, 48 h, 72 h y 7 días tras la cirugía. Tras la eutanasia, el hígado y el bazo fueron disecados y pesados en una balanza de precisión. Se tomaron muestras de tejido hepático, esplénico e intestinal (duodeno), parte de las cuales fueron fijadas en Methacarn (Metanol:Cloroformo:Ácido glacial acético 60:30:10) (Fisher Scientific) o Formalina (Panreac) para estudio histológico, y parte fueron congeladas en nitrógeno líquido para análisis de proteínas y ARNm.

Objetivo 3. Determinar la potencial contribución de fuentes extra-hepáticas a la elevación de la IL-6 circulante tras una HP.

Se hicieron tres series de experimentos para determinar la existencia de fuentes de IL-6 tras una HP adicionales a las estudiadas. Primero investigamos si la cavidad peritoneal contenía concentraciones relevantes de IL-6 tras una HP. Para ello, evaluamos los siguientes grupos de ratones C57BL6/J machos (n≥ 3/grupo):

- Grupo CTRL no operados: Ratones no sometidos a cirugía.
- Grupo CTRL SHAM: Ratones fueron sometidos a una laparotomía simple sin resección de masa hepática.
- Grupo HP del 30%: Ratones sometidos a una HP del 30%.
- Grupo HP del 70%: Ratones sometidos a una HP del 70%.

Justo antes de la eutanasia, obtuvimos una muestra de sangre retro-orbitaria bajo anestesia para determinar la producción de IL-6 mediante ELISA. Inmediatamente tras la eutanasia, se realizó un lavado peritoneal con 0.5 mL de 0.9% NaCl en cada ratón. Las muestras del lavado peritoneal fueron centrifugadas a 4500 rpm a 4 °C, y el sobrenadante se almacenó a -80°C.

La segunda serie de experimentos trató de determinar si, tras una HP, existen fuentes celulares de IL-6 en el lavado peritoneal distintas de las células de estirpe mieloide y en distintos órganos extrahepáticos. Para ello, utilizamos ratones machos de 8-14 semanas de edad de los siguientes grupos:

- Grupos CTRL no operados: Ratones controles floxeados y ratones IL-6 KO<sub>M</sub> no sometidos a cirugía.

- Grupos HP: Ratones controles floxeados y ratones IL-6 KO<sub>M</sub> sometidos a una HP.

Los ratones se sacrificaron con CO<sub>2</sub> a las 2 horas de la cirugía. Tras el sacrificio, se recogieron muestras de lavado peritoneal, y muestras de distintos tejidos (bazo, ileón, pulmón, riñón, músculo y mesenterio) que fueron congeladas en nitrógeno líquido.

## **4.- MÉTODOS Y TÉCNICAS UTILIZADAS**

### **4.1.- CUANTIFICACIÓN DE MASA/TEJIDO HEPÁTICO**

#### **4.1.1.- Determinación de la variabilidad en la cantidad de tejido resecado**

Para evaluar la variabilidad en la cantidad de tejido resecado se determinaron dos parámetros:

- El ratio del peso del hígado resecado frente al peso corporal del animal en el día de la cirugía.

Los lóbulos hepáticos resecados (lóbulo izquierdo y medio) fueron pesados en una balanza de precisión para determinar la relación del peso del hígado resecado frente al peso corporal del animal en el día de la cirugía (Figura 41). Esta relación fue expresada en porcentaje.

$$\text{Relación} = \frac{\text{Peso de tejido hepático resecado en el día de la cirugía (gr.)}}{\text{Peso del animal en el día de la cirugía (gr.)}} \times 100$$

**Figura 41.** Fórmula de la relación del peso del hígado resecado frente al peso corporal del animal en el día de la cirugía.

➤ El porcentaje de hepatectomía.

El porcentaje de hepatectomía se calculó tomando como referencia un valor basal del 4% para el ratio del peso del hígado frente al peso corporal en ratones normales (Figura 42).

	Peso de tejido hepático resecado en el día de la cirugía (gr.)	
Porcentaje de hepatectomía	Peso del animal en el día de la cirugía (gr.)	X 100
	4 (valor del % de hepatectomía en animales salvajes)	

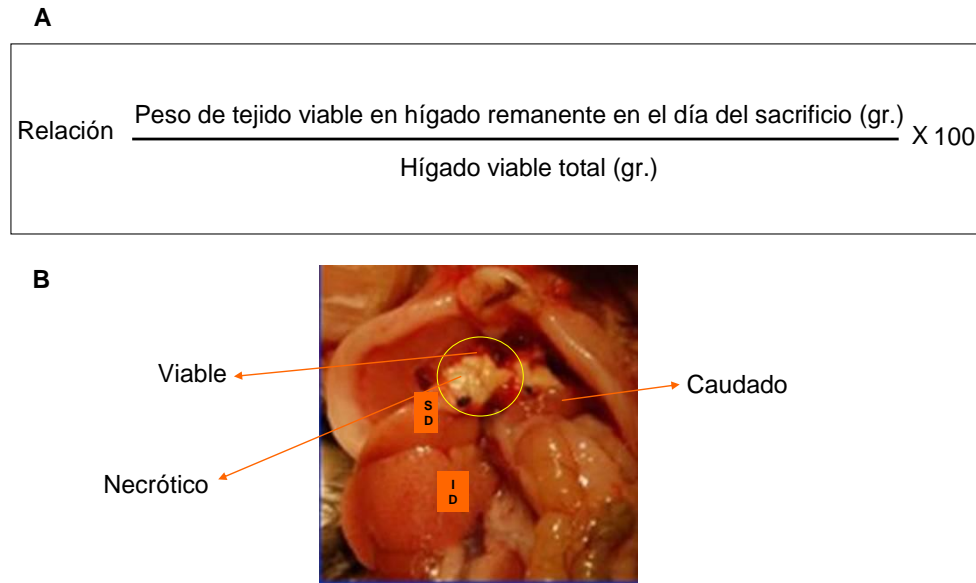
**Figura 42.** Fórmula del porcentaje de hepatectomía.

**4.1.2.- Determinación de la cantidad de tejido remanente del lóbulo medio.**

Para determinar si existían diferencias entre la técnica de HP tradicional frente a la modificada respecto a la cantidad de tejido remanente (viable y no viable) del lóbulo medio tras su resección, evaluamos:

➤ El ratio del tejido viable en el remanente respecto al tejido viable total.

El muñón del lóbulo medio que queda tras hacer la HP se diseccionó en el día del sacrificio del animal. Del muñón se separaron la parte de tejido viable y la parte de tejido necrótico, las cuales fueron pesadas por separado en una balanza de precisión. El hígado viable total se calculó pesando los lóbulos remanentes en el día del sacrificio. La relación del tejido viable en el muñón del lóbulo medio remanente frente al hígado viable total se expresó en porcentaje según la fórmula de la Figura 43.



**Figura 43. Relación del tejido viable en el muñón del lóbulo medio remanente frente al hígado viable total.** A. Fórmula. B. Fotografía de un ratón sometido a una HP de 2/3 y sacrificado a las 48 horas de la cirugía, en la que se observa un crecimiento de los lóbulos remanentes (SD, ID y caudado). El círculo amarillo señala el muñón del lóbulo medio. De este muñón, se pesó por separado la parte de tejido viable y la parte de tejido necrótico. HP; Hepatectomía parcial; SD: superior derecho; ID: inferior derecho.

➤ El ratio del tejido necrótico en el remanente respecto al tejido viable total.

La cantidad de tejido necrótico en el muñón remanente del lóbulo medio tras cada HP se expresó como porcentaje respecto al peso del hígado viable total según la fórmula de la Figura 44.

$$\text{Relación } \frac{\text{Peso de tejido necrótico en hígado remanente en el día del sacrificio (gr.)}}{\text{Hígado viable total (gr.)}} \times 100$$

**Figura 44.** Fórmula de la relación del tejido necrótico en el hígado remanente frente al hígado viable total.

**4.1.3.- Relación del peso del hígado frente al peso corporal (índice hepático)**

Los lóbulos hepáticos remanentes (lóbulo derecho y caudado) fueron diseccionados tras el sacrificio de los animales y pesados (excluyendo el tejido necrótico) en una balanza de precisión para

determinar el índice hepático (Figura 45). Esta relación fue expresada en porcentaje.

$$\text{Relación} = \frac{\text{Peso de tejido hepático remanente en el día del sacrificio (gr.)}}{\text{Peso del animal en el día del sacrificio (gr.)}} \times 100$$

**Figura 45.** Fórmula de la relación del peso del hígado frente al peso corporal (índice hepático).

El índice hepático es un parámetro frecuentemente utilizado para cuantificar la regeneración hepática (Assy N, Minuk GY, 1997; Jia 2011).

#### **4.2.- COMPLICACIONES DE LAS TÉCNICAS DE HP TRADICIONAL Y HP MODIFICADA.**

Las complicaciones de cada técnica de HP se evaluaron en base a los siguientes parámetros:

➤ Determinación de mortalidad intra-operatoria.

Los ratones que fallecieron por causas inherentes a la técnica quirúrgica se anotaron en una base de datos. El número de ratones que falleció se normalizó con el número de ratones totales a los que se practicó la cirugía correspondiente. El resultado de esta relación se expresó en porcentaje.

➤ Medida de parámetros de daño hepático en plasma.

Muestras de sangre retro-orbitaria se recolectaron con capilares heparinizados a las 28 horas de cada cirugía. En dichas muestras, los niveles plasmáticos de aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (FAL) se determinaron

mediante analizadores automáticos en el Departamento de Análisis Clínicos del HGUGM.

➤ Evaluación de necrosis hepatocelular.

La aparición de áreas de necrosis hepatocelular focal es un fenómeno observado en algunos ratones tras la realización de una HP (Panis et al, 1997; Mitchell C, Willenbring H, 2008; Rudich et al, 2009). La aparición de áreas de necrosis hepatocelular se evaluó en todos los ratones en secciones de hígado teñidas con Hematoxilina & Eosina (H&E). El número de animales que desarrollaron necrosis hepatocelular de cualquier grado se normalizó con respecto al número de animales totales en los que se realizó la misma técnica quirúrgica. El resultado de esta relación se expresó en porcentaje.

### **4.3.- RT-PCR EN TIEMPO REAL**

#### **4.3.1.- Extracción de ácido ribonucleico (ARN)**

La extracción de ARN se realizó en muestras de tejidos. Para la extracción de ARN se usaron muestras pequeñas (30 mg) de distintos tejidos (hígado, bazo, íleon, pulmón, riñón, músculo y mesenterio). El ARN se extrajo utilizando 1mL de Trizol (Ambion) y un homogenizador de tejidos (LT Tissue Lyser Quiagen) según las instrucciones del fabricante. El ARN fue extraído con 0,2 mL de cloroformo (Fisher Chemical) y se precipitó con 0,5 mL de isopropanol (Fisher Chemical). El pellet obtenido se lavó con 1mL de etanol al 75% (VWR Chemical) y se resuspendió en agua destilada libre de nucleasas.

La cuantificación de la concentración de ARN en muestras de tejido se realizó por medida de la absorbancia a 260 nm con la ayuda de un Nanodrop (Nucliber), teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia corresponde a 40 µg/mL de ARN. Se calculó la pureza de los extractos por la medida de la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm. En todos los casos esta relación fue cercana a 2. Si esta relación es cercana a 2, indica ausencia de contaminación por proteínas en la muestra.

#### **4.3.2.- Síntesis de ADN copia o complementario (ADNc)**

El paso de ARN a ADNc (transcripción inversa) se realizó sobre 1µg de RNA total usando el kit comercial *iScript cDNA synthesis kit* (Biorad), según las recomendaciones del fabricante. Este kit requiere agua libre de nucleasas, ARN y la enzima transcriptasa inversa. La síntesis de ADNc fue realizada en un termociclador *iQ5 Multicolor Real Time PCR Detection System* (Bio-Rad) con un programa específico para este propósito. Tras este proceso, el ADNc obtenido se almacenó a -80°C.

#### **4.3.3.- RT-PCR en tiempo real**

La RT-PCR en tiempo real fue realizada en un termociclador *iQ5 Multicolor Real Time PCR Detection System* (Bio-Rad) usando el *Taqman Universal Master Mix II with UNG* (ABI, Life Sciences) y sondas Taqman para ratón de los genes IL-6 (Mm00446190\_m1) y SOCS-3 (Mm00545913\_s1). Como control interno para normalizar los datos se usó la proteína de unión a TATA (TBP) (Mm00446973\_m1) y 18S. TBP

ha sido validado como gen de referencia en distintas condiciones como la regeneración hepática. La expresión de este gen fue estable y fiable en comparación con otros genes de referencia que se usan normalmente en regeneración como  $\beta$ -Actina o gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Tatsumi 2008).

El programa utilizado tenía un primer paso de desnaturalización a 95°C de 15 minutos, un segundo paso de 50 ciclos a 94°C durante 20 segundos seguido de 60 segundos a 60°C y un tercer paso a 4°C que se mantenía hasta la recolección de los tubos. Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados fueron analizados utilizando el método Delta-Delta CT.

#### **4.4.- ENSAYO POR INMUNOADSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA) DE IL-6**

La concentración de IL-6 se midió en muestras de plasma (IL-6 circulante), de lavado peritoneal, y de medio de cultivo de macrófagos peritoneales.

##### **4.4.1.- En plasma (IL-6 circulante)**

Los niveles circulantes de IL-6 se midieron en una muestra de sangre retro-orbitaria obtenida a las 4 ó 6 horas tras una HP o a los 90 minutos tras una inyección de LPS, como se especifica en el apartado 3 de Material y Métodos.

#### **4.4.2.- En líquido peritoneal**

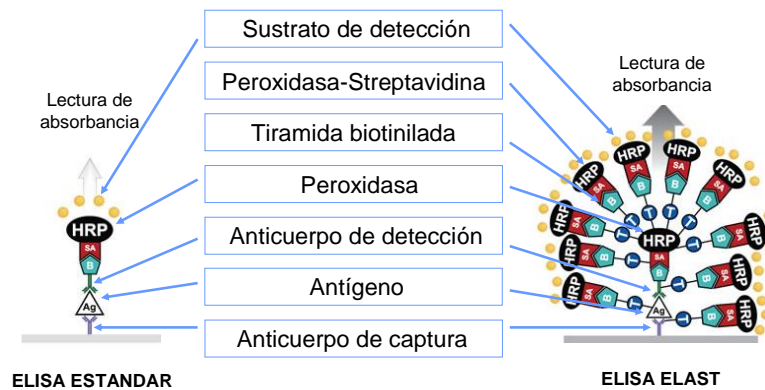
Los niveles de IL-6 en el líquido peritoneal se midieron en una muestra de líquido peritoneal obtenida a las 2 horas tras una HP, como se especifica en el apartado 3 de Material y Métodos.

#### **4.4.3.- En medio de cultivo de macrófagos peritoneales**

Los niveles de IL-6 se midieron en una muestra de medio de cultivo de  $2 \times 10^5$  células, como se especifica en el apartado 2 y 3 de Material y Métodos.

Para evaluar la contribución de las células de Kupffer a la producción de IL-6, medimos la concentración de IL-6 circulante a las 4 horas tras una HP en ratones controles floxeados (CTRL FL) e IL-6 KO<sub>M</sub>, mediante el kit mouse IL-6 ELISA set (BD OptEIA, BD Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante. Dado que la mayoría de estos ratones presentaron una concentración de IL-6 por debajo del límite de detección del kit de ELISA de IL-6, utilizamos un kit de amplificación de la señal, ELAST ELISA amplification system (PerkinElmer). Este kit está diseñado para amplificar la señal generada por la enzima peroxidasa. Se basa en utilizar la tecnología de amplificación de la tiramida (Bobrow et al, 1989). La tiramida es un compuesto fenólico que al ser activado por la enzima peroxidasa se convierte en un radical libre altamente reactivo. Este radical libre reacciona rápidamente y se une covalentemente a regiones ricas en electrones de proteínas adyacentes (predominantemente en residuos de tirosina) a donde se une la enzima peroxidasa.

En este sistema de amplificación por ELISA, la enzima peroxidasa cataliza la unión covalente de la tiramida biotinilada a la fase sólida del ELISA. La adición posterior de una peroxidasa adicional unida a estreptavidina, provoca la unión de la peroxidasa a la fase sólida y como resultado, se amplifica la señal (Figura 46). Este kit de amplificación de la señal se insertó en el protocolo del ELISA de IL-6 (BD OptEIA, BD Biosciences), después de incubar con la peroxidasa y antes de añadir el sustrato que da color, según las instrucciones del fabricante.



**Figura 46. Comparación del procedimiento de un ELISA estándar con el de un ELISA estándar junto con el kit de amplificación de la señal ELAST (PerkinElmer).** Cuando se añade tiramida biotinilada a un sistema que contiene una peroxidasa inmobilizada (ELISA estándar), la enzima peroxidasa cataliza la unión covalente de la tiramida a la fase sólida del ELISA. La aplicación posterior a este sistema de una peroxidasa unida a estreptavidina provoca la unión de esta peroxidasa a la nueva fase sólida biotinilada y resulta en una amplificación de la señal. ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas. Imagen modificada de [www.perkinelmer.com](http://www.perkinelmer.com).

Una vez realizado el ELISA de IL-6 estándar o con amplificación de la señal, se cuantificó la concentración de IL-6 (pg/mL) en cada muestra por interpolación de la diferencia de las lecturas de absorbancia a 450 nm y 560 nm en una curva estándar propia para cada experimento. Las muestras se diluyeron apropiadamente para que los valores de IL-6 estuvieran dentro de la curva estándar correspondiente y en la posición más central (lineal) de la misma.

#### **4.5.- . HISTOLOGÍA**

Porciones de hígado procedentes del lóbulo superior e inferior derecho y muestras del intestino y del bazo fueron fijadas en Methacarn durante 24 horas. Los tejidos fueron deshidratados con concentraciones crecientes de etanol (VWR Chemical) hasta alcanzar el 100% y sumergidos en isoparafina (Panreac). Tras la inclusión de los tejidos en parafina, se cortaron secciones de 5 µm en un microtomo, colocando dos secciones consecutivas en cada portaobjetos.

La proliferación de hepatocitos fue evaluada histológicamente mediante tres técnicas para cuantificar:

- El número de hepatocitos que se encuentran en la fase de síntesis de ADN (fase S), por inmunohistoquímica de BrdU.
- El número de hepatocitos que son positivos para el antígeno nuclear PCNA, que abarca distintas fases del ciclo celular.
- El número de hepatocitos que presentan figuras mitóticas, en secciones teñidas con H&E.

##### **4.5.1.- Inmunohistoquímica (IHQ) de BrdU**

BrdU es un análogo de la timidina que se incorpora al ADN durante la fase de síntesis. Esta incorporación puede ser detectada por IHQ mediante el empleo de anticuerpos monoclonales (Magaud et al, 1988; Assy N, Minuk GY, 1997; Jia 2011). La administración de BrdU (50mg/Kg) se realizó por vía intraperitoneal 2 horas antes del sacrificio de los animales.

#### **4.5.2.- IHQ de PCNA**

El PCNA es un cofactor de la ADN polimerasa delta y es considerado una proteína esencial para la replicación (Moldovan et al, 2007). Fue identificada inicialmente como un antígeno nuclear presente en células que se encontraban en la fase de síntesis del ADN, aunque abarca más fases del ciclo celular (Matsumoto et al, 1987). Este antígeno puede ser detectado por IHQ mediante el empleo de anticuerpos monoclonales (Assy N, Minuk GY, 1997; Jia 2011).

Para la realización de las inmuno-localizaciones de BrdU y PCNA, las secciones se desparafinaron mediante incubación a 70°C en un horno y posterior inmersión en isoparafina (Panreac). Una vez desparafinadas, fueron rehidratadas en concentraciones decrecientes de etanol (100%-90%-70%) (VWR Chemical) y sumergidas en PBS. La actividad endógena de la peroxidasa fue eliminada mediante inmersión en metanol (Fisher Chemical) con 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para desenmascarar el antígeno, las secciones fueron digeridas con tripsina (Sigma Aldrich) durante 10 minutos a temperatura ambiente, desnaturalizadas con HCl al 5,67% (Fisher Scientific) durante 10 minutos a 37°C, neutralizadas en tetraborato de sodio decahidrato (Borax) (Sigma-Aldrich) y lavadas con PBS. En el caso de la IHQ de PCNA, se bloquearon las secciones durante 30 minutos a temperatura ambiente con una solución de PBS que contenía suero al 5% del huésped (cabra) (Gibco) en el que se obtuvo el anticuerpo secundario, para eliminar las uniones inespecíficas. A continuación, en ambas IHQ, una sección del portaobjetos fue incubada con anticuerpo primario y la otra sección fue

incubada con una solución que solo contenía PBS y el suero al 5% del huésped en el que se obtuvo el anticuerpo secundario (control negativo, sin anticuerpo primario) durante toda la noche a 4°C en atmósfera húmeda. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios diluidos en PBS y suero del huésped al 5% (Tabla 10):

<b>Anticuerpo</b>	<b>Origen</b>	<b>Suero</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>
<b>Monoclonal anti-BrdU clon Bu 20a</b>	Ratón	Caballo (ATCC)	1:40	Dako
<b>Monoclonal anti-PCNA XP</b>	Conejo	Cabra (Gibco)	1:16000	Cell Signaling Technology

**BrdU:** Bromodesoxiuridina. **PCNA:** Antígeno nuclear de células en proliferación.

**Tabla 10.** Descripción de los anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica.

Tras lavar con PBS, las secciones se incubaron a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (anti-ratón en la BrdU o anti-conejo para el PCNA) durante 30 minutos y con ABC Vectastain solution (Vectastain ABC kit, Vector labs) otros 30 minutos, y finalmente con el cromógeno 3-3'-diaminobencidina (DAB, Sigma-Aldrich) que precipita en presencia de la peroxidasa dando lugar a un color marrón oscuro. Entre incubaciones y después de completar la IHQ, las secciones fueron lavadas con PBS para retirar el exceso de reactivos. Las incubaciones con el anticuerpo secundario y ABC se realizaron en una solución que contenía PBS y suero del huésped al 5%. Finalmente, se realizó contratincción con hematoxilina de Carazzi (Panreac) y, en el caso de la BrdU, también con eosina (Leica biosystems). Estas secciones se deshidrataron y se sumergieron en

isoparafina (Panreac), antes de realizar el montaje con cubreobjetos y el medio de montaje Permount (Fisher Scientific). Los portaobjetos se dejaron secar durante la noche a temperatura ambiente antes de realizar la observación al microscopio.

#### **4.5.3.- Tinción de Hematoxilina & Eosina (H&E)**

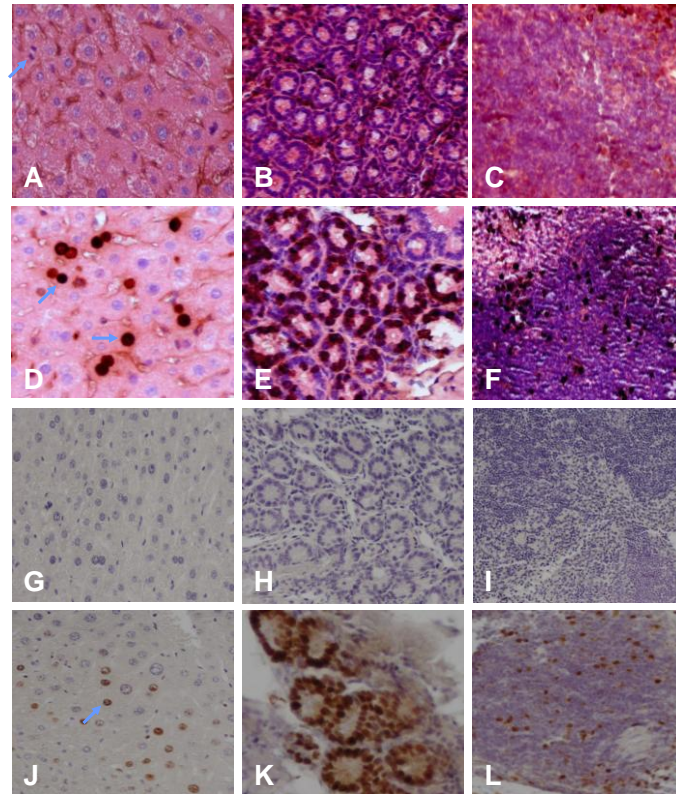
La tinción estándar de secciones de tejido hepático con H&E con recuento de hepatocitos con figuras mitóticas es una técnica común en la evaluación de la regeneración hepática (Assy N, Minuk GY, 1997; Jia 2011).

La tinción de H&E no requiere incubación con anticuerpos. Las secciones fueron desparafinadas, rehidratadas, y sumergidas en PBS. La actividad endógena de la peroxidasa fue eliminada mediante inmersión en metanol (Fisher Chemical) con 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tras este paso, los tejidos fueron teñidos con hematoxilina de Carazzi (Panreac) y eosina (Leica biosystems). Finalmente, fueron deshidratados y sumergidos en isoparafina (Panreac), antes de realizar el montaje con cubreobjetos y medio de montaje Permount (Fisher Scientific). Los portaobjetos se dejaron secar durante la noche a temperatura ambiente antes de realizar la observación al microscopio.

Después de las distintas IHQ, las secciones fueron observadas al microscopio óptico y fotografiadas a una amplificación de 20X. Por cada ratón, se tomaron 8 fotografías: 8 de la sección control negativo (sin anticuerpo primario), 8 de la sección teñida con BrdU o PCNA, 1 foto del intestino y otra del bazo. El intestino y el bazo fueron utilizados como

control positivo del marcaje de BrdU y PCNA por su alta actividad proliferativa basal (Figura 47) (Magaud et al, 1989).

La síntesis de ADN en hepatocitos se evaluó mediante el recuento del número de hepatocitos positivos para BrdU o PCNA en ocho campos fotografiados al microscopio con una amplificación del 20X (aproximadamente 3000 hepatocitos totales) en las secciones incubadas con BrdU o PCNA. La actividad mitótica en hepatocitos se evaluó mediante el recuento del número de figuras mitóticas en hepatocitos en las secciones incubadas sin el anticuerpo primario (control negativo) (Figura 47). Para realizar ambas medidas, se usó el programa Image J del Instituto Nacional de Salud (NIH). Las evaluaciones histológicas fueron realizadas de forma ciega, y los datos fueron recogidos y analizados en una hoja de cálculo de Excel.



**Figura 47. Imágenes histológicas de secciones teñidas con H&E, BrdU y PCNA.** A-C. Secciones teñidas con H&E: A) Hígado, la flecha indica una figura mitótica en anafase, B) Intestino, y C) Bazo. D-F. Secciones teñidas con BrdU de: D) Hígado, las flechas indican núcleos marrones o negros positivos para BrdU, E) Intestino, y F) IHQ de BrdU en bazo. G-I. Secciones teñidas con hematoxilina de G) Hígado, H) Intestino, e I) Bazo. J-L. Secciones teñidas con PCNA de: J) Hígado, la flecha indica un núcleo positivo para PCNA de color marrón, K) Intestino, y L) Bazo. H&E: Hematoxilina y Eosina; BrdU: Bromodesoxiuridina; PCNA: Antígeno nuclear de células en proliferación; IHQ: Inmunohistoquímica.

## **4.6.- INMUNOFLUORESCENCIA**

### **4.6.1.- Procesado de las muestras hepáticas**

El procesamiento de las muestras es un aspecto clave para el desarrollo de una correcta inmunofluorescencia. En nuestro experimento, las muestras hepáticas fueron fijadas en formalina, inmersas después en un gradiente de sucrosa, y finalmente criopreservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en medio de corte óptimo (OCT) (Krape). Más en detalle, las muestras de tejido hepático fueron cortadas a un tamaño apropiado (aproximadamente 5 mm) e introducidas en tubos de 50 mL

que contenían 15-20 mL de Formalina al 10% (Sigma-Aldrich). Estas muestras se mantuvieron en agitación lenta durante 3-4 horas a temperatura ambiente. Tras la agitación, se lavó el tejido hepático con PBS y se rellenó el tubo con 15-20 mL de sucrosa al 10% en PBS por 1 h, tras lo cual la solución de sucrosa al 10% se reemplazó por 15-20 mL de una solución de sucrosa al 20%. Una vez que el tejido descendió al fondo del tubo, se reemplazó la solución de sucrosa al 20% por 15-20 mL de una solución de sucrosa al 30%. En esta solución se dejó el tejido hepático durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente, cuando el tejido hepático se encontraba en el fondo del tubo, se retiró el exceso de sucrosa del tejido hepático mediante el uso de un papel de filtro. La criopreservación se realizó mediante el uso de una pieza de corcho sobre la que se depositó una gota de OCT, el tejido hepático orientado de forma correcta para el corte, y otra gota de OCT sobre el tejido hepático. Con ayuda de unas pinzas, el corcho con la muestra se introdujo en un vaso de 100 mL que contenía isopentano a -80°C, hasta que el OCT se tornó de color blanco. Después, se depositó la pieza de corcho sobre hielo seco durante unos segundos, y se almacenó en una bolsa correctamente etiquetada a -80°C.

#### **4.6.2.- Inmunofluorescencia y captura de imágenes**

Tras la inclusión del tejido hepático en OCT, se realizaron secciones de 10 µm de grosor cortadas en un criostato. Se emplearon dos secciones consecutivas en cada portaobjetos.

Tras descongelar los portaobjetos, se añadió una gota de PBS en cada sección para hidratar la muestra. Después, se añadió DAPI 1:1000 en cada sección durante 20 min a temperatura ambiente para marcar los núcleos. Para retirar el exceso de este marcaje, se lavó dos veces con PBS durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones se montaron con cubreobjetos y medio de montaje para inmunofluorescencia. Los portaobjetos se dejaron a 4°C durante la noche antes de realizar la observación al microscopio.

Las imágenes del tejido fueron capturadas con los objetivos 20X ó 63X de un microscopio confocal (Leica Microsystems) o los objetivos 20X ó 40X de un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E800) acoplado a una cámara digital (Nikon Digital Camera DXM1200F).

#### **4.7.- WESTERN BLOT**

##### **4.7.1.- Extracción de proteínas totales de tejido hepático**

Muestras del hígado remanente (30-50 mg) se homogenizaron en buffer de lisis frío (Tritón 1%, Tris-HCl 50mM pH 7,4, NaCl 150mM,  $\beta$ -glicerofosfato 50mM, glicerol 10%, EDTA 2mM) al que se añadió una mezcla de un coctel de inhibidores de proteasas (Calbiochem), ortovanadato sódico (Sigma-Aldrich) y NaF (Sigma-Aldrich), todos ellos a una dilución 1:100. Cada muestra se homogenizó con un homogenizador de tejidos (LT Tissue Lyser, Quiagen). Tras incubar las muestras en hielo durante unos minutos, se centrifugaron a 4°C durante 30 minutos a 14000 rpm, y el sobrenadante se almacenó a -80°C.

La concentración de proteína total se determinó según el método descrito por Lowry (Lowry et al, 1951) usando el kit DC Protein assay (Biorad). Se utilizó albúmina de suero bovino (BSA, Sigma) para construir una curva patrón. Con este método, los cambios de absorbancia a 750 nm son directamente proporcionales a la concentración de proteína presente en la muestra.

#### **4.7.2.- Western blot**

Los lisados proteicos totales de hígado se fraccionaron electroforéticamente en un gel SDS-poliacrilamida al 10% (Miniprotein TGX Stain-Free Gels, Biorad) en condiciones reductoras. Para ello, los extractos conteniendo la cantidad de proteínas adecuada se calentaron a 100°C durante 5 minutos en usando solución tampón Laemmli (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, SDS 1%, 10 mM DTT, glicerol 10% y azul de bromofenol 0,05 %) antes de ser cargados en los geles (Tabla 11). Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas Inmobilon-P, PVDF (Merck Millipore) en Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%. Las membranas fueron bloqueadas con el fin de saturar los sitios de unión inespecífica durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución de leche desnatada en polvo al 5% en tampón tris salino (TBS) (Tris 1M pH 7.5 y NaCl 5 M)-Tween 0,1% (TBST). Transcurrido este tiempo, las membranas se incubaron con los anticuerpos específicos durante toda la noche a 4°C en una solución que contenía TBST y leche desnatada en polvo al 0,5% (Tabla 11).

<b>Anticuerpo</b>	<b>Origen</b>	<b>Dilución</b>	<b>PM (kda)</b>	<b>Carga (prot.)</b>	<b>Casa comercial</b>
<b>Monoclonal anti-pSTAT-3 XP</b>	Conejo	1:1000	79, 83	IL-6 KO <sub>M</sub> : 60 µg IL-6 KO <sub>H</sub> : 30 µg	Cell Signaling Technology
<b>Monoclonal anti-STAT-3</b>	Conejo	1:1000	79, 83	IL-6 KO <sub>M</sub> : 60 µg IL-6 KO <sub>H</sub> : 30 µg	Cell Signaling Technology
<b>Policlonal anti-pERK 1/2</b>	Conejo	1:1000	42, 44	IL-6 KO <sub>M</sub> : 60 µg IL-6 KO <sub>H</sub> : 30 µg	Cell Signaling Technology
<b>Monoclonal anti-ERK 1/2</b>	Ratón	1:1000	42, 44	IL-6 KO <sub>M</sub> : 60 µg IL-6 KO <sub>H</sub> : 30 µg	Cell Signaling Technology
<b>Monoclonal anti-pAKT (Ser473) XP</b>	Conejo	1:2000	60	IL-6 KO <sub>M</sub> : 60 µg IL-6 KO <sub>H</sub> : 30 µg	Cell Signaling Technology
<b>Monoclonal anti-AKT XP</b>	Conejo	1:1000	60	IL-6 KO <sub>M</sub> : 60 µg IL-6 KO <sub>H</sub> : 30 µg	Cell Signaling Technology
<b>Monoclonal anti-Ciclina D1</b>	Conejo	1:1000	36	IL-6 KO <sub>M</sub> : 20 µg	Cell Signaling Technology
<b>Monoclonal anti-βActina</b>	Ratón	1:20000	42	IL-6 KO <sub>M</sub> : 20 µg	Sigma-Aldrich

**STAT-3:** Transductor de señal y activador de la transcripción 3. **ERK:** Quinasas reguladas por señales extracelulares. **AKT:** Proteína quinasa B. **PM:** Peso molecular.

**Tabla 11.** Anticuerpos primarios utilizados en Western blot.

Tras la incubación, las membranas se lavaron con TBST y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa en una solución que contenía TBST y leche desnatada en polvo al 0,5% (Tabla 12).

<b>Anticuerpo</b>	<b>Origen</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>
<b>Policlonal anti-IgG de conejo</b>	Burro	1:5000	Jackson Immunoresearch
<b>Policlonal anti-IgG de ratón</b>	Burro	1:5000	Jackson Immunoresearch

**Tabla 12.** Anticuerpos secundarios utilizados en Western blot.

Una vez llevada a cabo la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron varias veces con TBST, y la señal se reveló mediante quimioluminiscencia (ECL, GE Healthcare) con ayuda de un revelador Alliance 4.7 (Uvitec). La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó por densitometría con el programa de análisis Image J del NIH. Los resultados obtenidos se expresaron en unidades arbitrarias de densitometrado (u.a.d.).

#### **4.8.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM, salvo que se indique lo contrario. Para analizar las diferencias entre dos grupos se utilizo el test t de Student o el test U de Mann Whitney, en función de si la distribución de los datos era paramétrica o no paramétrica. Las diferencias entre 3 o más grupos se estudiaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) o la correspondiente prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Las comparaciones múltiples post-Hoc se realizaron con el test de Tukey o Dunns. La dispersión de los datos se evaluó mediante la prueba F para varianzas de dos muestras (test F para varianzas). La correlación entre dos parámetros se realizó con el test de regresión lineal. Se estableció como nivel de significación estadística un valor de p

inferior a 0.05. El análisis estadístico y las gráficas se realizaron con el programa GraphPad Prism versión 5.03 (GraphPad Software, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## **VII.- *RESULTADOS***

---



## **1.- OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA QUIRÚRGICA DE HEPATECTOMÍA PARCIAL (HP) EN RATONES.**

### **1.1.- OBJETIVO 1A. COMPARACIÓN DE LA REPRODUCIBILIDAD DE DOS PROTOCOLOS DE HP.**

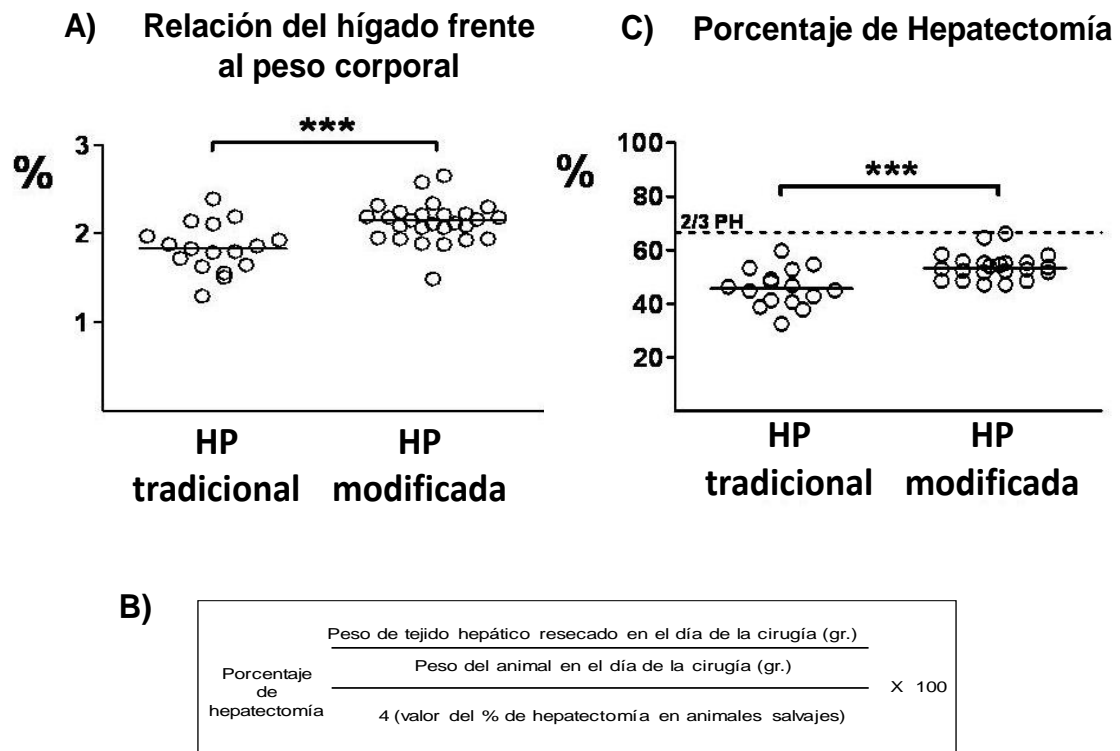
En este Objetivo, comparamos la técnica de HP tradicional desarrollada por Higgins y Anderson en ratas en 1931 y modificada por Mitchell C para ratones en 2008, basada en la resección del 70% de masa hepática utilizando **dos ligaduras** (grupo **HP-tradicional**), con una técnica modificada basada en la utilización de **tres ligaduras** (grupo **HP-modificada**).

#### **1.1.1.- Cantidad de tejido resecado**

Para evaluar la variabilidad de la cantidad de tejido resecado en cada técnica de HP, medimos el ratio del peso de hígado resecado frente al peso corporal del animal en el día de la cirugía, y calculamos el porcentaje de hepatectomía.

La HP-modificada resultó en la resección de una mayor cantidad de masa hepática, evaluada por la relación “peso del hígado resecado/peso corporal” (**HP tradicional:**  $1.84 \pm 0.07\%$  vs. **HP modificada:**  $2.13 \pm 0.04\%$ ,  $p < 0.001$ , Figura 48.A). Tomando un 4% como referencia del ratio normal del “peso del hígado/peso corporal” en ratones, calculamos el porcentaje de hepatectomía realizado en cada animal (Figura 48.B). Según este cálculo, el porcentaje de hepatectomía también fue mayor en el grupo de **HP modificada** ( $46.0 \pm 1.8\%$  vs.  $53.9$

$\pm 1.1\%$ ,  $p < 0.001$ , Figura 48.C). Así, las resecciones realizadas con la técnica de **HP modificada** se acercaron más al objetivo del 70% que aquellas realizadas con la técnica de **HP tradicional**.



**Figura 48. Cantidad de tejido hepático resecado en ratones mediante las técnicas de HP tradicional y HP modificada.** Cada símbolo representa el valor individual de cada ratón y la línea horizontal la mediana de cada grupo. La línea horizontal discontinua indica un porcentaje de hepatectomía del 70%. A) Relación del peso del hígado resecado frente al peso corporal. B) Fórmula para calcular el porcentaje de HP. C) Porcentaje de hepatectomía. \*\*\* $p < 0.001$ , test U de Mann-Whitney. Abreviaturas: HP: Hepatectomía parcial.

### 1.1.2.- Cantidad de tejido remanente de los lóbulos resecados

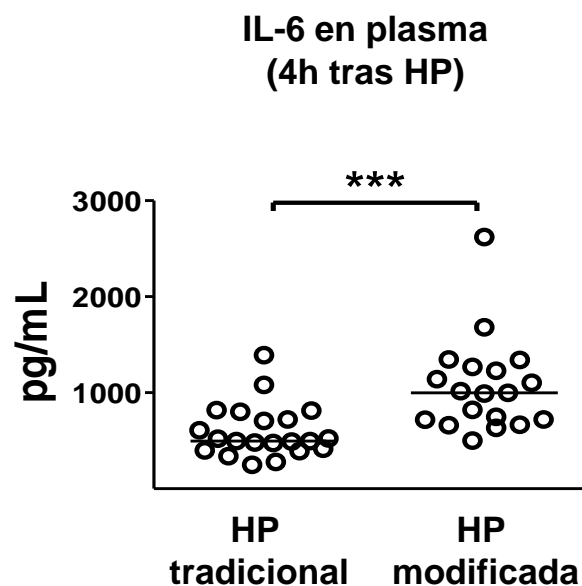
Para evaluar con más precisión la variabilidad de cada técnica para la resección del lóbulo medio del hígado, medimos por separado las proporciones de tejido viable y de tejido necrótico presentes en el muñón del lóbulo medio resecado en relación al total de tejido remanente viable.



los lóbulos resecaados frente al hígado viable total. \*\*\* $p < 0.001$ , test U de Mann-Whitney. Abreviaturas: HP: Hepatectomía parcial.

### 1.1.3.- Dinámica de la regeneración hepática

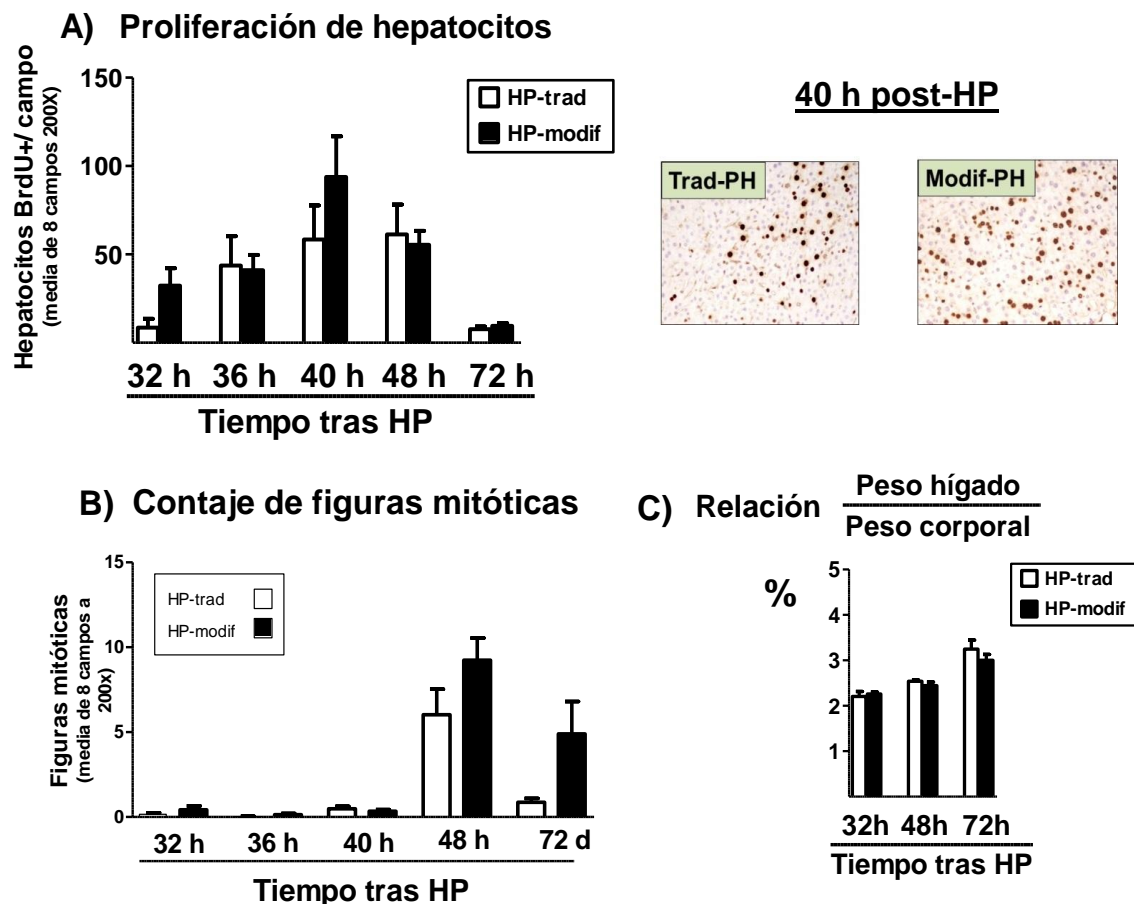
Uno de los fenómenos más consistentes y que se considera importante para el inicio de la regeneración hepática tras una HP es la elevación precoz de IL-6 circulante. Las modificaciones introducidas en la técnica de HP se asociaron a una mayor elevación de IL-6 en plasma a las 4 horas tras la cirugía (**HP tradicional:**  $595.0 \pm 59.82$  pg/mL vs. **HP modificada:**  $1064.0 \pm 111.8$  pg/mL,  $p < 0.001$ , Figura 50).



**Figura 50. Concentración de IL-6 en plasma a las 4 horas tras una HP tradicional o una HP modificada en ratones.** Cada símbolo representa el valor en ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. La concentración de IL-6 fue medida por ELISA a las 4 horas tras una HP. \*\*\* $p < 0.001$ , test U de Mann-Whitney. Abreviaturas: HP: Hepatectomía parcial; ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas.

La dinámica de la proliferación hepatocitaria se evaluó mediante la medida de la síntesis de ADN en hepatocitos por la incorporación de BrdU, el recuento de figuras mitóticas, y la recuperación de masa hepática (índice hepático) (Figura 51). Como en estudios previos

(Vaquero et al, 2011; Nevzorova et al, 2015), la síntesis de ADN comenzó a ser detectada en hepatocitos a las 32 horas, mientras que el pico se produjo a las 40 horas y la síntesis de ADN comenzó a descender a las 48 horas. Aunque la síntesis de ADN en hepatocitos en fases precoces (32 h tras HP) tendió a ser mayor y a alcanzar un pico más alto y definido a las 40 h tras HP en ratones operados con la **HP modificada** comparado con la **HP tradicional**, no existieron diferencias estadísticamente significativas entre las dos técnicas en ninguno de los tiempos estudiados (Figura 51.A). El recuento de figuras mitóticas en hepatocitos también tendió a ser más elevado a las 48 h y 72 h de la HP en ratones operados con la **HP modificada** en comparación con la **HP tradicional**, pero tampoco se alcanzó la significación estadística (Figura 51.B). Finalmente, el aumento del índice hepático tras la cirugía fue similar en las dos técnicas de HP evaluadas (Figura 51.C).



**Figura 51. Dinámica de la regeneración hepática en ratones operados con una HP tradicional o con una HP modificada.** La dinámica de la regeneración hepática fue evaluada por: A. Síntesis de ADN en hepatocitos mediante inmunohistoquímica de BrdU. B. Recuento de figuras mitóticas en tinciones de tejido hepático con H&E. C. Relación del peso del hígado frente al peso corporal (Índice hepático). Las barras muestran la media  $\pm$  SEM ( $n= 3-6/\text{grupo y tiempo}$ ). Abreviaturas: ADN: Ácido desoxirribonucleico; BrdU: Bromodesoxiuridina; H&E: Hematoxilina y eosina; HP-trad: Hepatectomía parcial tradicional; HP-modif: Hepatectomía parcial modificada.

## 1.2.- OBJETIVO 1B: COMPARACIÓN DE LAS COMPLICACIONES DE LAS TÉCNICAS DE HP TRADICIONAL Y HP MODIFICADA

### 1.2.1.- Mortalidad intra-operatoria.

La mortalidad intra-operatoria fue similar y prácticamente inexistente en los ratones operados con la técnica de **HP tradicional** y con la técnica de **HP modificada** (0% vs. 10%,  $p= 0.29$ ). Los 3 ratones en el grupo de **HP modificada** fallecieron por punción accidental del diafragma durante la ligadura del lóbulo medio debido a la dirección en

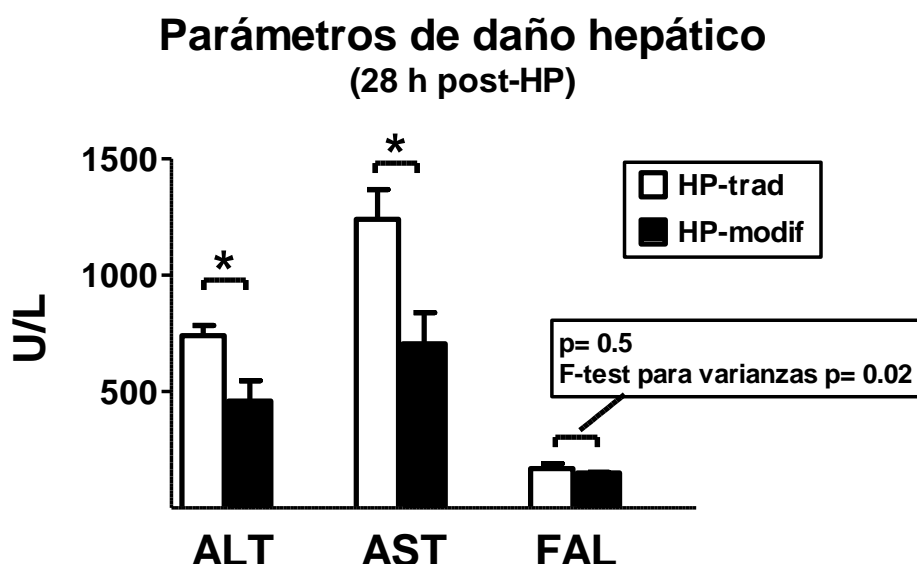
que se aprietan los nudos, y probablemente reflejen una mayor dificultad técnica en la realización de la HP modificada.

### 1.2.2.- Desarrollo de necrosis hepatocelular

El desarrollo de áreas focales de necrosis hepatocelular ocurrió en una frecuencia similar en ratones operados con las técnicas de HP tradicional y HP modificada (6% vs. 18%,  $p=0.38$ ).

### 1.2.3.- Parámetros de daño hepático

El grupo de ratones operados con la técnica de **HP tradicional** presentó unos niveles más altos de ALT ( $p < 0.05$ ) y AST ( $p < 0.05$ ) a las 28 de la cirugía en comparación con el grupo de **HP modificada**. Aunque los niveles de FAL fueron similares en ambos grupos ( $p = 0.5$ ), la dispersión de los datos de esta variable fue mayor en el grupo de HP tradicional ( $p = 0.02$ , test F para varianzas) (Figura 52).



**Fig.52. Parámetros bioquímicos de daño hepático en ratones operados con las técnicas de HP tradicional y HP modificada, medidos en sangre obtenida por sangrado retro-orbitario a las 28 h tras la cirugía.** Las barras muestran la media  $\pm$  SEM ( $n = 3-4$  ratones/grupo).  $*p < 0.05$ , test U de Mann Whitney. Abreviaturas: HP: Hepatectomía parcial; ALT: Alanina aminotransferasa; AST: Aspartato aminotransferasa; FAL: Fosfatasa alcalina.

**2.- OBJETIVO 2. DETERMINAR LA CONTRIBUCIÓN DE CADA TIPO CELULAR (HEPATOCITOS Y MACRÓFAGOS) A LA PRODUCCIÓN DE IL-6 Y LA RELEVANCIA DE LA FUENTE CELULAR DE IL-6 COMO FACTOR DETERMINANTE DE SUS EFECTOS SOBRE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA.**

En base a los resultados del OBJETIVO I y la mayor reproducibilidad de la técnica de HP modificada, utilizamos dicha técnica en todos los experimentos posteriores realizados en ratones con una deficiencia selectiva de IL-6 en células de origen mieloide (células de Kupffer) o en hepatocitos presentados en la presente tesis.

**2.1.- OBJETIVO 2A. VALIDAR LOS RATONES GENERADOS CON DEFICIENCIA SELECTIVA DE IL-6 EN CÉLULAS ESPECÍFICAS.**

Los experimentos del **Objetivo 2A** se realizaron para confirmar que los ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de Kupffer (IL-6 KO<sub>M</sub>) o en hepatocitos (IL-6 KO<sub>H</sub>) no expresaban esta citocina en estas células específicas y, por tanto, constituían una herramienta válida.

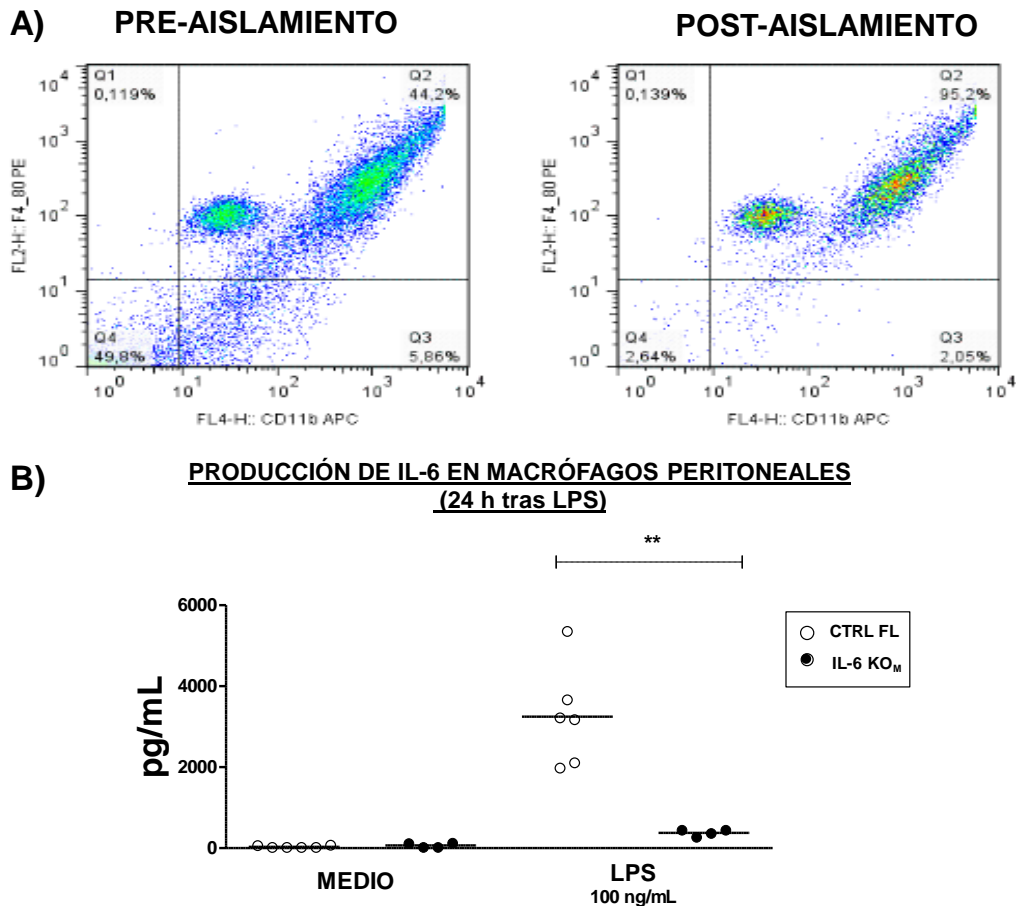
### **2.1.1.- Evaluación de la producción de IL-6 en cultivos primarios de macrófagos peritoneales.**

En este experimento, aislamos macrófagos peritoneales de ratones IL-6 KO<sub>M</sub> y de sus controles floxeados (CTRL FL) y evaluamos la producción de IL-6 en presencia o ausencia de LPS, medida en el medio de cultivo.

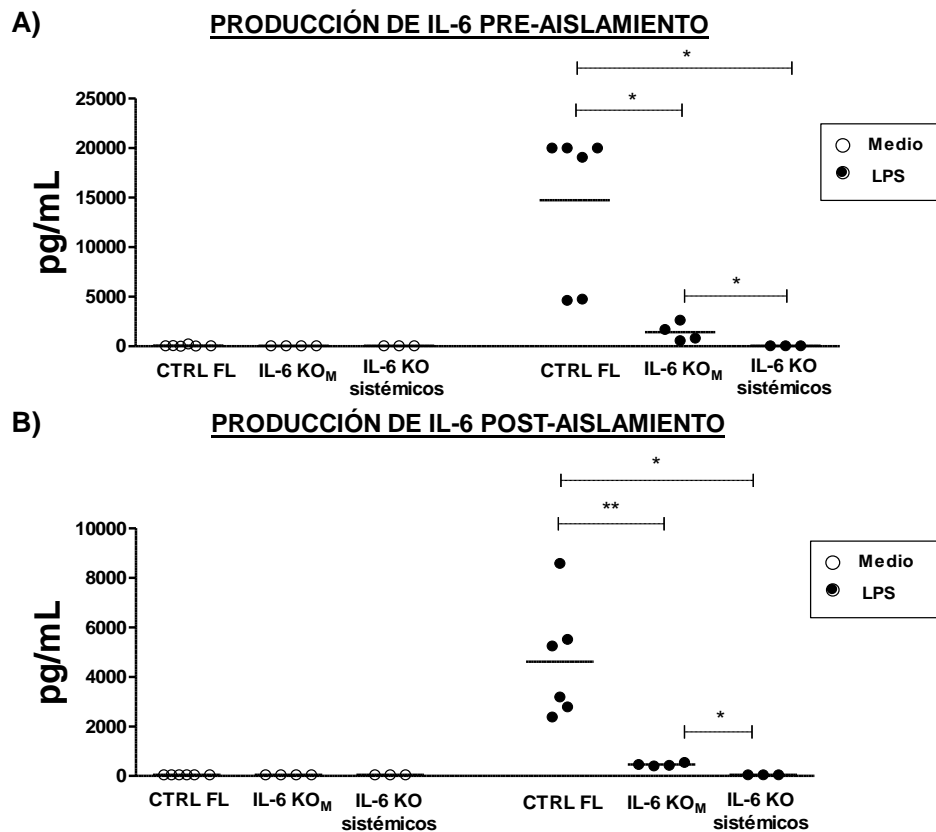
En primer lugar, evaluamos la presencia de macrófagos en las poblaciones celulares obtenidas en el lavado peritoneal, analizando muestras tanto antes de realizar el aislamiento de los mismos (grupo **pre-aislamiento**) como después del aislamiento (grupo **post-aislamiento**). Para ello, utilizamos citometría de flujo e inmunofluorescencia directa con anticuerpos anti-Cd11b y anti-F4/80 (marcadores de monocito/macrófago) (Figura 53.A). Cd11b (también conocido como Mac-1 o receptor del complemento 3), marcador mielomonocítico implicado en la adhesión y fagocitosis (Springer et al, 1979; Vermaelen et al, 2004), y F4/80, expresado a altos niveles en la superficie de un gran número de células incluyendo las células de Kupffer (Leenen et al, 1994; Schaller et al, 2002; Brown et al, 2004), son ampliamente utilizados para la identificación de macrófagos tisulares. La evaluación de las poblaciones celulares mostró que solo el 45% de las células expresaron marcadores de macrófagos (Cd11b y F4/80) en las muestras **pre-aislamiento**, mientras que más del 95% de las células se encontraban marcadas con Cd11b y F4/80 en las muestras **post-aislamiento** (Figura 53.A).

En segundo lugar, evaluamos la producción de IL-6 en el medio de cultivo de macrófagos peritoneales (grupo **post-aislamiento**) obtenidos de ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** o controles floxeados (**CTRL FL**) en presencia o ausencia de LPS. La elevación de IL-6 observada en el medio de cultivo de macrófagos procedentes de ratones controles (**CTRL FL**) a las 24 horas de administrar LPS, fue extensamente prevenida en el caso de los macrófagos procedentes de ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** ( $p < 0.01$ ) (Figura 53.B).

Para confirmar la especificidad de la medida y obtener información adicional, evaluamos la producción de IL-6 en el medio de cultivo de poblaciones celulares pre- y post-aislamiento procedentes de lavados peritoneales de ratones **IL-6 KO sistémicos** (como control negativo), ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** y ratones controles floxeados (**CTRL FL**), en presencia o ausencia de LPS durante 24 horas de cultivo. Estos experimentos reprodujeron los resultados previos, mostrando que la exposición a LPS indujo un gran aumento de IL-6 en las poblaciones celulares obtenidas de ratones controles (**CTRL FL**), el cual estuvo drásticamente atenuado en las obtenidas de ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>**, y totalmente abolido en las obtenidas de ratones **IL-6 KO sistémicos** (tanto en las muestras **pre-** como **post-aislamiento**) (Figura 54 A y B).



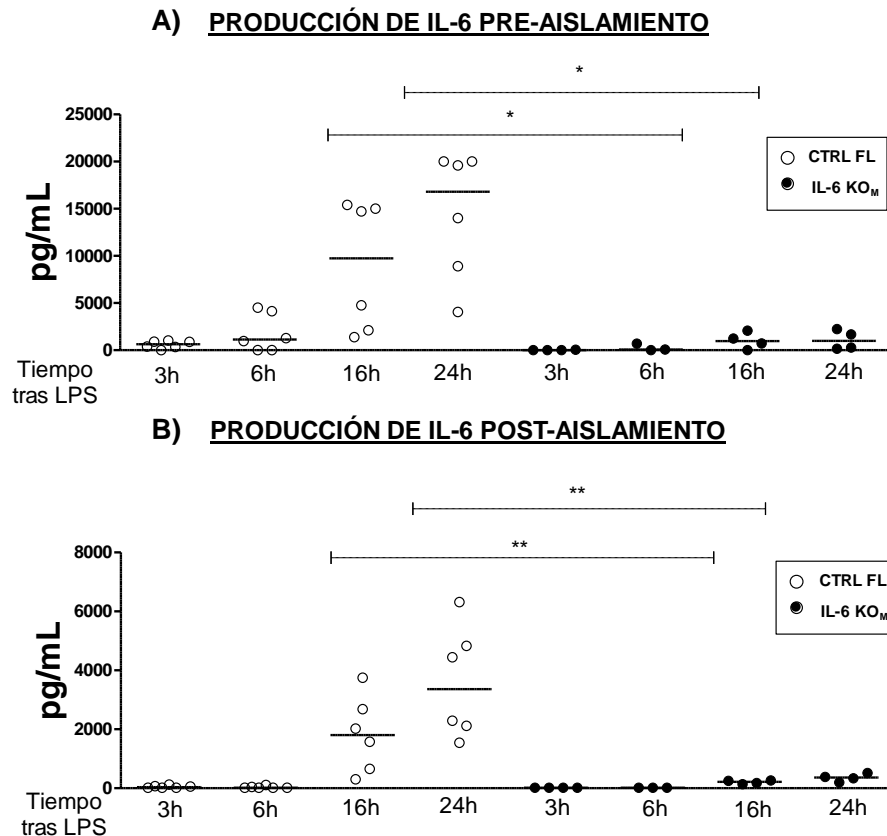
**Figura 53. Caracterización de poblaciones celulares, y concentración de IL-6 en el medio de cultivo de macrófagos peritoneales de ratones IL-6 KO<sub>M</sub> y de sus controles IL-6 floxeados (CTRL FL) tras administrar LPS durante 24 horas.** A. Identificación y recuento de macrófagos peritoneales presentes en el lavado peritoneal (grupo pre-aislamiento) o tras su aislamiento (grupo post-aislamiento), utilizando inmunofluorescencia directa de F4/80 y Cd11b y citometría de flujo (se muestra imagen representativa, pero se realizó en todos los animales utilizados). B. Producción de IL-6 inducida por LPS en macrófagos peritoneales (muestras post-aislamiento). Cada símbolo representa el valor obtenido en macrófagos de ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. En el grupo CTRL FL hubo un aumento de IL-6 tras administrar LPS en comparación con los ratones no estimulados con LPS (Medio vs LPS,  $p < 0.001$ , ANOVA con test de Tukey post-hoc).  $**p < 0.01$ , test U de Mann-Whitney. Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; LPS: Lipopolisacárido; IL-6 KO<sub>M</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en células de origen mieloide; CTRL FL: Control IL-6 floxeado.



**Figura 54. Producción de IL-6 tras administrar LPS durante 24 horas en el medio de cultivo de poblaciones celulares del lavado peritoneal (pre- y post- aislamiento de macrófagos) obtenido de ratones control IL-6 floxeados (CTRL FL), ratones con deficiencia de IL-6 en células mieloides (IL-6 KO<sub>M</sub>) y ratones IL-6 KO sistémicos.** A. Producción de IL-6 en la población celular mixta antes del aislamiento de los macrófagos (grupo pre-aislamiento). B. Producción de IL-6 en el cultivo de macrófagos peritoneales aislados (grupo post-aislamiento). Cada símbolo representa el valor obtenido en macrófagos de ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , test U de Mann Whitney. Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; LPS: Lipopolisacárido; IL-6 KO<sub>M</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en células de origen mieloides; CTRL FL: Control IL-6 floxeado.

El tercer lugar, comparamos la dinámica temporal de la elevación de IL-6 en medio de cultivo inducida por la exposición a LPS en células del lavado peritoneal, tanto en la población mixta original (grupo **pre-aislamiento**) como en la población aislada de macrófagos peritoneales (grupo **post-aislamiento**), obtenidas de ratones controles **CTRL FL** y de ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>**. La concentración de IL-6 en el medio de cultivo de las células procedentes de ambos grupos de ratones aumentó progresivamente durante las 24 horas tras la exposición a LPS, tanto en las células pre-aislamiento como post-aislamiento (Figura 55). Dicho

aumento de IL-6, sin embargo, fue drásticamente atenuado a las 16 h y 24 h en las células de ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** comparado con **CTRL FL** tanto en las células pre-aislamiento (16 h y 24 h:  $p < 0.05$ ) (Figura 55.A) como en los cultivos de macrófagos (post-aislamiento, 16 h y 24 h:  $p < 0.01$ ) (Figura 55.B).

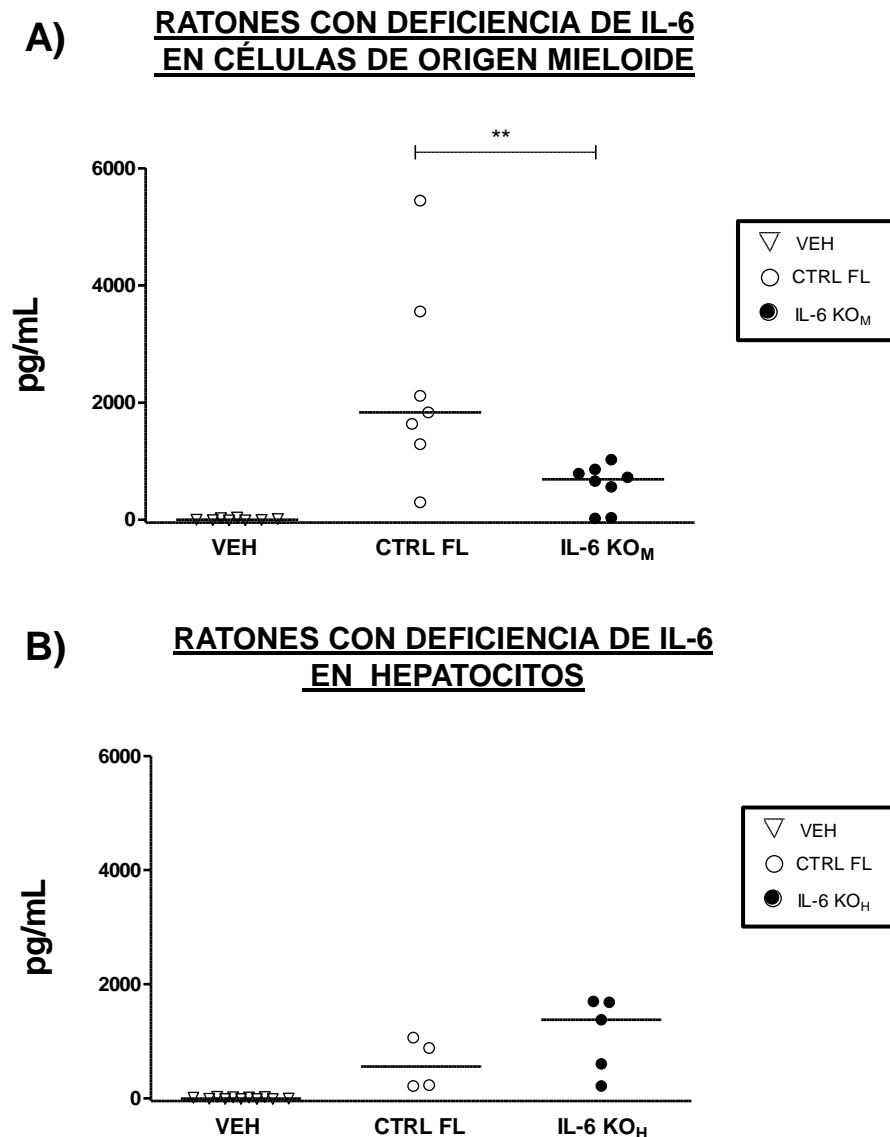


**Figura 55. Concentración de IL-6 en el medio de cultivo a lo largo del tiempo tras la administración de LPS en cultivos de células del lavado peritoneal (pre-aislamiento) y de macrófagos peritoneales (grupo post-aislamiento) obtenidos de ratones controles (CTRL FL) y ratones IL-6 KO<sub>M</sub>.** A. Producción de IL-6 en cultivos de la población celular mixta (grupo pre-aislamiento). B. Producción de IL-6 en cultivos de macrófagos peritoneales (grupo post-aislamiento). Cada símbolo representa el valor obtenido en macrófagos de ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , test U de Mann Whitney. Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; LPS: Lipopolisacárido; IL-6 KO<sub>M</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en células de origen mieloide; CTRL FL: Control IL-6 floxeado.

### 2.1.2.- Elevación de IL-6 circulante in vivo tras la administración de LPS en ratones.

Para confirmar la existencia de un fenotipo *in vivo*, evaluamos la elevación de IL-6 circulante inducida por la administración de LPS en

ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide o en hepatocitos (IL-6 KO<sub>M</sub> e IL-6 KO<sub>H</sub>) y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL). Excepto en los ratones IL-6 KO<sub>M</sub>, la administración de LPS causó elevaciones estadísticamente significativas de IL-6 circulante en comparación con la administración de suero salino (vehículo). La elevación de IL-6 circulante inducida por LPS en ratones CTRL FL estuvo significativamente atenuada en el caso de los ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide ( $2311 \pm 640$  pg/mL vs.  $585 \pm 131$  pg/mL,  $p < 0.01$ ), sugiriendo que dichas células son responsables de un 75% de la producción de IL-6 inducida por LPS (Figura 56.A). Los ratones con deficiencia de IL-6 en hepatocitos (**IL-6 KO<sub>H</sub>**), sin embargo, no presentaron alteraciones en la elevación de la IL-6 circulante en respuesta a LPS en comparación con sus respectivos controles IL-6 floxeados (**CTRL FL**) (Figura 56.B).

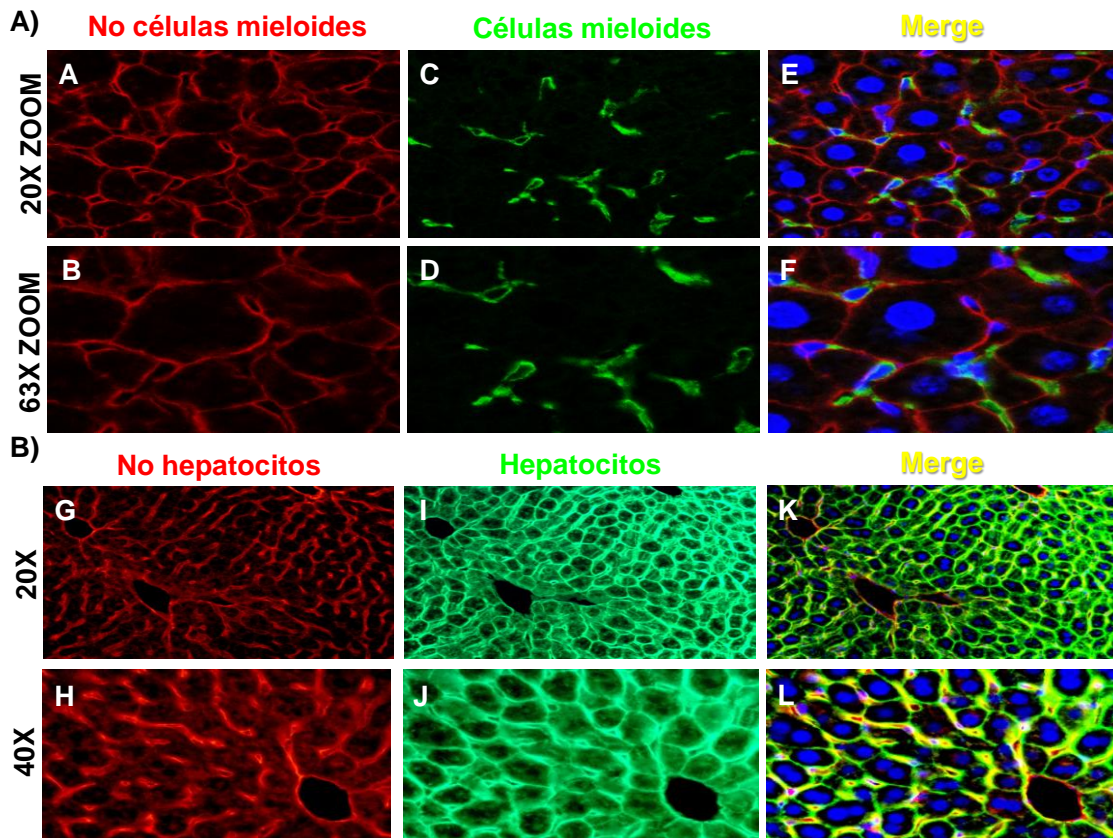


**Figura 56. Concentración plasmática de IL-6 en ratones a los 90 min de la administración de suero salino (VEH) o de LPS.** A. Concentración de IL-6 en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide y sus respectivos controles IL-6 floxeados. B. Concentración de IL-6 en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos y sus respectivos controles IL-6 floxeados. Cada símbolo representa el valor de IL-6 en ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Los ratones fueron inyectados con LPS de *E. coli* cepa 055/Vehículo (100 ng/mL) y sacrificados a los 90 minutos. El grupo vehículo se compuso de una mezcla de ratones de distintos genotipos: A. VEH: IL-6<sup>LOX/LOX</sup> LyMCre<sup>-/-</sup>, IL-6<sup>LOX/WT</sup> LyMCre<sup>+/-</sup> y IL-6<sup>LOX/WT</sup> LyMCre<sup>-/-</sup>; B. VEH: IL-6<sup>LOX/LOX</sup> AlbCre<sup>+/-</sup>, IL-6<sup>LOX/LOX</sup> AlbCre<sup>-/-</sup>, IL-6<sup>LOX/WT</sup> AlbCre<sup>+/-</sup> y IL-6<sup>LOX/WT</sup> AlbCre<sup>-/-</sup>. Excepto en los ratones IL-6 KO<sub>M</sub>, la administración de LPS causó elevaciones estadísticamente significativas de IL-6 circulante en comparación con la administración de suero salino (IL-6 KO<sub>M</sub> CTRL FL,  $p < 0.001$ ; IL-6 KO<sub>H</sub> CTRL FL,  $p < 0.05$ ; IL-6 KO<sub>H</sub>  $p < 0.001$ , ANOVA con test de Tukey post-hoc). \*\* $p < 0.01$ , test U de Mann Whitney. Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; LPS: Lipopolisacárido; CTRL FL: Control floxeado; IL-6 KO<sub>M</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en células de origen mieloide; IL-6 KO<sub>H</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 hepatocitos; VEH: Vehículo.

**2.1.3.- Selectividad y penetrancia de la recombinación inducida por los ratones LysMCre y AlbCre.**

Para definir de forma espacial y temporal la extensión de la recombinación mediada por la Cre recombinasa en los cruces con ratones LysMCre y AlbCre, cruzamos dichos ratones con una cepa de ratones reporteros de dicha actividad Cre-recombinasa (ratones TdEGFP). En las camadas procedentes de los cruces entre estos ratones, las células con actividad Cre-recombinasa expresan EGFP (fluorescencia verde) en su membrana plasmática mientras que el resto expresan fluorescencia roja (proteína Tomato-dye).

Las imágenes evaluadas confirmaron que la recombinación inducida por la Cre recombinasa en las camadas de los ratones LysMCre y AlbCre fue selectiva y efectiva en ambas cepas (Figura 57). Así, en el hígado de los ratones LysMCrexTdEGFP con expresión de la enzima Cre recombinasa bajo el promotor de la lisozima, se observó expresión de EGFP limitada a las células de estirpe mieloide (células de Kupffer) mientras que el resto de células expresaron la proteína roja Tomato-dye (Figura 57 A-F) En el hígado de los ratones ALBCrexTdEGFP (en los que la expresión de la enzima Cre recombinasa está bajo el promotor de la albumina), por el contrario, todos los hepatocitos presentaron expresión de EGFP en su membrana mientras que el resto de células del hígado expresaron la proteína roja Tomato-dye en su membrana plasmática (Figura 57 G-L).



**Figura 57. Expresión de EGFP y Tomato-dye en tejido hepático de ratones procedentes del cruce de ratones reporteros TdEGFP con ratones LysMCre (A-F) o con ratones AlbCre (G-L).** El tejido hepático fue fijado en formalina con gradiente de sucrosa y criopreservado con OCT en isopentano y marcado con DAPI. Las imágenes fueron capturadas con los objetivos 20X ó 63X de un microscopio confocal (A-F) (Leica Microsystems) o los objetivos 20X ó 40X de un microscopio de fluorescencia (G-L) (Nikon Eclipse E800) acoplado a una cámara (Nikon Digital Camera DXM1200F). Se muestran imágenes representativas (n= 3-4 ratones/grupo). Abreviaturas: OCT: Medio de corte óptimo; EGFP: Enhanced Green Fluorescent protein.

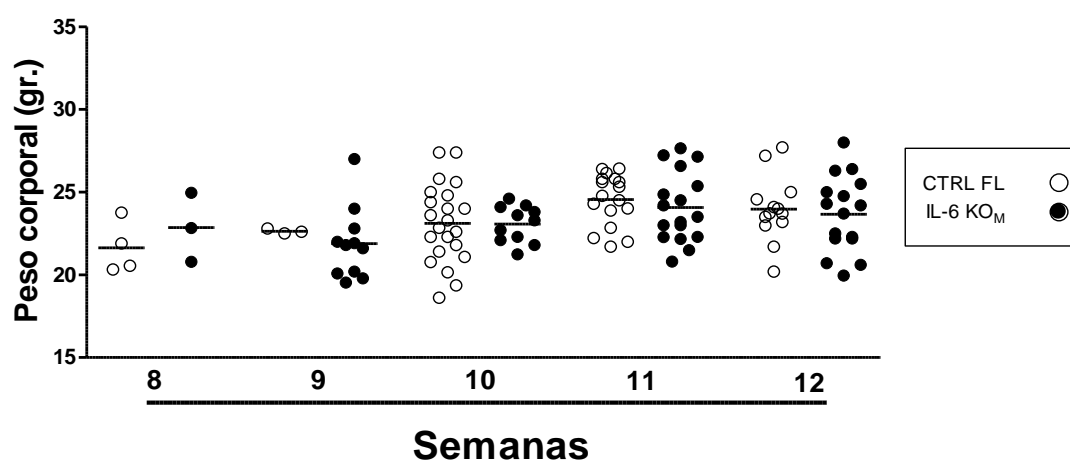
## 2.2.- OBJETIVO 2B. CARACTERIZACIÓN BASAL DE RATONES CON DEFICIENCIA DE IL-6 EN CÉLULAS ESPECÍFICAS (CÉLULAS DE ESTIRPE MIELOIDE / HEPATOCITOS)

### 2.2.1.- Ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide.

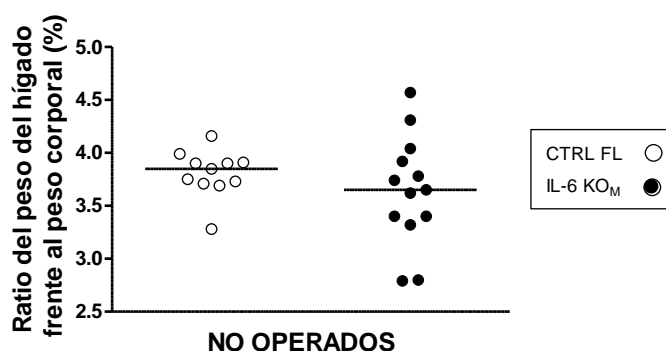
La deficiencia de IL-6 en células de estirpe mieloide no indujo alteraciones evidentes en el peso corporal de los ratones utilizados, ya que el peso corporal en ratones entre las 8 y las 12 semanas de edad

fue similar en los ratones controles IL-6 floxeados (**CTRL FL**) y en los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** (Figura 58).

Para determinar si la deficiencia de IL-6 en células de estirpe mieloide inducía cambios en el peso del hígado en relación al peso corporal, evaluamos el índice hepático en ratones **CTRL FL** y ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** no operados. Ambos grupos de ratones presentaron un índice hepático similar en torno al 4% (Figura 59).

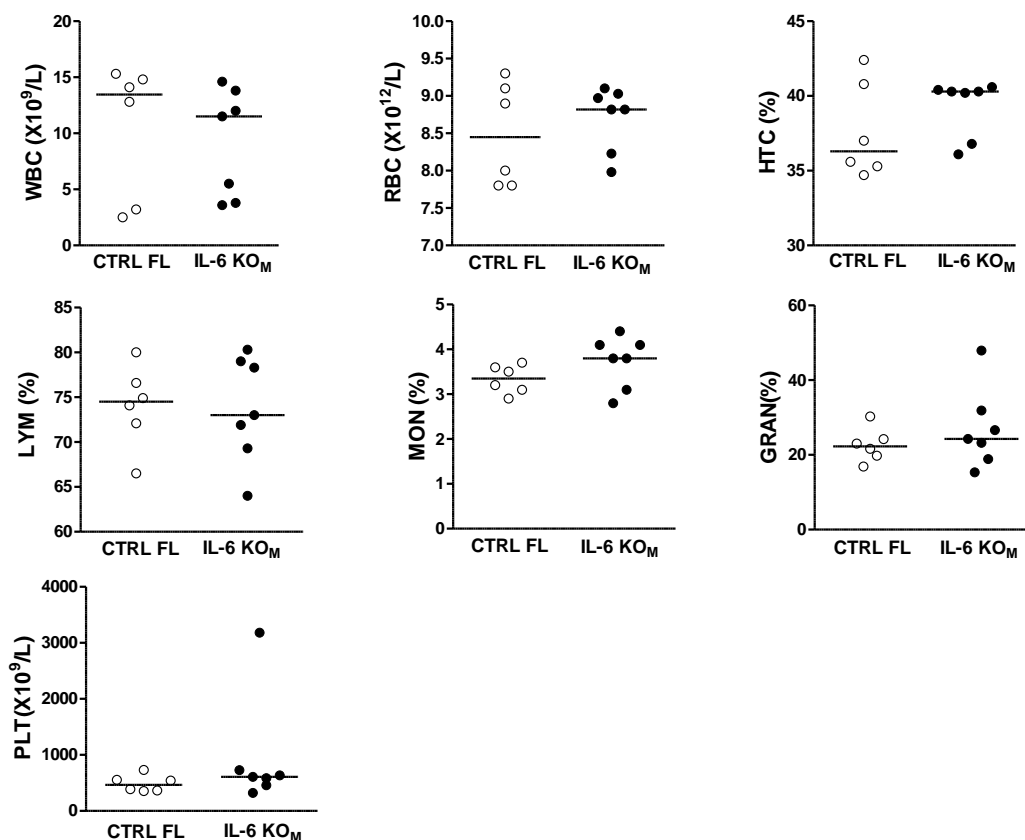


**Figura 58.** Peso corporal en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide (**IL-6 KO<sub>M</sub>**) y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (**CTRL FL**). Cada símbolo representa el valor de ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; CTRL FL: Control floxeado; IL-6 KO<sub>M</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en células de estirpe mieloide.

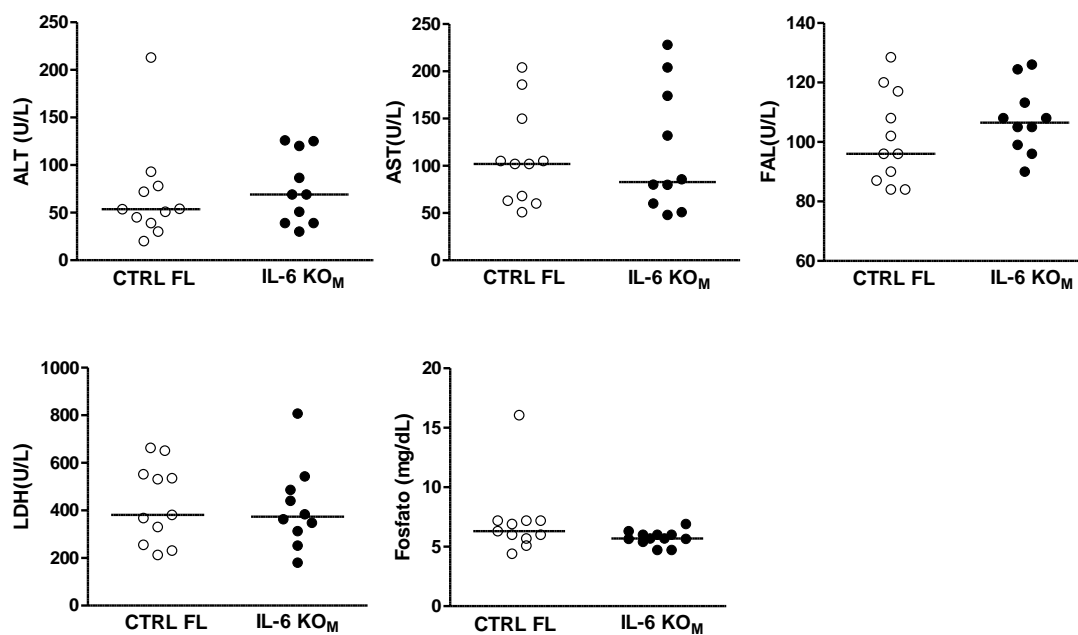


**Figura 59.** Índice hepático en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide (**IL-6 KO<sub>M</sub>**) y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (**CTRL FL**). Cada símbolo representa el valor de ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; CTRL FL: Control floxeado; IL-6 KO<sub>M</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en células de estirpe mieloide.

Los ratones del grupo **CTRL FL** y los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** también presentaron parámetros basales hematológicos (Figura 60) y bioquímicos (Figura 61) similares.



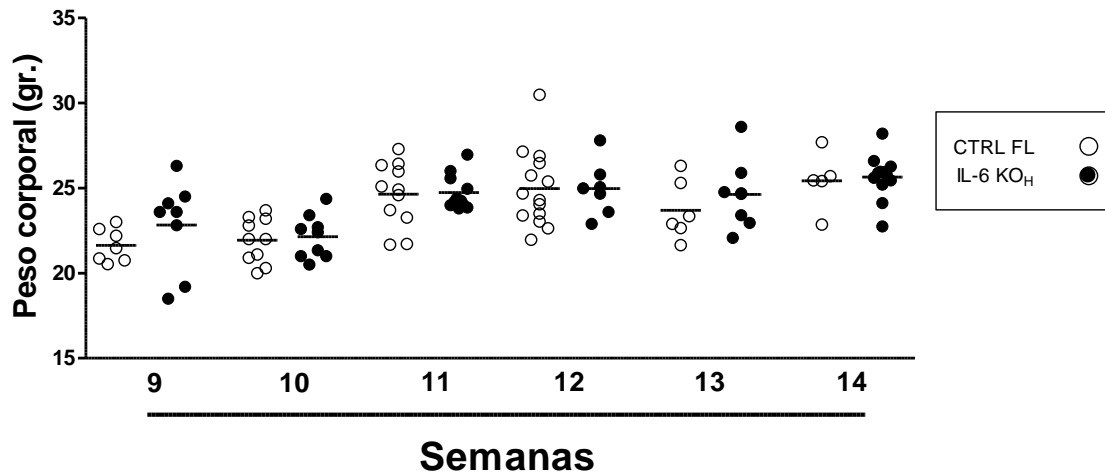
**Figura 60. Parámetros hematológicos en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide (IL-6 KO<sub>M</sub>) y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).** Cada símbolo representa el valor de ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; CTRL FL: Control floxeado; IL-6 KO<sub>M</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en macrófagos; WBC: Recuento de glóbulos blancos; RBC: Recuento de glóbulos rojos; HTC: Hematocrito; LYM%: Porcentaje de linfocitos; MON%: Porcentaje de monocitos; GRAN%: Porcentaje de granulocitos; PLT: Plaquetas.



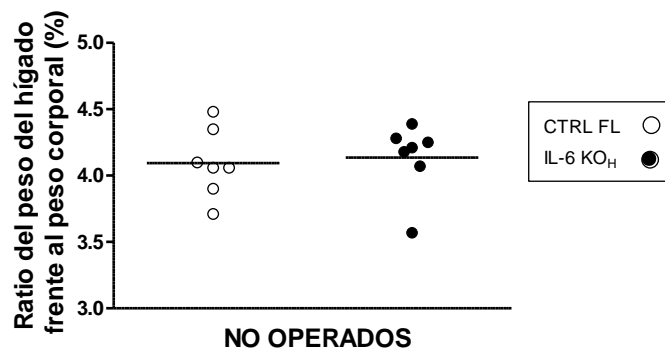
**Figura 61. Parámetros bioquímicos en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide (IL-6 KO<sub>M</sub>) y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).** Cada símbolo representa el valor de ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; CTRL FL: Control floxeado; IL-6 KO<sub>M</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en macrófagos; ALT: Alanina aminotransferasa; AST: Aspartato aminotransferasa; FAL: Fosfatasa alcalina; LDH: Lactato deshidrogenasa.

### 2.2.2.- Ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos

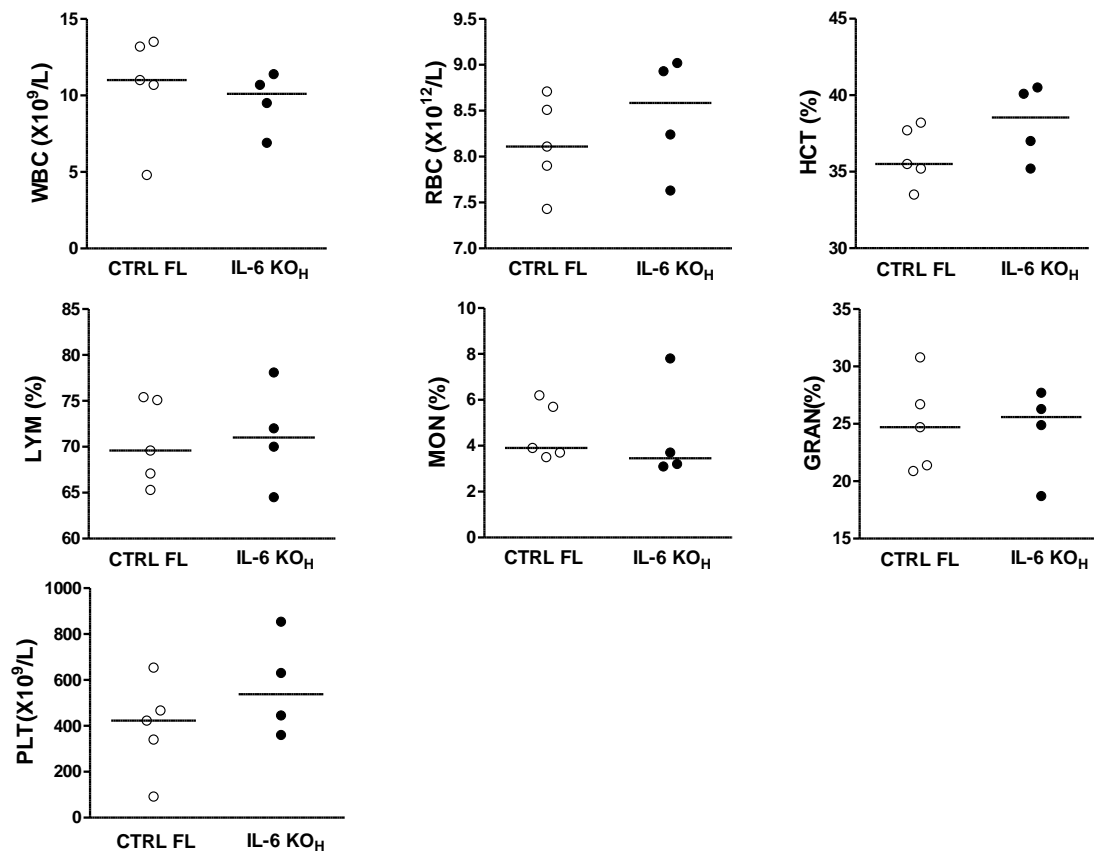
Al igual que la deficiencia de IL-6 en células de estirpe mieloide, la deficiencia de IL-6 en hepatocitos tampoco se asoció a alteraciones evidentes en parámetros fisiológicos generales. Así, los ratones con deficiencia de IL-6 en hepatocitos (**IL-6 KO<sub>H</sub>**) y sus respectivos controles IL-6 floxeados (**CTRL FL**) de 9 a 14 semanas de edad también presentaron valores basales similares de peso corporal (Figura 62), índice hepático (Figura 63), y parámetros sanguíneos hematológicos (Figura 64) y bioquímicos (Figura 65).



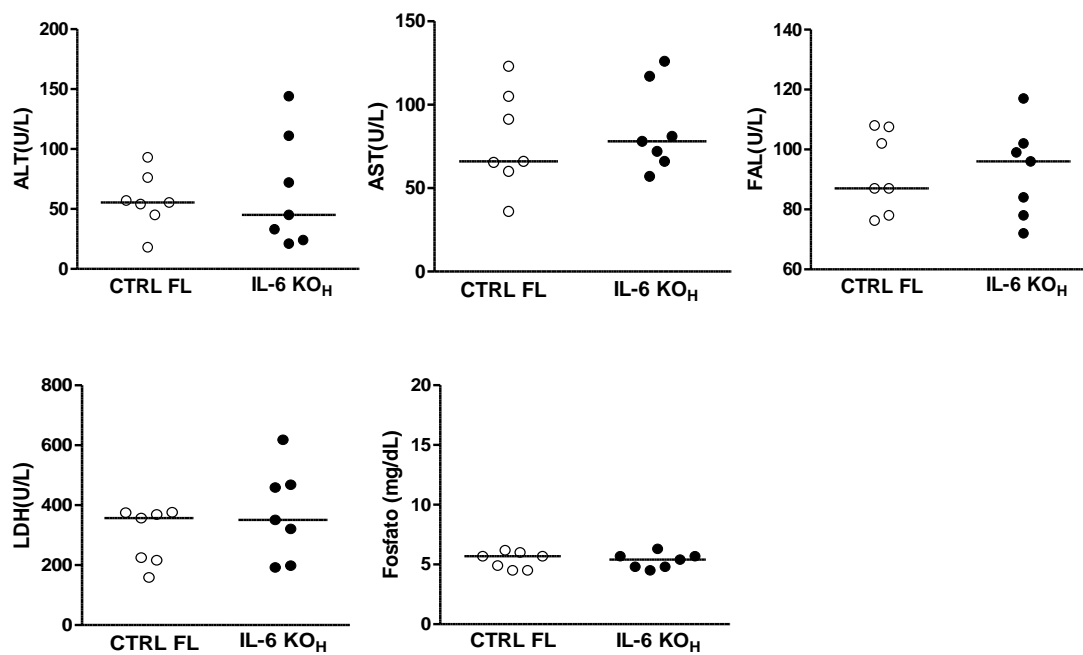
**Figura 62. Peso corporal en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos (IL-6 KO<sub>H</sub>) y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).** Cada símbolo representa el valor de ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; CTRL FL: Control floxeado; IL-6 KO<sub>H</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en hepatocitos.



**Figura 63. Índice hepático en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos (IL-6 KO<sub>H</sub>) y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).** Cada símbolo representa el valor de ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; CTRL FL: Control floxeado; IL-6 KO<sub>H</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en hepatocitos.



**Figura 64. Parámetros hematológicos en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos (IL-6 KO<sub>H</sub>) y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).** Cada símbolo representa el valor de ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; CTRL FL: Control floxeado; IL-6 KO<sub>H</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en hepatocitos; WBC: Recuento de glóbulos blancos; RBC: Recuento de glóbulos rojos; HCT: Hematocrito; LYM%: Porcentaje de linfocitos; MON%: Porcentaje de monocitos; GRAN%: Porcentaje de granulocitos; PLT: Plaquetas.



**Figura 65. Parámetros bioquímicos en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos (IL-6 KO<sub>H</sub>) y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).** Cada símbolo representa el valor de ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; CTRL FL: Control floxeado; IL-6 KO<sub>H</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en hepatocitos; NO OP: no operados; HP: Hepatectomía parcial; ALT: Alanina aminotransferasa; AST: Aspartato aminotransferasa; FAL: Fosfatasa alcalina; LDH: Lactato deshidrogenasa.

### 2.3.- OBJETIVO 2C. CONTRIBUCIÓN DE LAS CÉLULAS DE ESTIRPE MIELOIDE Y DE LOS HEPATOCITOS A LA PRODUCCIÓN DE IL-6 TRAS UNA HP

Una posible explicación a las discrepancias encontradas en los últimos años respecto al papel de IL-6 en la regeneración hepática podría encontrarse en la posible relevancia de la fuente celular de IL-6 para el proceso regenerativo. En este sentido, la producción de IL-6 tras una HP se ha atribuido clásicamente a las células de Kupffer (Aldeguer et al, 2002; Taub 2004; Michalopoulos 2007; Böhm, et al 2010), aunque

otros tipos celulares, como los hepatocitos, también tienen la capacidad de producir IL-6 (Klein et al, 2005; Norris et al, 2014).

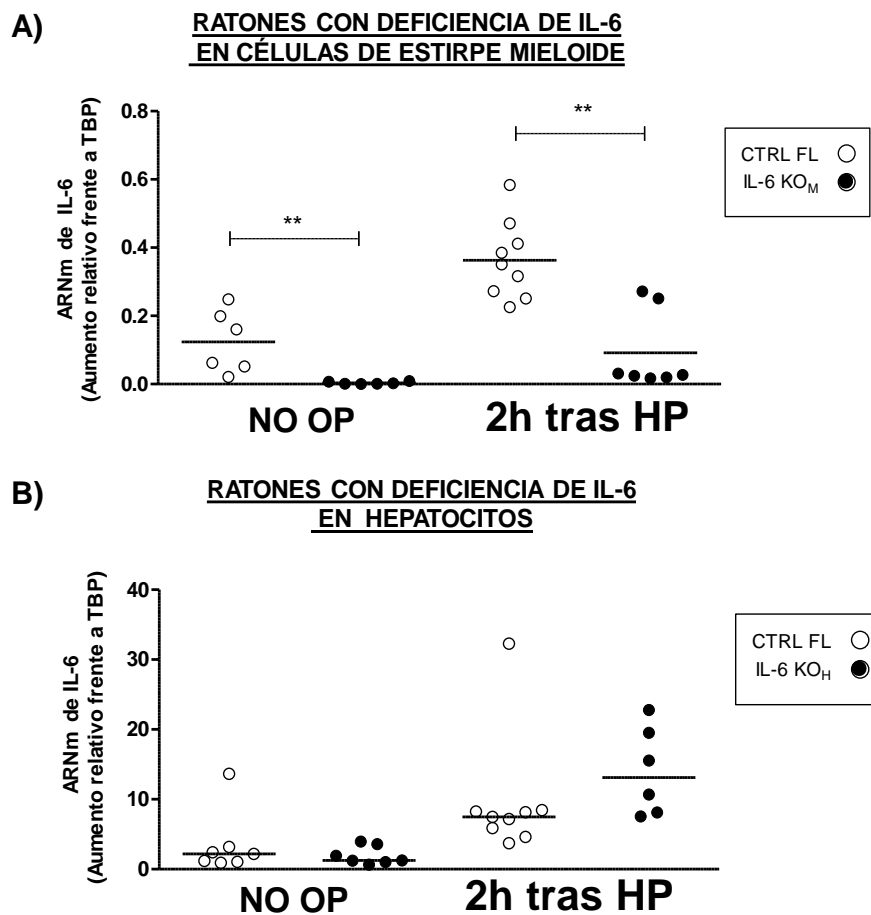
Para evaluar la contribución de las células de Kupffer y de los hepatocitos a la producción de IL-6 tras una HP, utilizamos ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide (**IL-6 KO<sub>M</sub>**) o en hepatocitos (**IL-6 KO<sub>H</sub>**) y sus respectivos controles IL-6 floxeados (**CTRL FL**), y medimos la expresión génica de IL-6 en tejido hepático y los niveles de IL-6 circulantes tras la realización de una HP.

### **2.3.1.- Expresión del ARNm de IL-6 en tejido hepático.**

En este experimento, analizamos la expresión del ARNm de IL-6 en tejido hepático por RT-PCR en ratones **CTRL FL** y en ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** e **IL-6 KO<sub>H</sub>** en las primeras horas tras una HP (Figura 66).

De acuerdo con la noción general de las células de Kupffer como principales responsables de la producción de IL-6 tras una HP, encontramos que los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** presentaron niveles de ARNm de IL-6 en el remanente hepático a las 2 horas de la HP significativamente menores que los encontrados en ratones controles IL-6 floxeados (**CTRL FL**) ( $p < 0.01$ , Figura 66.A). Interesantemente, la expresión basal de ARNm de IL-6 en ratones no operados también fue menor en ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** que en ratones **CTRL FL** ( $p < 0.01$ , Figura 66.A). Como consecuencia, la HP resultó en una inducción de la expresión del ARNm de IL-6 en ambos grupos de ratones respecto a sus niveles basales antes de la cirugía ( $p < 0.001$ , Figura 66.A).

En el caso de los ratones **IL-6 KO<sub>H</sub>**, la deficiencia de IL-6 en hepatocitos no atenuó la inducción del ARNm de IL-6 en el remanente hepático tras la HP; al contrario, los ratones **IL-6 KO<sub>H</sub>** tendieron a presentar una mayor elevación del ARNm de IL-6 que los ratones **CTRL FL** a las dos horas de la HP (Figura 66.B). Ambas cepas de ratones presentaron elevaciones del ARNm de IL-6 en tejido hepático tras la cirugía con respecto a los niveles encontrados en ratones no operados (IL-6 KO<sub>H</sub> no-op vs CTRL FL 2h HP,  $p < 0.05$ ; IL-6 KO<sub>H</sub> no-op vs IL-6 KO<sub>H</sub> 2h HP,  $p < 0.01$ ; Figura 66.B).



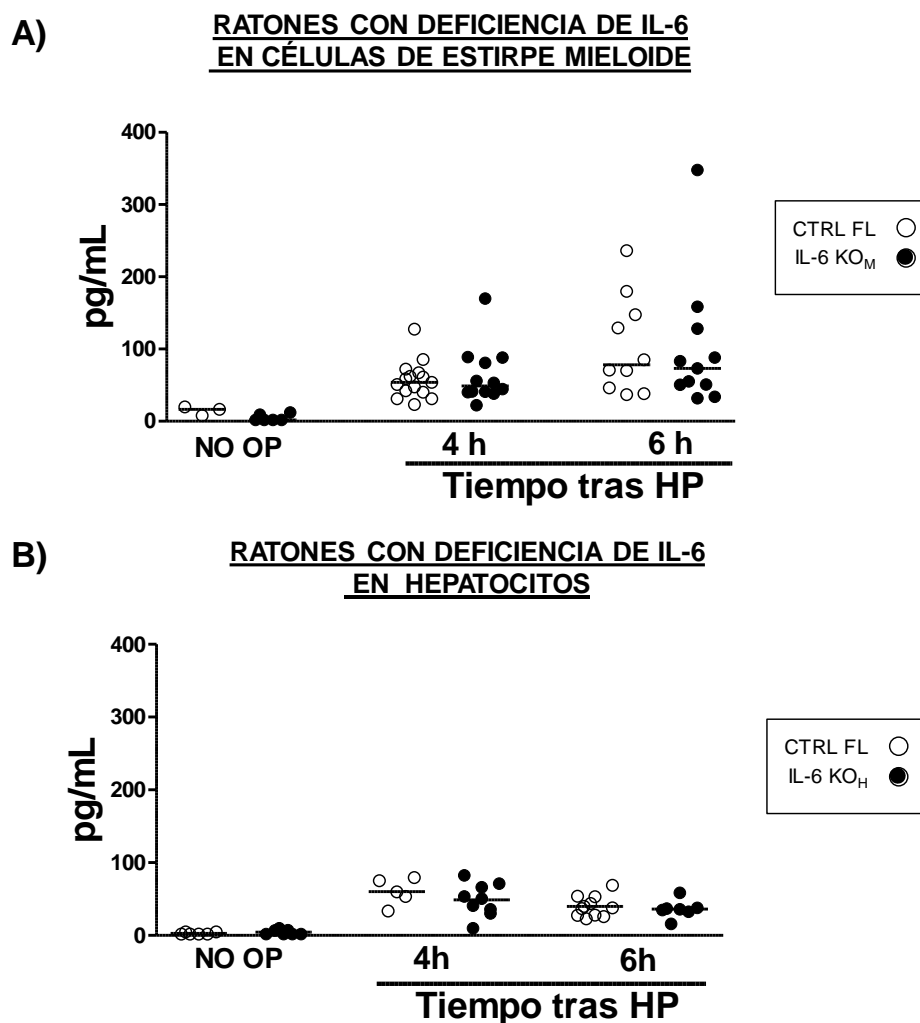
**Figura 66. Expresión del ARNm de IL-6 en tejido hepático de ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide (IL-6 KO<sub>M</sub>) o en hepatocitos (IL-6 KO<sub>H</sub>) y en sus respectivos ratones controles IL-6 floxeados (CTRL FL) no operados (NO OP) y a las 2 h tras una HP. Cada símbolo representa el valor en ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. A. Ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide (células de Kupffer). Los ratones CTRL FL e IL-6 KO<sub>M</sub> que fueron sometidos a una HP presentaron un aumento significativo de la expresión del ARNm de IL-6, en comparación con los ratones del mismo grupo NO OP ( $p < 0.001$ , ANOVA con test de Tukey post-hoc). B. Ratones con**

deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos. Los ratones IL-6 KO<sub>H</sub> que fueron sometidos a una HP presentaron un aumento significativo de la expresión del ARNm de IL-6 en comparación con los ratones NO OP (IL-6 KO<sub>H</sub> no op vs CTRL FL 2h HP,  $p < 0.05$ ; IL-6 KO<sub>H</sub> no op vs IL-6 KO<sub>H</sub> 2h HP,  $p < 0.01$ , ANOVA con test de Tukey post-hoc). \*\* $p < 0.01$ , test U de Mann Whitney. Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; CTRL FL: Control floxeado; HP: Hepatectomía parcial; IL-6 KO<sub>M</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en células de origen mieloide; IL-6 KO<sub>H</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en hepatocitos; NO OP: no operados.

### **2.3.2.- Producción de IL-6 circulante tras una HP**

El aumento de IL-6 en sangre en las primeras horas tras la resección del parénquima hepático es un fenómeno consistente y reproducible. Para evaluar la contribución de las células de Kupffer y de los hepatocitos al aumento de IL-6 circulante, medimos la concentración de IL-6 en plasma a las 4 y a las 6 horas tras una HP en ratones **CTRL FL** y en ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** e **IL-6 KO<sub>H</sub>**.

Ni la deficiencia de IL-6 en células de estirpe mieloide ni la deficiencia de IL-6 en hepatocitos atenuaron la elevación de la IL-6 circulante tras una HP. Así, los ratones del grupo **CTRL FL** presentaron un aumento de IL-6 circulante similar a los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** a las 4 y 6 horas tras una HP (Figura 67.A). El aumento de IL-6 circulante tras la HP también fue similar en los ratones **IL-6 KO<sub>H</sub>** y en sus correspondientes controles IL-6 floxeados (**CTRL FL**) (Figura 67.B).



**Figura 67. Concentración de IL-6 en plasma en ratones con A) deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide (IL-6 KO<sub>M</sub>) o B) en hepatocitos (IL-6 KO<sub>H</sub>), y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL) no operados (NO OP) y a las 4 y 6 horas tras una HP. Cada símbolo representa el valor en ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; HP: Hepatectomía parcial; CTRL FL: Control floxeado; IL-6 KO<sub>M</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en células de origen mieloide; IL-6 KO<sub>H</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en hepatocitos; NO OP: no operados.**

## **2.4.- OBJETIVO 2D. IMPACTO DE LA DEFICIENCIA DE IL-6 EN CÉLULAS DE ESTIRPE MIELOIDE O EN HEPATOCITOS SOBRE LA SEÑALIZACIÓN DE IL-6 EN EL HÍGADO TRAS UNA HP**

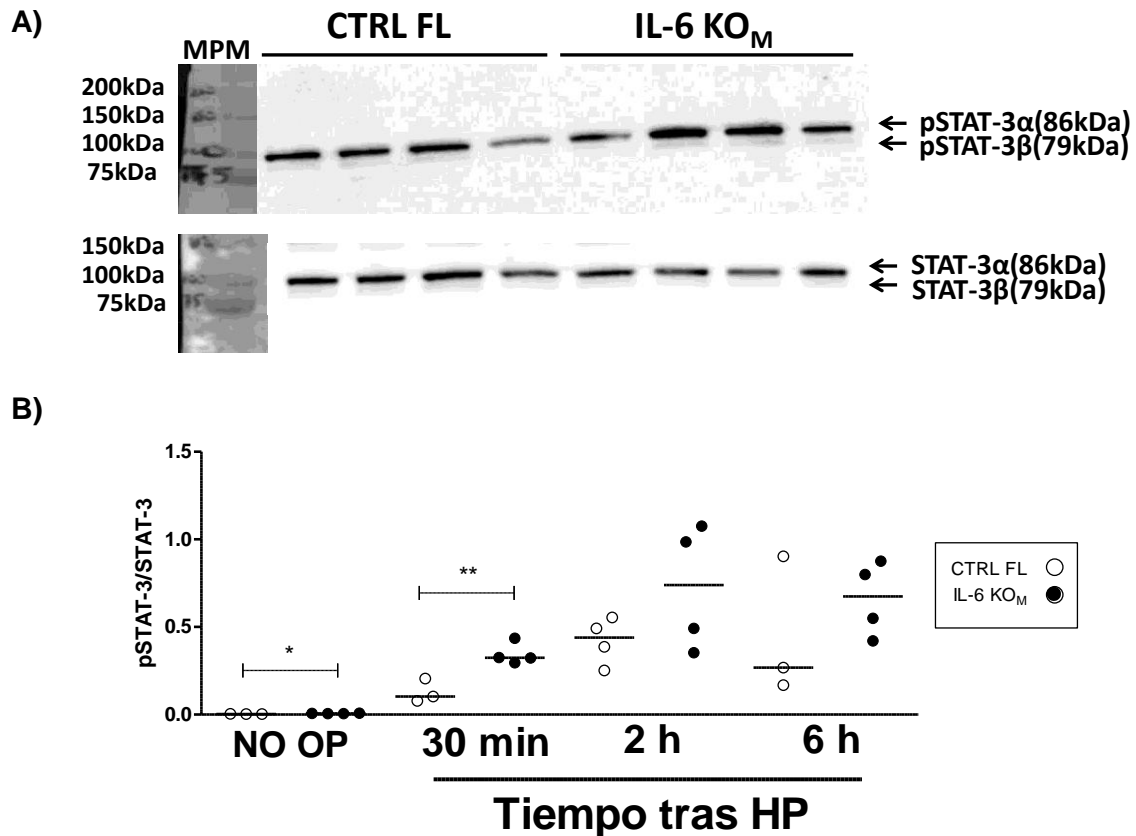
La existencia de alteraciones en los ratones con deficiencia de IL-6 en células de estirpe mieloide respecto a la expresión del ARNm de IL-6 en tejido hepático tras la HP junto con la ausencia de alteraciones

encontrada en los niveles de IL-6 circulante, abrieron la posibilidad de explorar efectos en la señalización por IL-6 en el hígado específicamente derivados de la IL-6 originada en las células de Kupffer. En Biología, la localización y la compartimentación de enzimas y mediadores es de gran importancia para determinar su función (Shaul 2002).

#### **2.4.1.- Ratonos con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide.**

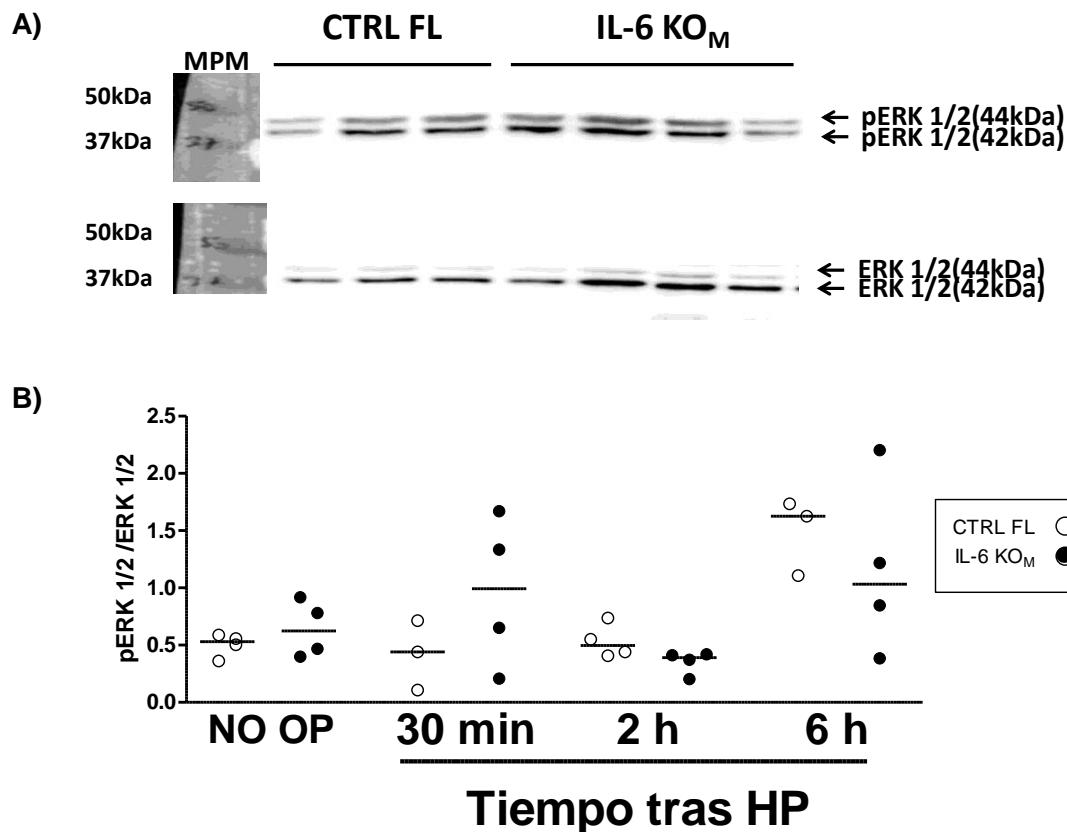
En estos experimentos, evaluamos diversos parámetros de la vía de señalización de la IL-6 en el hígado no operado o en tiempos tempranos tras una HP (30 min, 2h y 6 h) en ratones **CTRL FL** y ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>**.

En primer lugar, evaluamos la activación de STAT-3 mediante el ratio pSTAT-3/STAT-3 total en Western blot de extractos de proteínas totales del tejido hepático (Figura 68.A). La deficiencia de IL-6 en los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** resultó en una mayor activación de STAT-3 en el hígado no operado ( $p < 0.05$ ) y a los 30 min tras una HP ( $p < 0.01$ ) en comparación con los ratones **CTRL FL**. (Figura 68.B). En ambos grupos de ratones (**CTRL FL** e **IL-6 KO<sub>M</sub>**), el ratio pSTAT-3/STAT-3 aumentó a las 2 h y a las 6 h tras la **HP** en comparación con los ratones no operados ( $p < 0.01$ , Figura 68.B).



**Figura 68. Efecto de la deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide sobre la activación de STAT-3 en tejido hepático tras una HP.** A. Imágenes representativas del western blot de pSTAT-3 y STAT-3 en extractos de proteínas totales de tejido hepático de ratones CTRL FL y ratones IL-6 KO<sub>M</sub> a las 2 horas tras una HP. B. Análisis de densitometría de la expresión en tejido hepático de pSTAT-3 y STAT-3 de ratones CTRL FL e IL-6 KO<sub>M</sub> tras una HP. Cada símbolo representa el valor en ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Los ratones CTRL FL e IL-6 KO<sub>M</sub> presentaron un aumento de la activación de pSTAT-3 a las 2 h y 6 h tras la HP en comparación con los ratones IL-6 KO<sub>M</sub> NO OP ( $p < 0.01$ , ANOVA con test de Tukey post-hoc). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , test t de Student. Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; STAT-3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3; kDa: KiloDalton; CTRL FL: Control floxeado; IL-6 KO<sub>M</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en células de origen mieloide; HP: Hepatectomía parcial; NO OP: no operados; MPM: Marcador de peso molecular.

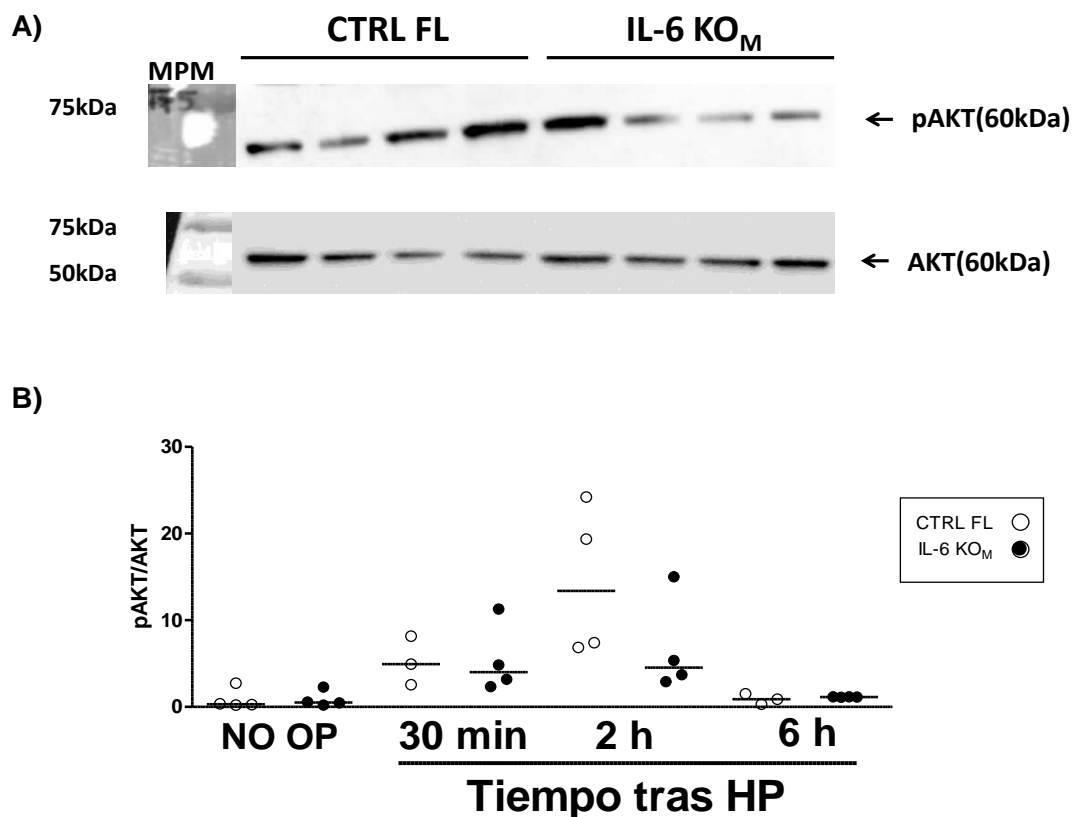
En segundo lugar, evaluamos la activación de la proteína quinasa ERK 1/2, mediante el ratio de pERK1/2 / ERK1/2 total en extractos de proteínas de tejido hepático (Figura 69.A). La deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide no afectó la fosforilación de ERK1/2 en ninguno de los tiempos evaluados tras la cirugía (Figura 69.B). Tampoco se detectaron diferencias entre ratones **CTRL FL** o **IL-6 KO<sub>M</sub>** sometidos a una **HP** y ratones no operados de los mismos grupos (Figura 69.B).



**Figura 69. Efecto de la deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide sobre la activación de ERK1/2 en tejido hepático tras una HP.** A. Imágenes representativas del western blot de pERK 1/2 y ERK 1/2, en muestras de extractos de proteínas totales de tejido hepático de ratones CTRL FL y ratones IL-6 KO<sub>M</sub> a las 6 horas tras una HP. B. Análisis de densitometría de la expresión de pERK1/2 y ERK1/2 de ratones CTRL FL e IL-6 KO<sub>M</sub> tras una HP. Cada símbolo representa el valor de ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; ERK: Quinasas reguladas por señales extracelulares; kDa: KiloDalton; CTRL FL: Control floxeado; IL-6 KO<sub>M</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en células de origen mieloide; HP: Hepatectomía parcial; NO OP: no operados; MPM: Marcador de peso molecular.

En tercer lugar, evaluamos el efecto de la deficiencia de IL-6 en células de estirpe mieloide sobre la activación de AKT, evaluada mediante el ratio pAKT/AKT total, en extractos de proteínas del hígado de ratones **CTRL FL** e **IL-6 KO<sub>M</sub>** no operados o sometidos a una HP (Figura 70.A). Los ratones **CTRL FL** presentaron un aumento del ratio pAKT/AKT a las 2 horas tras la **HP** respecto a los niveles encontrados en ratones no operados de los mismos grupos ( $p < 0.01$ , Figura 70.B). La deficiencia de IL-6 en células de estirpe mieloide no tuvo efectos

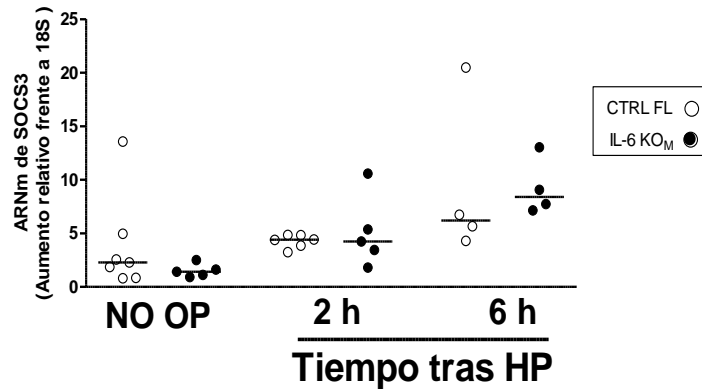
evidentes sobre la activación de AKT en ninguno de los tiempos evaluados tras la HP (Figura 70.B).



**Figura 70. Efecto de la deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide sobre la activación de AKT en tejido hepático tras una HP.** A. Imágenes representativas del western blot de pAKT y AKT, en muestras de extractos de proteínas totales de tejido hepático de ratones CTRL FL y ratones IL-6 KO<sub>M</sub>, a las 2 horas tras una HP. B. Análisis de densitometría de la expresión de pAKT y AKT en el hígado de ratones CTRL FL y de ratones IL-6 KO<sub>M</sub> tras una HP. Cada símbolo representa el valor de ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Los ratones CTRL FL presentaron un aumento de la activación de pAKT a las 2 horas tras la HP en comparación con los ratones del mismo grupo NO OP ( $p < 0.05$ , ANOVA con test de Tukey post-hoc). Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; AKT: Proteína quinasa B; kDa: KiloDalton; CTRL FL: Control floxeado; IL-6 KO<sub>M</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en células de origen mieloide; HP: Hepatectomía parcial; NO OP: no operados; MPM: Marcador de peso molecular.

En cuarto lugar, evaluamos la inducción del ARNm de SOCS-3, uno de los reguladores negativos de la señalización de IL-6 que es inducido por la propia IL-6 tras una HP. La deficiencia de IL-6 en células de estirpe mieloide (ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>**) no alteró los niveles de expresión del ARNm de SOCS-3 en tejido hepático en comparación con los ratones controles IL-6 floxeados (**CTRL FL**) ni en el hígado no

operado ni en ninguno de los tiempos evaluados tras la realización de una HP (Figura 71).



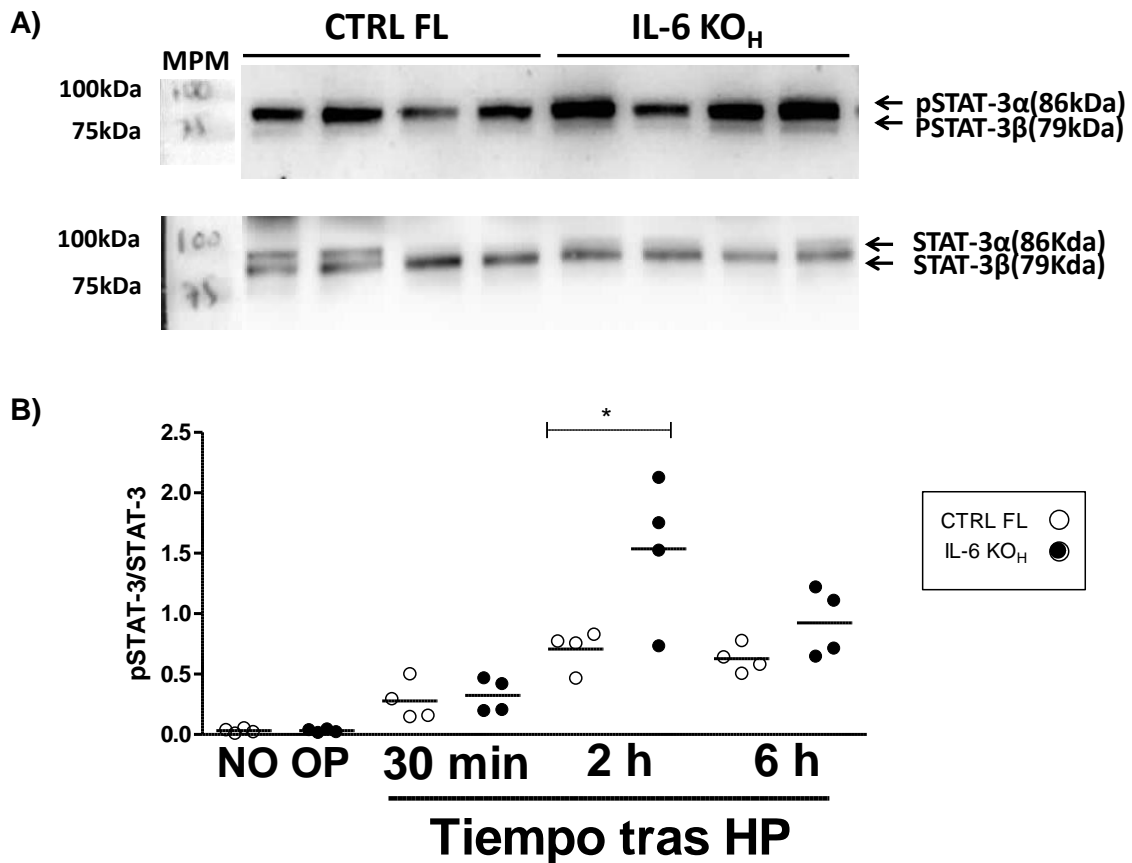
**Figura 71. Expresión del ARNm de SOCS-3 en tejido hepático de ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide tras una HP.** Cada símbolo representa el valor en ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Abreviaturas: SOCS-3: Supresor de la señalización por citocinas 3; IL-6: Interleucina-6; CTRL FL: Control floxeado; HP: Hepatectomía parcial; IL-6 KO<sub>M</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en células de origen mieloide.

#### 2.4.2.- Ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos

Para descartar un potencial efecto de la IL-6 generada en hepatocitos sobre las vías de señalización de esta citocina en el hígado tras una HP, evaluamos en los ratones con deficiencia de IL-6 en hepatocitos (**IL-6 KO<sub>H</sub>**) y en sus correspondientes controles IL-6 floxeados (**CTRL FL**) los mismos parámetros de señalización de la IL-6 analizados en los ratones con deficiencia de IL-6 en células de estirpe mieloide en el apartado anterior.

Respecto al ratio pSTAT-3/STAT-3 (Figura 72.A), los ratones **IL-6 KO<sub>H</sub>** presentaron una mayor activación de STAT-3 en tejido hepático que los ratones **CTRL FL** a las 2 horas de la realización de una HP ( $p < 0.01$ , Figura 72.B). La activación de STAT-3 también fue superior en el hígado de ratones **CTRL FL** y en ratones **IL-6 KO<sub>H</sub>** a las 2 h y a las 6 h tras una **HP** en comparación con el hígado de ratones no operados de

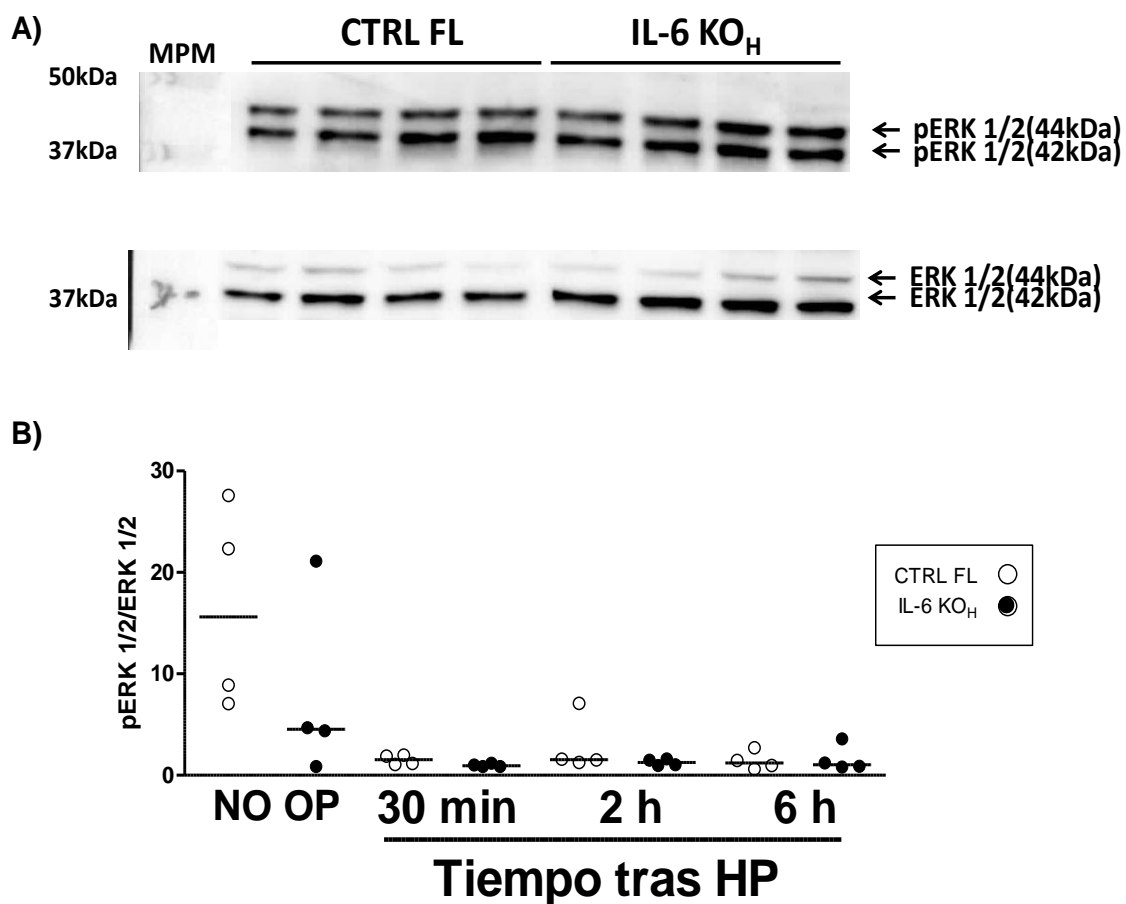
ambos grupos (CTRL FL no-op vs. CTRL FL 2h HP,  $p < 0.05$ ; CTRL FL no-op vs. CTRL FL 6h HP,  $p < 0.05$ ; IL-6 KO<sub>H</sub> no-op vs IL-6 KO<sub>H</sub> 2h HP e IL-6 KO<sub>H</sub> 6h HP,  $p < 0.001$ ; Figura 72.B).



**Figura 72. Efecto de la deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos sobre la activación de STAT-3 en tejido hepático tras una HP.** A. Imágenes representativas del western blot de pSTAT-3 y STAT-3, en muestras de extractos de proteínas totales de tejido hepático de ratones CTRL FL e IL-6 KO<sub>H</sub>, a las 2 horas tras una HP. B. Análisis de densitometría de la expresión de pSTAT-3 y STAT-3 en el hígado de ratones CTRL FL e IL-6 KO<sub>H</sub> tras una HP. Cada símbolo representa el valor de ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Los ratones CTRL FL e IL-6 KO<sub>H</sub> que fueron sometidos a una HP y sacrificados a las 2 h y 6 h presentaron un incremento significativo de la síntesis de pSTAT-3 en comparación con los ratones NO OP (CTRL FL e IL-6 KO<sub>H</sub>) (CTRL FL no op vs. CTRL FL 2h HP,  $p < 0,05$ ; CTRL FL no op vs. CTRL FL 6h HP,  $p < 0,05$ ; IL-6 KO<sub>H</sub> no op vs IL-6 KO<sub>H</sub> 2h HP, IL-6 KO<sub>H</sub> no op vs IL-6 KO<sub>H</sub> 6h HP  $p < 0,001$ ; ANOVA con test de Tukey post-hoc). \* $p < 0,05$ , test t de Student. Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; STAT-3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3; kDa: KiloDalton; CTRL FL: Control floxeado; IL-6 KO<sub>H</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en hepatocitos; HP: Hepatectomía parcial; NO OP: no operados; MPM: Marcador de peso molecular.

Respecto al ratio pERK1/2 / ERK1/2 en tejido hepático (Figura 73.A), no encontramos diferencias significativas entre los ratones **CTRL FL** y los ratones **IL-6 KO<sub>H</sub>** en ninguno de los tiempos evaluados tras

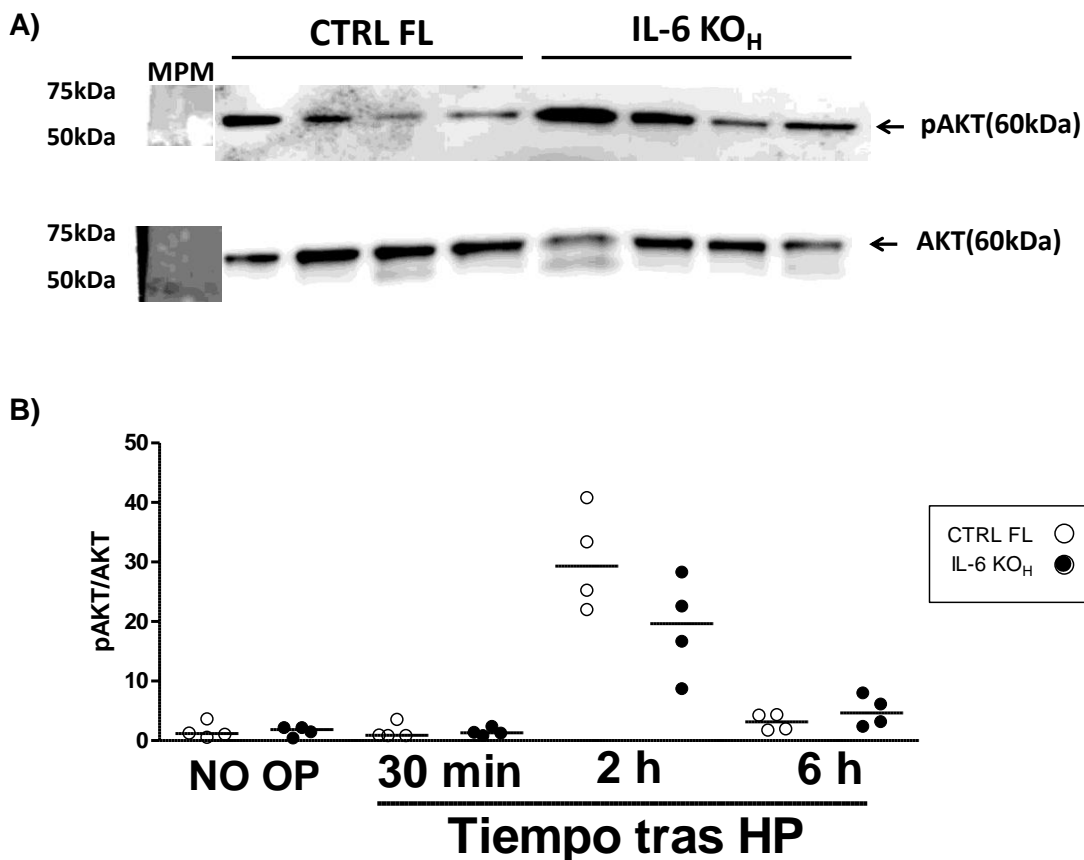
una HP (Figura 73.B). Sin embargo, el ratio  $pERK1/2 / ERK1/2$  descendió en el hígado de ratones **CTRL FL** a los 30 min, 2 h y 6 h tras la HP en comparación con el hígado de ratones **CTRL FL** no operados (CTRL FL no-op vs. CTRL FL 30min HP,  $p < 0.01$ ; CTRL FL no-op vs. CTRL FL 2h HP,  $p < 0.05$ ; CTRL FL no-op vs. CTRL FL 6h HP,  $p < 0.01$ , Figura 73.B). Una tendencia similar fue observada en los ratones **IL-6 KO<sub>H</sub>**, aunque no fue estadísticamente significativa.



**Figura 73. Efecto de la deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos sobre la activación de ERK1/2 en tejido hepático tras una HP.** A. Imágenes representativas del western blot de pERK 1/2 y ERK 1/2, en muestras de extractos de proteínas totales de tejido hepático de ratones CTRL FL e IL-6 KO<sub>H</sub> a los 30 minutos tras una HP. B. Análisis de densitometría de la expresión de pERK1/2 y ERK1/2 en el hígado de ratones CTRL FL e IL-6 KO<sub>H</sub> tras una HP. Cada símbolo representa el valor de ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. El hígado de los ratones CTRL FL que fueron sometidos a una HP presentaron un descenso significativo del ratio  $pERK1/2 / ERK1/2$  a los 30 min, 2 h y 6 h tras la cirugía en comparación con el hígado de ratones CTRL FL no operados (CTRL FL no-op vs. CTRL FL 30min HP,  $p < 0.01$ ; CTRL FL no-op vs. CTRL FL 2h HP,  $p < 0.05$ ; CTRL FL no-op vs. CTRL FL 6h HP,  $p < 0.01$ , ANOVA con test de Tukey post-hoc). Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; ERK: Quinasas

reguladas por señales extracelulares; kDa: KiloDalton; CTRL FL: Control floxeado; IL-6 KO<sub>H</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en hepatocitos; HP: Hepatectomía parcial; NO OP: no operados; MPM: Marcador de peso molecular.

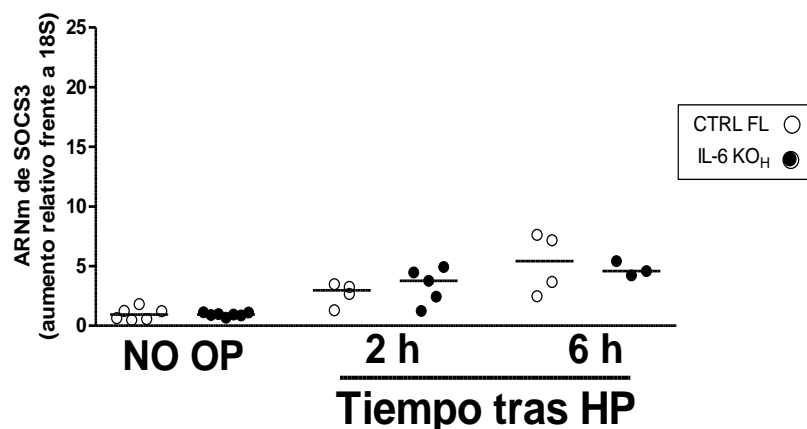
Respecto al ratio pAKT/AKT (Figura 74.A), la deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos no afectó a la activación de AKT en ninguno de los tiempos evaluados tras una HP (Figura 74.B). La realización de una HP, sin embargo, indujo una activación significativa de AKT en hígado a las 2 horas de la cirugía tanto en ratones **CTRL FL** y en ratones **IL-6 KO<sub>H</sub>** en comparación con el hígado de ratones no operados de los mismos grupos ( $p < 0.001$ , Figura 74.B).



**Figura 74. Efecto de la deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos sobre la activación de AKT en tejido hepático tras una HP.** A. Imágenes representativas del western blot de pAKT y AKT, en extractos de proteínas totales de tejido hepático de ratones CTRL FL y de ratones IL-6 KO<sub>H</sub> a las 6 horas tras una HP. B. Análisis de densitometría de la expresión de pAKT y AKT en hígado de ratones CTRL FL e IL-6 KO<sub>H</sub> tras una HP. Cada símbolo representa el valor de ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. En ratones CTRL FL e IL-6 KO<sub>H</sub>, la síntesis de pAKT fue significativamente mayor a las 2 horas tras una HP en comparación con los ratones del mismo grupo NO OP ( $p < 0.001$  ANOVA con test de Tukey post-hoc). Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; AKT: Proteína quinasa B; HP: Hepatectomía parcial; kDa: KiloDalton; CTRL

FL: Control floxeado; IL-6 KO<sub>H</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en hepatocitos; NO OP: no operados; MPM: Marcador de peso molecular.

Por último, la deficiencia de IL-6 en hepatocitos no influyó en la expresión del ARNm de SOCS-3 en tejido hepático tras la HP, esto es, la expresión del ARNm de SOCS-3 fue similar en el hígado de ratones **CTRL FL** e **IL-6 KO<sub>H</sub>** tras una HP en todos los tiempos evaluados (Figura 75). Sin embargo, observamos una inducción de la expresión del ARNm de SOCS-3 en el hígado de los ratones **CTRL FL** a las 6 h tras una HP en comparación con sus controles no operados (CTRL FL no-op vs. CTRL FL 6h HP,  $p < 0.001$ ), y en el hígado de los ratones **IL-6 KO<sub>H</sub>** a las 2 h y 6 h tras la HP en comparación con sus respectivos controles no operados (IL-6 KO<sub>H</sub> no-op vs IL-6 KO<sub>H</sub> 2h HP,  $p < 0.05$ ; IL-6 KO<sub>H</sub> no-op vs IL-6 KO<sub>H</sub> 6h HP  $p < 0.01$ ; Figura 75).



**Figura 75. Expresión del ARNm de SOCS-3 en tejido hepático de ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos tras una HP.** Cada símbolo representa el valor en ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. El hígado de los ratones CTRL FL presentó un aumento de la expresión del ARNm de SOCS-3 a las 6 h de una HP en comparación con el hígado de ratones no operados (CTRL FL no-op vs. CTRL FL 6h HP,  $p < 0.001$ , ANOVA con test de Tukey post-hoc). El hígado de ratones IL-6 KO<sub>H</sub> presentó un aumento de la expresión del ARNm de SOCS-3 a las 2 h y 6 h tras una HP en comparación con el hígado de ratones no operados (IL-6 KO<sub>H</sub> no-op vs IL-6 KO<sub>H</sub> 2h HP,  $p < 0.05$ ; IL-6 KO<sub>H</sub> no-op vs IL-6 KO<sub>H</sub> 6h HP  $p < 0.01$ , ANOVA con test de Tukey post-hoc). Abreviaturas: SOCS-3: Supresor de la señalización por citocinas 3; IL-6: Interleucina-6; CTRL FL: Control floxeado; HP: Hepatectomía parcial; IL-6 KO<sub>H</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en hepatocitos; NO OP: no operados.

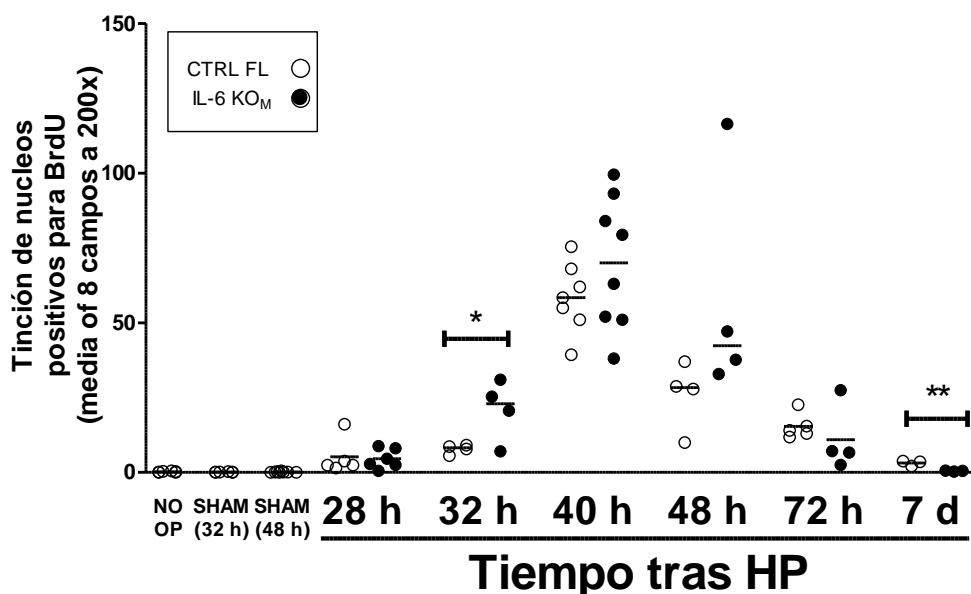
## **2.5.- OBJETIVO 2E. IMPACTO DE LA DEFICIENCIA DE IL-6 EN CÉLULAS DE ESTIRPE MIELOIDE O EN HEPATOCITOS SOBRE EL DESARROLLO DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA TRAS UNA HP**

En estos experimentos, evaluamos si las ligeras alteraciones observadas en las vías de señalización de la IL-6 en el hígado en las primeras horas tras la realización de una HP en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide o en hepatocitos se traducían en un desarrollo alterado de la proliferación de los hepatocitos y de la recuperación de masa hepática.

### **2.5.1.- Ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide.**

En primer lugar, comparamos la síntesis de ADN (fase S) en hepatocitos del hígado de ratones **CRTL FL** y de ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** antes y a diversos tiempos tras la realización de una HP, mediante inmunohistoquímica de BrdU en secciones de tejido hepático. La síntesis de ADN en hepatocitos comenzó en ambos grupos de ratones a las 28 horas tras la HP y el pico de síntesis de ADN se produjo a las 40 horas en ambos grupos de ratones ( $p < 0.001$  40 h vs. Sham y No-op, Figura 76). Los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** tendieron a presentar un mayor número de hepatocitos en fase S que los ratones **CRTL FL** a lo largo de las primeras 48 horas tras la HP, siendo la diferencia estadísticamente significativa a las 32 horas ( $p < 0.05$ ). La deficiencia de IL-6 en células de estirpe mieloide también pareció resultar en una terminación más

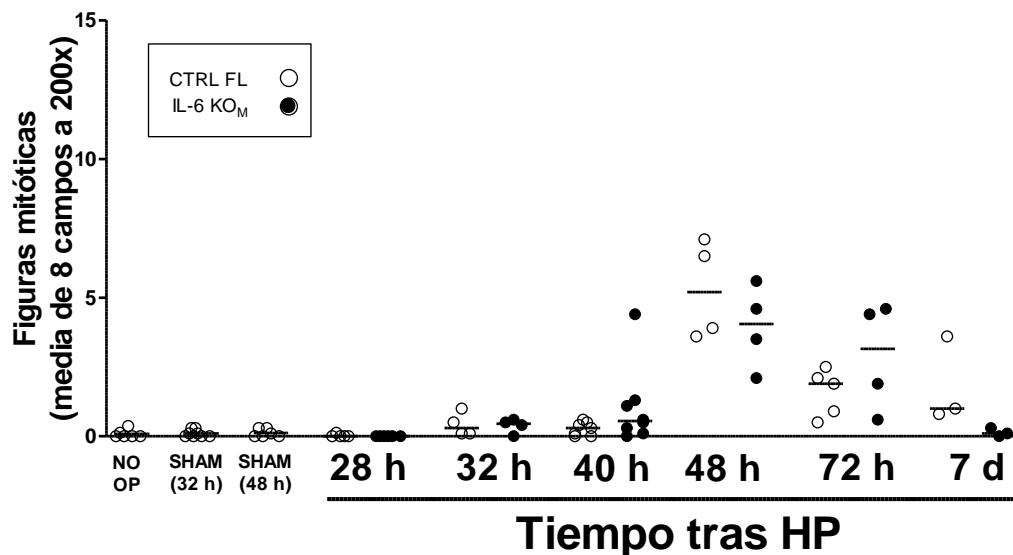
temprana de la fase de síntesis de ADN en hepatocitos, siendo el número de hepatocitos en fase S menor en los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** que en los ratones **CRTL FL** a los 7 días tras la HP ( $p < 0.01$ ).



**Figura 76. Síntesis de ADN en hepatocitos tras una HP en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide (IL-6 KO<sub>M</sub>) y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).** La síntesis de ADN en hepatocitos se midió mediante inmunohistoquímica de BrdU en secciones de tejido hepático. Como controles, se usaron ratones no operados (NO OP) o ratones con laparotomía simple sin resección hepática (SHAM) sacrificados a las 32 horas y las 48 horas de la cirugía. El grupo SHAM estuvo compuesto de una mezcla de ratones de distintos genotipos (IL-6<sup>LOX/LOX</sup> LyMCre<sup>-/-</sup>, IL-6<sup>LOX/WT</sup> LyMCre<sup>+/-</sup> y IL-6<sup>LOX/WT</sup> LyMCre<sup>-/-</sup>). Cada símbolo representa el valor en ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Los ratones CTRL FL e IL-6 KO<sub>M</sub> que fueron sometidos a una HP presentaron un aumento de la proliferación de los hepatocitos a las 40 horas en comparación con los ratones de los mismos grupos NO OP o SHAM ( $p < 0.001$ , ANOVA con test de Tukey post-hoc). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , test t de Student. Abreviaturas: ADN: Ácido dextrirribonucleico; HP: Hepatectomía parcial; IL-6: Interleucina-6; CTRL FL: Control floxeado; BrdU: Bromodesoxiuridina; NO OP: no operados; SHAM: Laparatomía control; IL-6 KO<sub>M</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en células de estirpe mieloide.

En segundo lugar, realizamos un recuento del número de hepatocitos que presentaban figuras mitóticas en secciones de tejido hepático teñidas con H&E (Assy N, Minuk GY, 1997; Jia 2011). La deficiencia selectiva de IL-6 en células de Kupffer no afectó al número de mitosis en hepatocitos tras una HP, siendo el número de mitosis en hepatocitos similar en los ratones **CRTL FL** y en los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** en todos los tiempos evaluados tras la HP (Figura 77). Ambos grupos de

ratones (**CTRL FL** e **IL-6 KO<sub>M</sub>**) presentaron el pico de hepatocitos en mitosis a las 48 horas tras la HP ( $p < 0.001$  vs. ratones No-op y SHAM, Figura 77).

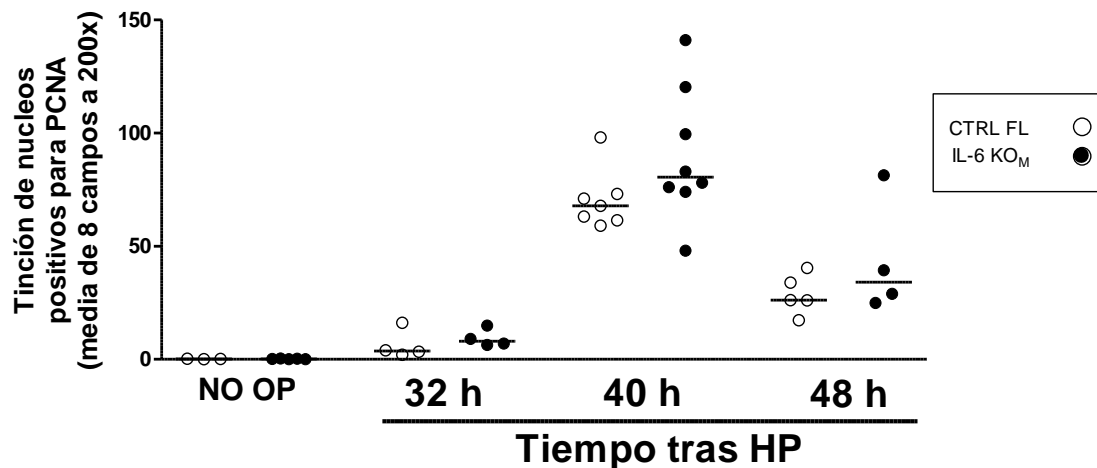


**Figura 77. Recuento de hepatocitos con figuras mitóticas tras una HP en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).** Cada símbolo representa los valores individuales de cada ratón y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Las mitosis en hepatocitos se contaron en secciones de tejido hepático teñidas con H&E. Como controles, se usaron ratones no operados (NO OP) o ratones con laparotomía simple sin resección de masa hepática (SHAM) sacrificados a las 32 horas y 48 horas tras la cirugía. El grupo SHAM estuvo compuesto de una mezcla de ratones de distintos genotipos ( $IL-6^{LOX/LOX}$  LyMCre<sup>-/-</sup>,  $IL-6^{LOX/WT}$  LyMCre<sup>+/-</sup> y  $IL-6^{LOX/WT}$  LyMCre<sup>-/-</sup>). Los ratones CTRL FL e IL-6 KO<sub>M</sub> que fueron sometidos a una HP presentaron un aumento del número de mitosis en hepatocitos a las 48 horas en comparación con los ratones de los mismos grupos NO OP o SHAM ( $p < 0.001$ , ANOVA con test de Tukey post-hoc). Abreviaturas: HP: Hepatectomía parcial; IL-6: Interleucina-6; CTRL FL: Control floxeado; H&E: Hematoxilina y eosina; NO OP: no operados; SHAM: Laparotomía control; IL-6 KO<sub>M</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en células de origen mieloide.

En tercer lugar, evaluamos la expresión de proteínas que reflejan las fases del ciclo celular mediante inmunohistoquímica (PCNA, Figura 78) y mediante Western blot de extractos de proteínas totales de tejido hepático (Ciclina D1, Figura 79.A).

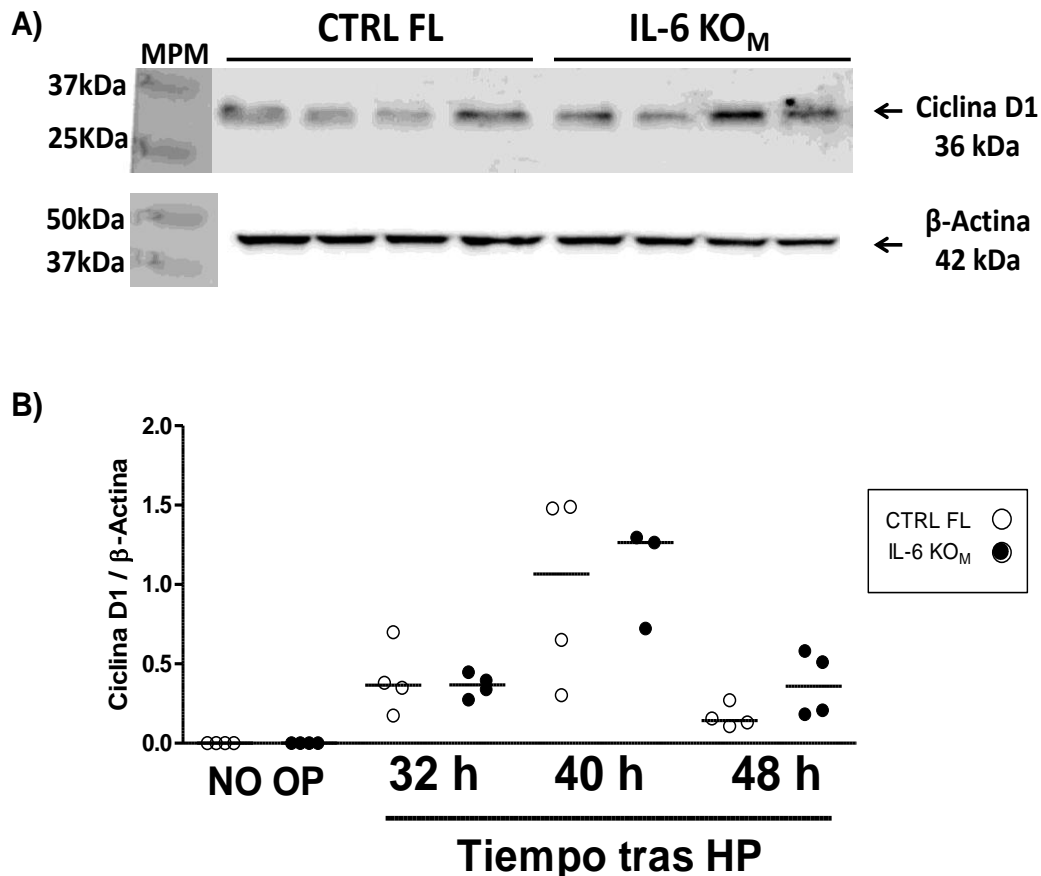
Tanto los ratones **CTRL FL** como los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** presentaron un aumento en el número de hepatocitos con expresión de PCNA a las 40 horas tras la HP respecto a sus respectivos controles no operados ( $p < 0.001$ , Figura 78). Aunque los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** tendieron

a presentar un mayor número de hepatocitos PCNA positivos que los ratones **CTRL FL** tras la HP, no existieron diferencias significativas entre ambos grupos en ninguno de los tiempos evaluados (Figura 79).



**Figura 78. Número de hepatocitos con expresión de PCNA en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide y en sus respectivos ratones controles IL-6 floxeados (CTRL FL).** La proliferación de hepatocitos se midió mediante inmunohistoquímica de PCNA en secciones de tejido hepático. Cada símbolo representa el valor en ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Los ratones que fueron sometidos a una HP presentaron un aumento de la proliferación de los hepatocitos a las 40 horas en comparación con los ratones no operados (CTRL FL e IL-6 KO<sub>M</sub>) ( $p < 0.001$ , ANOVA con test de Tukey post-hoc). Abreviaturas: HP: Hepatectomía parcial; PCNA: Antígeno nuclear de células en proliferación; IL-6: Interleucina-6; CTRL FL: Control floxeado; IL-6 KO<sub>M</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en células de origen mieloide; NO OP: no operados.

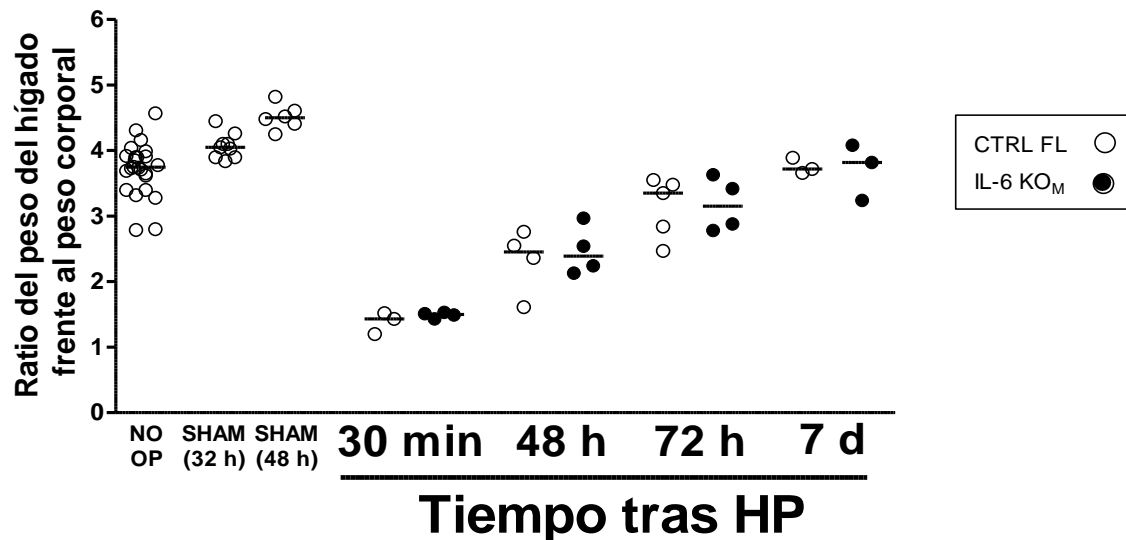
De manera similar, la expresión de ciclina D1 en tejido hepático aumentó a las 40 horas tras la realización de una HP tanto en los ratones **CTRL FL** como en los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** respecto a sus correspondientes ratones controles no operados ( $p < 0.001$ , Figura 79.B). Sin embargo, la expresión de ciclina D1 en tejido hepático fue similar en los ratones **CTRL FL** y en los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** en todos los tiempos evaluados (Figura 79.B).



**Figura 79. Efecto de la deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide sobre la expresión de ciclina D1 en tejido hepático tras una HP.** A. Imágenes representativas del western blot de ciclina D1 y de  $\beta$ -actina (control de carga) en extractos de proteínas totales de tejido hepático de ratones CTRL FL e IL-6 KO<sub>M</sub> a las 48 tras una HP. B. Análisis de densitometría de los western blots de ciclina D1 corregidos por el control de carga en tejido hepático de ratones CTRL FL e IL-6 KO<sub>M</sub> a distintos tiempos tras una HP. Cada símbolo representa el valor en ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Los ratones CTRL FL e IL-6 KO<sub>M</sub> que fueron sometidos a una HP y sacrificados a las 40 horas presentaron un aumento de la síntesis de ciclina D1 en comparación con los ratones de ambos grupos no operados ( $p < 0.001$ , ANOVA con test de Tukey post-hoc). Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; HP: Hepatectomía parcial; kDa: KiloDalton; CTRL FL: Control floxeado; IL-6 KO<sub>M</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en células de Kupffer; NO OP: no operados; MPM: Marcador de peso molecular.

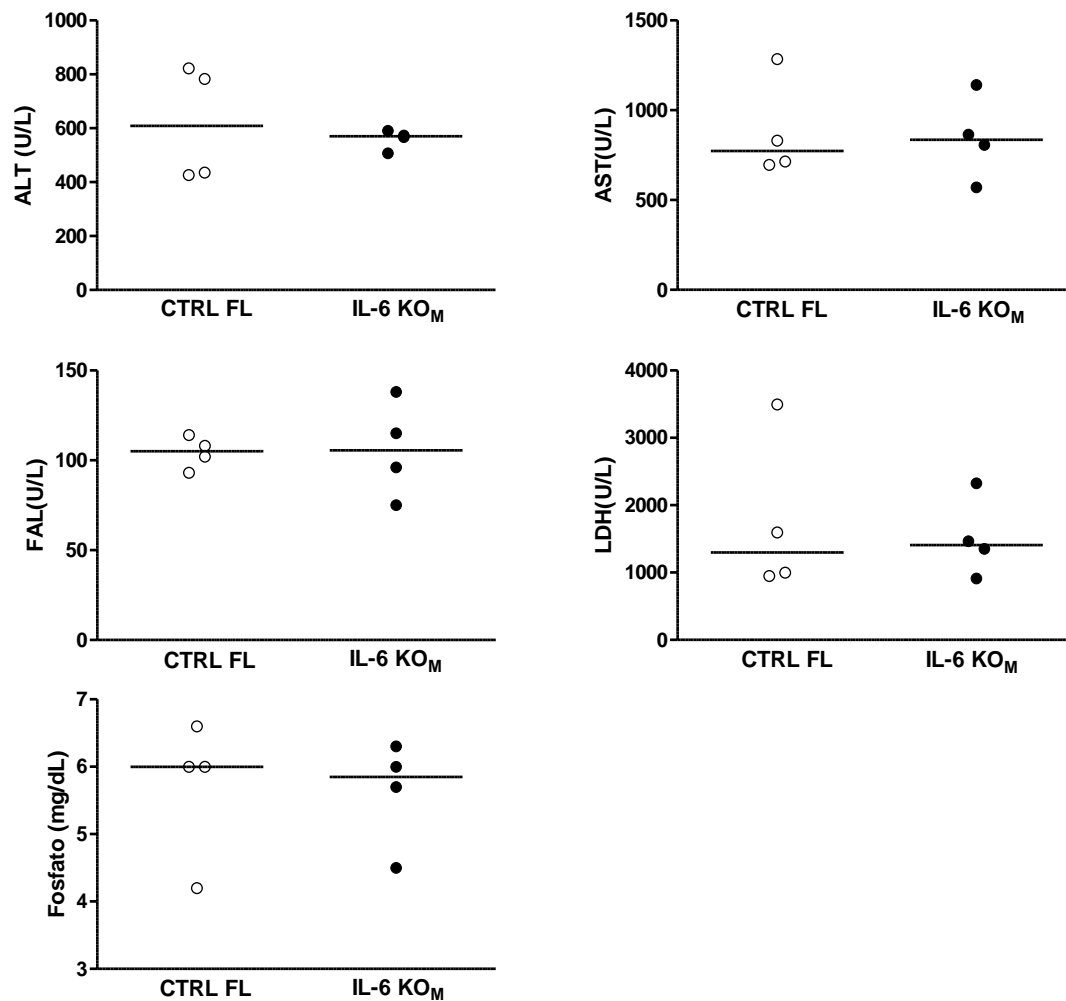
En cuarto lugar, evaluamos la recuperación de masa hepática mediante la medida del índice hepático (peso del hígado/peso corporal). En los ratones no operados (NO OP) y en los ratones SHAM de los distintos genotipos estudiados (IL-6<sup>LOX/LOX</sup> LyMCre<sup>-/-</sup>, IL-6<sup>LOX/WT</sup> LyMCre<sup>+/-</sup> y IL-6<sup>LOX/WT</sup> LyMCre<sup>-/-</sup>), la masa hepática representó aproximadamente un 4% del peso corporal total. Tras la HP, el índice hepático (medido a los 30 min tras la cirugía) disminuyó hasta

aproximadamente un 1.5% en todos los grupos. La recuperación de masa hepática tras la HP fue similar en los ratones **CRTL FL** y en los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>**, recuperando todos ellos la masa hepática inicial a los 7 días tras la cirugía (Figura 80).



**Figura 80. Evolución del índice hepático (ratio peso del hígado frente al peso corporal) tras una HP en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide y en sus correspondientes controles IL-6 floxeados (CTRL FL).** Cada símbolo representa el valor en ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Como controles, se usaron ratones no operados (NO OP) y ratones con cirugía SHAM sacrificados a las 32 h y 48 h tras la cirugía. El grupo SHAM estuvo compuesto de una mezcla de ratones de distintos genotipos (IL-6<sup>LOX/LOX</sup> LyMCre<sup>-/-</sup>, IL-6<sup>LOX/WT</sup> LyMCre<sup>+/-</sup> y IL-6<sup>LOX/WT</sup> LyMCre<sup>-/-</sup>). Abreviaturas: HP: Hepatectomía parcial; IL-6: Interleucina-6; CTRL FL: Control floxeado; NO OP: no operados; SHAM: Laparatomía control; IL-6 KO<sub>M</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en células de origen mieloide.

Finalmente, evaluamos parámetros bioquímicos de daño hepático, dado que estudios previos han descrito un posible papel hepatoprotector de la IL-6 independiente de sus efectos sobre la proliferación celular. Tanto los ratones **CRTL FL** como los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>**, sin embargo, presentaron concentraciones similares de ALT, AST, LDH, FAL y fosfato en plasma tras la realización de una HP (Figura 81).

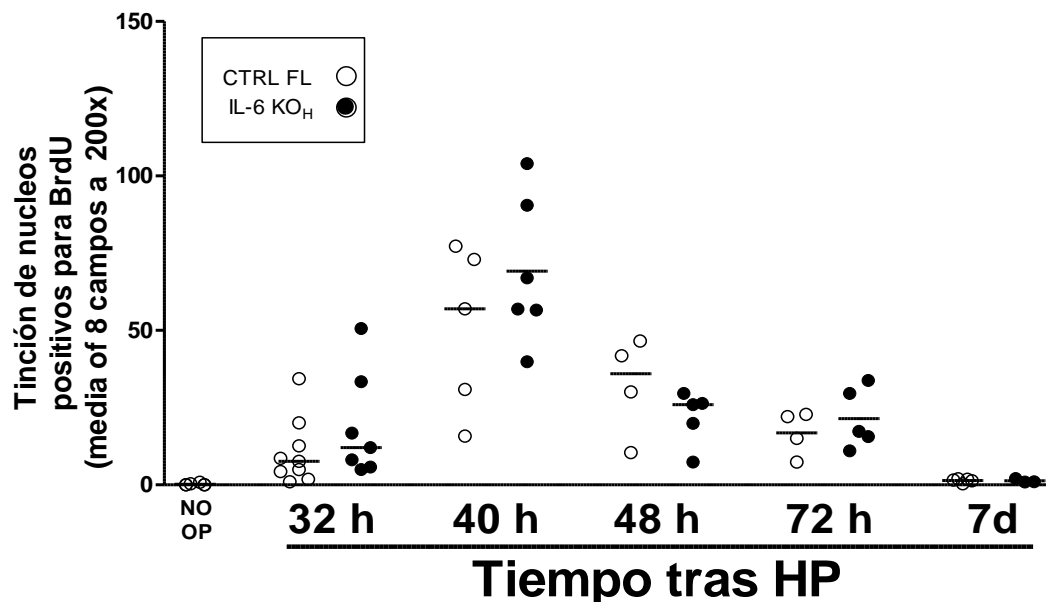


**Figura 81. Parámetros bioquímicos en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide y en sus correspondientes ratones controles IL-6 floxeados (CTRL FL) tras una HP.** Cada símbolo representa el valor en ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; CTRL FL: Control floxeado; IL-6 KO<sub>M</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 células de origen mieloide; ALT: Alanina aminotransferasa; AST: Aspartato aminotransferasa; FAL: Fosfatasa alcalina; LDH: Lactato deshidrogenasa.

### 2.5.2.- Ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos

Para evaluar el efecto de la deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos sobre la regeneración hepática, analizamos parámetros de proliferación de hepatocitos y la recuperación de la masa hepática en ratones **IL-6 KO<sub>H</sub>** y en sus correspondientes ratones controles IL-6 floxeados (**CTRL FL**) no operados o sometidos a una HP.

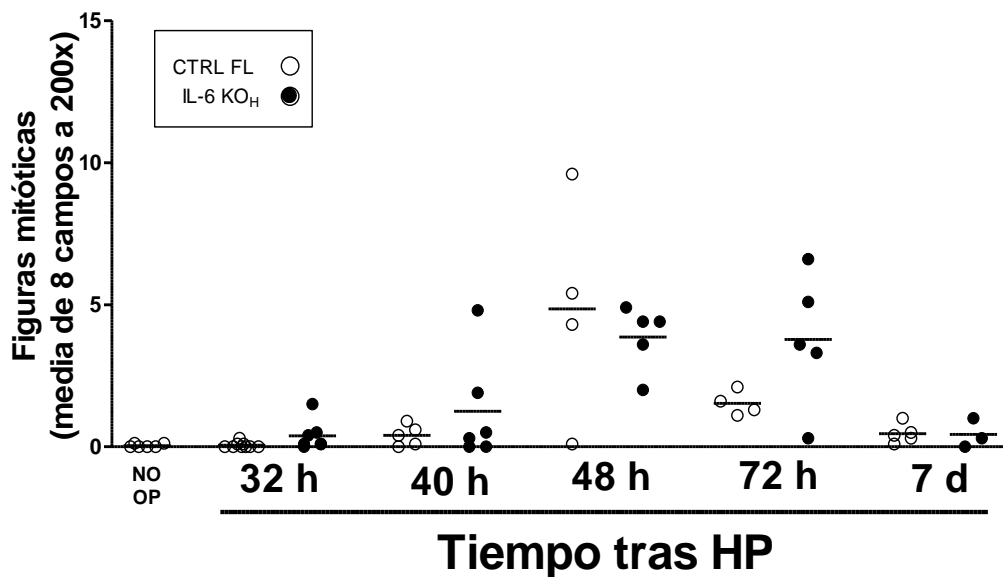
Tanto los ratones **CTRL FL** como los ratones **IL-6 KO<sub>H</sub>** presentaron un pico de hepatocitos en fase de síntesis de ADN a las 40 horas tras una HP en comparación con los ratones no operados de ambos grupos ( $p < 0.001$ , Figura 82). Sin embargo, la deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos no afectó a la síntesis de ADN, siendo el número de hepatocitos en fase S similar en ratones **CTRL FL** y ratones **IL-6 KO<sub>H</sub>** en todos los tiempos evaluados tras la HP (Figura 82).



**Figura 82. Síntesis de ADN en hepatocitos tras una HP en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).** La síntesis de ADN en hepatocitos se midió mediante inmunohistoquímica de BrdU en secciones de tejido hepático. Cada símbolo representa el valor en ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Los ratones no operados estuvieron compuestos por una mezcla de ratones CTRL FL e IL-6 KO<sub>H</sub>. Los ratones CTRL FL e IL-6 KO<sub>H</sub> que fueron sometidos a una HP presentaron un aumento de la proliferación de hepatocitos a las 40 horas en comparación con los ratones no operados de los mismos grupos ( $p < 0.001$ , ANOVA con test de Tukey post-hoc). Abreviaturas: ADN: Ácido dexosirribonucleico; HP: Hepatectomía parcial; IL-6: Interleucina-6; CTRL FL: Control floxeado; BrdU: Bromodesoxiuridina; IL-6 KO<sub>H</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en hepatocitos; NO OP: no operados.

Tanto los ratones **CTRL FL** como los ratones **IL-6 KO<sub>H</sub>** presentaron el pico del número de hepatocitos con mitosis a las 48 horas tras una HP en comparación con los ratones no operados de

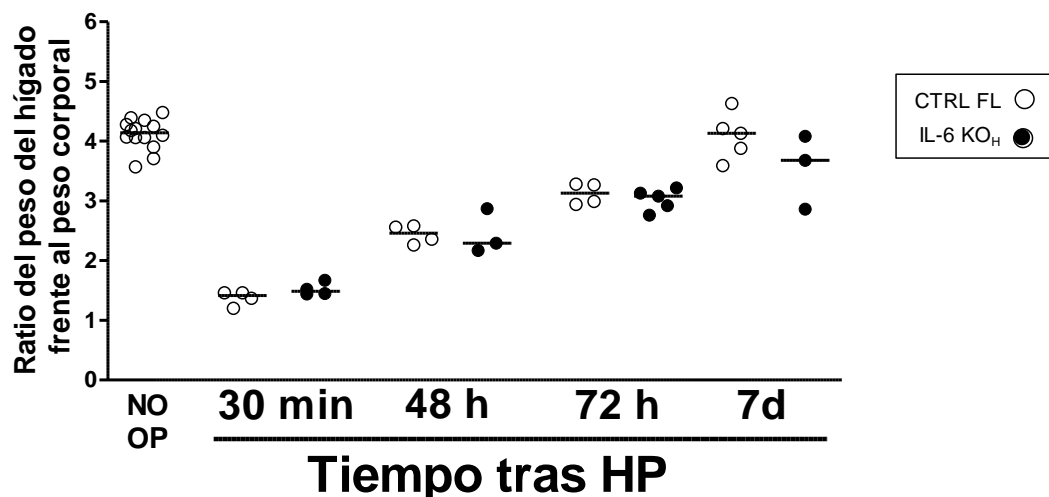
ambos grupos (NO OP vs. CTRL FL 48h HP,  $p < 0.001$ ; NO OP vs. IL-6 KO<sub>H</sub> 48h HP,  $p < 0.01$ , Figura 83). La deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos no afectó al número de mitosis en hepatocitos, siendo similar en los ratones **CTRL FL** y en los ratones **IL-6 KO<sub>H</sub>** en todos los tiempos evaluados tras la HP (Figura 83).



**Figura 83. Recuento de hepatocitos con figuras mitóticas tras una HP en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).** Las mitosis en hepatocitos se contaron en secciones de tejido hepático teñidas con H&E. Cada símbolo representa el valor en ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Los ratones no operados (NO OP) estuvieron compuestos por una mezcla de ratones CTRL FL e IL-6 KO<sub>H</sub>. Los ratones CTRL FL e IL-6 KO<sub>H</sub> que fueron sometidos a una HP presentaron un aumento del número de mitosis en hepatocitos a las 48 horas de la cirugía en comparación con los ratones no operados de los mismos grupos (NO OP vs. CTRL FL 48h HP,  $p < 0.001$ ; NO OP vs. IL-6 KO<sub>H</sub> 48h HP,  $p < 0.01$ , ANOVA con test de Tukey post-hoc). Abreviaturas: HP: Hepatectomía parcial; IL-6: Interleucina-6; CTRL FL: Control floxeado; H&E: Hematoxilina y eosina; NO OP: no operados; IL-6 KO<sub>H</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en hepatocitos.

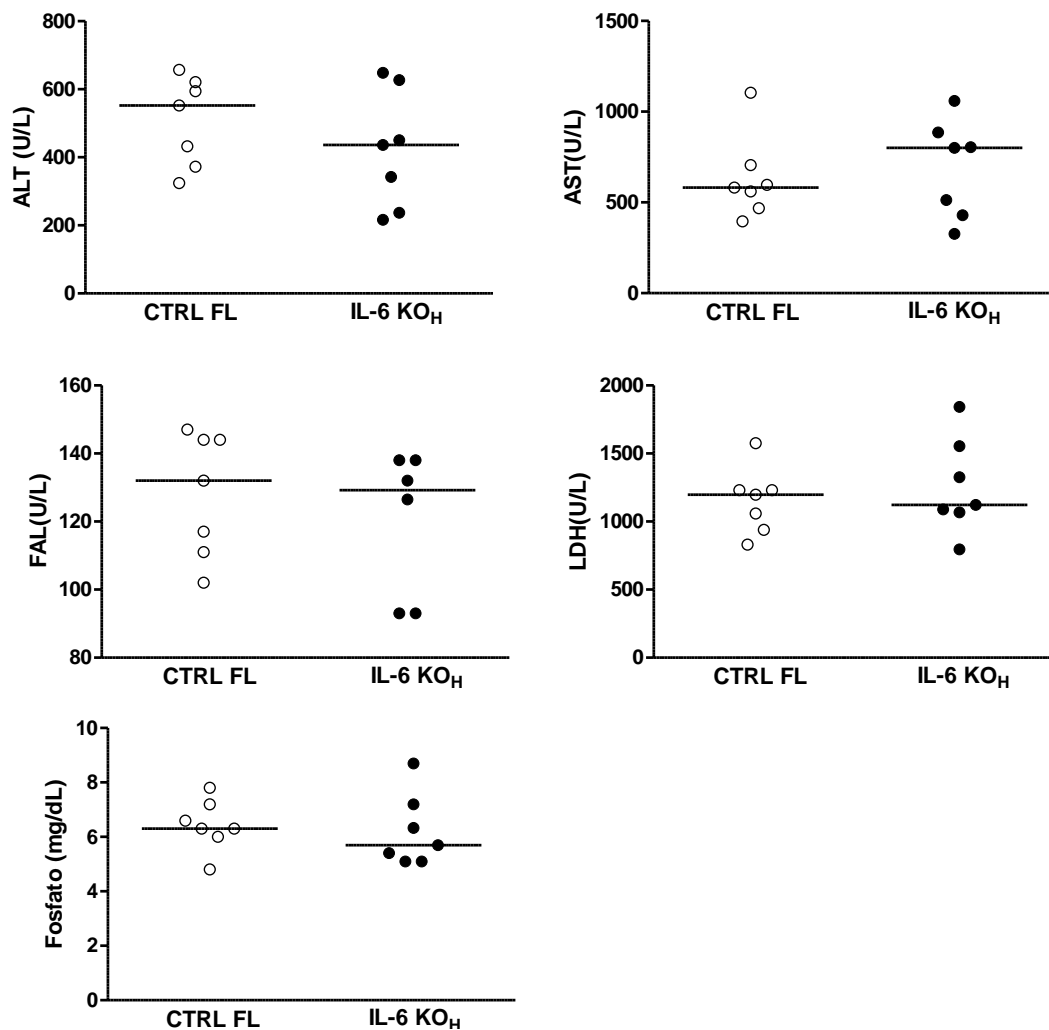
En concordancia con las observaciones previas, la deficiencia de IL-6 en hepatocitos tampoco alteró la recuperación de masa hepática (evaluada mediante el índice hepático). Así, la masa hepática representó aproximadamente el 4% del peso corporal total en los ratones no operados, y disminuyó hasta aproximadamente un 1.5% a los 30 minutos tras la realización de una HP en todos los grupos. La

recuperación de masa hepática tras la HP fue similar en los ratones **CTRL FL** y en los ratones **IL-6 KO<sub>H</sub>**, recuperando todos ellos la masa hepática inicial a los 7 días tras la cirugía (Figura 84).



**Figura 84. Evolución del índice hepático (ratio peso del hígado frente al peso corporal) tras una HP en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).** Cada símbolo representa el valor en ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. El grupo NO OP estuvo compuesto de una mezcla de ratones CTRL FL e IL-6 KO<sub>H</sub>. Abreviaturas: HP: Hepatectomía parcial; IL-6: Interleucina-6; CTRL FL: Control floxeado; NO OP: no operados; IL-6 KO<sub>H</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en hepatocitos.

Por último, evaluamos parámetros bioquímicos en muestras de sangre de ratones **CTRL FL** e **IL-6 KO<sub>H</sub>** tras realizar una HP, no observando diferencias en la concentración de AST, ALT, FAL, LDH o fosfato entres ambos grupos (Figura 85).



**Figura 85. Parámetros bioquímicos en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos tras una HP en ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos y en sus respectivos controles IL-6 floxeados (CTRL FL).** Cada símbolo representa el valor en ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; CTRL FL: Control floxeado; IL-6 KO<sub>H</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en hepatocitos; ALT: Alanina aminotransferasa; AST: Aspartato aminotransferasa; FAL: Fosfatasa alcalina; LDH: Lactato deshidrogenasa.

### 3.- OBJETIVO 3. CONTRIBUCIÓN DE FUENTES EXTRA-HEPÁTICAS A LA ELEVACIÓN DE LA IL-6 CIRCULANTE TRAS UNA HP.

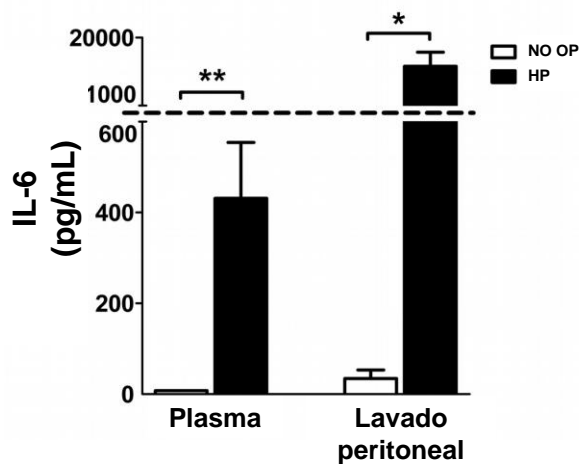
La ausencia de un efecto sobre la elevación de IL-6 circulantes tras una HP encontrada en los ratones con deficiencia del gen de la IL-6 en células de estirpe mieloide (**IL-6 KO<sub>M</sub>**) o en hepatocitos (**IL-6 KO<sub>H</sub>**) abre la posibilidad de que existan fuentes extra-hepáticas de IL-6 no

identificadas hasta ahora. La capacidad de producir IL-6 ha sido descrita, entre otros, en el pulmón, el peritoneo, el músculo esquelético, el tejido adiposo, los linfocitos T, las células endoteliales o los fibroblastos en diversas condiciones (Li et al, 2001; Aldeguer et al, 2002; Schmidt-Arras D, Rose-John S, 2016). Para identificar posibles fuentes extra-hepáticas de IL-6 evaluamos en diversos grupos de ratones no operados y tras la realización de una HP: i. Los niveles de IL-6 en la cavidad peritoneal (mediante un lavado peritoneal con suero salino), y ii. La expresión de ARNm de IL-6 en diversos órganos y tejidos.

### **3.1.- NIVELES DE IL-6 EN LA CAVIDAD PERITONEAL**

Diversos estudios sugieren que el peritoneo es una fuente potencial de producción de citocinas en cirugías abdominales abiertas y, en menor grado, en cirugías laparoscópicas (Riese J et al, 2000; Yahara N et al, 2002). Para evaluar si el peritoneo era una fuente relevante de IL-6, realizamos lavados peritoneales con 0.5 mL de suero salino en ratones C57BL6/J no operados (**NO OP**) y 2 horas tras la realización de una HP, inmediatamente tras la obtención de una muestra de sangre retro-orbitaria.

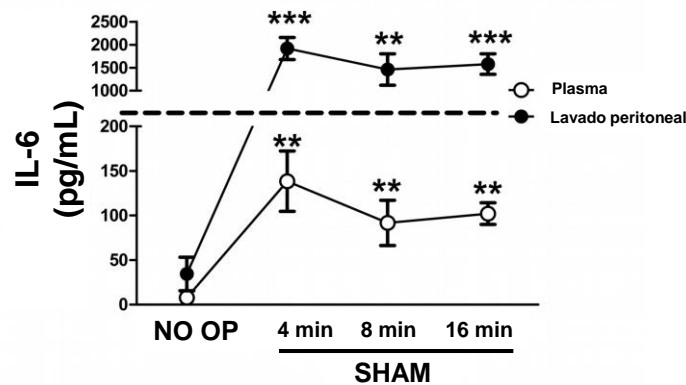
En comparación con los ratones **NO OP**, los ratones con **HP** presentaron elevaciones de IL-6 tanto en el plasma ( $7.81 \pm 0.01$  pg/mL vs.  $431.2 \pm 123.2$  pg/mL,  $p < 0.01$ ) como en el lavado peritoneal ( $34.4 \pm 18.8$  pg/mL vs.  $11980 \pm 3955$  pg/mL,  $p < 0.05$ ) (Figura 86).



**Figura 86. Concentración de IL-6 en plasma y en el lavado peritoneal de ratones C57BL6/J no operados y tras una HP del 70%.** Las muestras de plasma o lavado peritoneal fueron recogidas de ratones no operados o a las 2 horas tras una HP, y la concentración de IL-6 fue medida mediante ELISA. Las columnas representan la media  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ /grupo). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , test t de Student. Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; HP: Hepatectomía parcial; ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas; NO OP: No operados.

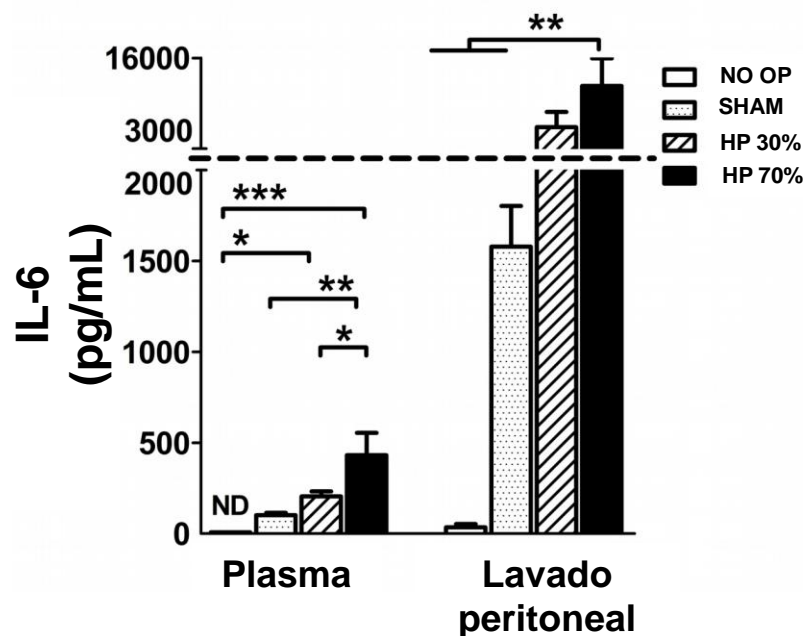
Para saber si la elevación de IL-6 en el lavado peritoneal se trataba de una reacción inespecífica a la apertura de la cavidad abdominal o si estaba influida por factores como la duración de la cirugía o el grado de resección de masa hepática, realizamos varios sets de experimentos en ratones C57Bl6/J salvajes. En primer lugar, realizamos laparatomías simples (SHAM) que se mantuvieron abiertas durante distintos tiempos (4 min, 8 min o 16 min) con el fin de evaluar si la duración de la cirugía influía en la elevación de IL-6. La concentración de IL-6 en los ratones SHAM fue mayor que la encontrada en ratones no operados tanto en el plasma ( $p < 0.01$  vs. SHAM todos los tiempos) como en el lavado peritoneal ( $p < 0.01$  vs. SHAM 8 min,  $p < 0.001$  vs. Sham 4 min y 16 min) (Figura 87). Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la concentración de IL-6 en plasma o en el lavado peritoneal entre las

distintas duraciones de las cirugías SHAM, todas ellas menores de 16 minutos.



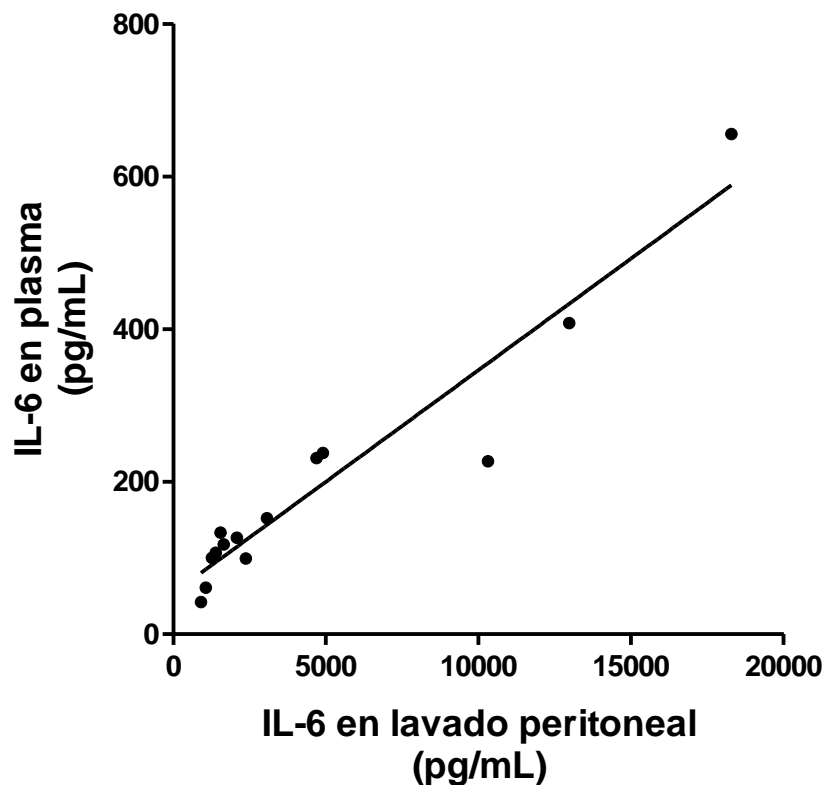
**Figura 87. Concentración de IL-6 en plasma y en el lavado peritoneal de ratones C57BL6/J no operados o tras laparatomías simples de 4, 8 o 16 minutos de duración.** La concentración de IL-6 en plasma y lavado peritoneal fue medida mediante ELISA. Los puntos representan la media  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ /grupo). \*\* $p < 0.01$  vs. NO OP, \*\*\* $p < 0.001$  vs. NO OP, one-way ANOVA con Newman-Keuls post-hoc. Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas; NO OP: No operados; SHAM: Laparatomía control.

Para evaluar si la extensión de la hepatectomía influía en la elevación de IL-6, comparamos la concentración de IL-6 en plasma y en lavado peritoneal de los ratones **NO OP**, y de ratones sometidos a una laparatomía **SHAM**, a una **HP del 30%** y a una **HP del 70%**, manteniendo en todas ellas la misma duración de tiempo operatorio (16 min). La realización de una **HP del 70%** indujo una elevación de IL-6 tanto en el plasma como en el lavado peritoneal en comparación con los ratones **NO OP** o con cirugía **SHAM** ( $p < 0.01$ , Figura 88). El grado de HP pareció influir en la elevación de la IL-6 en sangre (30% vs. 70%,  $p < 0.05$ ), pero no en el lavado peritoneal.



**Figura 88. Concentración de IL-6 en plasma y en el lavado peritoneal de ratones C57BL6/J no operados o tras una laparatomía simple (SHAM), una HP del 30% o una HP del 70%.** La concentración de IL-6 en plasma y lavado peritoneal fue medida mediante ELISA. Las barras representan la media  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ /grupo). El grado de HP (30% vs. 70%) influyó en la elevación de IL-6 en plasma ( $p < 0,05$ ), pero no en el lavado peritoneal. One-way ANOVA con Newman-Keuls post-hoc. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , one-way ANOVA con Newman-Keuls post-hoc. Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; SHAM: Laparatomía control; HP: Hepactetomía parcial; ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas; NO OP: No operados.

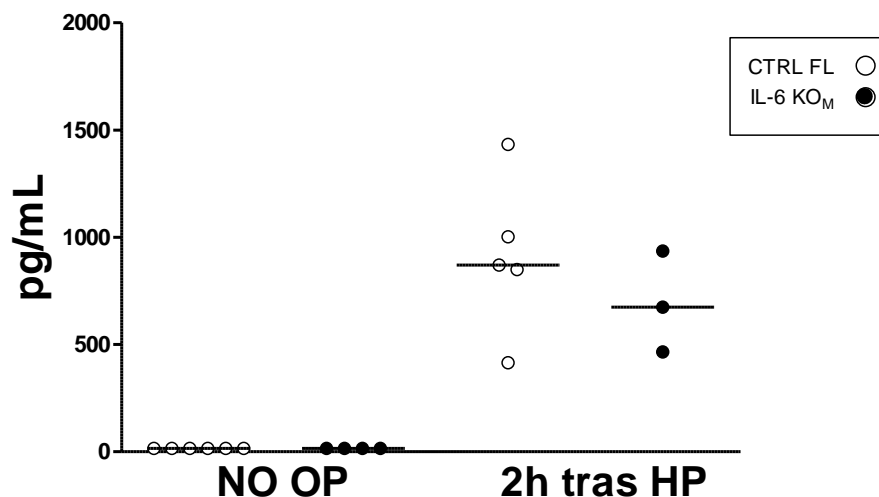
Por último, realizamos un análisis de correlación para evaluar si las elevaciones de IL-6 en plasma y en el lavado peritoneal estaban relacionadas entre sí. En las muestras obtenidas en estos ratones, la concentración de IL-6 en el lavado peritoneal tuvo una fuerte correlación con la concentración de IL-6 en plasma, pudiendo explicar hasta un 90% de la magnitud de la misma ( $R^2 = 0.915$ ;  $p < 0.001$ , Figura 89).



**Figura 89.** Correlación entre la concentración de IL-6 en plasma y en el lavado peritoneal en ratones NO OP o tras laparatomía SHAM, HP del 30% o HP del 70%. ( $R^2= 0.915$ ;  $p < 0.001$ , test de regresión lineal).

El peritoneo posee una considerable cantidad de macrófagos tisulares residentes que podrían liberar IL-6 a la cavidad peritoneal. Para evaluar si los macrófagos peritoneales eran la fuente de la IL-6 liberada a la cavidad peritoneal tras una HP, comparamos la concentración de IL-6 en el lavado peritoneal de ratones con deficiencia del gen de la IL-6 en células de estirpe mieloide (**IL-6 KO<sub>M</sub>**) no operados o sometidos a una HP del 70%, así como en sus correspondientes ratones controles IL-6 floxeados (**CTRL FL**). La concentración de IL-6 en el lavado peritoneal se elevó tanto en los ratones **CTRL FL** como en los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** a las 2 horas de la HP respecto a los respectivos controles no operados (CTRL FL no op vs. CTRL FL 2h HP,  $p < 0.001$ ; IL-

6 KO<sub>M</sub> no op vs. IL-6 KO<sub>M</sub> 4h HP,  $p < 0.01$ ), pero la magnitud de la elevación fue similar en ambos grupos (Figura 90).



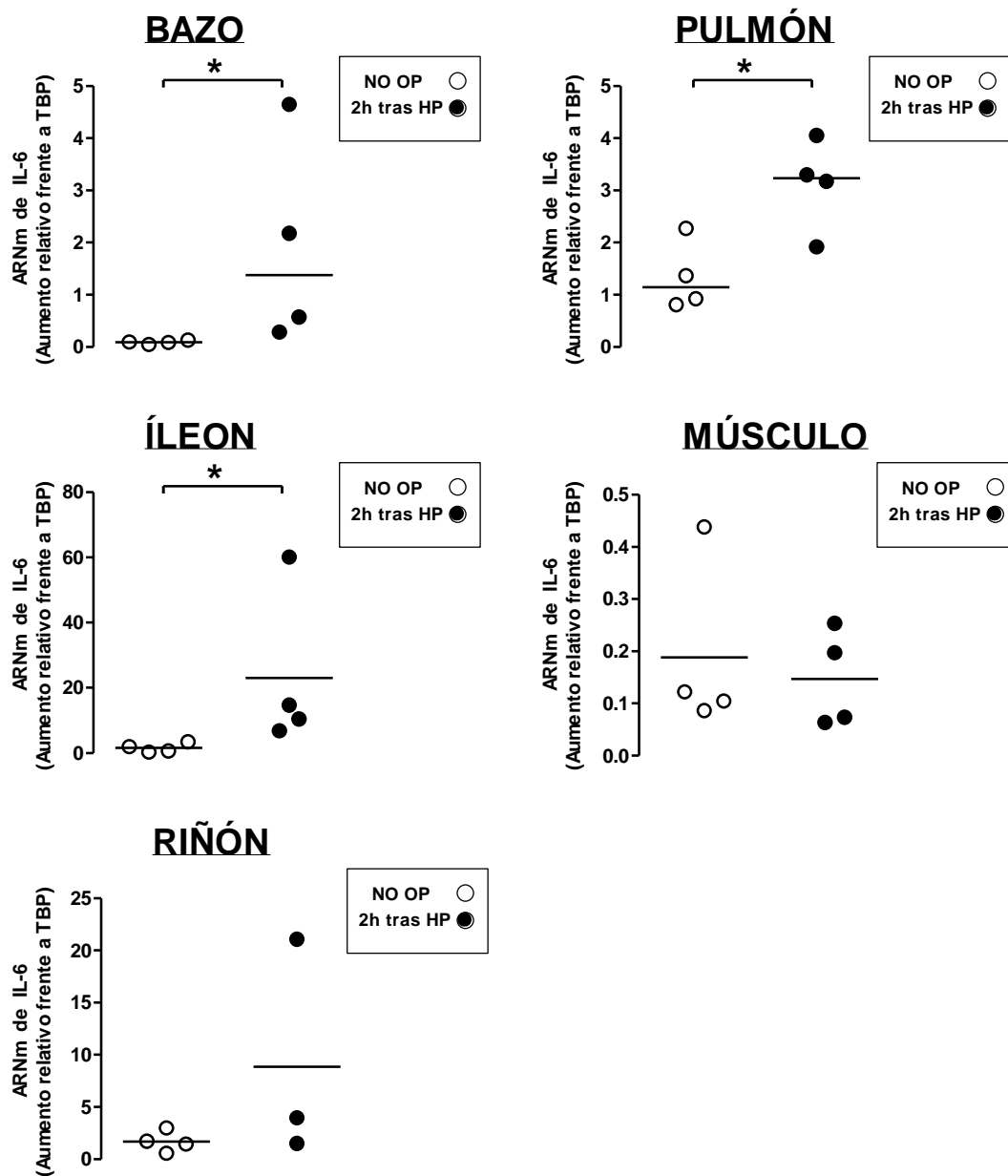
**Figura 90. Concentración de IL-6 en el lavado peritoneal de ratones CTRL FL e IL-6 KO<sub>M</sub> no operados o tras una HP del 70%.** La concentración de IL-6 en el lavado peritoneal fue medida mediante ELISA. Cada símbolo representa el valor en ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. Los ratones CTRL FL e IL-6 KO<sub>M</sub> presentaron un aumento de la concentración de IL-6 en el lavado peritoneal a las 2 horas tras una HP, en comparación con los ratones no operados de los mismos grupos (CTRL FL 4h HP,  $p < 0.001$ ; IL-6 KO<sub>M</sub> no op vs. IL-6 KO<sub>M</sub> 4h HP,  $p < 0.01$ , ANOVA con test de Tukey post-hoc). Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; CTRL FL: Control floxeado; IL-6 KO<sub>M</sub>: Ratones con deficiencia selectiva del gen de IL-6 en células de estirpe mieloide; HP: Hepatectomía parcial; ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas; NO OP: no operados.

### 3.2.- EXPRESIÓN GÉNICA DE IL-6 EN DIVERSOS ÓRGANOS.

Para evaluar posibles fuentes extra-hepáticas de IL-6, en los siguientes experimentos comparamos la expresión del ARNm de IL-6 en distintos órganos en ratones C57Bl6/J no operados o a las 2 horas tras una HP.

En comparación con los órganos de los ratones no operados, la realización de una HP resultó en una inducción significativa del ARNm de la IL-6 a las 2 horas en el bazo (20-fold,  $p < 0.05$ ), el pulmón (1.3-fold,

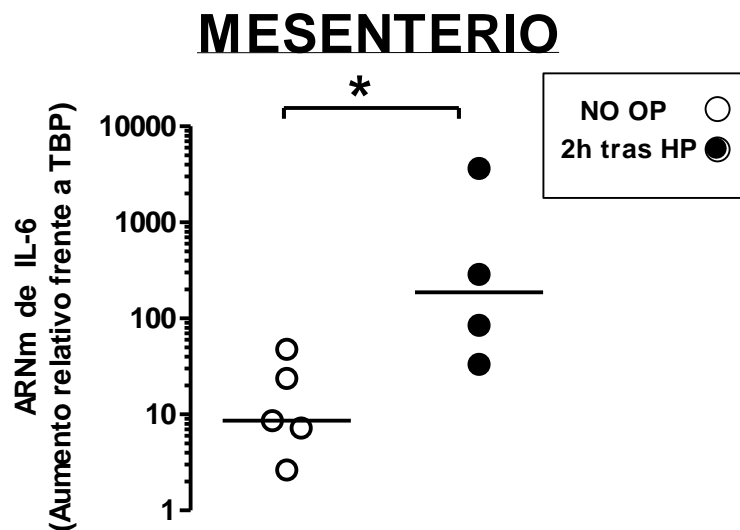
$p < 0.05$ ), y el íleon (13.7-fold,  $p < 0.05$ ), mientras que no se observaron cambios en el riñón ni en el músculo (Figura 91).



**Figura 91. Expresión del ARNm de IL-6 en órganos de ratones C57Bl6/J no operados y a las 2 horas tras una HP.** Cada símbolo representa el valor en ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. \* $p < 0.05$ , test U de Mann-Whitney. Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; HP: Hepatectomía parcial; NO OP: no operados.

Dado que la IL-6 producida en el pulmón, el bazo o el intestino probablemente es liberada a la circulación sanguínea, es poco probable

que dichas fuentes sean responsables de la alta concentración de IL-6 encontrada en el lavado peritoneal. Por este motivo, realizamos un nuevo set de experimentos destinados a evaluar la expresión génica de IL-6 en el mesenterio, evaluando de nuevo ratones C57Bl6/J no operados y a las 2 horas tras una HP. La realización de una HP resultó en una drástica inducción (55-fold,  $p < 0.05$ ) de la expresión de ARNm de IL-6 en el mesenterio en comparación con la expresión encontrada en ratones no operados (Figura 92).



**Figura 92. Expresión del ARNm de IL-6 en el mesenterio de ratones C57Bl6/J no operados y a las 2 horas tras una HP.** Cada símbolo representa el valor en ratones individuales y la línea horizontal la mediana de cada grupo. El eje de ordenadas se expresa en escala de logaritmo decimal. \* $p < 0.05$ , test U de Mann-Whitney. Abreviaturas: IL-6: Interleucina-6; HP: Hepatectomía parcial; NO OP: no operados.



## **VIII.- *DISCUSIÓN***

---



La IL-6 es una citocina pleiotrópica con funciones esenciales en la fisiología de multitud de sistemas, incluyendo el hematopoyético, inmune, nervioso y hepático (Kishimoto T, 2010). La IL-6 ejerce propiedades tanto pro-inflamatorias (Karin et al, 2006; Streetz KL, Tacke F, et al, 2003; Hammerich L, Tacke F, 2014) como anti-inflamatorias (Becker et al, 2004; Grivennikov et al, 2009; Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, et al, 2011; Rose-John 2012), y también activa genes implicados en diferenciación, supervivencia, apoptosis y proliferación celular (Heinrich et al, 2003). Por esta multiplicidad de acciones, no es extraño que el papel exacto de esta citocina en el desarrollo de la regeneración hepática continúe sin desentrañarse del todo a pesar de los múltiples estudios que se han realizado. Existe además cierta controversia sobre el efecto de esta citocina en el proceso proliferativo. Así, los primeros estudios establecieron un papel pro-proliferativo esencial de la IL-6 sobre los hepatocitos durante la regeneración hepática (Cressman et al, 1996; Zimmers TA, McKillop IH, et al, 2003). Estudios posteriores demostraron que esta citocina tenía también efectos pro-supervivencia y hepatoprotectores (Blindenbacher et al, 2003; Wuestefeld et al, 2003) así como efectos anti-proliferativos (Vaquero et al, 2011; Quétier et al, 2013; Tachibana et al, 2014). A pesar de estos resultados contradictorios, la mayoría de los investigadores aceptan que la IL-6 juega un papel importante en la regeneración hepática (Tumanov et al, 2009; Zorde-Khvaleyevsky et al, 2009; Teixeira-Clerc et al, 2010; Wang et al, 2011).

En ratones sometidos a una HP, la proliferación de las células de los lóbulos hepáticos remanentes se produce de manera sincronizada gracias a la rápida integración por los hepatocitos de diversos estímulos procedentes de los sistemas de inmunidad innata, de factores de crecimiento y de regulación metabólica (Fausto et al, 2006). Se ha observado que el sistema de inmunidad innata, y en particular las citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6, juegan un papel importante en las primeras horas tras una HP, sensibilizando a los hepatocitos para responder posteriormente a factores de crecimiento (Webber et al, 1998). La red de citocinas se inicia cuando TNF $\alpha$  se une a su receptor TNFR1 en células de Kupffer y esta unión desencadena la activación de NF $\kappa$ B, la producción de IL-6 por parte de los macrófagos del hígado y la activación de STAT-3 en hepatocitos (Liebermann TA, Baltimore D, 1990; Fausto et al 2006; Jia 2011). Así, la producción de citocinas tras una HP se ha atribuido clásicamente a los macrófagos residentes hepáticos (células de Kupffer) (Shiratori et al, 1996; Aldeguer et al, 2002). Sin embargo, la fuente celular de la IL-6 tras una HP no ha sido estudiada de una forma específica y sistemática. Más aún, algunos estudios proporcionan evidencias indirectas de que otras fuentes celulares podrían también contribuir y de que la depleción de macrófagos podría resultar en un aumento de la proliferación de hepatocitos y no a una atenuación de la regeneración hepática (Loffreda et al, 1997; Boulton et al, 1998). Una posible explicación a las discrepancias encontradas podría radicar en la existencia de distintas fuentes celulares de IL-6 que determinasen distintos efectos de la misma. En este sentido, algunos

estudios han sugerido que los hepatocitos son una fuente potencial de IL-6 ante distintos estímulos como LPS (Liu et al, 2002; Maeda et al, 2006) o tras la realización de una HP (Norris et al, 2014). En el contexto de la regeneración hepática, algunos investigadores han propuesto que la regulación del receptor de IL-6 en los hepatocitos podría ser autocrina, en lugar de endocrina/paracrina como se creía previamente (Klein et al, 2005; Norris et al, 2014). A pesar de las consideraciones previas, la noción generalizada en la comunidad científica continúa siendo que las células de Kupffer son las principales productoras de IL-6 durante la regeneración hepática (Taub 2004; Michalopoulos 2007; Böhm, et al 2010).

Tanto las células de Kupffer como los hepatocitos juegan un papel importante en la regeneración hepática, y tienen además la capacidad potencial de producir IL-6 tras una HP. Mediante la tecnología Cre-LoxP (Akagi et al, 1997), en el presente trabajo desarrollamos dos cepas de ratones KO condicionales con deficiencia del gen de la IL-6 en células de estirpe mieloide (incluyendo las células de Kupffer) o en hepatocitos para investigar el papel de la IL-6 producida por dichas células sobre la regeneración hepática.

En el presente trabajo, realizamos estudios preliminares en los que caracterizamos y optimizamos una técnica de HP modificada frente a la técnica de HP tradicionalmente utilizada. Así mismo, validamos y caracterizamos los dos modelos de ratones KO condicionales de IL-6 en células específicas (células de Kupffer y hepatocitos) para el estudio del

efecto de la fuente celular de IL-6 en el desarrollo de la regeneración hepática tras una HP.

En los siguientes experimentos, mostramos que los **ratones KO condicionales de IL-6 en células de estirpe mieloide y células de Kupffer** presentaron una atenuación de la inducción del ARNm de IL-6 en el remanente hepático tras una HP, pero no una reducción de la concentración de IL-6 circulante tras la cirugía. Sorprendentemente, la deficiencia de IL-6 en células de estirpe mieloide se asoció a una mayor activación de STAT-3 a tiempos tempranos tras una HP, pero sin acompañarse de modificaciones en la inducción del gen SOCS-3 (dependiente de la activación de STAT-3) ni en otras rutas de señalización inducidas por IL-6, como la ruta de ERK o de AKT. La mayor activación de STAT-3 en los ratones con deficiencia de IL-6 en células de estirpe mieloide se acompañó de una sutil aceleración del inicio y la terminación de la fase de síntesis de ADN en hepatocitos tras una HP que no se tradujo en modificaciones de otros parámetros proliferativos (mitosis, PCNA, ciclina D1) ni en la recuperación global de la masa hepática.

Los **ratones KO condicionales de IL-6 en hepatocitos**, a diferencia de lo encontrado en ratones KO condicionales en células de estirpe mieloide, no presentaron una atenuación sino un aumento de la expresión del ARNm de IL-6 en el remanente hepático que tampoco se tradujo en cambios de la concentración de IL-6 circulante tras una HP. La deficiencia de IL-6 en hepatocitos tan sólo resultó en una mayor activación de STAT-3 en las primeras horas tras la HP, que no se

acompañó de cambios relevantes ni en otros parámetros de la vía de señalización de la IL-6 ni en parámetros de proliferación celular ni en la recuperación de la masa hepática.

Siguiendo los **OBJETIVOS** planteados inicialmente, las seis preguntas centrales respondidas por nuestro trabajo son las siguientes:

### **1.- ¿ES POSIBLE MEJORAR LA REPRODUCIBILIDAD DE LA TÉCNICA DE HP EN RATONES PARA EL ESTUDIO DE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA?**

El modelo experimental “*in vivo*” más empleado y caracterizado para estudiar la regeneración hepática es la HP de 2/3, descrita por primera vez en ratas (Higgins GM, Anderson RM 1931). En este modelo, el 70% del hígado es eliminado quirúrgicamente y la masa hepática es restaurada en 14 días. Esta técnica ha sido utilizada por la mayor parte de la comunidad científica para el estudio del ciclo celular y de las rutas de señalización implicadas en la regeneración hepática (Mitchell C, Willenbring H, 2008; Martins et al, 2008) y ha sido adaptada a ratones para mejorar la reproducibilidad y seguridad (Greene AK, Puder M, 2003; Mitchell C, Willenbring H, 2008).

La utilización de un modelo experimental que sea lo más reproducible posible es una parte crucial de cualquier diseño experimental, particularmente si se persigue evaluar los efectos de una manipulación específica terapéutica o no terapéutica. Además de su reproducibilidad y especificidad, la elección de un determinado modelo animal debe tener en cuenta otras consideraciones como el impacto de

distintos factores antes de la cirugía (género, edad y background genético del animal o anestesia empleada) (Nevzorova et al, 2015).

La popularidad del modelo quirúrgico de HP, en comparación con otros modelos de daño hepático producido por tóxicos, radica en que la eliminación del tejido reseado no se asocia con necrosis extensa y, frente a otros modelos animales, reúne una serie de ventajas (inicio del estímulo regenerativo perfectamente definido, proceso rápido y fácil de realizar y mortalidad reducida) (Michalopoulos 2007, 2010, 2011; Nevzorova et al, 2015). Sin embargo, este modelo de HP ampliamente utilizado presenta una serie de problemas que abren la posibilidad de mejorar la técnica. Una de ellas es que la técnica tradicional implica la resección de la vesícula biliar (Mitchell C, Willenbring H, 2008). Si durante la resección de la masa hepática se daña la vesícula biliar, la vía biliar extrahepática o la vena cava suprahepática puede conducir a necrosis de los lóbulos remanentes y fallo de la regeneración hepática (Nevzorova et al, 2015). Otro campo para mejorar estaría relacionado con la posible variabilidad en la cantidad de tejido reseado. En particular, la resección del lóbulo medio mediante la técnica tradicional (Mitchell C, Willenbring H, 2008) puede tener una considerable variabilidad intra- e inter-investigador. El sangrado de los vasos sanguíneos hepáticos y de la superficie del hígado es otra posible complicación de esta técnica (Boyce S, Harrison D, 2008). Por último, esta técnica de HP tiene riesgos asociados a la colocación de la sutura en el lóbulo medio. Uno de estos riesgos es que se produzca estenosis

de la vena cava suprahepática y congestión hepática que puede ocasionar desarrollo de necrosis hepatocelular (Martins et al, 2008).

Desde la descripción del modelo de HP de Higgins y Anderson en 1931, son varias las modificaciones e intentos que se han realizado para aumentar la reproducibilidad del modelo. En primer lugar, la técnica de HP tradicional de Higgins y Anderson fue adaptada para ser utilizada en ratones (Mitchell C, Willenbring H, 2008) y desde entonces, se han probado varias alternativas para mejorar la reproducibilidad de los resultados obtenidos. Una de estas alternativas consistió en **resecar el parénquima hepático mediante el empleo de clips**, en lugar de suturas. Esta técnica resultó ser rápida y segura, pero llevaba asociada las mismas complicaciones que la técnica tradicional (Martins et al, 2008; Hori et al, 2012). También se plantearon otras alternativas como la ligadura de las ramas de la arteria hepática y la vena porta antes de realizar la resección del lóbulo hepático mientras que las venas hepáticas eran ligadas dentro del lóbulo durante la resección del parénquima. Esta técnica se conoce como **técnica microquirúrgica orientada a vasos** que presenta las ventajas de reducido riesgo de sangrado y reducida opresión de la vena cava, pero es una técnica que requiere habilidades quirúrgicas y mayor práctica por parte del investigador para reducir la mortalidad asociada al proceso quirúrgico (Martins et al, 2008).

Finalmente, el desarrollo de **técnicas microquirúrgicas** ha permitido la disección individual y ligadura de las ramas vasculares y biliares de los lóbulos medio e izquierdo sin provocar daño a los lóbulos

remanentes o complicaciones como la estenosis de la vena cava u obstrucción del árbol biliar (Martins et al, 2008; Aller et al, 2009). Sin embargo, el empleo de estas técnicas implica habilidades quirúrgicas y un mayor tiempo de práctica para alcanzar resultados reproducibles.

De forma que actualmente, el protocolo de inducción de regeneración hepática más utilizado continúa siendo **la resección del parénquima hepático con el empleo de dos ligaduras** (Taub et al, 2004; Mitchell C, Willenbring H, 2008; Böhm et al, 2010). Sin embargo, se han introducido modificaciones a este protocolo quirúrgico para mejorar la reproducibilidad de los resultados. Una de estas modificaciones consiste en el **empleo de tres ligaduras para resecar el parénquima hepático**. Estudios como el de Boyce y Harrison en el año 2008 o el de Nevzorova en el año 2015, han mostrado que el uso de tres ligaduras para realizar una HP constituye un protocolo quirúrgico rápido, fácil de llevar a cabo, altamente reproducible y no asociado a mortalidad (Dierssen et al, 2008; Nevzorova et al, 2009). Sin embargo, no se han realizado comparaciones directas entre ambas técnicas y tampoco se ha estudiado el impacto sobre la variabilidad en la cantidad de tejido resecaado, sobre la regeneración hepática, o sobre las complicaciones

Con el objeto de elegir el protocolo más reproducible para estudiar posteriormente los posibles efectos de la fuente celular de IL-6 en la regeneración hepática, realizamos una comparación en paralelo entre la técnica tradicional descrita por Mitchell y Willenbring en 2008 (resección del parénquima hepático con dos ligaduras, **HP-trad**) y una

técnica modificada en la que se utilizan tres ligaduras (**HP-modif**). Los resultados de nuestro trabajo sugieren que las modificaciones incluidas en la técnica quirúrgica de HP del 70% reducen la variabilidad en la cantidad de tejido resecado y se asocian a una tendencia a un mayor y más definido desarrollo de la regeneración hepática, sin asociarse con un mayor número de complicaciones:

➤ Reproducibilidad en la cantidad de tejido resecado y remanente

La técnica de **HP-modif** supuso una mayor resección de la masa hepática, que representó de forma más exacta a una HP del 70%. Una de las limitaciones del protocolo de **HP-trad** era que la colocación de la sutura en el lóbulo medio dependía del investigador, carecía de un referente anatómico preciso, y podía conducir a variabilidad en la cantidad de tejido resecado en cada HP (Mitchell C, Willenbring H, 2008). En nuestro estudio, encontramos que la técnica de **HP-modif** (colocación de dos suturas en el lóbulo medio, en lugar de una sutura), mejoraba de forma consistente la reproducibilidad en la cantidad de tejido resecado con respecto a la técnica de **HP-trad**.

Además, en la técnica de **HP-trad** existe variabilidad en la cantidad de tejido viable/necrótico que queda en el remanente de los lóbulos resecados tras la cirugía, debido a la distinta cantidad de tejido que se reseca. En consonancia con los datos anteriores, encontramos que los ratones que siguieron el protocolo de **HP-modif** tuvieron una menor cantidad de tejido viable en el remanente de los lóbulos que debían ser resecados que los ratones sometidos a una **HP-trad**. De esta manera, estos datos indican que la modificación incluida en la técnica

de **HP-trad** supone una mejora en la reproducibilidad en la cantidad de tejido remanente con respecto a la técnica de **HP-trad**.

➤ Dinámica de la regeneración hepática

Estudios previos en los que se describían nuevos protocolos de HP no han realizado comparaciones de la dinámica de la regeneración hepática con la encontrada en ratones operados con la técnica tradicional o con otras técnicas alternativas (Hori et al, 2011, 2012; Nevzorova et al, 2015). Por lo tanto, es difícil concluir si las modificaciones introducidas en esos protocolos quirúrgicos suponen un efecto sobre el desarrollo de la regeneración hepática. En nuestro estudio, evaluamos distintos parámetros para cuantificar este proceso en las dos técnicas empleadas, tal como está recomendado (Assy N, Minuk GY, 1997; Jia 2011).

La técnica de **HP-modif** resultó en una mayor elevación de IL-6 circulante que el protocolo de **HP-trad**, lo que se acompañó de una tendencia a una proliferación de los hepatocitos mayor y más acelerada, aunque no reflejada en la recuperación de masa hepática (índice hepático). Es posible que la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en estos parámetros pueda ser debida al uso de un tamaño muestral pequeño y que sea necesario incrementar el tamaño muestral para confirmar si la técnica de **HP-modif** supone un mayor estímulo para la regeneración hepática que la **HP-trad** (Assy N, Minuk GY, 1997; Jia 2011).

➤ Frecuencia de complicaciones

Las complicaciones más comunes asociadas al desarrollo de estos protocolos quirúrgicos son el desarrollo de necrosis hepatocelular y la mortalidad (Panis et al, 1997; Rudich et al, 2009; Hori et al, 2011,2012). La mortalidad suele estar asociada a complicaciones durante el desarrollo de la técnica quirúrgica mientras que el desarrollo de necrosis en hepatocitos se suele achacar a la producción de estenosis de la vena cava suprahepática. Esta estenosis presumiblemente se produce por la colocación de la sutura cercana a este vaso en el lóbulo medio al realizar la técnica de **HP-trad** (Martins et al, 2008). En este sentido, el empleo de técnicas microquirúrgicas ha supuesto un avance a la hora de reducir el desarrollo de necrosis hepatocelular, pero necesita de una importante curva de aprendizaje (Martins et al, 2008; Aller et al, 2009). En nuestro estudio, ambas técnicas estudiadas presentaron una frecuencia baja y similar de complicaciones asociadas (mortalidad intra-operatoria, necrosis hepatocelular).

La ventaja del modelo de **HP-trad** frente a otros modelos usados para inducir una regeneración hepática es la ausencia de daño en el tejido hepático remanente. Además de evaluar histológicamente la aparición de necrosis hepatocelular, en nuestro estudio evaluamos si existían diferencias entre ambos protocolos quirúrgicos en parámetros bioquímicos de daño hepático, ya que la diferencia en la cantidad de tejido reseca y remanente podría tener un efecto en estos parámetros. En concordancia con esta hipótesis, encontramos que la técnica de **HP-**

**modif** presentaba menores elevaciones de enzimas hepáticas en plasma (ALT y AST) tras la cirugía, aunque los niveles de otra enzima hepática como la FAL fueron similares al protocolo de **HP-trad**. Estos datos podrían reflejar que, comparada con la **HP-trad**, la técnica de **HP-modif** disminuye el daño en el hígado remanente o, alternativamente, podría estar relacionado con la mayor extensión de la resección de masa hepática lograda con la misma.

En resumen, los resultados de nuestro trabajo indican que el protocolo de **HP-modif** es un método rápido y reproducible para inducir regeneración hepática, y supone probablemente un mayor estímulo del proceso proliferativo sin aumentar las complicaciones asociadas a esta técnica. Por lo tanto, el protocolo de **HP-modif** resultaría más atractivo para estudiar los distintos inductores del proceso regenerativo, cuyo descubrimiento sería de gran utilidad para mejorar el tratamiento de distintas enfermedades hepáticas.

## **2.- ¿LOS RATONES CON DEFICIENCIA SELECTIVA DE IL-6 EN CÉLULAS DE ORIGEN MIELOIDE (CÉLULAS DE KUPFFER) O EN HEPATOCITOS CONSTITUYEN UNA HERRAMIENTA VÁLIDA PARA EL ESTUDIO DE LA FUENTE CELULAR DE IL-6?**

Avances en Genética Molecular y Embriología han permitido eliminar de forma condicional y específica determinados genes en tipos celulares específicos mediante el empleo del sistema Cre/LoxP (Gordon et al 1980; Capecchi 1989; Copp et al 1995; Akagi et al, 1997). En este

estudio, generamos por primera vez ratones KO condicionales de IL-6 en células de estirpe mieloide y en hepatocitos mediante el uso de ratones IL-6 floxeados (cedidos por el Dr. Juan Hidalgo) y de ratones con expresión de la Cre recombinasa dirigida por promotores específicos (Akagi et al, 1997).

Con el objeto de determinar si estos ratones KO condicionales con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide (**IL-6 KO<sub>M</sub>**) o en hepatocitos (**IL-6 KO<sub>H</sub>**) constituían una herramienta válida para estudiar los efectos de la fuente celular de la IL-6 en la regeneración hepática, realizamos diversos estudios de validación comparando dichos ratones frente a sus correspondientes ratones controles IL-6 floxeados (**CTRL FL**). Los resultados de nuestro trabajo indicaron que las dos cepas de ratones KO condicionales de IL-6 generadas constituían una herramienta válida para estudiar la fuente celular de IL-6 en la regeneración hepática, ya que en ambas existió una reducción de la producción de IL-6 y actividad de la Cre recombinasa en las células diana.

➤ Producción de IL-6

En estudios previos se había mostrado que el aislamiento de macrófagos de la cavidad peritoneal con tioglicolato y posterior cultivo ante estímulos como LPS, incrementaba la producción de citocinas como IL-6. En estos estudios se indicaba que los resultados obtenidos con estos macrófagos peritoneales se podían generalmente trasladar a los macrófagos presentes en distintos tejidos como es el caso de las células de Kupffer en el hígado (Zhang et al, 2008; Soudi et al, 2013;

Ling et al, 2014). Uno de los primeros experimentos que se suelen evaluar en estudios con ratones KO condicionales creados mediante el sistema Cre/LoxP, consiste en determinar si la producción de la proteína delecionada se encuentra realmente atenuada en estos ratones (Xu et al, 2015). En nuestro estudio, encontramos que la producción de IL-6 estimulada por LPS estaba prácticamente abolida en macrófagos peritoneales aislados de **ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide (IL-6 KO<sub>M</sub>)** en comparación con macrófagos aislados de **ratones CTRL FL**. Por lo tanto, estos resultados validaron el uso de este sistema experimental en nuestro trabajo.

En estudios previos se había mostrado que la producción de IL-6 y de otras citocinas en cultivo primario de macrófagos peritoneales, aumentaba con el tiempo de exposición a LPS (Soudi et al, 2013; Ling et al, 2014). En nuestro estudio encontramos que la producción de IL-6 en el grupo **pre-aislamiento** (población celular mixta presente en el lavado peritoneal) y en macrófagos peritoneales (grupo **post-aislamiento**) aumentaba con el tiempo de exposición a LPS y estaba casi abolida en las células procedentes de ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** en todos los tiempos estudiados, pero sobre todo a las 24 horas, en comparación con las de los ratones **CTRL FL**. Estos resultados confirmaron de nuevo la eficacia de la deleción específica del gen, y sugieren además que el tiempo de exposición a la endotoxina es un factor importante para encontrar diferencias entre ambas cepas, debiéndose tener en cuenta a la hora de diseñar experimentos *in vitro* en este modelo experimental.

Aunque es bien conocido que la IL-6 puede ser sintetizada por distintos tipos celulares (Schmidt-Arras D, Rose-John S, 2016), la mayor parte de la comunidad científica acepta que las células de Kuffer son las principales productoras de IL-6 tras estimular con LPS (Bode et al, 2012; Schmidt-Arras D, Rose-John S, 2016). En nuestro estudio, las observaciones realizadas con la exposición a LPS en las poblaciones celulares mixta (pre-aislamiento) y de macrófagos (post-aislamiento) obtenidas mediante lavado peritoneal de los ratones KO condicionales de IL-6 en células de origen mieloide y en sus correspondientes controles, sugieren que las células de estirpe mieloide son responsables del 90% de la producción total de la proteína IL-6 ante estímulos como LPS, mientras que otros tipos celulares serían responsables de la producción del 10% restante de IL-6. Estos resultados, por tanto, son una evidencia más de que la delección del gen de IL-6 en células de estirpe mieloide mediante el sistema Cre/LoxP utilizado en este trabajo fue efectiva.

Estudios previos con ratones IL-6 KO (IL-6<sup>-/-</sup>) expuestos a LPS observaron un mayor infiltrado de neutrófilos en el sitio de la infección, en lugar de monocitos y macrófagos que son los encargados de orquestar una respuesta pro-inflamatoria (Xing et al, 1998). La producción de IL-6 por parte de monocitos y macrófagos estimulados con LPS, conlleva a que esta citocina se desplace a través del torrente sanguíneo al hígado para inducir la respuesta de fase de aguda en los hepatocitos (Gauldie et al, 1987; Heinrich et al, 1990; Bode et al, 2012; Tanaka et al, 2014; Schmidt-Arras D, Rose-John S, 2016). Aunque es

bastante aceptado que el LPS estimula la producción de citocinas en células de estirpe mieloide, también existen evidencias de que otras células como los hepatocitos pueden ser capaces de producir citocinas tras la exposición al LPS u otros estímulos (Liu et al, 2002; Norris et al, 2014). Entre estas citocinas, estudios recientes sugieren que los hepatocitos podrían ser una fuente potencial de IL-6 (Lee et al, 2009; Xiang et al, 2011).

Nuestro estudio es el primero en proporcionar datos sobre la producción de IL-6 secundaria a la estimulación *in vivo* con LPS en ratones KO condicionales de IL-6 en células de estirpe mieloide o en hepatocitos. Así, encontramos que la **deficiencia selectiva de IL-6 en células de origen mieloide** atenuaba hasta en un 75% el aumento de la concentración de IL-6 circulante tras estimular con LPS *in vivo*. Estos resultados concuerdan con los resultados de los experimentos *in vitro* y con la noción establecida de que las células de origen mieloide son las principales responsables de la producción de IL-6 ante estímulos como el LPS (Bode et al, 2012; Schmidt-Arras D, Rose-John S, 2016), así como validan también el sistema Cre/LoxP utilizado en un paradigma experimental *in vivo*.

En el caso de **ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos** estimulados con LPS *in vivo*, encontramos que la falta de IL-6 en hepatocitos no atenuó, sino que tendió a aumentar la concentración de IL-6 circulante en comparación con los correspondientes ratones controles IL-6 floxeados sin delección del gen. Estos resultados no concuerdan con un trabajo previo (Norris et al,

2014), donde tras estimular *in vivo* con LPS encontraron un aumento de la expresión del ARNm de IL-6 en células de Kupffer y, fundamentalmente, en hepatocitos. Nuestros resultados son, sin embargo, concluyentes en tanto que la delección del gen de IL-6 mediante el sistema Cre/LoxP en nuestro estudio fue efectiva. Suponiendo que los hepatocitos fuesen realmente la principal fuente celular de IL-6 tras la estimulación con LPS, una posible explicación para nuestros hallazgos sería la activación de vías compensadoras en los ratones generados con deficiencia de IL-6 en hepatocitos.

Por último, es importante destacar que en ninguno de los experimentos utilizados para validar el modelo experimental (estudios *in vitro* e *in vivo*) se observó una abolición total de la expresión de IL-6 en ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>**, sugiriendo que existen células de estirpe no mieloide que son capaces de producir IL-6, como se ha propuesto en otros estudios (Brun et al, 2005; Martin-Armas et al, 2006; Wu et al, 2009; Chen et al, 2011; Jaeschke et al, 2012; Godoy et al, 2013; Norris et al, 2014). Por este motivo, la evaluación de la expresión de IL-6 en el tejido hepático para determinar qué células podrían estar contribuyendo al incremento de IL-6 circulante tras una HP probablemente permitiría entender mejor esta cuestión.

➤ Efectividad y selectividad celular de la delección génica mediada por la Cre recombinasa

La efectividad y selectividad celular de la delección génica mediada por la Cre recombinasa fue adicionalmente evaluada en nuestro estudio con el uso de ratones reporteros (fluorescentes). Este sistema permite

definir de forma espacial y temporal la extensión de la recombinación mediada por la enzima Cre recombinasa (Muzumdar et al, 2007). Así, la recombinación llevada a cabo por la Cre recombinasa bajo el control de los promotores utilizados en este estudio (promotor de lisozima para células de estirpe mieloide, y promotor de albúmina para hepatocitos) fue efectiva en las células diana y tuvo una alta penetrancia, a juzgar por la adecuada expresión de las proteínas EGFP y Tomato-dye en los tipos celulares diana evaluada mediante microscopía de fluorescencia. Estos resultados contribuyen a la validación de los modelos y concuerdan con lo descrito previamente en la literatura en cuanto al modelo experimental de recombinación realizado con el sistema Cre/LoxP (Gordon et al 1980; Capecchi 1989; Copp et al 1995; Akagi et al, 1997; Xu et al, 2015).

### **3.- ¿LOS RATONES KO CONDICIONALES DE IL-6 EN CÉLULAS DE KUPFFER O EN HEPATOCITOS, PRESENTAN UN FENOTIPO NORMAL A NIVEL BASAL?**

En nuestro estudio, hemos generado por primera vez ratones KO condicionales de IL-6 en células de estirpe mieloide y en hepatocitos mediante el empleo del sistema Cre/LoxP. Con el objeto de determinar si estos ratones KO condicionales en células específicas presentaban anomalías en sus características basales, realizamos una comparación entre ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide o en hepatocitos (**IL-6 KO<sub>M</sub>** e **IL-6 KO<sub>H</sub>**, respectivamente) y en sus correspondientes ratones controles IL-6

floxeados (**CTRL FL**). Los resultados de nuestro trabajo indicaron que estas dos cepas de ratones presentaban características fisiológicas normales sin desarrollo de anomalías, siendo similares a las de los ratones **CTRL FL** a nivel basal.

En un estudio previo donde habían generado **ratones KO condicionales de IL-6 en astrocitos**, se había observado que tampoco existía un fenotipo evidente en dichos ratones. En dicho estudio, encontraron que la mortalidad era aproximadamente del 1% en ratones KO condicionales de IL-6 en astrocitos desde el nacimiento hasta que eran separados de sus padres; desde ese momento hasta que los ratones alcanzaban más de cuatro meses de edad, fueron encontradas pocas muertes en la cepa de ratones KO condicionales de IL-6 en astrocitos, y la mayoría de las muertes eran causadas por peleas entre machos (Quintana et al, 2013). En nuestro estudio, en consonancia con estos datos, no existieron cambios en cuanto a la mortalidad entre los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** ó **IL-6 KO<sub>H</sub>** y ratones **CTRL FL**.

Aunque no existió un fenotipo en **ratones KO condicionales de IL-6 en astrocitos**, los ratones machos de esta cepa presentaron un incremento progresivo del peso corporal comparado con ratones **CTRL FL** que fue estadísticamente significativo desde la semana 8 en adelante (Quintana et al, 2013). Por ello, en nuestro estudio evaluamos si existían diferencias en el peso corporal a nivel basal relacionadas con el genotipo de cada ratón. Al contrario que en el estudio de Quintana et al, nosotros encontramos que la ganancia de peso corporal con la edad fue

similar en **ratones IL-6 KO<sub>M</sub>** e **IL-6 KO<sub>H</sub>** en comparación con sus correspondientes ratones controles **CTRL FL**.

Tras una HP, es bien conocido que el peso de los lóbulos remanentes aumenta hasta alcanzar la relación original con el peso corporal total (índice hepático). Así, este parámetro es utilizado comúnmente para cuantificar la regeneración hepática (Assy N, Minuk GY, 1997; Jia 2011). En un estudio previo, se había encontrado que los ratones con deficiencia total de IL-6 presentaban finas alteraciones en la regulación del índice hepático en comparación con ratones salvajes (Sakamoto et al, 1999). Por ello, en nuestro estudio, evaluamos si este parámetro era diferente a nivel basal entre las cepas de **ratones IL-6 KO<sub>M</sub>** ó **IL-6 KO<sub>H</sub>** y sus correspondientes controles **CTRL FL**. A diferencia de lo encontrado en los ratones IL-6 KO sistémicos, este parámetro fue similar a nivel basal en todos los genotipos estudiados.

En nuestro estudio, también confirmamos la ausencia de anormalidades a nivel basal en parámetros sanguíneos generales hematológicos y bioquímicos en los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** e **IL-6 KO<sub>H</sub>** con respecto a sus correspondientes controles **CTRL FL**. En resumen, los resultados de nuestro trabajo indican que los ratones **generados por primera vez con una deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide o en hepatocitos mediante el sistema Cre/LoxP presentan características fisiológicas y parámetros sanguíneos hematológicos y bioquímicos normales.**

#### 4.- ¿CUÁL ES LA FUENTE DE IL-6 TRAS UNA HP?

En los últimos años ha existido una gran controversia en cuanto al papel de la IL-6 en la regeneración hepática (Taub 2004; Fausto et al 2006; Böhm et al, 2010). Una posible explicación a las discrepancias encontradas en cuanto al papel de IL-6 en la regeneración hepática podría ser que la fuente celular de IL-6 en el proceso regenerativo fuera relevante, de forma que la IL-6 de distintas células podría producir distintos efectos durante la regeneración hepática. Esta posibilidad se ha obviado sistemáticamente dado que la mayor parte de la comunidad científica acepta que las células de Kupffer son la principal fuente de IL-6 tras una HP (Aldeguer et al, 2002; Taub 2004; Michalopoulos 2007; Böhm, et al 2010). Sin embargo, existen evidencias de que otros tipos celulares, como los hepatocitos, son capaces de producir IL-6 durante la regeneración hepática (Klein et al, 2005; Norris et al, 2014).

Con el objeto de determinar el origen de IL-6 tras una HP, realizamos una comparación de la producción de IL-6 entre ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de Kupffer y en hepatocitos (**IL-6 KO<sub>M</sub>** e **IL-6 KO<sub>H</sub>**, respectivamente) y sus correspondientes ratones controles (**CTRL FL**) tras una HP. Los resultados de nuestro trabajo indican que las células de Kupffer no son las únicas responsables de la producción de IL-6 circulante en ratones sometidos a una HP.

En estudios previos con ratones KO condicionales de una proteína sometidos a una HP, para investigar el papel de una determinada proteína en la regeneración hepática se evaluaba la expresión del ARNm de esa proteína a nivel local (hígado) y la

producción de esa proteína en suero (Wen et al, 2015; Xu et al, 2015). En nuestro estudio, encontramos una inducción atenuada de la expresión del ARNm de IL-6 en el hígado en **ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe sometidos a una HP**. Estos resultados apoyaban la idea de que las células de Kupffer eran las principales responsables de la producción de IL-6 localmente en el hígado remanente (Böhm et al, 2010). Nuestros datos sugieren también que la IL-6 puede ser producida a nivel basal en el hígado y que las células responsables de esta producción basal de IL-6 serían las células de Kupffer.

Uno de los principales hallazgos de nuestro estudio fue que **la deficiencia de IL-6 en células de estirpe mieloide no afectaba a la concentración de IL-6 circulante tras una HP**, a pesar de la reducción en la expresión del ARNm de IL-6 encontrada en ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>**. Estos resultados sugieren que otras células además de los macrófagos hepáticos y extra-hepáticos son capaces de producir IL-6 tras una HP, como otros estudios habían sugerido previamente (Böhm et al, 2010; Norris et al, 2014).

En este sentido, estudios previos habían mostrado que los hepatocitos eran capaces de sintetizar IL-6 tras una HP (Coudriet et al, 2010; Norris et al, 2014). Sin embargo, en nuestro estudio encontramos que **la deficiencia de IL-6 en hepatocitos** no atenuaba la expresión del ARNm de IL-6 en el hígado, sino que tendía a aumentar en comparación con ratones **CTRL FL**. En el estudio de Norris et al, se proponía que el hígado era expuesto tras una HP a endotoxinas

intestinales capaces de promover la producción de IL-6 por parte de las células de Kupffer y de los hepatocitos (Norris et al, 2014). Dado que estudios previos habían demostrado que HGF puede suprimir la producción de IL-6 en macrófagos (Coudriet et al, 2010) y promover la producción de IL-6 en hepatocitos (Stolz et al, 1999), la combinación de ambos datos abre la posibilidad de que el aumento de HGF tras una HP resulte en la supresión de la producción de IL-6 en macrófagos junto con la inducción simultánea de la producción de IL-6 en hepatocitos (Norris et al, 2014). Un posible escenario, por tanto, es que el aumento de IL-6 sea debido principalmente a células de Kupffer a las pocas horas tras la HP (2 horas) y que, tras el aumento de los niveles de HGF en plasma (1-3 horas) (Pediaditakis et al, 2001), la producción de IL-6 por células de Kupffer fuese abolida y aumentase la producción de IL-6 por parte de los hepatocitos. Dado que en nuestro estudio no evaluamos la expresión de ARNm de IL-6 en el hígado en tiempos más tardíos a las 2 horas, no podemos proporcionar información al respecto. Sin embargo, la persistencia de niveles circulantes de IL-6 a las 6 horas tras la HP similares en los ratones KO condicionales y en sus respectivos controles hace poco probable tal posibilidad.

Interesantemente, **la deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos** tampoco afectó a los niveles de IL-6 circulante, que fueron similares a los ratones **CTRL FL**. Estos resultados sugieren que otros tipos celulares son capaces de producir IL-6 tras una HP, además de los hepatocitos. En este sentido, es bien conocido que la IL-6 puede ser sintetizada por distintos tipos celulares y en el contexto de la

regeneración hepática, otras células presentes en el hígado como son las células endoteliales y las células epiteliales biliares, se ha mostrado que podrían constituir otra fuente de IL-6 durante la regeneración hepática (Loffreda et al, 1997).

En resumen, este trabajo desafía el concepto pre-establecido de que las células de Kupffer constituyen la principal fuente de IL-6 tras una HP, indicando que otros tipos celulares podrían producir esta citocina durante el proceso regenerativo.

## **5.- ¿TIENE LA FUENTE CELULAR DE IL-6 UN IMPACTO SOBRE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE ESTA CITOCINA O SOBRE LA REGENERACIÓN HEPÁTICA TRAS UNA HP?**

En estudios previos se había mostrado que en Biología es de gran importancia la localización y la compartimentación de enzimas y mediadores para determinar su función (Shaul 2002). Por este motivo, nos planteamos que la IL-6 procedente de distintas fuentes celulares (células de Kupffer vs. hepatocitos) tras una HP, podría tener un efecto diferente sobre la señalización de IL-6 y en el desarrollo de la regeneración hepática tras una HP.

Con el objeto de determinar el efecto de la deficiencia selectiva de IL-6 en células de Kupffer o en hepatocitos en cuanto a la señalización de IL-6 y al desarrollo de la regeneración hepática tras una HP, realizamos una comparación de diversos parámetros de las vías de señalización de la IL-6 en el hígado remanente tras una HP así como de

parámetros de proliferación celular entre ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de Kupffer o en hepatocitos (**IL-6 KO<sub>M</sub>** o **IL-6 KO<sub>H</sub>**, respectivamente) y sus correspondientes ratones controles IL-6 floxeados (**CTRL FL**). Los resultados de nuestro trabajo indicaron que la deficiencia selectiva de IL-6 en los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** e **IL-6 KO<sub>H</sub>** sometidos a una HP sólo resultó en un aumento de la expresión de pSTAT-3 a determinados tiempos tempranos, que en el caso de los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** se acompañó de una aceleración parcial del inicio y el fin de la proliferación de los hepatocitos.

➤ Vías de señalización de IL-6

En el hígado, la principal ruta de señalización de IL-6 tras una HP es la ruta IL-6/JAK/STAT-3 que promueve la expresión de genes implicados en la regeneración hepática, la respuesta de fase aguda y hepatoprotección (Taub 2004; Fausto et al 2006; Jia 2011). STAT-3 es un factor de transcripción que se encuentra basalmente inactivo en el citoplasma hasta que es activado (pSTAT-3) (Reich NC, Liu L, 2006) por ligandos como IL-6 (Rawlings et al, 2004; Brantley EC, Benveniste EN, 2008; Abroun et al, 2015). En ratones IL-6 KO sistémicos, se demostró que STAT-3 era inducido por IL-6 a tiempos tempranos tras una HP, sugiriendo que IL-6 podía ser un inductor del proceso regenerativo a través de STAT-3 (Cressman et al, 1996).

En nuestro estudio, encontramos que **la eliminación selectiva de IL-6 en células de Kupffer** se tradujo en un aumento de la activación de STAT-3 en hígado a los 30 minutos tras una HP. Estudios previos habían observado una atenuada expresión de pSTAT-3 en

ratones IL-6 KO sistémicos sometidos a una HP (Cressman et al, 1996) y una expresión aumentada de pSTAT-3 tras la administración de altos niveles de IL-6 en ratones inmunodeficientes (Zimmers et al, 2003). Sin embargo, estos resultados no concuerdan con otros estudios con ratones con deficiencia selectiva de gp130 (receptor de IL-6) en hepatocitos inducida por IFN- $\alpha$ , donde altos niveles de IL-6 se relacionaban con una expresión atenuada de STAT-3 (Wuestefeld et al, 2003). Estos resultados contradictorios con respecto a la activación/fosforilación de STAT-3 en la regeneración hepática podrían ser debidos al uso de ratones con diferentes background genéticos, a distintos procedimientos quirúrgicos o a los diferentes procedimientos anestésicos empleados (Böhm et al, 2010; Wang et al, 2011).

Además, encontramos que los ratones **no operados con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide** presentaban un aumento basal de la expresión de pSTAT-3. Junto a la atenuada expresión del ARNm de IL-6 en los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub> no operados**, estos resultados sugieren que IL-6 procedente de fuentes celulares distintas a las células de Kupffer contribuyen a la activación de STAT-3 tras una HP.

En el caso de **ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en hepatocitos**, en nuestro estudio encontramos que aumentaba la expresión de pSTAT-3 a las dos horas tras una HP en comparación con ratones **CTRL FL**. En estudios en los que se eliminó conjuntamente de forma condicional STAT-3 en hepatocitos y en células mieloides, se encontró una reducción drástica de la supervivencia comparado con

animales salvajes o con ratones KO condicionales de STAT-3 sólo para hepatocitos o sólo para células mieloides. Estos resultados sugerirían que la interacción de STAT-3 entre hepatocitos y células mieloides juega un papel importante en asegurar el desarrollo de una regeneración hepática normal mediante un balance entre la respuesta inflamatoria innata del hígado y sistémica (Wang et al, 2010; Wang et al, 2011). Para poder elucidar correctamente el efecto de la deficiencia selectiva de IL-6 en células de Kupffer y en hepatocitos, serían necesarios estudios donde se eliminará conjuntamente de forma condicional IL-6 en células mieloides y en hepatocitos y posteriormente, se evaluará la síntesis de pSTAT-3 tras una HP.

En ratones sometidos a una HP, se había encontrado que IL-6 también contribuía a la activación de otra ruta de señalización que implicaba la inducción de la proteína quinasa ERK 1/2 (Dierssen et al, 2008; Eulenfeld et al, 2012). Esta ruta de señalización de las MAPK era conocida por estar implicada en procesos celulares que mantenían la supervivencia celular y que promovían la proliferación celular (Ogata et al, 1997; Schiemann et al, 1997; Heinrich et al, 2003; Rawlings et al, 2004; Fremin et al, 2009). Además, la señalización de IL-6 también inducía la ruta de PI3K/AKT (Takahashi-Tezuka et al, 1998; Heinrich et al, 2003). Esta ruta estaba implicada en funciones de protección frente apoptosis y en aumentar la proliferación de células de mieloma múltiple (Jee et al, 2002; Hsu et al, 2002; Heinrich et al, 2003).

En nuestro estudio, encontramos que **la deficiencia selectiva de IL-6 en células de Kupffer o en hepatocitos** no afectaba a la síntesis

de pERK ni pAKT a los distintos tiempos estudiados tras una HP. En estudios previos con ratones KO condicionales de SOCS-3 en hepatocitos, se había observado que la ausencia de SOCS-3 aumentaba la proliferación de los hepatocitos en asociación con una incrementada activación de ERK 1/2 (Talarmin et al, 1999; Riehle et al, 2008). En nuestro estudio, no observamos una activación de ERK1/2 en el hígado en los tiempos evaluados tras la cirugía. Posiblemente, la falta de grandes diferencias en todos los parámetros de las vías de señalización de la IL-6 en el hígado sea debida a que la concentración de IL-6 circulante fue similar entre ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** ó **IL-6 KO<sub>H</sub>** y sus correspondientes controles **CTRL FL**.

IL-6 juega además un papel importante en regular su propia ruta de señalización, e induce a través de STAT-3 la expresión del inhibidor SOCS-3 (Libermann TA, Baltimore D, 1990; Taub 2004; Fausto et al 2006; Jia 2011). En nuestro estudio, encontramos que la expresión de SOCS-3 fue similar en ratones con **deficiencia selectiva de IL-6 en células de Kupffer** o en **hepatocitos** y en sus respectivos controles IL-6 floxeados. Estos resultados están en concordancia con lo descrito previamente en la literatura, esto es, que la inducción de SOCS-3 tras una HP depende de la señalización de IL-6 (Böhm et al, 2010). En escenarios distintos de la HP, existen un gran número de estímulos, aparte de la familia de proteínas de la IL-6, capaces de inducir la expresión de SOCS-3 en función del tipo celular (Adams et al, 1998; Bode et al, 1999; Stoiber et al, 1999; Jegalian AG, Wu H, 2002; Canfield et al, 2005; Yadav et al, 2005; Sands et al, 2006; Strengell et al, 2006;

Qin et al, 2006; Qin et al, 2007). En cualquier caso, era esperable no encontrar grandes alteraciones en la inducción de SOCS-3 en el tejido hepático, dado que la concentración de IL-6 circulante en nuestro estudio fue similar en ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** ó **IL-6 KO<sub>H</sub>** en comparación con ratones **CTRL FL**.

En resumen, la ausencia de IL-6 en células de Kupffer o en hepatocitos afectó ligeramente a la señalización de IL-6 a través de STAT-3 tras una HP, pero no afectó a otras vías de señalización mediadas por IL-6 ni a la expresión de SOCS-3, uno de los principales inhibidores de la ruta IL-6/JAK/STAT-3.

➤ Proliferación de hepatocitos

Estudios iniciales en los que la proliferación de los hepatocitos estaba retrasada en los animales carentes de IL-6 tras una HP condujeron a la idea de que la IL-6 era esencial para la regeneración hepática (Cressman et al, 1996; Taub et al, 1999; Fausto et al, 2006; Böhm et al, 2010). Sin embargo, posteriormente se mostró que algunos de los ratones KO para IL-6 no tenían ningún retraso en la proliferación de los hepatocitos, presentando una regeneración hepática normal (Blindenbacher et al, 2003). Estos resultados sugerían que el efecto proliferativo de la IL-6 no era esencial para la regeneración hepática. Datos posteriores han sugerido que IL-6 tiene efectos anti-apoptóticos y promueve la supervivencia de los hepatocitos (Sakamoto et al, 1999; Blindenbacher et al, 2003; Wuestefeld et al, 2003) y efectos anti-proliferativos (Wüstefeld et al, 2000; Vaquero et al, 2011). A la vista de estos resultados, parece que la IL-6 induce una respuesta adaptativa

tras la HP que sería requerida para la supervivencia de los hepatocitos y que el nivel exacto de esta citocina tras una HP podría ser un factor crítico en determinar sus efectos (Blindenbacher et al, 2003; Zimmers TA, Pierce RH, et al, 2003).

En este sentido, un hallazgo importante de nuestro estudio fue que **la deficiencia selectiva de IL-6 en células de Kupffer** supuso una aceleración de la síntesis de ADN, en comparación con ratones **CTRL FL**, como se valoró por IHQ de BrdU. Sin embargo, a los 7 días tras una HP, los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** no presentaron síntesis de ADN en hepatocitos, indicando que estos animales podrían haber finalizado la regeneración hepática más pronto que los ratones **CTRL FL**. Este efecto fue específico de la fase S y no se tradujo en modificaciones en parámetros de proliferación que reflejan otras fases del ciclo celular, como la IHQ de PCNA, las mitosis de hepatocitos, la síntesis de ciclina D1, o en la evolución del ratio del hígado frente al peso corporal. Los parámetros bioquímicos de daño hepático también fueron similares en ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** y sus **CTRL FL** tras una HP. Quizás un considerable aumento del tamaño muestral pudiese haber revelado pequeñas alteraciones en alguno de esos parámetros.

La aceleración de la síntesis de ADN en hepatocitos de ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>** sugiere un efecto antiproliferativo de la IL-6 derivada de las células de Kupffer. Esta posibilidad estaría en concordancia con estudios previos en los que se detectó un aumento de la proliferación de hepatocitos tras la eliminación selectiva de las células de Kupffer (Boulton et al, 1998), así como en estudios con ratones MyD88 (MyD88-

/-) en los que una activación defectuosa de IL-6 se asoció a un inicio acelerado de la regeneración hepática (Vaquero et al, 2011). En el caso de los ratones **IL-6 KO<sub>H</sub>**, la medida de distintos parámetros usados para cuantificar la regeneración hepática resultó en ausencia de diferencias entre ratones **IL-6 KO<sub>H</sub>** y sus correspondientes controles **CTRL FL**.

En conjunto, los resultados de nuestro trabajo sugieren que la IL-6 procedente de las células de Kupffer y de los hepatocitos tiene tan solo efectos sutiles (aunque detectables) en la señalización por IL-6 en el hígado y en el desarrollo de la regeneración hepática.

## **6.- ¿EXISTEN FUENTES CELULARES EXTRAHEPÁTICAS DE IL-6 EN RATONES TRAS UNA HP?**

Según los experimentos realizados, el aumento de la concentración de IL-6 circulante tras una HP no se vió afectado ni por la ausencia de IL-6 en las células de estirpe mieloide ni en los hepatocitos. Estos resultados sugerían la existencia de fuentes celulares de IL-6 distintas a las células de Kupffer, así como de posibles fuentes extrahepáticas de la misma. Con el fin de evaluar el origen de IL-6 tras una HP, evaluamos la concentración de IL-6 circulante y en el lavado peritoneal, y la expresión del ARNm de IL-6 en distintos órganos extrahepáticos. Los resultados de nuestro trabajo indican que el peritoneo tiene un alto contenido de IL-6 tras la HP, probablemente producida por el mesenterio, que determina en gran medida la concentración de IL-6 circulante tras la cirugía. Más aún, la inducción de la expresión del ARNm de IL-6 encontrada en el bazo, intestino y

pulmón sugieren que la producción de IL-6 en las primeras horas tras una HP es un fenómeno sistémico. Junto con la ausencia de efectos sobre la concentración de IL-6 circulante encontrada en los ratones **IL-6 KO<sub>M</sub>**, es poco probable que las células mieloides sean las responsables de la producción sistémica de IL-6 en los órganos mencionados.

En un estudio previo, se planteó la hipótesis de que en el lavado peritoneal podrían existir células que contribuyeran a la producción de IL-6 circulante tras una HP (Vaquero et al, 2011). En el presente estudio, demostramos que la elevación de IL-6 tras una HP fue mayor en el lavado peritoneal que en el plasma, existiendo una estrecha correlación entre la concentración de IL-6 en ambos lugares.

En nuestro estudio con células del lavado peritoneal (**grupo pre-aislamiento**) y macrófagos peritoneales (**grupo post-aislamiento**) de ratones controles (**CTRL FL**), encontramos que los niveles de IL-6 producidos tras estimular con LPS eran mucho mayores en el grupo pre-aislamiento que en el grupo post-aislamiento, sugiriendo que en el lavado peritoneal, aparte de macrófagos, otras células pueden contribuir a la producción de IL-6. En este sentido, entre las células presentes en el lavado peritoneal se encuentran células inmunes y mesoteliales que podrían contribuir a la producción de IL-6 tras una HP. Aunque la drástica inducción de la expresión del ARNm de IL-6 en el mesenterio tras una HP apunta un posible origen, son necesarios más estudios para conocer con precisión cuál es la fuente celular de IL-6 en el peritoneo. En este sentido, sería interesante comprobar la

expresión de la proteína IL-6 en las células obtenidas del lavado peritoneal mediante citometría de flujo (sorting).

Además, en nuestro estudio encontramos que los niveles de IL-6 fueron mayores en los ratones sometidos a las laparotomías SHAM que en los ratones no operados tanto en plasma como en el lavado peritoneal, sin encontrar diferencias en las distintas duraciones de las cirugías SHAM de menos de 16 min. De forma que un simple acceso a la cavidad peritoneal con una sutil manipulación de las vísceras sin resección de la masa hepática elevó los niveles de IL-6. En este sentido, hay muchos factores que pueden influir en la producción de la IL-6 después de la HP como es el sistema del complemento, el receptor de linfotóxina B, el receptor de TNF-1, TLR-3, TLR-4 e ICAM-1 (Selzner et al, 2003; Zorde-Khvalevsk et al, 2009), pero estas y otras vías también podrían estar implicadas en la producción de IL-6 directamente desde el peritoneo sin relación con la HP.

La elevación de la IL-6 en plasma estuvo relacionada con la cantidad de masa hepática reseçada, pero dicha relación pareció perderse en el caso de la IL-6 en el peritoneo. Así, en una HP del 70%, la concentración de IL-6 en plasma (pero no en el peritoneo) se elevó más que en una HP del 30%. La falta de correlación entre la concentración de IL-6 en el peritoneo y el grado de la resección sugieren que existen otros factores implicados en la síntesis de IL-6 desde el peritoneo. Aunque estudios con un mayor tamaño muestral serían necesarios para confirmar este hallazgo.

Es bien conocido que IL-6 puede ser sintetizada por distintos tipos celulares distintos a los monocitos y macrófagos, como por ejemplo las células T, células B, fibroblastos o células endoteliales (Schmidt-Arras D, Rose-John S, 2016). Cualquiera de estas fuentes celulares podría ser responsable de la inducción de la expresión del ARNm de IL-6 observada en el mesenterio, el bazo, el intestino o el pulmón tras una HP. En este sentido, sería interesante realizar una hibridación in situ de IL-6 en estos tejidos para intentar elucidar el origen celular de IL-6 en la regeneración hepática.

Además, en un estudio reciente se ha mostrado que células madre mesenquimales presentes en la médula ósea o en otros tejidos mesenquimales, son capaces de aumentar la regeneración hepática tras una HP en ratones normales y en ratones con esteatosis y regeneración hepática defectuosa (Ezquer et al, 2017). Dado que estas células mesenquimales son capaces de secretar IL-6 (Xagorari et al, 2013; Ezquer et al, 2017), estas células podrían ser también posibles candidatos para explicar la producción de IL-6 desde el propio hígado o en tejidos extrahepáticos tras una HP.

En resumen, los experimentos realizados sugieren que el aumento de IL-6 circulante tras una HP es un fenómeno sistémico no dependiente de células de estirpe mieloide ni de hepatocitos. La cavidad peritoneal y el mesenterio parecen ser responsables en gran medida del aumento de IL-6 circulante tras la cirugía, aunque el bazo, el intestino y el pulmón también podrían estar implicados.

## **IX.- CONCLUSIONES**

---



El presente trabajo proporciona información novedosa que ayuda a entender la biología de la IL-6 en la regeneración hepática. Las conclusiones derivadas de los resultados de nuestro trabajo son las siguientes:

1. La utilización de la técnica de HP modificada es preferible a la técnica tradicional en los estudios de regeneración hepática en ratones, ya que consigue una resección hepática más reproducible y cercana al 70% de masa hepática sin aumentar las complicaciones. Sin embargo, las modificaciones introducidas en la técnica, con la preservación de la vesícula biliar, no disminuyeron el desarrollo de necrosis hepatocelular, que ocurrió en un bajo porcentaje de ratones independientemente de la técnica utilizada.
2. Los resultados en los ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide o en hepatocitos utilizados en el presente trabajo:
  - i. Apoyan la noción clásica de las células de Kupffer como principal fuente de IL-6 en el hígado tras una HP, dada la atenuada inducción del ARNm de IL-6 encontrada localmente en el hígado de ratones con deficiencia selectiva de IL-6 en células de estirpe mieloide.
  - ii. Demuestran la existencia de fuentes celulares de IL-6, distintas de las células de estirpe mieloide (incluyendo las células de Kupffer) y de los hepatocitos, que no han sido

identificadas hasta ahora y que son las principales responsables del aumento de IL-6 en la circulación sanguínea tras una HP.

- iii. Sugieren que la IL-6 producida por las células de Kupffer u otras células de estirpe mieloide tan solo tiene sutiles efectos moduladores negativos sobre la señalización precoz de IL-6 en hígado y sobre la proliferación de hepatocitos tras una HP, que no afectan a la recuperación final de la masa hepática.
- iv. Sugieren que la IL-6 producida por los hepatocitos tiene mínimos efectos sobre la señalización precoz de IL-6 en tejido hepático tras una HP, no afectando el desarrollo global de la regeneración hepática.

3. Revelan que la inducción de la producción de IL-6 tras una HP no es un fenómeno limitado al hígado, sino que ocurre a nivel sistémico en diversos órganos como el bazo, el pulmón o el intestino. En particular, los resultados del presente trabajo apuntan a la producción de IL-6 por el mesenterio y a su liberación a la cavidad peritoneal como principal determinante de la elevación de la IL-6 en la circulación sanguínea tras una HP.

## **X.- BIBLIOGRAFÍA**

---



- Abbas AK, Litchman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 2015. Pages 75,162-163. Elsevier. Philadelphia.
- Abroun S, Saki N, Ahmadvand M, Asghari F, Salari F, Rahim F. STATs: An old story, yet mesmerizing. *Cell J.* 2015;17(3):395-411.
- Adams TE, Hansen JA, Starr R, Nicola NA, Hilton DJ, Billestrup N. Growth hormone preferentially induces the rapid, transient expression of SOCS-3, a novel inhibitor of cytokine receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 1998;273:1285-1287.
- Akagi K, Sandig V, Vooijs M, Van der Valk M, Giovannini M, Strauss M, Berns A. Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:1766-1773.
- Akira S. IL-6-regulated transcription factors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1997;29:1401-1418.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2001;2(8):675-80.
- Albrecht JH, Hoffman JS, Kren BT, Steer CJ. Cyclin and cyclin-dependent kinase 1 mRNA expression in models of regenerating liver and human liver diseases. *Am. J. Physiol.* 1993;265:G857-864.
- Aldeguer X, Debonera F, Shaked A, Krasinkas AM, Gelman AE, Que X, Zamir GA, Hiroyasu S, Kovalovich KK, Taub R, Olthoff KM. Interleukin-6 from intrahepatic cells of bone marrow origin is required for normal murine liver regeneration. *Hepatology* 2002;35(1):40-48.
- Aller MA, Mendez M, Nava MP, Lopez L, Arias JL, Arias J. The value of microsurgery in liver research. *Liver Int.* 2009;29:1132-1140.
- Apte U, Gkretsi V, Bowen WC, Mars WM, Luo JH, Donthamsetty S, Orr A, Monga SP, Wu C, Michalopoulos GK. Enhanced liver regeneration following changes induced by hepatocyte-specific genetic ablation of integrin-linked kinase. *Hepatology* 2009;50:844-851.
- Argast GM, Campbell J, Brooling JT, Fausto N. Epidermal growth factor receptor transactivation mediates tumor necrosis factor-induced hepatocyte replication. *J. Biol. Chem.* 2004;279:34530-34536.
- Arthur MJP. Matrix degradation in the liver: a role in injury and repair. *Hepatology* 1997;26:1069-1071.
- Assy N, Minuk GY. Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. *J. Hepatol.* 1997;26(4):945-952.
- Atreya R, Mudter J, Finotto S, Müllberg J, Jostock T, Wirtz S, Schütz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schürmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF. Blockade of interleukin-6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn's disease and experimental colitis in vivo. *Nat. Med.* 2000;6:583-588.
- Barkhausen T, Tschernig T, Rosenstiel P, van Griensven M, Vonberg RP, Dorsch M, Mueller-Heine A, Chalaris A, Scheller J, Rose-John S, Seegert D, Krettek C, Waetzig GH. Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model. *Crit. Care Med.* 2011; 39:1407-1413.
- Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol. Today* 1994;15:74-80.
- Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, Burg J, Strand S, Kiesslich R, Huber S, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Galle PR, Blessing M, Rose-John S, Neurath MF. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 2004;21:491-501.

Behrens A, Sibilía M, David JP, Mohle-Steinlein U, Tronche F, Schutz G, Wagner EF. Impaired postnatal hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice lacking c-jun in the liver. *EMBO J* 2002;21:1782-1790.

Bellezza I, Neuwirt H, Nemes C, Cavarretta IT, Pühr M, Steiner H, Minelli A, Bartsch G, Offner F, Hobisch A, Doppler W, Culig Z. Suppressor of cytokine signaling-3 antagonizes cAMP effects on proliferation and apoptosis and is expressed in human prostate cancer. *Am. J. Pathol.* 2006;169:2199-2208.

Benveniste R, Danoff TM, Ilekiš J, Craig HR. Epidermal growth factor receptor numbers in male and female mouse primary hepatocyte cultures. *Cell Biochem. Funct.* 1988;6(4):231-235.

Benvenuti S, Comoglio PM. The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis. *J. Cell Physiol.* 2007;213:316-325.

Berasain C, Garcia-Trevijano ER, Castillo J, Erroba E, Lee DC, Prieto J, Avila MA. Amphiregulin: an early trigger of liver regeneration in mice. *Gastroenterology* 2005;128:424-432.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235-238.

Blanchard F, Wang Y, Kinzie E, Duplomb L, Godard A, Baumann H. Oncostatin M regulates the synthesis and turnover of gp130, leukemia inhibitory factor receptor  $\alpha$ , and oncostatin M receptor  $\beta$  by distinct mechanisms. *J. Biol. Chem.* 2001;276:47038-47045.

Blindenbacher A, Wang X, Langer I, Savino R, Terracciano L, Heim MH. Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* 2003;38:674-682.

Block GD, Locker J, Bowen WC, Petersen BE, Katyal S, Strom SC, Riley T, Howard TA, Michalopoulos GK. Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. *J. Cell Biol.* 1996;132:1133-1149.

Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KJ, Litt GJ. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. *J. Immunol. Methods* 1989;125:279-285.

Bode JG, Albrecht U, Häussinger D, Heinrich PC, Schaper F. Hepatic acute phase proteins—regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF- $\kappa$ B-dependent signaling. *Eur. J. Cell Biol.* 2012;91:496-505.

Bode JG, Nimmesgern A, Schmitz J, Schaper F, Schmitt M, Frisch W, Häussinger D, Heinrich PC, Graeve L. LPS and TNF $\alpha$  induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages. *FEBS Lett.* 1999;463:365-370.

Boekholdt SM, Stroes ES. The interleukin-6 pathway and atherosclerosis. *Lancet* 2012; 379:1176-1178.

Böhm F, Köhler UA, Speicher T, Werner S. Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. *EMBO Mol. Med.* 2010;2:294-305.

Bondue B, De Henau O, Luangsay S, Devosse T, De Nadai P, Springael JY, Parmentier M, Vosters O. The chemerin/ChemR23 system does not affect the pro-inflammatory response of mouse and human macrophages ex vivo. *PLoS ONE* 2012;7:e40043

Borowiak M, Garratt AN, Wustefeld T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C. Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004;101:10608-10613.

Boulanger MJ, Chow DC, Brevnova EE, Garcia KC. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha receptor/gp130 complex. *Science* 2003;300:2101-2104.

Boulton RA, Alison MR, Golding M, Selden C, Hodgson HJ. Augmentation of the early phase of liver regeneration after 70% partial hepatectomy in rats following selective Kupffer cell depletion. *J Hepatol.* 1998;29(2):271-280.

Bouzahzah B, Fu M, Iavarone A, Factor VM, Thorgeirsson SS, Pestell RG. Transforming growth factor-beta1 recruits histone deacetylase 1 to a p130 repressor complex in transgenic mice in vivo. *Cancer Res.* 2000;60:4531-4537.

Boyce S, Harrison D. A detailed methodology of partial hepatectomy in the mouse. *Lab. Anim. (NY)* 2008;37:529-532.

Boyle K, Zhang JG, Nicholson SE, Trounson E, Babon JJ, McManus EJ, Nicola NA, Robb L. Deletion of the SOCS box of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in embryonic stem cells reveals SOCS box-dependent regulation of JAK but not STAT phosphorylation. *Cell Signal.* 2009;21(3):394-404.

Brantley EC, Benveniste EN. Signal transducer and activator of transcription-3: a molecular hub for signaling pathways in gliomas. *Mol. Cancer Res.* 2008;6: 675-684.

Brocker C, Thompson D, Matsumoto A, Nebert DW, Vasiliou V. Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family. *Hum. Genomics* 2010;5:30-55.

Brown KA, Pietenpol JA, Moses HL. A tale of two proteins: differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF-beta signaling. *J. Cell Biochem.* 2007;101:9-33.

Brown NJ, Hutcheson J, Bickel E, Scatizzi JC, Albee LD, Haines GK. III, Eslick J, Bradley K, Taricone E, Perlman, H. Fas death receptor signaling represses monocyte numbers and macrophage activation in vivo. *J. Immunol.* 2004;173: 7584-7593.

Brun P, Castagliuolo I, Pinzani M, Palu G, Martines D. Exposure to bacterial cell wall products triggers an inflammatory, phenotype in hepatic stellate cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2005;289:G571-G578.

Bucher NL, Patel U, Cohen S. Hormonal factors concerned with liver regeneration. *Ciba Found Symp.* 1977;55:95-107.

Burr AW, Toole K, Chapman C, Hines JE, Burt AD. Antihepatocyte growth factor antibody inhibits hepatocyte proliferation during liver regeneration. *J. Pathol.* 1998;185:298-302.

Bustos M, Beraza N, Lasarte JJ, Baixeras E, Alzuguren P, Bordet T, Prieto J. Protection against liver damage by cardiotrophin-1: a hepatocyte survival factor up-regulated in the regenerating liver in rats. *Gastroenterology* 2003;125:192-201.

Cacalano NA, Sanden D, Johnston JA. Tyrosine-phosphorylated SOCS-3 inhibits STAT activation but binds to p120 RasGAP and activates Ras. *Nat. Cell. Biol.* 2001;3:460-465.

Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 1989;244:1288-1292.

Cain K, Freathy C. Liver toxicity and apoptosis: role of TGF-beta1, cytochrome c and the apoptosome. *Toxicol. Lett.* 2001;120:307-315.

Camargo CA, Jr., Madden JF, Gao W, Selvan RS, Clavien PA. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology* 1997;26:1513-1520.

Campbell JS, Prichard L, Schaper F, Schmitz J, Stephenson-Famy A, Rosenfeld ME, Argast GM, Heinrich PC, Fausto N. Expression of suppressors of cytokine signaling during liver regeneration. *J Clin. Invest.* 2001;107:1285-1292.

Campbell JS, Riehle KJ, Brooling JT, Bauer RL, Mitchell C, Fausto N. Proinflammatory cytokine production in liver regeneration is Myd88-dependent, but independent of Cd14, Tlr2, and Tlr4. *J. Immunol.* 2006;176:2522-2528.

Canfield S, Lee Y, Schroder A, Rothman P. Cutting edge: IL-4 induces suppressor of cytokine signaling-3 expression in B cells by a mechanism dependent on activation of p38 MAPK. *J. Immunol.* 2005;174:2494-2498.

Chalaris A, Gewiese J, Paliga K, Fleig L, Schneede A, Krieger K, Rose-John S, Scheller J. ADAM17-mediated shedding of the IL6R induces cleavage of the membrane stub by gamma-secretase. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010;1803:234-245.

Chari RS, Price DT, Sue SR, Meyers WC, Jirtle RL. Down-regulation of transforming growth factor beta receptor type I, II, and III during liver regeneration. *Am. J. Surg.* 1995;169:126-131.

Chen LP, Guo YB, Shi BY. [Role of rapamycin in cholangiocytes regeneration after liver transplantation]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2011;91(22):1523-1528.

Chen Q, Fisher DT, Clancy KA, Gauguier JM, Wang WC, Unger E, Rose-John S, von Andrian UH, Baumann H, Evans SS. Fever-range thermal stress promotes lymphocyte trafficking across high endothelial venules via an interleukin 6 trans-signaling mechanism. *Nat. Immunol.* 2006;7:1299-1308.

Chen Q, Wang WC, Bruce R, Li H, Schleider DM, Mulbery MJ, Bain MD, Wallace PK, Baumann H, Evans SS. Central role of IL-6 receptor signal-transducing chain gp130 in activation of L-selectin adhesion by fever-range thermal stress. *Immunity* 2004;20:59-70.

Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat. Immunol.* 2000;1:510-514.

Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 1997; 278:1803-1805.

Claman HN, Chaperon EA, Selner JC. Thymus-marrow immunocompetence. 3. The requirement for living thymus cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1968;127:462-466.

Cobb L. Cell based assay: the cell cycle, cell proliferation and cell death. *Materials and Methods.* 2013;3:172.

Commins SP, Borish L, Steinke JW. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010;125:S53-S72.

Comoglio PM. Pathway specificity for Met signalling. *Nat. Cell Biol.* 2001;3:E161-162.

Copp AJ. Death before birth: clues from gene knockouts and mutations. *Trends Genet.* 1995;11:87-93.

Coudriet GM, He J, Trucco M, Mars WM, Piganelli JD. Hepatocyte growth factor modulates interleukin-6 production in bone marrow derived macrophages: implications for inflammatory mediated diseases. *PLoS One* 2010;5:e15384.

Cornell RP. Gut-derived endotoxin elicits hepatotrophic factor secretion for liver regeneration. *Am J Physiol.* 1985;249:R551-562.

Cornell RP, Liljquist BL and Bartizal KF. Depressed liver regeneration after partial hepatectomy of germ-free, athymic and lipopolysaccharide-resistant mice. *Hepatology* 1990;11:916-922.

Cressman DE, Diamond RH, Taub R. Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration. *Hepatology* 1995; 21(5):1443-1449.

Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R. *Science* 1996;274:1379-1383.

Croker BA, Krebs DL, Zhang JG, Wormald S, Willson TA, Stanley EG, Robb L, Greenhalgh CJ, Förster I, Clausen BE, Nicola NA, Metcalf D, Hilton DJ, Roberts AW, Alexander WS. SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat. Immunol.* 2003;4:540-545.

Cruise JL, Houck KA, Michalopoulos GK. Induction of DNA synthesis in cultured rat hepatocytes through stimulation of alpha 1 adrenoreceptor by norepinephrine. *Science* 1985; 227(4688):749-751.

Curnow SJ, Scheel-Toellner D, Jenkinson W, Raza K, Durrani OM, Faint JM, Rauz S, Wloka K, Pilling D, Rose-John S, Buckley CD, Murray PI, Salmon M. Inhibition of T cell apoptosis in the aqueous humor of patients with uveitis by IL-6/soluble IL-6 receptor trans-signaling. *J. Immunol.* 2004;173:5290-5297.

Da Silva CG, Studer P, Skroch M, Mahiou J, Minussi DC, Peterson CR, Wilson SW, Patel VI, Ma A, Csizmadia E, Ferran C. A20 promotes liver regeneration by decreasing SOCS3 expression to enhance IL-6/STAT3 proliferative signals. *Hepatology* 2013;57(5):2014-2025.

Daniel S, Arvelo MB, Patel VI, Longo CR, Shrikhande G, Shukri T, Mahiou J, Sun DW, Mottley C, Grey ST, Ferran C. A20 protects endothelial cells from TNF-, Fas-, and NK-mediated cell death by inhibiting caspase 8 activation. *Blood* 2004;104:2376-2384.

Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science* 1997;277:1630-1635.

DeAngelis RA, Markiewski MM, Kourtzelis I, Rafail S, Syriga M, Sandor A, Maurya MR, Gupta S, Subramaniam S, Lambris JD. A complement-IL-4 regulatory circuit controls liver regeneration. *J. Immunol.* 2012;188:641-648.

Debbaut C, De Wilde D, Casteleyn C, Cornillie P, Van Loo D, Van Hoorebeke L, Monbaliu D, Fan YD, Segers P. Modeling the impact of partial hepatectomy on the hepatic hemodynamics using a rat model. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2012;59:3293-3303.

Diehl AM, Rai RM. Liver regeneration 3: regulation of signal transduction during liver regeneration. *FASEB J.* 1996;10:215-227.

Diehl S, Rincon M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol. Immunol.* 2002;39:531-536.

Dienz O, Eaton SM, Bond JP, Neveu W, Moquin D, Noubade R, Briso EM, Charland C, Leonard WJ, Ciliberto G, Teuscher C, Haynes L, Rincon M. The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 2009;206:69-78.

Dierssen U, Beraza N, Lutz HH, Liedtke C, Ernst M, Wasmuth HE, Trautwein C. Molecular dissection of gp130-dependent pathways in hepatocytes during liver regeneration. *J Biol Chem.* 2008;283:9886-9989.

Ding BS, Nolan DJ, Butler JM, James D, Babazadeh AO, Rosenwaks Z, Mittal V, Kobayashi H, Shido K, Lyden D, Sato TN, Rabbany SY, Rafii S. Inductive angiocrine signals from sinusoidal endothelium are required for liver regeneration. *Nature* 2010;468:310-315.

Dittrich E, Rose-John S, Gerhartz C, Mullberg J, Stoyan T, Yasukawa K, Heinrich PC, Graeve L. Identification of a region within the cytoplasmic domain of the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 important for ligand-induced endocytosis of the IL-6 receptor. *J. Biol. Chem.* 1994;269:19014-19020.

Dominitzki S, Fantini MC, Neufert C, Nikolaev A, Galle PR, Scheller J, Monteleone G, Rose-John S, Neurath MF, Becker C. Cutting edge: trans-signaling via

the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naïve CD4+CD25 T cells. *J. Immunol.* 2007;179:2041-2045.

Dudas J, Kovalszky I, Gallai M, Nagy JO, Schaff Z, Knittel T, Mehde M, Neubauer K, Szalay F, Ramadori G. Expression of decorin, transforming growth factor-beta 1, tissue inhibitor metalloproteinase 1 and 2, and type IV collagenases in chronic hepatitis. *Am. J. Clin. Pathol.* 2001;115:725-735.

Duval D, Duval G, Kedinger C, Poch O, Boeuf H. The 'PINIT' motif, of a newly identified conserved domain of the PIAS protein family, is essential for nuclear retention of PIAS3L. *FEBS Lett* 2003;554:111-118.

Eddahri F, Denanglaire S, Bureau F, Spolski R, Leonard WJ, Leo O, Andris F. Interleukin-6/STAT3 signaling regulates the ability of naïve T cells to acquire B cell help capacities. *Blood* 2009;113:2426-2433.

Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, Miyazaki T, Leonor N, Taniguchi T, Fujita T, Kanakura Y, Komiyama S, Yoshimura A. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 1997;387:921-924.

Eulenfeld R, Dittrich A, Khouri C, Müller PJ, Mütze B, Wolf A, Schaper F. Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs. *Eur. J. Cell. Biol.* 2012;91(6-7):486-495.

European Commission. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. September 22, 2010.

Ezquer F, Bahamonde J, Huang YL, Ezquer M. Administration of multipotent mesenchymal stromal cells restores liver regeneration and improves liver function in obese mice with hepatic steatosis after partial hepatectomy. *Stem Cell Res. Ther.* 2017;8:20.

Fafalios A, Ma J, Tan X, Stoops J, Luo J, Defrances MC, Zarnegar R. A hepatocyte growth factor receptor (Met)-insulin receptor hybrid governs hepatic glucose metabolism. *Nat. Med.* 2011;17:1577-1584.

Farley FW, Soriano P, Steffen LS, Dymecki SM. Widespread recombinase expression using FLPeR (flipper) mice. *Genesis* 2000;28:106-110.

Fausto N. Liver regeneration. *J. Hepatol.* 2000;32(1):19-31.

Fausto N, Campbell JS. Liver regeneration. In: Arias IM, Alter HJ, Boyer JL, Cohen DE, Fausto N, Shafritz DA, Wolkoff AW (Assoc. Eds) Wiley-Blackwell, West Sussex. The liver: biology and pathobiology. 5th ed. *Oxford: Wiley & Sons.* 2009:549-565.

Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech. Dev.* 2003;120:117-130.

Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006; 43:S45-S53.

Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *J. Hepatol.* 2012;57(3):692-694.

Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, Brakenhoff JP, Kallen KJ, Wollmer A, Grötzinger J, Rose-John S. I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat. Biotechnol.* 1997;15:142-145.

Francavilla A, Ove P, Polimeno L, Coetzee M, Makowka L, Barone M, VanThiel DH, Starzl TE. Regulation of liver size and regeneration: importance in liver transplantation. *Transplant. Proc.* 1988;20:494-497.

Fremin C, Bessard A, Ezan F, Gailhouste L, Regeard M, Le Seyec J, Gilot D, Pagès G, Pouysségur J, Langouët S, Baffet G. Multiple division cycles and long-term

survival of hepatocytes are distinctly regulated by extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2. *Hepatology* 2009;49:930-939.

Friedman SL. Mechanisms of Disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 2004;1(2):98-105.

Fujita J, Marino MW, Wada H, Jungbluth AA, Mackrell PJ, Rivadeneira DE, Stapleton PP, Daly JM. Effect of TNF gene depletion on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Surgery* 2001;129:48-54.

Fukada T, Hibi M, Yamanaka Y, Takahashi-Tezuka M, Fujitani Y, Yamaguchi T, Nakajima K, Hirano T. Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity* 1996;5:449-460.

Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.* 1999;340:448-454.

Galun E, Zeira E, Pappo O, Peters M, Rose-John S. Liver regeneration induced by a designer human IL-6/sIL-6R fusion protein reverses severe hepatocellular injury. *FASEB J.* 2000;14:1979-1987.

Gao B. Cytokines, STATs and liver disease. *Cell Mol. Immunol.* 2005;2:92-100.

Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H. Interferon beta 2/Bcell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1987;84:7251-7255.

Gerhartz C, Heesel B, Sasse J, Hemmann U, Landgraf C, Schneider-Mergener J, Horn F, Heinrich PC, Graeve L. Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. *J. Biol. Chem.* 1996;271:12991-12998.

Germain D, Frank DA. Targeting the cytoplasmic and nuclear functions of signal transducers and activators of transcription 3 for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 2007;13:5665-5669.

Gherardi E, Stoker M. Hepatocytes and scatter factor. *Nature* 1990;346:228.

Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, Ramos HL, Wei L, Davidson TS, Bouladoux N, Grainger JR, Chen Q, Kanno Y, Watford WT, Sun HW, Eberl G, Shevach EM, Belkaid Y, Cua DJ, Chen W, O'Shea JJ. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* 2010;467:967-971.

Giese B, Roderburg C, Sommerauer M, Wortmann SB, Metz S, Heinrich PC, Müller-Newen G. Dimerization of the cytokine receptors gp130 and LIFR analysed in single cells. *J. Cell Sci.* 2005;118:5129-5140.

Gkretsi V, Apte U, Mars WM, Bowen WC, Luo JH, Yang Y, Yu YP, Orr A, St-Arnaud R, Dedhar S, Kaestner KH, Wu C, Michalopoulos GK. Liver-specific ablation of integrin-linked kinase in mice results in abnormal histology, enhanced cell proliferation, and hepatomegaly. *Hepatology* 2008;48:1932-1941.

Gkretsi V, Bowen WC, Yang Y, Wu C, Michalopoulos GK. Integrin linked kinase is involved in matrix-induced hepatocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;353:638-643.

Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes and Dev.* 2000;14:121-141.

Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S, ... Hengstler JG. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch. Toxicol.* 2013;87(8):131-1530.

Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980;77:7380-7384.

Grandis JR, Drenning SD, Zeng Q, Watkins SC, Melhem MF, Endo S, Johnson DE, Huang L, He Y, Kim JD. Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97(8):4227-4232.

Greene AK, Puder M. Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management. *J. Invest. Surg.* 2003;16:99-102.

Greenhalgh CJ, Hilton DJ. Negative regulation of cytokine signaling. *J. Leukoc. Biol.* 2001;70:348-356.

Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre H, Eckmann L, Karin M. IL-6 and STAT3 signaling is required for survival of intestinal epithelial cells and colitis associated cancer. *Cancer Cell*. 2009;16:103-113.

Grompe M, Overturf K, Al-Dhalimy M, Finegold M. Therapeutic trials in the murine model of hereditary tyrosinemia type I: a progress report. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1998;21:518-531.

Guschin D, Rogers N, Briscoe J, Witthuhn B, Watling D, Horn F, Pellegrini S, Yasukawa K, Heinrich PC, Stark GR, Ihle JN, Kerr IM. A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *EMBO J*. 1995;14:1421-1429.

Haan C, Hermanns HM, Heinrich PC, Behrmann I. A single amino acid substitution (Trp666→Ala) in the interbox1/2 region of the interleukin-6 signal transducer gp130 abrogates binding of JAK1, and dominantly impairs signal transduction. *Biochem. J*. 2000; 349:261-266.

Haan C, Is'harc H, Hermanns HM, Schmitz-Van De Leur H, Kerr IM, Heinrich PC, Grotzinger J, Behrmann I. Mapping of a region within the N terminus of Jak1 involved in cytokine receptor interaction. *J. Biol. Chem.* 2001;276:37451-37458.

Haan C, Kreis S, Margue C, Behrmann I. Jaks and cytokine receptors - an intimate relationship. *Biochem Pharmacol.* 2006;72:1538-1546.

Haber BA, Mohn KL, Diamond RH, Taub R. Induction patterns of 70 genes during nine days after hepatectomy define the temporal course of liver regeneration. *J. Clin. Invest.* 1993;91(4):1319-1326.

Haga S, Terui K, Zhang HQ, Enosawa S, Ogawa W, Inoue H, Okuyama T, Takeda K, Akira S, Ogino T, Irani K, Ozaki M. Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms. *J. Clin. Invest.* 2003;112:989-998.

Hammerich L, Tacke F. Interleukins in chronic liver disease: lessons learned from experimental mouse models. *Clin. Exp. Gastroenterol.* 2014;7:297-306.

Hayashi T, Kaneda T, Toyama Y, Kumegawa M, Hakeda Y. Regulation of receptor activator of NF-kappa B ligand-induced osteoclastogenesis by endogenous interferon-beta (INF-beta) and suppressors of cytokine signaling (SOCS). *J. Biol. Chem.* 2002;277:27880-27886.

Hayashi H, Nagaki M, Imose M, Osawa Y, Kimura K, Takai S, Imao M, Naiki T, Kato T, Moriwaki H. Normal liver regeneration and liver cell apoptosis after partial hepatectomy in tumor necrosis factor- $\alpha$  deficient mice. *Liver Int.* 2005;25:162-170.

He G, Dhar D, Nakagawa H, Font-Burgada J, Ogata H, Jiang Y, Shalpour S, Seki E, Yost SE, Jepsen K, Frazer KA, Harismendy O, Hatzia Apostolou M, Iliopoulos D, Suetsugu A, Hoffman RM, Tateishi R, Koike K, Karin M. Identification of liver cancer

progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling. *Cell* 2013;155:384-396.

Hecht N, Pappo O, Shouval D, Rose-John S, Galun E, Axelrod JH. Hyper-IL-6 gene therapy reverses fulminant hepatic failure. *Mol. Ther.* 2001;3: 683-687.

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochemical J.* 2003;374:1-20.

Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.* 1998;334:297-314.

Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.* 1990;265:621-636.

Herrada G, Wolgemuth DJ. The mouse transcription factor Stat4 is expressed in haploid male germ cells and is present in the perinuclear theca of spermatozoa. *J. Cell Sci.* 1994;10:1543-1553.

Hibi M, Nakajima K, Hirano T. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J. Mol. Med.* 1996;74:1-12.

Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of liver. I. Restoration of liver of white rat following partial surgical removal. *Arch. Patho.* 1931;12:186-202.

Hirano T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int. Rev. Immunol.* 1998;16:249-284.

Hirano T, Matsuda T, Nakajima K. Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the interleukin 6 related cytokine subfamily. *Stem Cells* 1994;12:262-277.

Hirano T, Taga T, Nakano N, Yasukawa K, Kashiwamura S, Shimizu K, Nakajima K, Pyun KH, Kishimoto T. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985;82:5490-5494.

Hoehme S, Brulport M, Bauer A, Bedawy E, Schormann W, Hermes M, Puppe V, Gebhardt R, Zellmer S, Schwarz M, Bockamp E, Timmel T, Hengstler JG, Drasdo D. Prediction and validation of cell alignment along microvessels as order principle to restore tissue architecture in liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010;107:10371-10376.

Honda M, Yamamoto S, Cheng M, Yasukawa K, Suzuki H, Saito T, Osugi Y, Tokunaga T, Kishimoto T. Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection. *J. Immunol.* 1992;148:2175-2180.

Hong F, Jaruga B, Kim WH, Radaeva S, El-Assal ON, Tian Z, Nguyen VA, Gao B. Opposing roles of STAT1 and STAT3 in T cell-mediated hepatitis: regulation by SOCS. *J. Clin. Invest.* 2002;110:1503-1513.

Hong F, Kim WH, Tian Z, Jaruga B, Ishac E, Shen X, Gao B. Elevated interleukin-6 during ethanol consumption acts as a potential endogenous protective cytokine against ethanol-induced apoptosis in the liver: involvement of induction of Bcl-2 and Bcl-x(L) proteins. *Oncogene* 2002;21:32-43.

Hong F, Radaeva S, Pan HN, Tian Z, Veech R, Gao B. Interleukin 6 alleviates hepatic steatosis and ischemia/ reperfusion injury in mice with fatty liver disease. *Hepatology* 2004;40:933-941.

Hori T, Ohashi N, Chen F, Baine AM, Gardner LB, Hata T, Uemoto S, Nguyen JH. Simple and reproducible hepatectomy in the mouse using the clip technique. *World J. Gastroenterol.* 2012;18:2767-2774.

Hori T, Ohashi N, Chen F, Baine AM, Gardner LB, Jermanus S, Nguyen JH. Simple and sure methodology for massive hepatectomy in the mouse. *Ann. Gastroenterol.* 2011;24(4):307-318.

Houck KA, Cruise JL, Michalopoulos G. Norepinephrine modulates the growth-inhibitory effect of transforming growth factor-beta in primary rat hepatocyte cultures. *J. Cell Physiol.* 1988;135:551-555.

Houck KA, Michalopoulos GK. Altered responses of regenerating hepatocytes to norepinephrine and transforming growth factor type beta. *J. Cell Physiol.* 1989;141:503-509.

Hsu JH, Shi Y, Hu L, Fisher M, Franke TF, Lichtenstein A. Role of the AKT kinase in expansion of multiple myeloma clones: effects on cytokine-dependent proliferative and survival responses. *Oncogene* 2002;21:1391-1400.

Hu J, Srivastava K, Wieland M, Runge A, Mogler C, Besemfelder E, Terhardt D, Vogel MJ, Cao L, Korn C, Bartels S, Thomas M, Augustin HG. Endothelial cell-derived angiopoietin-2 controls liver regeneration as a spatiotemporal rheostat. *Science* 2014;343(6169):416-419.

Huang W, Ma K, Zhang J, Qatanani M, Cuvillier J, Liu J, Dong B, Huang X, Moore DD. Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science* 2006;312:233-236.

Huh C, Factor VM, Sanchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004;101:4477-4482.

Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Fuller GM, Topley N, Jones SA. Control of leukocyte infiltration during inflammation: IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment. *Immunity* 2001;14:705-714.

IL6R Genetics Consortium Emerging Risk Factors Collaboration, Sarwar N, Butterworth AS, Freitag DF, Gregson J, Willeit P, Gorman DN, et al. Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of 82 studies. *Lancet* 2012;379:1205-1213.

Ikeda H, Nagoshi S, Ohno A, Yanase M, Maekawa H, Fujiwara K. Activated rat stellate cells express c-met and respond to hepatocyte growth factor to enhance transforming growth factor beta1 expression and DNA synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998;250:769-775.

Imoto S, Sugiyama K, Muromoto R, Sato N, Yamamoto T, Matsuda T. Regulation of transforming growth factor-beta signaling by protein inhibitor of activated STAT, PIASy through Smad3. *J. Biol. Chem.* 2003;278:34253-34258.

Inoue H, Ogawa W, Ozaki M, Haga S, Matsumoto M, Furukawa K, Hashimoto N, Kido Y, Mori T, Sakaue H, Teshigawara K, Jin S, Iguchi H, Hiramatsu R, LeRoith D, Takeda K, Akira S, Kasuga M. Role of STAT-3 in regulation of hepatic gluconeogenic genes and carbohydrate metabolism in vivo. *Nat. Med.* 2004;10:168-174.

Interleukin6Receptor Mendelian Randomisation Analysis (IL6RMR) Consortium, Swerdlow DI, Holmes MV, Kuchenbaecker KB, Engmann JE, Shah T, Sofat R, et al. The interleukin-6 receptor as a target for prevention of coronary heart disease: a mendelian randomisation analysis. *Lancet* 2012;379:1214-1224.

Jackson PK. A new RING for SUMO: wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. *Genes Dev.* 2001;15: 3053-3058.

Jaeschke H, Williams CD, Ramachandran A, Bajt ML. Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity. *Liver Int.* 2012;32:8-20.

Jee SH, Chiu HC, Tsai TF, Tsai WL, Liao YH, Chu CY, Kuo ML. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal pathway is involved in interleukin-6-mediated Mcl-1 upregulation and anti-apoptosis activity in basal cell carcinoma cells. *J. Invest. Dermatol.* 2002;119:1121-1127.

Jegalian AG, Wu H. Regulation of *socs* gene expression by the proto-oncoprotein GFI-1B: two routes for STAT5 target gene induction by erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 2002;277:2345-2352.

Jekarl DW, Lee SY, Lee J, Park YJ, Kim Y, Park JH, Wee JH, Choi SP. Procalcitonin as a diagnostic marker and IL-6 as a prognostic marker for sepsis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;75:342-347.

Jenkins BJ, Grail D, Inglese M, Quilici C, Bozinovski S, Wong P, Ernst M. Imbalanced gp130-dependent signaling in macrophages alters macrophage colony-stimulating factor responsiveness via regulation of *c-fms* expression. *Mol. Cell. Biol.* 2004;24:1453-1463.

Jia C. Advances in the regulation of liver regeneration. *Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2011;5:105-121.

Jin X, Zhang Z, Beer-Stolz D, Zimmers TA, Koniaris LG. Interleukin-6 inhibits oxidative injury and necrosis after extreme liver resection. *Hepatology* 2007;46: 802-812.

Jones CW, McLoughlin RM, Hammond VJ, Parker CR, Williams JD, Malhotra R, Scheller J, Williams AS, Rose-John S, Topley N, Jones SA. Loss of CD4<sup>+</sup>T cell IL-6R expression during inflammation underlines a role for IL-6 trans signaling in the local maintenance of Th17 cells. *J. Immunol.* 2010;184:2130-2139.

Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J. Immunol.* 2005;175:3463-3468.

Jones SA, Rose-John S. The role of soluble receptors in cytokine biology: the agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex. *Biochim. Biophys. Acta* 2002;1592:251-263.

Jostock T, Müllberg J, Özbek S, Atreya R, Blinn G, Voltz N, Fischer M, Neurath MF, Rose-John S. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble IL-6R transsignaling responses. *Eur. J. Biochem* 2001;268:160-167.

Jungermann K, Katz N. Functional hepatocellular heterogeneity. *Hepatology* 1982;2:385-395.

Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol.* 2003;24:25-29.

Karin M, Lawrence T, Nizet V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* 2006;124:823-835.

Kim TH, Mars WM, Stolz DB, Michalopoulos GK. Expression and activation of pro-MMP-2 and pro-MMP-9 during rat liver regeneration. *Hepatology* 2000;31:75-82.

Kilby NJ, Snaith MR, Murray JA. Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet.* 1993;9:413-421.

Kim TH, Mars WM, Stolz DB, Petersen BE, Michalopoulos GK. Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat. *Hepatology* 1997;26:896-904.

Kim LC, Song L, Haura EB. Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2009;6(10):587-595.

Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine—40 years in immunology. *Annu. Rev. Immunol.* 2005;23:1-21.

Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int. Immunol* 2010;22(5):347-352.

Klein C, Wustefeld T, Assmus U, Roskams T, Rose-John S, Müller M, Manns MP, Ernst M, Trautwein C. The IL-6-gp130-STAT3 pathway in hepatocytes triggers liver protection in T cell mediated liver injury. *J. Clin. Invest.* 2005;115:860-869.

Knight B, Yeoh GC. TNF/LT $\alpha$  double knockout mice display abnormal inflammatory and regenerative responses to acute and chronic liver injury. *Cell Tissue Res.* 2005;319: 61-70.

Kogure K, Zhang YQ, Maeshima A, Suzuki K, Kuwano H, Kojima I. The role of activin and transforming growth factor-beta in the regulation of organ mass in the rat liver. *Hepatology* 2000;31: 916-921.

Köhler C, Bell AW, Bowen SP, Monga WC, Fleig W, Michalopoulos GK. Expression of Notch-1 and its ligand Jagged-1 in rat liver during liver regeneration. *Hepatology* 2004;39:1056-1065.

Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Kohler G. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 1994;368:339-342.

Kovalovich K, DeAngelis RA, Li W, Furth EE, Ciliberto G, Taub R. Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice. *Hepatology* 2000;31:149-159.

Kovalovich K, Li W, DeAngelis R, Greenbaum LE, Ciliberto G, Taub R. Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2 and Bcl-xL. *J. Biol. Chem.* 2001;276:26605-26613.

Kubota T, Takabe K, Yang M. Minimum sizes for remnant and transplanted livers in rats. *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* 1997;4:398-403.

Kühn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K. Inducible gene targeting in mice. *Science* 1995;269:1427-1429.

Kurinna S, Barton MC. Hierarchies of transcriptional regulation during liver regeneration. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2010;97:201-227.

Kuropatwinski KK, De Imus C, Gearing D, Baumann H, Mosley B. Influence of Subunit Combinations on Signaling by Receptors for Oncostatin M, Leukemia Inhibitory Factor, and Interleukin-6 *J. Biol. Chem.* 1997;272:15135-15144.

LaBrecque DR, Feigerbaum A, Bucher NR. Diurnal rhythm: Effects on hepatic regeneration and hepatic regenerative stimulator substance. *Science* 1978;199:1082-1084.

Lakso M, Sauer B, Mosinger B Jr., Lee EJ, Manning RW, Yu SH, Mulder KL, Westphal H. Targeted oncogene activation by sitespecific recombination in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992;89:6232-6236.

Lamarre J, Hayes MA, Wollenberg GK, Hussaini I, Hall SW, Gonias SL. An  $\alpha$ 2-macroglobulin receptor-dependent mechanism for the plasma clearance of transforming growth factor- $\beta$ 1 in mice. *J. Clin. Invest.* 1991;87:39-44.

Lázaro CA, Rhim JA, Yamada Y, Fausto N. Generation of hepatocytes from oval cell precursors in culture. *Cancer Res.* 1998;58:5514-5522.

LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan KJ, Ferrara N. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 2003;299:890-893.

Lee BS, Park M, Cha HY, Lee JH. Hepatocyte growth factor induces delayed STAT3 phosphorylation through interleukin-6 expression. *Cell Signal.* 2009;21(3):419-27.

Lee EG, Boone DL, Chai S, Libby SL, Chien M, Lodolce JP, Ma A. Failure to regulate TNF-induced NF- $\kappa$ B and cell death responses in A20-deficient mice. *Science* 2000;289:2350-2354.

Leenen PJ, de Bruijn MF, Voerman JS, Campbell PA, van Ewijk W. Markers of mouse macrophage development detected by monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* 1994;174:5-19.

Leslie M. Immunology. The new view of complement. *Science* 2012;337:1034-1037.

Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, Gachet C, Bader M, Clavien PA. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science* 2006;312:104-107.

Leu JI., Crissey MAS, Leu JP, Ciliberto G, Taub R. Interleukin-6-induced Stat3 and AP-1 amplify hepatocyte nuclear factor 1-mediated transactivation of hepatic genes, an adaptive response to liver injury. *Mol. Cell. Biol.* 2001;21:414-424.

Li W, Liang X, Kellendonk C, Poli V, Taub R. STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration. *J. Biol. Chem.* 2002;277:28411-28417.

Li W, Liang X, Leu J, Kovalovich K, Ciliberto G, Taub R. Global changes in interleukin-6-dependent gene expression patterns in mouse livers after partial hepatectomy. *Hepatology* 2001;33:1377-1386.

Li YX, Ren YL, Fu HJ, Zou L, Yang Y, Chen Z. Hepatitis B Virus Middle Protein Enhances IL-6 Production via p38 MAPK/NF- $\kappa$ B Pathways in an ER Stress-Dependent Manner. *PLoS One* 2016;11(7):e0159089.

Liebermann TA, Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF- $\kappa$ B transcription factor. *Mol. Cell Biol.* 1990;10:2327-2334.

Ling GS, Bennett J, Woollard KJ, Szajna M, Fossa-ti-Jimack L, Taylor PR, Scott D, Franzoso G, Cook TH, Botto M. Integrin CD11b positively regulates TLR4-induced signalling pathways in dendritic cells but not in macrophages. *Nat. Commun.* 2014;5:3039.

Liu S, Gallo DJ, Green AM, Williams DL, Gong X, Shapiro RA, Gambotto AA, Humphris EL, Vodovotz Y, Billiar TR. Role of toll-like receptors in changes in gene expression and NF- $\kappa$ B activation in mouse hepatocytes stimulated with lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* 2002;70: 3433-3442.

Liu L, McBride KM, Reich NC. STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin- $\alpha$ 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005;102:8150-8155.

Locker J, Tian J, Carter R, Concas D, Cossu C, Ledda-Columbano GM, Columbano A. A common set of immediate-early response genes in liver regeneration and hyperplasia. *Hepatology* 2003;38:314-325.

Loffreda S, Rai R, Yang SQ, Lin HZ, Diehl AM. Bile ducts and portal and central veins are major producers of tumor necrosis factor alpha in regenerating rat liver. *Gastroenterology* 1997;6(6):2089-2098.

Long J, Matsuura I, He D, Wang G, Shuai K, Liu F. Repression of Smad transcriptional activity by PIASy, an inhibitor of activated STAT. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003;100:9791-9796.

Longo CR, Patel VI, Shrikhande GV, Scali ST, Csizmadia E, Daniel S, Sun DW, et al. A20 protects mice from lethal radical hepatectomy by promoting hepatocyte proliferation via a p21waf1-dependent mechanism. *Hepatology* 2005;42:156-164.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193:265-275.

Lust JA, Donovan KA, Kline MP, Greipp PR, Kyle RA, Maihle NJ. Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* 1992;4:96-100.

Lütticken C, Wegenka UM, Yuan J, Buschmann J, Schindler C, Ziemiecki A, Harpur AG, Wilks AF, Yasukawa K, Taga T, et al. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* 1994;263:89-92.

Ma J, Cao X. Regulation of Stat3 nuclear import by importin alpha5 and importin alpha7 via two different functional sequence elements. *Cell Signal*. 2006;18:1117-1126.

Macias-Silva M, Li W, Leu JI, Crissey MA, Taub R. Up-regulated transcriptional repressors SnoN and Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor-beta signals during liver regeneration. *J. Biol. Chem.* 2002;277:28483-28490.

Mackiewicz A, Schooltink H, Heinrich PC, Rose-John S. Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins. *J. Immunol.* 1992;149:2021-2027.

Magaud JP, Sargent I, Clarke PJ, Ffrench M, Rimokh R, Mason DY. Double immunocytochemistry labeling of cell and tissue samples with monoclonal anti-bromodeoxyuridine. *J. Histochem. Cytochem.* 1989;37:1517-1527.

Magaud JP, Sargent I, Mason DY. Detection of human white cell proliferative responses by immunoenzymatic measurement of bromodeoxyuridine uptake. *J. Immunol. Methods* 1988;106:95-100.

Matsumoto K, Moriuchi T, Koji T, Nakane PK. Molecular cloning of cDNA coding for rat proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin. *EMBO J.* 1987;6(3):637-42.

McLoughlin RM, Jenkins BJ, Grail D, Williams AS, Fielding CA, Parker CR, Ernst M, Topley N, Jones SA. IL-6 trans-signaling via STAT3 directs T cell infiltration in acute inflammation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2005;102:9589-9594.

Maeda S, Chang L, Li Z-W, Luo J-L, Leffert H, Karin M. IKKbeta is required for prevention of apoptosis mediated by cell-bound but not by circulating TNFalpha. *Immunity* 2003;19:725-737.

Maione D, Di Carlo E, Li W, Musiani P, Modesti A, Peters M, Rose-John S, Della Rocca C, Tripodi M, Lazzaro D, Taub R, Savino R, Ciliberto G. Coexpression of IL-6 and soluble IL-6R causes nodular regenerative hyperplasia and adenomas of the liver. *Embo J.* 1998;17:5588-5597.

Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006;441:231-234.

Marin V, Montero-Julian FA, Gres S, Boulay V, Bongrand P, Farnarier C, Kaplanski G. The IL-6-soluble IL-6R $\alpha$  autocrine loop of endothelial activation as an intermediate between acute and chronic inflammation: an experimental model involving thrombin. *J. Immunol.* 2001;167:3435-3542.

Mars WM, Liu ML, Kitson RP, Goldfarb RH, Gabauer MK, Michalopoulos GK. Immediate early detection of urokinase receptor after partial hepatectomy and its implications for initiation of liver regeneration. *Hepatology* 1995;21(6):1695-1701.

Martin-Armas M, Simon-Santamaria J, Pettersen I, Moens U, Smedsrod B, Sveinbjornsson B. Toll-like receptor 9 (TLR9) is present in murine liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) and mediates the effect of CpG-oligonucleotides. *J. Hepatol.* 2006;44:939-946.

Martins PN, Theruvath TP, Neuhaus P. Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int* 2008;28:3-11.

Mastellos D, Papadimitriou JC, Franchini S, Tsonis PA, Lambris JD. A novel role of complement: mice deficient in the fifth component of complement (C5) exhibit impaired liver regeneration. *J. Immunol.* 2011;166:2479-2486.

Masubuchi Y, Bourdi M, Reilly TP, Graf ML, George JW, Pohl LR. Role of interleukin-6 in hepatic heat shock protein expression and protection against acetaminophen-induced liver disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;304:207-212.

McFarland-Mancini MM, Funk HM, Paluch AM, Zhou M, Giridhar PV, Mercer CA, Kozma SC, Drew AF. Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor. *J. Immunol.* 2010;184:7219-7228.

McGowan JA, Strain AJ, Bucher NLR. DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes in a defined medium: effects of epidermal growth factor, insulin, glucagon, and cyclic-AMP. *J. Cell Physiol.* 1981;180:353-363.

Mead JE, Fausto N. Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989;86:1558-1562.

Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol.* 2007;213:286-300.

Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J. Pathol.* 2010;176:2-13.

Michalopoulos GK. Liver regeneration: alternative epithelial pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2011;43(2):173-179.

Michalopoulos GK. Principles of liver regeneration and growth homeostasis. *Compr. Physiol.* 2013;3(1):485-513.

Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997;276:60-66.

Michalopoulos GK, Khan Z. Liver regeneration, growth factors, and amphiregulin. *Gastroenterology* 2005;128:503-506.

Miller JF, Mitchell GF. Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1968;128:801-820.

Minty A, Dumont X, Kaghad M, Caput D. Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *J. Biol. Chem.* 2000;275:36316-36323.

Mitchell C, Nivison M, Jackson LF, Fox R, Lee DC, Campbell JS, Fausto N. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor links hepatocyte priming with cell cycle progression during liver regeneration. *J Biol Chem* 2005; 280:2562-2568.

Mitchell C, Willenbring H. A reproducible and well tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nat. Protoc.* 2008;3:1167-1170.

Mock BA, Nordan RP, Justice MJ, Kozak C, Jenkins NA, Copeland NG, Clark SC, Wong G, Rudikoff S. The murine IL-6 gene maps to the proximal region of chromosome 5. *J. Immunol.* 1989;142:1372-1376.

Moh A, Iwamoto Y, Chai GX, Zhang SS, Kano A, Yang DD, Zhang W, Wang J, Jacoby JJ, Gao B, Flavell RA, Fu XY. Role of STAT3 in liver regeneration: survival, DNA synthesis, inflammatory reaction and liver mass recovery. *Lab. Invest.* 2007;87:1018-1028.

Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell* 2007;129:665-679.

Monga SP, Padiaditakis P, Mule K, Stolz DB, Michalopoulos GK. Changes in WNT/beta-catenin pathway during regulated growth in rat liver regeneration. *Hepatology* 2001;33:1098-1109.

Moolten FL, Bucher NL. Regeneration of rat liver (transfer of humoral agent by cross circulation). *Science* 1967;158-272.

Moolten FL, Oakman NJ, Bucher NL. Accelerated response of hepatic DNA synthesis to partial hepatectomy in rats pretreated with growth hormone or surgical stress. *Cancer Res.* 1970;30:2353-2357.

Moustakas A, Heldin CH. The regulation of TGF $\beta$ ; signal transduction. *Development* 2009;136:3699-3714.

Müllberg J, Dittrich E, Graeve L, Gerhartz C, Yasukawa K, Taga T, Kishimoto T, Heinrich PC, Rose-John S. Differential shedding of the two subunits of the interleukin-6 receptor. *FEBS Lett.* 1993;332:174-178.

Müllberg J, Oberthur W, Lottspeich F, Mehl E, Dittrich E, Graeve L, Heinrich PC, Rose-John S. The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *J. Immunol.* 1994;152:4958-4968.

Müllberg J, Schooltink H, Stoyan T, Günther M, Graeve L, Buse G, Mackiewicz A, Heinrich PC, Rose-John S. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur. J. Immunol.* 1993;23:473-480.

Murakami M, Narazaki M, Hibi M, Yawata H, Yasukawa K, Hamaguchi M, Taga T, Kishimoto T. Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991;88:11349-11353.

Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, Li L, Luo L. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 2007;45:593-605.

Nagy A. Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 2000;26:99-109.

Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, Nishimoto N, Kajita T, Taga T, Yoshizaki K, Akira S, Kishimoto T. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 1997;387:924-929.

Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, and Shimizu S. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 1989;342:440-443.

Nakamura K, Nonaka H, Saito H, Tanaka M, Miyajima A. Hepatocyte proliferation and tissue remodeling is impaired after liver injury in oncostatin M receptor knockout mice. *Hepatology* 2004;39:635-644.

Nakamura T, Sakai K, Matsumoto K. Hepatocyte growth factor twenty years on: much more than a growth factor. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2011;26:188-202.

Narazaki M, Yasukawa K, Saito T, Ohsugi Y, Fukui H, Koishihara Y, Yancopoulos GD, Taga T, Kishimoto T. Soluble forms of the interleukin-6 signal transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood* 1993;82:1120-1126.

Narazaki M, Witthuhn BA, Yoshida K, Silvennoinen O, Yasukawa K, Ihle JN, Kishimoto T, Taga T. Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91: 2285-2289.

Narimatsu M, Maeda H, Itoh S, Atsumi T, Ohtani T, Nishida K, Itoh M, Kamimura D, Park SJ, Mizuno K, Miyazaki J, Hibi M, Ishihara K, Nakajima K, Hirano T. Tissue-specific autoregulation of the stat3 gene and its role in interleukin-6-induced survival signals in T-cells. *Mol. Cell. Biol.* 2001;21:6615-6625.

Nasir GA, Mohsin S, Khan M, Shams S, Ali G, Khan SN, Riazuddin S. Mesenchymal stem cells and interleukin-6 attenuate liver fibrosis in mice. *J. Transl. Med.* 2013;11:78.

Natarajan A, Wagner B, Sibilio M. The EGF receptor is required for efficient liver regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007;104:17081-17086.

National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Reissue edition. *National Academy Press. Washington, DC, USA*. 1996.

Neubauer H, Cumano A, Müller M, Wu H, Huffstadt U, Pfeffer K. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* 1998;93:397-409.

Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM, Karin M. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. *Science* 2007;317:121-124.

Nevzorova YA, Tolba R, Trautwein C and Liedtke C. Partial hepatectomy in mice. *Lab. Anim.* 2015;49:81-88.

Nevzorova YA, Tschaharganeh D, Gassler N, Geng Y, Weiskirchen R, Sicinski P, Trautwein C, Liedtke C. Aberrant cell cycle progression and endoreplication in regenerating livers of mice that lack a single E-type cyclin. *Gastroenterology* 2009;137(2):691-703.

Nishikawa Y, Wang M, Carr BI. Changes in TGF- $\beta$  receptor of rat hepatocytes during primary culture and liver regeneration: increased expression of TGF- $\beta$  receptors associated with increased sensitivity to TGF- $\beta$  mediated growth inhibition. *J. Cell. Physiol.* 1998;176:612-623.

Noguchi S, Ohba Y, Oka T. Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J. Endocrinol.* 1991;128:425-431.

Norris CA, He M, Kang LI, Ding MQ, Radder JE, Haynes MM, Yang Y, Paranjpe S, Bowen WC, Orr A, Michalopoulos GK, Stolz DB, Mars WM. Synthesis of IL-6 by hepatocytes is a normal response to common hepatic stimuli. *PLoS One* 2014;9(4):e96053.

Oe S, Lemmer ER, Conner EA, Factor VM, Leveen P, Larsson J, Karlsson S, Thorgeirsson SS. Intact signaling by transforming growth factor beta is not required for termination of liver regeneration in mice. *Hepatology* 2004;40:1098- 1105.

Ogata A, Chauhan D, Teoh G, Treon SP, Urashima M, Schlossman RL, Anderson KC. IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J. Immunol.* 1997;159:2212-2221.

Oh JW, Van Wagoner NJ, Rose-John S, Benveniste EN. Role of IL-6 and the soluble IL-6 receptor in inhibition of VCAM-1 gene expression. *J. Immunol.* 1998;161:4992-4999.

Olsen PS, Poulsen SS, Kirkegaard P. Adrenergic effects on secretion of epidermal growth factor from Brunner's glands. *Gut.* 1985;26(9):920-927.

Padberg F, Feneberg W, Schmidt S, Schwarz MJ, Korschenhausen D, Greenberg BD, Nolde T, Müller N, Trapmann H, König N, Möller HJ, Hampel H. CSF and serum levels of soluble interleukin-6 receptors (sIL-6R and sgp130), but not of interleukin-6 are altered in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 1999; 99:218-223.

Panis Y, McMullan DM, Emond JC. Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. *Surgery* 1997;121(2):142-149.

Papastefanou VP, Bozas E, Mykoniatis MG, Grypioti A, Garyfallidis S, Bartsocas CS, Nicolopoulou-Stamati P. VEGF isoforms and receptors expression throughout acute acetaminophen-induced liver injury and regeneration. *Arch. Toxicol.* 2007;81:729-741.

Pediaditakis P, Lopez-Talavera JC, Petersen B, Monga PS, Michalopoulos GK. The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat. *Hepatology* 2001;34:688-693.

Pellegrini S, Dusanter-Fourt I. The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur. J. Biochem.* 1997;248:615-633.

Peters M, Blinn G, Solem F, Fischer M, Meyer zum Büschenfelde K-H, Rose-John S. In Vivo and in vitro Activity of the gp130 Stimulating Designer Cytokine Hyper-IL-6. *J. Immunol.* 1998;161:3575-3581.

Peters M, Blinn G, Jostock T, Schirmacher P, Meyer zum Büschenfelde KH, Galle PR, Rose-John S. Combined interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor accelerates murine liver regeneration. *Gastroenterology* 2000;119:1663-1671.

Peters M, Jacobs S, Ehlers M, Vollmer P, Müllberg J, Wolf E, Brem G, Meyer zum Büschenfelde KH, Rose-John S. The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6. *J. Exp. Med.* 1996;183:1399-1406.

Peters M, Müller A, Rose-John S. Interleukin-6 and soluble Interleukin-6 Receptor: Direct Stimulation of gp130 and Hematopoiesis. *Blood* 1998;92: 3495-3504.

Peters M, Schirmacher P, Goldschmitt J, Odenthal M, Peschel C, Dienes HP, Meyer zum Büschenfelde KH, Rose-John S. Extramedullary expansion of hematopoietic progenitor cells in IL-6/sIL-6R double transgenic mice. *J. Exp. Med.* 1997;185:755-766.

Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168-1170.

Pinzani M. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. *Front. Biosci.* 2002;7:d1720-1726.

Pope RM. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* 2002;2:1-9.

Qin H, Roberts KL, Niyongere SA, Cong Y, Elson CO, Benveniste EN. Molecular mechanism of lipopolysaccharide-induced SOCS-3 gene expression in macrophages and microglia. *J. Immunol.* 2007;179:5966-5976.

Qin H, Wilson C, Roberts KL, Baker B, Zhao X, Benveniste E. IL-10 inhibits lipopolysaccharide-induced CD40 gene expression through induction of suppressor of cytokine signaling-3. *J. Immunol.* 2006;177:7761-7771.

Quétier I, Brezillon N, Duriez M, Massinet H, Giang E, Ahodantin J, Lamant C, Brunelle MN, Soussan P, Kremsdorf D. Hepatitis B virus HBx protein impairs liver regeneration through enhanced expression of IL-6 in transgenic mice. *J. Hepatol.* 2013, 59(2):285-291.

Quintana A, Erta M, Ferrer B, Comes G, Giralt M, Hidalgo J. Astrocyte-specific deficiency of interleukin-6 and its receptor reveal specific roles in survival, body weight and behavior. *Brain Behav. Immun.* 2013;27:162-173.

Rabes HM, Wirsching R, Tuczek HV, Iseler G. Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy. *Cell. Tissue Kinet.* 1976;9(6):517-532.

Radtke S, Hermanns HM, Haan C, Schmitz-Van De Leur H, Gascan H, Heinrich PC, and Behrmann I. Novel role of Janus kinase 1 in the regulation of oncostatin M receptor surface expression. *J. Biol. Chem.* 2002;277:11297-11305.

Rai RM, Yang SQ, McClain C, Karp CL, Klein AS, Diehl AM. Kupffer cell depletion by gadolinium chloride enhances liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Am. J. Physiol.* 1996;270(6):G909-918.

Rakesh K, Agrawal DK. Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 2005;70:649-657.

Rane SG, Reddy EP. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene*. 2000; 19(49):5662-5679.

Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J. Cell Sci*. 2004;117:1281-1283.

Reich NC, Liu L. Tracking STAT nuclear traffic. *Nat. Rev. Immunol*. 2006;6:602-612.

Ren X, Hogaboam C, Carpenter A, Colletti L. Stem cell factor restores hepatocyte proliferation in IL-6 knockout mice following 70% hepatectomy. *J. Clin. Invest*. 2003;112:1407-1418.

Ren X, Hu B, Colletti LM. IL-22 is involved in liver regeneration after hepatectomy. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2010;298:G74-80.

Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science* 1994;263:1149-1152.

Richards CD, Langdon C, Pennica D, Gauldie J. Murine cardiotrophin-1 stimulates the acute-phase response in rat hepatocytes and H35 hepatoma cells. *J. Interferon Cytokine Res*. 1996;16:69-75.

Riehle KJ, Campbell JS, McMahan RS, Johnson MM, Beyer RP, Bammler TK, Fausto N. Regulation of liver regeneration and hepatocarcinogenesis by suppressor of cytokine signaling 3. *J. Exp. Med*. 2008;205:91-103.

Riehle KJ, Dan YY, Campbell JS, Fausto N. New concepts in liver regeneration. *J. Gastroenterol. Hepatol*. 2011;26(1):203-212.

Riese J, Schoolmann S, Beyer A, Denzel C, Hohenberger W, Haupt W. Production of IL-6 and MCP-1 by the human peritoneum in vivo during major abdominal surgery. *Shock* 2000;14:91-94.

Roberts AW, Robb L, Rakar S, Hartley L, Cluse L, Nicola NA, Metcalf D, Hilton DJ, Alexander WS. Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signaling 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001;98:9324-9329.

Rodig SJ, Meraz MA, White JM, Lampe PA, Riley J K, Arthur CD, King KL, Sheehan KC, Yin L, Pennica D, Johnson EM Jr, Schreiber RD. Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* 1998;93:373-383.

Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, Luini W, van Hinsbergh V, Sozzani S, Bussolino F, Poli V, Ciliberto G, Mantovani A. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 1997;6:315-325.

Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int. J. Biol. Sci*. 2012;8:1237-1247.

Ross MA, Sander CM, Kleeb TB, Watkins S, Stolz DB. Spatiotemporal expression of angiogenesis growth factor receptors during the revascularization of regenerating rat liver. *Hepatology* 2001;34:1135-1148.

Rudich N, Zamir G, Pappo O, Shlomai Z, Faroja M, Weiss ID, Wald H, Galun E, Peled A, Wald O. Focal liver necrosis appears early after partial hepatectomy and is dependent on T cells and antigen delivery from the gut. *Liver Int*. 2009;29:1273-1284.

Russell WE, Coffey RJ Jr, Ouellette AJ, Moses HL. Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988;85:5126-5130.

Russell WE, Kaufmann WK, Sitaric S, Luetkeke NC, Lee DC. Liver regeneration and hepatocarcinogenesis in transforming growth factor-alpha-targeted mice. *Mol. Carcinog*. 1996;15:183-189.

Sands WA, Woolson HD, Milne GR, Rutherford C, Palmer TM. Exchange protein activated by cyclic AMP (Epac)-mediated induction of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS-3) in vascular endothelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 2006;26:6333-6346.

Sakamoto T, Liu Z, Murase N, Ezure T, Yokomuro S, Poli V, Demetris AJ. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology* 1999;29:403-411.

Sakuda S, Tamura S, Yamada A, Miyagawa J, Yamamoto K, Kiso S, Ito N, Imanaka K, Wada A, Naka T, Kishimoto T, Kawata S, Matsuzawa Y. Activation of signal transducer and activator transcription 3 and expression of suppressor of cytokine signal 1 during liver regeneration in rats. *J. Hepatol.* 2002;36:378-384.

Sato T, El-Assal ON, Ono T, Yamanoi A, Dhar DK, Nagasue N. Sinusoidal endothelial cell proliferation and expression of angiopoietin/Tie family in regenerating rat liver *J. Hepatol.* 2001;34:690-698.

Savill J, Dransfield I, Geogory C, Haslett CA. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates the immune response. *Nat. Rev. Immunol.* 2002;2:965-975.

Scambia G, Testa U, Panici PB, Martucci R, Foti E, Petrini M, Amoroso M, Masciullo V, Peschle C, Mancuso S. Interleukin-6 serum levels in patients with gynecological tumors. *Int. J. Cancer* 1994;57:318-323.

Schaller E, Macfarlane AJ, Rupec RA, Gordon S, McKnight AJ, Pfeffer K. Inactivation of the F4/80 glycoprotein in the mouse germ line. *Mol. Cell. Biol.* 2002;22:8035-8043.

Scheller J, Chalaris A, Garbers C, Rose-John S. ADAM17: a molecular switch of inflammatory and regenerative responses? *Trends Immunol.* 2011;32:380-387.

Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta* 2011;1813:878-888.

Scheller J, Rose-John S. Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Med. Microbiol. Immunol.* 2006;195:173-183.

Scheller J, Rose-John S. The interleukin 6 pathway and atherosclerosis. *Lancet* 2012;380:338.

Schiemann W P, Bartoe JL, Nathanson NM. Box 3-independent signaling mechanisms are involved in leukemia inhibitory factor receptor  $\alpha$ - and gp130-mediated stimulation of mitogen-activated protein kinase. Evidence for participation of multiple signaling pathways which converge at Ras. *J. Biol. Chem.* 1997;272:16631-16636.

Schirmacher P, Geerts A, Jung W, Pietrangelo A, Rogler CE, Dienes HP. The role of Ito cells in the biosynthesis of HGF-SF in the liver. *EXS* 1993;65:285-299.

Schirmacher P, Peters M, Ciliberto G, Blessing M, Lotz J, Meyer zum Bu"schensfelde KH, Rose-John S. Hepatocellular hyperplasia, plasmacytoma formation and extramedullary hematopoiesis in IL-6/sIL-6R double transgenic mice. *Am. J. Pathol.* 1998;153:639-648.

Schmidt-Arras D, Rose-John S. Il-6 pathway in the liver: from pathophysiology to therapy. *J. Hepatol.* 2016;64:1403-1415.

Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier E. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 1995;373:699-702.

Schmidt D, Muller S. Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99:2872-2877.

Schmitz J, Weissenbach M, Haan S, Heinrich PC, Schaper F. SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J. Biol. Chem.* 2000;275:12848-12856.

Schooltink H, Stoyan T, Roeb E, Heinrich PC, Rose-John S. Ciliary neurotrophic factor induces acute-phase protein expression in hepatocytes. *FEBS Lett.* 1992;314:280-284.

Schuster B, Meinert W, Rose-John S, Kallen KJ. The human interleukin-6 (IL-6) receptor exists as a preformed dimer in the plasma membrane. *FEBS Lett.* 2003;538:113-116.

Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* 1976;13:29-83.

Sehgal PB, Zilberstein A, Ruggieri RM, May LT, Ferguson-Smith A, Slate DL, Revel M, Ruddle FH. Human Chromosome 7 Carries the beta 2 Interferon Gene. *PNAS* 1986;83:5219-5222.

Seki E, Tsutsui H, Iimuro Y, Naka T, Son G, Akira S, Kishimoto T, Nakanishi K, Fujimoto J. Contribution of Toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88 signaling to murine liver regeneration. *Hepatology* 2005;41:443-450.

Sekimoto T, Nakajima K, Tachibana T, Hirano T, Yoneda Y. Interferon-gamma-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by the GTPase activity of Ran/TC4. *J. Biol. Chem.* 1996;271:31017-31020.

Selzner N, Selzner M, Odermatt B, Tian Y, Van Rooijen N, Clavien PA. ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and Kupffer cell-dependent release of TNF- $\alpha$ /IL-6 in mice. *Gastroenterology* 2003;124:692-700.

Selzner N, Selzner M, Tian Y, Kadry Z, Clavien PA. Cold ischemia decreases liver regeneration after partial liver transplantation in the rat: A TNF- $\alpha$ /IL-6-dependent mechanism. *Hepatology* 2002;36:812-818.

Serandour AL, Loyer P, Garnier D, Courselaud B, Theret N, Glaise D, Guguen-Guillouzo C, Corlu A. TNF $\alpha$ -mediated extracellular matrix remodeling is required for multiple division cycles in rat hepatocytes. *Hepatology* 2005;41:478-486.

Sharrocks AD. PIAS proteins and transcriptional regulation--more than just SUMO E3 ligases? *Genes Dev.* 2006; 20:754-758.

Shaul PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol.* 2002;64:749-774.

Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113:685-700.

Shimizu H, Mitsuhashi N, Ohtsuka M, Ito H, Kimura F, Ambiru S, Togawa A, Yoshidome H, Kato A, Miyazaki M. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins regulate sinusoidal regeneration and remodeling after partial hepatectomy in rats. *World J. Gastroenterol.* 2005;11:7254-7260.

Shiratori Y, Hongo S, Hikiba Y, Ohmura K, Nagura T, Okano K, Kamii K, Tanaka T, Komatsu Y, Ochiai T, Tsubouchi H, Omata M. Role of macrophages in regeneration of liver. *Dig. Dis. Sci.* 1996;41(10):1939-46.

Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, Komiya S, Kosai K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Nagata K, Yoshimura A. Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J. Clin. Invest.* 2001;108:1781-1788.

Shuai K. The STAT family of proteins in cytokine signaling. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1999;71:405-422.

Shuai K. Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins. *Cell Res.* 2006;16:196-202.

- Shuai K, Liu B. Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2005;5:593-605.
- Sofi MH, Li W, Kaplan MH, Chang CH. Elevated IL-6 expression in CD4 T cells via PKC $\theta$  and NF-kappaB induces Th2 cytokine production. *Mol. Immunol.* 2009;46:1443-1450.
- Somers W, Stahl M, Seehra JS. 1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *EMBO J.* 1997;16:989-997.
- Soudi S, Zavarán-Hosseini A, Muhammad Hassan Z, Soleimani M, Jamshidi Adegani F, Hashemi SM. Comparative study of the effect of LPS on the function of BALB/c and C57BL/6 peritoneal macrophages. *Cell J.* 2013;15:45-54.
- Springer T, Galfre G, Secher DS, Milstein C. Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.* 1979;9:301-306.
- Stahl N, Boulton TG, Farruggella T, Ip NY, Davis S, Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Barbieri G, Pellegrini S, et al. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 $\beta$  receptor components. *Science* 1994;263:92-95.
- Stahl N, Farruggella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell JJ, Yancopoulos GD. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine based motifs in cytokine receptors. *Science* 1995;267:1349-1353.
- Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997;387:917-921.
- Starzl TE., Fung J, Tzakis A, Todo S, Demetris AJ, Marino IR, Doyle H, Zeevi A, Warty V, Michaels M. Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet* 1993;341:65-71.
- Steer CJ. Liver regeneration. *FASEB J.* 1995;9:1396-1400.
- Stöcker E, Heine WD. Regeneration of liver parenchyma under normal and pathological conditions. *Beitr. Pathol.* 1971;144(4):400-408.
- Stoiber D, Kovarik P, Cohny S, Johnston JA, Steinlein P, Decker T. Lipopolysaccharide induces in macrophages the synthesis of the suppressor of cytokine signaling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor IFN- $\gamma$ . *J. Immunol.* 1999;163:2640-2647.
- Stolz, D.B., Mars, W.M., Petersen, B.E., Kim, T.H., Michalopoulos, G.K. Growth factor signal transduction immediately after two-thirds partial hepatectomy in the rat. *Cancer Res.* 1999;59:3954-3960.
- Streetz KL, Tacke F, Leifeld L, Wüstefeld T, Graw A, Klein C, Kamino K, Spengler U, Kreipe H, Kubicka S, Müller W, Manns MP, Trautwein C. Interleukin 6/gp130-dependent pathways are protective during chronic liver diseases. *Hepatology* 2003;38:218-229.
- Streetz KL, Wüstefeld T, Klein C, Kallen KJ, Tronche F, Betz UA, Schütz G, Manns MP, Müller W, Trautwein C. Lack of gp130 expression in hepatocytes promotes liver injury. *Gastroenterology* 2003;125:532-543.
- Strengell M, Lehtonen A, Matikainen A, Julkunen I. IL-21 enhances SOCS gene expression and inhibits LPS-induced cytokine production in human monocyte-derived dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 2006;79:1279-1285.
- Strey CW, Markiewski M, Mastellos D, Tudoran R, Spruce LA, Greenbaum LE, Lambris JD. The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *J. Exp. Med.* 2003;198:913-923.

Strom SC, Jirtle RL, Jones RS, Novicki DL, Rosenberg MR, Novotny A, Irons G, McLain JR, Michalopoulos G. Isolation, culture, and transplantation of human hepatocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* 1982;68:771-778.

Su AI, Guidotti LG, Pezacki JP, Chisari FV, Schultz PG. Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002;99(17):11181-11186.

Subramaniam A, Shanmugam MK, Perumal E, Li F, Nachiyappan A, Dai X, Swamy SN, Ahn KS, Kumar AP, Tan BK, Hui KM, Sethi G. Potential role of signal transducer and activator of transcription (STAT)3 signaling pathway in inflammation, survival, proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma. *Biochim. Biophys. Acta* 2013;1835:46-60.

Suematsu M, Aiso S. Professor Toshio Ito: a clairvoyant in pericyte biology. *Keio J. Med.* 2001; 50(2):66-71.

Sun R, Jaruga B, Kulkarni S, Sun H, Gao B. IL-6 modulates hepatocyte proliferation via induction of HGF/p21cip1: regulation by SOCS3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005;338:1943-1949.

Sun R, Tian Z, Kulkarni S, Gao B. IL-6 prevents T cell mediated hepatitis via inhibition of NKT cells in CD4+ T cell and STAT3-dependent manners. *J. Immunol.* 2004;172:5648-5655.

Sun Z, Klein AS, Radaeva S, Hong F, El-Assal O, Pan HN, Jaruga B, Batkai S, Hoshino S, Tian Z, Kunos G, Diehl AM, Gao B. In vitro interleukin-6 treatment prevents mortality associated with fatty liver transplants in rats. *Gastroenterology.* 2003;125:202-215.

Tachibana S, Zhang X, Ito K, Ota Y, Cameron AM, Williams GM, Sun Z. Interleukin-6 is required for cell cycle arrest and activation of DNA repair enzymes after partial hepatectomy in mice. *Cell Biosci.* 2014;4(6):1-10.

Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 1997;15:797-819.

Takahashi-Tezuka M, Yoshida Y, Fukada T, Ohtani T, Yamanaka Y, Nishida, K, Nakajima K, Hibi M, Hirano T. Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 1998;18:4109-4117.

Takano M, Sugano N, Mochizuki S, Koshi RN, Narukawa TS, Sawamoto Y, Ito K. Hepatocytes produce tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 in response to *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodontal. Res.* 2012;47(1):89-94.

Talarmin H, Rescan C, Cariou S, Glaise D, Zanninelli G, Bilodeau M, Loyer P, Guguen-Guillouzo C, Baffet G. The mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G(1) phase progression in proliferating hepatocytes. *Mol. Cell Biol.* 1999;19(9):6003-6011.

Tan X, Behari J, Cieply B, Michalopoulos GK, Monga SP. Conditional deletion of beta-catenin reveals its role in liver growth and regeneration. *Gastroenterology* 2006;131:1561-1572.

Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2014;6:a016295.

Tatsumi K, Ohashi K, Taminishi S, Okano T, Yoshioka A, Shima M. Reference gene selection for real-time RT-PCR in regenerating mouse livers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008;374(1):106-110.

Taub R. Hepatoprotection via the IL-6/Stat3 pathway. *J. Clin. Invest.* 2003;112:978-980.

Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2004;5:836-847.

Taub R, Greenbaum LE, Peng Y. Transcriptional regulatory signals define cytokine dependent and independent pathways in liver regeneration. *Semin. Liver Dis.* 1999;19:117-127.

Teixeira-Clerc F, Belot MP, Manin S, Deveaux V, Cadoudal T, Chobert MN, Louvet A, Zimmer A, Tordjmann T, Mallat A, Lotersztajn S. Beneficial paracrine effects of cannabinoid receptor 2 on liver injury and regeneration. *Hepatology* 2010;52:1046-1059.

Tenhumberg S, Schuster B, Zhu L, Kovaleva M, Scheller J, Kallen KJ, Rose-John S. gp130 dimerization in the absence of ligand: preformed cytokine receptor complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006;346:649-657.

Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 1987;51:503-512.

Tiniakos DG, Kandilis A, Geller SA. Tityus: A forgotten myth of liver regeneration. *J. Hepatol.* 2010;53:357-361.

Topley N, Liberek T, Davenport A, Li FK, Williams JD. Activation of inflammation and leukocyte recruitment into the peritoneal cavity. *Kidney Int.* 1996;56:S17-S21.

Tumanov AV, Koroleva EP, Christiansen PA, Khan MA, Ruddy MJ, Burnette B, Papa S, Franzoso G, Nedospasov SA, Fu YX, Anders RA. T cell-derived lymphotoxin regulates liver regeneration. *Gastroenterology* 2009;136:694-704.

Vaquero J, Campbell JS, Haque J, McMahan RS, Riehle KJ, Bauer RL, Fausto N. Toll-like receptor 4 and myeloid differentiation factor 88 provide mechanistic insights into the cause and effects of interleukin-6 activation in mouse liver regeneration. *Hepatology* 2011;54(2):597-608.

Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003;422:901-904.

Verbsky JW, Bach EA, Fang YF, Yang L, Randolph DA, Fields LE. Expression of Janus kinase 3 in human endothelial and other non-lymphoid and non-myeloid cells. *J. Biol. Chem.* 1996;271:13976-13980.

Vergier A, Perdomo J, Crossley M. Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep.* 2003;4:137-142.

Vermaelen K, Pauwels R: Accurate and simple discrimination of mouse pulmonary dendritic cell and macrophage populations by flow cytometry: methodology and new insights. *Cytometry A* 2004;61:170-177.

Veverka V, Baker T, Redpath NT, Carrington B, Muskett FW, Taylor RJ, Lawson AD, Henry AJ, Carr MD. Conservation of functional sites on interleukin-6 and implications for evolution of signalling complex assembly and therapeutic intervention. *J. Biol. Chem.* 2012;287(47):40043-40050.

Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. *J. Exp. Med.* 1989;169:333-338.

Wang H, Lafdil F, Kong X, Gao B. Signal transducer and activator of transcription 3 in liver diseases: a novel therapeutic target. *Int. J. Biol. Sci.* 2011;7:536-50.

Wang H, Park O, Lafdil F, Shen K, Horiguchi N, Yin S, Fu XY, Kunos G, Gao B.. Interplay of hepatic and myeloid signal transducer and activator of transcription 3 in facilitating liver regeneration via tempering innate immunity. *Hepatology* 2010;51:1354-1362.

Wang SW, Sun YM. The IL-6/JAK/STAT3 pathway: Potential therapeutic strategies in treating colorectal cancer. *Int. J. Oncol.* 2014;44:1032-1040.

Wang Y, Robledo O, Kinzie E, Blanchard F, Richards C, Miyajima A, Baumann H. Receptor Subunit-specific Action of Oncostatin M in Hepatic Cells and Its Modulation by Leukemia Inhibitory Factor. *J. Biol. Chem.* 2000;275:25273-25285.

Webb DJ, Roadcap DW, Dhakephalkar A, Gonias SL. A 16-amino acid peptide from human alpha2-macroglobulin binds transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor-BB. *Protein Science* 2000;9:1986-1992..

Webber EM, Bruix J, Pierce RH, Fausto N. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat. *Hepatology* 1998;28:1226-1234.

Webber EM, FitzGerald MJ, Brown PI, Bartlett MH, Fausto N. Transforming growth factor-alpha expression during liver regeneration after partial hepatectomy and toxic injury, and potential interactions between transforming growth factor-alpha and hepatocyte growth factor. *Hepatology* 1993;18:1422-1431.

Weir E, Chen Q, DeFrances MC, Bell A, Taub R, Zarnegar R. Rapid induction of mRNAs for liver regeneration factor (LRF-1) and insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) in primary cultures of rat hepatocytes by hepatocyte growth factor and epidermal growth factor. *Hepatology* 1994;20:955-960.

Wen Y, Feng D, Wu H, Liu W, Li H, Wang F, Xia Q, Gao WQ, Kong X. Defective Initiation of Liver Regeneration in Osteopontin-Deficient Mice after Partial Hepatectomy due to Insufficient Activation of IL-6/Stat3 Pathway. *Int. J. Biol. Sci.* 2015;11(10):1236-1247.

Werner S, Alzheimer C. Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17:157-171.

Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, Wu P, Wiesmann C, Baker R, Boone DL, Ma A, Koonin EV, Dixit VM. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature* 2004;430:694-699.

Wiesinger MY, Haan S, Wüller S, Kauffmann ME, Recker T, Küster A, Heinrich PC, Müller-Newen G. Development of an IL-6 inhibitor based on the functional analysis of murine IL-6Ralpha. *Chem. Biol.* 2009;16:783-794.

Wilks AF, Harpur AG, Kurban RR, Ralph SJ, Zurcher G, Ziemiecki A. Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 1991;11:2057-2065.

Wu J, Meng Z, Jiang M, Zhang E, Trippler M, Broering R, Bucchi A, Krux F, Dittmer U, Yang D, Roggendorf M, Gerken G, Lu M, Schlaak JF. Toll-like receptor-induced innate immune responses in non-parenchymal liver cells are cell type-specific. *Immunology* 2009;129:363-374.

Wuestefeld T, Klein C, Streetz KL, Betz U, Lauber J, Buer J, Buer J, Manns MP, Müller W, Trautwein C. Interleukin-6/glycoprotein 130-dependent pathways are protective during liver regeneration. *J. Biol. Chem.* 2003;278:11281-11288.

Wüstefeld T, Rakemann T, Kubicka S, Manns MP, Trautwein C. Hyperstimulation with interleukin-6 inhibits cell cycle progression after hepatectomy in mice. *Hepatology* 2000;32,514-522.

Xagorari A, Siotou E, Yiangou M, Tsolaki E, Bougiouklis D, Sakkas L, Fassas A, Anagnostopoulos A. Protective effect of mesenchymal stem cell-conditioned medium on hepatic cell apoptosis after acute liver injury. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2013;6(5):831-840.

Xiang WQ, Feng WF, Ke W, Sun Z, Chen Z, Liu W. Hepatitis B virus X protein stimulates IL-6 expression in hepatocytes via a MyD88-dependent pathway. *Hepatitis*

B virus X protein stimulates IL-6 expression in hepatocytes via a MyD88-dependent pathway. *J Hepatol.* 2011;54(1):26-33.

Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK. IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J. Clin. Invest* 1998;101:311-320.

Xu GY, Yu HA, Hong J, Stahl M, McDonagh T, Kay LE, Cumming DA. Solution structure of recombinant human interleukin-6. *J. Mol. Biol.* 1997;268:468-481.

Xu MJ, Feng D, Wu H, Wang H, Chan Y, Kolls J, Borregaard N, Porse B, Berger T, Mak TW, Cowland JB, Kong X, Gao B. Liver is the major source of elevated serum lipocalin-2 levels after bacterial infection or partial hepatectomy: a critical role for IL-6/STAT3. *Hepatology* 2015;61(2):692-702.

Xu Q, Briggs J, Park S, Niu G, Kortylewski M, Zhang S, Gritsko T, Turkson J, Kay H, Semenza GL, Cheng JQ, Jove R, Yu H. Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. *Oncogene* 2005;24:5552-5560.

Yadav A, Kalita A, Dhillon S, Banerjee K. JAK/STAT3 pathway is involved in survival of neurons in response to insulin-like growth factor and negatively regulated by suppressor of cytokine signaling-3. *J. Biol. Chem.* 2005;280: 31830-31840.

Yahara N, Abe T, Morita K, Tangoku A, Oka M. Comparison of interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte colony-stimulating factor production by the peritoneum in laparoscopic and open surgery. *Surg Endosc.* 2002;16:1615-1619.

Yamada Y, Fausto N. Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor. *Am. J. Pathol.* 1998;152:1577-1589.

Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94:1441-1446.

Yang XP, Schaper F, Teubner A, Lammert F, Heinrich PC, Matern S, Siewert E. Interleukin-6 plays a crucial role in the hepatic expression of SOCS3 during acute inflammatory processes in vivo. *J. Hepatol.* 2005;43:704-710.

Yasukawa H, Ohishi M, Mori H, Murakami M, Chinen T, Aki D, Hanada T, Takeda K, Akira S, Hoshijima M, Hirano T, Chien KR, Yoshimura A. IL-6 induces an antiinflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat. Immunol.* 2003;4:551-516.

Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* 2007;7:454-65.

Yeh SH, Chen PJ. Gender disparity of hepatocellular carcinoma: the roles of sex hormones. *Oncology* 2010;78 Suppl 1:172-179.

Yin S, Wang H, Park O, Wei W, Shen J, Gao B. Enhanced Liver Regeneration in IL-10-Deficient Mice after Partial Hepatectomy via Stimulating Inflammatory Response and Activating Hepatocyte STAT3. *Am. J. Pathol.* 2011;178:1614-1621.

Yu C, Wang F, Jin C, Huang X, Miller DL, Basilico C, McKeehan WL. Role of fibroblast growth factor type 1 and 2 in carbon tetrachloride-induced hepatic injury and fibrogenesis. *Am. J. Pathol.* 2003;163:1653-1662.

Zeini M, Hortelano S, Traves PG, Gomez-Valades AG, Pujol A, Perales JC, Bartrons R, Boscá L. Assessment of a dual regulatory role for NO in liver regeneration after partial hepatectomy: protection against apoptosis and retardation of hepatocyte proliferation. *FASEB J.* 2005;19:995-997.

Zhang T, Kee WH, Seow KT, Fung W, Cao X. The coiled-coil domain of Stat3 is essential for its SH2 domain-mediated receptor binding and subsequent activation

induced by epidermal growth factor and interleukin-6. *Mol. Cell Biol.* 2000;20:7132-7139.

Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr. Protoc. Immunol.* 2008;14:Unit 14.1.

Zhang X, Wrzeszczynska MH, Horvath CM, Darnell JE Jr. Interacting regions in Stat3 and c-Jun that participate in cooperative transcriptional activation. *Mol. Cell Biol.* 1999;19:7138-7146.

Zhong Z, Wen Z, Darnell Jr JE. Stat3 and Stat4: members of the family of signal transducers and activators of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91:4806-4810.

Zimmers TA, McKillop IH, Pierce RH, Yoo JY, Koniaris LG. Massive liver growth in mice induced by systemic interleukin 6 administration. *Hepatology* 2003;38:326-334.

Zimmers TA, Pierce RH, McKillop IH, Koniaris LG. Resolving the role of IL-6 in liver regeneration. *Hepatology* 2003;38:1590-1591.

Zorde-Khvaleyevsky E, Abramovitch R, Barash H, Spivak-Pohis I, Rivkin L, Rachmilewitz J, Galun E, Giladi H. Toll-like receptor 3 signaling attenuates liver regeneration. *Hepatology* 2009;50:198-206.



## **XI.- ANEXO**

---



Los artículos publicados durante el desarrollo de la Tesis:

- Rodríguez-Feo JA, Puerto M, **Fernández-Mena C**, Verdejo C, Lara JM, Díaz-Sánchez M, Álvarez E, Vaquero J, Marín-Jiménez I, Bañares R, Menchén L. A new role for reticulon-4B/NOGO-B in the intestinal epithelial barrier function and inflammatory bowel disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 2015;308(12):G981-993.
- Asencio JM, García-Sabrido JL, López-Baena JA, Olmedilla L, Peligros I, Lozano P, Morales-Taboada Á, **Fernández-Mena C**, Steiner MA, Sola E, Perez-Peña JM, Herrero M, Laso J, Lisbona C, Bañares R, Casanova J, Vaquero J. Preconditioning by portal vein embolization modulates hepatic hemodynamics and improves liver function in pigs with extended hepatectomy. *Surgery* 2017; S0039-6060(16): 30854-30856.
- Fortea JI, Zipprich A, **Fernandez-Mena C**, Puerto M, Bosoi CR, Almagro J, Hollenbach M, Bañares J, Rodríguez-Sánchez B, Cercenado E, Clément MA, Rose CF, Bañares R, Vaquero J, Ripoll C. Enoxaparin does not ameliorate liver fibrosis or portal hypertension in rats with advanced cirrhosis. *Liver International* (pendiente de envío para segunda revisión).

Los resultados de esta Tesis han sido presentados parcialmente en los siguientes congresos:

- Fortea JI, **Fernández-Mena C**, Rodríguez JA, Rincón D, Bañares R, Vaquero J. Effects of reduction of liver mass prior to azoxymethane-induced acute liver failure in mice. Póster congreso de la **ISHEN 2012** (Grenaa, Denmark).
- Fortea JI, Ripoll C, **Fernández-Mena C**, Puerto M, Rodríguez-Feo JA, Vaquero J, Bañares R. Mechanisms involved in the development of thrombocytopenia in rats with cirrhosis and ascit. Póster congreso de la **AASLD 2013** (Washington, DC).
- **Fernández-Mena C**, Fortea JI, Puerto M, Rodríguez-Feo JA, Álvarez E, Bañares R, Vaquero J. Optimización de la técnica de hepatectomía parcial para el estudio de la regeneración hepática para ratones. Póster congreso de la **AEEH 2014** (Madrid).

- Fortea JI, **Fernández-Mena C**, Puerto M, Rodríguez-Feo JA, Ripoll C, Bañares R, Vaquero J. Un nuevo protocolo de tetracloruro de carbono aumenta la reproducibilidad y acelera la inducción de cirrosis hepática, hipertensión portal y ascitis en rata. Póster Congreso de la **AEEH 2014** (Madrid).
- Fortea JI, Ripoll C, **Fernández-Mena C**, Puerto M, Rodríguez-Feo JA, Alvarez E, Bañares R, Vaquero J. Mecanismos implicados en el desarrollo de trombocitopenia en ratas cirróticas con Ascitis. Póster Congreso de la **AEEH 2014** (Madrid).
- Asencio JM, López JA, García-Sabrido JL, Lozano P, Pérez J, Morales A, Peligros I, Herrero H, **Fernández C**. Regeneration Preconditioning in a swine model: A new strategy to prevent the 'Small-for-Flow' Syndrome? Presentación oral en congreso del **ACS 2014** (San Francisco, CA).
- **Fernandez-Mena C**, Almagro J, Puerto M, Quintana A, Hidalgo J, Bañares R, Vaquero J. Effects of myeloid cell-selective deficiency of IL-6 for liver regeneration after partial hepatectomy (PH) in mice. Póster congreso de la **AASLD 2015**.
- Fortea JI, Zipprich A, **Fernandez-Mena C**, Rose CF, Bañares J, Puerto M, Bosoi CR, Almagro J, Hollenbach M, Clément M-A, Vaquero J, Bañares R, Ripoll R. Enoxaparin treatment does not ameliorate liver fibrosis or portal hypertension in experimental models of cirrhosis in rats. Póster congreso de la **AASLD 2015**.
- **Fernández-Mena C**, Almagro J, Puerto M, Quintana A, Hidalgo J, Bañares R, Vaquero J. Efectos de la deficiencia selectiva de interleucina-6 (il-6) en células de estirpe mieloide sobre la regeneración hepática en ratones. Póster Congreso de la **AEEH 2016** (Madrid).
- Fortea JI, Zipprich A, **Fernandez-Mena C**, Rose CF, Bañares J, Puerto M, Bosoi CR, Almagro J, Hollenbach M, Clément M-A, Vaquero J, Bañares R, Ripoll C. Estudio del efecto de la enoxaparina sobre la cirrosis e hipertensión portal experimental. Póster Congreso de la **AEEH 2016** (Madrid).



