

Modificaciones en la síntesis de DNA provocadas por la ciclosporina A sobre la regeneración hepática inducida quirúrgicamente

I. García-Alonso *, I. López de Tejada **, I. Iturburu ** y J. J. Méndez ***

Cátedra de Patología y Clínica Quirúrgicas. Facultad de Medicina. Universidad del País Vasco. Catedrático: Prof. J. J. Méndez Martín.

Palabras clave: Ciclosporina. Hepatectomía. Regeneración hepática. DNA.

Resumen

Con la finalidad de estudiar los posibles cambios inducidos por la ciclosporina A (CyA) sobre el funcionalismo hepático, se ha valorado su efecto sobre la síntesis de DNA hepatocitario consecutiva a hepatectomía parcial. La CyA se ha administrado por vía intraperitoneal a cuatro grupos de ratas, en los que se ha cuantificado el DNA intranuclear hepatocitario por un método microespectrofotométrico sobre tinción de Feulgen-Rossenback. La administración de CyA intraperitoneal ha provocado un aumento del contenido medio hepatocitario en DNA-Feulgen, tanto en los animales normales como en los sometidos a hepatectomía parcial del 40%, lo que indica un aumento en el nivel de poliploidía de los hepatocitos. Por ello parece permitido concluir que la CyA induce la entrada en fase de síntesis de los hepatocitos en el hígado en reposo y exalta la síntesis de DNA hepatocitario inducida con la hepatectomía del 40%.

Abstract

With a view to study of possible alterations induced by Cyclosporin A (CyA) on liver function, its effect has been assessed on the synthesis of hepatocytic DNA following partial hepatectomy. The CyA was administered intraperiton-

eally in four groups of rats, in which the hepatocytic intranuclear DNA was quantified by means of a microspectrophotometric method on Feulgen-Rossenback tinction. The intraperitoneal administration of the CyA caused an increase in the mean hepatocytic content in DNA-Feulgen both in normal animals and in those submitted to a partial hepatectomy of 40%, which indicated an increase in the hepatocyte polyploid level. It therefore seems that it can be concluded that CyA induces the entry to the synthesis stage of hepatocytes in the liver at rest, and raises the synthesis of hepatocytic DNA induced with a 40% hepatectomy.

Zusammenfassung

Um die möglichen Änderungen studieren zu können, die durch das Zyklosporin A (CyA) hinsichtlich des hepatischen Funktionalismus hervorgerufen wurden, würdigen die Verf. die Wirkung auf die Synthese der hepatozytären DNA nach einer Teilweisen Hepatektomie. Das CyA wurde auf intraperitonealem Wege an 4 verschiedene Gruppen von Ratten verabfolgt, bei denen das hepatozytäre intranukleare DNA auf Grund einer mikroespektrophotometrischen Methode nach Feulgen-Rossenbackscher Färbung mengenmassig bestimmt wurde. Die intraperitoneale Verabfolgung von CyA führte zu einer Erhöhung des durchschnittlichen hepatozytären Gehalts an DNA-Feulgen sowohl bei den normalen Tieren wie auch bei denjenigen Tieren, bei denen eine 40% teilweise Hepatektomie vorgenommen wurde, was auf eine Erhöhung des Polyploid-spiegels der Hepatozyten hindeutet. Aus diesem Grunde scheint die Annahme möglich, dass das CyA in der Synthesephase den Eintritt der Hepatozyten in die im Ruhezustand befindliche Leber begünstigt und die Synthese der hepatozytären DNA unterstreicht, die mit der 40% teilweisen Hepatektomie erreicht wurde.

* Becario de la Cátedra de Patología y Clínica Quirúrgica. ** Profesor contratado de Patología y Clínica Quirúrgica. *** Catedrático de Patología y Clínica Quirúrgica.

Recibido: XI/86.

Correspondencia: Dr. Ignacio García-Alonso Montoya.
M.^o Díaz de Haro, 7. 2.^o izq.
48013 Bilbao.

Résumé

En vue d'étudier les changements possibles induits par la cyclosporine A (CyA) sur le fonctionnalisme hépatique, on en a évalué l'effet sur la synthèse de DNA hépatocytaire consécutive à une hépatectomie partielle. La CyA a été administrée par la voie intrapéritonéale dans quatre groupes de rats, où l'on a quantifié le DNA intranucléaire hépatocytaire par une méthode microspectrophotométrique sur teinture de Feulgen-Rossenback. L'administration intrapéritonéale de CyA a provoqué une augmentation de la teneur moyenne hépatocytaire en DNA-Feulgen aussi bien chez les animaux normaux que chez les animaux soumis à hépatectomie de 40%, ce qui indique une augmentation dans le niveau de polyploidie des hépatocytes. Pour cette raison, il semble permis de conclure que la CyA induit l'entrée en phase de synthèse des hépatocytes dans le foie en repos et exalte la synthèse de DNA hépatocytaire induite par l'hépatectomie de 40%.

Introducción

La ciclosporina A es un metabolito fúngico de naturaleza polipeptídica y con actividad inmunosupresora selectiva sobre los linfocitos. Calne y cols. (1979) la introdujeron en la clínica del trasplante hepática¹. En los primeros meses de 1980, Starzl y cols.² comenzaron a usarla asociada a prednisona, obteniendo un notable avance en la profilaxis y terapéutica del rechazo³.

Con la mejora en las perspectivas de supervivencia, la técnica del trasplante hepático ortotópico (THO) se ha extendido a pacientes pediátricos, ensayándose nuevas técnicas quirúrgicas adaptadas a sus peculiaridades circunstantes. Así, se están practicando trasplantes ortotópicos con hígados adultos reducidos a uno o parte de uno de sus lóbulos (Bismuth y Housin, 1984), confiando a los sistemas de regulación del huésped la posterior adaptación del tamaño del hígado a las propias necesidades, vía regeneración hepática⁴. Es importante en estos casos que los fármacos empleados en el postoperatorio no obstaculicen esa actividad regenerativa.

Calne y cols. (1978) refirieron algunos casos de hepatotoxicidad de la CyA en pacientes sometidos a trasplante renal⁵. La potencial hepatotoxicidad del fármaco fue puesta de manifiesto en estudios experimentales con ratas (Thomson y cols.⁶, 1981; Siegel y cols.⁷, 1982). En fechas más recientes otros autores han señalado alteraciones bioquímicas (aumento de bilirrubina y fosfatasa alcalina) en pacientes sometidos a diversos trasplantes y tratados con CyA (Ota y Bradley⁸, 1983; Magreiter y cols.⁹, 1984; Nogueira y Cutler¹⁰, 1985).

Teniendo en cuenta la importancia que han cobrado la CyA y la regeneración hepática en el trasplante ortotópico de hígado en niños, hemos investigado los posibles efectos de este fármaco sobre el fenómeno

regenerativo. Para ello, hemos evaluado su actividad sobre la síntesis de DNA intranucléar en los hepatocitos en reposo y tras estimulación por hepatectomía.

Material y métodos

Se han empleado ratas Sprague-Dawley hembras (200-220 g.). El DNA se ha cuantificado en hígados de ratas controles y sometidas a hepatectomía, con y sin tratar con CyA.

La CyA (Sandoz Inc., Basilea, Suiza) se ha administrado por vía intraperitoneal en dosis de 15 mg/kg/día durante tres días, disuelta al 10% en una mezcla de etanol e intralipid (Kavibitrum) al 95%.

Para inducir la regeneración hepática en las ratas se ha practicado (a las dieciséis horas del segundo día de tratamiento con CyA) una lobectomía parcial del 40% (lóbulo lateral izquierdo). Cuarenta horas después fueron anestesiadas de nuevo, procediéndose a la rápida extracción del hígado. Las piezas, tras fijación en formol 10%, se incluyeron en parafina.

La cuantificación del DNA se ha llevado a cabo mediante técnicas microespectrofotométricas sobre secciones histológicas de 5 µm teñidas con la coloración de Feulgen-Rossenbeck. Este colorante tiene la característica de ser absolutamente específico del DNA y seguir una reacción de tipo estequiométrica (existe una relación directa entre el número de moléculas de colorante en el tejido y número de moléculas de DNA).

De cada animal hemos valorado cinco secciones histológicas, cuantificando en cada una de ellas 100 núcleos de hepatocitos y 25 núcleos de linfocitos o células de Kupffer (para control interno). Con ello, se ha podido calcular el contenido medio en DNA de los núcleos hepatocitarios en cada animal del estudio.

Resultados

Se ha calculado el contenido medio en DNA-Feulgen de los núcleos de cada serie experimental, resultando 12,9 unidades en los controles estáticos y 18,5 en los regenerativos. En los animales tratados con CyA la media ha sido de 15,5 para los hígados estáticos y 23,6 para los regenerativos (tabla I).

El análisis estadístico de estos datos ha permitido comprobar la existencia de una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de DNA obtenidos para las series estáticas y los obtenidos para las series regenerativas, así como entre los animales sometidos a tratamiento con CyA y sus respectivos controles.

Tabla I

	Medidas de DNA-Feulgen			
	Reposo		Regeneración	
	Control	CyA i.p.	Control	CyA i.p.
M	12,90	15,54	18,49	23,67
SD	0,94	0,97	1,29	1,37
X	14,21	17,32	19,73	25,55
x	11,98	13,39	16,67	20,87
X-x	2,23	3,93	3,06	4,68

M: Media; SD: Desviación estándar; X: Valor máximo; x: Valor mínimo; X-x: Diferencia entre los valores máximo y mínimo de cada serie.

La administración de CyA en los animales control ha producido un aumento en el contenido intranuclear de DNA en los hepatocitos. Administrada a animales sometidos a hepatectomía, ha provocado

una síntesis mayor de DNA, que se ha manifestado en dos hechos: 1) Aumento del valor medio de DNA/núcleo en los hepatocitos. 2) Aparición de mayor número de hepatocitos con alto nivel de poliploidía (fig. 1).

Para poner más de manifiesto estas diferencias hemos realizado un estudio de la dispersión de los valores de DNA-Feulgen obtenidos. Para ello hemos calculado la media aritmética de los valores extremos de cada serie experimental; la amplitud de la muestra empleada para este cálculo se ha fijado en el 20% del total de medidas de cada serie (20% mayor y 20% menor). El cociente entre ambos extremos se ha tomado como indicador del grado de dispersión de los valores en cada serie experimental.

Comparando los valores obtenidos en cada serie hemos visto que: 1. El grado de dispersión no es

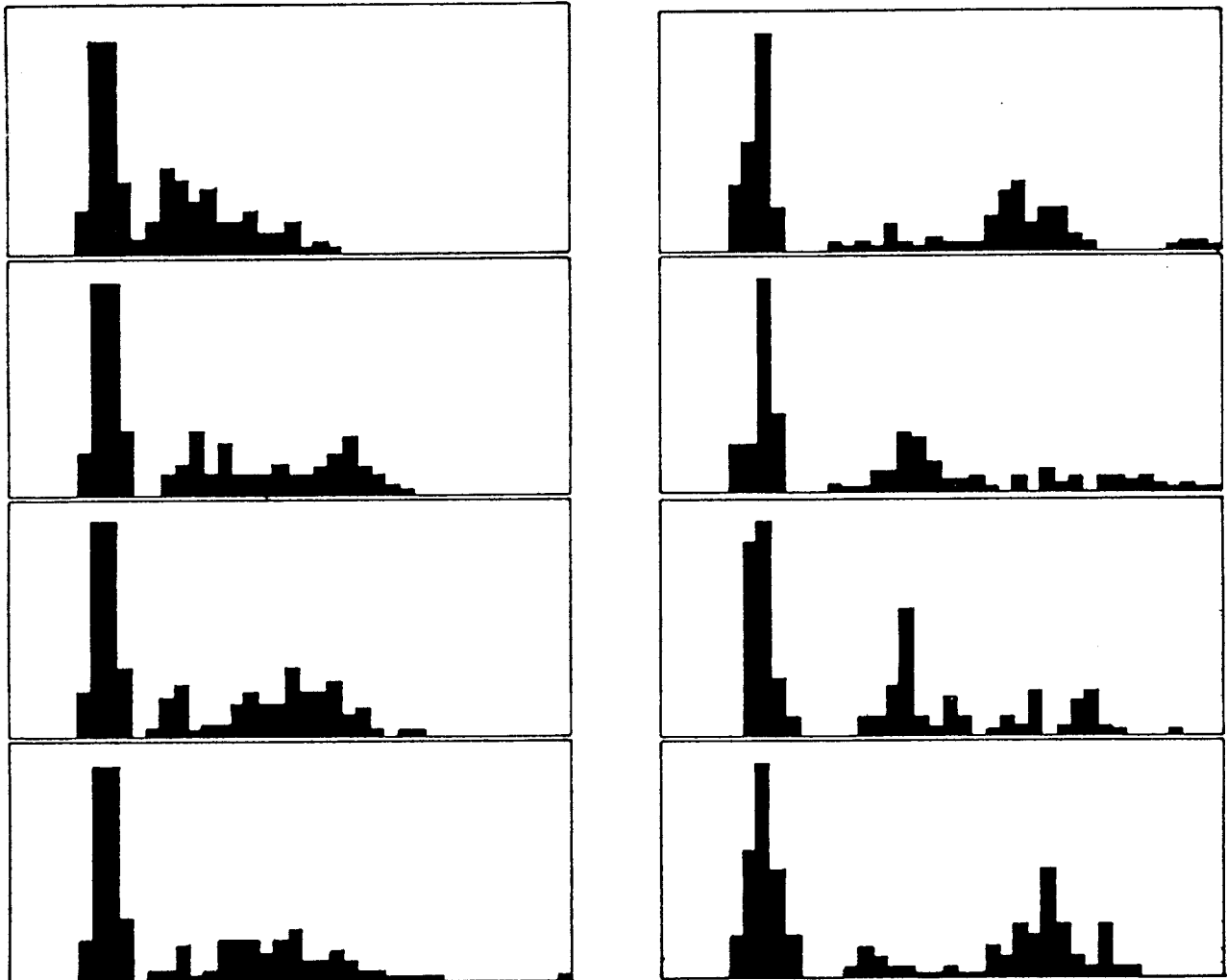


Fig. 1.—En el eje de abscisas, contenido en DNA; en el de ordenadas, frecuencia. Los histogramas de la izquierda corresponden a hepatocitos en regeneración postquirúrgica. Los de la derecha han sido sometidos, además, a tratamiento con CyA; se aprecia una mayor dispersión en la muestra, que se corresponde con una mayor actividad de síntesis de DNA.

modificado por el tratamiento con CyA y sí lo es por la hepatectomía. 2. La media de los valores extremos superiores es mayor ($p < 0,05$) en los animales tratados con CyA (con y sin hepatectomía). 3. La media de los valores extremos inferiores no se modifica significativamente con la CyA en los animales controles, pero aumenta en los sometidos a hepatectomía ($p < 0,05$).

Discusión

El signo fehaciente de regeneración del parénquima hepático ha sido en general la entrada de los hepatocitos en fase de síntesis (Higgins y Anderson ¹¹, 1944). Para demostrar la existencia de replicación en los hepatocitos, se puede proceder de dos modos diferentes:

— Bien a través de la técnica autorradiográfica, con la que tras un tratamiento suficientemente largo en el que se administran al animal precursores del DNA marcados con radioisótopos, se detectan las células en síntesis por contener mayor índice de producto radioactivo (Leong y cols., 1964).

— O bien por la estimación individual (célula a célula) del contenido de DNA nuclear. Procedimiento con el que las células en síntesis se estiman por tener un contenido de DNA intermedio entre las dosis 2C y 4C. Este procedimiento se utiliza frecuentemente cuando las células se encuentran libres (Fukuda y cols. ¹², 1978), pero puede hacerse también por citofotometría de alta precisión cuando las células se encuentran constituyendo tejidos (Barberá ¹³, 1972).

En nuestro caso hemos querido utilizar el método citofotométrico para estimar la cantidad de DNA de los núcleos, ya que éstos en los hepatocitos de hígados normales (no sujetos a regeneración) contienen cantidades de DNA diploides o múltiples de la diploidía, tales como 4, 8 y 16C (Ris y Mirsky ¹⁴, 1949; Swift ¹⁵, 1953). Tales poblaciones con contenido regular de DNA dan de sí unas estimaciones del contenido de DNA con muy poco error, por lo que la distribución estadística de los valores que se obtienen por la medición de una amplia muestra de células arroja un valor medio con muy poca desviación. En la representación gráfica del histograma de fre-

cuencias (en la que en las ordenadas se recoge el número de células y en las abscisas el contenido de DNA), las células de contenido regular aparecen agrupadas en picos nítidos entre los que quedan unos espacios a guisa de valles, donde no se encuentran células.

Cuando existe una cierta población de células en fase de síntesis aparece una dispersión de los valores que refleja la presencia de cantidades intermedias de DNA situadas entre dos niveles de ploidía (Barberá ¹³, 1972; Fukuda y cols. ¹², 1978); es decir, ocupando los valles.

Este procedimiento es de mayor precisión y regularidad que el autorradiográfico, ya que las células que se miden se eligen con buen contraste y definición directamente sobre la estructura histológica, evitando con absoluta seguridad incluir dentro de la muestra células que no sean hepatocitos. Además, se puede llevar el tamaño de la muestra a los límites que se quieran. Para nosotros trabajar con un amplio margen en el tamaño de la muestra resulta de especial importancia, debido a que nuestro objetivo final es contrastar muestras sometidas a diferentes tratamientos, y para ello es necesario un análisis estadístico, que queda reforzado con muestras grandes (y viceversa).

Efectivamente, en los hígados a las cuarenta horas posthepatectomía, hemos comprobado la desaparición de los «valles» que, en condiciones normales, existen entre los picos del histograma de frecuencias del contenido en DNA de los hepatocitos. Estos «valles» corresponden a los valores intermedios entre dos niveles de ploidía. Este fenómeno se objetiva uniparamétricamente en la cantidad promedio de DNA de los hepatocitos del hígado sujeto a regeneración.

Estos resultados nos permiten, pues, objetivar de una forma numérica la existencia de regeneración hepática y en cierta medida la intensidad de este proceso.

Los pocos trabajos que han intentado relacionar el sistema inmune con la regeneración hepática lo han hecho estimando el porcentaje de proliferación hepatocitaria asociado al tratamiento (Kolpashchikova y cols. ¹⁶, 1979; Bavaera y cols. ¹⁷, 1980). Por ello, también nosotros hemos querido correlacionar el tratamiento con CyA y la tasa de síntesis de DNA hepática. Por nuestros resultados, hemos podido comprobar que la CyA administrada por vía i.p. produce, aun sin hepatectomía, un aumento global del contenido de DNA hepatocitario, que tal y como demostramos anteriormente, representa un indicador de la entrada en fase de síntesis de un número importante de hepatocitos.

El incremento, sin embargo, es menor que el que se produce por la simple hepatectomía. O lo que es lo mismo, la administración de CyA provoca una in-

Tabla II
Estudio del grado de dispersión de los valores de DNA-Feulgen

	Hígado en reposo			Hígado regenerativo		
	M	m	M/m	M	m	M/m
Control	16,27	10,93	1,501	25,85	12,75	2,036
CyA i.p.	19,21	12,25	1,575	33,61	16,46	2,043

M: Media de los valores más altos de la serie; m: Idem de los inferiores.

ducción de los hepatocitos para que entren en fase de síntesis más baja, pero semejante a la que produce el estímulo de la hepatectomía.

Los animales hepatectomizados y tratados con CyA i.p. muestran un estímulo regenerativo muy superior a los simplemente hepatectomizados. Esto parece indicar que la hepatectomía y la CyA i.p. actúan sinérgicamente, provocando una inducción regenerativa mucho más intensa que la esperada tras la simple hepatectomía.

Teniendo en cuenta que la CyA no se ha definido como un producto cicloactivo (Dos Reis y Shevach¹⁸, 1982; Borel y Lafferty¹⁹, 1983), no cabe esperar que su acción sobre el proceso regenerativo hepático tenga lugar sobre los hepatocitos ya inducidos a la síntesis de DNA, sino que parece más probable que su papel sea directamente inductor. Sobre todo si se tiene en cuenta el hecho de que los hígados no hepatectomizados sometidos a tratamiento con CyA presentan una evidente tasa proliferativa, cuando está admitido que los hepatocitos en condiciones normales permanecen en estado latente (Go).

Sin embargo, las varias sugerencias encontradas en la literatura sobre el papel de los timocitos en la regeneración hepática (Kolpashchikova y cols.¹⁶, 1979; Desser-Wiest y cols.²⁰, 1980; Geldanowski y cols.²¹, 1983; Schaff y cols.²², 1984) y la interferencia ejercida por la CyA sobre el metabolismo de estas células (Reem y cols.²³, 1983), hablaban a favor de una influencia negativa de este producto en el proceso regenerativo.

A favor de un efecto contraproducente de la CyA en la regeneración hepática, también hablan los trabajos de Bavaera y cols.¹⁷ (1980). Estos autores sugieren que los linfocitos T juegan un papel importante en el proceso regenerativo hepático inducido por hepatectomía parcial. A esta misma idea apuntan las experiencias de Yokomura y cols.²⁴ (1984) y Miyahara y cols.²⁵, 1984, que muestran que los hepatocitos en regeneración provocan activación de linfocitos singénicos («in vitro»).

Por otra parte, si tomamos en consideración los varios trabajos que hablan de un factor hormonal de origen intestinal (llamado por algunos autores «hepatopoyetina») regulador de la regeneración hepática (Orloff y cols.²⁶, 1972; Starlz y cols.²⁷, 1973; Leffert y cols.²⁸, 1979; Ruhenstroth-Bower y cols.²⁹, 1984), podríamos plantearnos si el estímulo proliferativo de la CyA pudiera deberse a una actuación del fármaco a nivel de los supuestos centros productores de esa hormona. Si aceptamos el supuesto de Ruhenstroth-Bower²⁹ (1984), que localiza la producción de la «hepatopoyetina» en las placas de Peyer del intestino delgado, el hecho se complica más. Ello es debido a que recientemente se ha descrito que la CyA produce una inhibición de la proliferación de las placas de Peyer subsiguiente a

una lesión provocada por isquemia intestinal (Basáñez, «comunicación personal»).

A la vista de todo lo anterior, cabe elaborar dos hipótesis sobre la relación existente entre la CyA y la proliferación hepática.

La primera de ellas tendería a involucrar al sistema inmunitario y permitiría hablar de un efecto indirecto de la CyA sobre el hepatocito. Así, la actividad inmunosupresora de la CyA, por medio quizá de un efecto supresor sobre el sistema monocito-macrófago (Wright y cols.³⁰, 1984), permitiría una acentuación de la respuesta regenerativa tras hepatectomía. Los numerosos trabajos citados anteriormente, y que aunque difícilmente armonizables relacionan la regeneración hepática con el sistema inmunitario, apoyan esta hipótesis.

En segundo lugar se podría argumentar un efecto directo de la CyA sobre los hepatocitos no descritos hasta hoy. Sólo una experiencia de tratamiento aislado de hepatocitos cultivados «in vitro» con CyA podría darnos pistas sobre esta hipótesis. Pero también cabría esperar resultados confusos, dado que los hepatocitos aislados y cultivados «in vitro» alteran sustancialmente sus características funcionales.

Conclusiones

La CyA induce la entrada de los hepatocitos en fase de síntesis y potencia la regeneración hepatocitaria subsiguiente a la hepatectomía parcial del 40%. Se desconoce el mecanismo de esta acción de la CyA.

Bibliografía

1. CALNE, R. Y.; ROLLES, K.; WHITE, D. J. G., y cols.: «Cyclosporin A as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers». *Lancet*, 2:1033-1036, 1979.
2. STARZL, T. E.; KLINTMALM, G. B. G.; PORTER, K. E.; IWATSUKI, S., y SCHROTER, P. J.: «Liver transplantation with use of cyclosporin-A and prednisone». *N. Engl. J. Med.*, 305(5):266-269, 1981.
3. STARZL, T. E.; IWATSUKI, S.; VAN THIEL, D. H., y cols.: «Report of Colorado-Pittsburgh liver transplantation studies». *Trans. Proc.*, 15(4):2582-2585, 1983.
4. BISMUTH, H., y HOUSSIN, D.: «Reduced-saized orthotopic liver graft in hepatic transplantation in children». *Surgery*, 95(3):367-372, 1984.
5. CALNE, R. Y.; WHITE, D. J. G.; THIRU, S., y cols.: «Cyclosporin-A in patients receiving renal allografts from cadaver donors». *Lancet*, 23:1323-1326, 1978.
6. THOMSON, A. W.; WHITING, P. H.; CAMERON, I. D.; LESSELS, S. E., y SIMPSON, J. G.: «A toxicological study in rats receiving immunotherapeutic doses of cyclosporin A». *Transplantation*, 31:121-129, 1981.
7. SIEGEL, H., y RYFFEL, B.: «Effects of cyclosporin on renin-angiotensin-aldosterone system». *Lancet*, ii:1274, 1982.
8. OTA, B., y BRADLEY, M.: «Side effects of cyclosporin in 100 renal allograft recipients». *Trans. Proc.*, 15(4):3150-3155, 1983.

9. MAGREITER, R.; KRAMAR, R.; HUBER, C., y cols.: «Transplante renal y hepático combinado». *Lancet* (Ed. esp.), 5(3):221-222, 1984.
10. NOGUEIRA, H. J., y CUTLER, R. E.: «Cyclosporine: part II. nephrotoxicity and other adverse effects». *D&T Today*, 3:585-586, 1985.
11. HIGGINS, G. M., y ANDERSON, R. M.: «Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal». *Arch. Pathol.*, 196-202, 1944.
12. FUKUDA, M.; BOHM, N., y FUJITA, S.: «Cytophotometry and its biological application». New York, Edit. Gustav Fischer Verlag, 1978.
13. BARBERÁ-GUILLEM, E.: «Análisis citofotométrico de los megacariocitos humanos». Tesis doctoral. Valencia, 1972.
14. RIS, H., y MIRSKY, A. E.: «Quantitative cytochemical determination of desoxyribonucleic acid with the Feulgen reaction». *J. Gen. Physiol.*, 33:125-146, 1949.
15. SWIFT, H.: «Quantitative aspects of nuclear nucleoproteins». *Int. Rev. Cytol.*, 2:1-76, 1953.
16. KOLPASHCHIKOVA, I. F.: «Effect of transplantation of thymus, bone marrow, and spleen cells on the regenerative processes in pathologically changed liver». *Biull. Eksp. Biol. Med.*, 88:477-480, 1979.
17. BAVAEBBA, A. G.; KRASKINA, A. N., e IUDINA, N. V.: «Stimulation of the mitotic activity of the hepatocytes and kupffer cells in the liver of monoperated mice by T and B lymphocytes from partially hepatectomized... donor». *Biull. Eksp. Biol. Med.*, 89(1):69-70, 1980.
18. DOS REIS, G. A., y SHEVACH, E. M.: «Effect of cyclosporin-A on T cell function in vitro: the mechanism of suppression of T cell proliferation». *J. Immunol.*, 129(6):2360-2367, 1982.
19. BOREL, J. F., y LAFFERTY, K. J.: «Cyclosporin: speculation about its mechanism of action». *Trans. Proc.*, 15(3):1881-1885, 1983.
20. DESSER-WIEST y DESSER, H.: «Inhibition and stimulation of rat thymocytes in vitro by partial hepatectomy». *Exp. Pathol.*, 18(2):114-117, 1980.
21. GIELDANOWSKI, J.: «Immunomodulatory drugs as the stimulators of proliferative process». *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 31(3):345-348, 1983.
22. SCHAFF, Z.; LAPIS, K., y SENDROI, M.: «D-galactosamine-induced liver injury in immunosuppressed mice». *Acta Morphol. Hung.*, 32(1):67-72, 1984.
23. REEM, G. H.; COCK, L. A., y PALLADINO, M. A.: «Cyclosporin inhibits interleukin-2 and interferon-gamma synthesis by human thymocytes». *Trans. Proc.*, 15(4):2387-2389, 1983.
24. YOKOMURO, K.; MIYAHARA, S.; TAKAHASHI, H., y KIMURA, Y.: «Regeneration and the immune system. II. Suppressor activities of lymphocytes activated in vivo by liver regeneration and their genetic control». *Eur. J. Immunol.*, 13(11):883-889, 1984.
25. MIYAHARA, S.; YOKOMURO, K.; TAKAHASHI, H., y KIMURA, Y.: «Regeneration and the immune system. I. In vitro and in vivo activation of lymphocytes by liver regeneration and the role of kupffer cells in stimulation». *Eur. J. Immunol.*, 13(11):878-883, 1984.
26. ORLOFF, M. J.; LEE, S.; CHANDLER, J. G.; ROSEN, H.; NAKAJI, N. T.; KRUBLE, R., y WILLIAMS, R.: «Humoral regulation of liver regeneration by a hepatotrophic portal blood factor». *Gastroenterology*, 62:791-795, 1972.
27. STARZL, T. E.; FRANCAVILLA, A.; HALGRIMSON, C. G., y cols.: «The origin, hormonal nature and action of hepatotrophic substances in portal venous blood». *Surg. Gynecol. Obstet.*, 137(2):179-199, 1973.
28. LEFFERT, H. L.; KOCH, K. S.; MORAN, T., y RUBALCAVA, B.: «Hormonal control of rat liver regeneration». *Gastroenterology*, 76:1470-1482, 1979.
29. RUHENSTROTH-BOWER, G.; GOLDBERG, M., y VOGL, S.: «Regulation of hepatocyte proliferation. The feed-back system of hepatopoietin». *Naturwissenschaften*, 71(8):404-407, 1984.
30. WRIGHT, B.; GREIG, R., y POSTE, G.: «Inhibition of macrophage activation and tumor cell cytotoxicity by cyclosporin A». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123(2):710-715, 1984.