

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Terapia con células madre mesenquimales de la colestasis  
microquirúrgica experimental**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Carlos Gilsanz Martín**

Directores

María Ángeles Aller Reyero  
María Paz de Miguel González  
Alfredo Alonso Poza

**Madrid, 2015**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE  
MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**



**TERAPIA CON CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES  
DE LA COLESTASIS MICROQUIRÚRGICA  
EXPERIMENTAL**

**TESIS DOCTORAL**

**CARLOS GILSANZ MARTÍN**

**DIRECTORES**

Maria Ángeles Aller Reyero  
Maria Paz de Miguel González  
Alfredo Alonso Poza

**MADRID, 2015**





## Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Carlos Gilsanz Martín
Título de la Tesis	TERAPIA CON CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE LA COLESTASIS MICROQUIRÚRGICA EXPERIMENTAL
Facultad o Centro	Medicina, UCM

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	Maria Angeles Aller Reyero
Centro al que pertenece y dirección	Departamento de Cirugía. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Plaza de Ramón y Cajal s.n., 28040 MADRID
D.N.I/Pasaporte	02519481S
e-mail	maaller@med.ucm.es

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	X			
Definición Objetivos	X			
Metodología	X			
Relevancia Resultados	X			
Discusión / Conclusiones	X			

**INFORME** (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

*El tema que se estudia en el presente trabajo de Investigación es de gran trascendencia actualmente por la elevada morbi-mortalidad que comporta la cirrosis hepática. En particular, la cirrosis por colestasis extrahepática en adultos, por litiasis o patología tumoral, y en niños por atresia biliar, es una de las causas de patología inflamatoria hepática que progresa a fibrosis-cirrosis cuya única alternativa terapéutica es el trasplante de hígado. La escasez de hígados donantes implica que un elevado número de pacientes fallezcan en lista de espera. Por éste motivo, el planteamiento de nuevas y más eficaces terapias en ésta patología, como es la administración de células madre mesénquimales y, su ensayo previo en animales de experimentación, aporta un futuro esperanzador para ésta devastadora enfermedad.*

*En la **Introducción** se expone y actualiza la patología hepática colestásica y la insuficiencia hepática, sus modelos experimentales, así como las terapias anti-fibrogénicas, en particular con células madre mesenquimales.*

*La **Hipótesis** y los **Objetivos** se exponen con claridad y son concisos y específicos.*

*El **Material** y **Métodos** se caracteriza por su rigor metodológico, especialmente por el modelo experimental microquirúrgico utilizado, por los cuidados y tratamiento post-operatorio a largo plazo que precisan los animales, así como el aislamiento y diferenciación de las células madre mesénquimales, obtenidas de tejido adiposo humano durante la realización de liposucciones quirúrgicas. El diseño experimental está correctamente explicado, a pesar de realizar múltiples grupos de estudio con diferentes tratamientos y tiempos de evolución postoperatoria, lo cual permite reproducir las técnicas empleadas por otros grupos de investigadores.*

*Los **Resultados** de éste estudio permiten verificar la Hipótesis de Investigación y se exponen claramente, tanto en el texto, como en las numerosas Figuras y Tablas incluidas, permitiéndose así una clara comprensión por los lectores de éste estudio.*

*En la **Discusión** se estudian e integran todos los resultados obtenidos tras el estudio de las alteraciones hepáticas (insuficiencia hepática crónica e insuficiencia hepática aguda-sobre-crónica, cuando las ratas se descompensan después de la 6ª semana de evolución post-operatoria y desarrollan ascitis) y extra-hepáticas resultantes de la colestasis obstructiva en la rata y se demuestra que la administración de células madre mesénquimales de origen adipocítico, tanto humanas como de rata, quizá por sus efectos anti-inflamatorios, inmunosupresores y potenciadores de la reparación tisular, mejoran la insuficiencia hepática y reducen la fibrosis, la proliferación biliar y la necrosis hepatocitaria. En particular, es de gran interés la demostración de que éstos efectos son mejores cuando se realiza un Isotrasplante de células madre de ratas singénicas prediferenciadas a hepatocitos, respecto al Xenotrasplante de células madre humanas*

*Respecto de la **Bibliografía**, destaca la exhaustiva y actualizada revisión, tanto de la patología fibrogénica hepática, como de las propiedades y utilización, experimental y clínica, de la terapia con células madre, un tema de vanguardia en la actualidad .*

*En **Conclusión**, la relevancia del presente trabajo de Investigación se fundamenta en la posible extrapolación de los resultados obtenidos a la clínica humana, en la cual la cirrosis de diferentes etiologías comporta una elevada morbi-mortalidad a nivel mundial. En particular, el tratamiento con células madre de origen mesenquimal adipocítico y prediferenciadas in vitro a hepatocitos podría ser de utilidad para reducir las complicaciones secundarias a las hepatopatías crónicas de origen biliar en el ser humano.*

**Madrid, a 12 de Marzo de 2015**



**Fdo.:MA Aller**

***Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.***





## Informe del Director de la Tesis Doctoral

<b>DATOS DE LA TESIS DOCTORAL</b>	
<b>Nombre del Doctorando</b>	Carlos Gilsanz Martín
<b>Título de la Tesis</b>	TERAPIA CON CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE LA COLESTASIS MICROQUIRÚRGICA EXPERIMENTAL
<b>Facultad o Centro</b>	Medicina, UCM

<b>DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL</b>	
<b>Nombre Completo</b>	Maria Paz DeMiguel González
<b>Centro al que pertenece y dirección</b>	Instituto de Investigaciones Sanitarias del Hospital Universitario La Paz, Paseo Castellana 261, 28064 Madrid
<b>D.N.I./Pasaporte</b>	08982805V
<b>e-mail</b>	mariapdemiguel@gmail.com

	<b>VALORACIÓN DE LA TESIS</b>			
	<b>Muy Buena</b>	<b>Buena</b>	<b>Suficiente</b>	<b>Deficiente</b>
<b>Originalidad</b>	X			
<b>Definición Objetivos</b>	X			
<b>Metodología</b>	X			
<b>Relevancia Resultados</b>	X			
<b>Discusión / Conclusiones</b>	X			

**INFORME** (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

El tema que trata la presente tesis doctoral es de gran actualidad y relevancia, ya que aborda la problemática de la cirrosis hepática desde el punto de vista de la Terapia Celular, y su abordaje con técnicas de Medicina Regenerativa en animales de experimentación.

La Introducción es lo suficientemente extensa y detallada, planteando el problema específico y los antecedentes tanto en el uso de células madre mesenquimales, como los modelos experimentales de cirrosis hepática.

La Hipótesis y los Objetivos son claros y están convenientemente especificados.

Los Resultados son muy extensos, detallados con iconografía suficiente y analizados convenientemente. Destaca el análisis y diseño experimental de diversos grupos de animales con diferentes tratamientos frente a los controles colestásicos. Destaca también el abordaje experimental, tanto a nivel quirúrgico como de técnicas de aislamiento y diferenciación in vitro de las células a transplantar.

La discusión es suficientemente detallada y analítica, y permite extraer conclusiones muy relevantes para la futura Terapia Celular en pacientes con colestasis hepática. Destaca la comparativa entre los diversos tratamientos, así como la misma con otros abordajes experimentales, de gran interés terapéutico y con una bibliografía actualizada y relevante.

Finalmente, destaca muy favorablemente la trasladabilidad casi inmediata de los resultados experimentales a los pacientes afectados por la enfermedad.



*Madrid, a 23 de Marzo de 2015*

***Fdo.: Maria P De Miguel***

*Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.*



## Informe del Director de la Tesis Doctoral

DATOS DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre del Doctorando	Carlos Gilsanz Martín
Título de la Tesis	TERAPIA CON CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE LA COLESTASIS MICROQUIRÚRGICA EXPERIMENTAL
Facultad o Centro	Medicina, UCM

DATOS DEL DIRECTOR DE LA TESIS DOCTORAL	
Nombre Completo	Alfredo Alonso Poza
Centro al que pertenece y dirección	Jefe de Servicio de Cirugía. Hospital Universitario del Sureste de Madrid. Avenida Ronda del Sur Nº 10 . Arganda del Rey. 28500 MADRID
D.N.I/Pasaporte	12748779V
e-mail	alfredo.alonsop@salud.madrid.org

	VALORACIÓN DE LA TESIS			
	Muy Buena	Buena	Suficiente	Deficiente
Originalidad	X			
Definición Objetivos	X			
Metodología	X			
Relevancia Resultados	X			
Discusión / Conclusiones	X			

**INFORME** (en caso necesario se podrán añadir más hojas):

*El tema que se analiza en la presente Tesis Doctoral supone un estudio de investigación de gran trascendencia por la elevada morbi-mortalidad y coste económico que supone la cirrosis hepática. Concretamente, la cirrosis por colestasis extrahepática en adultos y en niños por sus distintas etiologías hace que actualmente la única alternativa terapéutica sea el trasplante hepático. El elevado coste de este procedimiento hace que nos hayamos planteado nuevas y eficaces terapias en ésta patología, como es la administración de células madre mesénquimales. Actualmente su ensayo previo en animales de experimentación, aporta un futuro prometedor para ésta grave enfermedad.*

*La Introducción es una extraordinaria exposición del estado actual del tema tratado, al que da soporte la bibliografía mas relevante sobre un tema de investigación realmente apasionante.*

*La Hipótesis y los Objetivos son claros y concretos y a ellos responden las conclusiones finales del trabajo de investigación tan arduo que se ha llevado a cabo.*

**Material y Método.** El diseño experimental está correctamente explicado, a pesar de los múltiples grupos de estudio con diferentes tratamientos y tiempos de evolución postoperatoria, lo cual permite reproducir las técnicas empleadas por otros grupos de investigadores. Tiene por tanto un gran rigor metodológico, especialmente por el modelo experimental microquirúrgico utilizado, por los cuidados y tratamiento post-operatorio a largo plazo que precisan las ratas de experimentación, así como el aislamiento y diferenciación de las células madre mesénquimales, obtenidas de tejido adiposo humano durante la realización de liposucciones quirúrgicas.

Los **Resultados** de ésta tesis doctoral, utilizando los análisis estadísticos necesarios a cada parte, permiten verificar la Hipótesis de trabajo, exponiéndose en el texto y en las numerosas Figuras y Tablas incluidas, permitiéndose así una clara comprensión por los lectores de éste estudio.

La **Discusión** es una interpretación y contraste con la bibliografía publicada por los más relevantes autores, de los resultados obtenidos tras el estudio de las alteraciones hepáticas y extra-hepáticas resultantes de la colestasis obstructiva en el animal de experimentación y se demuestra que la administración de células madre mesénquimales de origen adipocítico, tanto humanas como de rata, quizá por sus efectos anti-inflamatorios, inmunosupresores y potenciadores de la reparación tisular, mejoran la insuficiencia hepática y reducen la fibrosis, la proliferación biliar y la necrosis hepatocitaria. En particular, es de gran interés la demostración de que éstos efectos son mejores cuando se realiza un Isotrasplante de células madre de ratas singénicas prediferenciadas a hepatocitos, respecto al Xenotrasplante de células madre humanas. Destaca la exhaustiva y actualizada revisión, tanto de la patología fibrogénica hepática, como de las propiedades y utilización, experimental y clínica, de la terapia con células madre.

La numerosa **Bibliografía**, es fiel reflejo de un tema candente que interesa en grado sumo a toda la comunidad científica.

Las **Conclusiones**, en concordancia con los objetivos y la hipótesis de trabajo, expresan la importancia de la presente tesis doctoral que se basa en la posible aplicación a la clínica humana, en la cual la cirrosis de cualquier origen comporta una elevada morbi-mortalidad y coste sanitario. En concreto, el tratamiento con células madre de origen mesenquimal adipocítico y prediferenciadas in vitro a hepatocitos podría ser de utilidad para reducir las complicaciones secundarias a las hepatopatías crónicas de origen biliar en el ser humano.

Madrid, a 12 de Marzo de 2015



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Alfonso', written over a horizontal line.

Fdo. Alfredo Alonso Poza.

Este impreso deberá entregarse al Departamento/Órgano responsable del Posgrado/ Comisión responsable del Programa de Doctorado, para su estudio y aprobación en la admisión a trámite de la tesis doctoral. Asimismo, deberá incluirse entre la documentación enviada a la Comisión de Doctorado para la designación del Tribunal y aprobación de la defensa de la Tesis Doctoral.

A mis padres,  
a mi mujer, y  
a mis hijas



# *Agradecimientos*

- A mis directores de tesis, la Prof. Dra. María Ángeles Aller, la Dra. María Paz De Miguel y el Dr. Alfredo Alonso Poza, por su apoyo constante, su entusiasmo, sus consejos y su dedicación plena a la consecución de este trabajo experimental, sin cuya colaboración no hubiera sido posible lograr este objetivo.

- Mi agradecimiento especial a la profesora doctora María Ángeles Aller Reyero, por toda la confianza que depositó en mí, aceptándome bajo su dirección, guiándome en mis primeros pasos en la investigación e inculcándome el compromiso con el rigor científico, lo que me trajo un sinnúmero de enseñanzas, tanto personales como académicas. Por poner a mi disposición su gran sabiduría e inagotable fuente de conocimientos, lo que enriqueció sobremanera el resultado final de este proyecto. Gracias por su constante apoyo, su entrega absoluta y todo el tiempo invertido en lo personal, su paciencia, comprensión y generosidad. Gracias profesora Aller por ser una persona acogedora, amable y sobre todo dispuesta y siempre preocupada.

- Al profesor doctor Jaime Arias Catedrático de Cirugía de la Facultad de Medicina de la U.C.Mpor haberme acogido en este departamento y por haberme brindado la posibilidad de desarrollar este trabajo de investigación. Durante el desarrollo de mi tesis he podido disfrutar de su integridad, humildad, sabiduría y sentido común con lo que me siento eternamente agradecido. Gracias, por ser un verdadero maestro, un verdadero gigante como científico y de una altura aún mayor como persona.

- Al equipo dirigido por la Dra. María Paz De Miguel, de Ingeniería Celular del Hospital Universitario de La Paz, en especial a Sherezade Fuentes y Alejandro Blázquez, siempre dispuestos a colaborar, haciendo un gran esfuerzo al adaptar sus horarios de trabajo a las exigencias del exhaustivo tiempo empleado en el periodo experimental del desarrollo de esta tesis, llevando a cabo un enorme trabajo con el aislamiento y cultivo de las células madre, así como en el procesamiento de las muestras histológicas.

- A la Dra. Isabel Prieto, por su generosa disposición y colaboración en la realización de la parte experimental, al haberme brindado su tiempo y desinteresada ayuda en esta parte tan importante de la tesis. Gracias por haberme acompañado y por compartir esta experiencia de vida.

- A Ana Arias ,Carlos Nieto y Zoe de Julián por hacer más agradable el día a día, por su constancia y su capacidad de trabajo y haber compartido las tardes de colestasis formando un gran equipo coordinado, y hacer de nuestro lugar de trabajo un espacio más entretenido y distendido para investigar. Sin estas personas no habría sido posible cumplir esta meta con tanta eficacia y tanta rapidez.

- A Santiago Cano, experto en el tratamiento estadístico de los resultados por su disponibilidad y estar siempre dispuesto a resolver cualquier duda.

- A la Dra. Beatriz Diéguez Fernández, agradecerla todo el apoyo brindado en los momentos difíciles, por escucharme cuando lo necesité sin necesidad de explicaciones, por tu

preocupación incesante así como también la ayuda que me presto para continuar cuando parecía que la cosa no avanzaba. Gracias por tu amistad.

- Al Dr. Manuel Losada Ruíz, agradecerle su ayuda, consejos y acertadas opiniones que hicieron que este arduo trabajo fuera más ameno y cuyo aporte influenciara significativamente en el desarrollo de esta tesis. Gracias por tu amistad.

-Al Dr. Salvador Argudo, agradecerle su ayuda y orientación, tanto en la parte experimental como en la elaboración de la parte escrita, lo que aportó gran fluidez en el desarrollo de esta tesis. Gracias por tu amistad.

- Al Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario de La Paz, a la Dra. Carlota Largo (Dra. Veterinaria), así como a los técnicos y al personal auxiliar de su equipo quienes me permitieron el uso de sus instalaciones, que me instruyeron y ayudaron en el manejo y cuidado de los animales de experimentación.

- Al personal del laboratorio de bioquímica de la Facultad de veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona quienes realizaron las determinaciones bioquímicas para la obtención de nuestros resultados.

-A mis padres, por todo el apoyo que me han dado durante todo este tiempo. Han sido un pilar importante para mí en este nuevo desafío, con su incondicional cariño y con las constantes palabras de apoyo para mi desarrollo personal y profesional.

-A mi mujer porque gracias a su paciencia e incondicional apoyo y comprensión, he tenido las fuerzas necesarias para sacar adelante esta tesis, y ha sido su constante motivación la que me ha permitido luchar día a día para alcanzar este objetivo.

-A mis hijas Alejandra y Virginia, porque me has dado la fuerza para seguir adelante en este camino y un motivo más para lograr este objetivo, que espero con todo deseo que lleguen a entender algún día el motivo por el que durante tantas horas no he podido dedicarles la atención que se merecen.

-A la Fundación Mutua Madrileña, por su aportación económica a través de la concesión de una beca destinada a la financiación del trabajo de Investigación que constituye ésta Tesis Doctoral (ref.nº. AP69772009)

## ***Índice de abreviaturas y acrónimos***



## A

**A:** glándula adrenal

**ABCB:** “*ATP-binding cassette bile canaliculus*” (transportador ATP-dependiente del canalículo biliar)

**Ac bil:** ácidos biliares

**Ach:** Acetilcolina

**ACTH:** hormona adrenocorticotropa

**AH:** arteria hepática

**Alb:** albumina

**ALT:** alanin aminotransferasa

**Ang II:** angiotensina II

**ANOVA:** análisis de la varianza

**AST:** aspartato aminotransferasa

**Act Prot:** actividad de Protrombina

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

## B

**B:** bazo

**Bb:** bilirrubina

**Bb T:** bilirrubina total

**Bb D:** bilirrubina directa

**BD/BTx100:** % de bilirrubina directa en relación a bilirrubina total.

**bFGF:** “*fibroblastic growth factor*”

(factor básico de crecimiento

fibroblástico)

## C

**CA:** cayado aórtico

**CCHP:** ratas con colestasis microquirúrgica y xenotrasplante de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos.

**CCRND:** ratas con colestasis microquirúrgica e isotrasplante de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas.

**CCRP:** ratas con colestasis microquirúrgica e isotrasplante de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos.

**CER:** circulación colateral espleno-renal

**CMS:** ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica e inyección intrahepática de solución salina.

**COL:** colágeno

**CPE:** circulación colateral para-esofágica

**CPF:** catéter de perfusión de formaldehído

**CPR:** circulación colateral pararectal

**Cr:** Creatinina

**CTGF:** “*connective tissue growth factor*” (factor de crecimiento del tejido conectivo)

**CXC:** Quimioquinas

**CCL4:** tetracloruro de carbono

**CD4<sup>+</sup>:** células T ayudantes o *helper*

**CMQ:** Colestasis microquirúrgica.

## D

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**D:** duodeno

## E

**E:** esófago

**ECM:** “*extracellular matrix*” (matriz extra celular)

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**EP:** espacio porta

**ERi:** circulación colateral esplenorrenal inferior

**ERs:** circulación colateral esplenorrenal superior

**Es:** estómago

**EGF:** *epithelial growth factor* (factor de crecimiento de epitelio)

**ERO:** especies reactivas de oxígeno

## F

**F:** Ligamento falciforme

**FA:** fosfatasa alcalina

**FBS:** “*fetal bovine serum*” (suero bovino fetal)

**FSH:** hormona folículo estimulante

**F:** fibrinógeno

**FGF:** “*Fibroblastic growth factor*” (factor de crecimiento fibroblástico)

**FXR:** receptor nuclear Farnoside X

## G

**GAGs:** glicosaminoglicanos

**GGT:**  $\gamma$ -glutamilttransferasa

## H

**HDL:** “*high density lipoprotein*” (lipoproteínas de alta densidad)

**HIF-1 $\alpha$ :** “*hipoxia-inducible factor-1 alpha*” (factor inductor de hipoxia 1-alfa)

**HBSS:** “*Hanks balanced salt solution*” (solución salina equilibrada de Hanks)

**HSCs:** “*hepatic stellate cells*” (células estrelladas hepáticas)

**HBV:** virus de la hepatitis B

**HCV:** virus de la hepatitis C

**HGF:** “*Hepatocyte growth factor*” (factor de crecimiento hepatocitario)

**HNFs:** factor nuclear hepatocitario

## I

**IFN  $\gamma$ :** interferón-gamma

**IGF-1:** “*Insulin-like growth factor*” (factor de crecimiento similar a Insulina)

**IL:** Interleuquina

**iNOS:** “*Inducible nitric oxide synthasa*” (Óxido Nítrico síntasa inducible)

**INR:** “*International Normalized Ratio*”

**IFN- $\gamma$ :** Interferon  $\gamma$

## L

**LA:** líquido ascítico

**LBP:** “*Lypopolysacharide-binding proteína*” (proteína de unión a lipopolisacárido)

**LC:** lóbulo caudado hepático

**LDH:** Lactato deshidrogenasa

**LDL:** “*low density lipoprotein*” (lipoproteínas de baja densidad)

**LH:** hormona luteinizante

**LLD:** lóbulo lateral derecho hepático

**LLI:** lóbulo lateral izquierdo hepático  
**LM:** lóbulo medio hepático  
**LMD:** lóbulo medio derecho hepático  
**LMI:** lóbulo medio izquierdo hepático  
**LPA:** lipoaspirado  
**LXR:** “*liver X receptor*” (receptor hepático X)

## M

**MCP:** “*Monocyte chemoattractant protein*” (proteína quimioatrayente de monocitos)  
**MDR3:** “*multi-drug-resistant 3 protein*” (proteína multirresistente a fármacos-3)  
**MELD:** “*Model for End-stage Liver Disease*”  
**ml:** mlilitros  
**MMPs:** “*Matrix metalloproteinases*” (Metaloproteinasas de la matriz)  
**MMP-2:** “*Matrix metalloproteinases-2*” (Metaloproteinasas de la matriz-2)  
**MRP:** “*multidrug resistance proteins*” (proteínas relacionadas con resistencia a múltiples fármacos)  
**MC:** complejo mayor de histocompatibilidad  
**MEC:** matriz extracelular  
**MF:** miofibroblastos  
**MSC-TA:** “*Adipose Tissue Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells*” células madre estromales mesenquimales adherentes derivadas de tejido adiposo.

## N

**NASH:** “*Non-alcoholic steatohepatitis*” (esteatohepatitis no alcohólica)  
**NK:** células *natural killer*  
**NKT:** “*Natural killer T cells*” (células T *natural killer*)  
**NO:** óxido nítrico  
**NFG:** Factor de crecimiento nervioso  
**NTCP:** Polipeptido cotransportador de taurocolato sódico

## O

**OATP:** “*organic anion transporting proteins*” (proteínas transportadoras de aniones orgánicos)

## P

**P:** páncreas  
**PAF:** “*platelet activation factor*” (factor activador de plaquetas)  
**PBS:** “*Phosphate-buffered saline*” (tampón fosfato salino)  
**PC:** peso corporal  
**PCF:** peso corporal final  
**PCG-1 $\alpha$ :** “*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*” (coactivador 1-alfa de receptor gamma proliferador activado de peroxisomas)  
**PCI:** peso corporal inicial  
**PDGF:** “*platelet-derived growth factor*” (factor de crecimiento derivado de plaquetas)

**PE:** peso esplénico  
**PE/PC:** relación peso esplénico / peso corporal  
**Δ peso:** incremento de peso corporal  
**PH:** peso hepático  
**PH/PC:** relación peso hepático-peso corporal  
**PLC:** peso del lóbulo caudado hepático  
**PLLD:** peso del lóbulo lateral derecho hepático  
**PLLI:** peso del lóbulo lateral izquierdo hepático  
**PLM:** peso del lóbulo medio hepático  
**PK:** pinza de *Kocher*  
**PO:** post-operatorio  
**PPAR-γ:** "*peroxisome proliferator-activated receptors gamma*"  
(coactivador gamma del receptor gamma proliferador activado de peroxisomas)  
**PT:** peso testicular  
**PrT:** proteínas totales  
**PT/PC:** relación peso testicular / peso corporal  
**PGE2:** prostaglandina E2  
**PR:** Circulación pararrectal

## R

**R:** recto  
**RANTES:** "*Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*"  
(regulador de la activación, expresión y secreción de células T)  
**TBI:** traslocación bacteriana intestinal  
**T.Prot:** tiempo de protrombina  
**T Cefal:** tiempo de Cefalina

**Ri:** riñón

**ROS:** "*reactive oxygen species*"  
(especies reactivas del oxígeno)

**Rat T Cefal:** ratio de tiempo de Cefalina

## S

**SAMe:** S- adenosil- metionina

**SO:** ratas pseudo-operadas

**SVF:** "*stromal vascular fraction*"  
(fracción vascular estromal)

**SC-hp:** células madre mesenquimales adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos.

**SC-rnd:** células madre mesenquimales adipocíticas de rata no diferenciadas.

**SC-rp:** células madre mesenquimales adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos.

**SDF-1-alfa:** "*stromal derived factor*"  
(factor derivado del estroma alfa 1)

**SS:** suero salino.

**SMA-α:** "*Alpha-Smooth Muscle Actin*"  
(actina alfa de músculo liso)

## T

**TD:** ligamento triangular derecho

**TGF:** "*transforming growth factor*"  
(factor transformador de crecimiento)

**TIMP:** "*Tissue inhibitor of metalloproteinases*" (*inhibidor tissular de metaloproteasas*)

**TL:** ligamento triangular izquierdo

**TLR:** "*Toll-like receptor*" (receptores tipo *Toll*)

**TNF:** “*tumoral necrosis factor*” (factor de necrosis tumoral)

## V

**VBP:** vía biliar principal

**VEGF:** “*vascular endothelial growth factor*”

(factor de crecimiento de endotelio vascular)

**VI:** ventrículo izquierdo cardíaco

**VIP:** “*Vasoactive intestinal peptide*”  
(Polipéptido intestinal vasoactivo)

**VP:** vena porta

**VVM:** vasculopatía venosa mesentérica



# ***ÍNDICE***



<b>ÍNDICE</b>	<b>Pag.</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
1. COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA: UNA PATOLOGÍA LOCAL Y SISTEMICA.....	2
2. MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA.....	9
3. FISIOPATOLOGÍA DE LA COLESTASIS: RESPUESTA INFLAMATORIA HEPÁTICA.....	18
4. FIBROSIS BILIAR: EL RESULTADO DE LA COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA EN LA RATA.....	28
5. CELULAS MADRE MESENQUIMALES E INSUFICIENCIA HEPÁTICA.....	46
<b>II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	57
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	60
<b>1. MATERIAL</b> .....	61
1.A. ANIMALES.....	61
1.B. INSTALACIONES.....	61
1.B.1. Animalario. ....	61
1.B.2. Sala de operaciones.....	61
1.B.3. Sala de evolución postoperatoria.....	62
1.B.4. Sala de sacrificio y procesado de muestras.....	63
1.B.5. Área de conservación de muestras.....	63
1.B.6. Eliminación de residuos biológicos.....	63
1.C. FARMACOS.....	63
1.C.1. Anestésicos.....	63
1.C.2. Otros fármacos.....	63
1.D. MATERIAL.....	64
1.D.1. Instrumental quirúrgico.....	64
1.D.2. Material de sutura y ligadura.....	64
1.D.3. Material quirúrgico complementario.....	64
1.D.4. Otros materiales para procedimiento operatorio y de	

extracción de muestras.....	65
1.D.5 Material de laboratorio.....	65
1.E. EQUIPOS DE LABORATORIO.....	66
1.E.1 Procesado de muestras sanguíneas.....	66
1.E.2. Estudios bioquímicos en suero.....	66
1.E.3 Laboratorio de Anatomía Patológica.....	66
1.E.3.a. Laboratorio general.....	66
1.E.3.b Laboratorio de análisis de imagen.....	66
1.F. REACTIVOS DE LABORATORIO.....	67
1.F.1 Estudios bioquímicos en suero.....	67
1.F.2. Laboratorio de Ingeniería Celular.....	68
1.F.3. Estudio histopatológico.....	68
<b>2. MÉTODOS.....</b>	<b>69</b>
2.A. CONDICIONES DE UTILIZACIÓN Y ESTABULACIÓN DE LOS ANIMALES.....	69
2.B DISEÑO EXPERIMENTAL.....	70
2.C. TÉCNICA ANESTÉSICA.....	72
2.D. TÉCNICA QUIRÚRGICA.....	73
2.D.1. Pseudo-operación .....	73
2.D.2. Colestasis extrahepática microquirúrgica .....	74
2.E. MANTENIMIENTO Y TRATAMIENTO POSTOPERATORIO.....	79
2.F. OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE ORIGEN ADIPOCÍTICO.....	80
2.G. CARACTERIZACIÓN CELULAR FUNCIONAL MEDIANTE DIFERENCIACIÓN.....	82
2.H. DIFERENCIACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE ADIPOCITOS EN CELULAS PROGENITORAS HEPATOCITARIAS.....	83
2.I. ADMINISTRACIÓN INTRAHEPÁTICA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE ORIGEN ADIPOCÍTICO...	83
2.J. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES.....	85
2.J.1 Cuantificación del líquido ascítico.....	86
2.J.2 Circulación colateral porto-sistémica.....	86
2.J.3 Vasculopatía venosa mesentérica.....	86

2.J.4 Extracción sanguínea, perfusión intracardíaca y necropsia.....	87
2.J.5 Recogida de muestras histológicas.....	88
2.J.6 Eliminación de restos los biológicos.....	89
2.K. DETERMINACIONES SÉRICAS DE FUNCIÓN HEPÁTO-BILIAR.....	89
2.K.1 Bilirrubina total y directa.....	90
2.K.2 Alanin-aminotransferasa (ALT) y Aspartato-aminotransferasa (AST).....	90
2.K.3 Lactato-deshidrogenasa (LDH).....	90
2.K.4 Fosfatasa alcalina (FA).....	91
2.K.5 $\gamma$ -glutamilttransferasa (GGT).....	91
2.K.6 Proteínas totales.....	91
2.K.7 Albúmina.....	91
2.K.8 Creatinina.....	92
2.K.9 Urea.....	92
2.L. ESTUDIO MICROSCÓPICO E HISTOPATOLÓGICO HEPÁTICO .....	92
2.L.1 Fijación.....	92
2.L.2 Inclusión.....	92
2.L.3 Procesado de los cortes.....	93
2.L.4 Estudio con microscopía de fluorescencia.....	93
2.L.5 Tinciones histológicas.....	94
2.L.5.a Hematoxilina & Eosina.....	94
2.L.5.b Tricrómico de Masson.....	94
2.L.5.c Rojo Picrosirio.....	95
2.L.6. Evaluación histológica por microscopía óptica.....	96
2.M. CALCULO DEL “ <i>Model for end-stage Liver Disease</i> ” (MELD)	97
2.N. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.....	99
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>102</b>
1. SUPERVIVENCIA.....	103
1.A. Resultados de la serie I.....	105
1.B. Resultados de la serie II.....	105
1.C. Resultados de la serie III.....	106

1.D. Resultados de la serie IV.....	106
2. COMPLICACIONES POSTOPERATORIAS.....	108
3. ASCITIS.....	110
4. CIRCULACION COLATERAL VENOSA PORTO-SISTÉMICA.....	111
5. VASCULOPATIA VENOSA MESENTÉRICA.....	112
6. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL.....	113
7. PESO HEPATICO.....	114
8. PESO ESPLÉNICO.....	118
9. PESO TESTICULAR.....	121
10.DETERMINACIONES SÉRICAS DE FUNCIÓN HEPÁTO-BILIAR	123
11. DETERMINACION DEL “ <i>Model for end-stage Liver Disease</i> ” (MELD).	129
12. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO HEPÁTICO.....	130
12.A. Estudio con microscopía de Inmunofluorescencia.....	130
12.B. Estudio con microscopía óptica.....	131
12.C. Estudio de la fibrosis hepática.....	140
12.D. Estructura hepática, proliferación biliar y estudio hepatocitario	146
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>151</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>171</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>173</b>
<b>ANEXO: Tablas.....</b>	<b>226</b>

## ***RESUMEN***



## I. RESUMEN

**Introducción.** El desarrollo de fibrosis hepática e hipertensión portal en múltiples hepatopatías crónicas de etiología diversa es un proceso multifuncional, mediado por células inflamatorias que liberan mediadores fibrogénicos, que tiene además como consecuencia una angiogénesis excesiva. La administración de células madre de origen mesenquimal adipocítico, bien de procedencia humana o de rata, en un modelo experimental microquirúrgico de colestasis extrahepática podría revertir la fibrosis biliar hepática. En ese caso, también mejorarían la insuficiencia hepática crónica, así como la hiperactividad angiogénica esplácnica, que está implicada en la aparición de hepatoesplenomegalia, circulación colateral porto-sistémica, enteropatía hipertensiva portal y vasculopatía venosa mesentérica

**Material y Métodos.** Para verificar ésta hipótesis se ha realizado un estudio experimental en ratas Wistar. Para ello, se utilizaron 4 grupos de ratas: Un primer grupo Control, constituido a su vez por dos subgrupos: un subgrupo de ratas pseudo-operadas (n=20) y otro formado por ratas con colestasis microquirúrgica al que se administraba suero salino intrahepático (n=20) a las 2 semanas de evolución de la colestasis. Los otros 3 grupos estaban constituidos por animales con colestasis microquirúrgica que se diferenciaban entre sí en función del tipo de células madre administradas, también a las 2 semanas de la colestasis: un grupo en el que se realizó un Isotrasplante de células madre mesenquimales de rata indiferenciadas (n=47) ; otro grupo de Xenotrasplante de células madre mesenquimales humanas de origen adipocítico (n=38) , que fueron prediferenciadas a hepatocitos y un tercer grupo de Isotrasplante de células madre mesenquimales de rata prediferenciadas a hepatocitos (n=30). Como terapia analgésica se administró el opioide Buprenorfina (0.05mg/kg/12h) por vía subcutánea durante las primeras 24 horas del postoperatorio. Durante toda la evolución post-operatoria se administró por vía i.m. profunda (Ceftazidima; 50 mg/kg; dos veces a la semana) y Vitamina K1 (Fitomenadiona; 8mg/kg; una vez a la semana) como profilaxis anti-infecciosa y anti-hemorrágica, respectivamente. Además, en el grupo de ratas con Xenotrasplante de células madre adipocíticas se administró el inmunosupresor Tacrolimus (0.05 mg/Kg i.m., 3 veces a la semana) desde las 24 horas previas a

## RESUMEN

---

la inyección de las células madre hasta el momento del sacrificio como profilaxis de rechazo.

Los animales fueron sacrificados en todos los grupos a las 8 semanas de la realización de la colestasis. Así mismo, en todos los grupos, se estudiaron la presencia de ascitis, de vasculopatía venosa mesentérica, hipertensión portal y el desarrollo de circulación colateral porto-sistémica. Además, se cuantificaron las concentraciones séricas de parámetros de función hepato-biliar por fotolorimetría. Por último, se realizó un estudio histopatológico hepático con microscopía óptica y tinción de Hematoxilina-Eosina, Rojo Sirio y Tricrómico de Masson para comprobar el desarrollo de fibrosis biliar con necrosis hepatocitaria, proliferación biliar y cuantificar el área de fibrosis hepática. Además, con microscopio de fluorescencia se demostró la persistencia intrahepática de las células madre mesenquimales con las que fueron tratadas las ratas con colestasis.

**Resultados:** Respecto a los grupos estudiados con colestasis microquirúrgica, se obtuvieron datos histológicos y bioquímicos más favorables en el grupo de ratas con colestasis microquirúrgica a las que se administraron a las dos semanas del postoperatorio, por vía intrahepática células madre, tanto humanas prediferenciadas a hepatocitos, como de rata no diferenciadas o prediferenciadas a hepatocitos. Dentro de estos tres grupos, los datos obtenidos fueron mejores en el grupo al que se administró células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos.

La **supervivencia** en los distintos grupos fue la siguiente: Las ratas pseudo-operadas sobrevivieron el 100% (20/20) y las ratas con colestasis a las que se administró solución salina intrahepática tan solo sobrevivieron el 70% (20/14) ( $p < 0.05$ ). Respecto a las ratas con colestasis a las que se administraron células madre adipocíticas de rata no diferenciadas (Isotrasplante) sobrevivieron el 53,2% (47/25), en tanto que a las que se les administraron células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos (Xenotrasplante) sobrevivieron el 39,5% (38/15) ( $p < 0.05$ ) y, por último, las ratas colestásicas que recibieron células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos (Isotrasplante) sobrevivieron el 66,7% (30/20). En conclusión, en el grupo de ratas colestásicas con Xenotrasplante se apreció una tendencia al incremento de la mortalidad, tanto precoz, probablemente derivada del rechazo agudo; como tardía, posiblemente por el tratamiento inmunosupresor, respecto al resto de los

## RESUMEN

---

grupos con colestasis, tanto aquellos que solo recibieron suero, como aquellos en los que se realizó un Isotrasplante de células madre de rata.

Las ratas colestásicas a las que se les administró solución salina isotónica presentaron un incremento no significativo de **ascitis** respecto al grupo con Xenotrasplante de células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos, y a los dos grupos con Isotrasplante de células madre de rata, tanto no diferenciadas, como prediferenciadas a hepatocitos, siendo este último grupo el que presentó valores inferiores de líquido ascítico. Además, todas las ratas colestásicas (100%), tanto si recibieron solución salina, como células madre, desarrollaron circulación colateral porto-sistémica y presentaron vasculopatía venosa mesentérica, todo lo cual confirma el desarrollo de **hipertensión portal** en este modelo experimental de colestasis extrahepática microquirúrgica.

El **incremento del peso corporal** fue significativamente menor en las ratas colestásicas con administración de células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos respecto al grupo de ratas pseudo-operadas ( $p < 0,001$ ) y al resto de los grupos colestásicos ( $p < 0,01$ ), siendo este aumento casi del doble en los grupos con Isotrasplante de células madre de rata, tanto no diferenciadas como prediferenciadas a hepatocitos en relación al grupo de ratas con colestasis que sólo recibieron suero. En el grupo de ratas tratadas con suero se produjo un aumento significativo del **peso hepático** respecto a las ratas pseudo-operadas ( $p < 0,001$ ) y a todos los grupos con colestasis, ya con Isotrasplante como con Xenotrasplante ( $p < 0,05$ ). Igualmente ocurre con la **relación Peso Hepático/Peso Corporal**, que es también, estadísticamente superior en los animales con colestasis e inyección de suero respecto a las ratas pseudo-operadas ( $p < 0,001$ ), y a las colestásicas a las que se les inyectaron células madre siendo estas diferencias más marcadas en relación a los grupos que recibieron células madre de rata ( $p < 0,05$ ), tanto no diferenciadas, como las prediferenciadas a hepatocitos. En conclusión, hay que destacar que en el grupo con Isotrasplante de células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos se produce menor hepatomegalia que en el resto de los grupos con colestasis.

En las ratas colestásicas con suero salino también se produjo un aumento significativo tanto de la **esplenomegalia** respecto a las ratas pseudo-operadas ( $p < 0,001$ ) y al resto de los animales colestásicos, existiendo diferencias significativas con el grupo de Xenotrasplante de células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos ( $p < 0,5$ ), como de la relación **peso**

## RESUMEN

---

**esplenico/peso corporal**, siendo sin embargo, esta diferencia significativa ( $p < 0,5$ ) respecto al grupo de Isotrasplante de células madre de rata prediferenciadas. Se comprobó también, una disminución significativa del **peso testicular** en las ratas colestásicas que recibieron suero cuando se comparan con las ratas pseudo-operadas y con el resto de los grupos colestásicos que recibieron células madre, siendo esta diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) con aquellas ratas con Isotrasplante de células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos. Así mismo, se comprobó un descenso significativo de la relación **peso testicular/peso corporal** en las ratas colestásicas tratadas con suero respecto al grupo de ratas pseudo-operadas y al resto de los grupos colestásicos que recibieron células madre, existiendo diferencias significativas respecto al grupo con Isotrasplante de células madre de rata prediferenciadas ( $p < 0,05$ ). En conclusión, en el grupo con Isotrasplante de células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos se produce menor atrofia testicular que en el resto de los grupos con colestasis.

En relación a los parámetros bioquímicos séricos de **función hepato-biliar**, se apreció una mejoría no significativa en las concentraciones de bilirrubina total, pero sí un aumento significativo ( $p < 0,01$ ) del índice bilirrubina directa/bilirrubina total, de aspartato-aminotransferasa, alanin-aminotransferasa y gamma-glutamiltanspeptidasa. En todos los grupos de ratas tratados con células madre, ya Iso- o Xenotrasplante, se produce un aumento ( $p < 0,05$ ) de las proteínas totales y de la albúmina ( $p < 0,05$ ), respecto a las ratas con colestasis que sólo recibieron suero. También se observó una mejoría en los parámetros bioquímicos de la coagulación, como son el tiempo de Protrombina y la actividad de Protrombina, llegando a ser significativo en el “*International Normalized Ratio*” ( $p < 0,01$ ), el tiempo de Cefalina ( $p < 0,05$ ) y el Ratio de Tiempo de Cefalina ( $p < 0,05$ ), en los grupos de ratas con colestasis e Iso- y Xenotrasplante de células madre al grupo que sólo recibió suero.

En cuanto al estudio histopatológico, se ha demostrado mediante la utilización del microscopio de inmunofluorescencia la persistencia a largo plazo de las células madre que fueron administradas a las ratas colestásicas. Así mismo se observó que el área de **fibrosis** es significativamente inferior ( $p < 0,001$ ) en las ratas pseudo-operadas que en las ratas colestásicas y, entre los grupos colestásicos, el porcentaje de fibrosis es significativamente inferior ( $p < 0,001$ ) en las ratas que recibieron células madre, tanto Iso- como Xenotrasplante, respecto a aquellas a las que se inyectó sólo suero. Además,

## RESUMEN

---

dentro de los grupos que recibieron células madre, el porcentaje de fibrosis es significativamente inferior ( $p < 0,001$ ) en los que se realizó un Isotrasplante de células madre de rata, tanto no diferenciadas como prediferenciadas a hepatocitos siendo entre estos dos últimos grupos inferior en el grupo que con Isotrasplante de células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos, si bien ésta diferencia no fue significativa. También, se observó que en el grupo de ratas con colestasis y terapia con células madre hay zonas en las que existe una **estructura hepática** conservada, proliferación de hepatocitos con mitosis y mínima proliferación biliar en relación a las ratas colestásicas que sólo recibieron suero. Además se comprobó la existencia dentro del parénquima hepático de **heterogeneidad** respecto de las áreas lesionadas, tanto en cada lóbulo hepático, como en los cuatro lóbulos que constituyen el hígado de la rata, es decir, que hay zonas en las que los hepatocitos están preservados e, incluso existe mitosis hepatocitaria, y otras en las que predomina la proliferación biliar.

**Conclusión.** En un modelo experimental de colestasis microquirúrgica extrahepática crónica en el cual se pretende revertir o reducir la fibrosis biliar mediante xenotrasplante (células humanas) o isotrasplante (células de ratas singénicas) con células madre mesenquimales de origen adipocítico, tanto las alteraciones histopatológicas, esto es, la fibrosis y la proliferación biliar, como la mejoría de la función hepatocelular, han sido más eficaces cuando se realiza un Isotrasplante de células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos. La relevancia del presente trabajo de Investigación se fundamenta en la posible extrapolación de los resultados obtenidos a la clínica humana, en la cual la cirrosis de diferentes etiologías comporta una elevada morbi-mortalidad en la actualidad. En particular, el tratamiento con células madre de origen mesenquimal adipocítico y prediferenciadas *in vitro* a hepatocitos podría ser de utilidad para reducir las complicaciones secundarias a las hepatopatías crónicas de origen biliar en el ser humano.

**Palabras clave:** colestasis, microcirugía, hipertensión portal, ascitis, inflamación, células madre mesenquimales adipocíticas, Isotrasplante, Xenotrasplante



# ***ABSTRACT***



# ABSTRACT

---

## I. Abstract

**Introduction.** The development of liver fibrosis and portal hypertension in several chronic liver diseases of different causes, is a multifunctional process, mediated by inflammatory cells that release fibrogenic mediators and also promotes an excessive angiogenesis as a consequence. The administration of stem cells of an adipocytic mesenchymatous source either from human or rat donors, regarding a microsurgical experimental model of extrahepatic cholestasis could reverse the hepatic biliary fibrosis. And it would also improve the chronic hepatic insufficiency, as well as the splanchnic angiogenic hyperactivity, that is associated with the development of hepatosplenomegaly, collateral porto-systemic circulation, hypertensive portal enteropathy and mesenteric venous vasculopathy.

**Material and Methods.** In order to check this hypothesis, an experimental study with Wistar rats was conducted. There were 4 groups of rats: a first control group divided in two subgroups: a subgroup of pseudo-operated rats (n=20) and another subgroup with rats with microsurgical cholestasis to which was administered an intrahepatic saline solution (n=20) two weeks after the procedure. The other 3 groups were composed by animals with microsurgical cholestasis, but different according to the type of stem cells administered also after 2 weeks of cholestasis: a group with a Isotrasplant of indifferenciated mesenchymatous rat stem cells (n=47); a group of Xenotrasplant of mesenchymatous human stem cells of adipocytic origin (n=38) which were prediferenciated into hepatocytes and a third group of isotrasplant of mesenchymatous rat stem cells, prediferenciated into hepatocytes (n=30). As postoperative analgesia it was administered an opioid – Buprenorfina (0.05mg/kg/12h) - subcutaneously infused for the first 24 hours after the procedure. As an anti-infeccious and anti-hemorrhagic prophylaxis it was also administered, through an intramuscular access, Ceftazidima (50 mg/kg; twice a week) and Vitamina K1 - Fitomenadiona; (8mg/kg; once a week), respectively, throughout all the postoperative evolution. The group of rats with the xenotrasplant of adipocytic stem cells was also given an immunosupresor - Tacrolimus (0.05 mg/Kg i.m., three times a week), from the first 24 hours prior to the injection of the stem cells until the sacrifice, as prophylaxis of rejection.

## ABSTRACT

---

The animals were sacrificed, in all groups, 8 weeks after the cholestasis. But in all groups were also studied the presence of ascitis, mesenteric venous vasculopathy, portal hypertension and the development of colateral porto-systemic circulation. There were also measured the blood levels of hepatobiliary metabolism with a photocolorimeter. And for last an histopathological liver study was performed with optic microscopy and staining with Hematoxylin-eosin , Sirium red and Masson Trichromic to show and proove the development of biliary fibrosis with hepatocyte necrosis, biliary proliferation and mesure he area of hepatic fibrosis. With fluorecence microscopy it was also demonstrated the intrahepatic persistence of the mesenquimatous stem cells, with which were treated the rats with cholestasis.

**Results:** Regarding the studied groups with microsurgical cholestasis, there were more favorable histological an biochemical data in the group of rats with microsurgical cholestasis injected with stem cells (by liver aces) 2 weeks after procedure, either human prediferenciated into hepatocytes or rat prediferenciated into hepatocytes or non-diferenciated. In all three groups best data were collected from the group given prediferenciated into hepatocytes rat stem cells.

**The survival** rate of the diferent groups was as follows: the pseudo-operated rats survived by 100% (20/20) and the rats with cholestasis with the intrahepatic saline solution only 70% (20/14) ( $p < 0.05$ ). The rats with cholestasis and with the adipocitic rat non-diferenciated stem cells (Isotransplant) had a survival rate of 53,2% (47/25) and the ones given the human prediferenciated into hepatocytes stem cells (Xenotransplant) a 39,5% (38/15) ( $p < 0.05$ ). The rats with cholestasis given adipocitic prediferenciated into hepatocytes rat stem cells (Isotransplant) survived by 66,7% (30/20). In conclusion, the group of cholestatic rats with Xenotransplant had a tendency to higher mortality rates, either quickly probably due to an acute rejection, or later, possibly because of the immunossurpresor treatment, regarding all rest of the groups with cholestasis, including those recieving saline solution and the ones that undergone a isotransplant with rat stem cells.

The cholestatic rats which were given the isotonic saline solution presented a non-significant increase of **ascitis** regarding the group with Xenotransplant of prediferenciated into hepatocytes human stem cells and the other two groups with Isotransplant of rat stem cells, either non-diferenciated or

## ABSTRACT

---

prediferenciated into hepatocytes, this last group being the one with lower rates of ascitic fluid. All the cholestatic rats (100%), given saline solution or stem cells, developed colateral porto-systemic circulation and presented mesenteric venous vasculopathy, which confirms the development of **portal hypertension** in this experimental model of microsurgical extrahepatic cholestasis.

The increase of **body weight** was significantly lower on the cholestatic rats with the prediferenciated into hepatocytes human stem cells comparing to the pseudo operated rats ( $p < 0,001$ ) and the other cholestatic groups ( $p < 0,01$ ), and the increase was almost the double on the groups with Isotransplant of rat stem cells (non-diferenciated or diferenciated into hepatocytes) regarding the group of rats given only saline solution. The group of rats given the saline solution got a significant increase of **liver weight**, when compared with the pseudo operated rats ( $p < 0,001$ ) and all the groups with cholestasis (with Isotransplant or Xenotransplant ( $p < 0,05$ )). The same occurs with the ratio **liver weight/body weight**, also statistically higher in animals with cholestasis and administration of saline solution than in those pseudo operated ( $p < 0,001$ ) and the cholestatic group injected with stem cells, and these differences are more evident regarding the groups that were given rat stem cells ( $p < 0,05$ ), either non-diferenciated or diferenciated into hepatocytes. In conclusion, we must stand out that in the Isotransplant group of prediferenciated into hepatocytes rat stem cells, there is less hepatomegaly than in all the cholestatic groups.

In the group rats with cholestasis and the saline solution, there was also a significant increase of the **splenomegaly** - regarding the pseudo operated rats ( $p < 0,001$ ) and the rest of the animals with cholestasis, and there are significant differences with the Xenotransplant group of prediferenciated into hepatocytes human stem cells ( $p < 0,5$ ). The same happens with the ratio **splenic weight/body weight** although in this case the significant differences ( $p < 0,5$ ) regards the Isotransplant group of prediferenciated rat stem cells. It was also demonstrated a significant reduction of the **testicular weight** on the group of cholestatic rats given saline solution when compared with the pseudo operated rats and with the other cholestatic groups that were given stem cells, and this is significantly difference ( $p < 0,001$ ) with the group of rats with Isotransplant of prediferenciated into hepatocytes rat stem cells. The same way there was a significant decrease of the ratio **testicular weight / body weight** on the cholestatic rats treated with saline solution regarding the the group of pseudo operated rats and the rest of the groups with cholestasis that were given stem cells, with significant differences

## ABSTRACT

---

with the Isotransplant group of prediferenciated rat stem cells ( $p < 0,5$ ). In conclusion, in the group of Isotransplant of prediferenciated into hepatocytes rat stem cells there was less testicular atrophy than in the other groups with cholestasis.

The biochemical blood levels of the **hepatobiliary function** showed a non-significant improvement of the total bilirubin levels but a significant raise ( $p < 0,01$ ) of the ratio conjugated bilirubin/total bilirubin, the aspartate-aminotransferase, alanine-aminotransferase and gamaglutamyl transpeptidase. In all groups treated with stem cells, by Iso or Xenotransplant, there is an increase ( $p < 0,05$ ) of the total protein levels and albumine ( $p < 0,05$ ) when compared with the group treated with saline solution. There was also an improvement of the coagulation biochemical levels such as prothrombin time, prothrombin activity, being significant with the “*International Normalized Ratio*” ( $p < 0,01$ ), the Cephalin time ( $p < 0,05$ ) and the ratio of cephalin time ( $p < 0,05$ ) in the groups of rats with cholestasis and Iso or Xenotransplant of stem cells when compared with the group that got only saline solution.

The histopathological findings, with an immunofluorecence microscopy, demonstrated the persistence (at a long run) of the stem cells administrated to the rats with cholestasis. It was also observed that the area of **fibrosis** was significantly smaller ( $p < 0,001$ ) in the pseudo operated rats than in the cholestatic ones and, between the groups with cholestasis, the percentage of fibrosis was significantly smaller ( $p < 0,001$ ) in the rats with the stem cells, either Iso or Xenotransplant, when compared to the ones injected with saline solution. Further more, within the groups that were given stem cells, the rate of fibrosis was significantly lower ( $p < 0,001$ ) on those with an Isotransplant of rat stem cells, either non-diferenciated or prediferenciated into hepatocytes, and between these two groups, the last one had a lower percentage although without a significant difference. It was also noticed that the group of cholestatic rats with stem cells therapy presented areas of maintained **liver structure**, hepatocytes with mitosis proliferation and minimum biliary proliferation when compared to the cholestatic rats with saline solution therapy. In the liver parenchyma it was also found **heterogeneity** within the areas of lesion, either in each lobule as in all the four lobules that make the liver of the rat, which means that there are areas where the hepatocytes are preserved and further more, there is hepatocytic mitosis and other areas in which the biliary proliferation dominates.

## *ABSTRACT*

---

**Conclusión.** In an experimental microsurgical extrahepatic chronic cholestasis model, in which the goal is to revert or to reduce the biliary fibrosis through a Xenotransplant (human cells) or Isotransplant (syngeneic rat cells) with stem cells of adipocytic origin, either the histopathological changes – fibrosis and biliary proliferation – and the improvement of the hepatocellular function, have been more efficient when a isotransplant of prediferenciated into hepatocytes rat stem cells is performed. The relevance of the present investigation study is based on the posible extrapolation of this study results on human diseases, in which the cirrhosis of diferent etiologies is associated with a high morbidity and morbidity rates. Particularly the treatment with mesenquimal stem cells and prediferenciated into hepatocytes *in vitro*, could be usefull to reduce the secondary complications of the chronic liver diseases of biliary origin in the humans.

**Key-words:** cholestasis, microsurgery, portal hypertension, ascitis, inflammation, mesenquimous adipocitic stem cells, Isotransplant, Xenotransplant.



# ***I. INTRODUCCIÓN***



## I. INTRODUCCIÓN

### 1. COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA: UNA PATOLOGÍA LOCAL Y SISTEMICA

La colestasis se define como una alteración en la formación de bilis por el hígado (Pollheimer y cols., 2014) o bien, en el drenaje biliar en el intestino (Gossard 2013) y se clasifica en extrahepática e intrahepática (EASL, 2009; Jüngst y Lammert, 2013). La causa de la colestasis intrahepática reside en el hígado en tanto que el término extrahepático implica la obstrucción de la vía biliar fuera del parénquima hepático (Li y Crawford 2004; Hirschfield y cols., 2010) (Tabla 1) Los principales síntomas y signos de la colestasis, tanto intra- como extrahepática, son similares. En particular, la ictericia y el prurito son características clínicas de ambos tipos de colestasis, siendo frecuente que las alteraciones bioquímicas plasmáticas precedan su instauración (Ramapa y Aithal, 2011; Gossard 2013). Para realizar el diagnóstico diferencial entre la colestasis intra- y extra-hepática es precisa una cuidadosa evaluación de sus características clínicas, serológicas e histopatológicas, así como de diversas pruebas de imagen (Li y Crawford 2004; Briggs y Peterson, 2007; Gossard 2013).

El impacto clínico de la insuficiencia hepática es relevante porque la prevalencia mundial de cirrosis está aumentando y porque, a su vez, es la principal causa de carcinoma hepatocelular (Russo y Parola, 2012). En particular, los datos epidemiológicos demuestran un preocupante incremento de cirrosis hepática secundaria a infección crónica por el virus de la hepatitis B o C, por el consumo de alcohol y por la enfermedad hepática por depósito de grasa (Poynard y cols., 1997, Parola y cols., 2008). La progresión fibrogénica de la insuficiencia hepática crónica se comprueba por los aspectos siguientes:

1. Se estima que aproximadamente 180 millones de pacientes sufren insuficiencia hepática crónica en el mundo, siendo las causas fundamentales en los países occidentales la hepatitis crónica por virus C, seguida y/o asociada al abuso del consumo de alcohol. La hepatitis crónica por virus B y C son también predominantes en África y Asia. Un 25-30% de éstos pacientes desarrollarán fibrosis significativa y, eventualmente cirrosis. Además la obesidad y la diabetes epidémicas aceleran la progresión de las

## INTRODUCCION

---

patologías hepáticas crónicas y constituyen por sí mismas una causa de cirrosis en el contexto de la evolución de la esteatohepatitis no-alcohólica (Novo y cols., 2014).

2. Más de un millón de muertes al año, lo cual representa un 2% de todas las muertes, y 31.027.000 incapacidades ajustadas a los años de vida son secundarias a cirrosis hepática. La cirrosis producida únicamente por abuso de alcohol es responsable de 493.000 muertes anuales y 14.544.000 incapacidades ajustadas a los años de vida (Rehm y Shield, 2014)
3. Además, entre las patologías del tracto gastrointestinal, la cirrosis hepática es la causa de muerte más frecuente de origen no tumoral en Europa y USA, constituye la séptima causa de muerte en los países occidentales (Novo y cols., 2014)
4. El carcinoma hepatocelular, un tipo de cáncer muy agresivo, que representa el 5º tipo de tumor más frecuente, que cursa a su vez con un 85-90% de mortalidad (Gupta y cols., 1999), siendo la tercera causa de muerte por cáncer en todo el mundo, casi siempre tiene su origen en un hígado cirrótico, e incluso sobre una fibrosis biliar (El-Serag, 2011). El índice anual de progresión de cirrosis a carcinoma hepatocelular varía dependiendo de su etiología, pero se ha estimado en un 2-3% al 7-8% de los pacientes.
5. Los datos epidemiológicos predicen un pico de incidencia de insuficiencia hepática descompensada y de carcinoma hepatocelular en la próxima década (Rosselli y cols. 2013; Rehm y Shield, 2014), en paralelo con un descenso del número de hígados donantes para trasplante hepático que, actualmente, es el único tratamiento eficaz para los enfermos cirróticos.
6. La progresión de una insuficiencia hepática crónica hacia la cirrosis se produce al menos después de 10 a 15 años de evolución y, a veces requiere incluso hasta 30 años, pero puede ser extremadamente rápida en algunos tipos de patología hepática, en particular, en los niños con atresia biliar, en pacientes con recurrencia del virus de la hepatitis C después del trasplante hepático o en pacientes co-infectados con virus de la hepatitis B y C (Friedman, 2008; Rosselli y cols. 2013; Rehm y Shield, 2014; Novo y cols., 2014). Se consideran factores predictivos del desarrollo de fibrosis y cirrosis avanzadas el sexo masculino, la edad inferior a 50 años, la ingesta diaria de alcohol, el contenido hepático de hierro, la obesidad y la diabetes mellitus, así como factores individuales relacionados con la capacidad de respuesta inmune y el metabolismo de tóxicos (Novo y cols., 2014).

## INTRODUCCION

---

Respecto de la colestasis extrahepática en el ser humano, su etiología es la obstrucción mecánica de la vía biliar extrahepática, desde los conductos hepáticos, derecho e izquierdo, el conducto hepático común o el colédoco (Gossard y Talwakar, 2014). Dicha obstrucción puede ser causada a su vez por malformaciones biliares (Nakamura y Tanoue 2013), litiasis (Li y Crawford 2004; Hirschfield y cols, 2010), tumores biliares (Hirschfield y cols, 2010) o compresión extrínseca de la vía biliar (Suarez y cols, 2013) (Tabla 1). Con independencia de su etiología, la colestasis extrahepática se manifiesta clínicamente por ictericia, coluria, acolia y prurito (Imam y cols., 2012; Gossard 2013). Las alteraciones bioquímicas séricas se relacionan principalmente con la retención sanguínea de todas las sustancias normalmente excretadas en la bilis (Ramappa y Aithal, 2011). Así, al incremento sérico de bilirrubina y ácidos biliares se asocian elevadas concentraciones séricas de fosfatasa alcalina,  $\gamma$ -glutamil transferasa, 5'-Nucleotidasa y colesterol (Li y Crawford 2004; Ramappa y Aithal, 2011).

La inflamación hepática es una consecuencia importante de la colestasis extrahepática. Entre las alteraciones inflamatorias hepáticas de la colestasis obstructiva destacan el edema con infiltración leucocitaria de los tractos portales y la proliferación de las células epiteliales biliares con fibrosis portal (Saito y Maher 2000; Tacke y cols, 2009). En particular, el término fibrosis biliar, define un patrón hepático consistente en la asociación de proliferación ductular biliar y de los miofibroblastos periductulares entre las áreas portal y hepatocitaria o parenquimatosa que causa el desarrollo de septos fibrosos porto-portales (Parola y Pinzani 2009). Finalmente, la inflamación hepática crónica secundaria a la colestasis extrahepática induce la progresión secuencial de fibrosis a cirrosis y culmina en el desarrollo de un carcinoma hepatocelular (Aller y cols, 2010c; Pinzani y cols, 2011). El mecanismo exacto por el cual la inflamación induce cáncer no está aún perfectamente definido, pero factores de transcripción, como el NF- $\kappa$ B, el STAT3 y JNK., y el inflamósoma, un complejo multiproteico que actúa como sensor de lesión celular, se han implicado recientemente en éste mecanismo de transformación celular maligna. Las alteraciones claves de la cirrosis son necroinflamación, depósito de matriz extracelular y acortamiento de telómeros, todo lo cual comporta procesos inmunomoduladores, como la senescencia y la regeneración celular, que podrían ser la causa de la progresión tumoral de la cirrosis hepática (Ramakrishna y cols., 2013).

## INTRODUCCION

---

El hígado está compuesto por dos tipos de células epiteliales, los hepatocitos y los colangiocitos. Estos últimos, aunque sólo constituyen del 3 al 5% de todas las células del parénquima hepático, desarrollan un papel fisiológico clave durante el tránsito de la bilis a lo largo de la vía biliar, que implica la secreción y absorción de agua, electrolitos, como el Cloro y el bicarbonato, y de otros solutos orgánicos, principalmente la bilirrubina (Glaser y cols., 2010; Pollheimer y cols., 2014). La integración de estímulos prosecretorios (Secretina, Glucagon, Polipeptido Intestinal Vasoactivo, VIP, Acetilcolina y Bombesina) con los anti secretorios (Somatostatina y Endotelina-1) implica a Adenilil-ciclasas transmembrana que regulan la concentración intracelular de Monofosfato cíclico-3',5'. El transporte de proteínas basolateral (sinusoidal) y acanalicular (apical) conduce los ácidos biliares desde la sangre sinusoidal hacia el canalículo, lo cual se denomina circulación enterohepática (Hirschfield y cols., 2010).

Durante las últimas tres décadas los colangiocitos se han considerado como una heterogénea y altamente dinámica población celular implicada en la adaptación del hígado a la agresión (Marzioni y cols., 2010; O'hara y cols., 2013). En respuesta a la agresión, los colangiocitos liberan múltiples mediadores inflamatorios, en particular citoquinas y quimioquinas (Factor de Necrosis Tumoral-alfa;TNF- $\alpha$ , Interleuquina-6, IL-6, e Interleuquina-8, IL-8), factores de crecimiento (Factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDGF, Factor de crecimiento de endotelio vascular, VEGF y Factor de crecimiento transformador-beta, TGF- $\beta$ ); morfógenos, como Hedgehog y Notch, y expresan moléculas de adhesión que facilitan el reclutamiento, localización y modulación de la respuesta inmunitaria en el tracto biliar y el hígado (Syal y cols, 2012; O'hara y cols., 2013). Estas moléculas funcionan de forma autocrina/paracrina induciendo fenómenos celulares, como la proliferación, apoptosis, vasculogénesis y fibrosis, que se asocian con la respuesta de reparación biliar (Syal y cols, 2012). En éste sentido, algunas células mesenquimales derivadas de epitelio sufren una transición mesenquimo-epitelial, revirtiendo a células epiteliales que posteriormente pueden diferenciarse en colangiocitos o en hepatocitos (Hirschfield y cols., 2010). Así, la modulación de la función y supervivencia de los colangiocitos, favorece, tanto su proliferación, como la diferenciación de los fibroblastos portales y células estrelladas hepáticas en miofibroblastos, lo que explicaría la concomitante respuesta proliferativa biliar y fibrosante en la fibrosis/cirrosis biliar (Syal y cols, 2012; Park, 2012).

**Tabla 1: ETIOLOGIA DE LA COLESTASIS EXTRAHEPATICA**

- 
- Atresia biliar extrahepática
  - Litiasis biliar
  - Lesiones inflamatorias.
    - \* Colangitis esclerosante primaria y secundaria
    - \* Estenosis postoperatorias
      - ^ Colédoco
      - ^ Esfínter de Oddi
  - \* Biliopatía hipertensiva portal por obstrucción extrahepática de la vena porta.
    - \* Pancreatitis
      - ^ Aguda
      - ^ Crónica
    - \* Pseudoquistes pancreáticos
  - Tumores
    - \* Intrínsecos
      - ^ Benignos – Papilomas
      - ^ Malignos – Colangiocarcinomas
  - Extrínsecos
    - ^ Pancreáticos
    - ^ Gástricos
    - ^ Metástasis ganglionares hiliares hepáticas
    - ^ Lifomas: Enfermedad de Hodgkin
  - Causas inusuales
    - \* Quistes del colédoco
    - \* Abscesos amebianos
    - \* Divertículos duodenales
    - \* Infecciones parasitarias: Ascariasis, fascioliasis
    - \* Hemobilia
- 

*Sherlock S. Cholestasis. En: Diseases of the Liver and Biliary System. Ed. Sherlock S. Blackwell Scientific Publications. London 1989; 8ª Edición. Chapter 13; pp. 248-272.*

A su vez, las interacciones epitelio-mesenquimales desempeñan una importante influencia en la evolución de las colangiopatías crónicas. Incluso se ha sugerido que los colangiocitos como los hepatocitos, pueden transformarse en células mesenquimales mediante un proceso de transición epitelio-

## INTRODUCCION

---

mesenquimal, en cuyo caso este proceso podría también contribuir a la generación de miofibroblastos y, por tanto, a la producción de fibrosis biliar (Fabris y Strazzabosco, 2011; Park, 2012).

Se podría concluir que la colestasis extrahepática, comparte con otros tipos de colangiopatías la existencia de proliferación biliar, ductopenia por inhibición de la proliferación o por apoptosis, fibrosis biliar y carcinogénesis (Marzoni y cols., 2010; Park, 2012; Syal y cols, 2012; O'hara y cols., 2013).

Una complicación frecuente de la colestasis extrahepática es la infección bacteriana con colangitis y posterior formación de abscesos. Charcot ya describió en 1877 la tríada clínica de fiebre, ictericia y dolor en el hipocondrio derecho que se asocia a la colangitis secundaria a litiasis o estenosis del colédoco (Lipsett y Pitt 1990). La obstrucción del flujo biliar induce alteraciones en la respuesta inmune local del huésped, incluyendo defectos de la quimiotaxis y de la fagocitosis, así como de la función de las células de Kupffer y por la existencia de circulación colateral portosistémica, que evita el tránsito del flujo portal por el hígado, unidas a alteraciones sistémicas (Navaneethan y cols., 2011). La ausencia de bilis y de la secreción de IgA en el tracto gastrointestinal, como consecuencia de la colestasis obstructiva, induce cambios en la flora bacteriana intestinal, pérdida de la integridad de la mucosa, disminución de la inactivación de Endotoxina (LPS), con sobre crecimiento bacteriano, bacteriemia portal, endotoxemia y traslocación de LPS al hígado, todo lo cual puede producir colangitis y finalmente sepsis en éstos pacientes (Navaneethan y cols., 2011).

Las infecciones bacterianas son frecuentes en los pacientes con insuficiencia hepática crónica con independencia de su etiología. Las infecciones más frecuentes son la peritonitis bacteriana espontánea, las infecciones urinarias y la neumonía, que en el 80% de los casos son causadas por bacilos gram-negativos y, en particular, por *Escherichia coli*, lo que sugiere que estos episodios infecciosos que sufren éstos pacientes son de origen entérico (Bellot y cols, 2013). El paso de bacterias viables desde la luz intestinal, a través de su pared, hasta los ganglios linfáticos mesentéricos y otros tejidos y órganos de la economía, es un mecanismo patogénico aceptado para explicar el desarrollo de las infecciones bacterianas en el paciente con insuficiencia hepática crónica y, por tanto, en los pacientes con colestasis extrahepática. Este fenómeno fue originalmente descrito por Berg y Garlington en 1979 (Berg y Garlington, 1979). Los mecanismos que favorecen la traslocación bacteriana intestinal asociados a

## INTRODUCCION

---

la insuficiencia hepática crónica son, al menos, tres: el excesivo crecimiento de las bacterias intestinales, el incremento de la permeabilidad intestinal y el deficitario sistema inmunológico del tejido linfoide intestinal compuesto por las placas de Peyer, los linfocitos y las células dendríticas de la lámina propia, los linfocitos intraepiteliales y los ganglios linfáticos mesentéricos (Bellot y cols, 2013).

Otra grave consecuencia de la colestasis extrahepática en particular cuando se cronifica, es la hipertensión portal. Las complicaciones clínicamente significativas de la hipertensión portal, se considera que se producen cuando el gradiente de presión venosa hepática es superior a 10 mmHg (Miñano y García-Tsao 2010). Entre estas complicaciones destacan la encefalopatía hepática, la ascitis, el síndrome hepatorenal y las varices gastroesofágicas que son causa de hemorragia, así como de una creciente mortalidad con cada episodio hemorrágico (Rahimi y Rockey 2011; Abrales y cols., 2012).

Sin embargo, la alteración más representativa de la afectación hepática crónica, incluyendo la secundaria a colestasis extrahepática, es la existencia de circulación hiperdinámica tanto esplácnica como sistémica. La circulación hiperdinámica se atribuye tanto al incremento de sustancias vasodilatadoras circulantes como a una reducida respuesta a sustancias vasoconstrictoras (Iwakiri y Groszmann 2006; Laleman 2009).

En esencia, las alteraciones hemodinámicas asociadas a la insuficiencia hepática crónica, hipertensión portal y traslocación bacteriana, sugieren la existencia de un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica de origen multifactorial (Aller y cols, 2007a; Thabut y cols, 2007a; Tandon y García-Tsao 2008; Cazzaniga y cols, 2009; Abdel-Khalek y cols, 2011). En este caso, las complicaciones propias de la colestasis extrahepática, tanto locales o hepáticas (fibrosis/cirrosis biliar), regionales o esplácnicas (hipertensión portal, circulación colateral portosistémica, traslocación bacteriana intestinal, ascitis) y generales o sistémicas (encefalopatía hepática, síndrome hepatorenal) por su naturaleza inflamatoria, podrían ser integradas para su estudio etiopatogénico y, por tanto, en la investigación de nuevos y más eficaces tratamientos (Jalan y Williams 2002; Coltart y cols, 2013).

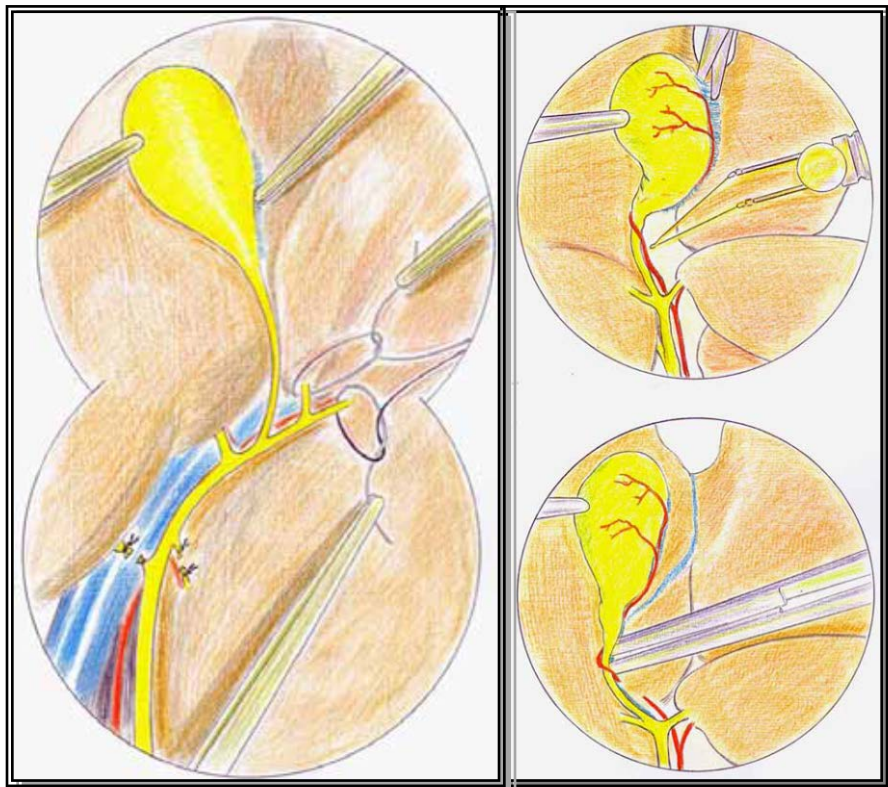
### 2. MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA

La colestasis extrahepática cursa con una elevada incidencia de morbilidad y mortalidad (Gossard y Talwalkar; 2013) Las graves alteraciones hepáticas, esplánicas y sistémicas que produce la ictericia obstructiva, justifica la creación de modelos experimentales que permitan el estudio de sus mecanismos patogénicos, con el objetivo de instaurar eficaces medidas profilácticas y terapéuticas (Aller y cols, 2008b).

Los dos modelos experimentales más utilizados en la actualidad para el estudio de la cirrosis/fibrosis biliar son la ligadura y sección del colédoco y la administración de  $\text{CCl}_4$ , pero el primero se considera mejor que el segundo porque se evita la toxicidad que comporta éste producto químico para los investigadores y porque, además el tiempo requerido para la obtención de fibrosis biliar es mucho más corto cuando se secciona el colédoco (Guimaraes Marques y cols., 2012). La colestasis obstructiva inducida por la ligadura y sección del colédoco se considera el modelo experimental más grave de colestasis porque induce la interrupción brusca y completa del drenaje biliar (Pollheimer y cols., 2014). En ésta situación acontece la inhibición predominante del receptor nuclear Farnoside X (FXR), un sensor nuclear hepatocelular de las sales biliares implicado en la síntesis de bilis por los hepatocitos, como consecuencia de la elevada concentración intracelular de sales biliares. FXR, a su vez inhibe la expresión de un polipeptido cotransportador de Taurocolato sódico (NTCP), expresado en la membrana basocelular de los hepatocitos que es responsable de la captación de sales biliares por los hepatocitos en contra de un gradiente de concentración. Estos hallazgos se han interpretado como una respuesta adaptativa del hígado para reducir el efecto citotóxico de las sales biliares sobre los hepatocitos sometidos a estrés (Pollheimer y cols., 2014). Por ello, el modelo experimental más frecuentemente utilizado de ictericia obstructiva es el resultante de la ligadura y sección del colédoco en la rata, aunque también se ha desarrollado en conejos y ratones (Katsuta y cols, 2005; Abrales y cols, 2006; Geerts y cols., 2008; Liedtke y cols. 2013). Además, de la ligadura y sección del colédoco, se han utilizado otros métodos como modelo experimental de colestasis neonatal, como la inyección intrabiliar de esclerosantes y superglue en ratones, hámsteres, ratas y *minipigs*, que permiten estudiar las consecuencias metabólicas de la colestasis en ésta etapa de la vida. (Petersen y Davenport, 2013).

## INTRODUCCION

La fibrosis hepática crónica es un problema de salud de proporciones significativas. El desarrollo experimental de modelos preclínicos, en particular en el ratón, han proporcionado una plétora de posibles alternativas terapéuticas. Sin embargo, el hígado del ratón no es un buen modelo de lesión hepática en el ser humano y los esfuerzos realizados para trasladar sus resultados a la fibrosis hepática humana han sido improductivos hasta la actualidad (Friedman 2010; Bissell 2011; Ellis y Mann 2012). Además, la rata es el animal de elección ya que no posee vesícula biliar, en tanto que en el ratón, la oclusión del colédoco produce una gran dilatación de la vesícula biliar que puede causar su perforación y coleperitoneo (Abralde y cols, 2006), lo que exige ligadura del conducto cístico o bien colecistectomía previa a la colestasis (Aller y cols, 2008a) (Figura 1).



**Figura 1.** A. Disección de la vía biliar extra hepática en el ratón. B. Colecistectomía durante la realización de colestasis extra hepática microquirúrgica en el ratón (Aller y cols. *Extrahepatic Cholestasis*. En: *Microsurgery In Liver Research*, Aller MA; Arias J. Eds. Bentham Scientific Publishers, 2009 b, pp 137-156.)

En el ratón, la transección del conducto colédoco entre ligaduras, asociado a colecistectomía, también permite conseguir un modelo para el estudio de la fibrosis biliar, aunque coexiste una extensa necrosis hepática

## INTRODUCCION

---

(Heinrich y cols, 2011). Para evitar ésta grave lesión hepática se ha propuesto la realización de una ligadura parcial del colédoco, que consiste en la ligadura conjunta del colédoco y una aguja quirúrgica de 7-0. Posteriormente, se retira la aguja y así persiste una estenosis graduada del colédoco que produce a los 14 días de evolución, proliferación biliar pero evita la necrosis del parénquima hepático (Heinrich y cols, 2011). Para evitar ésta complicación, otros grupos de investigación utilizan el modelo de ligadura y sección del colédoco, pero en ratones transgénicos (Tiao y cols., 2014; Marzioni y cols., 2014).

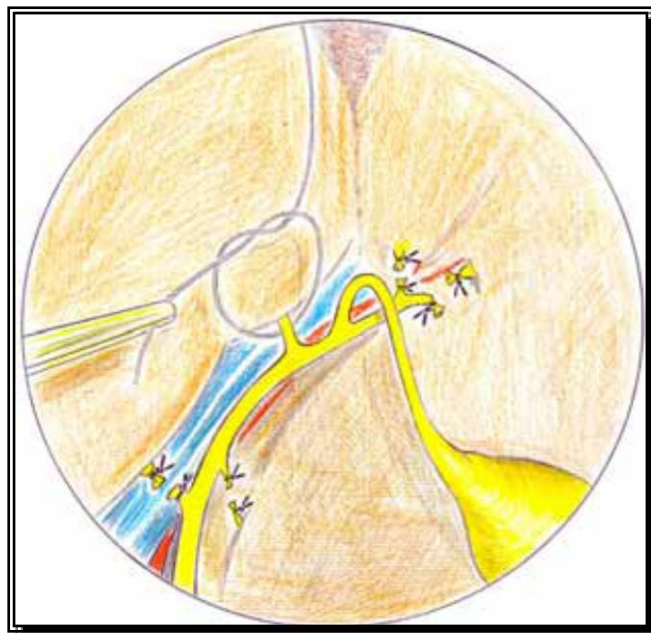
En el ratón, la ligadura y sección del colédoco induce un incremento brusco de la presión en la vía biliar, y ya a las 8 horas de evolución se produce una intensa infiltración de neutrófilos, que es la respuesta inmune predominante hasta el tercer día (Georgiev y cols. 2008). A continuación, entre el 2º-3º y 5º días se produce una respuesta proliferativa de los colangiocitos, como parte de la reacción ductular, y de los hepatocitos (Georgiev y cols. 2008; Pollheimer y cols., 2014). Estas lesiones agudas se acompañan con un aumento de las concentraciones séricas de AST, ALT, TG $\beta$ , bilirrubina y fosfatasa alcalina, así como de una continua reparación tisular hepática (Georgiev y cols. 2008). Los colangiocitos en proliferación secretan citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, con reclutamiento de neutrófilos que contribuyen a la lesión del hígado colestásico mediante la generación de especies reactivas de oxígeno ya a los tres días del postoperatorio desde los cinco días posteriores a la intervención se forman infartos biliares y un intenso edema periportal, que se acompaña de la infiltración de gran número de neutrófilos CD11-b positivos alrededor y en el interior de los infartos biliares, así como en los tractos portales (Pollheimer y cols., 2014). A las dos semanas de evolución se produce un marcado incremento del depósito hepático de colágeno y de la infiltración por linfocitos y células de Kupffer, que se cree reducen la agresión aguda hepática liberando IL-6, que posee un importante efecto anti-apoptótico, importante para la regeneración hepática (Pollheimer y cols., 2014). Posteriormente, el número de células estrelladas activadas y la expresión de TGF- $\beta$ , de inhibidor tisular de Metaloproteasa I (TIMP-I) y de Procolageno I disminuyen y la fibrosis biliar se estabiliza hasta la sexta semana del postoperatorio (Georgiev y cols. 2008).

Por el contrario, en la rata la técnica quirúrgica de ligadura y sección del colédoco es sencilla ya que, al ser una técnica macroquirúrgica, no requiere medios de magnificación para su realización. En esencia, y tras laparotomía media o subcostal derecha, se disecciona el colédoco y se reseca entre dos

## INTRODUCCION

ligaduras. Sin embargo, las ratas con colestasis extrahepática macroquirúrgica desarrollan un pseudoquistes biliar hilar por dilatación del extremo proximal ligado del colédoco, que se infecta por microorganismos Gram-negativos, y los animales fallecen durante las dos primeras semanas de evolución postoperatoria por sepsis secundaria a la existencia de múltiples abscesos intraperitoneales, hepáticos y pulmonares (Aller y cols, 1993c; Aller y cols, 2004a; Aller y cols, 2009a; Llamas y cols., 2010). En este modelo experimental también se ha descrito el desarrollo de fibrosis biliar por lo que ha sido considerado apropiado para el estudio de la patología humana secundaria a la atresia biliar extrahepática y la colangitis esclerosante primaria (Petersen 2012; Marzioni y cols. 2014).

Las especiales características anatómicas del hígado de la rata, multilobulado, y cada lóbulo poseen su propia vascularización portal y arterial, así como un drenaje biliar y venoso individualizado, permite mediante la utilización del microscopio operatorio realizar una nueva técnica de colestasis extrahepática.

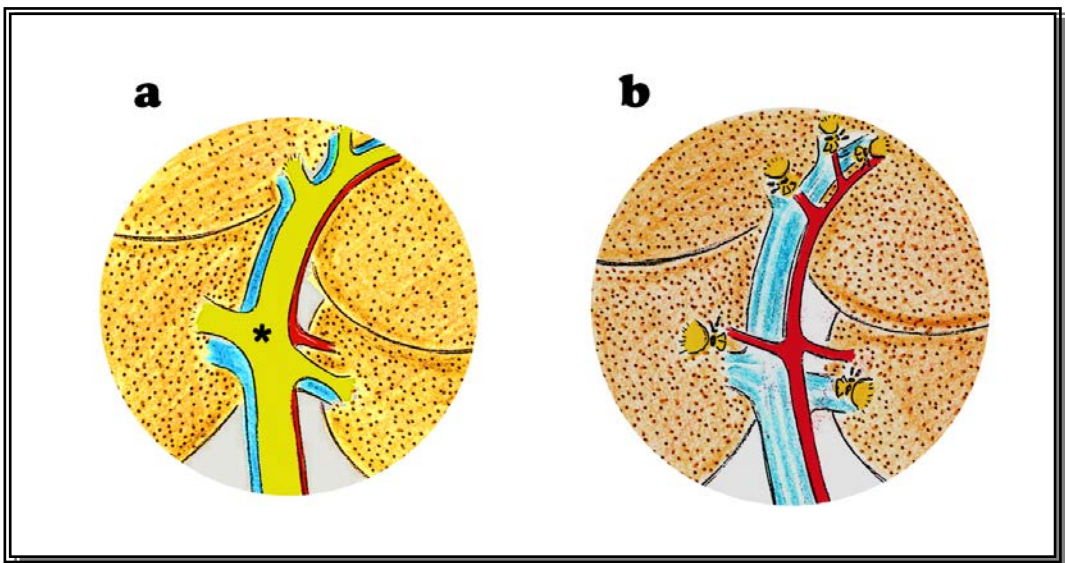


**Figura 2.** Disección, ligadura y sección de los conductos biliares de los lóbulos medio y lateral izquierdo en el ratón (Aller y cols. *Extrahepatic Cholestasis. En: Microsurgery In Liver Research*, Aller MA; Arias J. Eds. Bentham Scientific Publishers, 137-156;2009 b).

La técnica microquirúrgica de colestasis extrahepática en la rata permite la resección de la vía biliar extrahepática que incluye el colédoco, hasta el inicio de su porción intrapancreática, en continuidad con los conductos biliares que

## INTRODUCCION

drenan cada uno de los lóbulos hepáticos (Figuras 2 y 3) (Aller y cols, 1993a; Lorente y cols, 1995; Aller y cols, 2009a; Aller y cols, 2009b; Aller y cols, 2010a; Aller y cols., 2012a). Con ésta técnica microquirúrgica, la inexistencia de vía biliar extrahepática residual previene la formación de pseudoquistes biliares hiliares, así como de abscesos abdomino-torácicos y reduce la mortalidad respecto al modelo clásico de ligadura y sección del colédoco (Aller y cols, 1993a; Aller y cols, 2004a; Aller y cols, 2009a; Aller y cols, 2009b; Aller y cols, 2010a).



**Figura 3.** Técnica de la colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata. En el dibujo de la izquierda se representa la vía biliar extrahepática del hígado de la rata (a). En el dibujo de la derecha (b), tras la resección microquirúrgica de la vía biliar extrahepática, se observan los conductos lobulares hepáticos ligados a ras del parénquima hepático.

Este modelo de colestasis extrahepática microquirúrgica, al conseguir mayor supervivencia, también permite obtener a más largo plazo un nuevo modelo de fibrosis hepática que puede ser de gran utilidad para el estudio de nuevas terapias antifibrogénicas. A este respecto, se debe considerar que durante la evolución de la colestasis extrahepática en la rata existen dos fases. La fase evolutiva precoz que se extiende hasta la cuarta semana del periodo postoperatorio, y la fase evolutiva tardía que comprende las posteriores semanas de supervivencia (Assimakopoulos y Vagianos 2009). Así, cuando la ictericia obstructiva es aguda, la colemia predomina sobre la lesión del parénquima hepático y no existe aún hipertensión portal ni cirrosis, si bien se producen efectos inotrópicos y cronotrópicos negativos cardíacos, hipotensión arterial y vasodilatación periférica (Hajrasouliha y cols, 2004; Moezi y Dehpour; 2013;) y

## INTRODUCCION

---

se altera la respuesta vasoconstrictora simpática (Jacob y cols, 1993; Moezi y Dehpour; 2013). Parece que la disfunción cardíaca es secundaria fundamentalmente a la acción de los ácidos biliares, unidos al aumento de óxido nítrico (NO), de opioides endógenos y de endocannabinoides (Moezi y Dehpour; 2013) Además, el acúmulo de ácidos biliares causa una intensa diuresis y natriuresis que pueden incluso producir grave hipovolemia (Kramer 1997). Como consecuencia, se producen hipotensión arterial y disfunción renal prerrenal (Kaler y cols; 2004) que es agravada por la endotoxemia que acompaña a éste modelo experimental (Abrahám y cols., 2008).

A su vez, durante la fase evolutiva considerada crónica, esto es, superior a las cuatro semanas del postoperatorio, no solo existe colestasia, endotoxemia y translocación bacteriana intestinal (Clements y cols, 1998; Ara y cols., 2006) sino también una significativa patología hepática con fibrosis/cirrosis biliar, hipertensión portal y ascitis (Abralde y cols, 2006; Georgiev y cols., 2008; Aller y cols. 2009b; Han y cols., 2014; Mejias y cols; 2014; Yang y cols, 2014) que se asocia con una lesión renal similar fisiopatológicamente al síndrome hepatorenal de los enfermos cirróticos. Los modelos de colestasis extrahepática, tanto macroquirúrgicos, por ligadura del colédoco, como microquirúrgicos por resección de la vía biliar extrahepática, cursan a largo plazo (4ª a 6ª semana del postoperatorio) con hepatomegalia, fibrosis biliar, infiltración leucocitaria de los espacios portales hepáticos y muerte de los hepatocitos por necrosis y apoptosis, aunque no se observa la pérdida de la estructura normal hepática con la formación de nódulos de regeneración delimitados por septos fibrosos y remodelación vascular, descrita por algunos autores inicialmente (Kountouras y cols, 1984). Por esta razón, no es apropiado conceptuar estos modelos experimentales como productores de cirrosis en esta fase evolutiva. Por el contrario, en la actualidad se acepta que los cambios histopatológicos constituyen una fibrosis biliar (Aller y cols, 1993a; Aller y cols, 2004b; Liedtke y cols., 2013).

Tanto las alteraciones en la fase precoz como en la fase tardía o a largo plazo, de este modelo experimental, validan su empleo para el estudio de los mecanismos fisiopatológicos de la colestasis extrahepática así como para la investigación de nuevos y más eficaces tratamientos de ésta grave patología hepática (Assimakopoulos y Vagianos 2009).

## INTRODUCCION

---

Para la puesta a punto de la técnica microquirúrgica de la colestasis extrahepática en la rata, se ha estudiado previamente la anatomía de la vía biliar extrahepática, descrito sus variaciones anatómicas (Lorente y cols, 1995), la incidencia de infecciones postoperatorias (Aller y cols, 1993a) así como se ha estandarizado una microtécnica de fácil aprendizaje y mínima mortalidad atribuible a su ejecución. El estudio del modelo experimental se ha fundamentado en la valoración de la patología hepatobiliar, con el grado de fibrosis y proliferación biliar de los hígados colestasis (Aller y cols, 2004a; Aller y cols, 2004b) y de las alteraciones bioquímicas plasmáticas propias de la lesión hepatobiliar (Aller y cols, 2008a), así como de las alteraciones del metabolismo oxidativo hepato-intestinal (López y cols, 1999) y cerebral (García-Moreno y cols, 2002) y, por último, la respuesta inflamatoria esplácnica mediante la determinación de las concentraciones de citoquinas pro y anti-inflamatorias en hígado, bazo, ganglios linfáticos mesentéricos e íleon (García-Domínguez y cols, 2010). La utilización profiláctica de antibióticos de amplio espectro (Ceftazidima 50 mg/kg) y la administración semanal de vitamina K (8 mg/kg i.m.) reduce la mortalidad precoz de las ratas con colestasis extrahepática (Beck y Lee 1995; Akimoto y cols, 2005; Abrales y cols, 2006). En particular, en las ratas con colestasis obstructiva microquirúrgica la supervivencia es superior a las ocho semanas y, por tanto, los resultados pueden ser más fácilmente extrapolados a la clínica humana, que se suele caracterizar por la evolución crónica de la colestasis extrahepática.

Las alteraciones extrahepáticas son múltiples en la colestasis extrahepática experimental en la rata, con independencia de la técnica quirúrgica empleada. Destacan la ictericia, la coluria (Huang y cols, 2003; Aller y cols, 2004b), la hipertensión portal con esplenomegalia y circulación colateral portosistémica (Aller y cols, 1993b; Huang y cols, 2003; Aller y cols, 2004b; Chan y cols, 2004; Katsuta y cols, 2005), la insuficiencia renal (Assimakopoulos y Vagianos 2009), la encefalopatía hepática (García-Moreno y cols, 2002; Assimakopoulos y cols, 2010; Eslimi y cols, 2011; Leke y cols., 2012; Leke y cols., 2013; Jover-Cobos y cols., 2014) y al final de este periodo considerado crónico, 6ª semana del postoperatorio, la ascitis (Aller y cols, 2010a; Aller y cols, 2010c). Por lo tanto, la colestasis extrahepática experimental no solo es un modelo apropiado para el estudio de la patología hepática secundaria a la obstrucción biliar, sino que también reproduce las alteraciones esplácnicas y

## INTRODUCCION

---

sistémicas que son propias de la ictericia obstructiva crónica en la clínica humana.

También se ha descrito un modelo experimental quirúrgico de ictericia obstructiva parcial, que consiste en la sección entre ligaduras de los conductos biliares de los lóbulos hepáticos medio, lateral derecho y caudado, dejando intacto el correspondiente al lóbulo lateral izquierdo, que no sufre por tanto obstrucción biliar (Polimeno y cols, 1995). La colestasis selectiva lobular permite la supervivencia a largo plazo de los animales, aunque no evita que los lóbulos hepáticos colestásicos sufran proliferación biliar, discreta proliferación hepatocitaria e infiltración por células inflamatorias. Sin embargo, un hallazgo inesperado en éste modelo de colestasis selectiva ha sido la existencia de proliferación biliar en el lóbulo lateral izquierdo, que no sufría colestasis obstructiva. Este inopinado resultado también ha sido demostrado por otros autores cuando se ligan selectivamente sólo los conductos biliares de los lóbulos medio y lateral izquierdo (Tannuri y cols., 2012). La conclusión es que la ligadura selectiva biliar induce alteraciones, evidenciadas por el aumento de expresión de  $\alpha$ -SMA, una proteína relacionada con la fibrogénesis hepática, tanto en el parénquima hepático colestásico, como en el adyacente no sometido a obstrucción biliar. Estas alteraciones generalizadas hepáticas serían mediadas por vía paracrina y/o endocrina (Polimeno y cols, 1995; Tannuri y cols., 2012).

La colestasis experimental, en particular de localización extrahepática, se ha considerado un modelo apropiado para el estudio de los mecanismos implicados en la producción de atresia biliar en la clínica humana (Aller y cols, 2008a).

Sin embargo, otros modelos experimentales no quirúrgicos, se han propuesto como alternativas válidas. En particular, los modelos de atresia biliar de etiología vírica en ratones, mediante la inoculación intraperitoneal de varios serotipos de reovirus o rotavirus de monos Rhesus, que causan acumulo de células asesinas naturales (NK cells) y de células presentadoras de antígeno alrededor de los conductos biliares y una respuesta mediada por células T, con inflamación del hígado y de los conductos biliares e ictericia (Leonhardt y cols, 2010). Estas células inflamatorias inducen una respuesta inmune mediada por células T, mediante la expresión de antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, (MC), tanto de clase I (para células CD8<sup>+</sup> citotóxicas), como de clase II (para células T ayudantes o *helper* CD4<sup>+</sup>) (Petersen y Davenport,

## INTRODUCCION

---

2013). Las células CD4<sup>+</sup>, activadas por IL-12, producen una respuesta Th1, liberando múltiples citoquinas, como IL-2, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , quimioquinas, como CXCL 9, CXCL 10 y CCL5 y otros mediadores pro-inflamatorios, como Stat 1, Granzyme A y B u Osteopontin. Recientemente, se ha demostrado también el desarrollo de una respuesta Th2, así como de células T-reguladoras (Treg) que causan una lesión epitelial biliar (Petersen y Davenport, 2013). Una cuestión clave es que mecanismos desarrollados en éste modelo experimental en el ratón pueden ser extrapolados a la atresia biliar en el ser humano. Una diferencia fundamental es que estos ratones fallecen antes de desarrollar una fibrosis biliar grave. Por ello, optimizar este modelo experimental infeccioso en el ratón es un objetivo prometedor para comprender los mecanismos etiopatogénicos de ésta grave enfermedad y así, conseguir una investigación translacional efectiva (Petersen y Davenport, 2013).

La atresia biliar produce colestasis neonatal y se manifiesta por una inflamación progresiva y fibrosis de la vía biliar intra- y extra-hepática que evoluciona hacia una cirrosis devastadora que amerita la realización de un trasplante hepático en la mayoría de los niños. Estudios en ratones y en el ser humano sugieren una potencial infección vírica colangiopática perinatal como el iniciador de la lesión de los conductos biliares en la atresia biliar, en tanto que la respuesta inmune adaptativa y autoinmune serían los responsables de la progresión de la enfermedad (Mack, 2007). La presencia de rotavirus, además de en éstos modelos experimentales, se ha confirmado en niños con atresia biliar (Hertel y Estes, 2012).

Todos los modelos experimentales de colestasis previamente citados son realizados durante el periodo postnatal y, por esta razón, se considera que, aunque permiten estudiar las consecuencias metabólicas de la colestasis y la patogenia de la colangitis, no aportan conocimiento al mecanismo productor de la atresia biliar. Por esta razón, se han desarrollado modelos prenatales que se asemejan a la atresia biliar en niños, ya ligando el conducto colédoco en corderos a los 80 días de gestación o por ligadura de la arteria hepática en conejos fetales, que produce isquemia selectiva de la vía biliar intrahepática (Petersen and Davenport, 2013). También se ha ensayado la administración de tóxicos, por ejemplo derivados de setas *Amanita phalloides*, y fármacos, así antihelmínticos, como el 1,4-fenilendiisotiocianato, a ratas Wistar gestantes que producen ictericia en las ratas recién nacidas. En estos modelos postnatales se consigue la producción de ictericia con inflamación y dilatación de las vías

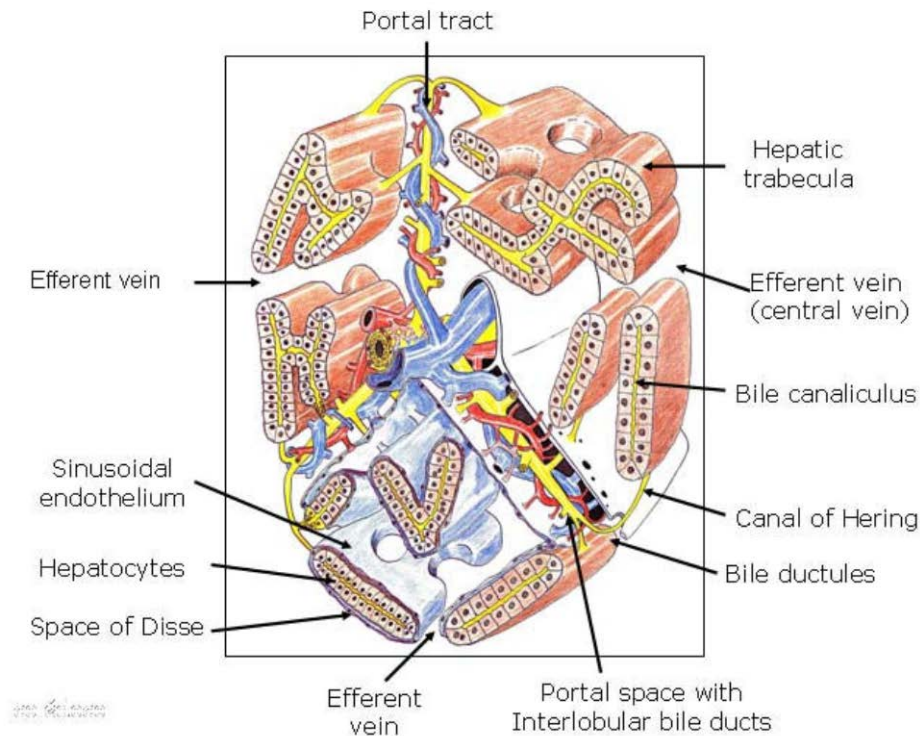
biliares intrahepáticas (Petersen and Davenport, 2013). Sin embargo, respecto de esta patología congénita, los modelos experimentales son apropiados para el estudio de las consecuencias hepáticas y extrahepáticas de la colestasis, aunque no para el estudio de los mecanismos productores de atresia biliar (Petersen 2012).

### **3. FISIOPATOLOGIA DE LA COLESTASIS: RESPUESTA INFLAMATORIA HEPÁTICA**

Las alteraciones hepáticas secundarias a la colestasis extrahepática han sido comparadas a las que protagonizan la curación de las heridas, esto es, la proliferación epitelial y, en particular, la fibrogénesis (Bissell, 2004; Aller y cols., 2008b; Meran y Steadman, 2011). La patogenia de la fibrosis hepática consiste en un depósito excesivo de colágeno fibrilar y otras proteínas de la matriz extracelular que distorsiona la arquitectura hepática e induce capilarización sinusoidal e hipertensión portal. En esencia, la fibrosis hepática es un proceso dinámico de reparación tisular aberrante en el que los fenómenos claves son la activación y transformación de las células estrelladas hepáticas quiescentes en células similares a miofibroblastos, por un proceso de transición epitelio-mesenquimal de tipo 2, con el subsiguiente incremento en la síntesis de proteínas, como actina de musculo liso- $\alpha$  ( $\alpha$ -SMA), colágeno, metaloproteasas de la matriz, inhibidores tisulares de metaloproteasas y proteoglicanos (Mormone y cols., 2011; Ding y cols., 2014). Los mecanismos fisiopatológicos implicados en el desarrollo de ésta hepatopatía son múltiples e interrelacionados y se pueden agrupar en tres fenotipos celulares que se expresan fundamentalmente en el espacio intersticial (Aller y cols., 2008b) (Figura 4).

Inmediatamente después de la obstrucción de la vía biliar en la rata se produce un intenso incremento (60%) de la presión biliar intraductal (Slott y cols., 1990; Azmaiparashvili y cols., 2009), seguido por alteraciones patológicas de la matriz extracelular (Desmouliere y cols., 1997). Por el contrario, la descompresión biliar, al suprimir el estrés mecánico, revierte las lesiones hepáticas inducidas por la ligadura del colédoco (Kloek y cols., 2008; Kirkland y cols., 2010), lo cual demuestra la relevancia de la energía mecánica en la etiopatogenia de la patología hepática secundaria a la obstrucción de la vía biliar.

## INTRODUCCION



**Figura 4.** Representación esquemática en 3D de un acino de acuerdo con la descripción de Rappaport. Tres espacios porta divergen de un eje, formado por el canalículo biliar, la arteria hepática y la vena porta. Así mismo, se representan varias trabéculas hepáticas formadas por láminas de dos células hepáticas orientadas hacia las venas eferentes (venas centrales). En la parte inferior del dibujo, las placas hepáticas cubiertas por el endotelio sinusoidal, y el espacio de Disse situado entre ambas estructuras, contiene líquido intersticial que fluye hacia el exterior por los vasos linfáticos del espacio porta. El espacio de Disse se continúa con el espacio porta, y ambos conforman el espacio intersticial del acino (Aller y cols. *Experimental obstructive cholestasis: the wound-like inflammatory liver response. Fibrogenesis Tissue Repair.* 1:6;2008b).

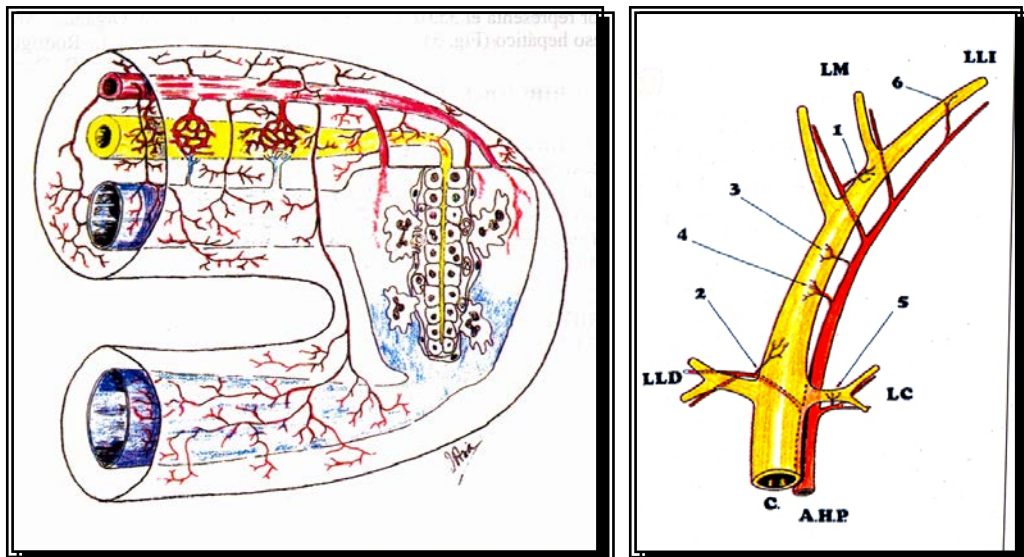
La respuesta del hígado de los roedores a la lesión obstructiva biliar implica su reprogramación transcripcional, favoreciendo la activación de genes reguladores del metabolismo, de la proliferación celular y de la remodelación de la matriz de forma secuencial y limitada en el tiempo (Campbell y cols., 2004; Wang y cols., 2005) desde una fase inmediata (1 día) hasta una fase tardía (21 días) (Campbell y cols., 2004). Sin embargo, en tanto que genes implicados en la disrupción del metabolismo lipídico y en la fibrosis son activados en el periodo precoz de la colestasis, otros genes, como los implicados en mecanismos de protección celular frente a la agresión por acumulación tóxica de ácidos biliares, son inhibidos (Kojima y cols., 2004).

Después de la ligadura del colédoco, el hígado de la rata sufre marcadas alteraciones hemodinámicas, portales y arteriales, que pueden comportar lesiones por isquemia-reperfusión y estrés oxidativo (Huang y cols., 2009; Oguz

## INTRODUCCION

et al., 2012; Lee y cols., 2014). El aumento de la resistencia vascular en el sistema portal hepático secundario a colestasis extrahepática produce hipertensión portal (Van Steenkiste y cols., 2010; Hsu y cols., 2014) e isquemia hepática, asociadas a una síntesis deficitaria del enzima Oxido Nítrico Síntasa-inducible (iNOS) y de oxido nítrico (NO) (Lee y cols., 2010).

La vía biliar es vascularizada solo por el plexo peribiliar (Gaudio y cols., 1996; Morell et y cols., 2013), localizado alrededor de los conductos biliares de menor calibre, haciéndose así progresivamente más estrecho y más simple (Gaudio y cols., 1996) (Figura 5). Estas características del plexo peribiliar comportan que el aumento de presión intraductal con dilatación de la vía biliar que ocurre en la colestasis extrahepática comprimiría el plexo peribiliar, con la consiguiente isquemia de la vía biliar. Sin embargo, la disminución del flujo sanguíneo portal induce un aumento del flujo arterial hepático o “*hepatic arterial buffer response*” (Laufer, 1983). Además, dos semanas después de la ligadura del colédoco en la rata se produce una proliferación significativa del plexo peribiliar, que drena por pequeñas vénulas en ramas de la vena porta y en los sinusoides hepáticos (Gaudio y cols., 1996). Por ello, la lesión por isquemia-reperfusión ha sido implicada en la patogénesis de la colestasis intrahepática (Fu y cols., 2013).



**Figura 5.** A la izquierda se observa una representación esquemática de la vascularización arterial intrahepática, comprobándose que los conductos biliares reciben su vascularización únicamente desde la arteria hepática de la hepatona. A la derecha, igualmente se demuestra que el colédoco tan solo recibe irrigación de la arteria hepática común. (Lorente y cols. *Microcirugía Experimental*. Nueva Editorial Médica, Madrid, 75-84; 2000).

## INTRODUCCION

---

Las ratas con ligadura del colédoco sufren una excesiva acumulación de ácidos biliares hidrofóbicos, que son considerados la causa principal de hepatotoxicidad (Poli, 2000; Chatterjee y cols., 2014), con deterioro de las funciones de la cadena transportadora de electrones mitocondriales, estrés oxidativo y apoptosis (Poli, 2000; Wang, 2014). La retención y el acúmulo de sales biliares hidrofóbicas (tauro- y glicoquenodesoxicolato) inhiben la actividad antioxidante hepática de catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reducido y superóxido dismutasa, así como inducen necrosis hepatocitaria al activar la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Portincasa y cols., 2007; Assimakopoulos y cols., 2007; Arduini y cols., 2011). Existe por tanto una estrecha relación entre la ictericia obstructiva experimental y el estrés oxidativo (Assimakopoulos y cols., 2004; Wang y cols., 2014). Así, se ha demostrado que el tratamiento con antioxidantes mejora el estado redox celular hepático (Assimakopoulos y cols., 2004; Soylu y cols., 2006), y las funciones hepáticas al inhibir la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Soylu y cols., 2006; Assimakopoulos y cols., 2007; Portincasa y cols., 2007; Somi y cols., 2013).

Por consiguiente, en la fase precoz tras ligadura del colédoco en la rata el insuficiente aporte de oxígeno que sufre el hígado, como consecuencia de las alteraciones hemodinámicas, así como de la incorrecta utilización del oxígeno por la hepatotoxicidad de las sales biliares, constituirían factores etiológicos de la inhibición del metabolismo energético hepático. Por lo tanto, el hígado reduce su capacidad funcional para satisfacer las necesidades metabólicas tisulares. Además, la lesión oxidativa hepática disminuiría el contenido intracelular de proteínas responsables de la síntesis energética y de las funciones de membrana, como son las proteínas reguladoras del transporte de  $H_2O$  e iones (Portincasa y cols., 2007), lo cual induciría edema intersticial y celular. También, el aumento de peroxidación lipídica hepática, un marcador de estrés oxidativo (Portincasa y cols., 2007), puede inducir el aumento de la permeabilidad de membrana, de la degradación de la matriz extracelular y edema (Kennett y Davies, 2007).

La acumulación intersticial de fragmentos de glicosaminoglicanos (GAGs) es un importante mecanismo de la formación del edema por sus propiedades hidrofílicas, en particular de hialuronan (Cantor y Nadkarni, 2006; Stern y cols., 2006; Jiang y cols., 2007; Kennett y Davies, 2009; Robert, 2014). GAGs son largas cadenas de polisacáridos no ramificadas compuestas de unidades

## INTRODUCCION

---

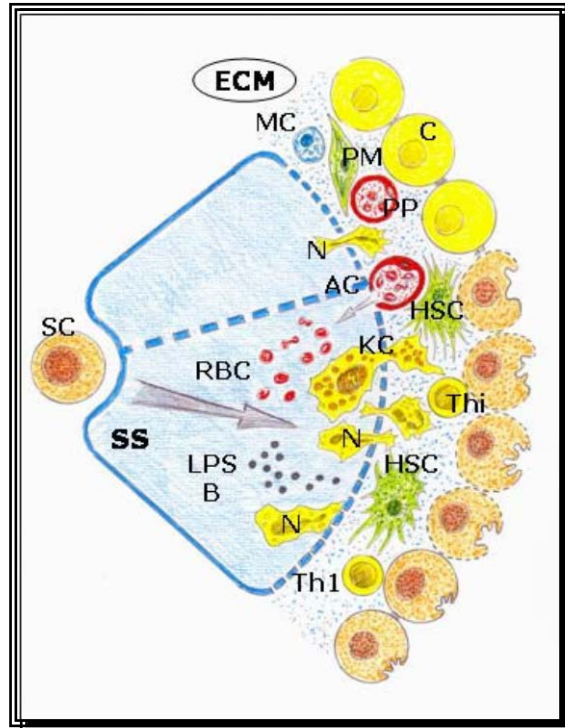
repetidas de disacáridos que tienden a adoptar conformaciones en espiral, y que ocupan un gran volumen en relación con su masa. Estos polisacáridos atraen y atrapan agua e iones, con lo cual forman geles hidratados, aunque permiten el flujo a su través de nutrientes para las células (Jiang y cols., 2007; Solís-Herruzo y cols., 2011). En situaciones de inflamación, el hialuronan es más polidisperso y tiende a formas de menor peso molecular, favoreciendo así la infiltración edematosa de los tejidos (Jiang y cols., 2007; Robert, 2014), el flujo del líquido intersticial y el gradiente de presión del sistema linfático.

Además, la tensión mecánica producida por la ligadura del colédoco puede alterar por mecanotransducción la remodelación de los proteoglicanos y de GAGs en el intersticio (Wight y cols., 2014). Virtualmente todos los órganos y tejidos están organizados en jerarquías estructurales y poseen una capacidad de respuesta mecánica inmediata aumentando su rigidez en proporción directa al estrés mecánico aplicado (Ingber, 2006). Este aumento de la consistencia y/o rigidez hepática parece ser el resultado del aumento de la cantidad de matriz neoformada, de la reticulación de la matriz y, posiblemente de otras variables desconocidas (Georges y cols., 2007; Guvendiren y cols., 2014). En las patologías hepáticas, el aumento precoz en la rigidez hepática podría causar la diferenciación de las células estrelladas hepáticas en miofibroblastos (Georges y cols., 2007; Muddu y cols., 2007; Guvendiren y cols., 2014), que entonces se comportan como células musculares lisas y, por consiguiente, responden a las sustancias vasoactivas contrayéndose (Friedman; 2010; Lee y Friedman, 2011). La contracción de éstas células estrelladas activadas regula el diámetro de la vascularización hepática, alterando el flujo sanguíneo, y la presión hepática (Winau y cols., 2008; Brunt y cols., 2014).

La adquisición posterior en la evolución del hígado colestásico de un fenotipo inmune afecta a las células parenquimatosas (hepatocitos y colangiocitos), a las no parenquimatosas (células endoteliales sinusoidales, células de Kupffer y miofibroblastos) y a las células sanguíneas que migran al intersticio hepático (Szabo y cols., 2007; Winau y cols., 2008; Albillos y cols., 2014) (Figura 6). Precisamente parece ser el espacio intersticial el que modula la actividad inflamatoria de las células inmunes tras la ligadura del colédoco en la rata (Aller y cols., 2008b). En particular, los fragmentos de matriz extracelular y sus receptores ejercen importantes efectos sobre las células inflamatorias y, por ello, se considera que están claramente implicados en la evolución de la respuesta inmune intersticial (Morwood y Nicholson, 2006; Korpos y cols., 2009).

## INTRODUCCION

Las metaloproteasas de la matriz (MMPs) son una familia de enzimas que degradan componentes de la matriz extracelular expresadas en los tejidos inflamados (Zitka y cols., 2010; McKleroy y cols., 2013) y, en particular, en el hígado colestásico (Bergheim y cols., 2006a; Onozuka y cols., 2011). La destrucción enzimática de la matriz extracelular cursa con la liberación inmediata de los mediadores secuestrados en dicha matriz.



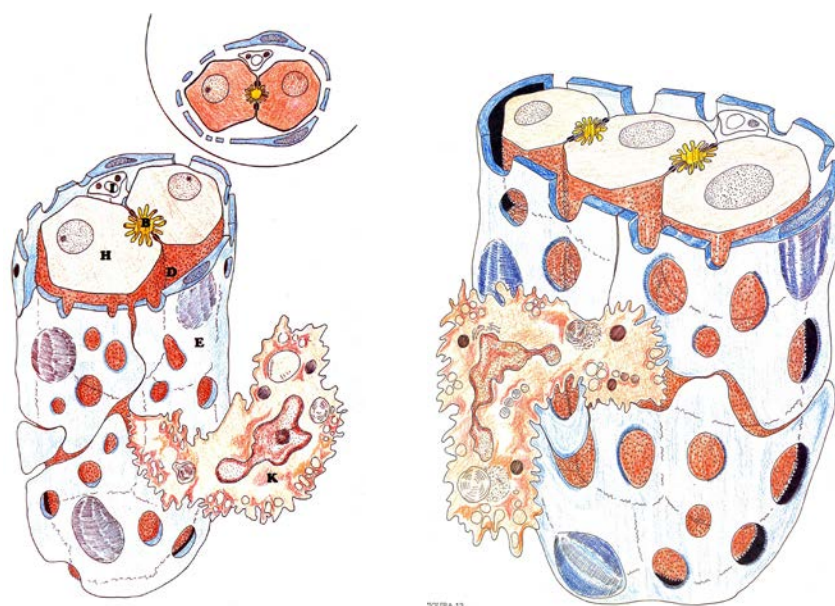
**Figura 6:** Isquemia-revascularización y fenotipos leucocitarios durante la evolución de la colestasis obstructiva. Predominio del estrés oxidativo con edema y estrés enzimático con infiltración de leucocitos y la activación de las células de Kupffer. AC: capilar arterial; B: bacterias; C: colangiocitos; ECM: matriz extracelular; HSC: células estrelladas hepáticas; KC: célula de Kupffer; LPS: lipopolisacárido; MC: mastocitos; N: neutrófilos; PM: miofibroblastos portales; PP: plexo arterial peribiliar; RBC: glóbulos rojos; SC: Células madre; SS: espacio sinusoidal; Th1: Linfocitos T h1; Thi: Linfocitos intraepiteliales. (Aller y cols. *Experimental obstructive cholestasis: the wound-like inflammatory liver response. Fibrogenesis Tissue Repair.* 1:6; 2008b).

Las proteínas de la matriz extracelular y el hialuronan poseen funciones proinflamatorias que pueden activar la respuesta inmune, tanto la innata como la adquirida (Morwood y Nicholson, 2006; Bei y cols., 2008). Estas moléculas se unen a los receptores *Toll-like* (TLR)-4 y TLR-2 (Szabo y cols., 2007), con activación del complejo regulador transcripcional NF $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  y la producción de citoquinas proinflamatorias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , y de quimioquinas que inducen la activación y el reclutamiento intersticial de leucocitos (Morwood y Nicholson,

## INTRODUCCION

2006). Los linfocitos T, una vez activados, se polarizan hacia la producción de distintos perfiles de citoquinas (Yagi y cols., 2011; Yamane y Paul, 2013). El tipo 1 ( $Th_1$ ) sintetiza Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e IL-2 y, los de tipo 2 ( $Th_2$ ) producen IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (Yamane y Paul, 2013).

Los macrófagos residentes en el hígado, o células de Kupffer, se localizan fundamentalmente en el área periportal del lobulillo y por ello podrían desempeñar un papel fundamental en la lesión por isquemia-reperfusión (Kolios y cols., 2006; Abu-Amara y cols., 2010; Jaeschke 2012). Pero las células de Kupffer están también implicadas en la inflamación hepática que produce la colestasis mediante la liberación de sustancias biológicamente activas que inducen un proceso inmunopatogénico (Minter y cols., 2005; Abrahám y cols., 2008; Zandieh y cols., 2011; Cheng y cols., 2011; Ramachandran e Iredale, 2012) (Figura 7).



**Figura 7.** A la izquierda, representación esquemática de una trabécula hepática en la rata, en la que se observa el canalículo biliar existente entre dos hepatocitos (esquema superior izquierdo), el espacio perisinusoidal de Disse, las células endoteliales sinusoidales, una célula de Ito y una célula de Kupffer. En el esquema de la derecha, se ha representado la trabécula hepática con mayor complejidad, lo cual permite apreciar la disposición laminar de los hepatocitos, en contraste con la supuesta disposición tubular del esquema de la parte izquierda de ésta Figura, ya que el canalículo biliar es el centro de la trabécula bicelular. (Arias y cols. Anatomía e histología hepática: Morfología y Función. En: Cirugía Hepática Experimental. Ed. Kronos. Zaragoza, 99-125, 1.993).

Las células de Kupffer están claramente afectadas en la obstrucción biliar (Minter y cols., 2005; Abrahám y cols., 2008; Zandieh y cols., 2011; Cheng y cols., 2011; Calmus y Poupon; 2014) con activación de la fagocitosis y una marcada respuesta pro inflamatoria frente a endotoxina y a la proteína de unión

## INTRODUCCION

---

a lipopolisacárido (*lypopolysacharide-binding protein*, LBP), ambas aumentadas en la colestasis extrahepática (Minter y cols., 2005; Kolios y cols., 2006; Isayama y cols., 2006; Minter y cols., 2009; Kassel y cols., 2011; Chou y cols., 2012). La hipersensibilidad a endotoxina en colestasis es la causa de la síntesis aumentada de citoquinas proinflamatorias y del aumento de la peroxidación lipídica (Isayama y cols., 2006; Abrahám y cols., 2008), con agravamiento de la apoptosis que, finalmente progresa a necrosis (Moazzam y cols., 2002; Lida y cols., 2010). La respuesta proinflamatoria inducida por LPS en ratas con ligadura de colédoco es inhibida por lipoproteínas de alta densidad (HDL), que, a su vez, inhiben las vías proinflamatorias hepáticas, restauran la actividad de eNOS y reducen la presión portal (Thabut y cols., 2007a; Galbois y cols., 2009).

La inflamación se asocia a la infiltración intersticial y de los tractos portales por leucocitos, en particular por neutrófilos, un proceso regulado por quimioquinas CXC (Saito y Maher 2000; Aller y cols., 2006; Jaeschke ,2006; P; Aller y cols., 2010a; Mantovani y cols., 2011; Jailon y cols., 2013) Los neutrófilos son componentes esenciales de la respuesta inflamatoria precoz a la agresión que sufre el hígado por colestasis (Laschke y cols., 2010; Licata y cols., 2013), infiltrando el intersticio ya a los tres días de la ligadura del colédoco (Gujral y cols., 2003; Georgiev y cols., 2008). Las células del epitelio biliar contribuyen a la inflamación produciendo moléculas quimioatrayentes de neutrófilos (Dold y cols., 2010). Además, las células de Kupffer, activadas por la endotoxemia portal secundaria a colestasis, estimulan la liberación de quimioquinas por los hepatocitos, lo cual implica a su vez la infiltración por neutrófilos (Wakabayashi y cols., 2008). En la colestasis extrahepática monocitos/macrófagos infiltran también el hígado, que hiperexpresa a su vez proteína quimioatrayente de monocitos (*monocyte chemoattractant protein*, MCP-1), una quimioquina CC y, como resultado éstos monocitos favorecen la respuesta inflamatoria (Tacke, 2012; Zhou y cols., 2013).

En esencia, la inflamación crónica hepática y la fibrogénesis constituyen un agregado dinámico de linfocitos, macrófagos y células del estroma relacionadas por interacciones autocrinas y paracrinas (Holt y cols., 2008; Pellicoro y cols., 2014). A largo plazo, en ratas con ligadura de colédoco persiste una importante migración celular alrededor de la triada portal y de la vena central que se asocia con un aumento de citoquinas pro inflamatorias en el hígado (Fernández-Martínez y cols., 2009), que inducen una respuesta

## INTRODUCCION

---

hepatocitaria heterogénea al estímulo colestásico, inhibiendo los hepatocitos de la zona periportal (Donner y cols., 2007).

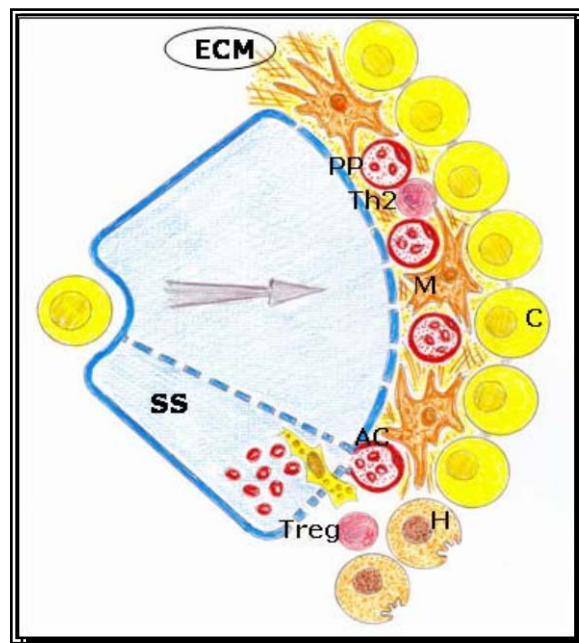
Las células estrelladas hepáticas y los miofibroblastos, ambos tipos celulares presentes en el intersticio hepático, tienen la capacidad de expresar un fenotipo inmune. En particular, las células estrelladas sintetizan un amplio espectro de mediadores inflamatorios, como quimioquinas (MCP-1, RANTES), factor de activación plaquetario (*platelet activation factor*, PAF), IL-8 y moléculas de adhesión leucocitaria (ICAM-1, VCAM), que son necesarias para el reclutamiento y la activación de los leucocitos en el intersticio (Bataller y Brenner, 2005; Rockey, 2006; Iredale, 2007; Gressner y cols., 2007; Friedman, 2008; Wasmuth y cols., 2010; Seki y Schwabe, 2014). El alojamiento de leucocitos en el espacio intersticial hepático es favorecido por las células estrelladas hepáticas, que expresan MMPs, lo cual aumenta la degradación de la matriz extracelular (Rockey, 2006; Gressner y cols., 2007; Aller y cols., 2010a; Day y cols., 2011). Por lo tanto, las células estrelladas hepáticas cambian su fenotipo contráctil a un fenotipo inmune y éstos dos fenotipos están íntimamente relacionados, e incluso son interdependientes (Rockey, 2006) (Figura 6).

La infiltración del hígado colestásico por células inflamatorias también sería secundaria a traslocación bacteriana intestinal (TBI), fenómeno por el cual endotoxinas y bacterias de procedencia intestinal alcanzarían el hígado en elevadas concentraciones por aumento de la permeabilidad de la barrera mucosa intestinal (Balzan y cols., 2007; Alaish y cols., 2013). La TBI es una complicación de la hipertensión portal y, por consiguiente, se produce en ratas con ligadura de colédoco (García-Tsao y Wiest, 2004; Sztrymf y cols., 2005; Karatepe y cols., 2010; Seo y Shah, 2012). En ratas con cirrosis y ascitis las bacterias que colonizan la luz intestinal constituyen un gran reservorio de productos microbianos, como LPS, endotoxinas y otros fragmentos de la pared bacteriana capaces de inducir la síntesis de citoquinas proinflamatorias, como TNF- $\alpha$  (García-Tsao y Wiest, 2004; Francés y cols., 2007; Aller y cols., 2010d; Corradi y cols., 2012). Por lo tanto, la TBI es un mecanismo etiopatogénico de infecciones bacterianas en la colestasis experimental (Sztrymf y cols., 2005; Abdeldayem y cols., 2007).

Las fases evolutivas tardías del modelo experimental de colestasis extrahepática se caracterizan por el desarrollo de angiogénesis, esto es, el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a expensas de vasos pre-existentes

## INTRODUCCION

(Gaudio y cols., 2006a; Gaudio y cols., 2006b; Davis 2011; Geudens y Gerhardt, 2011) (Figura 8) La angiogénesis requiere la migración de células endoteliales al espacio intersticial, con la consiguiente proliferación y diferenciación en capilares (Aller y cols., 2007b). Aunque el objetivo final de la proliferación endotelial es formar nuevos vasos sanguíneos para el transporte de oxígeno, sustratos y células sanguíneas, el endotelio posee otras funciones (Aller y cols., 2007a, Aller y cols., 2007b). Así, en las fases iniciales de la respuesta inflamatoria (fenotipos de isquemia-reperfusión y leucocitario), las nuevas células endoteliales podrían adoptar funciones anti-inflamatorias, anti-oxidantes y anti-inmunes, que favorecerían la resolución de la inflamación (Aller y cols., 2007b).



**Figura 8:** Fenotipo angiogénico durante la evolución de colestasis obstructiva. Aumento de la proliferación de colangiocitos con un importante desarrollo del plexo arterial peribiliar y de la arterialización sinusoidal con aplasia hepatocitaria. AC: capilar arterial; C: colangiocitos; ECM: matriz extracelular, H: hepatocitos; M: miofibroblastos; PP: plexo arterial peribiliar; SS: espacio sinusoidal; Th2: Linfocitos Th2; Treg: Linfocitos T reguladores (Aller y cols. *Experimental obstructive cholestasis: the wound-like inflammatory liver response. Fibrogenesis Tissue Repair.* 2008b;1:6).

En ratas con ligadura de colédoco la proliferación de los conductillos biliares, como ocurre en la organogénesis hepática, precede a la proliferación de los microvasos que los vascularizan. Solo después de 2 a 4 semanas de evolución se desarrolla una significativa proliferación de la microvascularización que se extiende desde el plexo peribiliar de los tractos biliares (Gaudio y cols.,

1996; Glaser y cols., 2009; Glaser y cols., 2011). Tras la ligadura del coledoco en la rata se ha demostrado el papel fundamental que ejercen los colangiocitos en la angiogénesis asociando la ligadura de la arteria hepática a la colestasis. En ésta situación, aumenta la apoptosis de colangiocitos, se altera la proliferación de los colangiolos con disminución de la secreción de factor de crecimiento de endotelio vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) por los colangiolos y desaparece el plexo peribiliar. Curiosamente, las funciones de los colangiocitos y, por lo tanto, la integridad del plexo peribiliar son preservadas mediante el tratamiento con VEGF-A recombinante (Gaudio y cols., 2006c).

#### **4. FIBROSIS BILIAR: EL RESULTADO DE LA COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA EN LA RATA**

La fibrosis hepática es un proceso dinámico de reparación tisular secundario a la agresión persistente del hígado por múltiples factores, como la infección vírica, la ingesta excesiva de etanol, fármacos o toxinas, reacciones inmunes diversas en enfermedades metabólicas y colestasis. Por lo tanto, una consecuencia patológica común de la insuficiencia hepática crónica es la fibrosis (Mormone y cols., 2011; Cohen-Naftaly y Friedman, 2011).

El modelo experimental de colestasis obstructiva en la rata, bien por ligadura y sección del colédoco o por colestasis extrahepática microquirúrgica, (Aller y cols., 1993a; Aller y cols, 2004a; Aller y cols, 2009a; Aller y cols, 2009b; Aller y cols, 2010c) induce una respuesta inflamatoria hepática cuyo resultado final es el desarrollo de fibrosis biliar. Este patrón histopatológico se caracteriza por dos fenómenos:

- Fibrogénesis.
- Proliferación biliar o reacción ductal.

En la clínica humana, las enfermedades hepáticas crónicas se caracterizan por una agresión persistente al parénquima, cuyas causas principales son:

- La infección crónica por virus hepatotropos (Virus de la hepatitis B y C).
- La exposición crónica a fármacos y diversas sustancias tóxicas, siendo la causa principal en los países occidentales, el consumo excesivo de bebidas etílicas.
- Alteraciones metabólicas crónicas.

## INTRODUCCION

---

- Enfermedades autoinmunes crónicas.
- Patologías colestásicas intra o extra hepáticas (Novo y cols., 2014).

La patogenia de la fibrosis hepática resulta en esencia de una alteración de la remodelación por la sustitución progresiva del parénquima funcional hepático por haces estrechamente unidos de colágeno I/III y otras proteínas de la matriz extracelular. La fibrosis altera la arquitectura y la función normales del hígado, disminuye el número de fenestras de las células endoteliales (capilarización sinusoidal) y se produce hipertensión portal (Cohen-Naftaly y Friedman, 2011; Ellis y Mann 2012). Este proceso de cicatrización hepática, si progresa, conduce al desarrollo de cirrosis hepática, una patología caracterizada por la desestructuración del parénquima hepático, con formación de septos fibrosos que delimitan nódulos de regeneración, aumento de la resistencia al flujo sanguíneo portal y un grave deterioro de la función hepática que puede comportar finalmente un fallo hepático. Además, la fibrosis se considera un estadio precanceroso que proporciona un medioambiente idóneo para el desarrollo de tumores primarios (Domínguez y cols., 2009; Hirschfield y cols., 2010; Mormone y cols., 2011; Cohen-Naftaly y Friedman, 2011; Solís-Herruzo y cols., 2011; Hytioglou y cols., 2012; Wynn y Ramalingam, 2012).

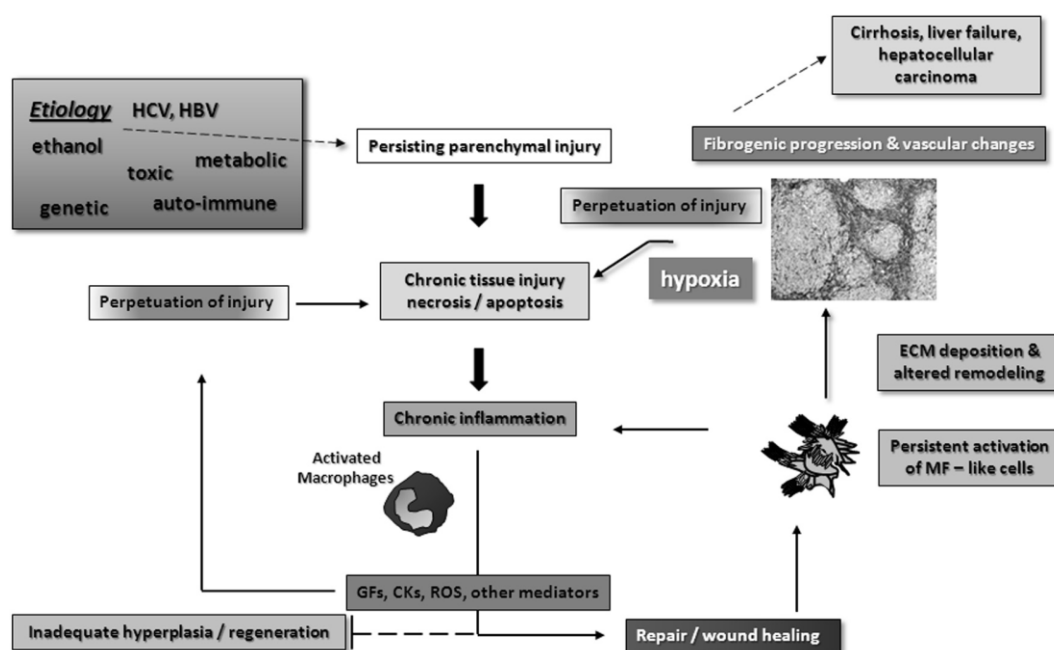
La agresión crónica del hígado induce la activación persistente de una respuesta inflamatoria y de reparación tisular, que asociada a otros factores patogénicos, como el estrés oxidativo y la alteración de la interacción entre células epiteliales y mesenquimales, comporta una fibrogénesis hepática, cuyo resultado tisular es la fibrosis hepática (Friedman, 2008b; Forbes y Parola, 2011). Por tanto **la fibrogénesis hepática** se puede definir como un proceso celular, tisular y molecular dinámico y exquisitamente integrado, que induce una acumulación excesiva y progresiva de componentes de la matriz extracelular, en un intento de limitar las consecuencias de la agresión crónica del parénquima hepático (Friedman 2008b; Forbes y Parola, 2011; Novo y cols., 2014).

La fibrogénesis hepática, independientemente de su etiología, es fundamental para la progresión de cualquier tipo de patología hepática crónica, siendo la fibrogénesis persistente la causa fundamental de cirrosis e insuficiencia hepática (Friedman 2008b; Rosselli y cols., 2013; Novo y cols., 2014).

Los principales mecanismos fisiopatológicos de la fibrogénesis hepática, evolucionan en estadios. El primer estadio, independientemente del agente etiológico, está protagonizado por la secuencia interrelacionada de lesión

## INTRODUCCION

parenquimatosa persistente, que produce necrosis y/o apoptosis crónica y activación crónica de una respuesta inflamatoria y de fibrogénesis, que son los factores inductores del depósito excesivo de componentes de la matriz extracelular, lo que constituye la fibrosis (Figura 9). En síntesis, este estadio consiste en la asociación de varios mecanismos, entre los que se encuentra la perpetuación de la agresión hepática, una característica clave en la progresión de las enfermedades hepáticas crónicas, depende no solo de la exposición persistente a un agente etiológico específico, sino también de la lesión parenquimatosa crónica por sí misma, así como de la respuesta inflamatoria crónica, con la liberación de múltiples mediadores, en particular de especies reactivas de oxígeno (ERO).



**Figura 9. Progresión de las enfermedades hepáticas crónicas.** Principales eventos en la progresión fibrogénica de enfermedad hepática crónica donde se produce una progresión persistente de lesión hepática, independientemente de la etiología, de la inflamación crónica y la activación de la reparación, con principal énfasis en el papel de miofibroblastos hepáticos en el impulso de la enfermedad a fibrosis significativa y eventualmente a cirrosis, insuficiencia hepática y carcinoma hepatocelular. (Novo y cols., *Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis. Archives of Biochemistry and Biophysic.* 20-37, 2014).

Así mismo participa la activación crónica de la respuesta inflamatoria y el reclutamiento y activación de células implicadas en la inmunidad innata y adquirida, puede crear un microambiente pro-fibrogénico, en el cual la síntesis y liberación de factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, ERO y otros mediadores, por una parte altera significativamente la hiperplasia/regeneración

## INTRODUCCION

---

del parénquima hepático y por otra, favorecen la activación crónica de la reparación tisular y de la fibrogénesis.

El microambiente pro-fibrogénico induce, a su vez, la activación persistente de células similares a los miofibroblastos, con la subsiguiente acumulación excesiva de componentes de la matriz extracelular (MEC) y paralelamente, de una remodelación tisular ineficaz.

También se ha puesto de manifiesto, el papel fundamental de la hipoxia y la angiogénesis en el mantenimiento y quizá también, en la inducción de la fibrogénesis, así como en las alteraciones vasculares, que son de relevancia grave durante la progresión de las enfermedades hepáticas crónicas. Por último la fibrosis hepática en este primer estadio, es potencialmente reversible, lo cual depende de la eliminación del agente etiológico o bien de una terapéutica efectiva (Novo y cols., 2014).

Cuando el depósito de componentes de la matriz extracelular es muy intenso y los septos de fibrosis, asociados a las alteraciones vasculares intrahepáticas, comienzan a modificar significativamente la estructura global del parénquima hepático, la hipertensión portal y las complicaciones fisiopatológicas relacionadas, inducen la progresión de la patología hepática crónica al estadio de cirrosis. A su vez, cuando ya el deterioro hepático adquiere el grado de cirrosis, existen dos estadios, dependiendo de su gravedad: (I): Estadio de cirrosis compensada o cirrosis sin manifestaciones clínicas y con un gradiente de presión venosa hepática en un rango de 5 a 10 mm Hg (II): Estadio de cirrosis descompensada o de cirrosis con sintomatología clínica y un gradiente de presión venosa hepática que supera los 10-12 mm Hg (El-Sevag 2011; Novo y cols., 2014).

El patrón histopatológico de la fibrosis depende de la etiología y de las células fibrogénicas. Esta idea, ya propuesta en 2004 (Pinzani y Rombouts, 2004), se ha aceptado en los últimos años (Parola y cols., 2008; Rosselli y cols., 2013). Así, el patrón de fibrosis postnecrótica dispuesta en forma de puentes o septos, que conectan diferentes áreas portales, se desarrolla típicamente en los pacientes con hepatitis vírica crónica por virus B y C o por patologías autoinmunes. El patrón de de fibrosis pericelular y capilarización de los sinusoides, se produce en enfermos con esteatohepatitis alcohólica y no alcohólica. El factor etiopatológico en este caso, es el estrés oxidativo asociado a la hepatotoxicidad. La fibrosis centrolobulillar es características en las

## INTRODUCCION

---

situaciones de obstrucción del drenaje venoso hepático, como ocurre en los pacientes con fracaso cardíaco y finalmente, la fibrosis biliar se produce en la cirrosis biliar primaria y secundaria, así como en colangitis esclerosante primaria y se caracteriza por la formación de septos fibróticos porto-portales rodeando los nódulos hepáticos. Este patrón de fibrosis se desarrolla preservando las conexiones entre la vena central y el tracto portal y se asocia a una intensa proliferación de los ductos biliares y de los miofibroblastos peri ductales, que se supone derivan, principalmente, de los fibroblastos portales y de las células estrelladas hepáticas. El estrés oxidativo y la alteración del equilibrio epitelio-estroma alrededor de los conductos biliares, se piensa que protagonizan una fibrogénesis persistente (Novo y cols., 2014).

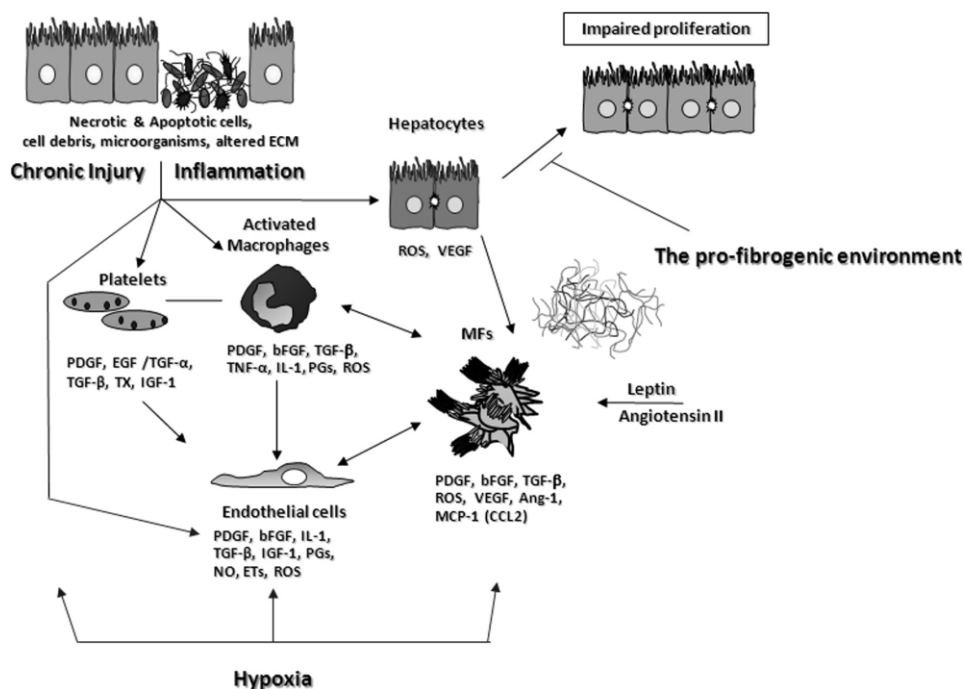
### **\*Poblaciones celulares implicadas en la fibrogénesis hepática**

Independientemente de la etiología específica o del patrón histopatológico de la fibrosis, la fibrogénesis hepática que ocurre durante una patología hepática crónica, es un proceso que resulta de las intensas y persistentes interacciones entre las poblaciones celulares hepáticas, que resultan de la síntesis y liberación de múltiples mediadores (factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, ROS, agentes vaso activos, etc.). Aunque también, células extra hepáticas, principalmente derivadas de la médula ósea hematopoyética, pueden ser reclutadas e implicadas en el hígado crónicamente, lesionándolo, prácticamente, cualquier célula hepática residente puede desempeñar un papel significativo en la progresión fibrogénica de la insuficiencia hepática crónica (Friedman, 2008; Forbes y Parola 2011; Novo y cols., 2014).

Como se resume en la Figura 10, la situación persistente de lesión celular parenquimatosa y la muerte por necrosis o apoptosis, la respuesta inflamatoria crónica y alteraciones cuantitativas y cualitativas de los componentes de la matriz extracelular, inevitablemente implican la activación de células inflamatorias, en particular, las células de Kupffer y los macrófagos reclutados de la sangre periféricas y de la médula ósea. Estos macrófagos, al activarse, constituyen una población celular fundamental en la progresión de las patologías hepáticas crónicas, sintetizando y liberando gran cantidad de mediadores pro inflamatorios y pro fibrogénicos, siendo los más importantes el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (platelet-derived growth factor; PDGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (basic fibroblastic growth factor; bFGF),

## INTRODUCCION

factor de crecimiento transformador beta-1 (TGFB1), factor de necrosis tumoral alfa (tumoral necrosis factor alpha; TNF--alfa), interleuquina 1 (IL--1), proteína 1 quimio atrayente de monocitos (monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1 O CCL2) y ROS. (Novo y cols., 2014).



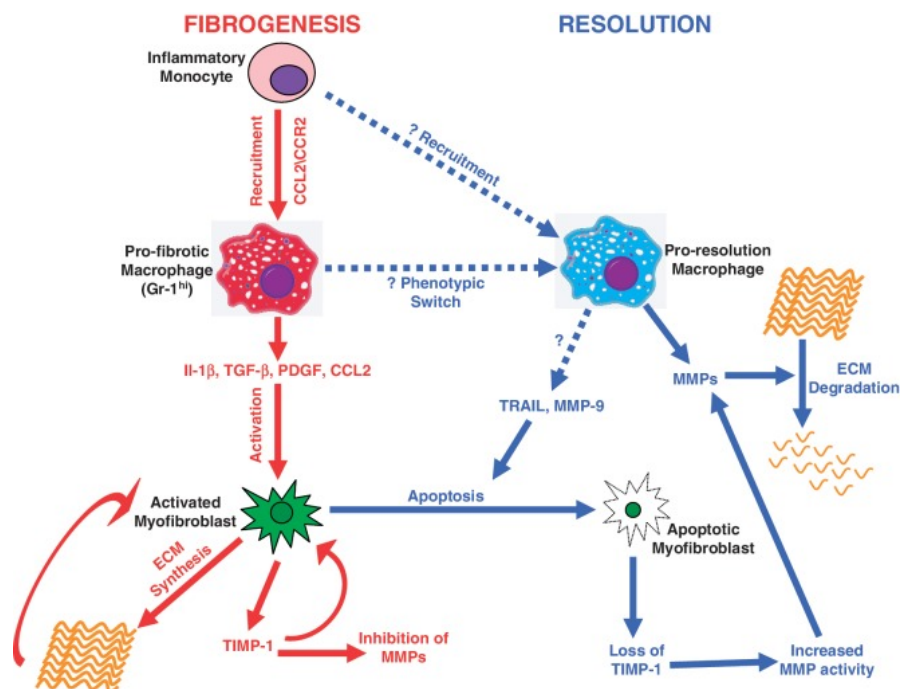
**Figura 10.** El escenario " crónico ": Historia de la diafonía entre las poblaciones de células hepáticas. Un esquema simplificado del complejo escenario de las interacciones entre las principales poblaciones de células hepáticas implicadas en la fibrogenesis hepática. Para cualquier población de células también aparecen mediadores que una vez son capaces de afectar de manera significativa el comportamiento de las células vecinas. La hipoxia también es capaz de afectar a la respuestas de las poblaciones de células hepáticas (Novo y cols., *Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis. Archives of Biochemistry and Biophysics.* 20-37, 2014).

Las células de Kupffer y los macrófagos procedentes de la circulación y de la médula ósea, inician y perpetúan una respuesta inflamatoria y, además, activan a las células estrelladas hepáticas. El reclutamiento de la subpoblación de monocitos inflamatorios Gr1+ (LyGC+) precursores de los macrófagos tisulares, es secundaria al receptor de quimioquina CCR2 y a su ligando MCP-1/CCL2 (Heymann y cols., 2009).

Estos monocitos derivados de la médula ósea que se acumulan en el hígado lesionado, se diferencian de forma predominante en una subpoblación de macrófagos productores de óxido nítrico-síntasa inducible (iNOS), que ejercen acciones pro inflamatorias y pro fibrogénicas, como son la activación de las

## INTRODUCCION

células estrelladas hepáticas, la diferenciación de los linfocitos Th en la subpoblación Th1 y la liberación de TGF-beta 1. La TGF-beta es una citoquina característicamente pro fibrogénica, que actúa aumentando la producción de componentes de la matriz extracelular y del enzima inhibidor de la metaloproteína tisular-1 (TIMP-1). Además, los macrófagos pueden sintetizar PDGF, un potente estimulador de la proliferación de miofibroblastos, IL-1beta y TNF-alfa, ambas citoquinas pro inflamatorias y múltiples quimioquinas que inducen un subsiguiente reclutamiento de células inflamatorias, perpetuando así, el estímulo pro inflamatorio y pro-fibrogénico (Figura 11), (Ramachandran, Iredale, 2012).



**Figura 11. Los macrófagos como organizadores de la fibrogenesis hepática y resolución de la fibrosis.** Durante la fibrogenesis, monocitos inflamatorios son reclutados por la inflamación del hígado a través de quimioquinas formando de la población de macrófagos pro-fibrótico. Macrófagos pro-fibróticos expresan mediadores tales como la IL-1β, TGF-β, PDGF y CCL2, que promueven la activación de miofibroblastos hepáticos. Miofibroblastos activados sintetizan el ECM y TIMP-1, un inhibidor potente de la actividad MMP. Ambos TIMP-1 y ECM promueven la persistencia del fenotipo de miofibroblastos activado. Durante la fase de resolución de la fibrosis, los macrófagos expresan MMP que promueven la degradación de ECM y expresan mediadores que inducen la apoptosis de miofibroblastos, lo que conduce a una reducción en la síntesis de ECM, la pérdida de TIMP-1 y el aumento de la actividad MMP. (Ramachandran y cols., Macrophages: central regulators of hepatic fibrogenesis and fibrosis resolution. *J Hepatol.* 2012; 56: 1417-9).

Los macrófagos se caracterizan por su gran plasticidad y pueden diferenciarse funcionalmente en diferentes subtipos, los clásicamente activados

## INTRODUCCION

---

M1 y los alternativamente activados M2. Es muy interesante que modelos experimentales han demostrado que los monocitos/macrófagos no solo son imprescindibles para la progresión de la fibrosis, sino también, para su regresión, ya que pueden degradar proteínas de la matriz extracelular y ejercer una acción anti inflamatoria (Heymann y cols, 2009; Tacke, 2012; Ramachandran e Iredale, 2012) (Figura 11).

Pero además de las células de Kupffer y de los macrófagos procedentes de los monocitos hepáticos que infiltran el hígado lesionado, otras células propias del parénquima hepático agredido de forma crónica, intervienen en el proceso de fibrinogénesis. Así los hepatocitos se considera que son una fuente importante de producción de ROS, así como de otros mediadores relacionados con el estrés oxidativo. Además, estos hepatocitos se consideran, en un sentido cuantitativo, la fuente principal de VEGF durante la progresión de la patología hepática crónica. Además, las células endoteliales, lesionadas y activadas, y las plaquetas constituyen el origen adicional de factores de crecimiento, citoquinas y también de otros mediadores. En particular, las células endoteliales contribuyen significativamente a la liberación de agentes vaso activos, como el óxido nítrico (NO) y la endotelina-1. Sin embargo, en cualquier tipo de hepatopatía crónica, la fibrogénesis hepática es protagonizada por lo miofibroblastos (MF) hepáticos, que representa una población heterogénea de células cuyo marcador fundamental es su inmunopositividad para la actina alfa del músculo liso (alfa-smooth-muscle actin, alfa-SMA). Por tanto, los MFs hepáticos son los efectores clave de la fibrogénesis hepática, posiblemente por su capacidad para ser una célula integradora de todas las señales autocrinas y paracrinas, liberadas desde el resto de las células del parénquima hepático (factores de crecimiento, citoquinas pro inflamatorias, quimioquinas, mediadores pro angiogénicos, adipoquinas y ROS, entre otros mediadores.) (Novo y cols., 2014). (Figura 10).

Aunque el parénquima hepático posee una gran capacidad regeneradora, la agresión aguda y crónica, puede causar necrosis asociada a una respuesta inflamatoria fibrogénica, que resulta en insuficiencia del órgano, asociada a hipertensión portal (Parola y cols., 2009).

La agresión que sufre el parénquima hepático, puede tener diferentes etiologías, esto es, vírica, alcohólica o por drogas y el mecanismo de muerte de los hepatocitos suele ser heterogénea. A los clásicos tipos de muerte celular, que son la necrosis y la apoptosis, se deben añadir los descritos recientemente,

## INTRODUCCION

---

como son la muerte celular por autofagia, la piroptosis y la necroptosis. (Cookson y cols., 2001; Galluzzi y cols., 2009; Komatsu, 2012). La mayoría de formas de muerte celular se han caracterizado “in vitro” y tan solo algunas de las descritas están bien definidas “in vivo”, utilizando ya modelos experimentales o en pacientes con hepatopatías. Sin embargo, se considera que en la mayoría de las enfermedades hepáticas, son diversos los mecanismos causantes de muerte celular y por esta razón, la muerte de los hepatocitos representa un proceso heterogéneo, en el cual participan varios de los mecanismos descritos. (Eguchi y cols., 2014).

A su vez, las células proclives a la muerte o incluso cuando son activadas, puede liberar micropartículas, que son pequeñas vesículas transportadoras de receptores, proteínas citosólicas o nucleares y micro RNAs.) (Morel y cols., 2011; Diehl y cols., 2012). Estas partículas son liberadas por los hepatocitos y transportadas por la circulación sanguínea. Así mismo, en ratas con ligaduras de colédoco, se ha demostrado que estas micropartículas activan las células sinusoidales hepáticas y por tanto, contribuyen a la remodelación tisular durante la evolución de la lesión colestásica hepática. (Witek y cols., 2009).

En la colestasis extrahepática, no solo se produce la muerte celular de los hepatocitos, sino que se lesionan también los colangiocitos y ambos tipos celulares liberan mediadores, que estimulan la producción de sustancias proinflamatorias. (Pellicoro y cols., 2014). En general, todos los modelos experimentales de fibrosis hepática secundaria a colestasis, presentan inicialmente lesión de las células epiteliales biliares, que desencadenan una respuesta inflamatoria crónica. (Liedtke y cols., 2013). La fibrosis secundaria a colestasis extrahepática o fibrosis biliar, tiene unas características histológicas propias, ya que cursan con tabiques fibrosos porto-portales, a los cuales se asocia la proliferación de conductos biliares. En particular, esta reacción ductular biliar se relaciona con la existencia de miofibroblastos periductulares. (Parola y cols., 2009).

La colestasis extrahepática en la rata, causa fibrosis biliar, así como complicaciones extrahepáticas, tanto cardiovasculares, como renales inmunológicas y neurológicas. (Kountouras y cols., 1984; Aller y cols., 2012a; Hosseini y cols., 2014). La fibrosis biliar en las ratas con ligaduras del colédoco es progresiva durante las primeras tres semanas de evolución, si bien, se ha

## INTRODUCCION

---

demostrado que en la cuarta semana, la producción de colágeno se reduce, (Tarcin y cols., 2011), lo que no excluye, que en estadios posteriores, progrese la fibrosis, aunque no se consigne la producción de cirrosis. (Kountouras y cols., 1984; Tsuhamoto y cols., 1990).

Sin embargo este modelo experimental de colestasis por ligadura y sección del colédoco, ha sido propuesto como útil para el estudio de la atresia biliar, ya que simula esta patología del ser humano. (Chen y cols., 2013). Incluso, mediante la inyección de etanol 95% por vía biliar intrahepática, se trata la fibrosis biliar mediante la cistoyeyunostomía, emulando así, el tratamiento de la atresia biliar humana con la intervención de KASAI. (Wang y cols., 2014).

Sin embargo, la atresia biliar humana, es un proceso complejo, de etiopatogenia aún no esclarecida completamente. La anomalía en el desarrollo de la vía biliar se suele asociar a una inflamación esclerosante de los conductos biliares, pero se desconoce la causa que inicia dicha patología. (Sokol y cols., 2001; Mieli-Vergani y cols., 2009). Con independencia de la causa originaria de la inflamación, la extravasación de bilis en los tejidos periductales, también potencia la respuesta inflamatoria y la fibrosis, produciendo colestasis obstructiva. (Mieli-Vergani y cols., 2009). Aunque la portoenterostomía de Kasai consigue en algunos casos la reversibilidad del proceso, se ha descrito también, el incremento postoperatorio de mediadores proinflamatorios, lo que a su vez, implicaría la existencia de un proceso inmunológico progresivo. (Narayanaswami y cols., 2007). En estos casos, el trasplante de hígado es el tratamiento de elección. (Davenport y cols., 2004).

La respuesta inflamatoria hepática secundaria a la colestasis obstructiva, se inicia en el espacio periductular y se cree que es protagonizada por los fibroblastos portales, que se activan y se transforman en miofibroblastos. (Novo y cols., 2014; Wells 2014). Inicialmente se especuló respecto de las posibilidades patogénicas de la transición epitelio-mesenquimal de los colangiocitos en la fibrosis biliar. (Kalluri y cols, 2003; Choi y cols, 2009; Kalluri, 2009). Sin embargo, en la actualidad no se considera que este mecanismo represente una significativa importancia en la producción de fibrosis biliar. (Chu y cols., 2011). Se ha demostrado que los hepatocitos ante determinados estímulos, que inducen su regeneración, se transforman en células con características mesenquimales, por el proceso denominado transición epitelio-mesenquimal. Este complejo fenómeno, produce la pérdida de la polaridad de las células

## INTRODUCCION

---

epiteliales, así como de las uniones intercelulares, en tanto, que son capaces de adquirir motilidad, así como de invadir el espacio intersticial, mediante la destrucción de la matriz extracelular, que son características propias de las células mesenquimales. (Kalluri, 2009). La transición epitelio-mesenquimal de los hepatocitos se correlaciona con la inhibición de factores nucleares hepatocitarios (HNFs) y en particular de HFN 4-alfa. Este factor nuclear, no solo regula la expresión molecular de adhesión, sino que incluso, es capaz, cuando se expresa ectópicamente en fibroblastos, de estimular la expresión de uniones fuertes intercelulares y moleculares de polaridad epitelial. (Ciccini y cols., 2014). Aunque la transición epitelio-mesenquimal se puede inducir "in vitro", no participa en la producción de fibrosis, en ningún modelo experimental de insuficiencia hepática colestásica. (Scholteri y cols., 2010).

Se considera, que los fibroblastos portales son los responsables principales de la producción de miofibroblastos en la fibrosis biliar. En particular, se ha propuesto, que en la fibrosis biliar, los fibroblastos portales originan una población de miofibroblastos procedentes de las células estrelladas hepáticas (Iwaisako y cols., 2014a). Incluso, se ha llegado a proponer que los fibroblastos portales y las células estrelladas hepáticas, poseerían funciones contrapuestas. Así, los miofibroblastos procedentes de los fibroblastos portales, regularían la fibrosis, en tanto que, los miofibroblastos procedentes de las células estrelladas hepáticas, mediarían la reparación hepatocelular. (Lemoinne y cols., 2013).

Los fibroblastos portales son una pequeña población de células fibroblásticas, que rodean la vena porta y mantienen la integridad del tracto portal. También se denominan fibroblastos periductulares (Dranoff y cols., 2010) y se han descrito como protagonistas de la patogenia de la insuficiencia hepática colestásica. A su vez, las células estrelladas hepáticas son el principal origen de los miofibroblastos en la insuficiencia hepática experimental, producida por tetracloruro de carbono (CCL4). (Iwaisako y cols., 2014b). Se considera, que tras la ligadura y sección del colédoco en roedores, la obstrucción al flujo biliar produce aumento de la presión biliar y disfunción de las células epiteliales biliares, que secretan citoquinas y causan una respuesta inflamatoria moderada. Con posterioridad, la difusión a través de la pared de los conductos biliares de los ácidos biliares libres, puede estimular la reacción ductular, con respuesta hiperplásica de las células epiteliales biliares, activación de los colangiocitos y por último, estimulación de los fibroblastos portales. (Syal y cols., 2012). Estudios "in vitro" e "in vivo", han demostrado que los fibroblastos portales

## INTRODUCCION

---

depositan colágenos de membrana basal y colágeno fibrilar, propios de la fibrosis hepática. Así mismo, tras la ligadura del colédoco en la rata, los fibroblastos periportales producen colágenos de tipos I, III y IV, en tanto que los miofibroblastos procedentes de fibroblastos portales, expresan RNA mensajero, que codifica colágeno de tipo I y de tipo II (Desmouliere y cols., 1997; Perepelyuk y cols., 2013). Además, los miofibroblastos poseen función contráctil mediante la acción de la actina de músculo liso (SMA)-alfa. La integración de alfa-SMA organizada como fibras de estrés, con las fibras propias de la matriz extracelular, permite al miofibroblasto, ejercer una acción contráctil a distancia, causando remodelación y distorsión de la estructura hepática, asociada a la fibrosis. (Ma y cols., 2013; Shi y cols., 2014).

Los colangiocitos dañados, liberan mediadores que inducen la respuesta inflamatoria hepática. Uno de los principales mecanismos de daño celular es el estrés oxidativo. (Novo y cols., 2014). Es posible que las alteraciones metabólicas que produce la colestasis en los colangiocitos, genere hipoxia y por tanto, producción de radicales libres de oxígeno y nitrógeno, que a su vez, inducen la activación de factores de transcripción proinflamatorios, como son NFκB y AP-1. (Liedtke y cols., 2013). Entre los mediadores proinflamatorios que se generan, destacan las quimioquinas, que son responsables de la atracción de leucocitos. (Koenderman y cols., 2014). En la actualidad, al considerar que fosfoinositol-3-Kinasas (P13Ks) desempeña una acción importante en la señal inicial de transducción, que conduce a la expresión de quimioquinas y sus receptores y por tanto, regulan la extravasación y migración de células protagonistas de la inmunidad natural, como son neutrófilos y monocitos, al parénquima hepático inflamado. (Hawkins y cols., 2014).

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) desempeña una importante acción reguladora del desarrollo embrionario, mediante la regulación de la transición mesénquimo-epitelial. Sin embargo, HGF por sus efectos pleiotrópicos, también está implicado en la regulación de la inflamación, en numerosos modelos experimentales, ya que ejerce una acción protectora, mediante su acción inmunosupresora. Así, HGF puede prevenir la insuficiencia hepática experimental, entre otros mecanismos, induciendo la producción del antagonista de receptores de IL-1 o limitando la citotoxicidad hepatocitaria causada por interferón (IFN). (Molnarfi y cols., 2014). La inhibición en la síntesis y secreción de esta citoquina por las células de origen mesenquimal hepático, como son los fibroblastos portales, podría constituir un factor inductor de

## INTRODUCCION

---

inflamación en la fibrosis biliar, así como la degradación enzimática de sus receptores epiteliales. (Stoker y cols., 1987).

La producción hepática de quimioquinas, no solo atrae células derivadas de las células madre hematopoyéticas, sino también células madre mesenquimales procedentes de la médula ósea, así como fibrocitos, en particular los fibrocitos migran al hígado colestásico y constituyen el 4 al 6% de las células que expresan colágeno tipo I. (Kisseleva y cols., 2012). Los fibrocitos poseen la capacidad de transformar su fenotipo y diferenciarse en miofibroblastos productores de colágeno en el hígado inflamado y por esta razón, se ha investigado el mecanismo por el que son reclutados. Entre los factores que regulan la movilización de los fibrocitos desde la médula ósea, destaca el TGF-B1. (Hong y cols., 2007) y entre las quimioquinas que facilitan su reclutamiento, se han descrito, principalmente, CCL 2, CCL 7, CCL 12 y CCL 3, que son ligandos para los receptores CCR 2 y CCR 1 en células hepáticas y derivadas de la médula ósea. (Seki y cols., 2009). En ratones con ligadura de colédoco, se ha demostrado que los fibrocitos procedentes de la médula ósea, migran específicamente al hígado con fibrosis biliar y por lo tanto, participarían en la fibrogénesis, ya que colaboran en el incremento de la población hepática de miofibroblastos. (Scholten y cols., 2011).

Las células inflamatorias que son atraídas al parénquima hepático, fagocitan células necróticas o apoptóticas y amplifican las respuesta inflamatoria, al liberar citoquinas proinflamatorias, como son TFN-alfa, IL-6 e IL-1beta, así como por la captación de linfocitos T. (Jenne y cols., 2013; Park y cols., 2014; Sipeki y cols., 2014).

Así mismo, numerosos mediadores liberados por las células inflamatorias, estimulan la actividad de los miofibroblastos, así como potencian su proliferación y la producción matriz extracelular. Entre estos factores, los que poseen mayor actividad son TGF-B, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) e IL-13. (Iwaisako y cols., 2014).

Por lo tanto, el modelo experimental de fibrosis biliar por ligadura del colédoco, cursaría con colestasis, inflamación portal hepática, infiltración leucocitaria de los tractos portales, proliferación de los colangiocitos y fibrosis de los tractos portales. La alteración del metabolismo de los colangiocitos durante la colestasis, no solo estaría causada por el estrés oxidativo inducido por la hiperpresión y los ácidos biliares, sino que también concurriría la activación de

## INTRODUCCION

---

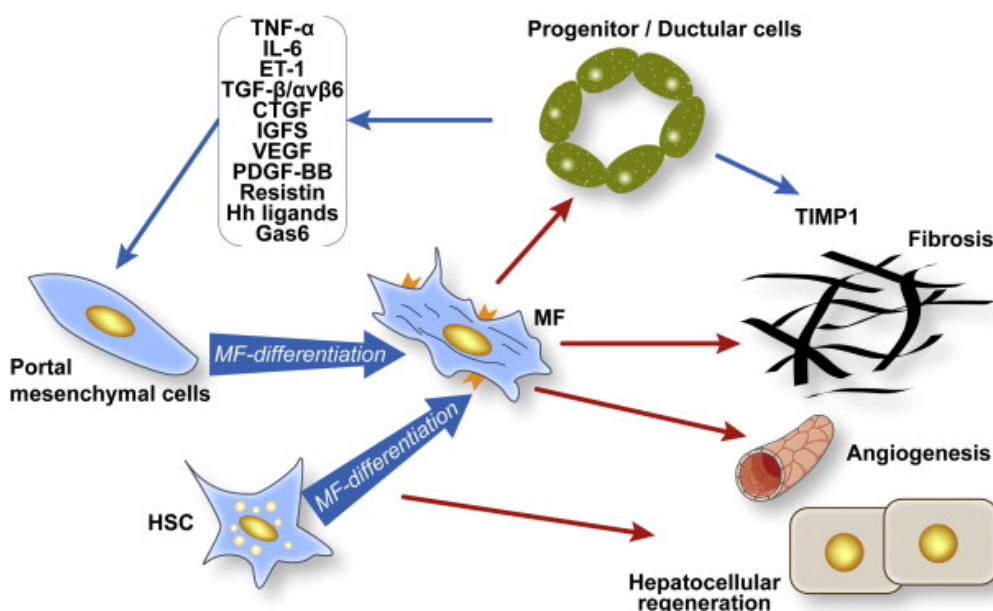
las células de Kupffer por su capacidad de liberar radicales libres de oxígeno. (Ljubuncic y cols., 2000).

Los fibroblastos portales establecen relación paracrina con los colangiocitos e influyen en su proliferación cuando existe colestasis obstructiva. Cuando se transforman en miofibroblastos, no expresan ectonucleotidasa NTPDasa 2 y por lo tanto, no degradan los nucleótidos extracelulares, que interaccionan con los receptores de clase P2Y en los colangiocitos y estimulan su proliferación. (Jhandier y cols., 2005). Este mecanismo por el que los miofibroblastos portales regulan la proliferación de los colangiocitos, se considera que participa en la reacción ductular, que es secundaria a la colestasis extrahepática. (Fausther y cols., 2013). Así mismo, los fibroblastos portales podrían regular la proliferación de colangiocitos mediante la producción de ácido hialurónico, que se ha demostrado en la fibrosis biliar que aumenta en el espacio portal y se une al receptor CD44, cuya expresión está aumentada en los colangiocitos y favorece su hiperplasia (He y cols., 2008).

En la colestasis obstructiva, otros mecanismos, que podrían regular la activación y proliferación de los fibroblastos portales, estarían relacionados con su interacción paracrina con endotelios vasculares sanguíneos y linfáticos, así como con la inervación, en particular del plexo vascular arterial peri biliar. Así, durante el desarrollo de fibrosis biliar, los fibroblastos portales pueden favorecer la angiogénesis en los espacios portales. (Figura 12), (Lemoinne y cols., 2013). También las células endoteliales linfáticas, por estimulación mediante factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), favorecen el desarrollo de células parietales con alfa-SMA, que a su vez, causan gran producción de ácido hialurónico. Este último mecanismo de interacción entre los miofibroblastos y las células endoteliales linfáticas, que ha sido demostrado en la fibrosis pulmonar, también podría participar en la patogenia de la fibrosis biliar. (Meinecke y cols., 2012). La relación funcional entre los miofibroblastos y las células nerviosas, es propia del desarrollo embrionario, aunque se sospecha que en la fibrosis biliar, esta interacción podría estar unificada también en su patogenia, máxime si se considera, que el plexo vascular perihiliar está muy inervado y que las células precursoras de los fibroblastos portales expresan receptores de neurotrofina que participa en el desarrollo nervioso embrionario. (Suzuki K y cols., 2008). Recientemente, también se ha demostrado la implicación de receptores cannabinoideos en la apoptosis y fibrosis hepática, secundarias a la ligadura del

## INTRODUCCION

colédoco en la rata. Así, la estimulación de receptores CB2 o el bloqueo de receptores CB1, atenúan la fibrosis hepática. (Mahmoud y cols., 2014).



**Figura 12. La interacción de las células progenitoras hepáticas/ductales con miofibroblastos hepáticos.** Células progenitoras hepáticas/ductales interactúan bidireccionalmente con miofibroblastos, a través de múltiples vías, para proliferar y activar acciones profibrogenicas, proangiogénicas y / o proregenerativas, dependiendo de su origen y microambiente. (Lemoine y cols., *Origins and functions of liver myofibroblasts. Biochim Biophys Acta.* 948-54, 2013).

Las células estrelladas hepáticas, constituye la principal fuente productora de miofibroblastos en la insuficiencia hepática crónica de causa vírica (Infecciones por HBV y HCV). Así como en la esteatosis hepática, lo que no excluye de su participación secundaria a los fibroblastos en la fibrosis biliar. (Xu y cols., 2014). Las células estrelladas hepáticas proceden del mesénquima embrionario y residen en el espacio de Disse, entre los hepatocitos y las células endoteliales sinusoidales. Mediante sus prolongaciones dendríticas, contactan con las células endoteliales de los sinusoides hepáticos y en su citoplasma acumulan vitamina A cuando expresan un fenotipo quiescente. (Asajina, 2012). También son características de su fenotipo quiescente, la expresión de desmina, marcadores neuronales, como la proteína asociada fibrilar glial, sinaptofisina, sinemina y receptor p75 de factor de crecimiento nervioso (NGF). (Bataller y cols., 2003). Por el contrario, cuando se activan liberan los depósitos lipídicos, (Jing y cols., 2013) e inhiben la expresión de marcadores neuronales, en tanto

## INTRODUCCION

---

que expresan alfa-SMA (Amooth mucle actin alpha) y sintetizan colágeno tipo 1 transformándose en miofibroblastos. (Forbes y cols., 2011; Novo y cols., 2014).

Las células estrelladas hepáticas también se han denominado células peri sinusoidales y células de ITO, aunque en estado quiescente, una de sus funciones principales es la propia de los pericitos, rodeando los sinusoides hepáticos y por lo tanto, con capacidad para acoplar el flujo sanguíneo intrahepático. Sin embargo, tras su estimulación por TGF $\beta$ 1 se activan y protagonizan la cicatrización hepática. (Yin y cols., 2013). En esencia, la pérdida de la homeostasis de las células estrelladas hepáticas quiescentes, es la productora principal de su activación. En este sentido, se han propuesto varias alteraciones como inductoras de la expresión miofibroblástica por las células estrelladas hepáticas. Así, la activación de los canales de K $^{+}$ , (Freise y cols., 2014) la expresión del factor inducible por hipoxia (HIF)-1-alfa, (Zhan y cols., 2014) y la autofagia. (Mallat y cols., 2014). En particular, la autofagia de los depósitos lipídicos de las células estrelladas hepáticas contribuye a su activación y diferenciación miofibroblástica. Se ha propuesto, que el estrés oxidativo y el estrés del retículo endoplasmático, serían dos factores estimuladores de la autofagia en las células estrelladas hepáticas. (Hernandez-Gea y cols., 2013). Por el contrario, también se ha propuesto la autofagia como un mecanismo protector anti inflamatorio. En este sentido, la autofagia en los macrófagos evita la liberación de mediadores proinflamatorios en la insuficiencia hepática crónica. Por lo tanto, la autofagia, según el tipo celular en que se produce, puede contribuir a la fibrogénesis hepática; por ejemplo, la autofagia en las células estrelladas hepáticas, o bien puede ejercer un efecto anti inflamatorio y anti fibrogénico, por ejemplo, la autofagia en macrófagos o la autofagia en los hepatocitos, que evita su apoptosis tras la agresión. (Mallat y cols., 2014).

Las células estrelladas hepáticas favorecen la proliferación de los hepatocitos y de las células biliares. Así mismo, durante el desarrollo embrionario inducen la diferenciación de ambos tipos celulares hepáticos. (Lemaigre, 2009) También han sido implicadas en la regeneración hepática, mediante la producción de factores angiogénicos, que modulan las células endoteliales y factores que causan la proliferación de los hepatocitos y la remodelación de la matriz extracelular. (Roskams, 2008). Por lo tanto, las células estrelladas hepáticas son capaces de expresar un fenotipo pro-regenerativo hepático, cuya investigación experimental es fundamental, ya que su manipulación puede ofrecer múltiples aplicaciones terapéuticas en la clínica

## INTRODUCCION

---

humana. (Yin y cols., 2013). Así, las células estrelladas hepáticas, se pueden trasplantar en el hígado lesionado y contribuir a la regeneración tisular, ya que son capaces de expresar un fenotipo similar al propio de las células progenitoras hepáticas durante su diferenciación en hepatocitos y células epiteliales biliares. Por lo tanto, la terapia con células estrelladas hepáticas, puede constituir un excelente método en el futuro, para conseguir la regeneración hepática, ya que pueden diferenciarse, tanto en hepatocitos como en células biliares. (Kordes y cols., 2014).

Sin embargo, las condiciones ambientales secundarias a la agresión hepática crónica, inducen la expresión del fenotipo fibrogénico en las células estrelladas hepáticas. (Pellicoro y cols., 2014; Xu y cols., 2014; Jwaisako y cols., 2014; Novo y cols., 2014).

Las células hepáticas activadas y los miofibroblastos que de ellas derivan, tienen características inmunológicas y por esta razón, son capaces de establecer interacciones con células inherentes a la inmunidad natural, así como ejercer acciones inmunoregulatoras. Así, las células estrelladas hepáticas, al ser activadas, producen radicales libres de oxígeno, a través de NADPH oxidasa, citoquinas pro inflamatorias, quimioquinas y receptores de quimioquinas, como CCR2, CCR 5, CCR 7, CXCR 3 y CXCR 7 (Pellicoro y cols., 2014). Entre las células inmunes que regulan, destacan los macrófagos, incluyendo también las células de Kupffer. Sin embargo, la agresión hepática, causa reducción de las células de Kupffer, en tanto, que aumenta considerablemente el número de macrófagos, que infiltran el tejido fibrosado hepático. (Ramachandran y cols., 2012), ya que el reclutamiento hepático de los macrófagos es fundamental en la producción de fibrosis, se han estudiado las características que poseen estas células, en distintos modelos experimentales de insuficiencia hepática crónica y se ha demostrado que los macrófagos profibrogénicos producen TGF $\beta$ , PDGF, IL-4, IL-13, que a su vez, estimulan la síntesis de colágeno por los miofibroblastos. A su vez, mediante la producción de citoquinas proinflamatorias, como son TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , favorecen la supervivencia de los miofibroblastos derivados de las células estrelladas hepáticas. (Wynn y cols., 2010; Zimmermann y cols., 2010).

Las propiedades inmunológicas de las células estrelladas hepáticas activadas, también le permiten modular la inmunidad adquirida, en particular, durante la producción de fibrosis hepática favorecen la aparición de linfocitos

## INTRODUCCION

---

Th17, que secretan IL-17 e IL-22, que actuando en receptores IL-17 de las células estrelladas hepáticas, activan el factor de transcripción STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) e inducen la producción de colágeno de tipo I. (Meng y cols., 2012). Otras interacciones con potencial actividad profibrogénica, es la que las células estrelladas hepáticas activadas pueden establecer con las células asesinas naturales (Natural Killer T cells=NKT cells), que constituyen el 30% de los linfocitos hepáticos. (Geissmann y cols., 2005) y con las células cebadas, que también aumentan significativamente en el hígado, tanto en modelos experimentales de fibrosis hepática, como en la cirrosis humana. (Franceschini y cols., 2006; Franceschini y cols., 2007; Aller y cols., 2007c).

TGF- $\beta$ 1 induce la activación de las células estrelladas hepáticas y aumenta la expresión del receptor PDGF, así como favorece la respuesta proliferativa dependiente de AKT, PI3K y p70S6K. Por lo tanto, aunque TGF- $\beta$  inhibe la proliferación hepatocitaria, sin embargo, estimula la proliferación de las células estrelladas hepáticas. (Ren y cols., 2013). Por el contrario PPAR-Gamma (peroxime proliferator-activated receptor gamma), favorece la sensibilidad a insulina e inhibe la activación de las células estrelladas hepáticas. (Qian y cols., 2012; Janani y cols., 2015). La vía de señalización Wnt es también fundamental en la inducción de proliferación de las células estrelladas hepáticas, en tanto que Notch favorece la diferenciación biliar. La activación anómala de Wnt causa fibrosis hepática, no solo por proliferación de las células estrelladas hepáticas, sino también, porque estimula su transición miofibroblástica. (Miao y cols., 2013). Por esta razón, la inhibición de Wnt. asociada a la activación de PPAR-gamma, poseería un efecto antifibrogénico hepático. (Kang y cols., 2009).

En la fibrosis biliar experimental, se considera que la fibrogénesis es iniciada por la activación de los fibroblastos portales y según progresa la fibrosis, las células estrelladas hepáticas colaboran progresivamente en la remodelación, contribuyendo a incrementar la población de miofibroblastos hepáticos. Por lo tanto, en la colestasis extrahepática experimental, se ha sugerido que los fibroblastos portales podrían regular la activación de las células estrelladas hepáticas. (Tweisako y cols., 2014) Entre los mecanismos de activación de ambos tipos de precursores miofibroblásticos hepáticos, destacan los epigenéticos, que alteran la función de los genes sin modificar la estructura del ADN. Así, tras su activación, las células estrelladas hepáticas inhiben la metilación de los genes que producen quiescencia, esto es, que silencian los

genes antifibrogénicos, como son IKB-alfa o PPAR-gamma y por lo tanto, se aumenta la expresión de la metil transferasa de histona, que a su vez, permite la transcripción de colágeno, TIMP-1 y TGF-B. (Yang y cols., 2012). A su vez, el aumento de la expresión de PPAR-gamma en los miofibroblastos derivados de células estrelladas hepáticas, produciría la reversión de su activación profibrinogénica. (Jaster y cols., 2005). Estos resultados sugieren, que las alteraciones micro ambientales que inicialmente se producen en la colestasis obstructiva experimental, causan la activación de fibroblastos portales y de células estrelladas hepáticas por mecanismos epigenéticos. En este supuesto, la manipulación y control del metabolismo celular, que regula las características bioquímicas ambientales hepáticas en la fibrosis biliar, representaría un eficaz mecanismo terapéutico.

### **5. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES E INSUFICIENCIA HEPÁTICA**

Las células madre, representan un futuro prometedor en medicina, ya que se ha demostrado experimentalmente su gran capacidad para modular la respuesta inflamatoria, así como para participar en la regeneración de tejidos y órganos. (Sutton y cols., 2014). Las células madre pueden proliferar manteniendo su indiferenciación y por su potencial pluripotencia generan células progenitoras de múltiples tipos celulares. Esta última propiedad, les confiere capacidad para regenerar y reparar tejidos humanos. En los mamíferos existen dos tipos fundamentales de células madre, las células madre somáticas, también denominadas células madre somáticas o progenitoras y las células madre embrionarias. (Niwa y cols., 2000).

Las células madre somáticas se encuentran en los tejidos de adultos, principalmente en médula ósea, tejido adiposo y sangre. Estas células, son capaces de proliferar y regenerar el tejido lesionado. Su limitación es que solo se pueden diferenciar en un tipo celular. (Gimble y cols., 2007). Por el contrario, las células madre embrionarias son pluripotentes y se pueden diferenciar en células derivadas de las tres capas germinativas, esto es, del endodermo, mesodermo y ectodermo. Por desdiferenciación, una célula somática diferenciada se puede transformar en una célula madre pluripotente o multipotente, en tanto que por transdiferenciación, una célula somática, cambia su fenotipo y adopta una identidad diferente, sin tener que desdiferenciarse. (Evan y cols. 1981; Graft, 2011).

## INTRODUCCION

---

La reprogramación celular tiene su origen en la transferencia de núcleos de células somáticas, que demostró, que el núcleo contiene toda la información genética necesaria para transformar cualquier célula del organismo. (Briggs y cols., 1952; Campbell y cols., 1996; Tachibana y cols., 2013).

Un gran avance en la reprogramación celular, fue la creación de células equivalentes a las células madre embrionarias sin utilización de embriones, sino mediante su creación "in vitro". Así, las células somáticas pueden ser reprogramadas genéticamente para inducir una célula madre pluripotente (iPSCs). Para alcanzar este objetivo, se realizó la transformación de los factores de transcripción Oct 4, Sox 2, Klf 4 y c-Myc a fibroblastos de ratón y humanos, utilizando vectores retrovirales. (Takahashi y cols., 2006; Takahashi y cols., 2013). La aplicación clínica más atractiva de estas técnicas de reprogramación genética, es la obtención de iPSCs específicas de los pacientes, para sustituir los tejidos dañados. (Kanherkar y cols., 2014). La posterior manipulación utilizando diferentes factores para la reprogramación genética, ha conseguido resultados más eficaces. Así se puede favorecer la expresión de específicos factores de transcripción, tanto del endodermo, como de los hepatocitos que representan diferentes estadios evolutivos del desarrollo embrionario. (Banas y cols., 2007b).

Algunas células madre del adulto tienen la propiedad de diferenciarse en hepatocitos. Inicialmente, la obtención de estas células para diferenciarse a hepatocitos se limitó a la médula ósea. En particular, se llegó a seleccionar una fracción de estas células, localizadas en el estroma de la médula ósea, denominadas células madre mesenquimales. Estas células demostraron su capacidad para diferenciarse en hepatocitos. (Pittenger y cols., 1999). Sin embargo, en la actualidad la fuente más atractiva para la obtención de células madre mesenquimales es el tejido adiposo, ya que gran número de estas células pueden ser obtenidas por liposucción, una técnica quirúrgica mínimamente invasiva (Seo y cols., 2005a; Seo y cols., 2005b). Así, estas células madre pueden ser obtenidas del propio paciente y tras su diferenciación a hepatocitos, pueden ser trasplantadas. (Wu y cols., 2012; Banas y cols., 2007b).

Para inducir la diferenciación de las células madre mesenquimales a hepatocitos "in vitro", es fundamental someterlas a estímulo adecuado para que mantengan las funciones especializadas de las células epiteliales hepáticas. Existen varios métodos para lograr este fin. Por ejemplo, mediante su

## INTRODUCCION

---

tratamiento con diferentes citoquinas y factores de crecimiento, como *Hepatocyte growth factor* (HGF), *epithelial growth factor* (EGF), los factores de crecimiento de los hepatocitos (HGF) y de epitelio (EGF), insulina o factor de crecimiento similar a insulina (IGF). Además, también estimulan la diferenciación a hepatocitos, la dexametasona, el ácido retinoico, la nicotinamida y la noradrenalina. (Wu y cols., 2012; Talen y cols., 2007) En general, las células con características similares a hepatocitos obtenidos a partir de las células madre mesenquimales, derivadas del tejido adiposo, tienen características diferentes según el método utilizado para su diferenciación. (Snykers y cols., 2006).

Otro método para diferenciar hepatocitos, consiste en cultivar las células madre mesenquimales con hepatocitos o con células hepáticas no epiteliales adultas o de hígado fetal. (Lange y cols., 2006; Deng y cols., 2008).

Por último, la diferenciación hepatogénica "in vitro". Puede ser conseguida induciendo determinados factores de transcripción. Así, HNF3B es un factor de transcripción fundamental para el desarrollo embrionario del hígado y puede ser regulado con tetraciclina. (Ishii y cols., 2008).

Las células madre mesenquimales se pueden diferenciar también en hepatocitos "in vivo". Estos experimentos se han realizado principalmente en roedores con insuficiencia hepática aguda o crónica y han demostrado que la diferenciación hepatogénica "in vivo" de las células madre mesenquimales, es un eficaz tratamiento de las enfermedades hepáticas. (Dai y cols., 2009). En particular, las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea, inyectadas directamente en el parénquima hepático de ratas cirróticas, se diferencia sin fusión, en hepatocitos. Por lo tanto, se puede considerar que las células madre mesenquimales pueden diferenciarse a hepatocitos "in vivo", así como estimular la regeneración hepática y favorecer la degradación de la matriz extracelular fibrosa. (Dai y cols., 2009). A este respecto, las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea indiferenciadas, son más eficaces en la reversión de la fibrosis causada por tetracloruro de carbono en rata, que las adipogénicas y hepatogénicas, entre otras razones, porque producen más metaloproteínas (MMP)-2 y MMP-9. (Hardjo y cols., 2009).

Las células madre mesénquimales están consideradas como principales candidatas para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias crónicas productoras de fibrosis. A sus efectos inmunomoduladores se une su acción para reducir los factores profibróticos, como son el estrés oxidativo, la hipoxia y la

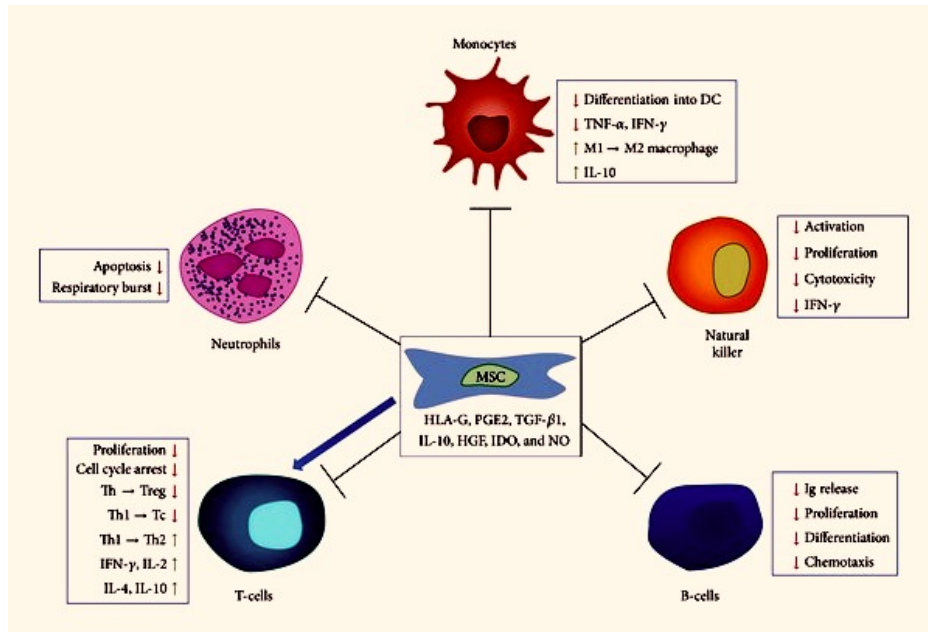
## INTRODUCCION

---

actividad de TGF-B1. (Figura 13), (Usunier y cols., 2014). Entre las acciones inmunomoduladoras de las células madre mesenquimales, se han demostrado múltiples, entre ellas, la inhibición de la proliferación de linfocitos T y B, la inhibición de la producción de inmunoglobulinas, el cambio de polaridad de los linfocitos Th1 a Th2 o anti inflamatorios, la disminución en la expresión de TLR (toll like receptors), la reducción de la infiltración de monocitos/macrófagos, neutrófilos y linfocitos, que se correlaciona con la disminución de la expresión de MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1). Disminución de macrófagos de tipo 1 y aumento de los macrófagos de tipo 2, inhibición liberación de microvesículas a la circulación sanguínea por las células inflamatorias, así como la disminución en la expresión de citoquinas proinflamatorias, como IFN-gamma, TNF, IL-1-alfa e IL-6 y aumento de la producción de citoquinas anti inflamatorias, como IL-4 e IL-10. (Zheng y cols., 2013; Usunier y cols., 2014; Haidara y cols., 2014; Glenn y cols., 2014). Las propiedades anti inflamatorias e inmunosupresoras que poseen las células madre mesenquimales, las hace igualmente atractivas para reducir la agresión inmunológica en el trasplante de órganos. En particular las células madre mesenquimales inducen tolerancia. La membrana celular de estas células presenta pocos antígenos leucocitarios humanos (HLA) de clase I y no expresa HLA de clase II, ni moléculas co-estimuladoras (Le Blanc y cols., 2003), por lo que se las considera células inmunoprivilegiadas, aunque no se excluye que en determinadas circunstancias, como son, por ejemplo, tras la estimulación con Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) puedan expresar moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MMC) y por lo tanto, ser capaces de presentar antígeno. (Krarojera y cols., 2006). Sin embargo, tanto las células madre mesenquimales, como las células presentadoras de antígeno por excelencia, como son las células dendríticas, son capaces de inducir tolerancia en el trasplante de órganos. (Guo y cols., 2014). Además las células madre mesenquimales humanas, se considera que no tienen riesgo de malignización, esto es, de transformarse en células cancerosas. (Casiraghi y cols., 2013). Sin embargo, las células madre mesenquimales pueden interactuar con la terapia inmunosupresora, ya que ambos comparten similares funciones inmunosupresoras. Así, tacrolimus, un inhibidor calcineurina y rapamicina, un inhibidor de mTOR, reducen las propiedades inmunosupresoras de las células madre mesenquimales y por el contrario, estas células también reducen la capacidad inmunosupresora de Tacrolimus y Rapamicina. Incluso a elevadas dosis tacrolimus pueden ser tóxicas para las células madre

## INTRODUCCION

mesenquimales. (Hoogduijin y cols., 2008). Por lo tanto, es importante la adecuada selección de la terapia con fármacos inmunosupresores si se utilizan células madre mesenquimales (Vandemeulen y cols., 2014).



**Figura 13. Las células madre mesenquimales ejercen diversos efectos sobre las células inmunes.** Resumen de los efectos mediados por las células madre mesenquimales en la respuesta inmune. Varios factores secretados por estas ejercen un efecto inhibitorio sobre las células del sistema inmunitario que están implicados en el proceso fibrótico (HGF: factor de crecimiento de hepatocitos, HLA: antígeno humano de leucocitos, IDO: indoleamina 2,3-dioxigenasa, IFN-γ: interferón γ, Ig: inmunoglobulina, IL: interleucina, MSC: células estromales mesenquimales, NO: óxido nítrico, PGE2: prostaglandina E2, Tc: citotóxica de células T, TGF-β: factor de crecimiento transformante-β, TNF-α: factor de necrosis tumoral -α, Th: células T helper, y Treg: de células T reguladoras). (Usunier y cols., Management of fibrosis: the mesenchymal stromal cells breakthrough. Stem Cells Int. 2014).

Las funciones inmunosupresoras de las células madre mesenquimales permite que sean utilizadas también para inhibir la respuesta inmunológica del injerto contra el huésped, por ejemplo, en el trasplante de médula ósea (Francois y cols., 2013) y de intestino, así mismo para el tratamiento de las enfermedades autoinmunes. (Glenn y cols., 2014; Kyurkchiev y cols., 2014) A su vez, por sus propiedades regenerativas, se ha propuesto su utilización en múltiples enfermedades que cursan con insuficiencia o degeneración tisular u orgánica. (Parekkadan y cols., 2010; Lanzoni y cols., 2013; Qin y cols., 2014; Sutton y cols., 2014).

## INTRODUCCION

---

Las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (MSC-TA), también llamadas células estromales derivadas del tejido adiposo y células estromales adherentes derivadas de tejido adiposo, son multipotentes y muy similares a las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea. (De Ugarte y cols., 2003). Las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo (MSC-TA), se pueden diferenciar en hepatocitos, tanto “in vitro” como “in vivo” y así expresan marcadores hepáticos, esto es, proteínas y enzimas propias de los hepatocitos, así como sus funciones, ya que sintetizan urea y captan lipoproteínas de baja densidad (LDL). (Seo y cols., 2005a). El mecanismo de transdiferenciación de las células madre mesenquimales en células similares a hepatocitos, es un proceso inverso al de transición epitelio-mesenquimal, esto es, constituye un proceso de especialización celular y por esta razón, se inhiben los reguladores de transición epitelio-mesenquimal como son Twist y Snail, en tanto que se expresan marcadores epiteliales como E-cadherina y alfa-catenina. (Christ y cols., 2010; Yammamoto y cols., 2008). Así mismo, la vía de señalización Wnt, que está implicada en el desarrollo embrionario, se inhibe en el proceso de diferenciación de las células madre mesenquimales a hepatocitos. (Ke y cols., 2008). En esta diferenciación, también participan mecanismos epigenéticos, como la metilación de ácido desoxirribonucleico (ADN) y la acetilación de histonas. (Yamazaki y cols., 2003; Sgodda y cols., 2007).

En su condición de células inmunoprivilegiadas se ha propuesto la utilización de MSC-TA, en alo- y xeno-trasplante. Sin embargo, se ha demostrado que estas células aún poseen capacidad para inducir respuesta inmunitaria en el receptor y por lo tanto, su longevidad y capacidad funcional podrían reducirse por la agresión inmunológica. Así, los xenotrasplantes de las células madre mesenquimales son rechazados, ya que inducen una respuesta inmune mediada por linfocitos T. (Fibbe y cols., 2007). Esta respuesta mediada por la inmunidad adquirida obliga, por lo tanto, al empleo de terapia inmunosupresora cuando se realiza este tipo de trasplante. La inmunogenicidad de las células madre derivadas de tejidos del adulto, se reduce mediante su encapsulamiento. (Goren y cols., 2010; Meier y cols., 2014).

Las células madre mesenquimales diferenciadas a hepatocitos, se considera que realizan las funciones propias de su especialización, esto es, se deposita en ellas glucógeno, se detoxifica el amonio mediante la síntesis de urea, captan lipoproteínas de baja densidad (LDL) y tienen la actividad metabólica de citocromo P450. (Wu y cols., 2012), así como aumentan la

## INTRODUCCION

---

expresión de múltiples proteínas mitocondriales, con un concomitante incremento de la actividad oxidativa. (Wanet y cols., 2014). Sin embargo, una alternativa al trasplante de MSC-AT diferenciados a hepatocitos, para el tratamiento de enfermedades metabólicas, lo constituye el trasplante de hepatocitos. Así, en ratones con colestasis intrahepática, el trasplante de hepatocitos por vía portal, permite la corrección metabólica que induce esta enfermedad. (Boudechiche y cols., 2014).

MSC-TA diferenciadas hepatocitos, se han trasplantado, por vía sistémica a través de la vena de la cola, demostrándose que reduce la inflamación y la apoptosis, así como favorece la proliferación de hepatocitos en la fibrosis hepática por CCl<sub>4</sub>. (Yin y cols., 2014). En este sentido, incluso el trasplante sistémico de células madre mesenquimales ha demostrado su eficacia en el tratamiento de la insuficiencia hepática aguda y crónica experimental. (Ma y cols., 2014; Pascual-Miguelañez y cols., 2014). Para favorecer la llegada de estas células trasplantadas al parénquima hepático lesionado, se considera que es importante utilizar el factor quimiotáctico propio de la respuesta inflamatoria. (Marra y cols., 2014). Así, en el tejido inflamado se encuentran elevadas concentraciones de SDF-1-alfa (stromal derived factor), una quimioquina fundamental para dirigir la migración de las células que expresan el receptor CXCR4. (Bleul y cols., 1996) y que por lo tanto, es capaz de atraer hacia el foco inflamatorio, tanto células madre hematopoyéticas, como leucocitos o células madre mesenquimales. (Yang y cols., 2015). Así, se ha demostrado que la modificación genética de las células madre mesenquimales, modificando la expresión CXCR4, consigue que su trasplante mejore la colonización hepática tras su administración intravenosa y por lo tanto, consigue mayor eficacia en el tratamiento de la insuficiencia hepática crónica producida por CCl<sub>4</sub>. (Ma y cols., 2014).

Sin embargo, el trasplante sistémico de células madre mesenquimales en la insuficiencia hepática aguda experimental, no solo ejerce efectos beneficiosos en el hígado inflamado, sino también sistémicamente. (Zhu y cols., 2013). Aunque las células madre trasplantadas se alojan en el hígado, se ha sugerido que además del efecto paracrino hepático, las células madre mesenquimales también podrían ejercer una acción inmunosupresora sistémica, mediante la producción y liberación de factores tróficos e inmunomoduladores. (Parekkadan y cols., 2007). Las células mesenquimales madre no suelen diferenciarse en hepatocitos, por lo que su acción beneficiosa se atribuye a los factores

## INTRODUCCION

---

hepatoprotectores que producen IL-6, que induce la expresión de FGL-1 (Fibroblast-like-protein 1 gene), un estimulante de la regeneración hepática. (Kovalovich y cols., 2001) y que además, protege contra la muerte celular mediada por Fas, ya que incrementa la expresión de proteínas hepáticas antiapoptóticas. (Bansal y cols., 2005). Por lo tanto, en la insuficiencia hepática aguda, el tratamiento con células madre mesenquimales, poseería una acción beneficiosa, tanto hepática, favoreciendo la regeneración, como sistémica, mediante la secreción de mediadores antiinflamatorios. (Van y cols., 2008).

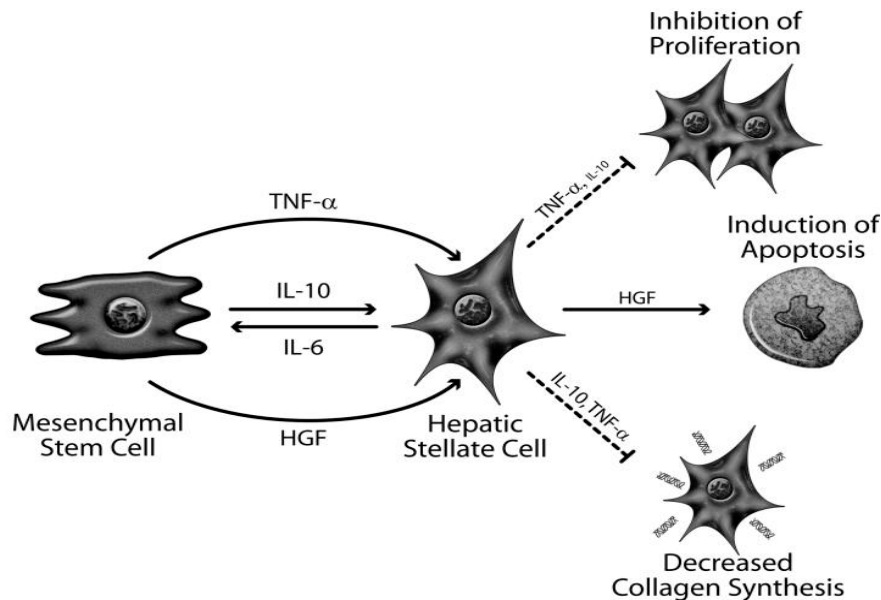
Otro factor que se debe considerar en el trasplante de células madre mesenquimales en la insuficiencia hepática aguda, es el estadio evolutivo de dicha patología. Así, en la fase en la que se produce la máxima agresión hepática, es posible que estas células se transformen en miofibroblastos en vez de hepatocitos. Por el contrario, en fases evolutivas más avanzadas existiría una predisposición a su transformación en hepatocitos. (Meier y cols., 2013).

En la insuficiencia hepática crónica experimental, ya producida por tetracloruro de carbón, tioacetamida o colestasis extrahepática, el tratamiento con células madre mesenquimales ha demostrado que favorece la regeneración hepática. (Sun y cols., 2013; Ahmed y cols., 2014; Motawi y cols., 2014;). Las células madre mesenquimales isotrasplantadas por vía intravenosa en ratones cirróticos, se alojan en los hígados con fibrosis inducida por CCl<sub>4</sub> y reducen la fibrosis, así como favorecen la regeneración hepática. Sin embargo, este efecto beneficioso tan solo se logra, si el trasplante se efectúa inmediatamente tras la exposición a CCl<sub>4</sub>, pero no, si se retrasa a la primera semana tras la inducción de fibrosis. (Fang y cols., 2004). Así mismo, también influyen las condiciones ambientales en las que se cultivan las células madre mesenquimales. Se ha demostrado, que las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, son más estables cuando se cultivan en hipoxia, puesto que es un ambiente similar al que proceden. Incluso en condiciones de cultivo hipóxico, estas células poseen mayor capacidad para ejercer efectos terapéuticos (Feng y cols., 2014).

Entre los mecanismos antifibrogénicos de las células madre mesenquimales, destaca su acción paracrina en las células estrelladas. (Day y cols., 2009). Las células mesenquimales causan la apoptosis de las células estrelladas hepáticas, mediante la producción de factor de crecimiento hepatocitario (HGF) y factor de crecimiento nervioso (NFG), así como también reducen su función de síntesis de colágeno I e inhiben su proliferación (Figura

## INTRODUCCION

14) (Parekkadan y cols., 2007). Esta acción antifibrótica hepática de las células madre mesenquimales, se puede potenciar mediante manipulación genética. Así, MSC-AT, con capacidad para incrementar la expresión HGF, reducen la fibrosis post-radiación hepática en la rata. (Zhang y cols., 2014).



**Figura 14. Un modelo esquemático de los efectos paracrinos de factores activados derivados de las células madre mesenquimales.** La liberación de IL-6 por las células estrelladas activadas conduce a la secreción de IL-10 por MSCs que induce la secreción de TNF- $\alpha$  por las células estrelladas y esta a su vez, inhibe la proliferación SC y la síntesis de colágeno. El efecto marginal de IL-10 en la proliferación de las células estrelladas se denota poco. Las células estrelladas se someten a la apoptosis después del cultivo con células madre mesenquimales debido al aumento de los niveles de HGF. (Parekkadan y cols., *Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun.* 2007).

En animales con fibrosis hepática, se ha demostrado que las células madre mesenquimales inyectadas por vía portal, aumentan la expresión hepática de VEGF, HGF, IL-10 y MMP-9, se diferencian en hepatocitos y además, favorecen la regeneración hepática. (Li y cols., 2013).

En la insuficiencia hepática crónica experimental, el trasplante de hepatocitos, ha demostrado recientemente, que es más eficaz en la producción de regeneración hepática, que las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea y las células de hígado fetal. Este efecto beneficioso, se atribuye a que sus efectos son principalmente metabólicos y no antiinflamatorios. (Sun y cols., 2014). El trasplante de hepatocitos ha tenido la limitación impuesta por la imposibilidad de obtener un número apropiado de células, mediante el cultivo de

## INTRODUCCION

---

células madre hepáticas para conseguir un resultado beneficioso. Sin embargo, en la actualidad es posible utilizar células madre hepáticas inducidas (i Hep.SCs). (Yu y cols., 2013), lo que facilita ampliar su número mediante cultivo "in vitro". También las células fetales hepáticas poseen células progenitoras hepáticas, que favorecen la regeneración hepática (Alison y cols., 2007).

El trasplante de células madre mesenquimales ha demostrado ser más eficaz, cuando se realiza por inoculación directa en el parénquima hepático lesionado. Por inyección intrahepática, se han xenotrasplantado MSC-AT humanas en el ratón y se ha demostrado su persistencia, así como su acción antioxidante en la fibrosis hepática. (Francois y cols., 2013; Ayatollahi y cols., 2014) Las células trasplantadas expresan citoqueratina (CK18 y CK19), así como proteínas de fase aguda, NGF, HGF y moléculas antiinflamatorias, como IL-10 y receptor soluble de IL-1 (IL-1 RA) (Francois y cols., 2013), así como incrementan las concentraciones del antioxidante glutatión (Ayatollahi y cols., 2014), por lo que reducen la apoptosis e incrementan la proliferación de hepatocitos, consiguiendo corregir la disfunción hepática. (Francois y cols., 2013).

Aunque la administración de células madre mesenquimales por vía intraesplénica, no se considera tan eficaz como la intrahepática, se ha demostrado en un modelo de esteatosis hepática en el ratón, que el xenotrasplante de células madre mesenquimales prediferenciadas a hepatocitos por vía esplénica, favorece la regeneración posthepatectomía parcial, localizándose la células trasplantadas en los espacios periportales. (Winkler y cols., 2014).

Para facilitar el trasplante de las células madre mesenquimales, ya derivadas, de médula ósea, cordón umbilical, amnios o tejido graso, es aconsejable que no exista barrera inmunológica, que impida o reduzca su implantación en los tejidos lesionados. Ya que estas células tienen capacidad para expresar antígenos de histocompatibilidad, cuando se realiza alotrasplante o xenotrasplante, es conveniente la inmunosupresión asociada, para evitar su rechazo. (Volarevic y cols., 2014).

Aunque no se han descrito casos de malignización de las células madre mesenquimales trasplantadas, se debe considerar que existe dicho riesgo, puesto que inciden varios factores predisponentes, como son la inestabilidad genómica, la significativa aneuploidia, la delección telomérica y la inhibición o

## *INTRODUCCION*

---

silenciamiento de genes que participan en la reparación de DNA. (Volarevic y cols., 2014).

En la actualidad, también se ha desarrollado un amplio campo de investigación en la consecución de órganos y tejidos a expensas de células madre mesenquimatosas indiferenciadas o diferenciadas incluidas en estructuras, ya de material orgánico o inorgánico. La ingeniería tisular persigue la obtención de estructuras que permitan la proliferación y la diferenciación celular, para lo cual se precisará un adecuado suministro de nutrientes y oxígeno para las células trasplantadas. (Cohon, 1995; Gunatillake y cols, 2003; Hosseinkhani y cols., 2014).

En modelos experimentales en animales pequeños, se investiga la aplicación de órganos bio-artificiales, utilizando métodos de descelularización y recelularización, en pulmón, corazón, riñón e hígado. (Kadota y cols., 2014). Ya que aún se desconocen los mecanismos moleculares que rigen la función de las células madre mesenquimales, se precisa investigación adicional para trasladar los resultados conseguidos en experimentación animal a la clínica humana. Sin embargo, se considera, que será preciso asociar a los hepatocitos células madre para lograr su supervivencia a largo plazo, cuando estos órganos neoformados sean trasplantados.



## ***II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***



## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### Hipótesis

La técnica microquirúrgica es aplicable a la cirugía experimental. En particular, ha sido utilizada para la obtención de diversos modelos experimentales de insuficiencia hepática en la rata. Por esta razón, ha sido elegida para la puesta a punto de un modelo experimental de insuficiencia hepática colestásica. En esencia, la producción de colestasis extrahepática en la rata, utilizando una técnica microquirúrgica, se fundamenta en la resección de la vía biliar extrahepática y permite el estudio evolutivo a largo plazo de las complicaciones que comporta ésta patología, tanto hepática como extrahepática.

Las alteraciones hepáticas secundarias a colestasis extrahepática en la rata consisten fundamentalmente en la instauración de un proceso inflamatorio, que a su vez está implicado en la producción de proliferación biliar y fibrosis. El grado de insuficiencia hepática que causa la colestasis induce la muerte del animal a corto plazo por infección y/o hemorragia, si no se realiza su profilaxis. Por el contrario, evitar estas complicaciones que se producen precozmente permite conseguir un modelo de insuficiencia hepática crónica por fibrosis biliar en la rata.

La fibrosis secundaria a colestasis en la rata, aunque tiene su origen en la respuesta inflamatoria hepática, no revierte mediante los múltiples tratamientos anti-inflamatorios ensayados hasta la actualidad, que han demostrado ser ineficaces. Así mismo, se debe considerar que la fibrosis es el estadio previo a la cirrosis hepática en la clínica humana, cuyo único tratamiento efectivo es el trasplante de hígado. Por lo tanto, todos los estudios dirigidos a evitar la evolución cirrótica de la patología inflamatoria hepática constituyen un objetivo fundamental en la actualidad para conseguir reducir la elevada morbi-mortalidad que comporta ésta frecuente patología en el ser humano.

En particular, en el presente trabajo experimental se ha ensayado el tratamiento de la patología hepática colestásica realizando tanto Xenotrasplantes de células madre mesenquimales adipocíticas humanas como, Isotrasplantes de madre mesenquimales adipocíticas de ratas singénicas, ya que se ha demostrado que estas células pluripotenciales, son capaces de diferenciarse en hepatocitos y, además poseen una gran actividad anti-inflamatoria e inmunosupresora.

### **Objetivos**

1. Estudiar la evolución a largo plazo de la colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata, así como demostrar la existencia de fibrosis biliar causante de insuficiencia hepática crónica en este modelo experimental.
2. Obtener células madre mesenquimales de origen adipocítico, tanto del ser humano como de rata, con capacidad para diferenciarse en hepatocitos para ser utilizadas en el tratamiento de la patología hepática colestásica.
3. Demostrar que mediante el tratamiento con células madre mesenquimales adipocíticas prediferenciadas a hepatocitos, tanto humanas como de rata, se reduce la gravedad evolutiva a largo plazo de la patología hepática secundaria a colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata.
4. Investigar si es diferente la efectividad del Xenotrasplante respecto del Isotrasplante hepático de células madre mesenquimales adipocíticas en la disminución de la patología hepática producida por la colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata.

### ***III. MATERIAL Y MÉTODOS***



## III. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. MATERIAL

#### 1. A. ANIMALES

Se han utilizado 155 ratas macho de la cepa Wistar, cuyo peso corporal osciló entre 200 y 400 gramos, procedentes de las instalaciones homologadas para la cría de animales de experimentación de la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Universitario de La Paz, en Madrid. Todos los ejemplares cumplían los requisitos de salud para animales de experimentación recomendados por la *Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)*.

#### 1. B. INSTALACIONES

##### 1. B.1. Animalario

El transporte desde el proveedor se realizó en las condiciones establecidas en la normativa vigente sobre comercio, sanidad y bienestar animal, es decir en un medio adecuado y en contenedores homologados.

La estabulación se efectuó en una sala acreditada para tal fin en el Animalario de la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Universitario de La Paz. Dicho Animalario es un Centro de Asistencia a la Investigación con registro nº 28079-15 ABC-M en la Dirección General de Agricultura y Alimentación de la Comunidad Autónoma de Madrid que cumple con los requerimientos legislativos relativos a la experimentación animal (R.D. 1201/2005). El Animalario cuenta con instalaciones óptimas homologadas para la cría, mantenimiento y cuarentena de animales de experimentación, así como también con instalaciones propias para la investigación, quirófanos y laboratorios anejos para la manipulación y toma de muestras alojamiento de roedores durante el postoperatorio.

Los animales se mantuvieron en grupos de cuatro dentro de cajas de Plexiglas de 42x65x15 cm (Letica, España) móviles con lecho de viruta (Panlab S.L. Barcelona).

##### 1.B.2 Sala de operaciones

La técnica quirúrgica en la que se fundamenta el modelo experimental utilizado se realizó en la Unidad de Microcirugía de la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Universitario de La Paz, en una sala que dispone de:

## MATERIAL Y MÉTODOS

- Refrigerador para conservación de los fármacos anestésicos.
- Mesa de trabajo de 80 x 100 cm.
- Sillas ergonómicas ajustables en altura.
- Microscopio operatorio Carl Zeiss OPMI 1-DFC n° serie 211069.
- Centrífuga refrigerada superspeed Du Pont Instrument (GIRALT Sorval® RC-5B).
- Balanza de precisión para pesado de los animales Jadever LPW- 1260 n° certificado PM-245/04 (Jadever Scale Co.LTD, Taiwan).
- Contenedor desechable de residuos biológicos cortantes y punzantes.
- Vaporizador de flujo continuo para la anestesia inhalatoria, tipo TEC 4 (Ohemeda)
- Fuente de O<sub>2</sub> (suministro centralizado). También disponible en bombona: 10.6 m<sup>3</sup> de O<sub>2</sub> a 200 Kg/cm<sup>2</sup>
- Arcón congelador Koxka a -80 °C.



**Figura 15.** Fotografías del Laboratorio de Cirugía Experimental donde se llevó a cabo la técnica de colestasis microquirúrgica.

### 1. B.3 Sala de evolución postoperatoria

La Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Universitario de la Paz posee instalaciones propias acondicionadas para el mantenimiento y el control de la evolución postoperatoria de las ratas.

### 1. B.4 Sala de sacrificio y procesado de muestras

Esta sala dispone de los siguientes elementos:

- Mesa de trabajo.
- Sillas ergonómicas ajustables en altura.
- Lámpara halógena de brazo con bombilla de 60 W.
- Contenedor hermético con bolsa para residuos biológicos.
- Contenedores desechables de residuos biológicos punzantes.
- Centrífuga.
- Formaldehído al 2%
- Máquina de perfusión de formaldehído Dynamax – Rainin Model RP-1.
- Elementos de protección individual: guantes y gafas.

### 1. B.5 Área de conservación de muestras

Se realizó en un espacio habilitado para ese fin en la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Universitario de la Paz. La misma dispone de un congelador SANYO MDF-U5186S nº de serie 50709226 (SANYO Electric Biomedical Co., Ltd Japan) que conserva las muestras a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 1. B.6 Eliminación de residuos biológicos

Los residuos biológicos se almacenaron en espera de su eliminación en un área especial que dispone de un congelador tipo arcón modelo ZCF320L/2 Zanussi (Electrolux Home Products España, S.A. Madrid).

## 1. C. FÁRMACOS

### 1. C.1 Anestésicos

Isoflurano: concentración de inducción al 3-5%, y de mantenimiento al 1.5-2%.

### 1. C.2 Otros fármacos

- Ceftriaxona sódica (D.C.I), 500 mg. (Ceftriaxona Normon 500 mg FG Lab. Normon S.A. Madrid).
- Fitomenadiona, vit. K<sub>1</sub> ampollas 1ml con 10 mg. (Konakion® Roche Farma S.A. Madrid).
- Prograf (Tacrolimus) concentrado de solución para perfusión 5mg/ml: 0.10 mg/Kg/día
- Buprenorfina (Buprex®).

## *MATERIAL Y MÉTODOS*

---

- Fibrinógeno humano + Trombina humana (Tachosil®), esponja 5,5 mg/2 UI (Lab. NYCOMED PHARMA)

### **1. D. MATERIAL**

#### **1. D.1 Instrumental quirúrgico**

Caja con instrumental de microcirugía, que incluye:

##### 1. D.1.A Pinzas:

- Clamp de paños Backhaus de 13.3 cm (2)
- Disección con dientes de 13cm (1)
- Disección de Adson con dientes de 12cm (1)
- Halsted Mosquito curva sin dientes de 12.7 cm (2)
- Halsted Mosquito recta sin dientes de 12.7 cm (2)
- Pinza de Heiss recta (1)
- Pinza de Heiss curva (1)
- Pinza de microcirugía recta de 10.5 cm. (1)
- Pinza de microcirugía curva de 10,5 cm.(1)

##### 1. D.1.B Porta-agujas Mayo-Hegar de 12,7 cm. (1)

##### 1. D.1.C Tijeras:

- De Metzenbaum curva de 14 cm (1)
- De Mayo recta de 14cm (1)
- Tijera de microcirugía recta de 15 cm. (1)

#### **1. D.2. Material de sutura y ligadura**

- Seda trenzada ligadura 3/0 Silkam®. (B. Braun España).
- Seda negra trenzada ligadura 6/0 Silkam®.(B. Braun España).
- Sutura de Vicryl® (poliglactina 910) aguja curva 3/0. (Ethicon Inc.)
- Sutura de seda negra trenzada aguja curva de 3 /0 Silkam®. (B.Braun España).

#### **1. D.3 Material quirúrgico complementario**

- Paños quirúrgicos.
- Guantes de exploración de látex natural sin polvo. Talla 7 (King™ Amebil S.A. Vizcaya. España)

## *MATERIAL Y MÉTODOS*

---

- Guantes quirúrgicos de látex natural con polvo (estériles). Talla 7 (Medi-Grip® Plus. Ansell Ltd. UK)
- Gasas de 10 x 10cm. (Envase de 10 unidades Texpol® .Manresa. España)
- Torundas de algodón pequeñas montadas (Algodones del Bages, S.A. Barcelona. España)

### **1. D.4. Otros materiales para el procedimiento operatorio y la extracción de muestras**

- Guantes de protección frente a mordedura de animales
- Bloque de plastilina de 10 x 2 x 3 cm
- Jeringas de 10, 5 y 2 ml BD Discardit™ II (Becton Dickinson S.A. Fraga. Huesca. España )
- Agujas de tipo Luer 20G 0,91x25,4 mm (monoject magellan Safety Needle Tyco Healthcare Group LP.USA)
- Agujas de tipo Luer 21G 0,82x38,1 mm (monoject magellan Safety Needle Tyco Healthcare Group LP.USA)
- Agujas de tipo Luer 25G 0,51x15,8 mm (monoject magellan Safety Needle Tyco Healthcare Group LP.USA)
- Hoja de bisturí de acero estériles del nº 11 (Albion Surgical Limited . Sheffield. England)
- Solución Salina isotónica: ClNa, 0.9g/100ml. Envase 10 ml B.Braun
- Contenedor cilíndrico de polietileno para residuos biológicos marca Consenur de 30 litros fabricado según norma DIN-30739.
- Contenedor de polipropileno para residuos biológicos punzantes y cortantes marca Biocompact 1,8 litros ( Sanipick Plastic SA. Madrid)
- Bolsas de plástico de 15 litros para residuos biológicos
- Recipiente de acero inoxidable para transporte de nitrógeno líquido Airliquide GT 2 (Airliquide España)
- Guantes de protección frente frío Midera 10

### **1. D.5. Material de laboratorio**

- Pipetas Pasteur no estériles de 1 ml.
- Micropipetas Jencons automáticas variables de 0.5-10 µl, 5-50 µl, 200-1000 µl (Labssystem) y puntas de pipetas desechables (Labcenter)
- Tubos de centrifuga 10ml (BD Vacutainer™. BD Vacutainer Systems. Plymouth. UK).

- Microtubos para muestras de suero (Eppendorf Ibérica, S.L. Madrid).
- Tubos de polipropileno de 50 ml para muestras de tejido (BD Falcon™ NY USA).

### **1. E. EQUIPOS DE LABORATORIO**

#### **1. E.1 Procesado de muestras**

- Centrífuga angular Nahita modelos 2610 ref. 2610000 OF.
- Balanza analítica de precisión AB 204 Mettler Toledo nº serie:1113043273 (Mettler-Toledo S.A.E. L'Hospitalet de Llobregat Barcelona).

#### **1. E.2 Estudio bioquímico en suero**

Autoanalizador Olympus AU400 nº serie 311267. Olympus Optical España S.A.

#### **1. E.3 Laboratorio de Anatomía Patológica**

El procesado de las muestras histológicas y su posterior estudio microscópico se efectuó en el laboratorio del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de la Paz. Este centro cuenta con:

##### **1. E.3.a. Laboratorio general:**

- Procesador automático de tejidos con vacío.
- Estación de trabajo para inclusión.
- Microtomos motorizados.
- Baños de flotación.
- Microscopios ópticos convencionales.
- Microscopio de fluorescencia.
- Cabina de extracción de gases.

##### **1. E.3.b Laboratorio de análisis de imagen:**

- Microscopio motorizado Leica CTR-5000 con epifluorescencia.
  - Cámara digital Leica DC-300.
  - Cámara digital Leica DC-350F.
  - Software Leica Qwin V3.
  - Impresora HP Photosmart 7960.
- Microscopio Nikon Labophot 2 con epifluorescencia

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

- Cámara de vídeo b/n Hitachi KP-140.
- Cámara de vídeo color Hitachi KP-C50
- Software MIP4 de C.I.D.
- Impresora laser Epson EPL-6100.
- Equipamiento común:
  - Cámara fotográfica digital Nikon Coolpix 950.
  - Videoimpresora Mitsubishi.
  - Videocopiadora Polaroid.
  - Sistema macro para fotografía.

### 1. F. REACTIVOS DE LABORATORIO

#### 1. F.1 Estudios bioquímicos en suero

- **Bilirrubina total y directa:**
  - *Total Bilirubin Olympus System Reagent y Direct Bilirubin Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR 6111 y OSR 6112).
  - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).
- **Aspartato aminotransferasa (AST)**
  - *AST Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6109).
  - *Pyridoxal phosphate liquid (P5P)* (Olympus Irlanda ref. (60106).
  - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).
- **Alanina aminotransferasa (ALT)**
  - *ALT Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. SR6107).
  - *Pyridoxal phosphate liquid (P5P)* (Olympus Irlanda ref. 60106).
  - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).
- **$\gamma$  - glutamiltransferasa (GGT)**
  - *GGT Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6120).
  - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300)
- **Fosfatasa alcalina (FA)**
  - *ALP Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6104).
  - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).
- **Lactato deshidrogenasa (LDH)**
  - *LDH Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6126).
  - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

- **Proteínas totales**
  - *Total proteins Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6103).
  - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).
- **Albúmina**
  - *Albumin Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6102).
  - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).
- **Creatinina**
  - *Creatinin Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6178).
  - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).
- **Urea**
  - *Urea Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6178).
  - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).

### 1. F.2. Laboratorio de Ingeniería Celular:

- Medio de expansión DMEM high glucose+ 10% FBS, más 1% P/S, Na-piruvato, glutamina
- Medio de expansión: 60% DMEM-LowGlucose (Gibco); 40%MCDB-201 (Sigma); 1% ITS (Gibco);  $10^{-9}$  M dexametasona (Sigma);  $10^{-4}$  M ácido ascórbico 2 fosfato (Fluka); 10 ng/ml rhEGF (R&D); 5% FBS (Gibco); 1% Pen/Strep (Gibco); 0.6% Glutamina (Gibco)
- Medio de diferenciación celular: Igual que el de expansión pero sin FBS y con 10ng/ml de rhHGF (Gibco) + 10 ng/ml de rhOSM (Sigma)
- Suero bovino fetal (FBS)
- Solución salina *Hanks balanced SALT solution*, HBSS, (Invitrogen)

### 1. F.3. Estudio histopatológico

- **Fijación**
  - Formol tamponado al 10%
- **Inclusión**
  - Agua destilada
  - Alcohol etílico (70°,96°,100°)
  - Xilol
  - Parafina

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

- **Tinción de Hematoxilina-Eosina:**
  - Hematoxilina de Harris.....0,5g.
  - Eosina ..... 1g.
  - Agua destilada .....100ml
  
- **Tinción con Rojo Picrosirio: Solución rojo sirio-ácido pícrico:**
  - Rojo sirio F3BA al 1%.....10 ml
  - Solución acuosa saturada de ácido pícrico...90 ml
  
- **Tinción con Tricrómico de Masson: Reactivos**
  - Solución de hematoxilina férrica de Weigert.
  - Solución de escarlata de Biebrich – fucsina ácida:
    - 90 cc de escarlata de Biebrich al 1% en agua destilada.
    - 9 cc de fucsina ácida al 1% en solución acuosa.
    - 1 cc de ácido acético glacial.
  - Solución acuosa de ácido fosfomolibdico (se utiliza ácido fosfotúngstico en la misma proporción, si se va a teñir con verde luz):
    - 5 g de ácido fosfomolibdico.
    - 200 cc de agua destilada.
  - Solución de azul de anilina:
    - 2,5 g de azul de anilina.
    - 2 cc de ácido acético glacial.
    - 98 cc de agua destilada.
  - Solución de verde luz al 2% (alternativa al azul):
    - 2 g de verde luz SF amarillento.
    - 99 cc de agua destilada.
    - 1 cc de ácido acético glacial.
  
  - Solución diferenciadora: solución acuosa de ácido acético glacial al 1%.

## 2. MÉTODOS

### 2.A. CONDICIONES DE UTILIZACIÓN Y ESTABULACIÓN DE LOS ANIMALES

La estabulación de las ratas durante el tiempo en el que se ha realizado la parte experimental del presente trabajo se realizó de acuerdo con la

legislación vigente en nuestro país sobre el cuidado y la utilización de animales de laboratorio, por la cual España adopta la normativa de la Unión Europea de 1996 sobre el uso de animales con fines científicos. Se incorporó a nuestro ordenamiento legal con fecha de 4 de Agosto de 1986 en el *Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos*. (BOE 252; 21-10-2005). (Aller y cols., 2009a).

Los animales se mantuvieron a una temperatura de  $20 \pm 2$  °C, y con una humedad relativa del  $65 \pm 10$  %. Las condiciones de luz/oscuridad fueron cíclicas, estableciéndose períodos alternos de 12 horas (8:00-20:00h/20:00-8:00h). Los animales se mantuvieron en grupos de 2, en cajas homologadas (Plexiglas de 42x65x15 cm; Letica, España) móviles con lecho de viruta (Panlab S.L. Barcelona). Dichas cajas fueron etiquetadas, consignándose en éstas últimas los datos de identificación de cada animal, y se colocaron en estanterías. Todos los animales fueron alimentados con una dieta estándar para roedores de laboratorio (rata /ratón dieta de mantenimiento A04. Panlab: España) y agua *ad libitum*. (Aller y cols., 2009a).

### 2. B. DISEÑO EXPERIMENTAL

El modelo de colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata se ha estudiado en 4 grupos: un primer grupo estaba constituido por animales con colestasis, pero sin tratamiento, y otros 3 grupos integrados por ratas que se diferenciaban entre sí en función del tipo de células madre que se les administraron para el tratamiento de la fibrosis biliar y de la insuficiencia hepática secundarias a la colestasis:

1. Células madre mesenquimales de origen adipocítico de rata indiferenciadas
2. Células madre mesenquimales de origen adipocítico humana prediferenciadas en células progenitoras hepatocitarias;
3. Células madre mesenquimales de origen adipocítico de rata prediferenciadas en células progenitoras hepatocitarias.

Las células madre del segundo grupo fueron obtenidas de tejido adiposo procedente de lipoaspirado de pacientes intervenidos en el Hospital de La Paz. En estas, la inyección se realizó en los lóbulos hepáticos medio, lateral derecho

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

y lateral izquierdo (LM, LD y LI). Por el contrario, en el último grupo, las células madre mesénquimales fueron obtenidas del tejido adiposo de ratas singénicas, es decir, de la misma cepa que las utilizadas para este estudio (Wistar), procedentes del animalario de la Unidad de Investigación del Hospital de La Paz. En estos animales colestásicos, la inyección de las células madre se realizó en el lóbulo medio hepático (LM).

De esta forma, las ratas fueron agrupadas aleatoriamente para su estudio en los siguientes grupos:

- **Serie I** (n=40): ratas control:
  - Grupo 1 (n=20): ratas pseudo-operadas (SO). Grupo 2 (n=20): ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica e inyección intrahepática de solución salina isotónica (0.9%) (CM-S)
  - Grupo 2 (n=20): ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica e inyección intrahepática de solución salina isotónica (0.9%) (CM-S)
  
- **Serie II** (n=47): Colestasis microquirúrgica e inyección de células mesenquimales de origen adipocítico, obtenidas de ratas singénicas y no diferenciadas .(CCRND)-Colestasis Células Rata No Diferenciadas
  
- **Serie III** (n=38): Colestasis microquirúrgica e inyección de células mesenquimales de origen adipocítico humanas que fueron prediferenciadas a hepatocitos en el Laboratorio de Ingeniería Celular previa a su administración intrahepática. (CCHP)-Colestasis Células Humanas Prediferenciadas
  
- **Serie IV** (n=30): Colestasis microquirúrgica e inyección de células mesenquimales de origen adipocítico, obtenidas de ratas singénicas que fueron prediferenciadas a hepatocitos previa a su administración intrahepática (CCRP)-Colestasis Células Rata Prediferenciadas

**Tabla 2:** *Diseño experimental de los Grupos de ratas utilizadas en éste trabajo*

## MATERIAL Y MÉTODOS

<b>SERIE I</b>	<b>GRUPO 1 SO</b>	n=20	Seudo-operadas
	<b>GRUPO 2 CM-S</b>	n=20	Colestasis microquirúrgica e inyección intrahepática de solución salina isotónica
<b>SERIE II</b>	<b>CCRND</b>	n=47	Colestasis microquirúrgica e inyección intrahepática de células adipocíticas de rata no diferenciadas
<b>SERIE III</b>	<b>CCHP</b>	n=38	Colestasis microquirúrgica e inyección intrahepática de células adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos
<b>SERIE IV</b>	<b>CCRP</b>	n=30	Colestasis microquirúrgica e inyección intrahepática de células adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos

### 2. C. TÉCNICA ANESTÉSICA

El principal objetivo de la anestesia cuando se utilizan animales de laboratorio es de carácter ético y consiste en evitarles el dolor y el sufrimiento innecesarios. Independientemente del método anestésico elegido por cada grupo de Investigación, éste debe conseguir suficiente relajación muscular para que la cirugía pueda ser realizada fácilmente, debe bloquear la actividad refleja para impedir la activación del Sistema Nervioso Autónomo y, por lo tanto alteraciones de la frecuencia y del ritmo cardíaco y, lo más importante, la técnica anestésica debe procurar un grado suficiente de pérdida de conciencia por hipnosis que, unido a la analgesia, impida que el animal sufra dolor. En definitiva, el objetivo fundamental de la anestesia es causar a los animales de experimentación el mínimo distrés físico y psicológico asociado a la cirugía experimental (Aller y cols., 2009a).

Entre los múltiples métodos de anestesia descritos en la rata los fundamentales son los que utilizan la vía inhalatoria o la parenteral. En este estudio, la anestesia se administró por vía inhalatoria utilizando Isoflurano, con una concentración de inducción al 3-5%, y de mantenimiento al 1.5-2%, administrada a través de un vaporizador de flujo continuo para la anestesia inhalatoria, tipo TEC 4 (Ohemeda), conectada a una fuente de O<sub>2</sub>. Esta pauta

## MATERIAL Y MÉTODOS

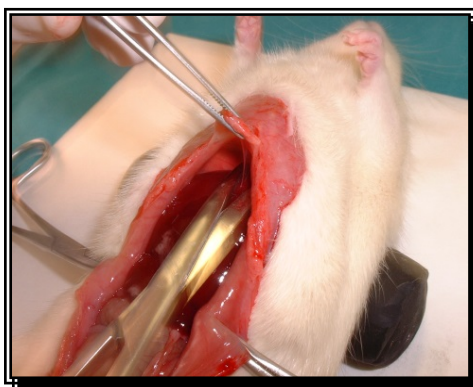
---

proporciona un plano anestésico quirúrgico y adecuada relajación muscular durante el tiempo que dura la intervención. Una vez finalizado el tiempo quirúrgico la recuperación espontánea de la conciencia se produce habitualmente entre los 5 y 10 minutos. Por la sensibilidad de los pequeños roedores a la hipotermia (Rodríguez, 1999), durante el postoperatorio inmediato se colocó a las ratas en un ambiente cálido suministrado por una manta eléctrica (Aller y cols., 2009a).

### 2. D. TÉCNICA QUIRÚRGICA

#### 2. D.1. SEUDO-OPERACIÓN

Con la rata en decúbito supino se realiza una laparotomía media xifopubiana, las asas intestinales se cubren con una gasa humedecida en solución salina isotónica (0.9%) a temperatura corporal, y son desplazadas hacia el lado izquierdo del animal. A continuación y, tras colocar un bloque de plastilina en la zona dorso lumbar, se secciona el ligamento falciforme, situado entre los lóbulos hepáticos lateral izquierdo y caudado, y posteriormente los ligamentos triangulares izquierdo y derecho (Figura 16).



**Figura 16.** Laparotomía media y sección del ligamento falciforme

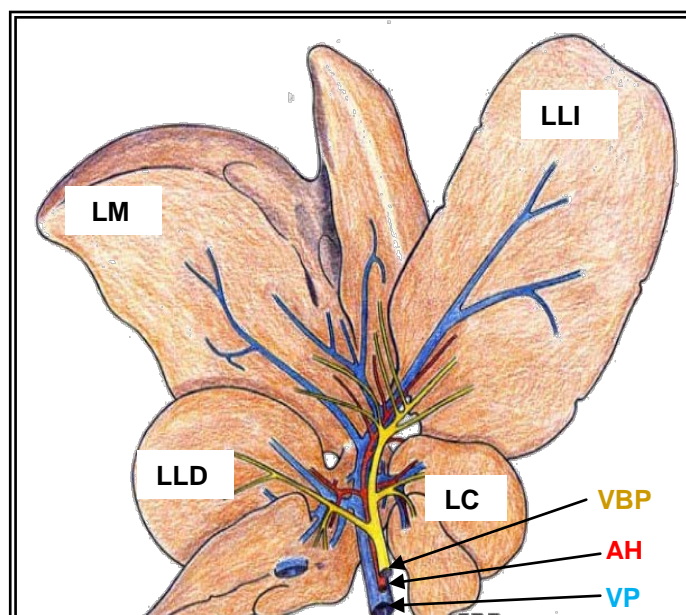
Las maniobras anteriores permiten una exposición adecuada del hilio hepático y la tracción ligera del duodeno hacia el lado izquierdo permite visualizar la vía biliar, que es la estructura hiliar más superficial en la rata (Lorente y cols., 2000). Tras disecar el colédoco, se introduce el intestino en la cavidad peritoneal, y la pared abdominal se cierra en dos planos: peritoneo, músculo y aponeurosis mediante sutura continua reabsorbible Vycril<sup>®</sup>

## MATERIAL Y MÉTODOS

(polyglactin 910) de 3/0, y piel con sutura continua de seda de 3/0. (Lorente y cols. 2000).

### 2. D.2. COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA MICROQUIRÚRGICA

El parénquima hepático en la rata está constituido por cuatro lóbulos: lateral derecho (LLD), medio (LM), lateral izquierdo (LLI) y caudado (LC) y cada uno de ellos posee una vascularización portal y arterial y un drenaje venoso y biliar independientes (Figura 17) (Aller y cols., 2008; Lorente y cols., 2009). Esta característica anatómica permite reseccionar los conductos biliares que drenan cada lóbulo hepático en continuidad con el colédoco mediante la utilización de una técnica microquirúrgica (Aller y cols., 1993a; Aller y cols., 2009b).

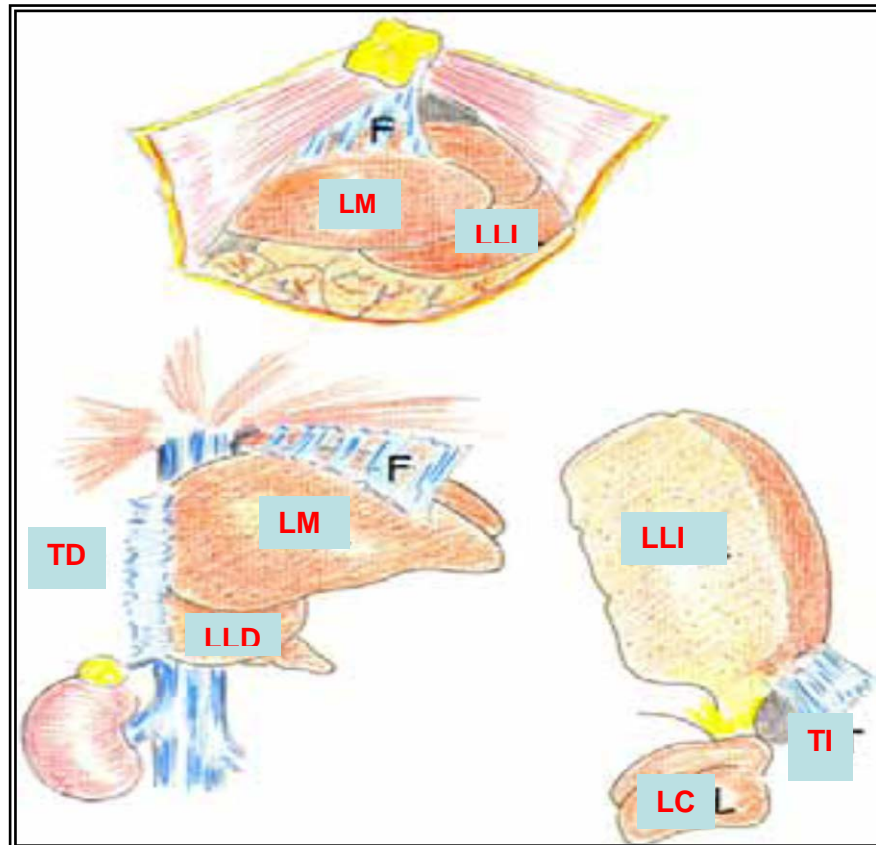


**Figura 17. Representación del hígado de la rata dividido en cuatro lóbulos:** medio (LM), lateral izquierdo (LLI), lateral derecho (LLD) y caudado (LC). En el hilio se puede apreciar la relación entre las ramas portales, arteriales y biliares, así como la ausencia de vesícula biliar. VBP, vía biliar principal, AH, arteria hepática, VP, vena porta

Tras administrar anestesia inhalatoria con Isoflurano, y con el animal en decúbito supino, se realizó una laparotomía media xifopubiana y se seccionó el ligamento falciforme. A continuación se extrajeron las asas intestinales, desplazándolas hacia el lado izquierdo del animal y se protegieron con una gasa humedecida en solución salina isotónica (0.9%) a temperatura corporal. Después de colocar un bloque de plastilina en la zona dorso-lumbar los lóbulos hepáticos superiores se evirtieron sobre el tórax y también se cubrieron con una gasa

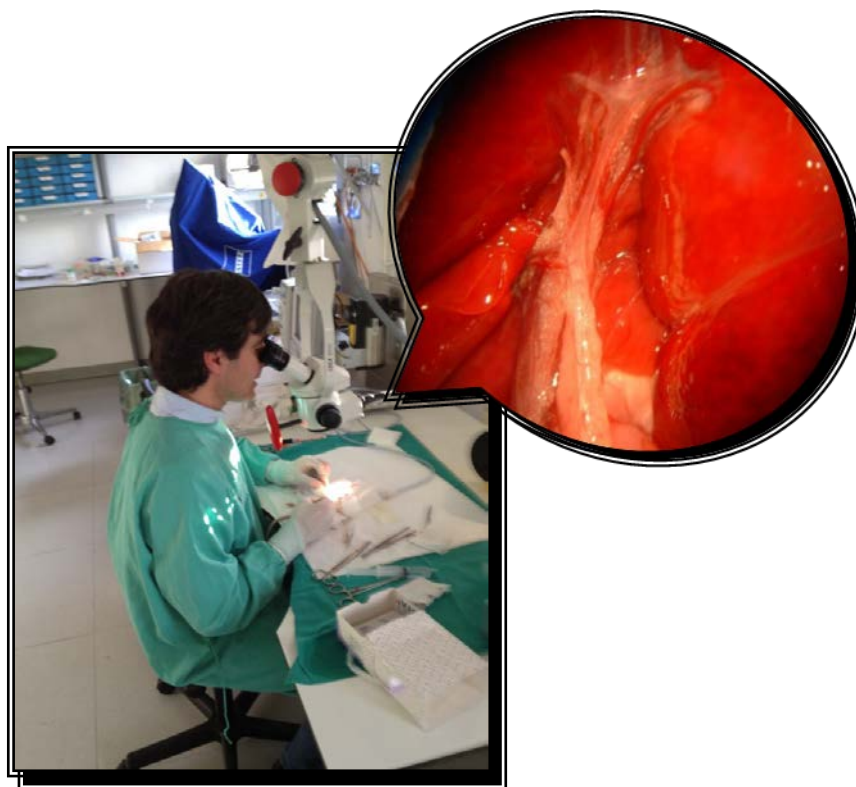
## MATERIAL Y MÉTODOS

empapada en suero salino. Estas maniobras permitieron una correcta exposición de la totalidad de la vía biliar extrahepática. A continuación se seccionan el ligamento falciforme (situado entre el LLI y el LC), y posteriormente los ligamentos triangulares izquierdo y derecho (Figura 18).



**Figura 18. Ligamentos principales del hígado de la rata.** *F: Ligamento falciforme; TD: Ligamento triangular derecho; TI: Ligamento triangular izquierdo; LM: Lóbulo medio; LLI: Lóbulo lateral izquierdo; LMD: Lóbulo medio derecho; LMI: Lóbulo medio izquierdo; LLD: Lóbulo lateral derecho; LC: Lóbulo caudado*

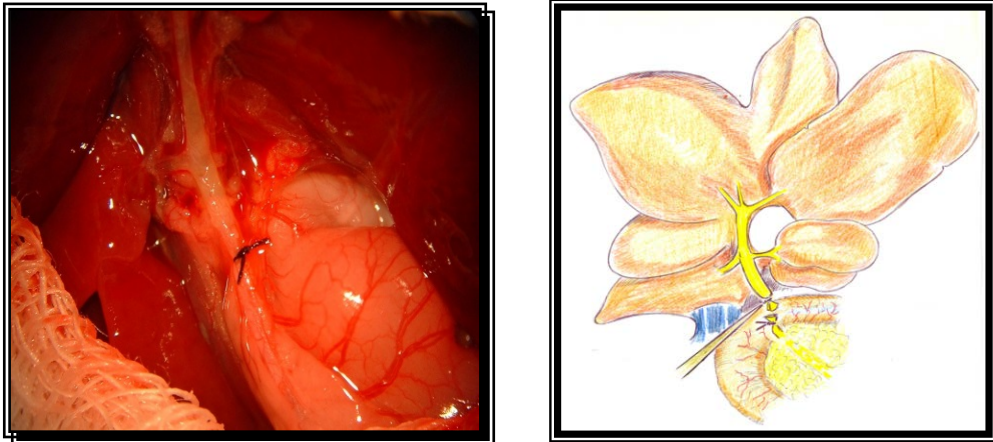
Para las siguientes fases de la intervención es necesario utilizar un microscopio operatorio binocular como medio de magnificación (Aller y Arias, 2009), ya que la disección y sección de los conductos biliares de los cuatro lóbulos hepáticos debe ser realizada sin lesionar la vascularización portal o arterial de estos lóbulos (Figura 19).



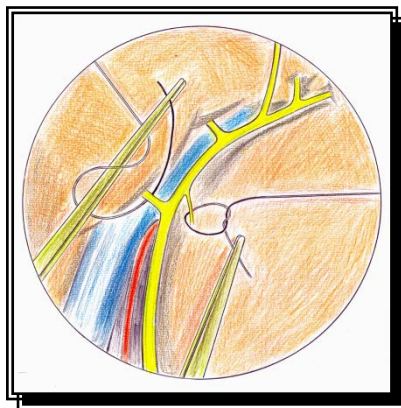
**Figura 19.** A la izquierda: fotografía en la que se observa al cirujano realizando la técnica microquirúrgica utilizando como medio e magnificación un microscopio operatorio. A la derecha: imagen percibida con el microscopio de la vía biliar extrahepática, que es anterior respecto de la arteria hepática y sus ramas lobulares, siendo a su vez la vena porta y sus ramas subyacentes a la arteria hepática

La tracción del duodeno hacia la izquierda del animal permite visualizar el colédoco, que se liga con Seda negra trenzada 6/0 Silkam®.(B. Braun España) y se secciona proximalmente al inicio de su porción intrapancreática (Figura 20). Esta maniobra, al producir dilatación de la vía biliar extrahepática, facilita la identificación y posterior disección del colédoco y de los conductos biliares procedentes de los cuatro lóbulos hepáticos que constituyen el hígado de la rata.

El colédoco, una vez seccionado, se desplaza proximalmente y se disecciona hasta el origen de los conductos biliares propios del LLD y del LC. Después de diseccionar el conducto biliar del LC y de identificar la rama de la arteria hepática de este lóbulo, se liga el conducto biliar lo más próximo posible de su salida del parénquima hepático. La disección, ligadura del conducto biliar del LLD se realiza de igual forma (Figura 21).



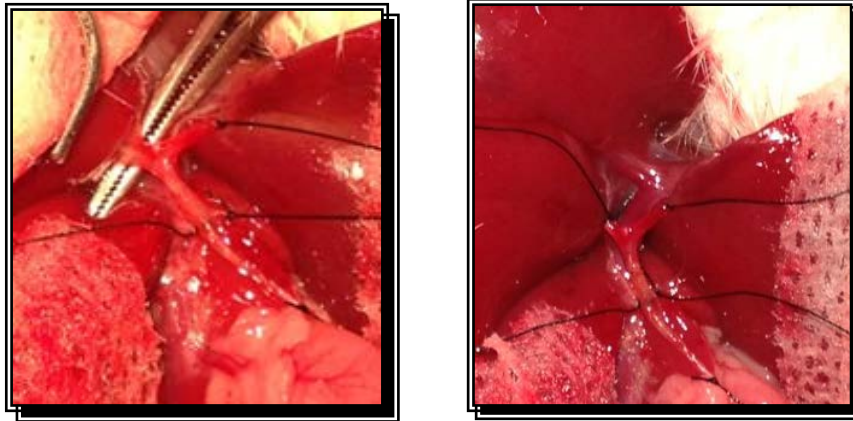
**Figura 20.** *A la izquierda:* Ligadura del colédoco previa al inicio de su porción intrapancreática, lo cual produce dilatación de la vía biliar extrahepática. *A la derecha:* Ligadura y sección del colédoco proximal al inicio de su porción intrapancreática..



**Figura 21.** *Ligadura del conducto biliar procedente del lóbulo caudado (derecha) e inicio de la ligadura del conducto biliar del lóbulo lateral derecho (izquierda).*

Se continúa la disección del colédoco en sentido craneal, liberándolo del tejido graso y de las adherencias peritoneales, e individualizándolo de la arteria hepática, y de la vena porta hasta los conductos biliares procedentes del lóbulo medio (LM) (Figura 22) Estos últimos se disecan independientemente. Por último, se disecciona, se secciona el conducto biliar del LLI y se secciona la vía biliar (Aller y cols., 1993a; Aller y cols.,2009b) (Figura 23).

## MATERIAL Y MÉTODOS

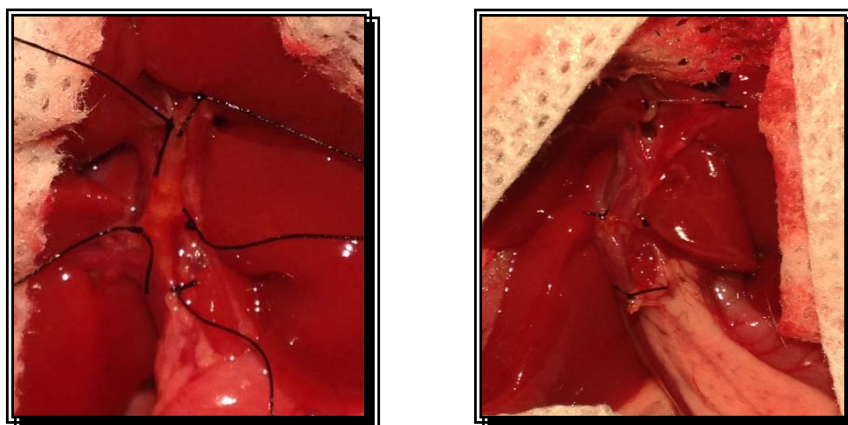


**Figura 22.** *A la izquierda:* Disección del conducto biliar procedente del lóbulo hepático medio (LM) previa a su ligadura. Los conductos biliares de los lóbulos derecho, caudado y lateral izquierdo ya ligados. *A la derecha:* ligadura de los conductos biliares que drenan los cuatro lóbulos hepáticos de la rata.



**Figura 23.** *Imagen de la vía biliar extrahepática y de sus ramas lobulares una vez resecada con una técnica microquirúrgica*

Previo comprobación de la integridad de la vascularización portal y arterial de los lóbulos hepáticos, así como de la inexistencia de hemorragia procedente de alguna lesión inadvertida del parénquima hepático (Figura 24), se reintegran las asas intestinales al interior de la cavidad abdominal y se administran por vía intraperitoneal 1,5 ml de solución salina isotónica (0.9%) o fisiológico para compensar las pérdidas hídricas producidas por la apertura de la cavidad abdominal durante la intervención quirúrgica. Por último, se procede al cierre del plano peritoneo-músculo-aponeurótico con sutura continua reabsorbible Vycril<sup>®</sup> (polyglactin 910) de 3/0, y de la piel con sutura continua de seda de 3/0.



**Figura 24. A la izquierda:** Aspecto del hilio hepático una vez finalizada la exéresis de la vía biliar principal, con las ligaduras correspondientes de los conductos biliares que drenan los cuatro lóbulos que constituyen el hígado de la rata. **A la derecha:** Sección de las ligaduras a ras del parénquima hepático con el objeto de dejar la menor cantidad posible de vía biliar extrahepática. Se comprueba la indemnidad de la arteria hepática y de la vena porta, así como de sus ramas lobulares

### 2. E. MANTENIMIENTO Y TRATAMIENTO POSTOPERATORIO

Una vez finalizada la intervención las ratas se colocaron en su caja de policarbonato (42 x 65 x 15 cm, Letica. España) sobre un lecho de viruta especial para roedores de laboratorio (Panlab) que permite su estabulación en un medio limpio y seco, con luz poco intensa y en un ambiente tranquilo hasta que se recuperan de la anestesia. Debido a la especial sensibilidad de los pequeños roedores a la hipotermia (Rodríguez, 1999; Aller y cols., 2009a), la prevención de la hipotermia postoperatoria es de fundamental importancia. Por ello, inmediatamente después de la intervención el animal se colocó cerca de una fuente de calor (una lámpara) sobre una manta eléctrica para mantener la temperatura corporal en el rango aconsejado para las ratas adultas (25-30°C) (Waynforth y Flecknell, 2004).

Además en los roedores, es importante controlar la respiración durante el postoperatorio inmediato ya que es común la depresión respiratoria durante este periodo. Esta complicación es especialmente peligrosa ya que suele pasar inadvertida hasta que los animales sufren hipoxia e hipercapnia.

Durante una intervención quirúrgica, en particular si como en éste modelo experimental se realiza una laparotomía, se pierden abundantes flúidos por evaporación, lo cual se agrava ya que las ratas generalmente son incapaces de

ingerir líquidos durante las primeras 12-24 horas del p.o. Por tanto, se deben aportar aproximadamente 40-80ml/kg/24h preferiblemente por vía oral si el animal ha recuperado la conciencia. En caso de que no se hayan recuperado del íleo paralítico se administra una solución salina-dextrosa (4% dextrosa, 0.18% salino) o salina (0.9%) por vía intraperitoneal o subcutánea (Aller y cols., 2009a).

La realización de una laparotomía con manipulación de las asas intestinales y resección de la vía biliar en la rata cursa con un importante dolor p.o. En particular, las ratas Wistar tras sufrir una laparotomía adoptan posturas sugerentes de dolor abdominal arqueando la espalda, aumentan su frecuencia respiratoria y reducen la ingesta de líquidos y sólidos. Por éste motivo, como terapia analgésica se administró el opioide Buprenorfina (0.05mg/kg/12h) por vía subcutánea durante las primeras 24 horas de p.o. (Aller y Nava, 2009). Buprenorfina ha sido muy utilizado en medicina veterinaria durante las últimas tres décadas porque proporciona un nivel de analgesia excelente y produce una mínima depresión cardíaca y/o respiratoria.

Los animales fueron sacrificados a las 8 semanas del post-operatorio. Durante este periodo p.o. se les administró por vía i.m. profunda un antibiótico de amplio espectro (Ceftazidima; 50 mg/kg; dos veces a la semana) y Vitamina K1 (Fitomenadiona; 8mg/kg; una vez a la semana) como profilaxis anti-infecciosa y anti-hemorrágica, respectivamente (Aller y cols., 2009b). Además, en el grupo de ratas a las cuales se les inyectaron células madre de origen adipocítico humanas, con el objetivo de evitar el rechazo del xenotrasplante, se les administró el inmunosupresor Tacrolimus (0.05 mg/Kg i.m., 3 veces a la semana) desde las 24 horas previas a la inyección de las células madre hasta el momento del sacrificio.

### **2. F. OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE ORIGEN ADIPOCÍTICO**

En el grupo de ratas de la Serie II se han utilizado células madre obtenidas durante la realización de un Proyecto anterior financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias, que fueron extraídas de tejido adiposo procedente de liposucciones estéticas electivas realizadas en el ser humano. El tejido obtenido de las pacientes donantes y, previo consentimiento informado siguiendo las directivas del BOE 2006/17/CE del 8 de febrero del 2006, fue procesado como más adelante se detalla. Por el contrario, en los grupos de las Series III y IV se administraron células madre mesenquimales de rata que se

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

obtuvieron de lipectomias de la grasa perirrenal y abdominal de ratas de la cepa Wistar (procedimiento aprobado por el Comité Ético de experimentación animal del Hospital Universitario La Paz). La fracción vasculo estromal (SVF), tanto en el ser humano como en la rata, fue aislada del tejido adiposo utilizando un procedimiento basado en el descrito por Zuk y cols en 2001 (Zuk y cols., 2001); brevemente:

1. La muestra de tejido adiposo se digiere con un volumen de 1:1 de solución de colagenasa tipo I en PBS (ambos de Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) al 0,075% ( si es tejido adiposo humano), 0,1% ( si es tejido adiposo de rata) a 37°C con agitación suave durante 30 minutos. Posteriormente, la actividad enzimática se neutraliza con un volumen 1:1 de DMEM + 10% suero bovino fetal (FBS) al 10% + 1% de solución antibiótica de penicilina y estreptomina (Medio de cultivo, todos ellos de Gibco-BRL). Tras la incubación, el tejido se centrifuga a 300 x g durante 10 minutos, y el sobrenadante, consistente en gotas lipídicas, adipocitos maduros, y la solución de colagenasa y el medio se retira, dejando un pellet con la SVF.
2. Los eritrocitos que contaminan esta fracción se lisan con un buffer de NH<sub>4</sub>Cl 160 mM, 10 mM de KHCO<sub>3</sub> y 1 mM de EDTA y, posteriormente la solución se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos. Dicho buffer se inhibe con PBS 5:1.
3. El SVF, ya libre de eritrocitos contaminantes, se aísla por centrifugación en las mismas condiciones anteriores, se resuspende en medio de cultivo y se siembra a una densidad aproximada de 30.000 células por cm<sup>2</sup>. Por último, se cultiva toda la noche a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> en medio de cultivo (DMEM con 10% FBS).
4. Posteriormente, la fracción SVF se lava con PBS con el fin de eliminar las células no adheridas y la población celular adherida, denominada lipoaspirado procesado (LPA), se cultiva en las mismas condiciones hasta su confluencia, cambiando el medio tres veces por semana.
5. Para su almacenamiento hasta su uso, se eliminan del LPA las células no adheridas mediante lavado con PBS, quedando únicamente la población celular adherida, o LPA. Estas células se cultivan y crecen hasta su confluencia, lo que significa que están suficientemente maduras para ser

utilizadas. Para extraerlas de los medios de cultivo se utiliza tripsina-EDTA al 0,05% en HBSS (Sigma) y se procede a su congelación en rampa (0,5°C/min) en un medio de criopreservación (medio de cultivo con 10% DMSO, Sigma, San Louis, MS, USA) hasta los -80°C, para luego sumergirlas en N<sub>2</sub> líquido.

### 2.G. CARACTERIZACIÓN CELULAR FUNCIONAL MEDIANTE DIFERENCIACIÓN

La caracterización funcional de las células madre mesenquimales se realiza mediante inducción de su diferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica:

- **Inducción osteogénica:** (Guilak et al., 2006): El medio de inducción osteogénica contiene DMEM (alta concentración de glucosa), con 10% de suero bovino fetal (FBS), 10 mM de glicerofosfato, 0.15 mM de ácido ascórbico -2-fosfato, 10 nM de 1,25- (OH) vitamina D3, y 10 nM de dexametasona, además de solución antibiótica estándar (P/S). Las células se mantienen en cultivo 28 días, refrescando el medio tres veces por semana, y el último día se mide la actividad fosfatasa alcalina en células control y en las células inducidas para comprobar si se ha producido la diferenciación dirigida hacia osteocitos *in vitro*.
- **Inducción condrogénica:** (Barry et al., 2001): El medio de inducción condrogénica contiene DMEM-LG (baja concentración de glucosa), con 110 mg/L de piruvato sódico, 0.15 mM de ácido ascórbico-2-fosfato, 100 nM de dexametasona, 1% ITS y 10 ng/ml de TGF-1 y 1% de solución antibiótica. Las células se mantienen en cultivo durante 4 semanas para después comprobar la presencia de proteoglicanos sulfatados mediante tinción con azul Alcian.
- **Inducción adipogénica** (Lin et al, 2006): El medio de diferenciación adipogénica está constituido por: DMEM (Gibco) suplementado con 10% FBS (Gibco), 500µM IBMX (Sigma), 1µM dexametasona (Sigma), 1µM Indometacina (Sigma). A las 72 horas se refresca el medio añadiendo 10µM insulina (Actrapid, Novonordisk) y 24 horas después se retira éste medio y se cambia por un medio de diferenciación adipogénica sin insulina. El medio con insulina se añade, de esta manera, cada 72 horas

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

lavándolo las 24 horas posteriores con medio sin insulina y se mantiene este protocolo durante 2 semanas, tras las cuales se revela la presencia de vacuolas lipídicas intracelulares mediante una tinción liposoluble de aceite rojo-O (*Red Oil-O*; ORO)

### **2.H. DIFERENCIACIÓN *IN VITRO* DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE ADIPOCITOS EN CELULAS PROGENITORAS HEPATOCITARIAS**

Las células aisladas del tejido adiposo humano se someten a condiciones de inducción hepatogénica, siguiendo el protocolo ya establecido por Seo y cols. en 2005, con pequeñas modificaciones: Las células se cultivan durante 7 días sobre un delgado substrato de colágeno (0,1% en PBS; Sigma) en medio de inducción hepatogénica (60% DMEM-LG; 40% MCDB-201 (Sigma); 1% ITS (Gibco);  $10^{-9}$  M dexametasona (Sigma);  $10^{-4}$  M ácido ascórbico 2 fosfato (Sigma); 10 ng/ml rhEGF ; 10 ng/ml rh OSM, 10ng/ml rhHGF (todos de R&D Systems); 1% P/S (Gibco); 0.6% Glutamax (Gibco), que se referescará cada 2 días. Después del tiempo aceptado como necesario (entre 2 y 4 semanas), se confirma la pre-diferenciación dirigida hacia hepatocitos, verificándose la expresión por éstas células madre de albúmina mediante inmunocitoquímica frente a albúmina (anticuerpo de Dako).

Para la inducción hepatogénica de las células mesenquimales estromales de rata, dichas células se mantuvieron en cultivo de inducción en medio de diferenciación durante 10 días (refrescando cada 2 días), que consistió en : DMEM-LG; 1% FBS;  $10^{-9}$  M Dexametasona; 20 ng/ml HGF; 10ng/ml FGF-4; 1%ITS; 1% Glutamax; 1% P/S.

Previamente a su trasplante, las células mesenquimales prediferenciadas hacia el linaje hepatocitario, tanto del ser humano como de rata, se marcan con Bromodeoxi-Uridina (1:1000) y fluorocromo CMDil (Molecular Probes 1: 200) con el objeto de identificarlas una vez trasplantadas en el parénquima hepático de la rata.

### **3. I. ADMINISTRACIÓN INTRAHEPÁTICA DE CÉLULAS MADRE DE ORIGEN ADIPOCÍTICO**

Una vez desarrollada la ictericia obstructiva, a las dos semanas de realizar la resección microquirúrgica de la vía biliar extrahepática, la

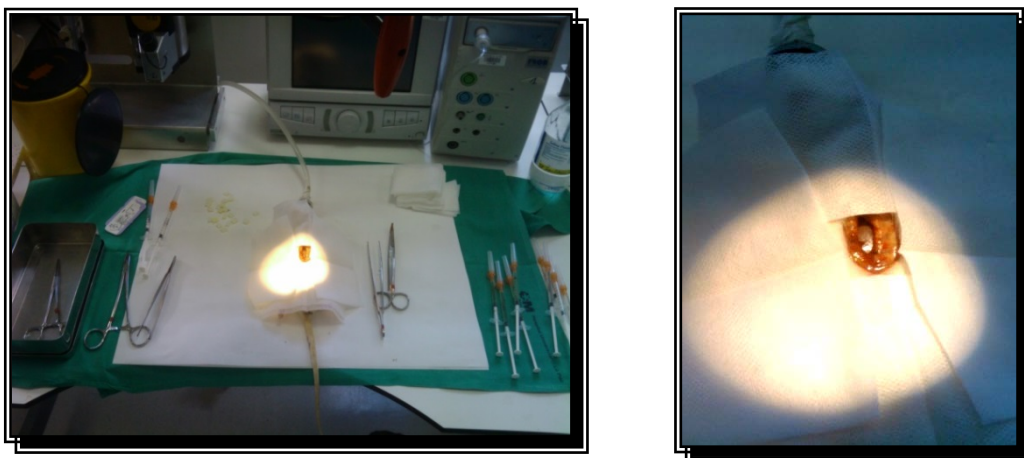
## MATERIAL Y MÉTODOS

administración de células madre se ha realizado mediante inyección directa en el parénquima hepático. Para ello se realiza una re-laparotomía media con la rata en decúbito supino, tras colocar un bloque de plastilina en la zona dorso lumbar lo que permite una exposición adecuada de la superficie hepática (Figura 25).

La técnica consiste en la obtención de una suspensión de células madre (número de células madre:  $2,5 \times 10^6$  células/rata en 1 cc de solución salina, *Hanks balanced SALT solution*, HBSS, Invitrogen) que se inyectó mediante una aguja de calibre 18G. El método de la inyección intrahepática fue diferente en función del Grupo de animales:

1. En el caso de las células mesenquimales de origen adipocítico humanas prediferenciadas a hepatocitos, en los lóbulos hepáticos medio, lateral izquierdo y lateral derecho (0.33 ml/lóbulo).

2. En el caso de las células mesenquimales de origen adipocítico de rata, tanto las no diferenciadas, como las prediferenciadas a hepatocito, sólo en el lóbulo hepático medio (1 ml/lóbulo).



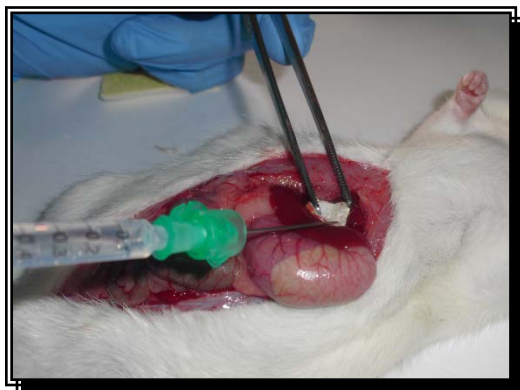
**Figura 25. A la izquierda:** Fotografía en la que se observa la rata anestesiada en decúbito supino con una re-laparotomía media y, el material quirúrgico, las jeringuillas con analgesia, vitamina K y antibiótico (lado derecho del animal) y las jeringuillas con las células madre y el Tachosyl (lado izquierdo). **A la derecha:** Imagen ampliada de la re-laparotomía media.

Una vez inoculadas las células madre de origen adipocítico o bien, la solución salina isotónica en los animales con colestasis microquirúrgica que sirvieron como Grupos Control, se aplica un material hemostático (Tachosyl) sobre el sitio de punción hepática (Figura 26) y se cierra la pared abdominal en 2 planos: peritoneo, músculo y aponeurosis mediante sutura continúa reabsorbible

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

Vycril<sup>®</sup> (polyglactin 910) de 3/0, y piel con sutura continua de seda de 3/0. (Lorente y cols., 2000).



**Figura 26.** *Inoculación de las células madre de origen adipocítico o de la solución salina isotónica en el parénquima hepático. Inmediatamente después, se aplica un material hemostático (Tachosil<sup>®</sup>) sobre el sitio de punción hepática*

Los animales que recibieron un xenotrasplante de células madre de origen adipocítico humano prediferenciadas a hepatocito, fueron inmunosuprimidos desde las 24 horas previas y tras la infiltración hepática con Tacrolimus (0.05 mg/Kg), como profilaxis de rechazo. En el caso de los animales a los que se administraron células madre de origen adipocítico de rata, tanto indiferenciadas, como prediferenciadas a hepatocito, al tratarse de células de procedencia de ratas genéticamente idénticas, se considera como un isotrasplante y, por tanto no fue necesaria la inmunosupresión.

### 2. J. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES

Los animales supervivientes en cada serie fueron sacrificados por exanguinación a las 8 semanas del post-operatorio. Antes de proceder a la anestesia y sacrificio de los animales se determinó su peso corporal (PC). La anestesia se realizó de nuevo por vía inhalatoria, a las concentraciones descritas con anterioridad. Tras colocar a la rata en decúbito supino se realizó una laparotomía xifopubiana y se realizó un estudio macroscópico de la cavidad abdominal, en el que se valoraba la presencia de líquido ascítico, el aspecto macroscópico de hígado y bazo, así como la presencia de circulación colateral portosistémica y de vasculopatía venosa mesentérica. De esta manera, durante el sacrificio, y de forma seriada, se valoraban los siguientes aspectos:

### 2. J.1 CUANTIFICACIÓN DEL LÍQUIDO ASCÍTICO

Tras realizar la laparotomía, se valoraba si había líquido ascítico, y en el caso en el que éste estuviera presente, se procedía a su cuantificación mediante aspiración con jeringa estéril y graduada en cm.

### 2. J.2. CIRCULACIÓN COLATERAL PORTOSISTÉMICA

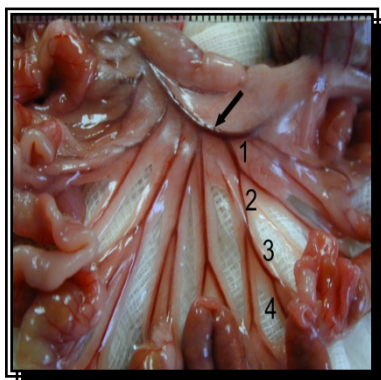
A continuación, se valoró la presencia de venas colaterales en aquellas áreas donde se desarrolla habitualmente circulación colateral venosa porto-sistémica en la rata, es decir, en las áreas esplenorrenal (ER), gastroesofágica (colaterales paraesofágicas) (PE), y pararrectal(PR).

### 2. J.3. VASCULOPATÍA VENOSA MESENTÉRICA

Se denomina vasculopatía venosa mesentérica a la dilatación y tortuosidad de las ramas de la vena mesentérica superior. Se consideran tres grados de vasculopatía venosa mesentérica (Aller y cols., 2001):

- **Grado 0:** aspecto macroscópico normal de las ramas de la vena mesentérica superior.
- **Grado I:** dilatación y tortuosidad de las ramas mesentéricas, secundarias al clampaje transitorio (1 minuto) de la vena mesentérica superior.
- **Grado II:** dilatación y tortuosidad espontáneas de las ramas de la vena mesentérica superior.

Para su estudio, se extrajeron parcialmente las asas intestinales, situando el árbol mesentérico por su región ileocecal, donde se visualizaron con facilidad las ramas de la vena mesentérica superior (Figura 27). Esto es, las ramas de primer y segundo orden o proximales, por su vecindad con la vena mesentérica superior, y las de tercer y cuarto orden o distales, por su vecindad con el intestino (íleon y ciego) (Castañeda y cols., 2000).



## MATERIAL Y MÉTODOS

---

**Figura 27.** *Vascularización venosa mesentérica en la que se observa la vena mesentérica superior (flecha) y sus ramas venosas de primer (1), segundo (2), tercer (3) y cuarto (4) orden.*

### 3. J.4. EXTRACCIÓN SANGUÍNEA, PERFUSIÓN INTRACARDÍACA Y NECROPSIA

Tras realizar un estudio macroscópico de la cavidad abdominal y valorar los signos macroscópicos sugerentes de hipertensión portal, como son el desarrollo de vasculopatía venosa mesentérica y de circulación venosa colateral, se procedió a la extracción de sangre de la vena cava inferior infrahepática, obteniéndose entre 5 y 8 ml de sangre en cada animal (Figura 28). Esta maniobra deja al animal exangüe, falleciendo por shock hipovolémico. Para la extracción de sangre se utilizaron jeringuillas heparinizadas con heparina al 1% (Rovi®). Posteriormente, la sangre se conservó refrigerada en hielo (4°C), y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos para obtener el plasma sanguíneo. Tras separar el plasma, este se dividió en alícuotas, que se congelaron a -80 °C hasta su utilización para determinar diferentes marcadores bioquímicos.

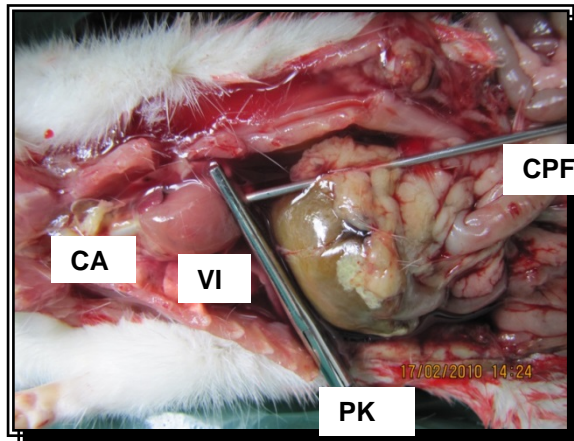


**Figura 28.** *Extracción sanguínea de la vena cava inferior infrahepática*

Antes de finalizar la extracción sanguínea y en tanto se mantiene el latido cardíaco, se procede a la realización de una toracotomía bilateral a nivel de la línea media clavicular, lo que permite la apertura de la cavidad torácica y el acceso al mediastino. Posteriormente se inserta un catéter en el ventrículo izquierdo y se inicia la perfusión con una máquina de perfusión de solución salina isotónica (0.9%) a través de este catéter. Inmediatamente después del

## MATERIAL Y MÉTODOS

comienzo de la perfusión, se realiza la sección de la aurícula derecha del corazón de la rata lo cual permite la salida del efluente del animal y evita la congestión (Figura 29). Este proceso de “perfusión-lavado” de los tejidos con suero fisiológico dura unos 15 minutos, tras los cuáles se continua la perfusión con formaldehído al 2%, durante unos 30 minutos aproximadamente.



**Figura 29.** Se puede apreciar el catéter de perfusión de formaldehído (CPF) insertado en el ventrículo izquierdo (VI) y con el extremo distal en la luz del cayado aórtico (CA), fijado con una pinza de Kocher (PK)

### 2. J.5. Recogida de muestras histológicas

Tras la perfusión y una vez fijados los tejidos con formol, se procede a la extracción del bazo, del hígado (figura 30) y de los testículos, registrándose su peso. Los lóbulos hepáticos se pesaron por separado (figura 31), y posteriormente se transfirieron a un tubo que contenía Formol al 10% para su posterior estudio histopatológico.



**Figura 30.** Aspecto del hígado colestásico una vez completada la exéresis de los órganos tras el sacrificio de los animales a las 8 semanas de evolución



**Figura 31.** Fotografía de las piezas quirúrgicas extraídas durante el sacrificio de los animales, después de ser pesadas. Cada columna corresponde a una rata, en la cual se puede apreciar desde la parte superior a la inferior, los testículos, el bazo, y los lóbulos hepáticos medio, izquierdo, derecho y caudado.

### 2. J.6. Eliminación de los restos biológicos

Una vez tomadas las muestras los restos de los animales y los tejidos desechados de las vísceras fueron depositados en bolsas plásticas e introducidas en contenedores especiales. La gestión de los restos biológicos (recogida, transporte y tratamiento de los mismos) se realizó a través de la empresa CONSENUR, S. A. C/Rio Ebro, s/n. Polígono Industrial Finanzauto. Arganda del Rey (Madrid) que cumple con la normativa vigente: *Decreto 83/1999, de 3 junio, por el que se regulan las actividades de producción y gestión de los residuos biosanitarios y citotóxicos en la Comunidad de Madrid.*

### 2. K. DETERMINACIONES SÉRICAS DE FUNCIÓN HEPÁTO-BILIAR

Para la valoración de la reversibilidad de las alteraciones producidas por la colestasis con células madre de rata indiferenciadas y de células madre, tanto de rata como humanas, preferenciadas a hepatocitos, se han estudiado parámetros bioquímicos séricos de insuficiencia hepática y de colestasis (Aspartato-aminotransferasa (AST), Alanin-aminotransferasa (ALT), Lactato-dehidrogenasa (LDH), Gamma-Glutamiltransferasa (GGT), Bilirrubina total y directa, Fosfatasa Alcalina (FA), proteínas totales, albúmina, creatinina y urea).

### 2. K.1 Bilirrubina total y directa

La bilirrubina total se determina mediante el uso de un reactivo compuesto por ácido Sulfanílico, ácido Clorhídrico y Dimetil sulfóxido (DMSO), que hace que se forme en determinadas condiciones azobilirrubina por una reacción de diazotación, obteniéndose una coloración rojo cereza. La absorbancia de la muestra se valora por espectrofotometría a una longitud de onda de 555 nm (530-580) y a 20-25°C (Martinek, 1966; Royer y cols., 1973).

### 2. K.2. Alanin-Aminotransferasa (ALT) Y Aspartato- Aminotransferasa (AST)

La valoración de AST se fundamenta en que el  $\alpha$ -cetoglutarato y el aspartato sufren una reacción catalizada por la AST, transformándose en L-Glutamato y oxalacetato que, a su vez, reaccionan con NADH e Hidrogeniones, para obtener malato y a  $\text{NAD}^+$ , por acción de la enzima Malato-deshidrogenasa. El método de valoración se basa en la oxidación del NADH a  $\text{NAD}^+$ , y se mide el valor medio de los incrementos de extinción por minuto mediante un test U.V. cinético (normativa IFCC) a una longitud de onda de 334 nm, 340 nm y 365 nm.

La técnica de determinación de la ALT sigue estos mismos principios, si bien en este caso los sustratos de la reacción catalizada por la ALT son el  $\alpha$ -cetoglutarato y la L-Alanina, que se convierten en L-glutamato y piruvato. Aquí, es el piruvato el que se combina con NADH e hidrogeniones para dar -por una reacción catalizada por la enzima Lactato Deshidrogenasa- Lactato y  $\text{NAD}^+$  (Bergmeyer y cols., 1976; Bergmeyer y cols., 1978; Bergmeyer y cols., 1980).

### 2. K.3. Lactato-deshidrogenasa (LDH)

Para la cuantificación de los niveles séricos de LDH se utilizó un método cinético espectrofotométrico ultravioleta recomendado por el Comité Escandinavo de Enzimas (SCE). LDH es una enzima que cataliza la reacción de reducción del piruvato a lactato en un medio con pH neutro produciéndose en la misma una oxidación de NADH. La concentración de NADH se monitoriza mediante la absorbancia a una longitud de onda de 340nm. La disminución en la absorbancia por minuto ( $\Delta A / \text{min}$ ) es proporcional a los micromoles de sustrato transformado en ese periodo de tiempo y por lo tanto proporcional a la actividad de la LDH. (*Scandinavian Committee on Enzymes*, 1974)

### 2. K.4. Fosfatasa Alcalina (FA)

La fosfatasa alcalina se determina basándose en que hidroliza los ésteres del ácido fosfórico en medio alcalino, produciendo fosfato inorgánico y el correspondiente resto orgánico con el que se había esterificado. Para su valoración, se utiliza un test cinético optimizado con el que se mide el valor medio de los incrementos de extinción por minuto a una longitud de onda de 405 nm y a 25 °C, 30°C y 37°C, siguiendo la metódica DGKC (Izquierdo y cols., 1982; Tietz y cols., 1983; Tietz, 1987).

### 2. L.5. $\gamma$ - glutamiltransferasa (GGT)

Para la valoración sérica de las concentraciones del enzima GGT se utilizó un método cuantitativo fotocolorimétrico. GGT cataliza la transferencia de un grupo  $\gamma$ -glutamil de un substrato donante ( $\gamma$ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida) a un receptor (glicilglicina), dando lugar  $\gamma$ -glutamilglicilglicina y 5-amino-2-nitrobenzoato. El aumento de la concentración de éste último produce cambios en la absorbancia a una longitud de onda de 410 nm., siendo por tanto la misma directamente proporcional a la actividad enzimática de GGT. (Schuman y cols., 2002)

### 2. K.6. Proteínas Totales

Las proteínas totales se determinaron mediante el test colorimétrico de "Biuret", basado en que los grupos -CO-NH- unidos entre sí reaccionan con las sales cúpricas en medio alcalino, adquiriendo la solución un color violeta, siendo la más representativa y simple la que produce con el reactivo de Biuret. Se valora la absorbancia de la muestra por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm. En la actualidad, éste constituye el método más exacto y simple para la determinación de las proteínas totales (Henry y cols.1957; Peters 1968).

### 2. K.7. Albúmina

La albúmina se cuantificó mediante el test colorimétrico denominado "verde de bromocresol", en el que se combina la muestra con esta tinción a determinado pH, produciéndose un cambio de color del indicador, que pasa de ser amarillo verdoso a verde azulado. La absorbancia de la muestra se valora

por espectrofotometría a una longitud de onda de 630 nm y a temperatura ambiente (Doumas y cols., 1971; Webster y cols., 1974).

### **2. K.8. Creatinina**

Los niveles séricos de Creatinina se cuantificaron utilizando un test químico cinético fotolorimétrico. Por la reacción de Jaffé, la creatinina en un medio alcalino reacciona con el ácido pícrico formando un producto de color amarillo-naranja que es visible en el espectro de longitud de onda de 520/800 nm. La velocidad de cambio en la absorbancia es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra. (Cook, 1971; Lamb y cols., 2006).

### **2. K.9. Urea**

Los niveles séricos de Urea se cuantificaron utilizando un test enzimático por espectrofotometría ultravioleta en suero proporcional a la concentración de urea (Sampson y cols 1980; Lamb y cols 2006). El descenso en la concentración de NADH produce una disminución en la absorbancia por unidad de tiempo en la longitud de onda de 340 nm, que es proporcional a la concentración de urea. (Sampson y cols 1980; Lamb y cols 2006)

## **2. L. ESTUDIO MICROSCÓPICO E HISTOPATOLÓGICO**

Para su estudio histopatológico, se procesaron las muestras mediante técnicas de rutina para microscopía óptica:

### **2. L.1. Fijación**

La fijación de los tejidos es imprescindible para que las estructuras tisulares y celulares se preserven intactas, evitando así que los procesos autolíticos *postmortem* las modifiquen. Para ello, además de su perfusión i.v. realizada "in vivo" con formol tamponado, los tejidos se introdujeron inmediatamente después de su extracción en formol tamponado al 10%, que tiene una penetración relativamente rápida en los mismos. El tiempo de fijación para este reactivo es de unas 24 horas.

### **2. L.2. Inclusión**

Tras el tallado macroscópico de los órganos, las piezas seleccionadas se incluyeron en parafina mediante un sistema automático, con temperatura y vacío controlado por ordenador (Histomatic 166 MP, Fisher). Para ello, las muestras

formolizadas se pasan por 3 cubetas que contienen concentraciones crecientes de alcohol etílico: primero al 70%, después al 96% y por último alcohol absoluto (100%). A continuación, se realiza el aclarado, que es un paso necesario para que se pueda incluir el tejido en parafina. El agente utilizado fue el Xilol, debido a su rápida acción. De esta forma, se sustituye el alcohol etílico por Xileno (sustancia miscible con la parafina), para que la parafina se pueda disolver y penetrar en el tejido, formándose así los bloques. Después, se procedió a la elaboración de los bloques de parafina sólidos con la pieza de tejido en su interior. Para ello, se impregna el material en parafina blanda a 46°C durante 1 hora, tiempo tras el cual se realiza un segundo baño en parafina dura a 58°C durante 1 hora. Por último, ya en la estación de inclusión, se coloca la muestra en un paramol, se vierte la parafina dura fundida en su interior, y se enfría en hielo.

### **2. L.3. Procesado de los cortes**

Tras la inclusión, se procedió a realizar el corte de las piezas con un microtomo de parafina tipo Minot (Microm), obteniéndose secciones de 4 µm de grosor. A continuación, las secciones colocadas en un portaobjetos e identificadas se sometieron a un proceso de desparafinado. Para esto, las preparaciones se dejan a 60°C durante 20 minutos, y después se someten a tres baños de 3 a 5 minutos en Xilol. Tras esto, las muestras histológicas se han de hidratar para lo cual se incluyen nuevamente en soluciones decrecientes de alcohol de 96°, 80° y 70° y por último en agua como paso previo a realizar las tinciones.

### **2. L.4 Estudio con microscopía de fluorescencia**

El microscopio de fluorescencia es un microscopio en el que los objetos son excitados por rayos de una determinada longitud de onda cuyo resultado es la emisión de rayos de otra longitud de onda. Se observan las preparaciones hepáticas al microscopio de fluorescencia para comprobar la persistencia de células fluorescentes (previamente marcadas con CmDil) que identificamos como células madre de origen adipocítico, Estas células, de procedencia humana, fueron las únicas marcadas con el agente fluorescente antes de su inoculación en el hígado colestásico de la rata, con lo cual se identifican por diferenciarse claramente de los hepatocitos de la rata no fluorescentes.

### **2. L.5. Tinciones histológicas**

#### **2. L.5. a. Hematoxilina & Eosina:**

Las secciones hepáticas realizadas se han de hidratar para que la hematoxilina-eosina pueda actuar, utilizando alcohol en concentraciones decrecientes (de la forma expuesta anteriormente) y finalmente, agua destilada. Las muestras han de estar sumergidas en cada baño entre 3 y 5 minutos. Finalmente, se llevó a cabo la tinción con Hematoxilina-Eosina para la posterior observación al microscopio óptico de las secciones hepáticas. Hematoxilina-Eosina es una tinción general que proporciona una visión global de las estructuras tisulares. Los portaobjetos con las secciones desparafinadas se sumergieron en hematoxilina de Harris durante 10 minutos, y después se lavaron en agua destilada durante otros 10 minutos. A continuación se sumergieron en Eosina unos segundos y se procedió a su deshidratación en alcoholes de gradación creciente. A continuación, se realiza su aclarado con Xilol y, para finalizar, se procede a su montaje, colocando una gota del medio de montaje (DPX: bálsamo de Canadá, o un medio sintético) sobre el corte, apoyando y presionando sobre éste el cubreobjetos para eliminar las burbujas. Por último, se limpia el medio de montaje excedente y se deja secar.

A continuación, se toman fotos de las muestras hepáticas teñidas con Hematoxilina&Eosina para estudiar las áreas ocupadas por hepatocitos y por proliferación epitelial biliar.

#### **2. L.5. b. Tricrómico de Masson:**

En primer término, se tiñen las secciones con un tinte ácido, como escarlata de Biebrich. Todos los elementos acidófilos del tejido, como el citoplasma celular, el músculo y el colágeno se unirán a los tintes ácidos, por ello ésta tinción permite visualizar muy bien las áreas de fibrosis. A continuación, las secciones se tratan con ácido fosfotúngstico y/o fosfomolibdico. Ya que el citoplasma es mucho menos permeable que el colágeno, los ácidos fosfotúngsticos y fosfomolibdicos permiten que la escarlata de Biebrich difunda del colágeno pero no del citoplasma.

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

Procedimiento: Se realizan los siguientes pasos sobre la preparación histológica:

- Desparafinar e hidratar
- Hematoxilina de Weigert, 12 minutos
- Agua corriente: 10 -15 minutos (lavar bien hasta eliminar el color del agua)
- Tinción con Ponceau - fucsina ácida – arfloxina, 20 minutos:  
Solución de Masson: 10 ml + 2 ml de solución de arfloxina + 88 ml de ácido acético al 0.2%.
- 1 parte de solución A: 1 g de fucsina ácida en 100 ml de agua: hervir, añadir 1 ml de ácido acético puro y filtrar.
- 2 partes de solución B: 1 g de Ponceau de xilidina en 100 ml de agua, hervir, añadir 1 ml de ácido acético puro y filtrar.  
Solución de azofloxina: 0.5 g de arfloxina + 100 ml de agua + 0.2 ml de ácido acético puro
- Agua acidulada (ácido acético 1%): Tirar y seguir lavando con agua del grifo
- Ácido fosfomolibdico – naranja G hasta decoloración del tejido: 4 minutos:  
3 g de ácido fosfomolibdico + 2 g de naranja G en 100 ml de agua
- Agua acidulada
- Verde luz 45 minutos (tapado): 0.1 g de verde luz SF + 0.2 ml de ácido acético puro + 100 ml de agua
- Agua acidulada, muy rápido, para que no se vaya el verde luz
- Deshidratar con rapidez hasta alcohol 100° (dejar 2 minutos)

### 2. L.5 c. Rojo Picrosirio:

La tinción con Rojo Sirio se caracteriza por su alta afinidad a las proteínas del colágeno, tiñe el colágeno en rojo y contratiñe en verde el resto de las proteínas.

Procedimiento:

- Desparafinar e hidratar
- Picrosirio: 1 hora a temperatura ambiente
- Lavar en agua acidulada 10 minutos
- Contrastar con Hematoxilina de Harris (opcional)

- Deshidratar en alcoholes crecientes
- Montar con D.P.X. (bálsamo de Canadá)
- Soluciones
  - Picrosirio: - Rojo sirio, 0.2 gramos (sirian red)  
- Ácido Pícrico a saturación: 100 ml
  - Agua acidulada: Con CIH 0.1 N

A continuación, se realizan fotos de campo claro del Rojo Picrosirio para cuantificar el área de fibrosis, así como fotos con luz polarizada para ver qué tipo de colágeno (maduro o no maduro) hay en los cortes del parénquima hepático. Las fotos se convierten a sistema binario (blanco y negro) y se analizan mediante un programa de análisis de imagen  $\diamond$  IMAGEJ.

Así, mediante el programa computacional analizador de imágenes IMAGEJ, se llevó a cabo la cuantificación del tejido fibroso y del depósito de fibras colágenas en las tinciones con Rojo Picrosirio. En las fotografías digitales realizadas, se midió el área total en píxeles, de la cual se restaba el área de luz ocupada por vasos, y se cuantificaron las áreas de fibrosis, hepatocitos y proliferación biliar. Una vez medidas las áreas, se calculó el porcentaje de los distintos aspectos histológicos objeto de estudio. El cálculo se realizó en fotos con 400x de magnificación.

### **2. L.6 Evaluación histopatológica por microscopía óptica**

Los cortes hepáticos realizados fueron sometidos a las tres tinciones diferentes indicadas anteriormente y observados a doble ciego por microscopía óptica, con el fin de evaluar distintos aspectos histológicos. Para intentar determinar de una manera objetiva si existen diferencias histopatológicas entre los diferentes grupos de estudio, se estableció un baremo por el cual se asignaba una puntuación a distintas variables de cada muestra histológica en función de la magnitud de los cambios observados. Las variables estudiadas son:

- Colestasis
- Nódulos de regeneración
- Proliferación ductular
- Binucleación
- Infiltrado inflamatorio
- Necrosis

- Trombosis
- Fibrosis
- Peliosis
  - Dilatación venular centrolobulillar
  - Estructura
  - Función
  - Congestión

Así, se puntuaba cada uno de los aspectos histológicos enumerados anteriormente con 0, 1, 2, o 3 puntos. Finalmente se sumaban todos los puntos y se clasificaba a cada preparación histológica correspondiente a cada individuo en unos de los siguientes grupos en función de la puntuación final obtenida:

- Diagnóstico histopatológico bueno:  $\leq 5$  puntos
- Diagnóstico histopatológico intermedio-bueno: 6-12 puntos
- Diagnóstico histopatológico intermedio-malo: 13-20 puntos
- Diagnóstico histopatológico malo:  $\geq 20$  puntos

Para realizar las tinciones con Rojo Sirio y Tricrómico de Masson se eligieron al azar 9 casos de cada grupo (ratas con inyección de suero salino, con células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos, con células madre indiferenciadas de rata y con células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos). Se realizó tinción Tricrómico de Mason y Rojo Picrosirio en los lóbulos LM y LC de cada caso, de tal forma que realizaríamos una comparación histológica entre el lóbulo medio, que es uno en los que se había inyectado células madre, con el lóbulo caudado, en el cuál no se habían inyectado células madre.

### **2. M. CALCULO DEL “*Model for end-stage Liver Disease*” (MELD)**

La escala MELD (del acrónimo inglés MELD, *Model for end-stage Liver Disease*) es un modelo matemático de predicción de la sobrevida y de medición de la gravedad de la enfermedad hepática muy utilizado en la clínica humana que se basa en simples valores rutinarios de laboratorio (bilirrubina, INR y creatinina). Fue inicialmente desarrollado para predecir la muerte dentro de los tres meses post-cirugía en pacientes a los que se les había colocado un TIPS (*transjugular intrahepatic portosystemic shunt*) y fue subsecuentemente

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

demostrada su utilidad para determinar el pronóstico y para priorizar los pacientes en lista de espera para trasplante hepático.

La puntuación MELD es calculada en el ser humano con la siguiente fórmula:

$$\text{MELD Score} = 9,57 \ln(\text{Creat}) + 3,78 \ln(\text{Bili}) + 11,2 \ln(\text{INR}) + 6,43$$

Consideraciones:

- El rango de valores va de 6 a 40.
- El valor mínimo es 1 para cada una de las variables.
- El valor se redondea al entero más cercano.
- Si el paciente ha sido sometido a diálisis (al menos 2 veces durante la semana anterior), el valor de creatinina a considerar es 4 mg/dL.

“A diferencia de la escala de Child Pugh, la escala MELD sí cumple las características de un buen score, como son el incluir variables objetivas, aplicables a un heterogéneo grupo de pacientes con enfermedad hepática crónica, distinguiendo la gravedad de la enfermedad. Además, ésta escala se ha constatado y validado en múltiples estudios que incluyeron múltiples subgrupos de pacientes con hepatopatía crónica”.

**La interpretación de la escala MELD** en pacientes hospitalizados indica:

- 40 o más — 71.3% mortalidad a los 3 meses
- 30–39 — 52.6%
- 20–29 — 19.6%
- 10–19 — 6.0%
- <9 — 1.9%

En nuestro trabajo hemos adaptado el cálculo del MELD al estudio de las ratas, ya que el peso y la edad de estas, difiere de la especie humana. Para ello hemos mantenido los valores séricos de bilirrubina, creatinina y el INR, con la salvedad de conservar los valores decimales de dichos valores y no redondear al entero más próximo. Con el resultado de los valores de MELD que hemos obtenido se ha aplicado el análisis estadístico antes descrito.

### 3. N. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó la aplicación informática SPSS versión: 19.0 para Windows® (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). En primer lugar, se realizó un **estudio descriptivo** de los resultados obtenidos. Los métodos estadísticos utilizados fueron los siguientes (SPSS, 2010):

-**Estadística descriptiva** de las **variables cuantitativas** (procedimiento DESCRIPTIVE) expresándolas mediante una medida de centralización (media aritmética) y una medida de dispersión (desviación estándar) ( $x \pm DE$ ) (Ferrán, 1996).

-Estadística descriptiva de las **variables cualitativas** (procedimiento FRECUENCIAS), con la obtención de frecuencias y porcentajes de las categorías. (Ferrán, 1996)

-**Tablas de contingencia** para la relación entre **variables cualitativas** (procedimiento CROSSTABS). A estas tablas se les aplica una distribución estadística: **Prueba de Chi-cuadrado** para contrastar la independencia o influencia entre dos variables cualitativas, con información en cada casilla de la tabla de contingencia del porcentaje en fila y los residuos corregidos no tipificados para ayudar a descubrir las tramas en los datos que contribuyen a una influencia significativa. (Everitt, 1992 y Ferrán, 1996), considerándose un resultado significativo cuando dicho residuo no está incluido en el intervalo (-2,+2).

-**Test de Kolmogorov-Smirnov** para una muestra (procedimiento NPAR TESTS) para determinar si las variables cuantitativas del estudio se ajustan a una distribución Normal (Ferrán, 1996) y así cumplir los requisitos para utilizar pruebas estadísticas paramétricas (ANOVA en este estudio). Si las variables no siguen una distribución Normal se deben utilizar pruebas no paramétricas (por ejemplo, en nuestro caso, el test de Kruskal-Wallis).

-**ANOVA para variables cuantitativas** (procedimiento ONEWAY), para la comparación de múltiples medias. A la ANOVA se le aplica una distribución estadística **F de Snedecor** Cuando el valor global de la F de Snedecor es significativo nos indica que las medias en los grupos no son iguales. El p-valor o significación obtenida, que es lo que valora si hay diferencias significativas entre los grupos, si las hay con unos niveles de significación fijados anteriormente, (en nuestro caso 95%,  $p < 0.05$ , 99%,  $p < 0.01$  y 99.9%,  $p < 0.001$ ), como prueba de contrastes “a posteriori” usamos el **test de Duncan**, que realiza comparaciones múltiples de medias, ordenando las medias de menor a mayor y compara las

## MATERIAL Y MÉTODOS

---

diferencias entre pares (menor-mayor), conectando los grupos que no difieren significativamente. De esta manera se identifican subconjuntos de medias no significativamente diferentes. Si dos medias se agrupan en un mismo subconjunto no son diferentes significativamente, en otro caso serán diferentes significativamente. (Ferrán, 1996) (Sánchez, 1996).

-Para realizar el **análisis de supervivencia**, las diferencias entre grupos se expresan en función del riesgo relativo de supervivencia (RR), empleando un intervalo de confianza del 95%. El RR se considera significativo cuando el intervalo de confianza no incluye el valor 1. Los resultados de supervivencia se expresan gráficamente mediante curvas de Kaplan Meier.

Respecto de los **estudios histopatológicos** (porcentaje del área de fibrosis), para comparar el efecto del lóbulo en el que se inyectan células y el efecto propio del tratamiento con células madre en los grupos con distinta evolución p.o. se utilizó ANOVA y posteriormente el test de Duncan de contrastes *post-hoc o a posteriori*.

Los valores se consideran estadísticamente significativos si  $p < 0.05$ .

## ***VI. RESULTADOS***



### VI. RESULTADOS

Habiendo demostrado previamente que las células madre humanas más adecuadas para la reversión de la patología colestásica son aquellas prediferenciadas a hepatocitos, y que el periodo evolutivo de colestasis microquirúrgica en la rata en el cual las lesiones hepáticas ya están completamente establecidas es alrededor de 14 días del p.o., se diseñó el presente estudio con la intención de analizar el posible efecto terapéutico, (reversión de la patología colestásica) de las células madre, tanto obtenidas del tejido adiposo del ser humano, como de la rata, a las 8 semanas de la realización de la colestasis extrahepática.

A continuación, se describen los resultados correspondientes a los grupos formados por ratas a las cuales se les realizó una colestasis microquirúrgica, y se les administró bien suero salino, células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos, células madre indiferenciadas de rata, o células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos, en cada grupo correspondiente. En todos los casos la inyección intraparenquimatosa hepática, de solución salina o de células madre mesenquimales de origen adipocítico, se realizó a las 2 semanas del p.o., y los animales se sacrificaron a las 8 semanas de la colestasis (Tabla 3).

**Tabla 3. Relación de las Series de ratas correspondientes al diseño del estudio experimental.** **SO:** pseudo-operadas. **CM-S:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino. **CCRND:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre de rata adipocíticas no diferenciadas **CCHP:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre humanas adipocíticas prediferenciadas a hepatocitos **CCRP:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos **CMQ:** Colestasis microquirúrgica. **SS:** Suero salino. **SC-hp:** células madre mesenquimales adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos. **SC-rnd:** células madre mesenquimales adipocíticas de rata no diferenciadas. **SC-rp:** células madre mesenquimales adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos.

## RESULTADOS

		CIRUGÍA	2 semanas p.o.	8 semanas p.o.
<b>CONTROL</b>	<b>SO</b> (n=20)	SO	-	Sacrificio (n=20)
<b>SERIE I</b>	<b>CM-S</b> (n=20)	CMQ	SS	Sacrificio (n=14)
<b>SERIE II</b>	<b>CCRND</b> (n=47)	CMQ	SC-rnd	Sacrificio (n=25)
<b>SERIE III</b>	<b>CCHP</b> (n=38)	CMQ	SC-hp	Sacrificio (n=15)
<b>SERIE IV</b>	<b>CCRP</b> (n=30)	CMQ	SC-rp	Sacrificio (n=20)

### 1. SUPERVIVENCIA

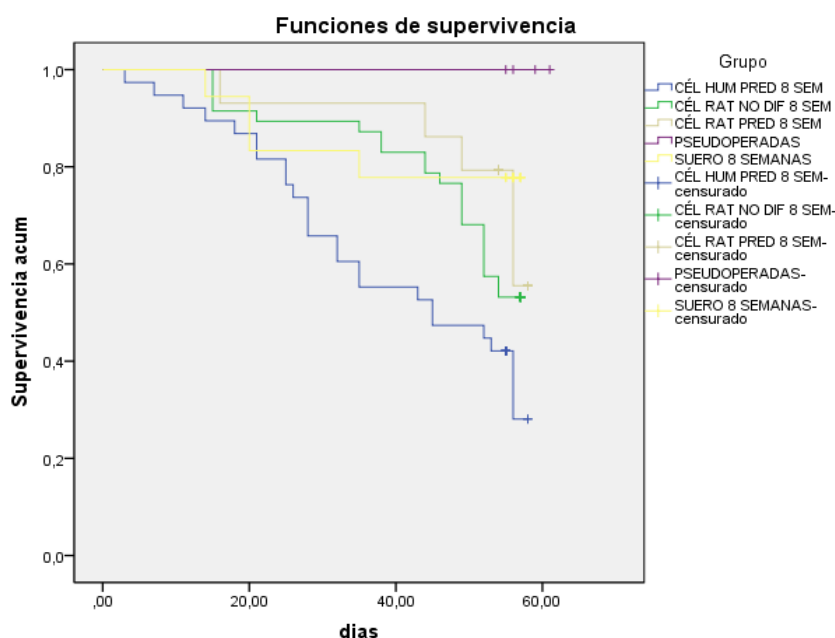
La supervivencia global fue del 56,1 %, produciéndose el fallecimiento de 61 de los 139 animales que formaban el estudio, apreciándose en las comparaciones globales de los grupos, diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,003$ ). La supervivencia por grupos se expone en la tabla 4 y en la figura 32 mediante una curva de Kaplan Meier.

**Tabla 4.** Supervivencia global. **SO:** pseudo-operadas. **CM-S:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino **CCRND:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas. **CCHP:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos **CCRP:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos.

GRUPO	SUPERVIVENCIA
<b>C</b> <b>SO</b> (n=20)	n=20 (100%)
<b>I</b> <b>CM-S</b> (n=20)	n=14 (70%)
<b>II</b> <b>(CCRND)</b> (n=47)	n=25 (53,2%)
<b>III</b> <b>(CCHP)</b> (n=38)	n=15 (39,5%)
<b>IV</b> <b>(CCRP)</b> (n=30)	n=20 (66,7%)

## RESULTADOS

A las 8 semanas de evolución p.o. el grupo control (C) presenta la mayor supervivencia, con un 100%, mientras que el grupo III, de ratas con colestasis y administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos, presenta la menor supervivencia con el 39,5%. En el grupo I, de ratas con colestasis microquirúrgica y administración de suero salino, la supervivencia fue del 70%, en el grupo II, de ratas con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas, la supervivencia fue del 53,2% y, por último, en el grupo IV, de ratas con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos sobrevivieron el 66,7% de los animales. En el análisis de comparaciones globales entre grupos se observa que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,003$ ). En el análisis de comparación por pares se concluye que la supervivencia menor es la conseguida por las ratas del grupo III, de colestasis microquirúrgica con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos (CCHP), existiendo diferencias estadísticamente significativas entre éste grupo, y los grupos control, de ratas pseudo-operadas (C;  $p=0,039$ ), de colestasis y administración de suero salino (CMS,  $p=0,012$ ) y IV, de colestasis e inyección de células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos (CCRP,  $p=0,002$ ).



**Figura 32. Curva de supervivencia de Kaplan Meier correspondiente a los cinco grupos de ratas Grupo C: Pseudo-operadas. Grupo I: Colestasis microquirúrgica y administración de suero salino Grupo II: Colestasis microquirúrgica con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas Grupo III: Colestasis microquirúrgica y administración de células madre adipocíticas humanas**

## RESULTADOS

---

*prediferenciadas a hepatocitos Grupo IV: Colestasis microquirúrgica con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos.*

### 1.A. RESULTADOS DE LA SERIE I, DE RATAS CON COLESTASIS Y ADMINISTRACIÓN INTRAHEPÁTICA DE SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA:

La Serie I está compuesta por ratas con colestasis y administración intrahepática de solución salina isotónica (CM-S) a las 2 semanas del p.o. Esta Serie estaba formada inicialmente por 20 animales, de los cuales 14 permanecían vivos en el momento del sacrificio (supervivencia del 70%).

La supervivencia de esta serie en función del periodo p.o., después de dos semanas de colestasis y realizar la inyección intrahepática de suero, fue la siguiente:

- **Supervivencia intraoperatoria** (administración de suero intrahepático) : 95% (19/20)
- **Supervivencia precoz** (primera semana post-administración del suero): 89,5 % (17/19)
- **Supervivencia intermedia** (a partir de la primera semana tras la administración de suero y hasta 2 semanas antes del sacrificio): 94,1% (16/17).
- **Supervivencia tardía** (desde la sexta a la octava semana de colestasis, en la cual se procedió a su sacrificio): 82,4% (14/17).

### 1. B. RESULTADOS DE LA SERIE II, DE RATAS CON COLESTASIS Y ADMINISTRACIÓN INTRAHEPÁTICA DE CÉLULAS MADRE ADIPOCÍTICAS NO DIFERENCIADAS DE RATA:

La Serie II está compuesta por ratas con colestasis y administración intrahepática de células madre adipocíticas no diferenciadas de rata (CCRND) a las 2 semanas del p.o. De los 47 animales que constituían este grupo, 25 permanecían vivos en el momento del sacrificio (supervivencia global del 53,2%).

La supervivencia de esta serie en función del periodo p.o., después de dos semanas de colestasis fue la siguiente:

- **Supervivencia intraoperatoria** (administración de las células madre): 91,5% (43/47)

## RESULTADOS

---

- **Supervivencia precoz** (primera semana post-administración de las células madre): 97,7 % (42/43)
- **Supervivencia intermedia** (a partir de la primera semana tras la administración de las células madre hasta 2 semanas antes del sacrificio): 92,9% (39/42)
- **Supervivencia tardía** (desde la sexta a la octava semana de colestasis, en la cual se procedió a su sacrificio): 59,5% (25/42).

### 1. C. RESULTADOS DE LA SERIE III, DE RATAS CON COLESTASIS Y ADMINISTRACIÓN INTRAHEPÁTICA DE CÉLULAS MADRE ADIPOCÍTICAS HUMANAS PREDIFERENCIADAS A HEPATOCITOS:

La Serie III está compuesta por ratas con colestasis y administración intrahepática de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos (CCHP) a las 2 semanas del p.o. De los 38 animales que constituían este grupo, 15 permanecían vivos en el momento del sacrificio (supervivencia de 39,4%).

La supervivencia de esta serie en función del periodo p.o., después de dos semanas de colestasis fue la siguiente:

- **Supervivencia intraoperatoria** (administración de las células madre): 89,4% (34/38)
- **Supervivencia precoz** (primera semana post-administración de las células madre): 88,2 % (30/34)
- **Supervivencia intermedia** (a partir de la primera semana tras la administración de las células madre hasta 2 semanas antes del sacrificio): 66,7% (20/30).
- **Supervivencia tardía** (desde la sexta a la octava semana de colestasis, en la cual se procedió a su sacrificio): 46,7% (14/30).

### 1. D. RESULTADOS DE LA SERIE IV, DE RATAS CON COLESTASIS Y ADMINISTRACIÓN INTRAHEPÁTICA DE CELULAS MADRE ADIPOCÍTICAS DE RATA PREDIFERENCIADAS A HEPATOCITOS

La Serie IV está compuesta por ratas con colestasis y administración intrahepática de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos (CCRP) a las 2 semanas p.o. De los 30 animales que constituían

## RESULTADOS

---

este grupo, 20 permanecían vivos en el momento del sacrificio (supervivencia global del 66,7%).

La supervivencia de esta serie en función del periodo p.o., después de dos semanas de colestasis fue la siguiente:

- **Supervivencia intraoperatoria:** (administración de las células madre) 93,3% (28/30).
- **Supervivencia precoz** (primera semana post-administración de células madre): 100% (28/28).
- **Supervivencia intermedia** (a partir de la primera semana tras la inyección de células madre hasta 2 semanas antes del sacrificio): 100% (28/28).
- **Supervivencia tardía** (desde la sexta a la octava semana de colestasis., en la cual se procedió a su sacrificio): 71,4% (20/28).

Las conclusiones en relación a los resultados de supervivencia son las siguientes:

- Hay un descenso no significativo de la **supervivencia intraoperatoria** en el grupo que recibió células madre humanas (CCHP; 89,4%), respecto a los grupos con solución salina (CMS; 95%), con células madre de rata indiferenciadas (CCRND; 91,5%) y con células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos (CCRP; 93,3%).
- Por el contrario en fases posteriores tras la inyección intrahepática de suero salino o de células madre, se produce un descenso significativo ( $p=0,05$ ) de la **supervivencia precoz** en las ratas que recibieron solución salina (CMS; 89,5%), y en las que se administraron células madre humanas (CCHP; 88,2%), respecto a los grupos, con células madre de rata indiferenciadas (CCRND; 97,7%) y con células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos (CCRP; 100%).
- Hay un descenso significativo ( $p= 0.05$ ) de la **supervivencia intermedia** en el grupo que recibió células madre humanas (CCHP; 66,7%), respecto a los grupos con solución salina (CMS; 94,1%), con células madre de rata indiferenciadas (CCRND; 92,9%) y con células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos (CCRP; 100%).

## RESULTADOS

- Por último, hay también un descenso significativo ( $p=0,01$ ) de la **supervivencia tardía** en el grupo que recibió células madre humanas (CCHP; 46,7%), respecto a los grupos con solución salina (CMS; 82,4%), con células madre de rata indiferenciadas (CCRND; 59,5%) y con células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos (CCRP; 71,4%).

**Tabla 5. Supervivencia acumulada dividida en periodos en los diferentes grupos de ratas con colestasis: CM-S:** Colestasis con administración de suero salino. **CCRND:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas. **CCHP:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos. **CCRP:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos

SUPERVIVENCIA	CM-S (n=20)	CCRND (n=47)	CCHP (n=38)	CCRP (n=30)
<b>Intraoperatoria</b>	95% (19/20)	91,5%(43/47)	89,4% (34/38)	93,3% (28/30)
<b>Precoz (1ª semana)</b>	89,5 % (17/19)	97,7%(42/43)	88,2 % (30/34)	100 % (28/28)
<b>Intermedia (1º-4º semana)</b>	94,1% (16/17)	92,9%(39/42)	66,7%(20/30))	100% (28/28)
<b>Tardía (6ª-8ª semana)</b>	82,4% (14/17)	59,5% (25/42)	46,7% (14/30)	71,4% (20/28)
<b>Global</b>	70% (14/20)	53,2% (25/47)	39,4% (15/38)	66,7%(20/30)

## 2. COMPLICACIONES POST-OPERATORIAS

Las complicaciones más frecuentes que presentaron los animales durante el postoperatorio fueron:

1. Peritonitis biliar y fallecimiento secundario (3 casos) Los 3 casos correspondieron: 1 al grupo de ratas con colestasis y administración de solución salina (CM-S), 1 al grupo de colestasis y administración de células madre adipocíticas de rata indiferenciadas (CCRND) y, el último al grupo con colestasis y administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos (CCRP).
2. Eventración en la cicatriz de laparotomía (2 casos), con formación de lesiones ulcerosas. Los 2 casos correspondieron al grupo de ratas con

## RESULTADOS

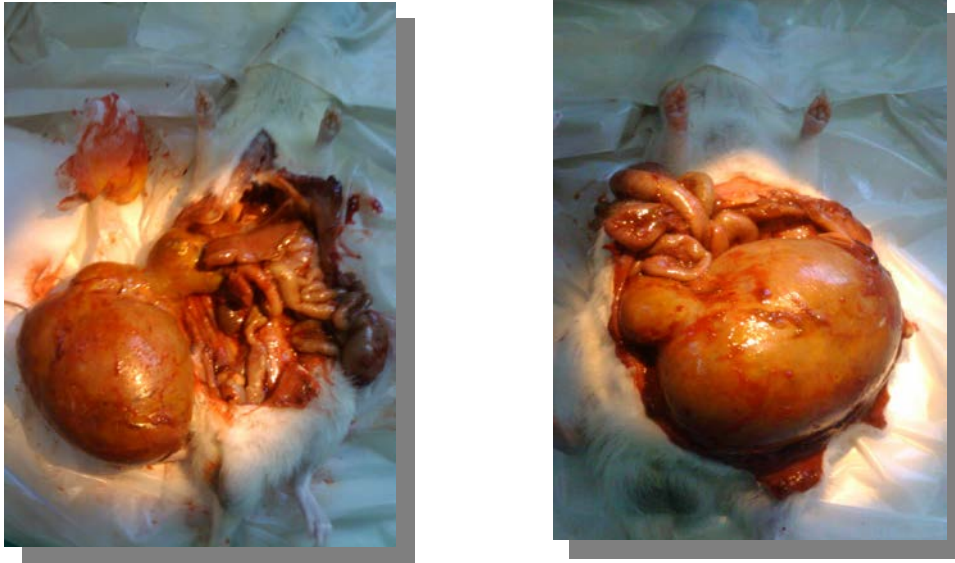
---

colestasis y administración de células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos (CCHP) (figura 33).

3. Formación de abscesos crónicos calcificados sobre la cicatriz de laparotomía (5 casos) Los 5 casos correspondieron, 2 al grupo de ratas colestásicas con administración de células madre de rata indiferenciadas (CCRND) y 3 casos al grupo de ratas con colestasis y administración de células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos (CCRP).
4. Complicaciones hemorrágicas (1 caso) Hemoperitoneo tras punción del parénquima hepático, que fue controlado en el momento del sangrado con medidas de compresión y sustancias hemostáticas. Esta complicación ocurrió en una rata con colestasis y administración de células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos (CCHP).
5. Exitus inmediatamente tras la la inyección intrahepática de células madre de rata indiferenciadas (CCRND) en tres ratas.
6. Morbilidad hepática: Se identificó la presencia de mínimos quistes biliares y abscesos hepáticos en 3 casos de ratas con colestasis y administración de células madre de rata indiferenciadas. (CCRND).
7. Síndrome adherencial intenso en una rata del grupo con colestasis y administración de células madre de rata indiferenciadas. (CCRND) (1 caso) que produjo un cuadro de obstrucción intestinal (figura 34).



**Figura 33. Complicaciones postoperatorias:** Úlcera sobre la cicatriz de laparotomía secundaria a infección local en una rata del grupo con colestasis y administración de células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos (CCHP).

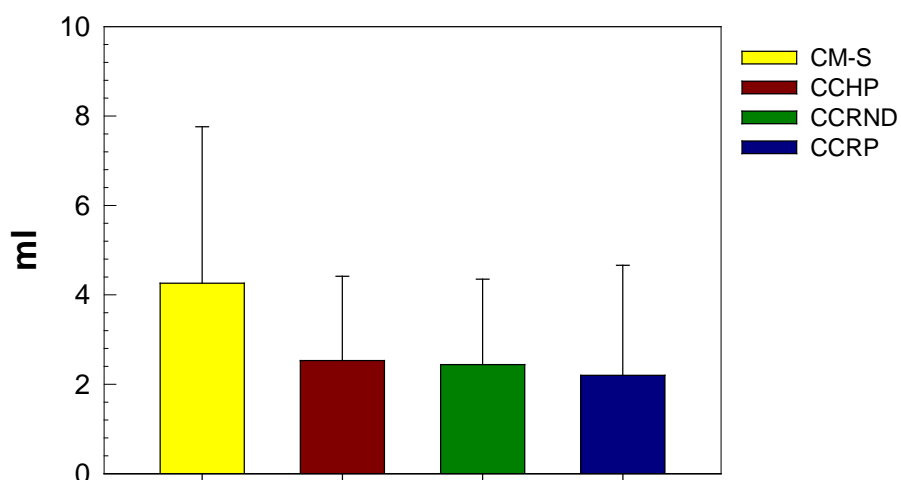


**Figura 34. Complicaciones postoperatorias:** Obstrucción intestinal por adherencias peritoneales en una rata del grupo con colestasis y administración de células madre de rata indiferenciadas (CCRND).

### 3. ASCÍTIS

La producción de líquido ascítico fue superior en las ratas con colestasis microquirúrgica y administración de suero salino respecto de los grupos a los que se administraron células madre adipocíticas, tanto humanas prediferenciadas a hepatocitos (CCHP), como de rata, indiferenciadas (CCRND) y prediferenciadas (CCRP) (Tabla 6, ANEXO 2, y figura 35).

#### VOLUMEN DE LIQUIDO ASCITICO



**Figura 35 Volumen de líquido ascítico en ratas con colestasis. CM-S:** Colestasis con administración de suero salino. **CCRND:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas. **CCHP:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos. **CCRP:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos

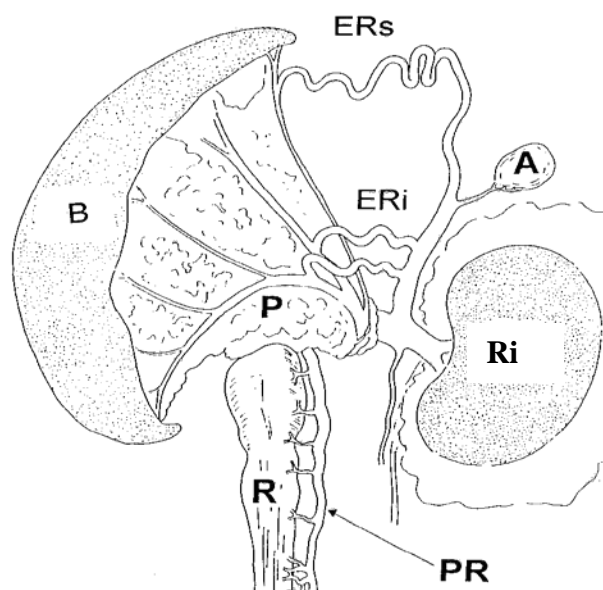
Resulta llamativo que en las ratas colestásicas, el volumen de líquido ascítico acumulado en la cavidad abdominal cuando se sacrifican, es menor en aquellos animales a los que se les administraron células madre respecto de los que tan solo recibieron solución salina, si bien ésta diferencia, aunque es prácticamente del doble, no alcanza significación estadística, posiblemente por la dispersión de los datos. (Figura 35).

Por el contrario, entre los grupos de animales a los que se les administraron células madre no se aprecian grandes diferencias, sin embargo, se observa que el volumen de líquido ascítico es menor en los grupos en que se administraron células de rata, en relación a aquellos que recibieron células humanas, sobre todo en el grupo que recibió células de rata prediferenciadas a hepatocitos.

#### 4. CIRCULACION COLATERAL VENOSA PORTOSISTÉMICA

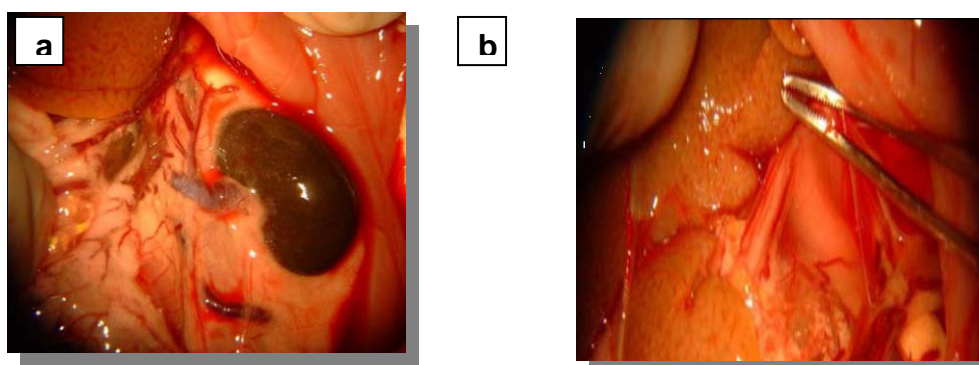
Se ha estudiado aquellas áreas donde se desarrolla habitualmente circulación colateral venosa en las ratas con hipertensión portal, es decir, en las áreas esplenorrenal (CER), gastroesofágica (colaterales paraesofágicas: CPE), y pararectal (CPR).

- Área Esplenorrenal: Se forman la vena esplenorrenal craneal (anterior o proximal), y la esplenorrenal caudal (posterior o distal), que drenan a distinta altura en la vena suprarrenal izquierda (figura 36).
- Área Gastroesofágica: Las colaterales paraesofágicas son dos venas tortuosas y de grueso calibre que ascienden por la cara anterior y posterior del esófago: paraesofágica anterior y posterior.
- Área Colorrectal: Se localiza la vena mesentérica inferior, que se continúa con las venas hemorroidales en situación pararectal izquierda (Figura 36).



**Figura 36.** Representación de circulación colateral porto-sistémica tras colestasis microquirúrgica en la rata. Ri: Riñón; A: Glándula adrenal; B: Bazo; P: Páncreas; ERs: Circulación esplenorrenal superior; ERi: Circulación esplenorrenal inferior; R: Recto; PR: Circulación pararrectal;

En los grupos de ratas con colestasis no se aprecian diferencias significativas en cuanto al desarrollo de circulación colateral venosa, estando presente en todos los grupos y en todas las áreas anatómicas descritas (tabla 7, ANEXO 2, figura 37).



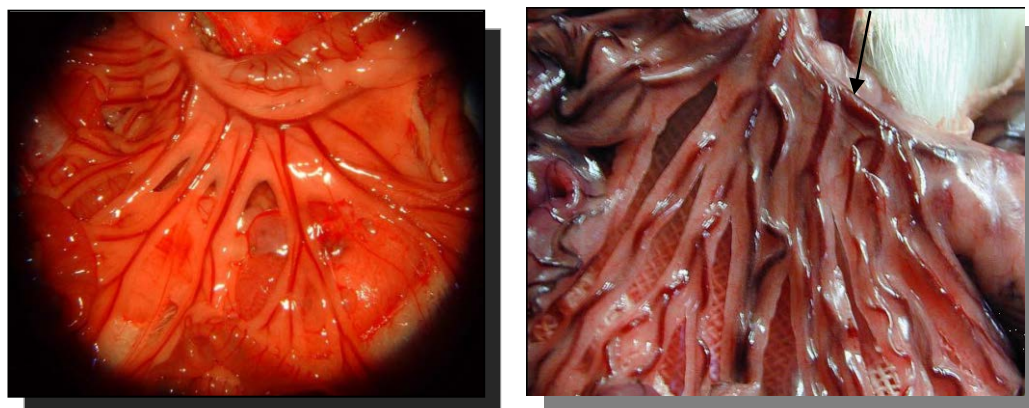
**Figura 37.** Imagen fotográfica en la que se observa la existencia de circulación colateral venosa esplenorrenal (a) y paraesofágica (b), a las 8 semanas de evolución postoperatoria, en una ratona con colestasis microquirúrgica a la que se le administró solución salina.

### 5. VASCULOPATIA VENOSA MESENTERICA

En todos los animales con colestasis, es decir con colestasis y administración de suero salino (CM-S), con colestasis y administración de

## RESULTADOS

células madre de rata no diferenciadas (CCRND), con colestasis y administración de células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos (CCHP) y las ratas con colestasis y administración de células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos (CCRP), se comprobó el desarrollo de vasculopatía venosa mesentérica (VVM) de grado I, no apreciándose en ninguno VVM espontánea o de tipo II (tabla 8, ANEXO 2, figura 38).



**Figura 38. Vasculopatía venosa mesentérica:** A la izquierda, rata pseudo-operada en la que se observa una vascularización fisiológica o normal del mesenterio de la rata. A la derecha, rata del grupo CM-S (Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino) en la que se aprecia vasculopatía de grado I, con dilatación y tortuosidad tras el clampaje transitorio (2 minutos) de la vena mesentérica superior.

### 6. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL

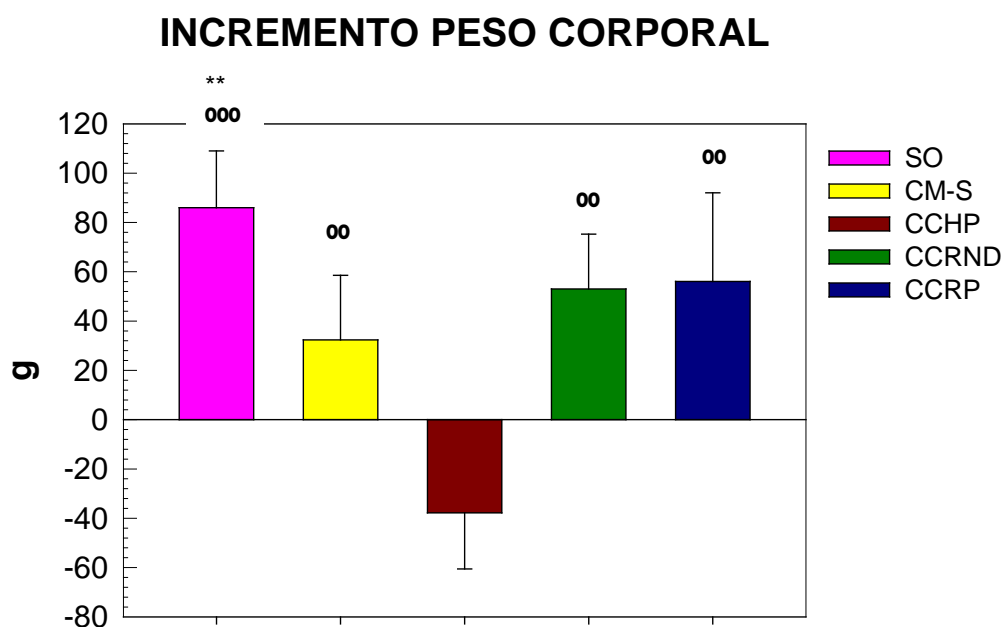
Los resultados correspondientes al peso corporal tanto al inicio (PCI) como al final del estudio (PCF) de los animales, así como el incremento de PC durante su evolución p.o., se representan en la Tabla 9, ANEXO 2.

El PCI es significativamente menor en el grupo **CCRND** (Colestasis con administración de células madre de rata no diferenciadas) que en los grupos **CCRP** ( $p < 0,05$ ) (Colestasis con administración de células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos) y **CCHP** ( $p < 0,01$ ) (Colestasis con administración de células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos). El PCF es significativamente mayor en el grupo **CCRP** (Colestasis con administración de células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos) que en los grupos **CCHP** ( $p < 0,01$ ) (Colestasis con administración de células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos) y **CM-S** ( $p < 0,05$ ) (Colestasis microquirúrgica con administración de suero). (Tabla 9, ANEXO I, Figura 39).

## RESULTADOS

En lo que al incremento del peso corporal ( $\Delta$ PC) se refiere, se produce una disminución significativa del mismo en las ratas colestásicas con administración de células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos (**CCHP**) respecto del resto de los grupos colestáticos ( $p < 0,01$ ), como del grupo de ratas seudo-operadas ( $p < 0,001$ ).

Además, en el grupo de ratas seudo-operadas (**SO**) hay un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ) del peso corporal, y en los grupos de ratas con colestasis que recibieron células madre de rata, tanto no diferenciadas (**CCRND**), como prediferenciadas a hepatocitos (**CCRP**) el aumento del  $\Delta$ PC es casi del doble en relación al grupo que recibió suero (**CM-S**). (Figura 39).



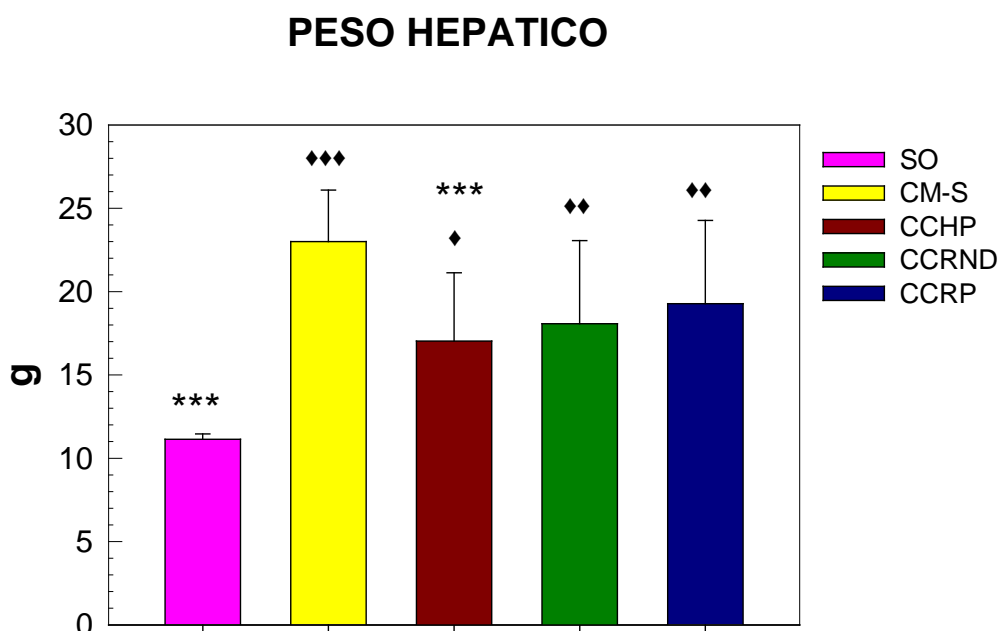
**Figura 39. Incremento de peso corporal ( $\Delta$  peso; g) en las ratas de los grupos de estudio: **SO**: Seudo-operadas; **CM-S**: Colestasis con administración de suero salino. **CCRND**: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas. **CCHP**: Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos. **CCRP**: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos; Media  $\pm$  DE \*\* $p < 0,01$ : Valor estadísticamente significativo respecto de CM-S;  $^{00}p < 0,01$ ,  $^{000}p < 0,001$ : Valor estadísticamente significativo respecto de CCHP.**

### 7. PESO HEPÁTICO

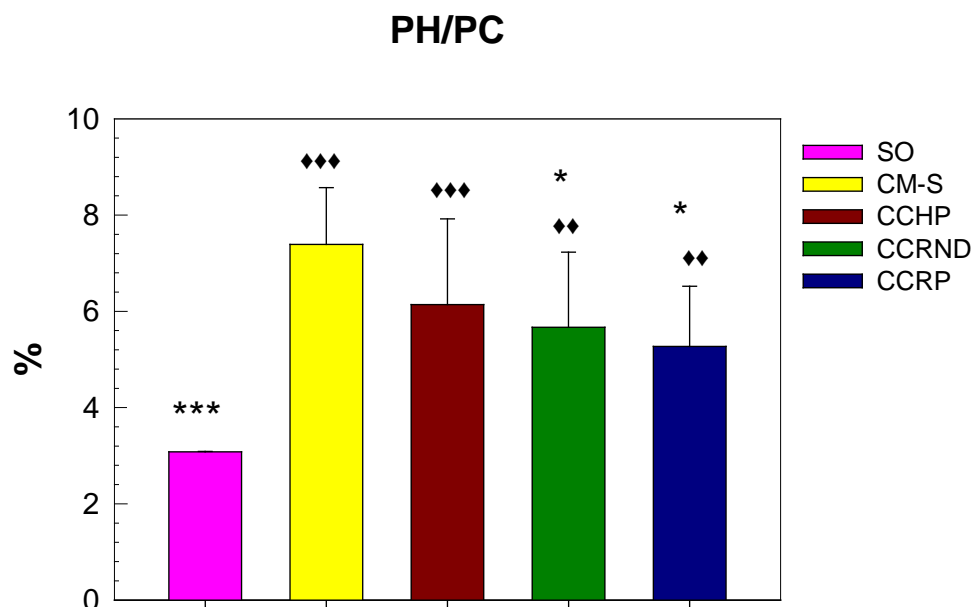
En relación al peso hepático, este es significativamente superior en las ratas colestásicas a las que sólo se les inyectó solución salina (CM-S) respecto

## RESULTADOS

a las ratas pseudo-operadas ( $p < 0,001$ ) y a todos los grupos de animales con colestasis a los que se les administraron células madre adipocíticas, tanto de rata no diferenciadas (CCRND) y prediferenciadas a hepatocitos (CCRP), como las humanas prediferenciadas a hepatocitos CCHP ( $p < 0,05$ ). Lo mismo ocurre con la relación PH/PC, que es también, estadísticamente superior en los animales con colestasis e inyección de suero (CM-S) respecto a las ratas pseudo-operadas ( $p < 0,001$ ) y a las colestásicas a las que se les inyectaron células madre. Estas diferencias son más marcadas en relación a los grupos que recibieron células madre de rata, tanto no diferenciadas (CCRND;  $p < 0,05$ ), como las prediferenciadas a hepatocitos (CCRP;  $p < 0,05$ ). (Tabla 10, ANEXO 2, figuras 40 y 41).



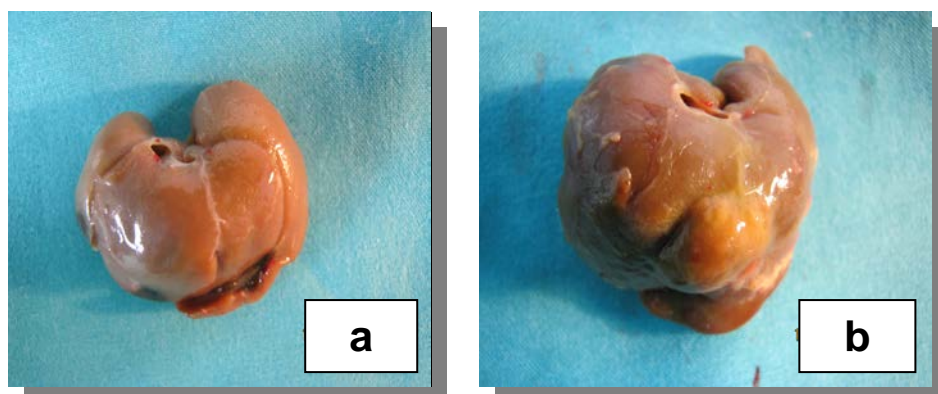
**Figura 40. Peso hepático (PH;g).** **SO:** Pseudo-operadas **CM-S:** Colestasis con administración de suero salino. **CCRND:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata indiferenciadas. **CCHP:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos. **CCRP:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos; Media  $\pm$  DE: ♦ $p < 0,05$ ; ♦♦ $p < 0,01$ ; ♦♦♦ $p < 0,001$ : Valor estadísticamente significativo respecto de SO; \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ : Valor estadísticamente significativo respecto de CM-S.



**Figura 41. Relación peso hepático / peso corporal x 100 (PH/PC; %) en las ratas de los diferentes grupos de estudio: SO: seudo-operadas; CM-S: Colestasis con administración de suero salino. CCRND: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas. CCHP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos. CCRP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos; Media ± DE:♦♦p<0.01;♦♦♦p<0.001:Valor estadísticamente significativo respecto de SO; \*p<0.05; \*\*\*p<0,001: Valor estadísticamente significativo respecto de CM-S.**

Es de interés destacar que la hepatomegalia, tanto en valor absoluto, como cuando se estudia la relación peso hepático/peso corporal, en comparación a los valores de referencia que se obtienen al pesar los hígados de las ratas seudo-operadas, es inferior en las ratas con colestasis a las que se les administran células madre respecto de aquellas que sólo recibieron suero salino. Se observa también que el grupo con menor hepatomegalia, y por tanto con pesos hepáticos más aproximados a los pesos de los hígados de las ratas seudo-operadas, es aquel al que se le administraron células madre humanas, si consideramos los valores absolutos, pero al estudiar la relación peso hepático/peso corporal, los animales con menor incremento del peso hepático, y con pesos hepáticos más aproximados a los pesos de los hígados de las ratas seudo-operadas, son aquellos a los que se les administraron células madre de rata, sobre todo las que recibieron células prediferenciadas a hepatocitos (Figuras 40 y 41). En la figura 42 se puede apreciar el aspecto macroscópico del hígado de una rata con colestasis microquirúrgica y administración de células madre y otra del grupo de ratas colestásicas a la que se le inyectó suero.

## RESULTADOS



**Figura 42.** .Fotografía comparativa del aspecto macroscópico del hígado en una rata con colestasis microquirúrgica y administración de células madre adipocíticas prediferenciadas a hepatocitos (a) y otra del grupo de ratas colestásicas con suero (b). Se aprecia hepatomegalia, ictericia y aumento de la consistencia en mayor grado en el hígado de la rata con colestasis y administración de solución salina, respecto al hígado de la rata colestásica a la que se administraron células madre.

Respecto de la evolución de los pesos lobulares hepáticos, se produce un aumento del peso del lóbulo medio hepático (LM) en el grupo de ratas con colestasis y solución salina (CM-S) respecto a las ratas seudo-operadas ( $p < 0,01$ ), y al resto de los grupos de animales colestáticos con células madre, si bien éste, en los animales colestáticos, no alcanza significación estadística. También se puede comprobar un aumento significativo del peso del lóbulo lateral derecho (LLD) en el grupo CM-S respecto a las ratas seudo-operadas ( $p < 0,001$ ) y a los grupos de ratas con colestasis que recibieron células madre, tanto de rata no diferenciadas (CCRND;  $p < 0,05$ ), como humanas prediferenciadas a hepatocitos (CCHP;  $p < 0,01$ ). El peso del lóbulo lateral izquierdo (LLI) es significativamente mayor en el grupo CM-S respecto a las ratas seudo-operadas ( $p < 0,001$ ) y al grupo CCHP ( $p < 0,05$ ). Por último, el peso del lóbulo caudado (LC) es superior en las ratas colestáticas con suero (CM-S) y con células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos (CCRP), respecto al grupo de ratas seudo-operadas ( $p < 0,001$ ) y al grupo que recibieron células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos (CCHP), si bien éste aumento no alcanza significación estadística (Tabla 11).

**Tabla 11. Peso de los lóbulos medio (PLM), lateral derecho (PLLD), lateral izquierdo (PLLI) y caudado (PLC) hepáticos en las ratas de los diferentes grupos de estudio: SO: Seudo-operadas; CM-S: Colestasis con administración de suero salino. CCRND: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas. CCHP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas**

## RESULTADOS

prediferenciadas a hepatocitos. **CCRP**: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos.

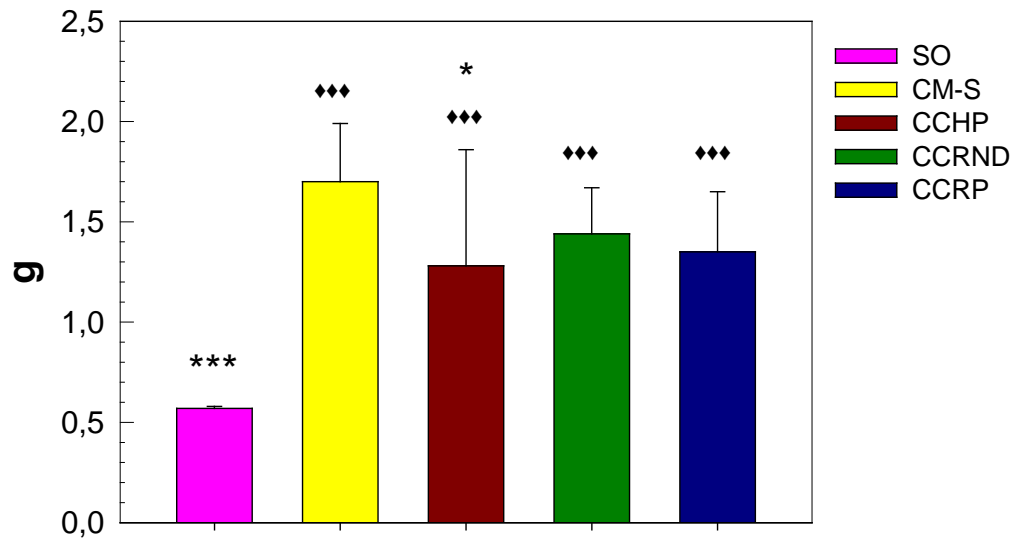
GRUPO	PLM (g)	PLLD (g)	PLLI (g)	PLC (g)
SO (n=20)	4,37** ± 0,09	2,36*** ± 0,12	3,43*** ± 0,18	0,79** ± 0,10
I CM-S (n=20)	7,14♦♦ ± 1,5	6,18♦♦♦ ± 1,84	7,55♦♦♦ ± 1,23	2,13♦♦ ± 0,46
II (CCHP) (n=38)	5,84 ± 2,2	3,79** ± 1,8	5,73♦ ± 1,47	1,67 ± 0,78
III (CCRPND) (n=47)	5,54 ± 1,76	4,22* ± 1,46	6,34♦ ± 2,15	1,96♦ ± 0,73
IV CCRP (n=30)	5,56 ± 1,35	5,11♦♦ ± 1,85	6,36♦ ± 2,04	2,24♦♦ ± 1,06

Media ± DE: ♦♦p<0.01; ♦♦♦p<0.001: Valor estadísticamente significativo respecto de SO; \*p<0.05; \*\*\*p<0,001: Valor estadísticamente significativo respecto de CM-S.

### 8. PESO ESPLÉNICO

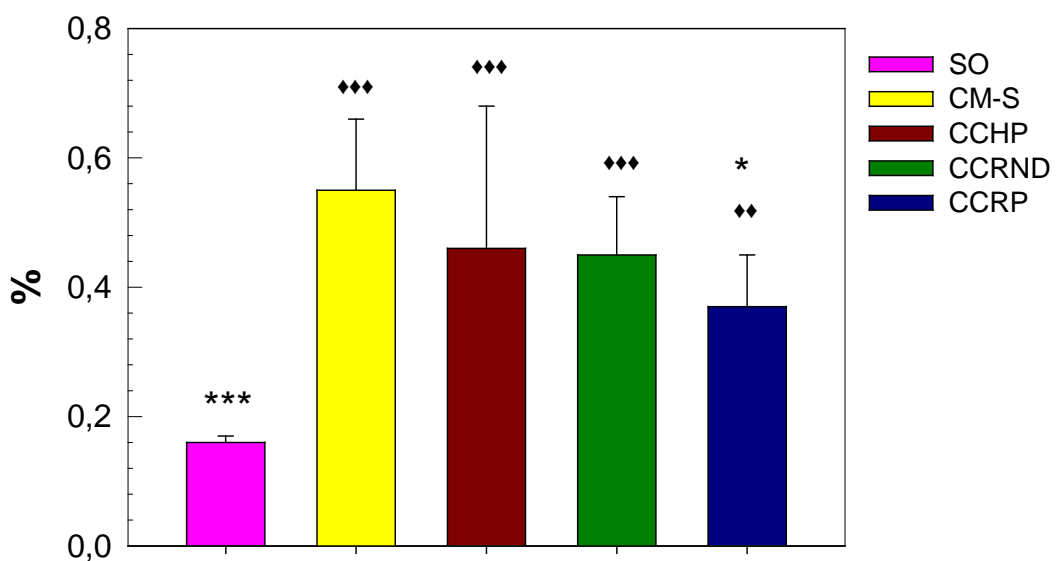
Todos los grupos de ratas con colestasis microquirúrgica presentan esplenomegalia cuando se comparan con las ratas pseudo-operadas, si bien, en las ratas colestásicas que recibieron tan solo solución salina (CM-S) el incremento del peso esplénico es más marcado en relación al resto de los grupos, existiendo diferencias significativas ( $p<0,5$ ) con el grupo de ratas colestásicas a las que les administraron células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos (CCHP). La relación PE/PC es, también, mayor en el grupo CM-S en relación al resto de los grupos, siéndo esta diferencia significativa ( $p<0,5$ ) respecto al grupo de ratas colestásicas a las que se inyectaron células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos (CCRP). (Tabla 12, ANEXO 2, figuras 43 y 44).

PESO ESPLÉNICO



**Figura 43. Peso esplénico (PE;g) en las ratas de de los diferentes grupos de estudio:** **SO:** Seudo-operadas **CM-S:** Colestasis con administración de suero salino. **CCRND:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas. **CCHP:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos. **CCRP:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos; Media  $\pm$  DE;  $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$   $p < 0.001$ : Valor estadísticamente significativo respecto de SO;  $***p < 0.001$ ;  $*p < 0.05$ ; Valor estadísticamente significativo respecto de CM-S.

PE/PC



## RESULTADOS

**Figura 44. Relación peso esplénico / peso corporal x 100 (PE/PC; %) en las ratas de los diferentes grupos de estudio: SO: Seudo-operadas CM-S: Colestasis con administración de suero salino. CCRND: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas. CCHP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos. CCRP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos. Media  $\pm$  DE;  $\blacklozenge p < 0.01$ ;  $\blacklozenge\blacklozenge p < 0.001$ : Valor estadísticamente significativo respecto de SO.;  $***p < 0.001$ ;  $*p < 0.05$ ; Valor estadísticamente significativo respecto de CM-S.**

Todas las ratas colestásicas presentaron esplenomegalia ( $p < 0.001$ ) respecto a las ratas seudo-operadas. Sin embargo, al igual que ocurría con la hepatomegalia, el incremento del peso esplénico es inferior en las ratas colestásicas que recibieron células madre respecto de aquellas a las que se inyectó sólo suero salino intrahepático (Figura 43). También se puede observar que en los grupos tratados con células madre se produce un aumento significativo de la relación PE/PC respecto a las ratas seudo-operadas: CM-S, CCRND, y CCHP ( $p < 0.001$ ), siendo este aumento menos marcado en el grupo de ratas colestáticas que recibieron células madre de rata prediferenciadas ( $p < 0.01$ ). Entre los grupos colestáticos se observa que en el grupo tratado con suero se produce un aumento más marcado de la relación PE/PC, que en los grupos tratados con células madre (figura 44). En la figura 45 se puede apreciar el aspecto macroscópico del bazo de una rata con colestasis microquirúrgica y administración intrahepática de células madre, y otra del grupo de ratas colestáticas a las que se administró suero.

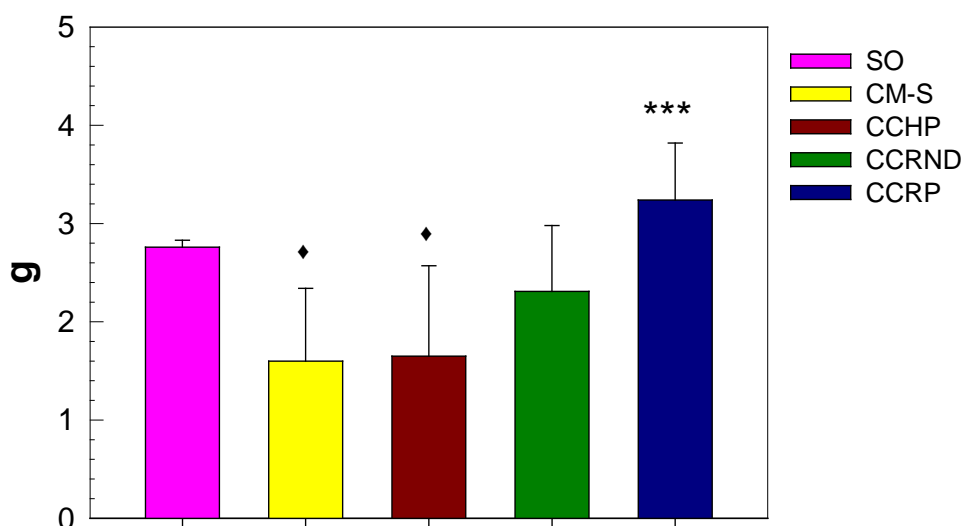


**Figura 45. Fotografía comparativa del tamaño del bazo de una rata del grupo con colestasis y administración de suero (CM-S) a la izquierda, y otra, a la derecha, de una rata seudo-operada (SO).**

### 9. PESO TESTICULAR

Las ratas con colestasis a las que se inyectó sólo suero salino intrahepático (CM-S), sufrieron atrofia testicular cuando se comparan con las ratas SO ( $p < 0.05$ ) (Tabla 13; Figura 46) y al resto de los grupos colestáticos que recibieron células madre, siendo esta diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) con el grupo de ratas que recibieron células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos (CCRP) que incluso llegan a tener un tamaño testicular mayor a las ratas seudo-operadas (SO); (Tabla 13, ANEXO 2, Figura 46).

### PESO TESTICULAR

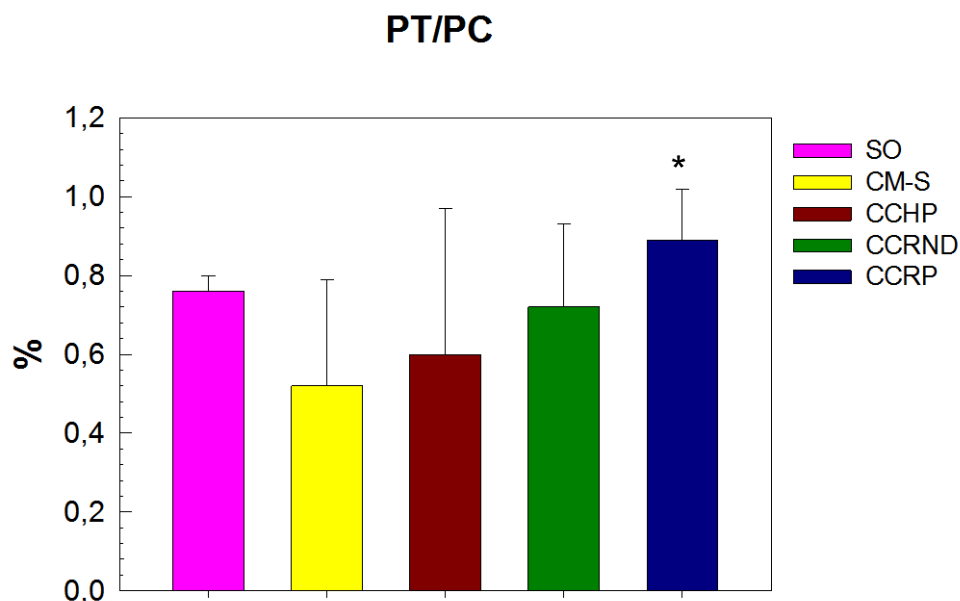


**Figura 46. Peso testicular bilateral (PT:g) en las ratas de de los diferentes grupos de estudio.** **SO:** Seudo-operadas **CM-S:** Colestasis con administración de suero salino. **CCRND:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas. **CCHP:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos. **CCRP:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos. Media  $\pm$  DE; ♦  $p < 0.05$ : Valor estadísticamente significativo respecto de SO; \*\*\*  $p < 0.001$ : Valor estadísticamente significativo respecto de CM-S.

La relación PT/PC es también menor en las ratas con insuficiencia hepática colestásica a las que se inyectó suero salino intrahepático (CM-S) respecto al grupo de ratas seudo-operadas y al resto de los grupos colestáticos que recibieron células madre. Dentro de las ratas colestáticas, el índice PT/PC es inferior en el grupo CM-S que en los grupos con colestasis que recibieron células madre, existiendo diferencias significativas respecto al grupo con células

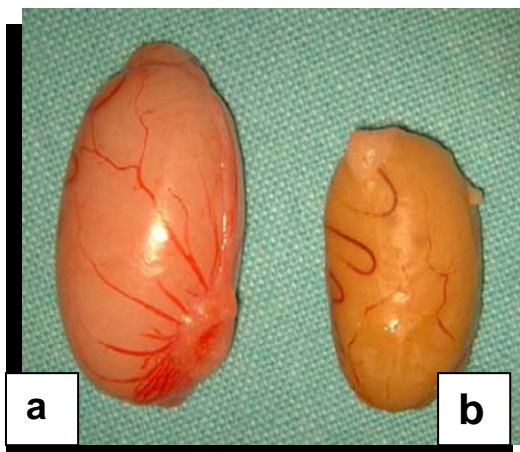
## RESULTADOS

madre de rata preferenciadas a hepatocitos (CCRP;  $p < 0,05$ ). (Tabla 13, ANEXO 2, figuras 47 y 48).



**Figura 47. Peso testicular bilateral (PT;g) y Relación peso testicular / peso corporal x 100 (PT/PC en las ratas de de los diferentes grupos de estudio: SO: Seudo-operadas CM-S: Colestasis con administración de suero salino. CCRND: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas. CCHP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas preferenciadas a hepatocitos. CCRP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata preferenciadas a hepatocitos. Media  $\pm$  DE; \* $p < 0,05$ : Valor estadísticamente significativo respecto de CM-S.**

En la figura 48 se puede apreciar el aspecto macroscópico de los testículos de una rata con colestasis microquirúrgica y administración de células madre preferenciadas a hepatocitos (CCRP) y otra del grupo con colestasis y administración de suero (CM-S), comprobándose la atrofia testicular que se produce en las ratas del último grupo.

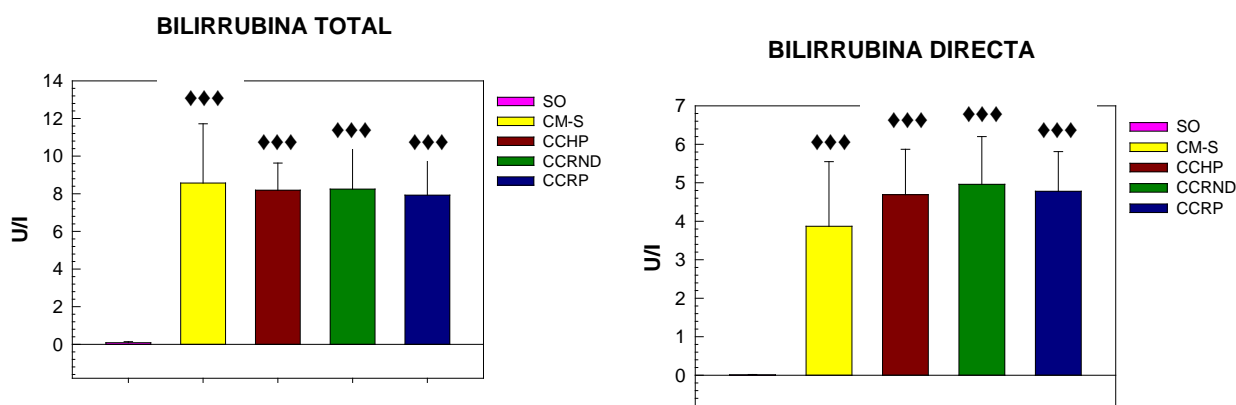


## RESULTADOS

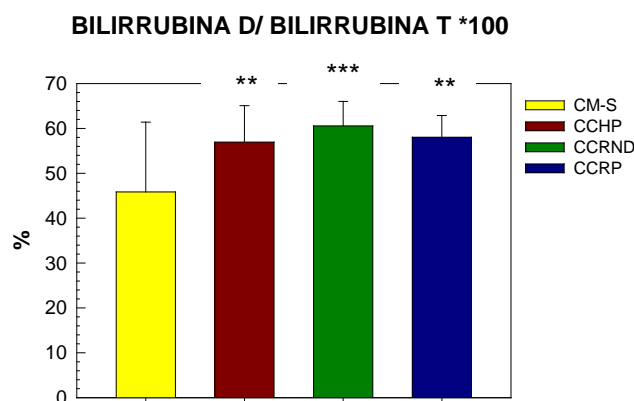
**Figura 48.** Imagen comparativa del tamaño testicular en una rata (a) del grupo de colestasis con administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos (CCRP) y en otra (b) del grupo de colestasis con administración de suero salino (CM-S).

### 10. DETERMINACIONES SÉRICAS DE FUNCIÓN HEPÁTO-BILIAR

En relación a los valores de **bilirrubina** se observa que, todos los grupos de ratas con colestasis microquirúrgica presentan valores significativamente mayores ( $p < 0,001$ ), tanto de bilirrubina total como de bilirrubina directa, cuando se comparan con las ratas pseudo-operadas. Respecto de las ratas con colestasis que recibieron suero salino (CM-S), presentan valores de bilirrubina total (BT) mayores, en tanto que los de bilirrubina directa (BD) son inferiores, respecto al resto de los grupos de animales colestásicos, tanto aquellos con células madre de rata no diferenciadas (CCRND), con células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos (CCHP) y con células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos (CCRP). Respecto del índice BD/BT, se produjo un descenso estadísticamente significativo en el grupo que recibió suero salino (CM-S) en relación al resto de los grupos colestásicos, tanto los que recibieron células madre prediferenciadas a hepatocitos, ya humanas (CCHP;  $p < 0,01$ ) o de rata (CCRP;  $p < 0,01$ ), como aquellas que recibieron células madre no diferenciadas de rata (CCRND) ( $p < 0,001$ ). (Tabla 14, ANEXO 2, Figura 49).



## RESULTADOS



**Figura 49. Concentraciones séricas de Bilirrubina Total (BT; mg/dl) y Bilirrubina Directa (BD; mg/dl), % de Bilirrubina Directa en relación a Bilirrubina Total (BD/BTx100), en las ratas de los diferentes grupos de estudio: SO: seudo-operadas; CM-S: Colestasis con administración de suero salino CCRND: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas. CCHP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos CCRP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos. Media±DE; ♦♦♦p<0,001: Valor estadísticamente significativo respecto de SO; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0,001: Valor estadísticamente significativo respecto de CM-S.**

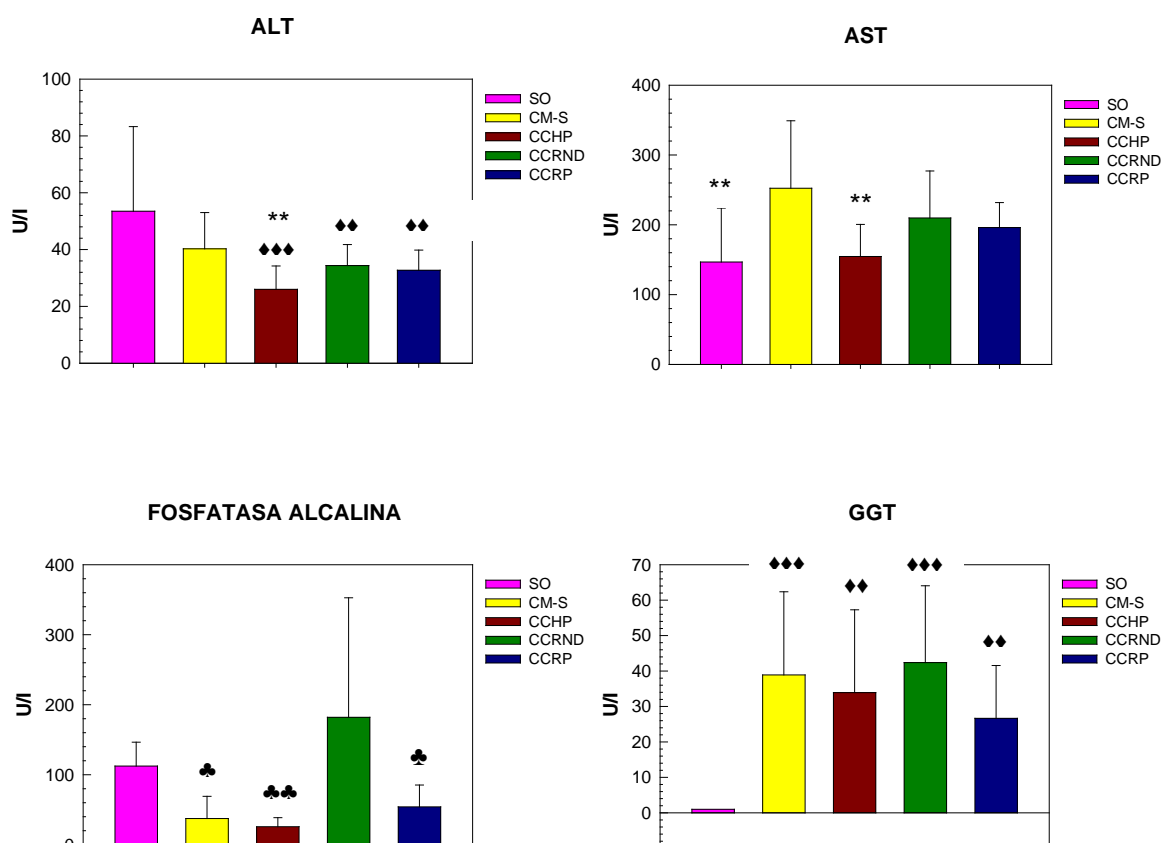
En el grupo de ratas con colestasis que recibieron suero salino (CM-S), los valores de **Aspartato-aminotransferasa** (AST) son mayores ( $p<0,01$ ) respecto al grupo de ratas seudo-operadas (SO) y a los grupos en que se administraron células madre, existiendo tan sólo en éstos últimos grupos diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,01$ ) en comparación con los grupos de ratas colestásicas a las que se administraron células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos (CCHP).

Así mismo, en el grupo de ratas seudo operadas (SO), los valores de **Alanin-aminotransferasa** (ALT) son mayores respecto a los grupos en que se administraron células madre, y al grupo que recibió suero (CM-S) existiendo diferencias estadísticamente significativas en comparación con los grupos de ratas colestasicas a las que se administraron células madre, tanto de rata no diferenciadas y prediferenciadas (CCRND y CCRP;  $p<0,01$ ), como humanas prediferenciadas (CCHP;  $p<0,01$ ). Entre los grupos de ratas colestasicas, los valores de Alanin-aminotransferasa (ALT) son mayores en el grupo de recibió suero salino (CM-S) en comparación al resto de los grupos, existiendo diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,01$ ) en comparación al grupo de ratas colestásicas a las que se administraron células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos (CCHP). (Tabla 15, Figura 50).

## RESULTADOS

En cuanto a las concentraciones séricas de **Fosfatasa Alcalina (FA)**, aumentan en las ratas con colestasis e inyección de células madre no diferenciadas de rata (CCRND) en relación a los grupos de ratas pseudooperadas y ratas colestasicas, ya con suero salino (CM-S;  $p < 0,05$ ), con administración de células madre de rata prediferenciadas (CCRP;  $p < 0,05$ ), y de células madre humanas prediferenciadas (CCHP;  $p < 0,01$ ).

Por el contrario, no se aprecian diferencias significativas en los valores de Gamma-Glutamiltranspeptidasa (**GGT**) entre los grupos de ratas colestasicas estudiados, pero si existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de ratas seudo operadas y los grupos colestasicos, tanto con suero salino (CM-S;  $p < 0,001$ ), como tras la administración de células madre de rata prediferenciadas (CCRP;  $p < 0,01$ ), de células madre humanas prediferenciadas (CCHP;  $p < 0,01$ ), y de células madre de rata no diferenciadas (CCRND;  $p < 0,001$ ). (Tabla 15, ANEXO 1, figura 50).



**Figura 50. Concentración sérica de AST (U/l), ALT (U/l), FA(U/l) Y GGT(U/l) en las ratas de los diferentes grupos de estudio: SO: seudo-operadas; CM-S: Colestasis con administración de suero salino CCRND: Colestasis con administración de células madre**

## RESULTADOS

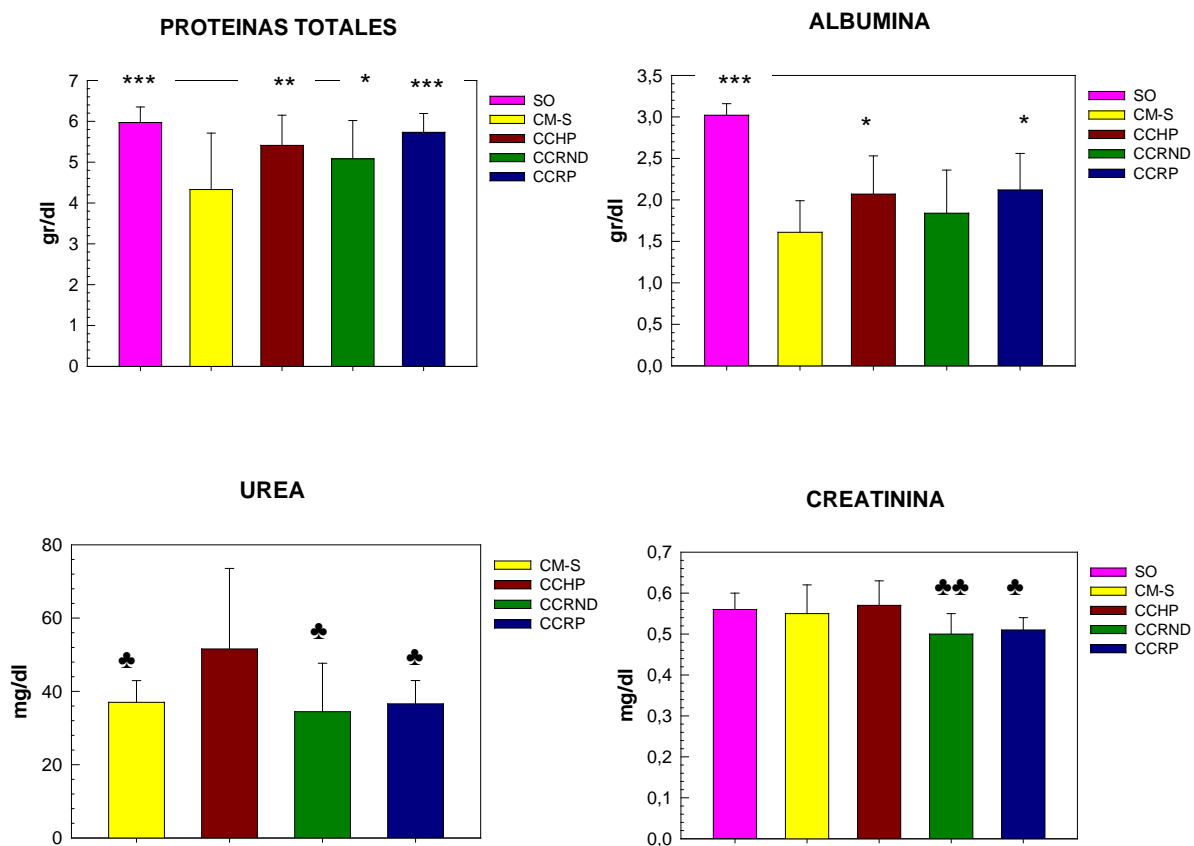
---

*adipocíticas de rata no diferenciadas* **CCHP**: Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos. **CCRP**: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos; *Media±DE;♦♦p<0,01;♦♦♦p<0,001*: Valor estadísticamente significativo respecto de SO; *\*\*p<0,01;\*\*\*p<0,001*: Valor estadísticamente significativo respecto de CM-S; *♣p<0,5, ♣♣p<0,01*: Valor estadísticamente significativo respecto de CCRND.

En relación a las **proteínas totales**, todos los grupos de ratas con colestasis microquirúrgica presentan valores menores cuando se comparan con las ratas pseudo-operadas, si bien, las ratas colestásicas con suero salino (CM-S) presentan valores significativamente inferiores en relación a las ratas pseudo operadas (SO;  $p<0,001$ ), y al resto de los grupos de ratas con colestasis, tanto con células madre de rata no diferenciadas (CCRND;  $p<0,05$ ), como con células madre humanas prediferenciadas (CCHP;  $p<0,01$ ) y, en particular, de rata (CCRP;  $p<0,001$ ) prediferenciadas a hepatocitos. De igual forma, los valores de **albumina** son estadísticamente superiores ( $p<0,001$ ) en las ratas pseudo operadas (SO) que en las ratas colestáticas. Entre las ratas con colestasis microquirúrgica, en aquellas que solo recibieron suero (CM-S) se observan también valores inferiores al resto de los grupos, existiendo diferencias estadísticamente significativas ( $p<0,05$ ) respecto a los grupos de ratas con células madre humanas (CCHP) y de rata (CCRP) prediferenciadas a hepatocitos (Tabla 16, figura 51).

Por el contrario, en relación a la función renal, el grupo de animales con colestasis y células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos (CCHP) presenta un valor estadísticamente mayor ( $p<0,05$ ) de las concentraciones de **Urea** en comparación a los otros tres grupos de colestasis: con solución salina (CM-S), con células madre de rata no diferenciadas (CCRND) y con células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos (CCRP). Respecto de las concentraciones séricas de **Creatinina**, son superiores también, en el grupo de animales con colestasis y células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos (CCHP), respecto a los grupos de ratas pseudo-operadas (SO) y colestásicas, existiendo diferencias estadísticamente significativas con los grupos a los que se inyectaron células madre de rata, tanto no diferenciadas (CCRND;  $p<0,01$ ), como prediferenciadas a hepatocitos (CCRP;  $p<0,05$ ) (Tabla 16, ANEXO 2, figura 51).

## RESULTADOS



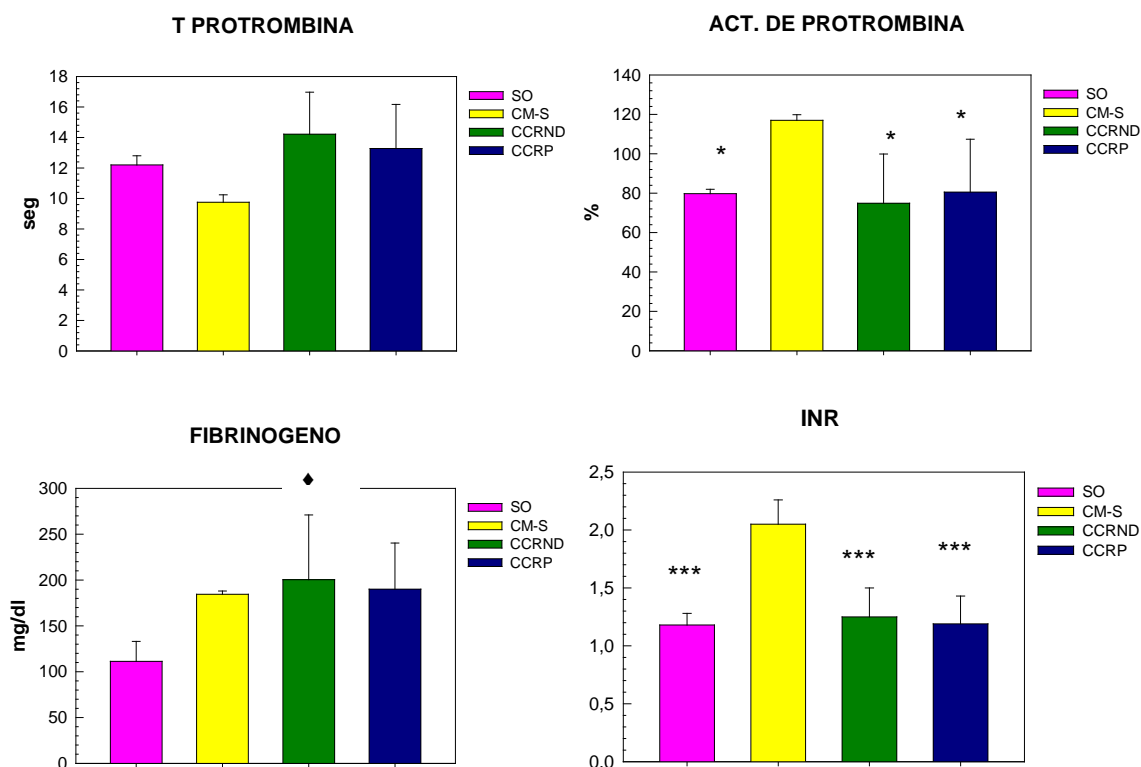
**Figura 51. Concentraciones séricas de Urea (mg/dl), Creatinina (Cr; mg/dl), Albúmina (Alb; g/dl) y Proteínas Totales (PT; g/dl) en las ratas de los diferentes grupos de estudio: SO: pseudo-operadas; CM-S: Colestasis con administración de suero salino CCRND: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas CCHP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos. CCRP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos; Media±DE; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0,001: Valor estadísticamente significativo respecto de CM-S; ♣p<0.5, ♣♣p<0.01: Valor estadísticamente significativo respecto de CCHP.**

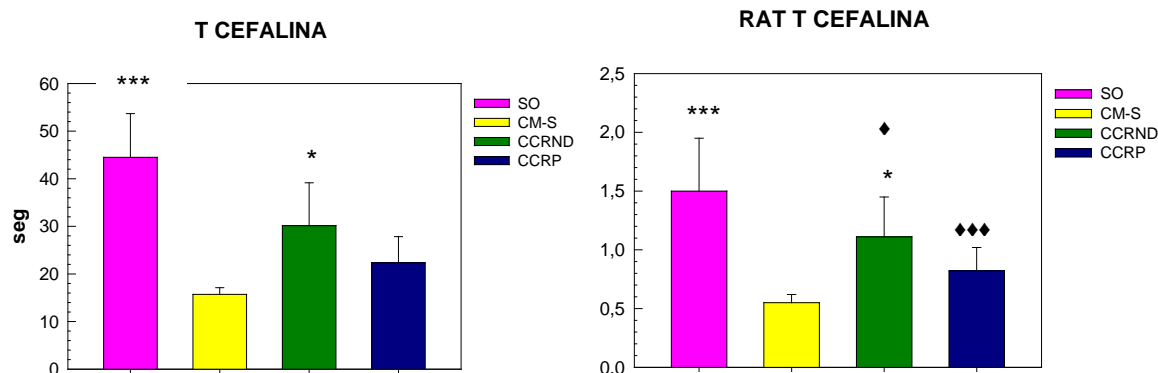
En relación a los parámetros bioquímicos de la **coagulación**, se observa que el **tiempo de protrombina (T.Prot)**, en relación a las ratas pseudo operadas (SO), es inferior en las ratas colestásicas con suero salino (CM-S), mientras que en los grupos con colestasis y células madre de rata, tanto no diferenciadas (CCRND), como prediferenciadas a hepatocitos (CCRP), es superior. Por el contrario, la **actividad de Protrombina (Act Prot)** es estadísticamente mayor ( $p<0,05$ ) en el grupo de ratas colestásicas con suero salino (CM-S) respecto de las ratas pseudooperadas (SO) y a los otros dos grupos con colestasis (CCRND y CCRP). En relación a las concentraciones séricas de **Fibrinógeno**, todos los grupos de ratas con colestasis microquirúrgica presentan valores mayores cuando se comparan con las ratas pseudo-operadas, si bien, en las ratas

## RESULTADOS

colestásicas que recibieron tan solo solución salina (CM-S) el incremento es menos marcado en relación a los otros dos grupos con colestasis a las que se administraron tanto células madre de rata no diferenciadas (CCRND), como prediferenciadas a hepatocitos (CCRP). Sólo existieron diferencias significativas ( $p < 0,5$ ) entre las ratas seudooperadas y el grupo de ratas colestásicas a las que les administraron células madre adipocíticas de rata no diferenciadas (CCRND).

Por el contrario, en el grupo CM-S hay un incremento significativo ( $p < 0,01$ ) del valor del “*International Normalized Ratio*” (INR) respecto a las ratas seudooperadas y a los otros dos grupos de ratas colestásicas con células madre de rata, tanto no diferenciadas (CCRND;  $p < 0,01$ ) como en las prediferenciadas a hepatocitos (CCRP;  $p < 0,01$ ). El tiempo de Cefalina (T Cefal) y el Ratio de Tiempo de Cefalina (Rat T Cefal) son menores en el grupo CM-S que en las ratas seudo-operadas ( $p < 0,001$ ), que en los grupos colestásicos con isotrasplante de células madre de rata, tanto no diferenciadas como prediferenciadas de hepatocitos (CCRND y CCRP), existiendo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) solo en el primer grupo (CCRND) (Tabla 17, ANEXO 2, figura 52).

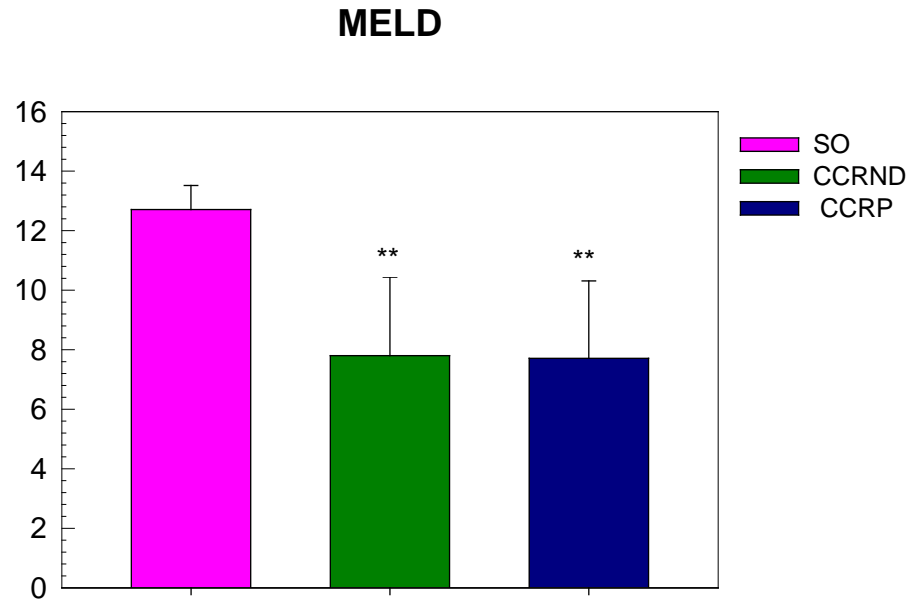




**Figura 52. Tiempo de Protrombina (TProt; seg), Actividad de Protrombina (ActProt; %), Fibrinógeno (F; mg/dl), International Normalized Ratio (INR), Tiempo de Cefalina (TCefal; seg) y Ratio de Tiempo de Cefalina (RatT), en los diferentes grupos de estudio: SO: seudo-operada; CM-S: Colestasis con administración de suero salino CCRND: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas CCRP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos. CCRP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos. Media  $\pm$  DE. ♦ $p$ <0.05; ♦♦ $p$ <0.01; ♦♦♦ $p$ <0.001: Valor estadísticamente significativo respecto de SO; \* $p$ <0.05; \*\*\* $p$ <0,001: Valor estadísticamente significativo respecto de CM-S**

## 11. DETERMINACION DEL “Model for end-stage Liver Disease” (MELD)

Al analizar el “Model for end-stage Liver Disease” (MELD) en los grupos de ratas seudo-operadas (SO) y colestásicas, con células madre de rata no diferenciadas (CCRND) y con células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos (CCRP), se ha demostrado la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las ratas seudo-operadas y los grupos de ratas con colestasis a las cuales se inyectaron células madre de rata, tanto no diferenciadas (CCRND), como prediferenciadas a hepatocitos (CCRP), siendo ésta última diferencia estadísticamente menor ( $p$ <0,01) en relación al grupo SO. (Tabla 18, ANEXO 2, figura 53).

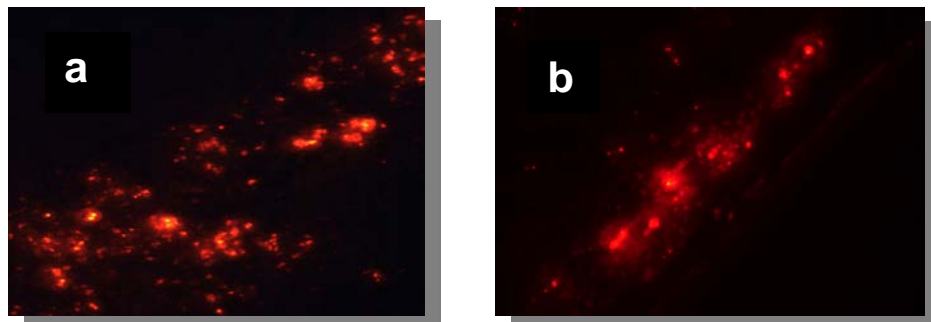


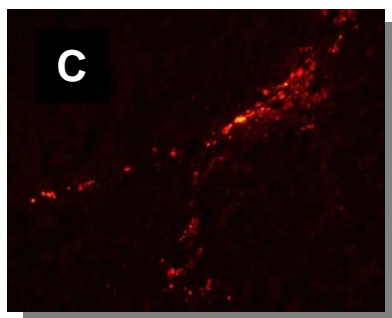
**Figura 53. Determinación del “Model for end-stage Liver Disease” (MELD) en los diferentes grupos de estudio: SO: Seudooperadas CCRND: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas. CCRP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos. Media±DE; \*\* $p < 0,01$ : Valor estadísticamente significativo respecto de SO.**

## 12. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO HEPÁTICO

### 12.A. Estudio con microscopía de Inmunofluorescencia.

A las 8 semanas del p.o., mediante el microscopio de inmunofluorescencia se ha demostrado la persistencia de las células madre inyectadas en los lóbulos hepáticos de las ratas con colestasis, tanto en los grupos a los que se administraron células madre humanas como en los que se administraron células madre de rata (figura 54).

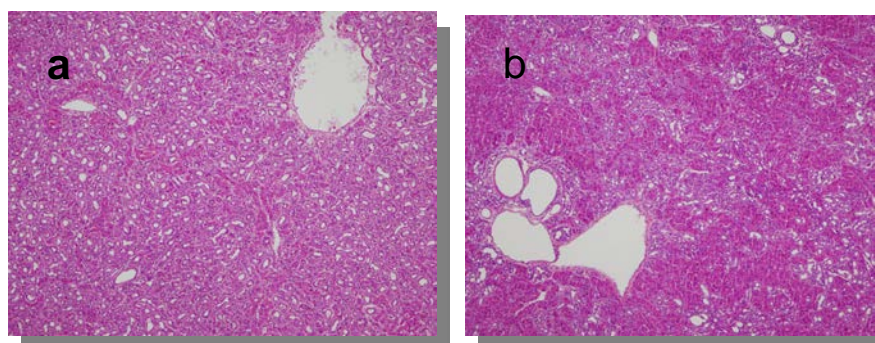




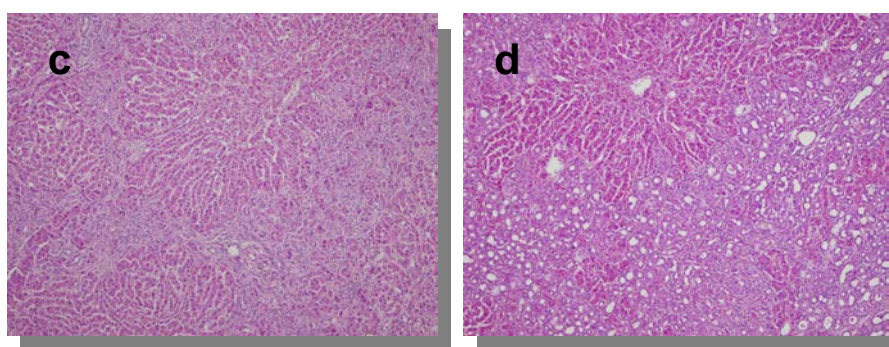
**Figura 54. Imágenes obtenidas mediante el microscopio de inmunofluorescencia en las que se aprecia la presencia intrahepática de células madre mesenquimales adipocíticas en ratas con colestasis microquirúrgica. a) CCRND (Colestasis con administración de células madre de rata no diferenciadas). b) CCRP (Colestasis con administración de células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos.) c) CCHP (Colestasis con administración de células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos).**

### 12.B. Estudio con microscopía óptica

Una vez examinadas todas las preparaciones de las muestras hepáticas con tinción H&E (figura 55) en todos los grupos estudiados, se evaluaron las siguientes variables histopatológicas: colestasis, nódulos de regeneración, proliferación ductal, binucleación, infiltrado inflamatorio, necrosis, trombosis, fibrosis, peliosis, dilatación vena centrolubulillar, estructura, congestión y función, dando una puntuación a cada una de ellas (tablas 19,20,21 y 22, ANEXO 2) (ver Material y Métodos). Tras asignar las puntuaciones correspondientes y proceder a clasificar a cada individuo en función de la puntuación final obtenida, se establecieron 4 grados: bueno (puntuaciones iguales o inferiores a 5), intermedia-buena (puntuaciones entre 6 y 12), intermedia-mala (puntuaciones entre 13 y 19) y mala (puntuaciones iguales o superiores a 20). A continuación se exponen las Tablas que resumen la puntuación total, valorada en los lóbulos hepáticos medio y caudado, en cada rata de todas las Series estudiadas (Tablas 23, 24, 25 y 26).



## RESULTADOS



**Figura 55.** Imágenes hepáticas obtenidas mediante el microscopio óptico correspondientes a ratas con colestasis microquirúrgica: **a)** CMS: Colestasis con administración de suero salino **b)** CCHP: Colestasis con administración de células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos **c)** CCRND: Colestasis con administración de células madre indiferenciadas de rata **d)** CCRP: Colestasis con administración de células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos (Hematoxilina&Eosina; 10 X)

**Tabla 23.** Puntuaciones obtenidas al sumar la puntuación de cada rata tras el estudio de las a las siguientes variables histopatológicas: colestasis, nódulos de regeneración, proliferación ductal, binucleación, infiltrado inflamatorio, necrosis, trombosis, fibrosis, peliosis, dilatación vena centrolubulillar, estructura, congestión y función, evaluadas en los hígados de ratas del grupo **CMS** (Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino).

RATA	CHRR50		CHRR51		CHRR52		CHRR53		CHRR54	
LOBULO	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
TOTAL	17	12	15	14	15	15	11	10	13	10

RATA	CHRR55		CHRR64		CHR68		CHR69		CHR70	
LOBULO	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
TOTAL	9	14	13	6	11	10	21	18	17	18

RATA	CHR72		CHR74		CHR76		CHR78	
LOBULO	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
TOTAL	23	23	22	20	20	20	21	20

Mejor puntuación = 2; Buena<5; Intermedia-buena 5-12; Intermedia-mala 13-19; Mala>20; Peor puntuación = 39

**Tabla 24.** Puntuaciones obtenidas al sumar la puntuación de cada rata tras el estudio de las a las siguientes variables histopatológicas: colestasis, nódulos de regeneración,

## RESULTADOS

*proliferación ductal, binucleación, infiltrado inflamatorio, necrosis, trombosis, fibrosis, peliosis, dilatación vena centrolubulillar, estructura, congestión y función, evaluadas en los hígados de ratas del grupo **CCHP** (Colestasis microquirúrgica con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos).*

RATA	CHR125		CHR130		CHR132		CHR134		CHR141	
LOBULO	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
TOTAL	17	18	26	18	21	12	20	20	15	12

RATA	CHR142		CHR144		CHR145		CHR148		CHR149	
LOBULO	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
TOTAL	15	15	21	16	17	12	12	20	20	15

RATA	CHR150		CHR152		CHR153		CHR154		CHR155	
LOBULO	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
TOTAL	9	14	4	7-8	17	16	12	9-10	11	13

Mejor puntuación = 2; Buena < 5; Intermedia-buena 5-12; Intermedia-mala 13-19; Mala > 20; Peor puntuación = 39

**Tabla 25.** Puntuaciones obtenidas al sumar la puntuación de cada rata tras el estudio de las a las siguientes variables histopatológicas: colestasis, nódulos de regeneración, proliferación ductal, binucleación, infiltrado inflamatorio, necrosis, trombosis, fibrosis, peliosis, dilatación vena centrolubulillar, estructura, congestión y función, evaluadas en los hígados de ratas del grupo **CRND** (Colestasis microquirúrgica con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas).

RATA	CHRR1		CHRR6		CHRR7		CHRR8		CHRR9	
LOBULO	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
TOTAL	15	12	16	12	15	11	17	13	21	13

RATA	CHRR13		CHRR14		CHRR15		CHRR16		CHRR18	
LOBULO	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
TOTAL	19	20	17	18	19	19	17	18	21	13

RATA	CHRR19		CHRR20		CHRR25		CHRR26		CHRR31	
LOBULO	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC

## RESULTADOS

TOTAL	13	13	16	13	15	16	15	17	17	6
-------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	---

RATA	CHRR32		CHRR56		CHRR57		CHRR58		CHRR60	
LOBULO	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
TOTAL	6	13	12	10	9,5	9	12	14,5	15	14

RATA	CHRR61		CHRR62		CHRR65		CHRR66		CHRR67	
LOBULO	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
TOTAL	16	17	14	13	14	16	16,5	13	11	11,5

Mejor puntuación = 2; Buena < 5; Intermedia-buena 5-12; Intermedia-mala 13-19; Mala > 20; Peor puntuación = 39

**Tabla 26.** Puntuaciones obtenidas al sumar la puntuación de cada rata tras el estudio de las a las siguientes variables histopatológicas: colestasis, nódulos de regeneración, proliferación ductal, binucleación, infiltrado inflamatorio, necrosis, trombosis, fibrosis, peliosis, dilatación vena centrolubulillar, estructura, congestión y función, evaluadas en los hígados de ratas del grupo **CRPD** (Colestasis microquirúrgica con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos).

RATA	CHRR39		CHRR41		CHRR43		CHRR46		CHRR47	
LOBULO	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
TOTAL	18	15	9	13	15	12	17	10	16	6

RATA	CHRR48		CHRR49		CHRR68		CHRR69		CHRR70	
LOBULO	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
TOTAL	14	13	14	12	18,5	16,5	16	17	17	18

RATA	CHRR71		CHRR72		CHRR73		CHRR74		CHRR75	
LOBULO	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
TOTAL	16,5	15	10,5	16,5	18	16		16,5	9,5	8,5

RATA	CHRR76		CHRR77		CHRR78		CHRR80		CHRR81	
LOBULO	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
TOTAL	18	13,5	17	15	13	15	9	8	20	20

Mejor puntuación = 2; Buena < 5; Intermedia-buena 5-12; Intermedia-mala 13-19; Mala > 20; Peor puntuación = 39

## RESULTADOS

---

Una vez sumadas las puntuaciones correspondientes a las alteraciones histopatológicas presentes en cada animal y, tras llevar a cabo una clasificación en función de la puntuación obtenida, se valoró el porcentaje de animales que dentro de cada grupo pertenecían a cada nivel de dicha clasificación (Tablas 27; Figura 56) y a su vez se subdividió cada valor porcentual según el lóbulo hepático estudiado (lóbulo medio y caudado) (Tabla 28; Figuras 57 y 58). Finalmente, en función de los resultados obtenidos y del análisis estadístico aplicado podemos concluir que:

1. Los grupos presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.004$ ), siendo las alteraciones histopatológicas correspondientes a la colestasis, más marcadas en el grupo de ratas a las que tan sólo se les administró solución salina (CM-S) respecto del resto de los grupos de ratas colestásicas a las que se les administraron células madre (Tabla 27 ; Figura 56).

2. **El resultado BUENO** (prácticamente inexistente en este estadio evolutivo de las ratas con colestasis a largo plazo) se demuestra en algunas ratas del grupo de colestasis con xenotrasplante de células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos (CCHP), no existiendo en los grupos restantes. El resultado BUENO en éstas ratas es superior ( $p=0.004$ ) al esperado (3.3% respecto a un 0,7% esperado) (Tabla 27; Figura 56).

3. **El resultado INTERMEDIO-BUENO** no es más frecuente en los grupos de ratas con colestasis en los que se administraron células madre que en el grupo que tan sólo recibió suero (Tabla 27; Figura 56).

4. Donde se aprecian grandes diferencias es en los resultados más frecuentes; esto es, **INTERMEDIO-MALO Y MALO**, observándose que:

-En el grupo de ratas con colestasis y suero salino (**CM-S**) prácticamente 1/3 de los resultados son **INTERMEDIO-MALOS**, destacando por tanto su baja presencia (39,3% respecto a un 59,2% esperado;  $p=0.004$ ). En otro 1/3 de las ratas de éste grupo, con colestasis y solución salina, se ha comprobado una alta presencia del resultado **MALO** (32.1% respecto a un 13,6% esperado;  $p=0.004$ ). Este grado más grave de resultados MALOS, además es más frecuente en éstas ratas que en el resto de los grupos de colestasis y trasplante de células madre, sobre todo en el LM hepático (35%). (Tabla 27 y 28; Figura 56,57 y 58).

## RESULTADOS

- Sin embargo, en los grupos de colestasis e isotrasplante de células madre de rata, tanto no diferenciadas (**CCRND**), como prediferenciadas a hepatocitos (**CCRP**), destaca la elevada presencia del resultado **INTERMEDIO-MALO** (72% y 69,2% respectivamente, respecto a un 59,2% esperado;  $p=0.004$ ), siendo el **resultado MALO** prácticamente inexistente (4% y 5,1% respectivamente, *versus* un 13,6% esperado;  $p=0.004$ ) (Tabla 27; Figura 56).

-En el grupo de ratas con colestasis y administración de células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos (**CCHP**) el **resultado MALO** no llega a  $\frac{1}{4}$  de los animales, (23%) siendo en el lóbulo caudado incluso de un 13,3%. El **resultado INTERMEDIO-MALO** aparece en el doble de los casos que el **MALO** (43,3%) en estos animales. (Tabla 27 y 28; Figura 56,57 y 58).

**Tabla 27. Clasificación en función de las puntuaciones asignadas a las diferentes variables histopatológicas evaluadas en los hígados de las ratas con colestasis microquirúrgica: CM-S: Colestasis con administración de suero salino. CCRND: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas. CCHP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos. CCRP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos.**

	COLESTASIS			
	CM-S	CCRND	CCHP	CCRP
<b>RESULTADO BUENO</b>	0 (0%)	0 (0%)	1 (3,3%)	0 (0%)
<b>RESULTADO INTERMEDIO-BUENO</b>	8 (28,6%)	12 (24%)	9 (30,1%)	10 (25,6%)
<b>RESULTADO INTERMEDIO-MALO</b>	11 (39,3%)	36 (72%)	13 (43,3%)	27 (69,2%)
<b>RESULTADO MALO</b>	9 (32,1%)	2 (4%)	7 (23,3%)	2 (5,1%)

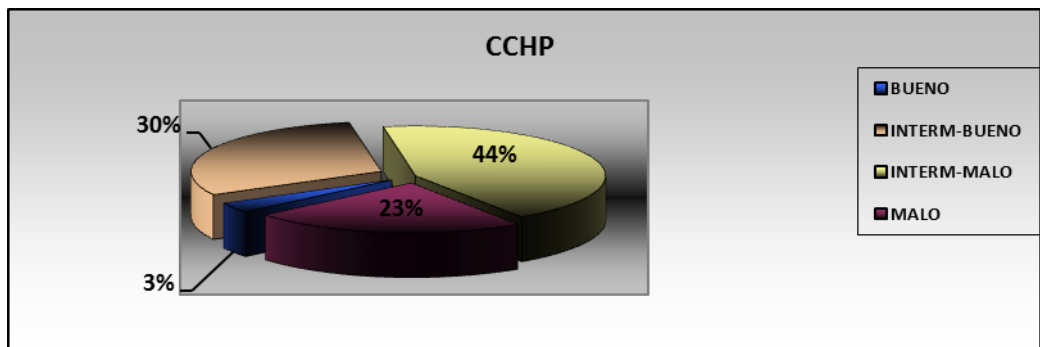
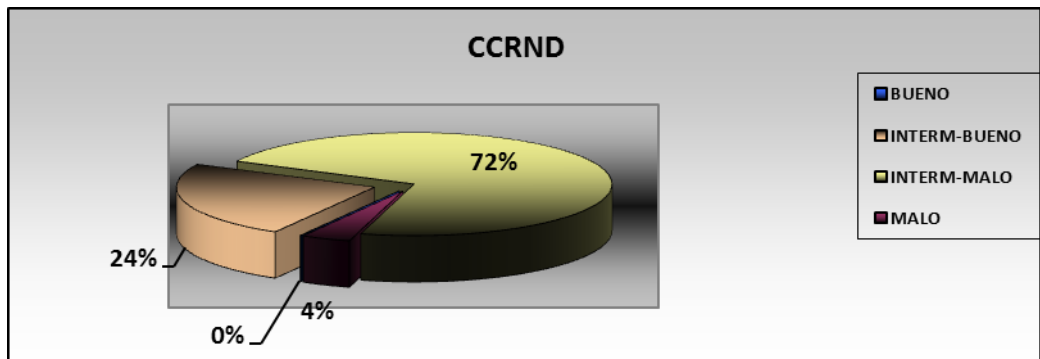
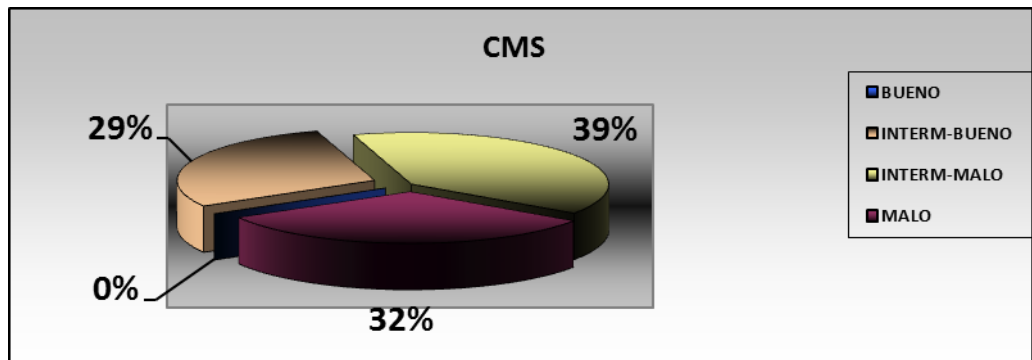
Test estadístico Chi-cuadrado ( $p=0.004$ )

**Tabla 28. Clasificación en función de las puntuaciones asignadas a las diferentes variables histopatológicas evaluadas en los lóbulos hepáticos medio (LM) y caudado (LC) de ratas con colestasis microquirúrgica: CM-S: Colestasis con administración de suero salino. CCRND: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas. CCHP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos. CCRP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos.**

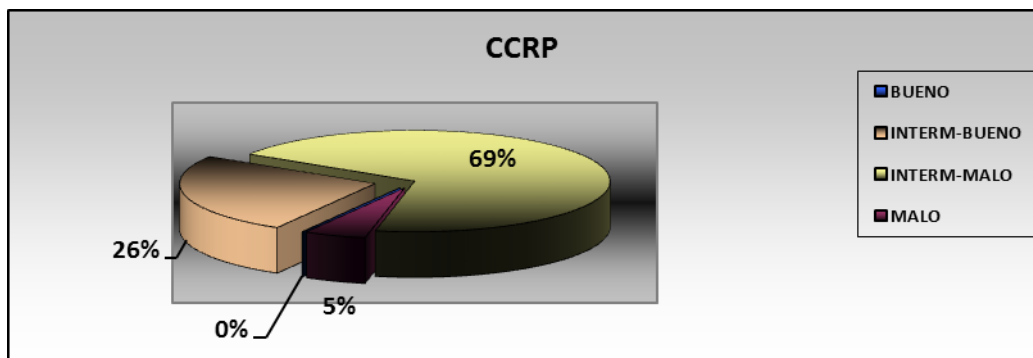
## RESULTADOS

	COLESTASIS							
	CM-S		CCRND		CCHP		CCRP	
	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
<b>RESULTADO BUENO</b>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (6,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>RESULTADO INTERMEDIO-BUENO</b>	3 (21,4%)	5 (35,7%)	5 (20%)	7 (28%)	4 (26,8%)	5 (33,3%)	4 (21%)	6 (30%)
<b>RESULTADO INTERMEDIO-MALO</b>	6 (42,9%)	5 (35,7%)	18 (72%)	18 (72%)	5 (33,3%)	8 (53,3%)	14 (73,7%)	13 (65%)
<b>RESULTADO MALO</b>	5 (35,7%)	4 (28,6%)	2 (8%)	0 (0%)	5 (33,3%)	2 (13,3%)	1 (5,3%)	1 (5%)

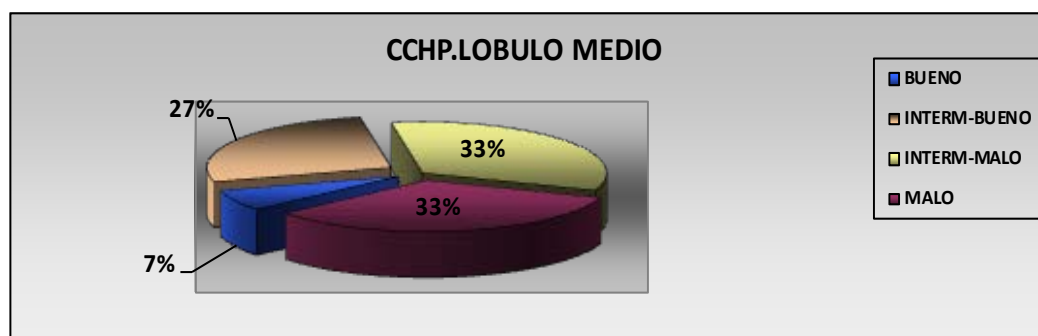
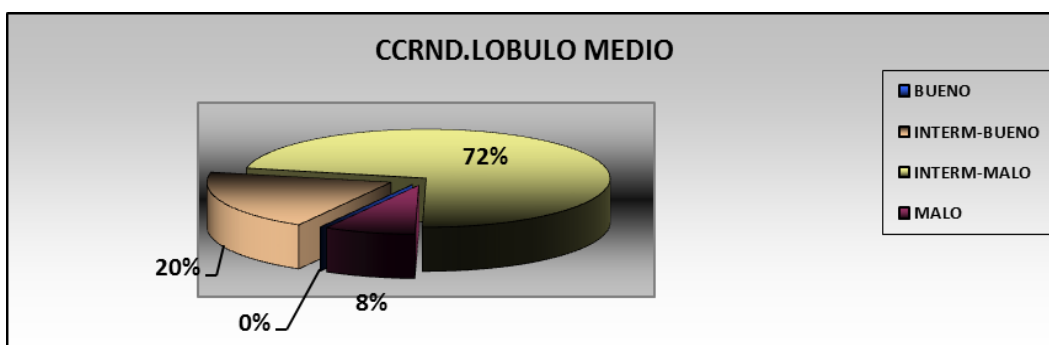
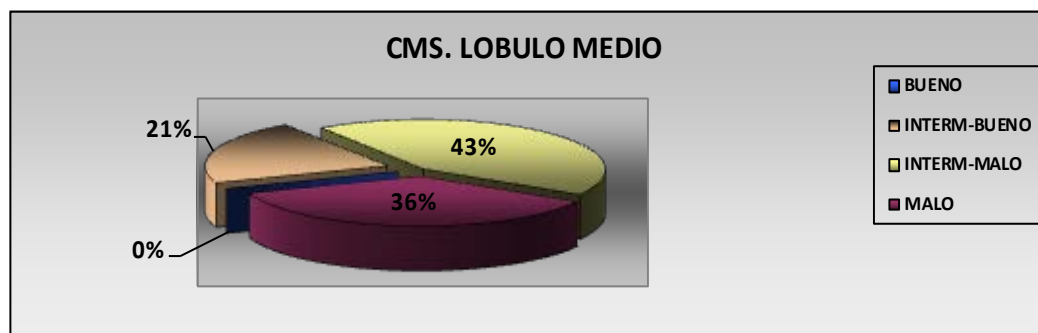
Test estadístico Chi-cuadrado ( $p=0.004$ )



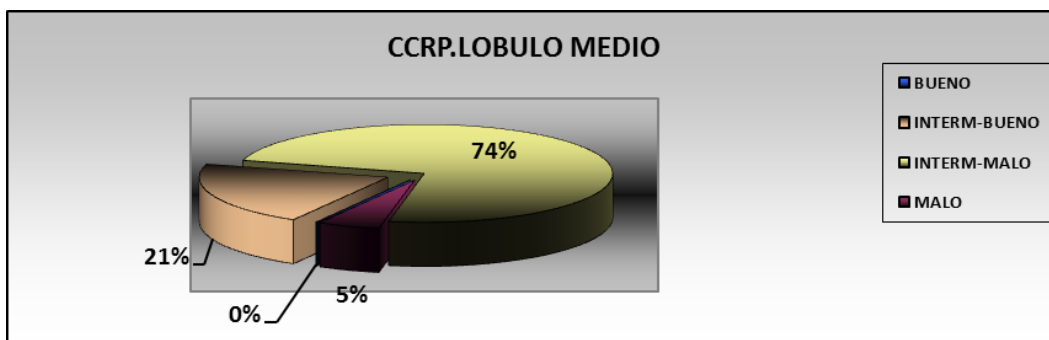
## RESULTADOS



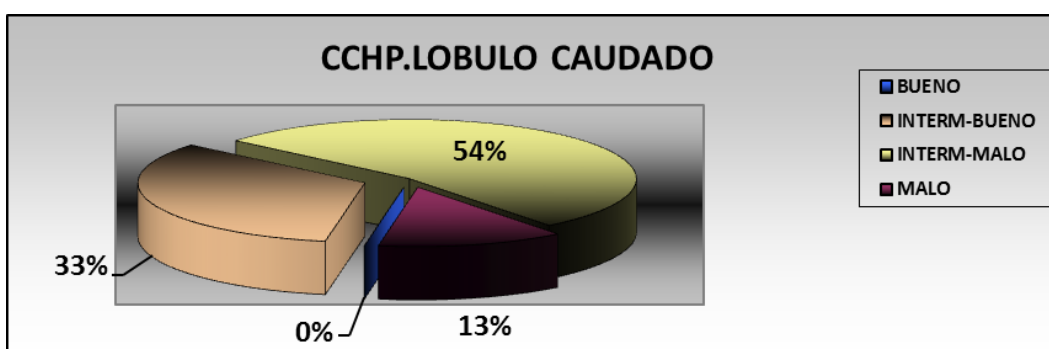
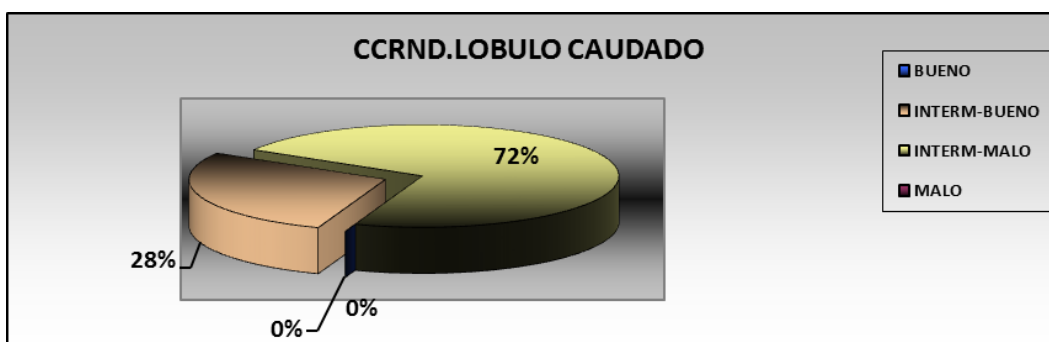
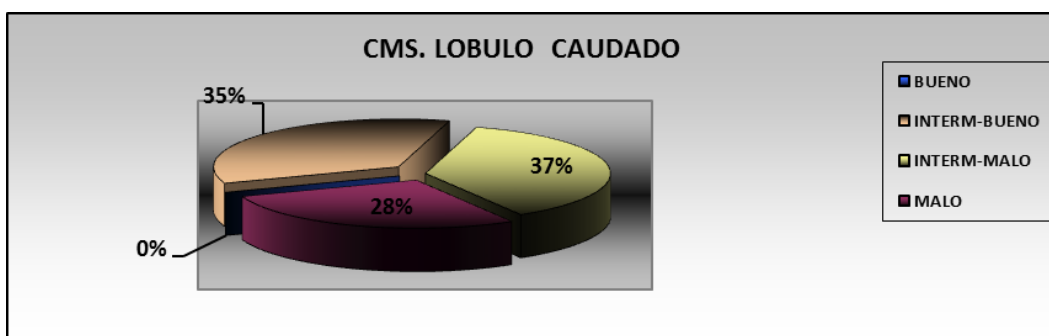
**Figura 56.** Comparación de resultados *histopatológicos evaluadas en los hígados de las ratas de los diferentes grupos de estudio CM-S: Colestasis con administración de suero salino CCRND: Colestasis con administración de células madre humanas adipocíticas no diferenciadas de rata. CCHP: Colestasis con administración de células madre humanas adipocíticas prediferenciadas a hepatocitos. CCRP: Colestasis con administración de células madre humanas adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos*



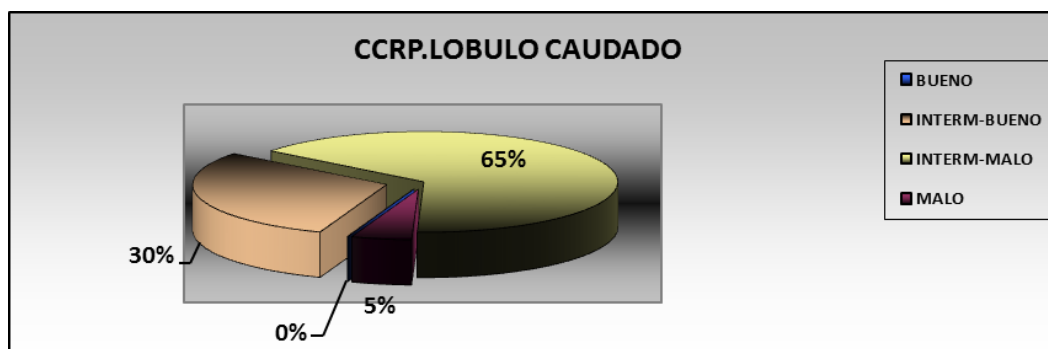
## RESULTADOS



**Figura 57.** “Comparación de los resultados histopatológicos evaluados en el lóbulo hepático medio (LM) de ratas de los diferentes grupos de estudio: **CM-S:** Colestasis con administración de suero salino **CCRND:** Colestasis con administración de células madre humanas adipocíticas no diferenciadas de rata. **CCHP:** Colestasis con administración de células madre humanas adipocíticas prediferenciadas a hepatocitos. **CCRP:** Colestasis con administración de células madre humanas adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos



## RESULTADOS

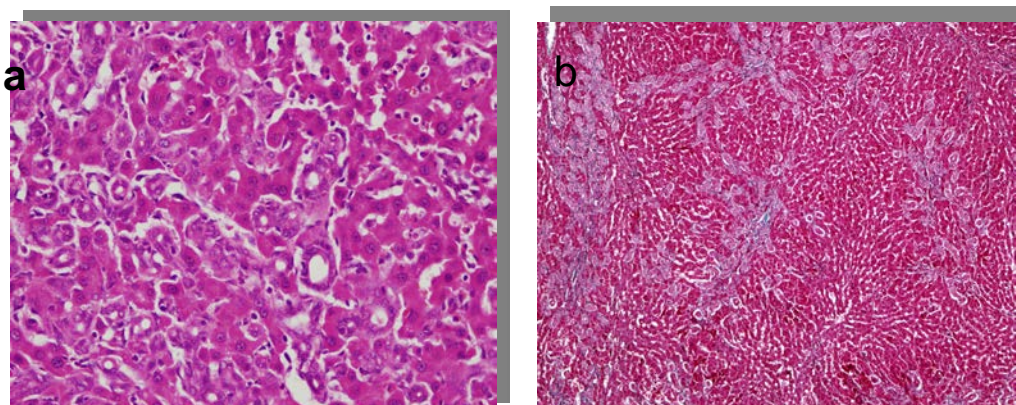


**Figura 58. Comparación de los resultados histopatológicos evaluados en el lóbulo hepático caudado (LC) de ratas de los diferentes grupos de estudio: CM-S: Colestasis con administración de suero salino CCRND: Colestasis con administración de células madre humanas adipocíticas no diferenciadas de rata. CCHP: Colestasis con administración de células madre humanas adipocíticas prediferenciadas a hepatocitos. CCRP: Colestasis con administración de células madre humanas adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos**

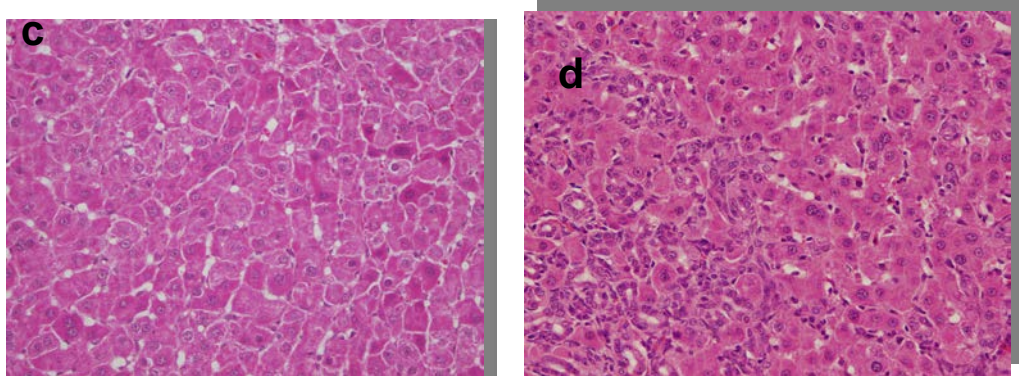
### 12.C. Estudio de la fibrosis hepática

Para estudiar la fibrosis hepática, se realizaron dos tinciones de las muestras del parénquima hepático: Tricrómico de Mason (figura 59) y Rojo Picosirio (figura 60) en los lóbulos hepáticos medio y caudado de 9 individuos de cada grupo experimental.

Con la tinción de Tricromico de Masson, todos los elementos acidófilos del tejido, como el citoplasma celular, el músculo y el colágeno se unen a los tintes ácidos, por ello ésta tinción permite visualizar muy bien las áreas de fibrosis. Con esto observamos en las fotografías de los cortes histológicos las zonas de parénquima en las que se ha depositado un aumento de la matriz extracelular se tiñen de color turquesa, en tanto que el citoplasma y los núcleos celulares de los distintas células hepáticas no captan ésta tinción.

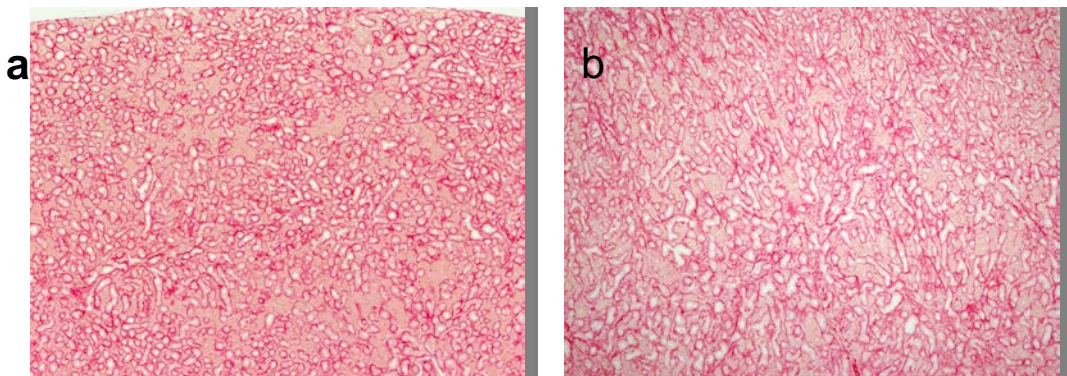


## RESULTADOS

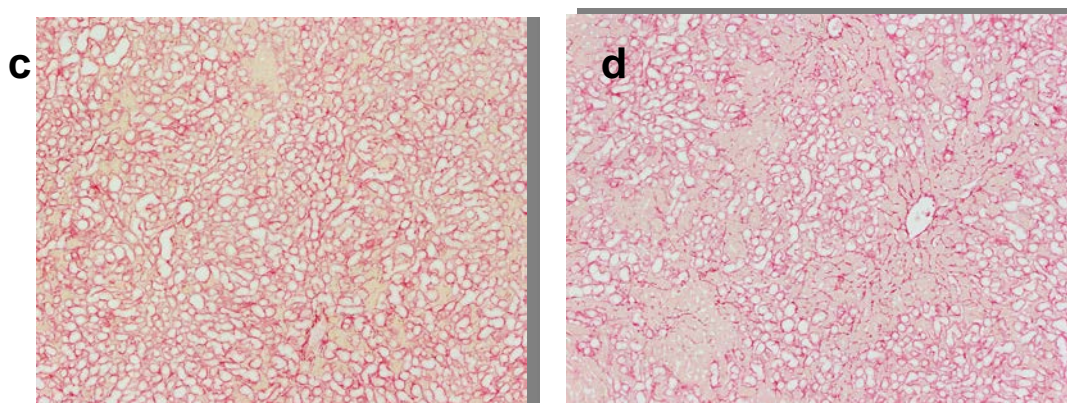


**Figura 59. Imágenes obtenidas mediante microscopía óptica con tinción de Tricrómico de Masson correspondiente a hígados de ratas de los diferentes grupos de estudio a) CMS: Colestasis con administración de suero salino (40X) b) CCHP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos (10X) c) CCRND: Colestasis con administración de células madre adipocíticas no diferenciadas de rata. (20X) d) CCRP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos (20X).**

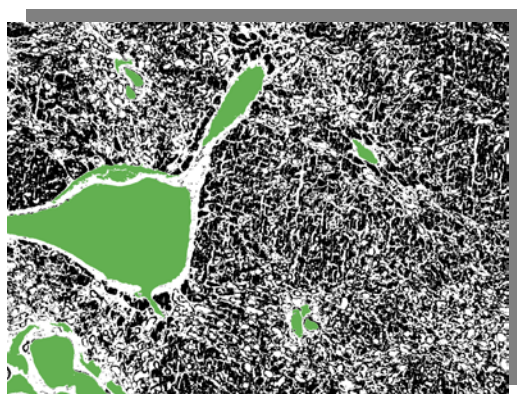
Cuando se utilizó la tinción con Rojo Picosirio (figura 60), (que tiñe específicamente las fibras de colágeno en rojo, en tanto que los hepatocitos y las células epiteliales biliares neoformadas aparecen de color blanco), las microfotografías obtenidas se convirtieron a sistema binario (B/W; figura 61) y fueron analizadas mediante un programa de análisis de imagen  $\diamond$  IMAGEJ, cuantificando posteriormente las áreas de fibrosis.



## RESULTADOS



**Figura 60.** Imágenes obtenidas mediante microscopía óptica con tinción de Rojo Picosirio correspondiente a hígados de las ratas de los diferentes grupos de estudio. El Rojo Picosirio tiñe específicamente las fibras de colágeno en rojo, en tanto que los hepatocitos y las células epiteliales biliares neoformadas aparecen de color blanco. **a)** CMS: Colestasis con administración de suero salino **b)** CCHP: Colestasis con administración de células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos **c)** CCRND: Colestasis con administración de células madre no diferenciadas de rata. **d)** CCRP: Colestasis con administración de células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos



**Figura 61.** Tinción hepática con Rojo Picosirio convertido en sistema binario en una rata con colestasis y administración de células madre indiferenciadas de rata: Negro=hepatocitos; Verde= vasos; blanco= fibrosis + proliferación biliar.

Se cuantificaron el área de fibrosis total y del porcentaje del área de fibrosis respecto del área de parénquima hepático en los lóbulos medio y caudado (tabla 29 y 30) (figura 62 y 63) y las conclusiones obtenidas de éste estudio fueron las siguientes:

1. En el grupo de ratas con colestasis que recibieron suero salino (CM-S) se produce un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de fibrosis respecto al resto de los grupos que recibieron células madre; tanto humanas y prediferenciadas a hepatocitos (CCHP;  $p < 0,001$ ), como de rata,

## RESULTADOS

---

no diferenciadas (CCRND;  $p < 0,001$ ) y prediferenciadas a hepatocitos (CCRP;  $p < 0,001$ ) (Tabla 29, Figura 62).

2. En el grupo de ratas a las que se administraron células madre, el porcentaje de fibrosis es mayor ( $p < 0,001$ ) en el grupo en el que se administraron células humanas (CCHP) respecto a los grupos en que se administraron células de rata, tanto no diferenciadas (CCRND), como prediferenciadas a hepatocitos (CCRP) (Tabla 29, Figura 62).

3. Entre los grupos en los que se administraron células de rata el porcentaje de fibrosis es mayor en el grupo que recibió células madre no diferenciadas (CCRND), respecto del grupo al que se administraron células madre prediferenciadas a hepatocitos (CCRP), si bien ésta diferencia no fué significativa (Tabla 29, Figura 62).

4. No se aprecian diferencias en el área de fibrosis entre lóbulos (no hay efecto lóbulo) en ninguno de los grupos de ratas colestásicas estudiadas. Por lo tanto, el área de fibrosis es homogénea en todo el hígado, no apreciándose diferencias en función del lóbulo en el que se realice el estudio (Tabla 30, Figura 63).

El porcentaje de fibrosis es significativamente inferior ( $p < 0,001$ ) en las ratas seudooperadas (SO) que en las ratas colestásicas y, entre los grupos colestásicos, el porcentaje de fibrosis es significativamente inferior ( $p < 0,001$ ) en las ratas que recibieron células madre respecto de aquellas a las que se inyectó sólo suero salino. Así mismo, dentro de los grupos que recibieron células madre, el porcentaje de fibrosis es significativamente inferior ( $p < 0,001$ ) en los que se realizó un isotrasplante de células de rata, tanto no diferenciadas (CCRND) como prediferenciadas a hepatocitos (CCRP).

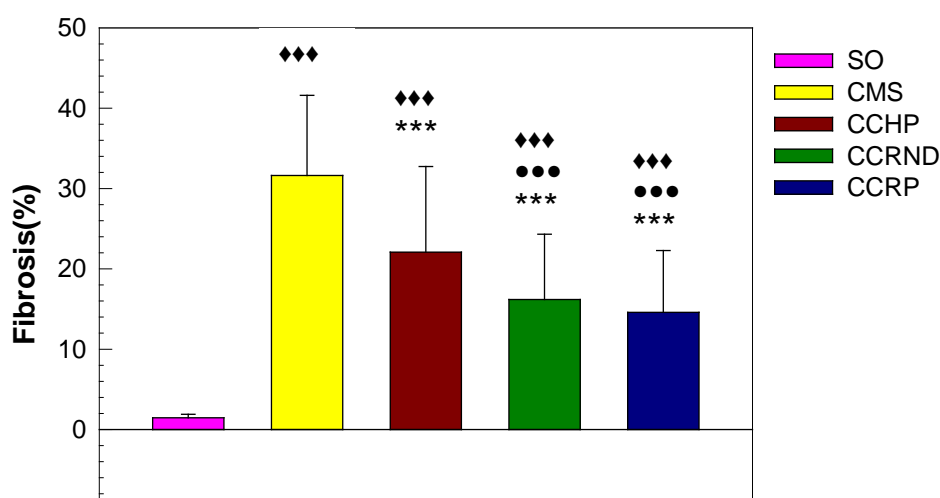
**Tabla 29. Porcentaje del área de fibrosis hepática tras tinción con Rojo Picrosirio en los diferentes grupos de estudio: SO: seudo-operadas; CMS: Colestasis con administración de suero salino. CCRND: Colestasis con administración de células madre no diferenciadas de rata. CCHP: Colestasis con administración de células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos CCRP: Colestasis con administración de células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos**

## RESULTADOS

	PORCENTAJE DEL ÁREA DE FIBROSIS HEPÁTICA
<b>SO</b> (n= 20)	1,46 ± 0,44
<b>CMS</b> (n= 9)	31,62 ± 9,98◆◆◆
<b>CCRND</b> (n= 9 )	16,19 ± 8,13◆◆◆*** °°°
<b>CCHP</b> (n= 9 )	22,09 ± 10,65◆◆◆***
<b>CCRP</b> (n= 9 )	14,59 ± 7,7 ◆◆◆*** °°°

Media ± DE; ◆◆◆p<0,001: Valor estadísticamente significativo respecto de SO; \*\*\*p<0,001: Valor estadísticamente significativo respecto de CM-S; °°°p<0,001: Valor estadísticamente significativo respecto de CCHP

### PORCENTAJE AREA DE FIBROSIS HEPATICA



**Figura 62. Porcentaje del área de fibrosis hepática tras tinción con Rojo Picrosirio en los diferentes grupos de estudio: SO: pseudo-operadas; CMS: Colestasis con administración de suero salino. CCRND: Colestasis con administración de células madre no diferenciadas de rata. CCHP: Colestasis con administración de células madre humanas prediferenciadas a hepatocitos CCRP: Colestasis con administración de células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos. Media ± DE; ◆◆◆p<0,001: Valor estadísticamente significativo respecto de SO; \*\*\*p<0,001: Valor estadísticamente significativo respecto de CM-S; °°°p<0,001: Valor estadísticamente significativo respecto de CCHP.**

## RESULTADOS

Si analizamos el porcentaje de fibrosis en los lóbulos hepáticos medio (LM) y caudado (LC) en cada grupo experimental, siempre es menor en el lóbulo caudado (en el cual no se inyectaban células madre), excepto en el grupo de animales con colestasis que recibieron células madre de rata no diferenciadas (CCRND), aunque estas diferencias no son significativas. Por lo tanto, el área de fibrosis es homogénea en todo el hígado, no apreciando diferencias marcadas en función del lóbulo en el que se realice el estudio (Tabla 30, Figura 63).

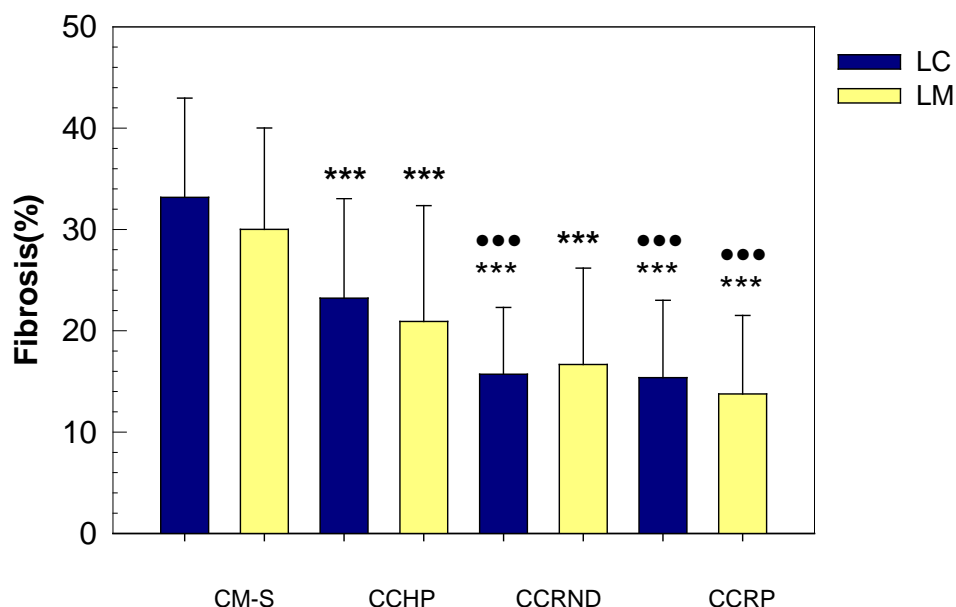
Igualmente, si comparamos el porcentaje de fibrosis hallado en los lóbulos hepáticos medio (LM) y caudado (LC) entre los diferentes grupos, observamos que tampoco se aprecian diferencias en función del lóbulo estudiado (Tabla 30, Figura 63).

**Tabla 30. Porcentaje del área de fibrosis en los lóbulos hepáticos medio (LM) y caudado (LC) tras tinción con Rojo Picrosirio en ratas de los diferentes grupos de estudio. CMS:** Colestasis con administración de suero salino. **CCRND:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas no diferenciadas de rata. **CCHP:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos **CCRP:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos.

	<b>PORCENTAJE DEL ÁREA DE FIBROSIS LOBULAR HEPÁTICA</b>	
	<b>LM</b>	<b>LC</b>
<b>CMS (n= 9)</b>	30,01 ± 10	33,17 ± 9,8
<b>CCHP (n= 9)</b>	20,92 ± 11,43 <sup>***</sup>	23,22 ± 9,82 <sup>***</sup>
<b>CCRND (n= 9)</b>	16,68 ± 9,51 <sup>***</sup>	15,72 ± 6,58 <sup>***</sup> °°°
<b>CCRP (n= 9)</b>	13,77 ± 7,75 <sup>***</sup> °°°	15,38 ± 7,63 <sup>***</sup> °°°

Media ± DE; <sup>\*\*\*</sup>p<0,001: Valor estadísticamente significativo respecto de CM-S;  
<sup>°°°</sup>p<0,001: Valor estadísticamente significativo respecto de CCHP

**PORCENTAJE AREA FIBROSIS LOBULAR HEPATICA**



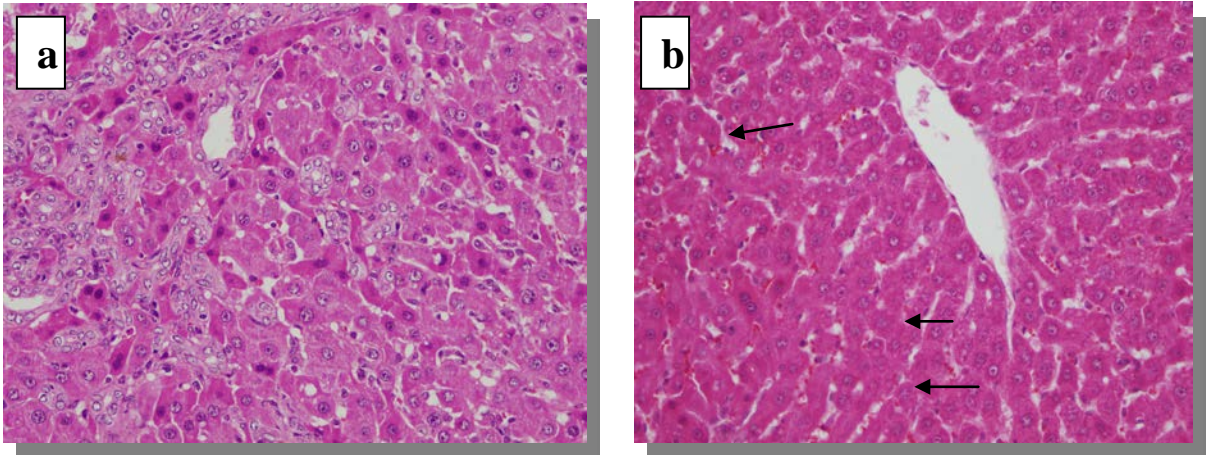
**Figura 63. Porcentaje del área de fibrosis en los lóbulos hepáticos medio (LM) y caudado (LC) tras tinción con Rojo Picosirio en ratas de los diferentes grupos con colestasis microquirúrgica** **CM-S:** Colestasis con administración de suero salino. **CCRND:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas no diferenciadas de rata. **CCHP:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos **CCRP:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos. Media ± DE; \*\*\* $p < 0,001$ : Valor estadísticamente significativo respecto de CM-S; ••• $p < 0,001$ : Valor estadísticamente significativo respecto de CCHP

**12.D. Estructura hepática, proliferación biliar y estudio hepatocitario**

Se estudiaron otras lesiones propias del modelo experimental obtenido tras la resección microquirúrgica de la vía biliar extrahepática en la rata, como son la proliferación biliar y el estado de los hepatocitos en los lóbulos hepáticos medio y caudado.

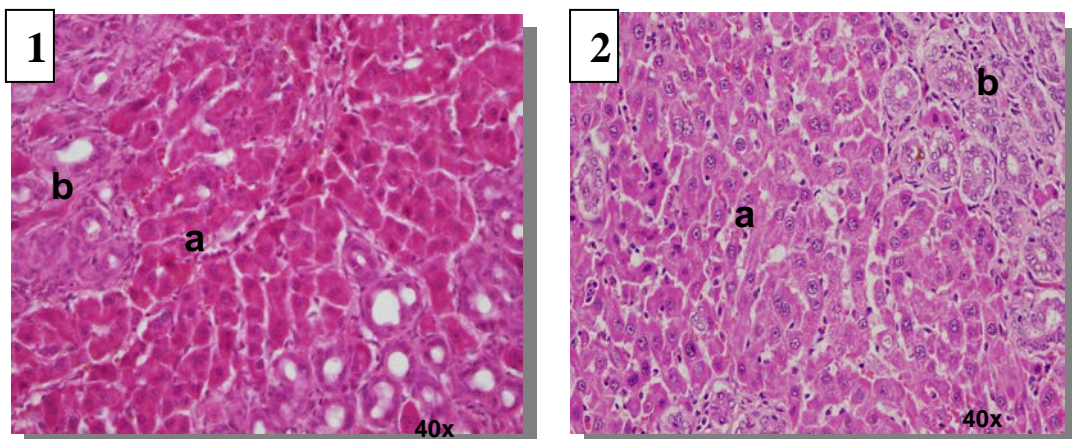
En el lóbulo caudado del grupo de ratas con colestasis y administración de solución salina (CM-S; Chrr53 figura 64.a) se observa desestructuración hepática, asociada a intensa proliferación epitelial biliar y necrosis hepatocitaria. Por el contrario, en el lóbulo caudado de las ratas con colestasis e isotrasplante de células adipocíticas de rata no diferenciadas (CCRND; chrr20; figura 64.b), se observa una **estructura hepática** prácticamente normal, con fibrosis moderada, grandes zonas de hepatocitos preservados y menor proliferación biliar, aunque se observan algunos hepatocitos en fase de necrosis con retracción eosinófila (figura 64.b).

## RESULTADOS



**Figura 64.** Imágenes obtenidas mediante microscopio óptico correspondientes al lóbulo caudado hepático de los grupos de ratas con colestasis microquirúrgica: **a)** Con suero (CM-S) donde se observa **desestructuración hepática**, asociada a intensa proliferación epitelial biliar y necrosis hepatocitaria (H&E, 40x). **b)** Con células madre adipocíticas de rata no diferenciadas (CCRND) donde se observa una **estructura hepática** prácticamente normal, aunque algunos hepatocitos se encuentran en fase de necrosis con retracción eosinófila (flechas) (H&E, 40x)

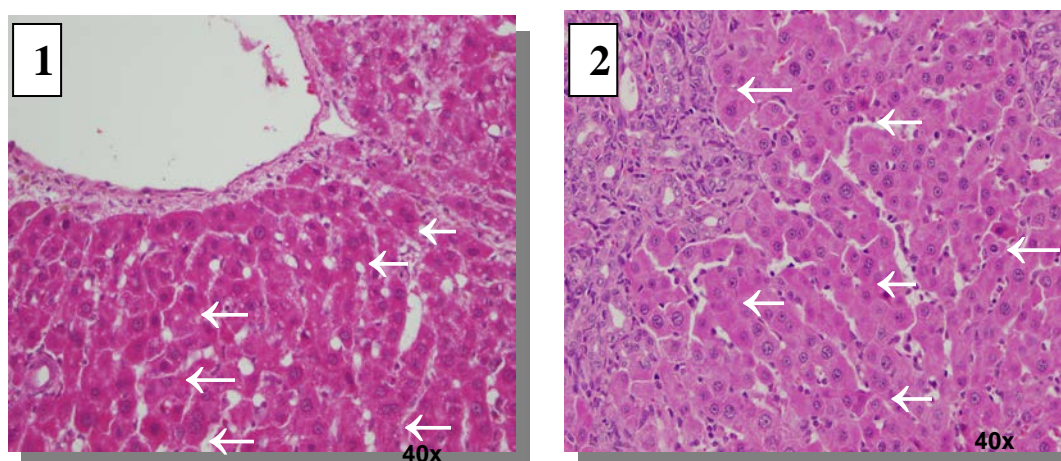
En las imágenes de la figura 65, obtenidas mediante estudio con microscopio óptico de cortes histológicos hepáticos de ratas correspondientes a los grupos de colestasis microquirúrgica y administración de células madre de rata no diferenciadas (CCRND; chrr26 Im) (Figuras 65.1) y de colestasis y administración de células madre de rata prediferenciadas a hepatocitos (CCRP: chrr43 Im), (Figura 65.2) se aprecia la **heterogeneidad** de la proliferación biliar y de las áreas de hepatocitos preservados. Así, se observan zonas donde predominan los hepatocitos (a), como en las áreas 3 del acino, y otras donde hay predominio de los ductos biliares y de la fibrosis (b), como son las áreas periportal (área 1) y área 2 del acino hepático.



## RESULTADOS

**Figura 65.** Imágenes del parénquima hepático obtenidas mediante microscopio óptico con tinción de Tricrómico de Masson correspondientes a los grupos con colestasis microquirúrgica: **a)** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas: **Fotografía 1** (40x) **b)** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos: **Fotografía 2** (40x), en las que se aprecia la **heterogeneidad** de la proliferación biliar y hepatocitaria

En las imágenes de la figura 66, obtenidas mediante la misma técnica y correspondientes a los grupos de ratas con colestasis y administración de células madre de rata, ya no diferenciadas (CCRND; chrr20 lc) (Figura 52.1) o bien, prediferenciadas a hepatocitos (CCRP; chrr46 lm) (Figura 66.2), se comprueba la presencia de **mitosis** de células hepáticas.

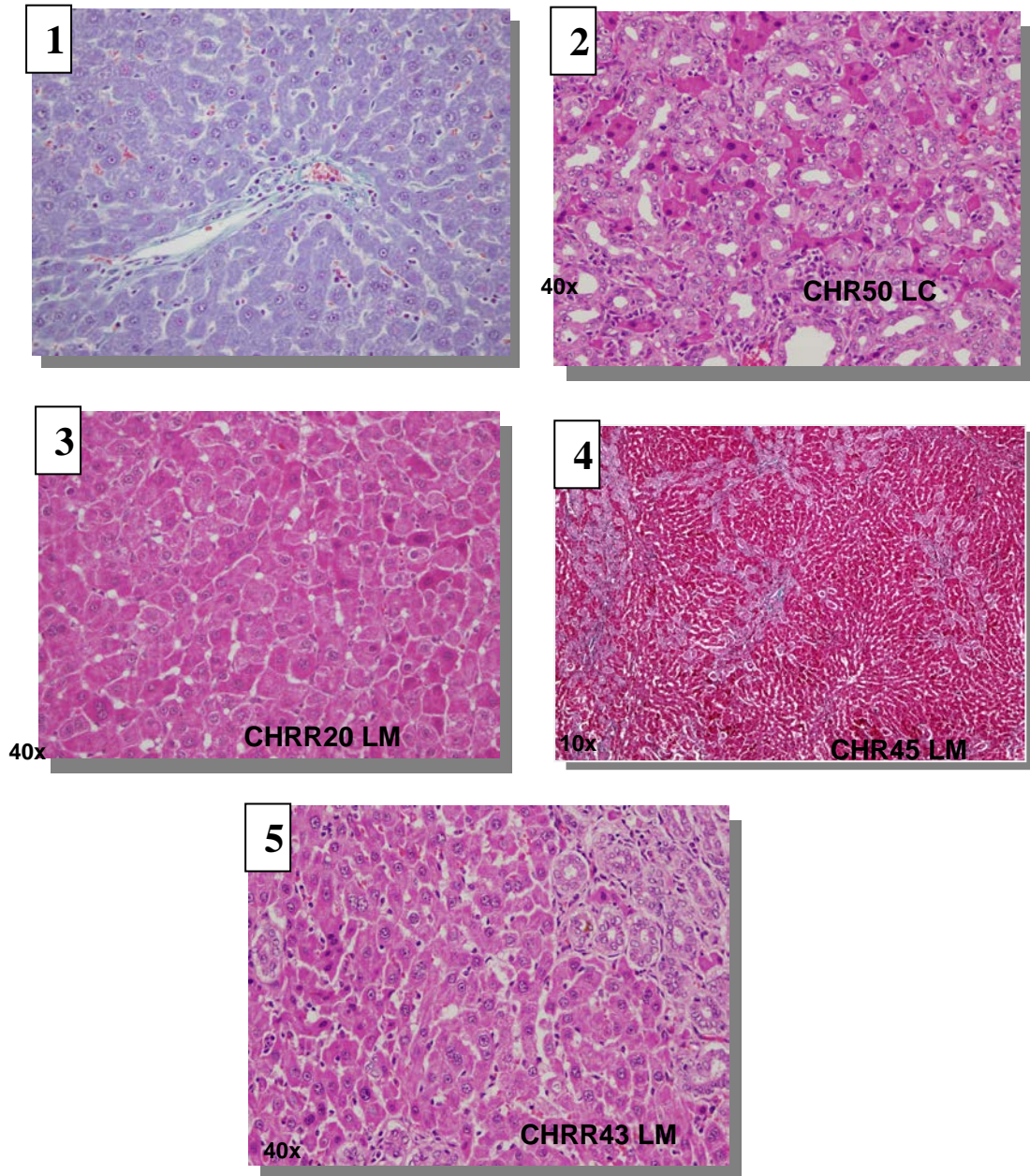


**Figura 66.** Imágenes obtenidas mediante microscopio óptica con tinción de Tricrómico de Masson correspondientes a los grupos de ratas con colestasis microquirúrgica: **a)** Colestasis microquirúrgica con administración de de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas **Fotografía 1** (40x) **b)** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre de rata adipocíticas prediferenciadas a hepatocitos **Fotografía 2** (40x). En ambas se demuestra la presencia de múltiples **mitosis** de hepatocitos (flechas).

Por ultimo, en el hígado del grupo de ratas con colestasis y administración de suero (CM-S; figura 67.2) se demuestra, tanto en el lóbulo medio, como en el lóbulo caudado, un marcado predominio de la **proliferación epitelial biliar** respecto del área de hepatocitos, observándose muchos de ellos con retracción eosinófila, lo cual significa que están necrosándose. Por el contrario, en las ratas con colestasis a las que se les administraron células madre adipocíticas no diferenciadas de rata (CCRND; figura 67.3), prediferenciadas a hepatocitos humanas (CCHP; figura 67.4), y prediferenciadas de rata (CCRP; figura 67.5), los hallazgos histopatológicos son

## RESULTADOS

heterogéneos, si bien en algunos animales predomina el área de hepatocitos respecto de la **proliferación biliar**, tanto en el lóbulo caudado, en el cual no se trasplantan células madre, como en el lóbulo medio, uno de los tres lóbulos hepáticos de la rata en los que se inyectan dichas células madre .



**Figura 67.** Imágenes obtenidas mediante microscopio óptico correspondientes a cortes histológicos del parénquima hepático de ratas del grupo con colestasis microquirúrgica: Seudoperada (SO): **Fotografía 1**(40X). Con administración de suero (CM-S) en las que se demuestra una marcada **proliferación biliar** que se acompaña de una reducción del área de hepatocitos, muchos de ellos en fase de necrosis (retracción eosinófila): **Fotografía 2** (40X). Estas alteraciones histopatológicas son más intensas en el lóbulo medio que en el lóbulo caudado Con administración células madre adipocíticas no diferenciadas de rata (CCRND): **Fotografía 3** (40X). Con administración células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos (CCHP): **Fotografía 4** (10X) y con

## RESULTADOS

---

*células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos (CCRP):***Fotografía 5** (40X), en las que predomina el área de hepatocitos respecto de la proliferación biliar, tanto en el área 1 y 2, como 3 del acino hepático.

En función de los resultados obtenidos, se puede concluir que:

1. En el grupo de ratas con colestasis y terapia con células madre se aprecian zonas en las que existe una **estructura hepática** conservada, proliferación de hepatocitos con mitosis y mínima proliferación biliar en relación a las ratas colestásicas que sólo recibieron suero (figura 64).
2. Dentro de cada corte histológico de un mismo lóbulo se observó que existen **áreas heterogéneas**, ya que hay zonas donde los hepatocitos están preservados, e incluso existe mitosis hepatocitaria, y otras donde predomina la proliferación biliar (figura 65).
3. Se aprecia efecto lóbulo, es decir la cantidad de hepatocitos y la proliferación biliar no es homogénea en todo el hígado, apreciándose diferencias en función del lóbulo en el que se realice el estudio.

En resumen, después de analizar histopatológicamente las muestras hepáticas obtenidas de los grupos de ratas con colestasis microquirúrgica y administración de suero (CM-S), con células de rata no diferenciadas (CCRND), con células humanas prediferenciadas (CCHP) y con células de rata prediferenciadas (CCRP), se puede concluir que en el grupo con administración de suero hay más fibrosis que en aquellos grupos en los que se administraron células madre, y dentro de estos, hay menos fibrosis en los grupos en los que se administraron células de rata que en los que se administraron células humanas.



## ***V. DISCUSIÓN***



## DISCUSIÓN

---

La administración intrahepática de células madre mesenquimales de origen adipocítico, tanto obtenidas del tejido adiposo del ser humano, como de la rata, a las dos semanas de evolución post-operatoria, en un modelo experimental microquirúrgico de colestasis extrahepática, donde los animales son sacrificados tras ocho semanas de insuficiencia hepática colestásica, produce efectos beneficiosos, ya que revierte parcialmente las alteraciones secundarias a la hipertensión portal y a la insuficiencia hepática, como son la hepatomegalia, la ascitis, la circulación colateral, el hipogonadismo, y la disminución de las concentraciones plasmáticas de parámetros de insuficiencia hepática así como la fibrosis y la proliferación biliar.

De esta manera, se pueden apreciar diferencias significativas en los grupos donde se administraron células prediferenciadas humanas (CCHP), de rata no diferenciadas (CCRND), y de rata prediferenciadas (CCRP) siendo estas diferencias más marcadas en los grupos que recibieron células de rata. De tal forma se observa un enlentecimiento en la progresión de los datos histológicos propios de la colestasis, un descenso en el volumen de ascitis, así como también un descenso en la disminución del peso corporal, en la relación peso hepático/peso corporal, peso esplénico/peso corporal y un aumento en la relación peso testicular/peso corporal. En relación a la circulación colateral, en contra a lo expuesto anteriormente, los cambios propios de la colestasis están plenamente establecidos en todos los grupos colestáticos. La progresión de la vasculopatía mesentérica es similar en los grupos de células y en el control. Además, podemos encontrar en los grupos de células un descenso no significativo tanto en los parámetros de colestasis como en los de función hepática. La supervivencia global es baja, sobre todo en el grupo colestático con administración de células humanas prediferenciadas (CCHP), posiblemente en relación a la inmunosupresión farmacológica. Si analizamos esta disminución de la supervivencia por etapas, observamos que hay un descenso no significativo en el grupo de células humanas por el aumento de la mortalidad intra operatoria secundaria al rechazo agudo, en relación al grupo que se administró suero (CMS) y a los grupos con administración de células de rata tanto prediferenciadas como no diferenciadas. Al igual, en fases posteriores (a partir de la primera semana post-administración de suero salino o de células madre hasta el sacrificio), se produce un descenso significativo de la supervivencia en las ratas que recibieron células madre humanas (CCHP), respecto a los grupos con administración de solución salina (CMS), o células de rata tanto

## DISCUSIÓN

---

indiferenciadas (CCRND) como prediferenciadas a hepatocitos (CCRP), posiblemente en relación a la inmunosupresión farmacológica.

En el presente trabajo, se ha realizado un estudio comparativo del tratamiento de la fibrosis biliar en la rata, según se efectúe un isotransplante o bien xenotransplante de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.

El modelo experimental utilizado ha sido la colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata, que tras una evolución de 8 semanas presenta insuficiencia hepática crónica con ictericia, hipertensión portal, circulación colateral porto sistémica, encefalopatía hepática y ascitis (Sánchez-Patan y cols., 2008; Aller y cols., 2008b; Aller y cols., 2010c; García-Domínguez y cols., 2010). La utilización de una técnica microquirúrgica para realizar la colestasis extra hepática en la rata, mejora los resultados conseguidos en el modelo experimental donde se utiliza la clásica técnica macroquirúrgica, consistente en la sección del colédoco entre las ligaduras. La microcirugía permite la disección de la vía biliar extra hepática sin ocasionar lesión vascular arterial o portal en el hilio hepático, así como su posterior resección sin lesionar el parénquima hepático (Diéguez y cols., 2002; Aller y cols., 2009b). Así mismo, la inexistencia de vía biliar extrahepática impide la formación de pseudoquistes biliares, que son propios de las técnicas macroquirúrgicas y que son causantes de precoces y graves complicaciones infecciosas, en particular abscesos hepatopulmonares y sepsis (Diéguez y cols., 2002; Aller y cols., 2009b; Aller y cols., 2009c).

Las ratas con ictericia obstructiva microquirúrgica precisan en su evolución tratamiento con antibióticos de amplio espectro que aminora el riesgo de infección postoperatoria, y la administración de vitamina K, ya que de lo contrario, los animales fallecen con precocidad por hemorragias, por deficiencia de factores de coagulación vitamina K dependientes que produce la insuficiencia hepática progresiva (Aller y cols., 2009c).

En este modelo experimental microquirúrgico, se produce una respuesta inflamatoria, tanto esplácnica como sistémica en la que están implicados factores, tanto pro inflamatorios como antiinflamatorios (García-Domínguez y cols., 2010), en particular, dentro de la respuesta inflamatoria esplácnica, destaca la propia del parénquima hepático, que se asemeja a la que acontece en las heridas y que finaliza con producción de fibrosis. En este sentido, se ha propuesto que sucesivamente se instaura, en el hígado un fenómeno de

## DISCUSIÓN

---

isquemia-reperfusión con estrés oxidativo, edema del espacio de Disse, activación de fibroblastos portales y células estrelladas hepáticas que se transforman en miofibroblastos, estimulación de células de Kupffer e infiltración intersticial leucocitaria y por último, intensa respuesta fibrogénica, si bien, asociada a proliferación canalicular biliar (Aller y cols., 2008b; Aller y cols., 2010c ; Aller y cols., 2010f).

La colestasis extrahepática experimental causa alteración de la homeostasis del parénquima hepático y, en consecuencia, se produce apoptosis y necroptosis hepatocitaria, que contribuyen a la instauración de fibrosis (Jiang y cols., 2010). En particular la homeostasis hepática, se ha demostrado que depende, entre otros factores, de la correcta regulación de la autofagia. Este proceso catabólico celular es responsable de la degradación de los distintos componentes de la célula por los lisosomas (Mizushirna y cols., 2008). Mediante la eliminación autofágica de proteínas y mitocondrias anómalas, la célula es capaz de regular el estrés oxidativo y el crecimiento, evitando la apoptosis. En el caso de los hepatocitos, la autofagia también regula importantes fenómenos metabólicos, como son la gluconeogénesis, la Beta-Oxidación de los ácidos grasos y la (Czaja y cols., 2013). A su vez, la alteración de la actividad autofágica en las células estrelladas hepáticas contribuye a su activación, induciendo su diferenciación a miofibroblastos. Se han propuesto dos mecanismos que inducen principalmente la alteración de la autofagia en las células estrelladas hepáticas, como son el estrés oxidativo y el estrés del retículo endoplasmico, ambos vinculados a diferentes tipos de agresión hepática, incluyendo la colestasis (Hernández-Gea y cols., 2013; Deretic y cols., 2013). Por último, también la deficitaria actividad autofágica de los macrófagos y en particular, de las células de Kupffer, favorecería la excesiva respuesta inflamatoria profibrogénica hepática. En este sentido, se reduciría su capacidad antioxidativa y por tanto, antiinflamatoria, con incremento de la producción y liberación de mediadores proinflamatorios, como la IL-1-alfa, IL-1-beta, IL-6 y TGF-Beta, que a su vez, estimularían la diferenciación y la actividad de linfocitos Th 17 (De Castro y cols., 2012). Sin embargo, la autofagia, además de su capacidad hepatoprotectora, también puede ejercer un efecto profibrogénico cuando se activa en células con capacidad fibrogénica, lo que sugiere que existe un sutil equilibrio regulador de los mecanismo autofágicos, para mantener la homeostasis hepática (Mallat y cols., 2014).

En las ratas con colestasis extrahepática, diferentes factores producen alteración de la regulación de la autofagia y por lo tanto, inducen apoptosis y fibronogénesis (Ertor y cols., 2013; Mahmoud y cols., 2014). Entre ellos, destaca la disminución de la capacidad antioxidativa, que favorece el estrés oxidativo y por tanto, la lesión hepática (Chen y cols., 2013). En este sentido, el modelo experimental de colestasis extrahepática, se ha propuesto como adecuado para estudiar los mecanismo patogénicos, que en los casos de atresia biliar producen insuficiencia hepática (Chen y cols., 2013; Wang y cols., 2014). Sin embargo, en estos modelos experimentales también debe considerarse necesaria la administración de vitamina K1, para evitar graves hemorragias precoces en los animales, que se ha sugerido que inhibe la activación fibrogénica de las células estrelladas hepáticas (Jiao y cols., 2014).

El estrés oxidativo, la activación del sistema inmunológico y la transdiferenciación mesenquimal celular, son los mecanismos más frecuentemente descritos como profibrogénicos (Parola y cols., 2009; Liedtk C., 2013; PU y cols., 2013; Novo y cols., 2014; Park y cols., 2014; Pellicoro y cols., 2014; Cicchini y cols., 2015). La colestasis extrahepática incluye además, como factores etiopatogénicos, la hipertensión intraductal y el estasis de sales biliares. En particular, las sales biliares son potencialmente tóxicas para las células hepáticas y a elevadas concentraciones dañan la integridad mitocondrial, produciendo liberación de citocromo y activación de la apoptosis. Sin embargo, y como ya ha sido mencionado, la apoptosis también puede ser iniciada en el retículo endoplásmico (Mallat y cols., 2014). Así el acúmulo de sales biliares puede causar estrés del retículo endoplásmico y liberación de calcio iónico, con la subsiguiente activación de las cascadas apoptóticas, tanto en hepatocitos como en colangiocitos (Beuers y cols., 2010). Sin embargo, los mecanismos productores de muerte hepatocitaria podrían ser múltiples en este modelo experimental de fibrosis biliar. En la actualidad, existe la evidencia de una cooperación entre los diversos mecanismos de muerte celular, lo que excluye considerar la implicación de un único mecanismo en su producción (Eguchi y cols., 2014).

La eficacia del tratamiento con células madre mesenquimales preferenciadas a hepatocitos en las ratas con colestasis extrahepática, sugiere que este tipo de trasplante celular es capaz de revertir parcialmente la respuesta inflamatoria profibrogénica hepática y por tanto, reducir la intensidad de los mecanismos patogénicos inherentes a la muerte celular hepatocitaria. Las

células madre mesenquimales retienen el potencial para diferenciarse a hepatocitos y así, son capaces de modular la inflamación hepática, asociando diferentes mecanismos, como son la producción de factores solubles y mediante contacto intercelular. Por lo tanto, el trasplante, por inyección intraparenquimatosa hepática, a las ratas con colestasis extrahepática, podría crear un ambiente propicio para la regeneración (Kadota y cols., 2014). Sin embargo, su prediferenciación a hepatocitos, podría favorecer esta función antiinflamatoria y proregenerativa. Las células mesenquimales derivadas del tejido adiposo, se diferencia a hepatocitos, tras ser tratadas con factor de crecimiento hepatocitario, dimetil sulfóxido y oncostatin M (Seo y cols., 2005). Protocolos posteriores de diferenciación hepatogénica de estas células mesenquimales, han permitido considerarlas como una terapia eficaz de la insuficiencia hepática (Teratani y cols., 2005; Banas y cols., 2007b). Los resultados del presente trabajo, sugieren que a su vez, el Isotrasplante, al evitar la respuesta inmunológica, favorece la recuperación estructural y funcional del hígado, respecto al xenotrasplante y por tanto es de elección. Así mismo, aunque las células madre mesenquimales derivadas del tejido graso, tiene capacidad regenerativa hepática, (Ishikawo y cols., 2012; Francois y cols., 2013; Lanzoni y cols., 2013) su prediferenciación a hepatocitos demuestra que produce una reversión significativa del grado de insuficiencia hepática y por lo tanto, de sus complicaciones respecto de las que no han sido prediferenciadas.

La gran capacidad que poseen las células madre mesenquimales para diferenciarse en hepatocitos, ofrece múltiples posibilidades terapéuticas, tanto en la insuficiencia hepática aguda como crónica (Lange y cols., 2005; Volarevic y cols., 2014). En el ser humano, las células madres mesenquimales pueden ser obtenidas, no solo del tejido adiposo por lipoaspiración, sino también, de la médula ósea, del cordón umbilical y del líquido amniótico (Zheng y cols., 2008; Banas y cols., 2009). Con independencia de su origen, estas células pueden ser diferenciadas en células con características similares a hepatocitos (Lee y cols., 2004). La capacidad que tienen estas células prediferenciadas a hepatocitos de expresar funciones hepatocitarias, como son la síntesis de albúmina, el almacenamiento de glucógeno, la producción de urea, la captación de lipoproteínas de baja densidad y la actividad detoxificadora de citocromo P450, (LingL y cols., 2008; Volarenic y cols 2014) explica el significativo resultado terapéutico que hemos obtenido tras su administración a las ratas con insuficiencia hepática crónica colestásica.

## DISCUSIÓN

---

Aunque la investigación realizada sobre las funciones hepatocitarias de las células mesenquimales, demuestra su capacidad terapéutica en la insuficiencia hepática, (Esmaeli y cols., 2014; Jang y cols., 2014; LU y cols., 2014; Hang y cols., 2014) no se ha excluido la posibilidad de utilizar células madre hepáticas para suplir los hepatocitos perdidos, en casos de lesión hepática aguda o crónica, así como hepatocitos de hígado fetal y células madre embrionarias (Esfoglu y cols., 2013; Lee y cols., 2014; Kamiga y cols., 2014). A favor de la utilización de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo, se arguye que pueden ser obtenidas en gran número por lipoaspiración y que su capacidad inmunomoduladora, de diferenciación hepatocitaria y de albergarse en ambientes de lesión celular, así como de inductoras de revascularización y regeneración tisular, las hace enormemente atractivas para el tratamiento de la insuficiencia hepática, tanto aguda como crónica (Ochiya y cols., 2010; Seo y cols., 2005; Esrefoglu y cols., 2013; Fiore y cols., 2014).

Recientemente, se ha demostrado que la fibrosis hepática secundaria a colestasis extrahepática, se produce principalmente, por la activación de los miofibroblastos portales. Estos miofibroblastos fibrogénicos, contribuyen a la formación del 70% de los miofibroblastos que se originan en el 5º día de evolución, tras la ligadura y sección del colédoco en el ratón, (Iwaisako y cols., 2014). Los fibroblastos portales, normalmente rodean a la vena porta y mantienen la integridad de los tractos portales y por esta razón, se han denominado “fibroblastos periportales” (Dranoff y cols., 2010.). Tras colestasis extrahepática, los miofibroblastos portales expresan con mayor intensidad su RNA de colágeno tipo I, Alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) e Inhibidor de metaloproteinasas tisular-1 (TIMP-1), así como, receptor de IL-25. Por lo tanto la IL-25 podría estimular a los miofibroblastos portales, que secretarían IL-13, causando a su vez, la estimulación posterior de células estrelladas hepáticas (Iwaisako y cols., 2014).

La inyección intraparenquimatosa hepática de células madre mesenquimales prediferenciadas a hepatocitos, es posible que causen inhibición tanto de la respuesta fibrogénica inicial, protagonizada por fibroblastos periportales, como por la respuesta fibrogénica asociada posterior producida por las células estrelladas hepáticas, ya que dicho tratamiento fue realizado a las 2 semanas de evolución tras la realización de la colestasis extrahepática. Ambos tipos de células hepáticas fibrogénicas tienen su origen en el mesotelio. Durante su desarrollo embrionario el mesotelio sufre una transición epitelio-mesenquimal

## DISCUSIÓN

---

que produce tanto fibroblastos periportales como células estrelladas hepáticas (Enzan y cols., 1997; Hassan y cols., 2004). Sin embargo, mesotelina que se expresa en células mesoteliales normales, tan solo es expresado por fibroblastos portales activados, y por tanto se considera un marcador específico de este tipo de células fibrogenicas (Iwaisako y cols., 2014).

Así mismo, el trasplante de células madre mesenquimales prediferenciadas a hepatocitos, podrían desempeñar, tanto las funciones propias de los hepatocitos en los hígados de rata con fibrosis biliar, (Lee y cols., 2014) como inducir la transición mesénquimo-epitelial de las células estrelladas hepáticas. Las células estrelladas hepáticas quiescentes, están localizadas entre las células endoteliales sinusoidales y los hepatocitos en el espacio de Disse, que tiene unas características similares a los nichos de célula madre. Por estimulación, tras la producción de colestasis, estas células estrelladas, podrían transformarse en células con características hepatocitarias tras el trasplante de células madre mesenquimales. Este efecto paracrino de las células madre mesenquimales prediferenciadas a hepatocitos, determinaría la diferenciación de las células estrelladas hepáticas en células mesenquimatosas hepáticas. En este sentido, se ha demostrado que las células estrelladas hepáticas en cultivo, pueden diferenciarse en células sintetizadoras de ácidos biliares y adquirir funciones contribuidoras a la regeneración hepática (Kordes y cols., 2014).

Se ha demostrado, que las células estrelladas hepáticas ejercen una función primordial en el desarrollo embrionario del hígado, así como en su homeostasis durante la vida adulta (Asahina, 2012). Durante el desarrollo embrionario, las células estrelladas hepáticas secretan quimioquina SDF-1, en tanto que las células endoteliales sinusoidales producen su receptor CXCR4. A su vez, las células endoteliales producen PDGF-beta, en tanto que las células estrelladas hepáticas producen su receptor. Así mismo, las células estrelladas hepáticas, mediante la producción de SDF-1 son capaces de reclutar células madre hematopoyéticas en el hígado, mediante el eje SDF-1alfa/CXCR4 (Yin y cols., 2013).

Las células estrelladas hepáticas también producen factores de crecimiento, como Wnt, Factor de crecimiento fibroblástico (*Fibroblastic growth factor*, FGF), Factor de crecimiento hepatocitario (*Hepatocyte growth factor*, HGF) y ácido retinoico, que a su vez, regulan el crecimiento de las células epiteliales hepáticas (Alatas y cols., 2011; Chen y cols., 2012; Yin y cols., 2013).

## DISCUSIÓN

---

Por lo tanto, estos factores pueden estimular la proliferación de células progenitoras del hígado, así como de hepatocitos o bien, actuar indirectamente a través de las células endoteliales sinusoidales y las células inmunes, para regenerar el hígado (Friedman, 2008).

Entre los factores de crecimiento citados, destaca Wnt, ya que es una vía de señalización hepática implicada en la patogénesis de la fibrosis (Thompson y cols., 2007). Esta vía de señalización produce inhibición de GSK 3 beta (Glycogen syntethase Kinase 3 B), que a su vez inhibe la degradación de Beta-catenina y su traslocación al núcleo, donde altera la expresión de genes Wnt. Sin embargo Wnt posee una vía de señalización independiente de Beta-catenina, mediante la liberación de calcio iónico intracelular, que activa la protein-quinasa C y calmodulina quinasa II sensible al calcio, así como la regulación del crecimiento y la diferenciación celular mediante la activación de GTP-asas que estimulan la actuación de quinasas, como rhoquinasa y DNK (Miao y cols., 2013) . En esencia, Wnt está implicado en la fibrosis hepática, ya que puede causar activación y proliferación de las células estrelladas hepáticas, incluso tras su modificación por factores epigenéticos. Por lo tanto, es posible su modificación para tratar la fibrosis hepática. En este caso, la actividad paracrina de las células madre mesenquimales prediferenciadas a hepatocitos, podría ejercer un efecto antifibrinogénico en el modelo experimental de colestasis extrahepática, inhibiendo la vía de señalización Wnt en las células estrelladas hepáticas activadas a miofibroblastos.

Las células estrelladas hepáticas también expresan receptores Notch y genes que se estimulan por la vía de la señalización Notch, los cuales están implicados en la diferenciación de las células biliares intrahepáticas (Zong y cols., 2009). Se explicaría así su protagonismo en la producción de proliferación biliar en la colestasis extrahepática experimental. Además, las células estrelladas hepáticas pueden ejercer su actividad fibrogénica regulando la síntesis y destrucción de la matriz extracelular hepática. Así, pueden influenciar la diferenciación de los hepatoblastos durante el desarrollo embrionario, regulando los componente de la matriz extracelular, (Suzki y cols., 2003) o bien, degradar la matriz extracelular mediante la producción de metaloproteinasas, liberando moléculas biológicamente activas como, por ejemplo, citoquinas y factores de crecimiento, que se acumulan en su interior (Pi y cols., 2008). Por lo tanto, el isotrasplante de células madres mesenquimales intrahepático en la fibrosis biliar, podría favorecer la regeneración hepática, entre otros

## DISCUSIÓN

---

mecanismos, inhibiendo las funciones profibrogénicas de las células estrelladas hepáticas activadas a miofibroblastos.

El trasplante de células madre mesenquimales prediferenciadas a hepatocitos en ratas con ictericia obstructiva, no solo reduce la fibrosis, sino que también induce la expansión de la población hepatocitaria, en tanto que podría reducir la proliferación ductular biliar. Este efecto terapéutico, podría ser atribuido a la capacidad que poseen las células madre mesenquimales para revertir la dediferenciación celular hepática que induce la respuesta inflamatoria secundaria a la colestasis extrahepática (Aller y cols., 2012b).

En particular, la reacción ductular que se produce en la colestasis extrahepática, se corresponde con los estadios finales de la metaplasia o dediferenciación colangiocitaria de los hepatocitos descrita por Desmet, (Desmet, 2011a) que induce la activación de células progenitoras existentes en el hígado y/o de células progenitoras formadas de novo en el hígado (Desmet, 2011b). Estas reacciones ductulares hepáticas, adoptan una configuración en “placa ductal”. Las placas ductales son formas primitivas de conductos biliares intrahepáticos, formados durante el desarrollo embrionario del hígado y consisten en una doble pared celular que delimita una hendidura (Van Eyken y cols., 1988; Desmet 2011).

En la mayoría de las reacciones ductulares que se producen en el hígado colestásico, se constituyen, a manera de pequeñas placas ductales, formadas por un pequeño vaso sanguíneo central, rodeado de una pequeña cantidad de mesénquima y una doble capa de células epiteliales biliares, que delimitan una hendidura luminal, casi virtual. Esta configuración se asemeja a las placas ductales embrionarias con estructura bicapa epitelial en un estadio precoz de remodelación (Desmet, 2011a). Por esta razón, la denominada “metaplasia colangiocítica” de los hepatocitos, podría representar una dediferenciación hacia tipos celulares más primitivos (Desmet y cols., 1995). Este concepto de dediferenciación celular es ratificado por diversos trabajos publicados en la literatura científica y ha sido atribuido, principalmente, a una respuesta a la inflamación (Aller y cols., 2013).

Existen diferentes tipos de reacciones ductulares, que a lo largo de la evolución de la colestasis extrahepática experimental, se podrían expresar superponiéndose. Así, la denominada reacción ductular tipo I, es la que predomina tras la obstrucción aguda y total de la vía biliar. Este tipo de reacción,

## DISCUSIÓN

---

tiene como resultado, la proliferación de los colangiocitos preexistentes, con elongación, ramificación y dilatación de los conductos biliares (Desmet, 2011a). A su vez, la reacción ductular de tipo 2A, ha sido interpretada como una “metaplasia ductular” de los hepatocitos y se asocia a un cambio de su polaridad secretora. Este tipo de reacción ductular, se aprecia en las áreas periportales y es propia de la colestasis crónica, asociándose a fibrosis. Se considera que las reacciones ductulares de tipos 1 y 2 A, son reversibles cuando la causa de la obstrucción biliar es eliminada (Desmet, 2011a).

Ya que la reacción ductular de tipo 2 A, se produce en las ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica, (Aller y cols., 2008a) y revierte parcialmente tras el isotrasplante de células madre mesenquimales, a pesar de la persistencia de la causa original de la colestasis, cual es la obstrucción biliar, se precisa evaluar los mecanismos que inducen su reversión.

La hipotética subdivisión del hígado, dependiendo del protagonismo vascular arterial y portal, implicaría la existencia de un parénquima arterio-biliar, por la dependencia trófica de la vía biliar con el flujo arterial hepático (Aller y cols., 2010c) y un parénquima complementario porto-hepatocitario, por la dependencia trófica de la trabéculas hepáticas con el flujo portal (Starzl y cols., 1973). La colestasis extrahepática, produce proliferación biliar y fibrosis, que a su vez reduce el flujo portal y menoscaba el funcionalismo hepatocitario. Sin embargo, la respuesta inflamatoria secundaria a la colestasis obstructiva, podría ejercer una acción ambivalente, según incida en el hígado arteriobiliar o en el hígado porto-hepatocitario. Así, en el hígado arteriobiliar la inflamación causaría un fenómeno de desdiferenciación, lo que explicaría formación de estructuras semejantes a las placas ductales, propias del desarrollo embrionario hepático (Desmet, 2011a). A su vez, la respuesta inflamatoria porto-hepatocitaria, induciría la desdiferenciación metabólica, con atrofia hepatocitaria. En este supuesto, el trasplante de células madre mesenquimales prediferenciadas a hepatocitos, facilitaría, por su actividad inmunomoduladora, la reposición parcial hepatocitaria, favorecería el metabolismo hepático, mejorando la supervivencia de los animales, el grado de necrosis y/o apoptosis de los hepatocitos, la proteinemia y albuminemia y *MELD*, así como, reduciendo la hipertensión portal y la intensidad de la ascitis. La semejanza de las células trasplantadas con los hepatocitos, permite su función metabólica, si bien, deficitaria, (Esrefoglu, 2013) aunque poseen una elevada capacidad proliferativa y por lo tanto, en los días

## DISCUSIÓN

---

sucesivos a su trasplante proliferan y se especializan, recuperando significativamente la función hepática (Zhang y cols., 2010).

Puesto que, el xenotrasplante de células madre mesenquimales prediferenciadas a hepatocitos, no consigue los beneficiosos resultados del isotrasplante en las ratas colestásicas, debe considerarse, que dicho déficit funcional, podría ser atribuido a la agresión inmunológica de las células trasplantadas, a pesar del tratamiento inmunosupresor que les fue administrado durante el periodo posoperatorio. La agresión inmunológica de las células es un tema (Streckbein y cols., 2013), ya que algunos autores han obtenido buenos resultados sin un significativo rechazo (Arinzeh y cols., 2003; Ben-David y cols., 2011; Lin Ch S, Lin y cols., 2012; Tsuji y cols., 2014) mientras que otros demuestran la existencia de una importante respuesta immune post trasplante. (Grunnens y cols., 2004; Poncelet y cols., 2007). Por esta razón, cuando hemos realizado xenotrasplante, administramos Tacrolimus, un macrólido inmunosupresor para la profilaxis del rechazo. Su mecanismo de acción es mediado por la inhibición de la calcineurina que impide la producción de IL-2 y por tanto reduce la proliferación de linfocitos T. (Brazelton y cols., 1996). En la actualidad los fármacos inhibidores de la Calcineurina constituyen el tratamiento fundamental en los protocolos inmunosupresores en el trasplante hepático (Ganschow y cols., 2014).

El isotrasplante de células madres mesenquimales prediferenciadas a hepatocitos, no solo recupera la función metabólica hepatocitaria, sino que también reduce significativamente el grado de fibrosis en el hígado con colestasis extrahepática crónica (Figura 48 y 49), ya que estas células madre multipotentes tienen actividad antiinflamatoria (Glenn y cols., 2014). La disminución o reversibilidad de la fibrosis podría atribuirse a la disminución de la producción de factores profibrogénicos por las células estrelladas hepáticas y el epitelio biliar proliferante, como por el incremento de factores antifibrogénicos. En este sentido, la disminución de la intensidad de la respuesta inflamatoria induciría también la diferenciación de los miofibroblastos derivados de fibroblastos portales y de células estrelladas hepáticas, adoptando un fenotipo inerte (Pellicoro y cols., 2014; Jawaisako y cols., 2014). Sin embargo, se debe excluir la posibilidad de que se produzca una transdiferenciación mesénquimo-epitelial, ya que se ha demostrado que las células estrelladas hepáticas son suficientemente multipotentes para producir hepatocitos, colangiocitos o células ovales, por transición mesénquimo-epitelial, (Lua y cols., 2014). Por el contrario

## DISCUSIÓN

---

no se puede excluir la posibilidad de que uno de los efectos terapéuticos de las células madre mesenquimales sea la producción de hepatocitos a expensas de los conductos biliares proliferantes o células ovales (Tarlow y cols., 2014).

Por lo tanto, los efectos beneficiosos del trasplante de células madres mesenquimales en el hígado de rata con fibrosis biliar, podría ser atribuido, principalmente, a sus efectos inmunomoduladores e inmunosupresores, que suprimirían o reducirían la inflamación (Kyurkchiev y cols., 2014, Glenn J D y cols., 2014). A su vez, tras su prediferenciación a hepatocitos, se favorecería su utilización para conseguir la regeneración hepática (Wu y cols., 2012; Qin y cols., 2014).

Respecto a las alteraciones esplácnicas y sistémicas que se asocian a la fibrosis biliar en la rata, destacan la hipertensión portal con circulación colateral portosistémica con vasculopatía venosa mesentérica, esplenomegalia, ictericia, disfunción renal, encefalopatía, hipogonadismo y ascitis. Estas alteraciones son propias, tanto del modelo experimental de colestasis extrahepática microquirúrgico, como macroquirúrgico (Aller y cols., 2009b; Aller y cols., 2008b). Los animales evolucionan con circulación hiperdinámica esplácnica y sistémica (Martinez-Prieto y cols., 2000; Atucha y cols., 2000; Li y cols., 2003; D'Aroico y cols., 2012), disfunción inmunológica con traslocación bacteriana intestinal e importante respuesta de fase aguda (Elgek y cols., 2012; Sipeki y cols., 2014; Barut y cols., 2014), encefalopatía hepática (García-Moreno y cols., 2005; Méndez y cols., 2008; Hosseini y cols., 2014), disfunción hepática y renal (Harry y cols., 1999; Adebayo y cols., 2014) y ascitis (Salerno y cols., 2010; Aller y cols., 2010e).

Sin embargo, en este modelo experimental se consideran dos periodos evolutivos con distintas características. Durante el primer periodo evolutivo, los animales desarrollan insuficiencia hepática crónica de evolución progresiva hasta las 6 semanas del posoperatorio. A partir de esta fecha, la aparición de ascitis indica la descompensación de la insuficiencia hepática crónica, instaurándose un fallo hepático agudo sobre el crónico, con fallecimiento de los animales hacia la 9-10 semana de evolución (Li y cols., 2003; Aller y cols., 2004a). Se considera, que a partir de la 6ª semana de evolución, las ratas con colestasis obstructiva microquirúrgica, inician una fase de franca descompensación, asociándose una intensa respuesta de fase aguda, con incremento de las concentraciones séricas de glicoproteína ácida alfa-1 y tiostatina, edema mesentérico, principalmente

## DISCUSIÓN

---

peripancreático e incremento de citoquinas Th1 y Th2 en intestino delgado y el complejo ganglionar mesentérico.(García-Domínguez, 2010). Esta asociación de citoquinas consideradas proinflamatorias y antiinflamatorias en el área esplácnica (Aller y cols., 2008b), sugiere la existencia de una modulación inmune con respuestas antagónicas.

Se ha propuesto que en esta fase descompensada de la evolución de la insuficiencia hepática crónica, se produciría un cambio metabólico, con instauración de un metabolismo oxidativo que se fundamentaría en la reducida producción energética por glucolisis (Aller y cols., 2010b). Mediante este mecanismo metabólico defensivo se reducirían las necesidades energéticas del organismo y por lo tanto, también la capacidad para expresar funciones celulares sumamente especializadas, especialmente las funciones celulares creadoras de barreras endoteliales, epiteliales y mesoteliales, que son las que compartimentan eficazmente el organismo (Aller y cols., 2010b).

Quizá por esta razón, una vez que se inicia la fase de descompensación en las ratas colestásicas, la progresiva reducción de la actividad metabólica, causaría el aumento progresivo de la permeabilidad de las barreras epiteliales, por ejemplo, gastrointestinal y urinaria y barreras endoteliales, por ejemplo, los sistemas microcirculatorios sanguíneo y linfático espláncnicos y por último, las barreras mesoteliales, por ejemplo, el peritoneo. En suma, se originaría una grave descompartimentalización, principalmente esplácnica, que produciría fracaso funcional multiorgánico. En este hipotético caso, se establecería en el territorio esplácnico, un eje inflamatorio en el que concurrirían patologías epiteliales, endoteliales y mesoteliales, caracterizadas por el aumento de la permeabilidad, por lo que se instauraría una continuidad anómala entre el espacio intersticial gastrointestinal, el sistema vascular linfático mesentérico y la cavidad peritoneal (Aller y cols., 2010e). En particular, el intersticio esplácnico, los linfáticos mesentéricos y el mesotelio peritoneal, podrían crear una vía inflamatoria, que tendría gran relevancia fisiopatológica cuando se produce fallo hepático agudo sobre crónico, como sucede en las ratas con colestasis extrahepática a las 6 semanas de evolución posoperatoria.

La instauración de un brusco cambio metabólico esplácnico en las ratas colestásicas, como causa principal de la descompensación de la insuficiencia hepática crónica, podría permitir integrar los diferentes mecanismos etiopatogénicos propuestos para explicar la aparición de ascitis (Cazaniga y

cols., 2009; Arroyo y cols., 2014; Zamora y cols., 2004; Kim y cols., 2013; Moreau y cols., 2013; Asrani y cols., 2014). En este sentido, el estado hipometabólico que se produce durante este proceso inflamatorio agudo sobre crónico, podría inducir una desdiferenciación celular. Así, las células endoteliales, epiteliales y mesoteliales espláncnicas, al adoptar propiedades similares a la que poseen las células madre, reducirían la expresión de genes que codifican moléculas de adhesión (Araamides y cols., 2008), lo que a su vez, facilitaría el aumento de la permeabilidad de las barreras que respectivamente constituyen el individuo adulto.

En este supuesto, el isotrasplante de células mesenquimales prediferenciadas a hepatocitos a las ratas con colestasis obstructiva microquirúrgica, se alojaría en el hígado lesionado y por su capacidad para la diferenciación, mejorarían la función hepatocelular y por tanto el metabolismo (Ochiya y cols., 2010; Kim y cols., 2011). Estas células prediferenciadas a hepatocitos, aunque no tienen las características de los hepatocitos maduros, pueden generar hepatocitos y por consiguiente, favorecerían la recuperación metabólica de los animales. En este caso, impedirían o aminorarían la desdiferenciación celular impuesta por la inflamación aguda sobre crónica y en consecuencia, reducirían sus complicaciones, en particular, el grado de ascitis.

Las células madre derivadas de tejido adiposo poseen numerosas funciones que les permiten alojarse en tejidos lesionados, como son, la capacidad para la inmunomodulación y la revascularización, pero, además, ejercen actividad antiapoptótica, de diferenciación y regenerativa (Esrefoglu, 2013). Además, una vez trasplantadas en animales con insuficiencia hepática, residen en el hígado lesionado y se diferencian a hepatocitos (Banas y cols., 2009). En el presente trabajo el isotrasplante en ratas con fibrosis biliar, reduce el grado de insuficiencia hepática, fibrosis biliar y ascitis, aunque su eficacia es menor que la propia de estas células cuando son prediferenciadas a hepatocitos.

Las células madre mesenquimales ejercen una función inmunomoduladora, por sus propiedades anti inflamatorias (Glenn y cols., 2014). Se ha demostrado, que su acción inmunosupresora incluye, tanto la inmunidad natural como la adquirida. Así, las células madre mesenquimales antagonizan el fenotipo proinflamatorio de los macrófagos tipo 1 (M1), en tanto, potencian el fenotipo macrofágico tipo 2 (M2), productor de IL-10, (Kim y cols., 2009). Así mismo, producen prostaglandina E2 (PGE2), que suprime al TNF-alfa y a la IL-6

(Maggini y cols., 2010) y reduce el estrés oxidativo al aumentar la producción de glutatión (Ayatollani y cols., 2014). Este conjunto de funciones, explicaría su capacidad para revertir la fibrosis hepática y por tanto, mejorar la función de los hígados, tanto tras la administración de troacetamida como de tetracloruro de carbono (Ayatollani y cols., 2014).

Así mismo, las células madre mesenquimales inhiben la capacidad de las células cebadas para degranular (Brown y cols., 2011), mediante la producción de PGE2. En particular, en la insuficiencia hepática crónica, así como en la hipertensión portal prehepática experimental, se ha sugerido que los mediadores inflamatorios producidos por las células cebadas, podrían tener un destacado protagonista en la producción de la inflamación esplácnica (Prieto y cols., 2005; Aller y cols., 2007c). Las células cebadas participan, tanto en la respuesta inmunitaria natural como en la adquirida y en las ratas con hipertensión portal, la infiltración que producen, tanto en el intestino delgado como en los ganglios linfáticos mesentéricos, sugiere dicha actividad dual en la inflamación esplácnica (Aller y cols., 2007c).

En los animales con colestasis extrahepática microquirúrgica, el hígado presenta aumento significativo de la densidad de las células cebadas. Estas células se acumulan en los espacios porta y en los septos fibrosos, asociándose pues, a la fibrosis y a la proliferación ductular biliar (Aller y cols., 2008a). Las células cebadas residen habitualmente, aunque en escaso número, en los tractos portales hepáticos, sin embargo, en las patologías hepáticas crónicas, como son la cirrosis biliar primaria y la cirrosis alcohólica, su número aumenta invadiendo, no solo los espacios portales, sino también los sinusoides (Farrel y cols., 1995). En estas enfermedades hepáticas progresivas, el incremento del número de células cebadas se correlaciona con el grado de fibrosis hepática. Por lo tanto, se ha sugerido que las células cebadas y sus mediadores podrían estar implicadas en la fibrogénesis hepática (Francis y cols., 2010; Francis y cols., 2010). En la colestasis extrahepática experimental, también se ha demostrado, que las células cebadas se acumulan en los espacios portales, alrededor de los conductos biliares proliferantes (Takeshita y cols., 2005). Sin embargo, las células cebadas también pueden migrar a los ganglios linfáticos e inducir tolerancia. Así, se ha demostrado que el trasplante de órganos cursa con migración de células cebadas a los ganglios linfáticos, donde participan en la presentación de antígenos a linfocitos T, así como contribuyen a la inducción de (Jahauyar y cols., 2008; Bond y cols., 2015).

## DISCUSIÓN

---

Estos resultados contradictorios, se atribuyen a la gran capacidad que poseen las células cebadas para modificar su fenotipo, en relación con las características ambientales, el tipo de estímulo que reciben y el tejido u órgano de procedencia. Así mismo, es variable su proceso de síntesis, almacenamiento y secreción de mediadores (Moon y cols., 2014). Por lo tanto, no se puede excluir que tras la inyección intrahepática de células madre mesenquimales, se modifique su fenotipo en razón a las nuevas características bioquímicas que impone este trasplante celular. Incluso, las células cebadas pueden ejercer funciones antiinflamatorias, por ejemplo, mediante la degradación enzimática de citoquinas proinflamatorias y quimoquinas (Wernersson y cols., 2014).

Ya que el modelo experimental de colestasis extrahepática microquirúrgica cursa, a partir de la 6ª semana de evolución, con fracaso hepático agudo sobre crónico productor de ascitis, se puede considerar que tanto el xenotrasplante de células madre mesenquimales prediferenciadas a hepatocitos, como el isotrasplante de dicho tipo de células, es un tratamiento eficaz de esta grave complicación. Tanto el xenotrasplante como el isotrasplante, favorecerían la reversión parcial de la insuficiencia hepática aguda, por sus acciones antiinflamatorias (Kyurkchiev y cols., 2014; Glenn y cols., 2014) como promotora de regeneración (Zhov y cols., 2014). Esta capacidad regeneradora hepática, también ha sido demostrada experimentalmente, utilizando células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea (Sato y cols., 2005; Cho y cols., 2009; Sun y cols., 2013). Las células madre mesenquimales humanas procedentes de la médula ósea, han sido trasplantadas, tras su encapsulación para favorecer su protección inmunológica, a ratones cirróticos. Por este método se consigue incrementar su eficacia antiinflamatoria y antifibrótica. Mediante la producción de mediadores antiinflamatorios, las células madre mesenquimales microencapsuladas, reducen la concentración de RNA mensajero, de colágeno tipo 2 y aumentan la producción de metaloproteinasa 9, así como incrementan los niveles plasmáticos de receptor soluble de IL-1 (IL-1Ra) humano (Meier y cols., 2014).

La insuficiencia hepática aguda sobre crónica, se ha propuesto que induce una regresión metabólica, con la adopción de un fenotipo denominado de isquemia-reperfusión, que se caracteriza por la producción de hipoxia o disoxia, hipometabolismo y edema intersticial (Aller y cols., 2007c; Aller y cols., 2010). El organismo que sufre los efectos de este fenotipo, aumentaría el estrés oxidativo y enzimático, que favorecería su hidratación y salinización, con retención de

## DISCUSIÓN

---

agua y sal, edema celular e intersticial, disminución de la producción de energía al utilizar en exceso la glicolisis y desdiferenciación celular con inhibición de las funciones especializadas, que comporta la disminución en la producción de uniones intercelulares y por tanto, la descompartmentalización del organismo (Aller y cols., 2010e).

Este supuesto mecanismo de supervivencia, ante la grave deficiencia metabólica impuesta por el fracaso hepático agudo, causaría, a su vez, un síndrome hepato-renal, con ascitis refractaria al tratamiento (Salerno y cols., 2010; Adebayo y cols., 2014). En esencia, la insuficiencia metabólica asociada a este fenotipo de isquemia-revascularización, causaría un fenómeno de desdiferenciación, que favorecería la supervivencia. En este grave proceso defensivo, se considera que también podrían participar las células cebadas, ya que poseen mediadores inflamatorios capaces de causar las alteraciones hemodinámicas y metabólicas asociadas a la ascitis (Allen y cols., 2007c).

Por esta razón, la reversión parcial de la ascitis en las ratas con xenotrasplante e isotrasplante de células madre mesenquimales pre diferenciadas a hepatocitos, reflejaría su efecto antiinflamatorio y favorecedor del metabolismo esplácnico. La descompensación de la insuficiencia hepática colestásica, aumentaría la permeabilidad endotelial en el eje hepato-intestinal con edema intersticial, incremento del drenaje linfático y disfunción linfática esplácnica con linfangiectasia, que se asociaría a la producción de ascitis (Wiig y cols., 2012; Seo y cols., 2012). A su vez, el tratamiento con células madre mesenquimales, al diferenciarse en hepatocitos favorecerían el metabolismo hepático, potenciarían la diferenciación celular, reducirían la permeabilidad endotelial, aminorarían el edema intersticial y el drenaje linfático y en consecuencia, reducirían la producción de líquido ascítico. Este efecto terapéutico de las células madre mesenquimales prediferenciadas a hepatocitos es superior en el caso de los isotrasplantes respecto a los xenotrasplantes, lo que sugiere que la agresión inmunológica del injerto reduce su eficacia. Por el contrario, el isotrasplante, incluso utilizando células madre mesenquimales no prediferenciadas a hepatocitos produce una reducción mas significativa del volumen de líquido ascítico que el xenotrasplante y por esta razón, se podría considerar de elección en el tratamiento de la insuficiencia hepática aguda sobre crónica.

## DISCUSIÓN

---

En conclusión, los resultados del presente trabajo experimental demuestran que el tratamiento con células mesenquimales derivadas de tejido adiposo, tanto prediferenciadas a hepatocitos como no prediferenciadas, revierte significativamente las alteraciones que son propias de la insuficiencia hepática crónica descompensada o aguda sobre crónica en la rata con colestasis extrahepática microquirúrgica. Sin embargo, el mecanismo podría ser diferente según se utilicen células madre mesenquimales prediferenciadas a hepatocitos o no prediferenciadas. En el primer caso, la intensa función metabólica y regeneradora hepatocitaria, induciría la reversibilidad de la desdiferenciación inflamatoria. En esencia, el retorno de la capacidad para el metabolismo fundamentado en la fosforilación oxidativa y por tanto con elevada producción energética, propio de las células epiteliales especializadas, revertiría a fibrosis hepática y la proliferación biliar. A su vez, el trasplante de células madre mesenquimales no prediferenciadas a hepatocitos ejercerían principalmente, una actividad inmunosupresora, si bien, con posterioridad y mediante transdiferenciación a hepatocitos, poseerían un efecto regenerador hepático y prometabólico. Quizás por esta razón, su efecto terapéutico es menor respecto del logrado por las células madre mesenquimales prediferenciadas a hepatocitos.

La respuesta inflamatoria hepática a la colestasis extrahepática es compleja y en ella participan múltiples mecanismos como son el estrés oxidativo (Czaja y cols., 2014), la hipoxia con actividad del factor inducible por hipoxia (HIF)-1-alfa (Zhan y cols., 2015), la activación de células de Kupffer (Marra y cols., 2014), la infiltración leucocitaria (Xu y cols., 2014), la activación inicial de fibroblastos portales (Clozeau-Girard y cols., 2006; Kissileva y cols., 2012; Wells y cols., 2014) y más tarde de células estrelladas hepáticas (Freise y cols., 2004; Iwaisako y cols., 2014; Marra y cols., 2014). El resultado final, es la fibrosis biliar con intensa proliferación ductular biliar (Aller y cols, 2008a). La mayor eficiencia obtenida con el trasplante de células madre mesenquimales cuando se prediferencian a hepatocitos, tanto en la reversibilidad de la patología hepática, como extrahepática, reflejarían la importancia que posee el metabolismo hepatocitario, para mantener la diferenciación celular de endotelios, epitelios y mesotelios, que es fundamental, a su vez, para regular la homeostasis orgánica. Respecto de su capacidad para revertir la patología hepática, se debe destacar la gran influencia que ejerce la recuperación metabólica en los distintos mecanismos que se implican en la respuesta inflamatoria. Entre otros

## DISCUSIÓN

---

mecanismos, la actividad metabólica hepatocitaria, crearía unas condiciones medioambientales o epigenéticas, que inducirían un fenotipo quiescente (Xu y cols., 2014) En esencia, la regulación epigenética de los miofibroblastos, silenciaría los genes profibrogénicos, facilitando la transcripción de genes antifibrogénicos, como son IKB-alfa y PPAR-gamma (Yang y cols., 2012). Las modificaciones post-translocacionales de las histonas nucleosómicas, pueden ser reguladas por metilación, acetilación y fosforilación, lo que permite el cambio en la expresión genética sin alteración de la estructura cromosómica (Henikoff y cols., 2008). Por este mecanismo, se ha propuesto que las alteraciones ambientales, pueden regular la respuesta proinflamatoria y profibrogénica hepática (Tsukamoto y cols., 2012), y por tanto, este efecto puede ser extrapolable a las alteraciones extrahepáticas propias de la ictericia obstructiva.

Por último, estos resultados de la investigación experimental, referentes a la ictericia obstructiva, podrían ser trasladados a la clínica humana. En particular, el modelo experimental de colestasis extrahepática microquirúrgica, podría ser utilizado para el estudio de los mecanismos patogénicos que causan la atresia biliar, así como, para su tratamiento potencial, mediante trasplante de células madre mesenquimales (Deng y cols., 2011).

En conclusión, aunque los resultados terapéuticos de las células madre mesenquimales, tanto obtenidas del tejido adiposo del ser humano, como de la rata, en la insuficiencia hepática crónica colestásica en la rata sugieren su efecto beneficioso, tanto esplácnico como sistémico, se desconocen sus mecanismos íntimos de acción, los cuales deben ser dilucidados antes de proceder a utilización en la clínica humana. El modelo experimental de fibrosis colestásica en la rata ha permitido demostrar que su patología multifactorial puede ser tratada mediante trasplante de células madre mesenquimales y, por esta razón, se podría sugerir también su utilización para investigar los complejos mecanismos fisiopatológicos inherentes tanto a la hipertensión portal como a la insuficiencia hepática crónica.



## ***VI. CONCLUSIONES***



## *CONCLUSIONES*

---

1. La colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata permite obtener un modelo experimental de insuficiencia hepática aguda sobre crónica.
2. El trasplante de células madre mesenquimales produce la reversión parcial de la patología hepática y extra hepática propia de la insuficiencia hepática crónica descompensada.
3. El xenotrasplante de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo disminuye las complicaciones propias de la colestasis obstructiva crónica en la rata.
4. El isotrasplante de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo y prediferenciadas a hepatocitos es más eficaz que el xenotrasplante para reducir las complicaciones hepáticas y extrahepáticas secundarias a la colestasis microquirúrgica extrahepática en la rata



## ***VII. BIBLIOGRAFÍA***



- Abdeldayem H, Ghoneim E, Refaei AA, Abou-Gabal A. Obstructive jaundice promotes intestinal-barrier dysfunction and bacterial translocation: experimental study. *Hepatol Int*. 2007;1: 444-8.
- Abdel-khalek EE, El-fakhry A, Helaly M, Hamed M, Elbaz O. Systemic inflammatory response syndrome in patients with liver cirrhosis. *Araba J Gastroenterol* 2011; 12: 173-7.
- Abrahám S, Szabó A, Kaszaki J, Varga R, Eder K, Duda E, Lázár G, Tiszlavicz L, Boros M, Lázár G Jr. Kupffer cell blockade improves the endotoxin-induced microcirculatory inflammatory response in obstructive jaundice. *Shock* 2008; 30:69-74.
- Abraldes JG, Pasarín M, García-Pagán JC. Animal models of portal hypertension. *World J Gastroenterol*. 2006;12: 6577-84.
- Abraldes JG, Araujo IK, Turón F, Berzigotti A. Diagnosing and monitoring cirrhosis: Liver biopsy, hepatic venous pressure gradient and elastography. *Gastroenterol Hepatol* . 2012;35:488-95.
- Abu-Amara M, Yang SY, Tapuria N, Fuller B, Davidson B, Seifalian A. Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks--a review. *Liver Transpl*. 2010;16:1016-32.
- Adebayo D, Morabito V , Davenport A., Jalan R. Renal dysfunction in cirrhosis is not. just a vasomotor nephropathy. *Kidney Int* . 2014; 338.
- Ahmed SK, Mohammed SA, Khalaf G, Fikry H Role of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of CCL4 Induced Liver Fibrosis in Albino Rats: A Histological and Immunohistochemical Study. *Int J Stem Cells*. 2014;7:87-97.
- Akimoto T, Hayashi N, Adachi M, Kobayashi N, Zhang XJ, Ohsuga M, Katsuta Y. Viability and plasma vitamin K levels in the common bile duct-ligated rats. *Exp Anim*. 2005; 54:155-61.
- Alaish SM, Smith AD, Timmons J, Greenspon J, Eyvazzadeh D, Murphy E, Shea-Donahue T, Cirimotich S, Mongodin E, Zhao A, Fasano A, Nataro JP, Cross A. Cross A. Gut microbiota, tight junction protein expression, intestinal resistance, bacterial translocation and mortality following cholestasis depend on the genetic background of the host. *Gut Microbes*. 2013,4:292-305.
- Alatas FS, Masumoto K, Matsuura T, Hayashida M, Saeki I, Kohashi K, Oda Y, Taguchi T Synchronized expressions of hepatic stellate cells and their

## BIBLIOGRAFÍA

---

- transactivation and liver regeneration during liver injury in an animal model of cholestasis *J Pediatric Surg.* 2011; 46:2284-90.
- Albillos A, Lario M, Alvarez-Mon M. Cirrhosis-associated immune dysfunction: Distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol.* 2014;61(6):1385-96.
- Alessandria C, Ozdogan O, Guevara M, Restuccia T, Jiménez W, Arroyo V, Rodés J, Ginès P. MELD score and clinical type predict prognosis in hepatorenal syndrome: Relevance to liver transplantation. *Hepatology.* 2005; 41: 1282-9.
- Alison MR, Choong C, Lim S. Application of liver stem cells for cell therapy. *Semin Cell Dev Biol.* 2007;18:819-26.
- Allen K, Jaeschke H, Copple BL. Bile acids induce inflammatory genes in hepatocytes: a novel mechanism of inflammation during obstructive cholestasis. *Am J Pathol* 2011;178:175-86.
- Aller MA, Lorente L, Alonso MS, Arias J. A model of cholestasis in the rat, using a microsurgical technique. *Scand J Gastroenterol.* 1993a; 28: 10-14.
- Aller MA, Lorente I, Alonso MS, Rodríguez G, Arias J. Different types of response to hepatic arterial ischemia in rats with cholestasis. *Surg Res Comm* 1993b; 14: 269-280.
- Aller MA, Lorente L, Tovar J, Rodríguez J, Betriu C, Ortega L, Arias J. Modelos experimentales: Colestasis extrahepática. En: *Cirugía Hepática Experimental.* Arias J, Lorente L, Aller MA, Rodríguez J, Alonso MS, Trobo JI, Durán H. Edit. Kronos. Zaragoza; 1993c, pp 283-315.
- Aller MA, Duran M, Ortega L, Arias JL, Nava MP, Prieto I, Arias J. Comparative study of macro- and microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat. *Microsurgery.* 2004a; 24:442-47.
- Aller MA, Nava MP, Arias JL, Durán M, Prieto I, Llamas MA, Arias J. Microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat: a long-term study. *J Invest Surg.* 2004b;17: 99-104.
- Aller MA, Vara E, Garcia C, Palma MD, Arias JL, Nava MP, Arias J. Proinflammatory liver and antiinflammatory intestinal mediators involved in portal hypertensive rats. *Mediators Inflamm.* 2005; 2005:101-11.
- Aller MA, Arias JL, Sánchez-Patán F, Arias J. The inflammatory response: an efficient way of life. *Med Sci Monit.* 2006; 12: RA225-34.
- Aller MA, Arias JL, Arias JI, Sanchez-Patan F, Arias J. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. *Med Hypotheses* 2007a; 68: 202-9.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Aller MA, Arias JL, Cruz A, Arias J. Inflammation: a way to understanding the evolution of portal hypertension. *Theor Biol Med Model.* 2007b 4:44.
- Aller MA, Arias JL, Arias J. The mast cell integrates the splanchnic and systemic inflammatory response in portal hypertension. *J Transl Med.* 2007c; 5:44.
- Aller MA, Ortega L, Sanchez-Patan F, Anchuelo R, Cruz A, Losada M, Arias J. Microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat: A histopathological liver study. *The Open Pathology Journal* 2008a; 2: 71-7.
- Aller MA, Arias JL, García-Domínguez J, Arias JI, Durán M, Arias J. Experimental obstructive cholestasis: the wound-like inflammatory liver response. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2008b;1:6.
- Aller MA, Vara E, García C, Méndez M, Méndez-López M, Mejía I, López L, Arias JL, Arias J. Prehepatic portal hypertension worsens the enterohepatic redox balance in thioacetamide-cirrhotic rats. *Pathophysiology* 2008c;15:233-42.
- Aller MA, Nava MP, Méndez M, Vergara P, Arias JL. Laboratory Rat Management. En: *Microsurgery In Liver Research*, Aller MA, and Arias J. Eds. Bentham Scientific Publishers, 2009a, pp 7-31.
- Aller MA, Prieto I, Cruz A, Losada M, Arias JI, García-Domínguez J, Argudo S, Arias JL, Arias J. Extrahepatic Cholestasis En: *Microsurgery In Liver Research*, Aller MA and Arias J. Eds. Bentham Scientific Publishers, 2009b, pp 137-156.
- Aller MA, Mendez M, Nava MP, Lopez L, Arias JL, Arias J. The value of microsurgery in liver research. *Liver Int.* 2009c, 29: 1132-40.
- Aller MA, Arias J. Microsurgery: Instruments and Techniques. En: *Microsurgery In Liver Research*, Aller MA and Arias J. Eds. Bentham Scientific Publishers, 2009d, pp 32-48.
- Aller MA, Nava MP. Anesthesia, Analgesia and Postoperative Care. En: *Microsurgery In Liver Research*, Aller MA; Arias J. Eds. Bentham Scientific Publishers, 2009e, pp 49-70.
- Aller MA, Mendez M, Mendez-Lopez M, Argudo S, Arias N, Lorente L, Arias JL, Arias J. Microsurgical Techniques for Researching Liver Disease: A Review. *Ann Gastroenterol Hepatol.* 2010a; 1: 101-16.
- Aller MA, Arias JI, Alonso-Poza A, Arias J. A review of metabolic staging in severely injured patients. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2010b;18:2.
- Aller MA, Arias JL, Prieto I, Losada M, Arias J. Bile duct ligation: step-by-step to cholangiocyte inflammatory tumorigenesis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2010 c;22:651-61.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Aller MA, Arias JI, Arias J. Pathological axes of wound repair: Gastrulation revisited. *Theor Biol Med Model* 2010d; 7:37. 14
- Aller MA, Prieto I, Argudo S, de Vicente F, Santamaría L, de Miguel MP, Arias JL, Arias J. The interstitial lymphatic peritoneal mesothelium axis in portal hypertensive ascites: when in danger, go back to the sea. *Int J Inflam.* 2010e; 2010:148689.5.
- Aller MA, García-Domínguez J, Vergara P, Arias J. Mast cells in wound-healing cholestatic liver response. *Burns.* 2010f;36: 292-4
- Aller MA, Arias N, Prieto I, Argudo S, Gilsanz C, LLorente L, Arias JI, Arias J. A half century (1961-2011) of applying microsurgery to experimental liver research. *World J Hepatol* 2012a; 4: 199-208.
- Aller MA, Blanco-Rivero J, Arias JI, Balfagon G, Arias J. The wound-healing response and upregulated embryonic mechanisms: brothers-in-arms forever. *Exp Dermatol.* 2012b; 21: 497-503.
- Aller MA, Arias JI, Prieto I, Gilsanz C, Arias A, Yang H, Arias J. Surgical inflammatory stress: the embryo takes hold of the reins again. *Theor Biol Med Model.* 2013; 10:6.
- Annon L, Vingadassalom N, Thévenot N, Prudhomme S, Calmus Y. Primary biliary cirrhosis. *Rev. Infirm.* 1989; 39:38-44.
- Anstee QM, Wright M, Goldin R, Thursz MR. Parenchymal extinction: coagulation and hepatic fibrogenesis. *Clin Liver Dis.* 2009;13:117-26.
- Ara C, Esrefoglu M, Polat A, Isik B, Aladag M, Gul M, Ay S, Tekerleklioglu MS, Yilmaz S. The effect of caffeic acid phenethyl ester on bacterial translocation and intestinal damage in cholestatic rats. *Dig Dis Sci.* 2006; 51:1754-60.
- Arduini A, Serviddio G, Escobar J, Tormos AM, Bellanti F, Viña J, Monsalve M, Sastre J. Mitochondrial biogenesis fails in secondary biliary cirrhosis in rats leading to mitochondrial DNA depletion and deletions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011; 301: G119-27.
- Arias J, Lorente L, Aller MA, Rodríguez J. Anatomía e histología hepática: Morfología y función. En: *Cirugía Hepática Experimental.* Arias J, Lorente L, Aller MA, Rodríguez J, Alonso MS, Trobo JI, Durán H. *Edit. Kronos.* 1993, pp 99-125.
- Arinzeh LT, Peter S J, Archambault MP, van den Bos C, Gordon S, Kraus K, Smith A, Kadiyala S. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone

## BIBLIOGRAFÍA

---

- in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am.* 2003; 85-A:1927-35.
- Arroyo V, Fernandez J, Gines P. Pathogenesis and treatment of hepatorenal syndrome. *Semin. in Liver Dis.* 2008; 28: 81-95.
- Arroyo V, García-Martínez R y Salvatella X. Human serum albumin, systemic inflammation, and cirrhosis. *J Hepatol.* 2014; 61:396-407.
- Asajina K. Hepatic stellate cell progenitor cells. *J Gastroenterol Hepatol.* 2012; 27 Suppl 2:80-84.
- Asrani S K, O'leary J G. Acute-on-chronic liver failure. *Clin Liver Dis.* 2014; 18:561-74.
- Assimakopoulos SF, Konstantinou D, Georgiou C, Chroni E. Metabolism of polyamines and oxidative stress in the brain of cholestatic rats. *Amino Acids.* 2010; 38: 973-4.
- Assimakopoulos SF, Maroulis I, Patsoukis N, Vagenas K, Scopa CD, Georgiou CD, Vagianos CE. Effect of antioxidant treatments on the gut-liver axis oxidative status and function in bile duct-ligated rats. *World J Surg.* 2007; 31: 2023-32.
- Assimakopoulos SF, Vagianos CE, Zervoudakis G, Filos KS, Georgiou C, Nikolopoulou V, Scopa CD. Gut regulatory peptides bombesin and neurotensin reduce hepatic oxidative stress and histological alterations in bile duct ligated rats. *Regul Pept.* 2004; 120: 185-93.
- Assimakopoulos SF, Vagianos CE. Bile duct ligation in rats: a reliable model of hepatorenal syndrome? *World J Gastroenterol.* 2009; 15: 121-3.
- Atucha NM, Ortíz MC, Fortepiani LA, Nadal FJ, Martínez-Prieto C, García-Estañ J. Mesenteric hyporesponsiveness in cirrhotic rats with ascites: role of cGMP and K<sup>+</sup> channels. *Clin. Sci.* 2000; 99:455-60.
- Aubé C, Moal F, Oberti F, Roux J, Croquet V, Gallois Y, Argaud C, Caron C, Calès P. Diagnosis and measurement of liver fibrosis by MRI in bile duct ligated rats. *Dig Dis Sci* 2007;52:2601-9.
- Auraamides C J, Garmy-Susini B, Varner JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Cancer.* 2008; 8:604-17.
- Ayatollahi M, Hesami Z , Jamshidzadeh A, Gramizadeh B. Antioxidant Effects of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell against Carbon Tetrachloride-Induced Oxidative Damage in Rat Livers. *Int J Organ Transplant Med.* 2014; 5:166-173.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Azmaiparashvili E, Kordzaia D, Dzidziguri D. Biliary hypertension as the cell proliferation trigger in bile duct ligated rats. *Georgian Med News*.2009;111-6
- Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleve R, Zilberstein B, Cecconello I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007; 22: 464-71.
- Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009; 24: 70-7.
- Banas A, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T. Stem cell plasticity: learning from hepatogenic differentiation strategies. *Dev Dyn*. 2007b; 236: 3228-41.
- Bansal MB, Kovalovich K, Gupta R, Li W, Agarwal A, Radbill B, Alvarez CE, Safadi R, Fiel MI, Friedman SL, Taub RA. Interleukin-6 protects hepatocytes from CCl4-mediated necrosis and apoptosis in mice by reducing MMP-2 expression. *J Hepatol*. 2005; 42:548-56.
- Barut I, Kaya S. The diagnostic value of C-reactive protein in bacterial translocation in experimental biliary obstruction. *Adv Clin Exp Med*. 2014;23: 197-203.
- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005; 115: 209-18.
- Bataller R, Schwabe RF, Choi YH, Yang L, Paik YH, Lindquist J, Qian T, Schoonhoven R, Hagedorn CH, Lemasters JJ, Brenner DA. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest*. 2003;112:1383-94.
- Beck PL, Lee SS. Vitamin K1 improves survival in bile-duct-ligated rats with cirrhosis. *J Hepatol*. 1995; 23: 235.
- Bei R, Masuelli L, Palumbo C, Tresoldi I, Scardino A, Modesti A. Long-lasting tissue inflammatory processes trigger autoimmune responses to extracellular matrix molecules. *Int Rev Immunol*. 2008;27:137-75.
- Bellot P, Frances R, Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int*. 2013;33:31-9.
- Ben-David D, Kizhner TA, Kohler T, Müller R, Livne E, Srouji S. Cell-scaffold transplant of hydrogel seeded with rat bone marrow progenitors for bone regeneration. *J Craniomaxillofacial Surg*.. 2011; 39:364-371.
- Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in agnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979; 23: 403-11.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Bergheim I, Harsch S, Mueller O, Schimmel S, Fritz P, Stange EF. Apical sodium bile acid transporter and ileal lipid binding protein in gallstone carriers. *J Lipid Res.* 2006a; 47:42-50.
- Bergmeyer HU, Bowers GN, Horder M, Moss DW. IFCC method for aspartate aminotransferase. Appendix A. Description of pertinent factors in obtaining optimal conditions for measurement. *Clin Chim Acta.* 1976; 31-40.
- Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin Chem.* 1978; 58-73.
- Bergmeyer HU, Hørdner M. International federation of clinical chemistry. Scientific committee. Expert panel on enzymes. IFCC document stage 2, draft 1; 1979-11-19 with a view to an IFCC recommendation. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1980; 521-34.
- Beuers U, Hohenester S, de Buy Wenniger LJ, Kremer AE, Jansen PL, Elferink RP. The biliary HCO<sub>3</sub><sup>(-)</sup> umbrella: a unifying hypothesis on pathogenetic and therapeutic aspects of fibrosing cholangiopathies. *Hepatology.* 2010 52: 1489-96.
- Bissell DM. Assessing fibrosis without a liver biopsy: are we there yet? *Gastroenterology.* 2004; 127: 1847-9.
- Bissell DM. Therapy for hepatic fibrosis: revisiting the preclinical models. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2011; 35: 521-5.
- Black DM, Behrns KE. A scientist revisits the atrophy-hypertrophy complex: hepatic apoptosis and regeneration. *Surg Oncol Clin N Am* 2002;11:849-64.
- Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature.* 1996; 382:829-833.
- Bogert PT, LaRusso NF. Cholangiocyte biology. *Curr Opin Gastroenterol* 2007;23:299-305.
- Bond G, Nowocin A, Sacks SH, Wong W. Kinetics of mast cell migration during transplantation tolerance *Transpl Immunol.* 2015 ;32:40-5.
- Boudechiche L, Tranchart H, Branchereau S, Davit-Spraul A, Lainas P, Groyer-Picard MT, Weber A, Hadchouel M, Dagher I. Improvement of Hepatocyte Transplantation Efficiency in the mdr2<sup>-/-</sup> Mouse Model by Glyceryl Trinitrate. *Transplantation.* 2015; 99:36-40.
- Brazelton TR, Morris RE. Molecular mechanisms of action of new xenobiotic immunosuppressive drugs: tacrolimus (FK506), sirolimus (rapamycin),

## BIBLIOGRAFÍA

---

- mycophenolate mofetil and leflunomide. *Curr Opin Immunol.* 1996; 8:710-720.
- Briggs CD, Peterson M. Investigation and management of obstructive jaundice. *Surgery Oxford* 2007; 25: 74-80.
- Briggs R, King T J. Transplantation of living nuclei from blastula cells into Enucleated Frogs eggs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1952; 38:455-463.
- Brown JM, Nemeth K, Kushnir-Sukhov NM, Metcalfe DD, Mezey E. Bone marrow stromal cells inhibit mast cell function via a COX2-dependent mechanism. *Clin Exp Allergy.* 2011; 41: 526-34.
- Brunt EM, Gouw AS, Hubscher SG, Tiniakos DG, Bedossa P, Burt AD, Callea F, Clouston AD, Dienes HP, Goodman ZD, Roberts EA, Roskams T, Terracciano L, Torbenson MS, Wanless IR. Pathology of the liver sinusoids. *Histopathology.* 2014;64:907-20.
- Buob S, Johnston AN, Webster CRL. Portal hypertension: pathophysiology, diagnosis and treatment. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 169-86.
- Calmus Y, Poupon R. Shaping macrophages function and innate immunity by bile acids: Mechanisms and implication in cholestatic liver diseases. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2014 ;38:550-6.
- Calvaruso V, Maimone S, Gatt A, Tuddenham E, Thursz M, Pinzani M, Burroughs AK. Coagulation and fibrosis in chronic liver disease. *Gut.* 2008;57:1722-7.
- Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature.* 1996 Mar 7;380:64-6.
- Campbell KM, Sabla GE, Bezerra JA. Transcriptional reprogramming in murine liver defines the physiologic consequences of biliary obstruction. *J Hepatol.* 2004; 40: 14-23.
- Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* 2004;39:273-8.
- Cannito S, Paternostro C, Busletta C, Bocca C, Colombatto S, Miglietta A, Novo E, Parola M. Hypoxia, hypoxia-inducible factors and fibrogenesis in chronic liver diseases. *Histol Histopathol.* 2014;29:33-44.
- Cantor JO, Nadkarni PP. Hyaluronan: the Jekyll and Hyde molecule. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2006; 5: 257-60.
- Cardenas A, Arroyo V. Management of ascites and hepatic hydrothorax. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology* 2007; 21: 55-75.
- Casiraghi F, Remuzzi G, Abbate M, Perico N. Multipotent mesenchymal stromal cell therapy and risk of malignancies. *Stem Cell Rev.* 2013 Feb;9:65-79.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Cassiman D, Roskams T. Beauty is in the eye of the beholder: emerging concepts and pitfalls in hepatic stellate cell research. *J Hepatol* 2002;37:527-35.
- Castañeda B, Debernardi-Venon W, Bandi JC, Andreu V, Pérez-del-Pulgar S, Moitinho E, Pizcueta P, Bosch J. The role of portal pressure in the severity of bleeding in portal hypertensive rats. *Hepatology*. 2000; 581-6.
- Cazzaniga M, Dionigi E, Gobbo G, Fioretti A, Monti V, Salerno F. The systemic inflammatory response syndrome in cirrhotic patients. *J Hepatol*. 2009; 51: 475-82.
- Chan CC, Wang SS, Lee FY, Chang FY, Lin HC, Hou MC, Huang HC, Lee SD. Effects of endothelin-1 on portal-systemic collaterals of common bile duct-ligated cirrhotic rats. *Eur J Clin Invest*. 2004; 34: 290-6.
- Chapman & Hall: The Analysis of Contingency Tables. *Everitt, B. S. Second Edition*. 1992; VIII, 164 pp.
- Chatterjee S, Bijmans IT, van Mil SW, Augustijns P, Annaert P. Toxicity and intracellular accumulation of bile acids in sandwich-cultured rat hepatocytes: role of glycine conjugates. *Toxicol In Vitro*. 2014;28:218-30.
- Chen CC, Ho CY, Chaung HC, Tain YL, Hsieh CS, Kuo FY, Yang CY, Huang LT. Fish omega-3 fatty acids induce liver fibrosis in the treatment of bile duct-ligated rats. *Dig Dis Sci*. 2013; 58:440-447.
- Chen L, Zhang W, Zhou QD, Yang HQ, Liang HF, Zhang BX, Long X, Chen XP. HSCs play a distinct role in different phases of oval cell-mediated liver regeneration. *Cell Biochem Funct*. 2012; 30:588-96.
- Cheng CW, Duwaerts CC, Rooijen Nv, Wintermeyer P, Mott S, Gregory SH. NK cells suppress experimental cholestatic liver injury by an interleukin-6-mediated, Kupffer cell-dependent mechanism. *J Hepatol*. 2011; 54: 746-52.
- Cho KA, Ju SY, Cho SJ, Jung YJ, Woo SY, Seoh JY, Han HS, Ryu KH.. Mesenchymal stem cells showed the highest potential for the regeneration of injured liver tissue compared with other subpopulations of the bone marrow. *Cell Biol Int*. 2009; 33:772-7.
- Choi SS, Diehl AM. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. *Hepatology*. 2009; 50: 2007-13.
- Cholongitas E, Marelli L, Shusang V, Senzolo M, Rolles K, Patch D, Burroughs AK. A systematic review of the performance of the model for end-stage liver

## BIBLIOGRAFÍA

---

- disease (MELD) in the setting of liver transplantation. *Liver Transpl* 2006; 12: 1049-61.
- Chou MH, Chuang JH, Eng HL, Tsai PC, Hsieh CS, Liu HC, Wang CH, Lin CY, Lin TM. Effects of hepatocyte CD14 upregulation during cholestasis on endotoxin sensitivity. *PLoS One*. 2012; 7:e34903.
- Christ B, Dollinger M M. The generation of hepatocytes from mesenchymal stem cells and engraftment into the liver. *Curr Opin Organ Transplant*. 2011;16:69-75.
- Chu AS, Diaz R, Hui JJ, Yanger K, Zong Y, Alpini G, Stanger BZ, Wells RG. Lineage tracing demonstrates no evidence of cholangiocyte epithelial-to-mesenchymal transition in murine models of hepatic fibrosis. *Hepatology*. 2011; 53:1685-95.
- Cicchini C, Amicone L, Alonzi T, Marchetti A, Mancone C, Tripodi M. Molecular mechanisms controlling the phenotype and the EMT/MET dynamics of hepatocyte. *Liver Int*. 2015;35:302-10.
- Clements WD, Erwin P, McCaigue MD, Halliday I, Barclay GR, Rowlands BJ. Conclusive evidence of endotoxaemia in biliary obstruction. *Gut*. 1998; 42: 293-9.
- Clements WD, McCaigue M, Erwin P, Halliday I, Rowlands BJ. Biliary decompression promotes Kupffer cell recovery in obstructive jaundice. *Gut* 1996;38:925-31.
- Clouzeau-Girard H, Guyot C, Combe C, Moronvalle-Halley V, Housset C, Lamireau T, Rosenbaum J, Desmoulière A. Effects of bile acids on biliary epithelial cell proliferation and portal fibroblast activation using rat liver slices. *Lab Invest*. 86:275-285.
- Cohen-Naftaly M, Friedman SL. Current status of novel antifibrotic therapies in patients with chronic liver disease. *Therap Adv Gastroenterol*. 2011; 4: 391-417.
- Cohon CK. Implantable biohybrid artificial organs. *Cell Transplant*. 1995;4:415-36
- Colgan SP, Taylor CT. Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7:281-7.
- Coltart I, Tranah TH, Shawcross DL. Inflammation and hepatic encephalopathy. *Arch Biochem Biophys*. 2013; 15;536:189-96.
- Cook JG. Creatinine assay in the presence of protein. *Clin Chim Acta*. 1971; 485-6.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol.* 2001; 9:113-4.
- Corradi F, Brusasco C, Fernández J, Vila J, Ramirez MJ, Seva-Pereira T, Fernández-Varo G, Mosbah IB, Acevedo J, Silva A, Rocco PR, Pelosi P, Gines P, Navasa M. Effects of pentoxifylline on intestinal bacterial overgrowth, bacterial translocation and spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic rats with ascites. *Dig Liver Dis.* 2012; 44: 239-44.
- Cray C, Zaias J, Altman NH. Acute phase response in animals: A review. *Comp Med* 2009; 59: 517-26.
- Czaja A J. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World J Gastroenterology.* 2014; 20:2515-32.
- Czaja MJ, Ding WX, Donohue TM Jr, Friedman SL, Kim JS, Komatsu M, Lemasters JJ, Lemoine A, Lin JD, Ou JH, Perlmutter DH, Randall G, Ray RB, Tsung A, Yin XM. Functions of autophagy in normal and diseased liver. *Autophagy.* 2013;9:1131-58.
- Dai LJ, Li HY, Guan LX, Ritchie G, Zhou JX The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis. *Stem Cell Res.* 2009; 2:16-25.
- Dai LJ, Li HY, Guan LX, Ritchie G, Zhou JX The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis. *Stem Cell Res.* 2009 Jan;16-25.
- D'Amico M, Mejías M, García-Pras E, Abrales JG, García-Pagán JC, Fernández M, Bosch J Effects of the combined administration of propranolol plus sorafenib on portal hypertension in cirrhotic rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012; 302:G1191-8.
- Davenport M, De Ville de Goyet J, Stringer MD, Mieli-Vergani G, Kelly DA, McClean P, Spitz L. Seamless management of biliary atresia in England and Wales (1999-2002). *Lancet.* 2004. 24;363:1354-7.
- Davis GE. Angiogenesis and Proteinases: Influence on Vascular Morphogenesis, Stabilization and Regression. *Drug Discov Today Dis Models.* 2011;8:13-20.
- Day SA, Lakner AM, Moore CC, Yen MH, Clemens MG, Wu ES, Schrum LW. Opioid-like compound exerts anti-fibrotic activity via decreased hepatic stellate cell activation and inflammation. *Biochem Pharmacol.* 2011; 81: 996-1003.
- De Las Heras N, Aller MA, Martín-Fernández B, Miana M, Ballesteros S, Regadera J, Cachafeiro V, Arias J, Lahera V. A wound-like inflammatory

## BIBLIOGRAFÍA

---

- aortic response in chronic portal hypertensive rats. *Mol Immunol.* 2012 ;51:177-87.
- De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs.* 2003; 174: 101-9.
- Deng X, Chen YX, Zhang X, Zhang JP, Yin C, Yue HY, Lin Y, Han ZG, Xie WF. Hepatic stellate cells modulate the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *J Cell Physiol.* 2008; 217:138-44.
- Deng YH, Pu CL, Li YC, Zhu J, Xiang C, Zhang MM, Guo CB. Analysis of biliary epithelial-mesenchymal transition in portal tract fibrogenesis in biliary atresia. *Dig Dis Sci.* 2011; 56: 731-40.
- Deretic V, Sactoh T y Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature Rev Immunol.* 2013; 13:722-37.
- Desmet V, Roskams T, Van Eyken P. Ductular reaction in the liver. *Pathol Res Pract.* 1995;191: 513-24.
- Desmet VJ. Ductal plates in hepatic ductular reactions. Hypothesis and implications. I. Types of ductular reaction reconsidered. *Virchows Arch.* 2011a; 458: 251-9.
- Desmet VJ. Ductal plates in hepatic ductular reactions. Hypothesis and implications. II. Ontogenic liver growth in childhood. *Virchows Arch.* 2011b; 458: 261-70.
- Desmoulière A, Darby I, Costa AM, Raccurt M, Tuchweber B, Sommer P, Gabbiani G. Extracellular matrix deposition, lysyl oxidase expression, and myofibroblastic differentiation during the initial stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab Invest.* 1997; 76: 765-78.
- Diéguez B, Aller MA, Nava MP, Palma MD, Arias JL, López L, Arias J. Chronic portal hypertension in the rat by triple-portal stenosing ligation. *J Invest Surg.* 2002; 15: 329-36.
- Diehl P, Fricke A, Sander L, Stamm J, Bassler N, Htun N, Ziemann M, Helbing T, El-Osta A, Jowett JB, Peter K. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc Res.* 2012 ;93:633-44.
- Ding BS, Cao Z, Lis R, Nolan DJ, Guo P, Simons M, Penfold ME, Shido K, Rabbany SY, Rafii S. Divergent angiocrine signals from vascular niche balance liver regeneration and fibrosis. *Nature.* 2014;505:97-102.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Ding WX, Yin XM. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med.* 2004;8:445-54.
- Dold S, Laschke MW, Zhau Y, Schilling M, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. P-selectin glycoprotein ligand-1-mediated leukocyte recruitment regulates hepatocellular damage in acute obstructive cholestasis in mice. *Inflamm Res.* 2010; 59: 291-8.
- Domínguez M, Colmenero J, Bataller R. Treatment of liver fibrosis. *Gastroenterol Hepatol.* 2009; 32: 627-32.
- Dong ZX, Su L, Brymora J, Bird C, Xie Q, George J, Wang JH. Resistin mediates the hepatic stellate cell phenotype. *World J Gastroenterol.* 2013;19:4475-85.
- Donner MG, Schumacher S, Warskulat U, Heinemann J, Häussinger D. Obstructive cholestasis induces TNF-alpha- and IL-1 -mediated periportal downregulation of Bsep and zonal regulation of Ntcp, Oatp1a4, and Oatp1b2. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007; 293: G1134-46.
- Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta.* 1971; 87-96.
- Dranoff JA, Wells RG. Portal fibroblasts: Underappreciated mediators of biliary fibrosis. *Hepatology.* 2010; 51:1438-44.
- Dunn L, Prosser HC, Tan JT, Vanags LZ, Ng MK, Bursill CA. Murine model of wound healing. *JVis Exp* 2013; 28:e50265.
- Eguchi A, Wree A, Feldstein A E. Biomarkers of liver cell death. *J Hepatol.* 2014 60:1063-74.
- Elipek T, Utkan NZ. Effects on bacterial translocation of high-fat enteral nutrition in bile duct ligated rats. *Balkan Med J.* 2012 ;29:301-5.
- Ellis EL, Mann DA. Clinical evidence for the regression of liver fibrosis. *J Hepatol.* 2012; 56: 1171-80.
- El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl JMed.* 2011 Sep 22; 365:1118-27.
- El-Shazly A, Berger P, Girodet PO, Ousova O, Fayon M, Vernejoux JM, Marthan R, Tunon-de-Lara JM. Fractalkine produced by airway smooth muscle cells contributes to small cell recruitment in asthma. *J Immunol* 2006;176:1860-8.
- Enzan H, Himeno H, Hiroi M, Kiyoku H, Saibara T, Onishi S. Development of hepatic sinusoidal structure with special reference to the Ito cells. *Microsc. Res. Tech.* 1997; 39:336-349.
- Ertor B, Topaloglu S, Calik A, Cobanoglu U, Ahmetoglu A, Ak H, Karabulut E, Arslan MK The effects of bile duct obstruction on liver volume: an experimental study. *ISRN Surgery.* 2013:156347.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Eslimi D, Oryan S, Nasehi M, Zarrindast MR. Effects of opioidergic systems upon anxiolytic-like behaviors induced in cholestatic rats. *Eur J Pharmacol.* 2011; 670: 180-5.
- Esmaeli S, Allameh A, Soleimani M, Rahbarizadeh F, Frouzandeh-Moghadam M. The role of albumin and PPAR- $\alpha$  in differentiation-dependent change of fatty acid profile during differentiation of mesenchymal stem cells to hepatocyte-like cells. *Cell Biochem Funct.* 2014; 32:410-9.
- Esrefoglu M. Role of stem cells in repair of liver injury: experimental and clinical benefit of transferred stem cells on liver failure. *World J Gastroenterol.* 2013;19:6757-73.
- European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of cholestatic liver diseases. *J Hepatol.* 2009;51:237-67.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981. 9;292:154-6.
- Fabris L, Strazzabosco M. Epithelial–Mesenchymal Interactions in Biliary Diseases. *Semin Liver Dis.* 2011; 31: 11–32
- Fang B, Shi M, Liao L, Yang S, Liu Y, Zhao RC. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation.* 2004;78:83-8.
- Farrell DJ, Hines JE, Walls AF, Kelly PJ, Bennett MK, Burt AD. Intrahepatic mast cells in chronic liver diseases. *Hepatology.* 1995; 22: 1175-81.
- Fausther M, Lavoie EG, Dranoff JA. Contribution of Myofibroblasts of Different Origins to Liver Fibrosis. *Curr Pathobiol Rep.* 2013;1:225-230.
- Feng Y, Zhu M, Dangelmajer S, Lee YM, Wijesekera O, Castellanos CX, Denduluri A, Chaichana KL, Li Q, Zhang H, Levchenko A, Guerrero-Cazares H, Quiñones-Hinojosa A. Hypoxia-cultured human adipose-derived mesenchymal stem cells are non-oncogenic and have enhanced viability, motility, and tropism to brain cancer. *Cell Death Dis.* 2014; 5:e1567.
- Fernandez M, Mejias M, Angermayr B, Garcia-Pagan JC, Rodés J, Bosch J. Inhibition of VEGF receptor-2 decreases the development of hyperdynamic splanchnic circulation and portal-systemic collateral vessels in portal hypertensive rats. *J Hepatol.* 2005; 43: 98-103.
- Fernandez M, Mejias M, Garcia-Pras E, Mendez R, Garcia-Pagan R, Bosch J. Reversal of portal hypertension and hyperdynamicsplanchnic

## BIBLIOGRAFÍA

---

- circulation by combined vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor blockade in rats. *Hepatology* 2007; 46: 1208-17.
- Fernández M, Semela D, Bruix J, Colle I, Pinzani M, Bosch J. Angiogenesis in liver disease. *J Hepatol* 2009;50:604-20.
- Fernandez M, Vizzutti F, Garcia-Pagan JC, Rodes J, Bosch J. Anti-VEGF receptor-2 monoclonal antibody prevents portal-systemic collateral vessel formation in portal hypertensive mice. *Gastroenterology* 2004; 126: 886-94.
- Fernandez-Blanco JA, Hollenberg MD, Martinez V, Vergara P. PAR-2-mediated control of barrier function and motility differs between early and late phases of postinfectious gut dysfunction in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013; 304:G390-400.
- Fernández-Martínez E, Pérez-Alvarez V, Tsutsumi V, Shibayama M, Muriel P. Chronic bile duct obstruction induces changes in plasma and hepatic levels of cytokines and nitric oxide in the rat. *Exp Toxicol Pathol* 2006; 58 : 49-58.
- Fernández-Martínez E, Pérez-Hernández N, Muriel P, Pérez-Alvarez V, Shibayama M, Tsutsumi V. The thalidomide analog 3-phthalimido-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-propanoic acid improves the biliary cirrhosis in the rat. *Exp Toxicol Pathol*. 2009; 61: 471-9.
- Ferrán Aranaz, M.: Programación y Análisis Estadístico. SPSS para Windows. *McGraw Hill*. 1996.
- Fibbe WE, Nauta AJ, Roelofs H. Modulation of immune responses by mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1106:272-8.
- Fiore EJ, Bayo JM, Garcia MG, Malvicini M, Lloyd R, Piccioni F, Rizzo M, Peixoto E, Sola MB, Atorrasagasti C, Alaniz L, Camilletti MA, Enguita M, Prieto J, Aquino JB, Mazzolini G. Mesenchymal Stromal Cells Engineered to Produce IGF-I by Recombinant Adenovirus Ameliorate Liver Fibrosis in Mice. *Stem Cells Dev*. 2014; [Epub ahead of print].
- Ford AC, Talley NJ. IBS in 2010: advances in pathophysiology, diagnosis and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:76-8.
- Francés R, Chiva M, Sánchez E, González-Navajas JM, Llovet T, Zapater P, Soriano G, Muñoz C, Balanzó J, Pérez-Mateo M, Song XY, Guarner C, Such J. Bacterial translocation is downregulated by anti-TNF-alpha monoclonal antibody administration in rats with cirrhosis and ascites. *J Hepatol*. 2007; 46: 797-803.
- Franceschini B, Ceva-Grimaldi G, Russo C, Dioguardi N, Grizzi F. The complex functions of mast cells in chronic human liver diseases. *Dig Dis Sci*. 2006;51:2248-56.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Franceschini B, Russo C, Dioguardi N, Grizzi F. Increased liver mast cell recruitment in patients with chronic C virus-related hepatitis and histologically documented steatosis. *J Viral Hepat.* 2007; 14:549-55.
- Franchitto A, Onori P, Renzi A, Carpino G, Mancinelli R, Alvaro D, Gaudio E. Recent advances on the mechanisms regulating cholangiocyte proliferation and the significance of the neuroendocrine regulation of cholangiocyte pathophysiology. *Ann Transl Med.* 2013; 1:27.
- Francis H, Meng F, Gaudio E, Alpini G. Histamine regulation of biliary proliferation. *J Hepatol* 2012; 56: 1204-6.
- Francis H, Meininger CJ. A review of mast cells and liver disease: What have we learned? *Dig Liver Dis.* 2010; 2:529-36.
- Francois S, Mouiseddine M, Allenet-Lepage B, Voswinkel J, Douay L, Benderitter M, Chapel A<sup>2</sup> Human mesenchymal stem cells provide protection against radiation-induced liver injury by antioxidative process, vasculature protection, hepatocyte differentiation, and trophic effects. *Biomed Res Int.* 2013;2013:151679.
- Freeman RB, Wiesner RH, Edwards E, Harper A, Merion R, Wolfe R; United Network for Organ Sharing Organ Procurement and Transplantation Network Liver and Transplantation Committee. Results of the first year of the new liver allocation plan. *Liver Transpl.* 2004;10:7-1
- Freise C, Heldwein S, Erben U, Hoyer J, Köhler R, Jöhrens K, Patsenker E, Ruehl M, Seehofer D, Stickel F, Somasundaram R. K<sup>+</sup> -channel inhibition reduces portal perfusion pressure in fibrotic rats and fibrosis associated characteristics of hepatic stellate cells. *Liver Int.* 2014 Sep 11. [Epub ahead of print].
- Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology.* 2008b;134:1655-69.
- Friedman SL. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010; 7: 425-36.
- Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev.* 2008;88:125-72.
- Fu YQ, Hua C, Zhou J, Cheng BR, Zhang J. Protective effects of ginseng total saponins against hepatic ischemia/reperfusion injury in experimental obstructive jaundice rats. *Pharm Biol.* 2013;51:1545-51.
- Galbois A, Thabut D, Tazi KA, Rudler M, Mohammadi MS, Bonnefont-Rousselot D, Bennani H, Bezeaud A, Tellier Z, Guichard C, Coant N, Ogier-Denis

## BIBLIOGRAFÍA

---

- E, Moreau R, Lebrec D. Ex vivo effects of high-density lipoprotein exposure on the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in patients with severe cirrhosis. *Hepatology*. 2009;49:175-84.
- Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. RIP kinases initiate programmed necrosis. *J Mol Cell Biol*. 2009;1:8-10.
- Ganschow R, Pollok JM, Jankofsky M, Junge G. The role of everolimus in liver transplantation. *Clin Exp Gastroenterol*. 2014 Sep 2;7:329-43.
- García-Dominguez J, Aller MA, García C, de Vicente F, Corcuera MT, Gómez-Aguado F, Alonso MJ, Vara E, Arias J. Splanchnic Th(2) and Th(1) cytokine redistribution in microsurgical cholestatic rats. *J Surg Res*. 2010;162:203-12
- García-Moreno LM, Angeles Aller M, Conejo NM, Gómez MA, Martín FR, Arias J, Arias JL. Brain Ag-NOR activity in cholestatic rats with hepatic encephalopathy. *Hepatol Res*. 2002; 24: 275.
- García-Moreno LM, Conejo NM, González-Pardo H, Aller MA, Nava MP, Arias J, Arias JL. Evaluation of two experimental models of hepatic encephalopathy in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2005; 38: 127-32.
- García-Tsao G, Wiest R. Gut microflora in the pathogenesis of the complications of cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004; 18: 353-72.
- Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Franchitto A, Onori P, Ueno Y, Marzioni M, Fava G, Venter J, Reichenbach R, Summers R, Alpini G. Administration of r-VEGF-A prevents hepatic artery ligation-induced bile duct damage in bile duct ligated rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006c;291:307-17.
- Gaudio E, Barbaro B, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Ueno Y, Meininger CJ, Franchitto A, Onori P, Marzioni M, Taffetani S, Fava G, Stoica G, Venter J, Reichenbach R, De Morrow S, Summers R, Alpini G. Vascular endothelial growth factor stimulates rat cholangiocyte proliferation via an autocrine mechanism. *Gastroenterology*. 2006b; 130: 1270-82.
- Gaudio E, Onori P, Pannarale L, Alvaro D. Hepatic microcirculation and peribiliary plexus in experimental biliary cirrhosis: a morphological study. *Gastroenterology*. 1996; 111: 1118-24.
- Gaudio E, Franchitto A, Pannarale L, Carpino G, Alpini G, Francis H, Glaser S, Alvaro D, Onori P. Cholangiocytes and blood supply. *World J Gastroenterol*. 2006;12:3546-52.
- Ge W, Jiang J, Baroja ML, Arp J, Zassoko R, Liu W, Bartholomew A, Garcia B, Wang H.. Infusion of mesenchymal stem cells and rapamycin synergize to

## BIBLIOGRAFÍA

---

- attenuate alloimmune responses and promote cardiac allograft tolerance. *Am J Transplant* 2009; 9: 1760-72.
- Geerts AM, Vanheule E, Praet M, Van Vlierberghe H, De Vos M, Colle I. Comparison of three research models of portal hypertension in mice: macroscopic, histological and portal pressure evaluation *Int J Exp Pathol.* 2008;89:251-63.
- Geier A, Dietrich CG, Voigt S, Kim SK, Gerloff T, Kullak-Ublick GA, Lorenzen J, Matern S, Gartung C. Effects of proinflammatory cytokines on rat organic anion transporters during toxic liver injury and cholestasis. *Hepatology* 2003;38:345-54.
- Geissmann F, Cameron TO, Sidobre S, Manlongat N, Kronenberg M, Briskin MJ, Dustin ML, Littman DR. Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids. *PLoS Biol.* 2005;3:e113.
- Georges PC, Hui JJ, Gombos Z, McCormick ME, Wang AY, Uemura M, Mick R, Janmey PA, Furth EE, Wells RG. Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007; 293: G1147-54.
- Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, Jang JH, Nocito A, Dahm F, Clavien PA. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *Br J Surg.* 2008; 95: 646-56.
- Geudens I, Gerhardt H. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development.* 2011; 138: 4569-83.
- Ghavami S, Hashemi M, Kadkhoda K, Alavian SM, Bay GH, Los M. Apoptosis in liver diseases--detection and therapeutic applications. *Med Sci Monit* 2005;11:337-45.
- Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* 2007; 100:1249-60.
- Glaser S, Gaudio E, Renzi A, Mancinelli R, Ueno Y, Venter J, White M, Kopriva S, Chiasson V, DeMorrow S, Francis H, Meng F, Marzioni M, Franchitto A, Alvaro D, Supowit S, DiPette DJ, Onori P, Alpini G. Knockout of the neurokinin-1 receptor reduces cholangiocyte proliferation in bile duct-ligated mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011; 301: G297-305.
- Glaser SS, Gaudio E, Miller T, Alvaro D, Alpini G. Cholangiocyte proliferation and liver fibrosis. *Expert Rev Mol Med.* 2009; 11: e7.
- Glaser SS, Onori P, Wise C, Yang F, Marzioni M, Alvaro D, Franchitto A, Mancinelli R, Alpini G, Munshi MK, Gaudio E. Recent advances in the

## BIBLIOGRAFÍA

---

- regulation of cholangiocyte proliferation and function during extrahepatic cholestasis. *Dig Liver Dis.* 2010; 42: 245-52.
- Glenn JD, Whartenby KA. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World J Stem Cells.* 2014;6:526-39.
- Goren A, Dahan N, Goren E, Baruch L, Machluf M. Encapsulated human mesenchymal stem cells: a unique hypoimmunogenic platform for long-term cellular therapy. *FASEB J.* 2010;24:22-31.
- Gossard AA, Talwalkar JA. "Cholestatic Liver Disease". *Med. Clin. North Am.* 2014; 98,: 73-85.
- Gossard AA. "Care of the cholestatic patient". *Clin Liver Dis.* 2013; 17: 331-44.
- Graft T. "Historical origins of transdifferentiation and reprogramming". *Cell stem Cell.* 2011: 9:504-516.
- Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM. Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comp Hepatol* 2007;6:7.
- Grinnemo KH, Månsson A, Dellgren G, Klingberg D, Wardell E, Drvota V, Tammik C, Holgersson J, Ringdén O, Sylvén C, Le Blanc K. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;127:1293-300.
- Gruber BL. Mast cells in the pathogenesis of fibrosis. *Curr Rheumatol Rep* 2003; 5:147-53.
- Guimarães-Marques GM, Batista JS, Guimarães HM, Naice-Daou MV, Lima MP, Formiga KM, Santos JM, Lima CA, Rafael MS. Isolation and characterization of 25 microsatellite DNA loci for *Anopheles albiparvus* sensu lato and interspecific amplification in 5 congeneric species. *Genet Mol Res.* 2012;11:4198-203.
- Gujral JS, Farhood A, Bajt ML, Jaeschke H. Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice. *Hepatology.* 2003;38:355-63.
- Gunatillake PA, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater.* 2003; 20;5:1-16.
- Guo K, Ikehara S, Meng X. Mesenchymal stem cells for inducing tolerance in organ transplantation. *Front Cell Dev Biol.* 2014 17;2:8.
- Guo S, Di Pietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 2010; 89: 219-29.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Gupta S, Rajvanshi P, Sokhi R, Slehria S, Yam A, Kerr A, Novikoff PM. Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium. *Hepatology*. 1999;29:509-19.
- Guvendiren M, Perepelyuk M, Wells RG, Burdick JA. Hydrogels with differential and patterned mechanics to study stiffness-mediated myofibroblastic differentiation of hepatic stellate cells. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2014;38:198-208.
- Haidara MA, Assiri AS, Youssef MA, Mahmoud MM, Ahmed M S E, Al-Hakami A, Chandramoorthy HC. Differentiated mesenchymal stem cells ameliorate cardiovascular complications in diabetic rats. *Cell Tissue Res*. 2015;359:565-75.
- Hajrasouliha AR, Tavakoli S, Jabehdar-Maralani P, Shafaroodi H, Borhani AA, Houshmand G, Sadeghipour H, Dehghani M, Dehpour AR. Resistance of cholestatic rats against epinephrine-induced arrhythmia: the role of nitric oxide and endogenous opioids. *Eur J Pharmacol*. 2004; 499: 307-13.
- Han Y, Onori P, Meng F, DeMorrow S, Venter J, Francis H, Franchitto A, Ray D, Kennedy L, Greene JF, Renzi A, Mancinelli R, Gaudio E, Glaser S, Alpini G. Prolonged exposure of cholestatic rats to complete dark inhibits biliary hyperplasia and liverfibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014; 307:G894-904.
- Hang HL, Xia Q. Role of BMSCs in liver regeneration and metastasis after hepatectomy. *World J Gastroenterol*. 2014;20:126-32.
- Hardjo M, Miyazaki M, Sakaguchi M, Masaka T, Ibrahim S, Kataoka K, Huh NH. Suppression of carbon tetrachloride-induced liver fibrosis by transplantation of a clonal mesenchymal stem cell line derived from rat bone marrow. *Cell Transplant*. 2009;18:89-99.
- Hassan R, Bera T, Pastan I. Mesothelin: a new target for immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2004;10:3937-42.
- Hawkins PT, Stephens LR. PI3K signalling in inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2014: S1388-1981:002.58-3.
- He Y, Wu GD, Sadahiro T, Noh SI, Wang H, Talavera D, Wang H, Vierling JM, Klein AS. Interaction of CD44 and hyaluronic acid enhances biliary epithelial proliferation in cholestatic livers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;295:G305-12.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Heinrich S, Georgiev P, Weber A, Vergopoulos A, Graf R, Clavien PA. Partial bile duct ligation in mice: a novel model of acute cholestasis. *Surgery*. 2011;149:445-51.
- Henikoff S. Nucleosome destabilization in the epigenetic regulation of gene expression. *Nat Rev Genet*. 2008;9:15-26.
- Henry RJ, Golub OJ, Sobel C. Some of the variables involved in the fractionation of serum proteins by paper electrophoresis. *Clin Chem*. 1957; 49-64.
- Hertel PM, Estes MK. Rotavirus and biliary atresia: can causation be proven? *Curr Opin Gastroenterol*. 2012;28:10-7.
- Heymann F, Trautwein C, Tacke F. Monocytes and macrophages as cellular targets in liver fibrosis. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2009;8:307-18.
- Holt AP, Salmon M, Buckley CD, Adams DH. Immune interactions in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis*. 2008; 12: 861-82.
- Hong KM, Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Strieter RM. Differentiation of human circulating fibrocytes as mediated by transforming growth factor-beta and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*. 2007;282:22910-20.
- Hoogduijn MJ, Crop MJ, Korevaar SS, Peeters AM, Eijken M, Maat LP, Balk AH, Weimar W, Baan CC. Susceptibility of human mesenchymal stem cells to tacrolimus, mycophenolic acid, and rapamycin. *Transplantation*. 2008;86:1283-91.
- Hosseini N, Alaei H, Zarrindast MR, Nasehi M, Radahmadi M. Cholestasis progression effects on long-term memory in bile duct ligation rats. *Adv Biomed Res*. 2014;3:215.
- Hosseinkhani M, Mehrabani D, Karimfar MH, Bakhtiyari S, Manafi A, Shirazi R. Tissue engineered scaffolds in regenerative medicine. *World J Plast Surg*. 2014;3:3-7.
- Houshmand G, Sadeghipour H, Dehghani M, Dehpour AR. Resistance of cholestatic rats against epinephrine-induced arrhythmia: the role of nitric oxide and endogenous opioids. *Eur J Pharmacol* 2004;499:307-13.
- Hsu MK, Qiao L, Ho V, Zhang BH, Zhang H, Teoh N, Dent P, Farrell GC. Ethanol reduces p38 kinase activation and cyclin D1 protein expression after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol*. 2006; 44: 375-82.
- Hsu SJ, Wang SS, Hsin IF, Lee FY, Huang HC, Huo TI, Lee WS, Lin HC, Lee SD. Green tea polyphenol decreases the severity of portosystemic collaterals

## BIBLIOGRAFÍA

---

- and mesenteric angiogenesis in rats with liver cirrhosis. *Clin Sci (Lond)*. 2014;126:633-44.
- Huang LT, Tiao MM, Tain YL, Chen CC, Hsieh CS. Melatonin ameliorates bile duct ligation-induced systemic oxidative stress and spatial memory deficits in developing rats. *Pediatr Res*. 2009; 65: 176-80.
- Hytiroglou P, Snover DC, Alves V, Balabaud C, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, Crawford JM, Dhillon AP, Ferrell L, Guido M, Nakanuma Y, Paradis V, Quaglia A, Theise ND, Thung SN, Tsui WM, van Leeuwen DJ. Beyond "cirrhosis": a proposal from the International Liver Pathology Study Group. *Am J Clin Pathol*. 2012; 137: 5-9.
- Iida A, Yoshidome H, Shida T, Takano S, Takeuchi D, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Miyazaki M. Hepatocyte nuclear factor-kappa beta (NF-kappaB) activation is protective but is decreased in the cholestatic liver with endotoxemia. *Surgery* 2010;148:477-89.
- Ikejima K, Takei Y, Honda H, Hirose M, Yoshikawa M, Zhang YJ, Lang T, Fukuda T, Yamashina S, Kitamura T, Sato N. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002;122:1399-410.
- Imam MH, Gossard AA, Sinakos E, Lindor KD. Pathogenesis and management of pruritus in cholestatic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27: 1150-1158.
- Ingber DE. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J*. 2006; 20: 811-27.
- Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest*. 2007; 117: 539-48.
- Isayama F, Hines IN, Kremer M, Milton RJ, Byrd CL, Perry AW, McKim SE, Parsons C, Rippe RA, Wheeler MD. LPS signaling enhances hepatic fibrogenesis caused by experimental cholestasis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006; 290: G1318-28.
- Ishii K, Yoshida Y, Akechi Y, Sakabe T, Nishio R, Ikeda R, Terabayashi K, Matsumi Y, Gonda K, Okamoto H, Takubo K, Tajima F, Tsuchiya H, Hoshikawa Y, Kurimasa A, Umezawa A, Shiota G. Hepatic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by tetracycline-regulated hepatocyte nuclear factor 3beta. *Hepatology*. 2008 Aug;48:597-606.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Ishikawa T, Banas A, Teratani T, Iwaguro H, Ochiya T. Regenerative cells for transplantation in hepatic failure *Cell Transplant*. 2012;21:387-99. .
- Iwaisako K, Taura K, Koyama Y, Takemoto K, Asagiri M. Strategies to Detect Hepatic Myofibroblasts in Liver Cirrhosis of Different Etiologies. *Curr Pathobiol Rep*. 2014;2:209-215.
- Iwaisako K, Jiang C, Zhang M, Cong M, Moore-Morris TJ, Park TJ, Liu X, Xu J, Wang P, Paik YH, Meng F, Asagiri M, Murray LA, Hofmann AF, Iida T, Glass CK, Brenner DA, Kisseleva T. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014b;111:E3297-305.
- Iwaisako K, Brenner DA, Kisseleva T. What's new in liver fibrosis? The origin of myofibroblasts in liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012;27Suppl 2:65-8
- Iwakiri Y, Groszmann RJ. The hyperdynamic circulation of chronic liver diseases: from the patient to the molecule. *Hepatology*. 2006; 43: S121-31.
- Izquierdo JM, Sotorrió P, Alvarez-Uría J, Estrada JM, Quirós A. Serum ASAT, ALAT, ALP, LD, GT, and CK determined in the Cobas-Bio centrifugal analyser by the methods of the Scandinavian Committee on Enzymes. *Scand J Clin Lab Invest*. 1982;173-6.
- Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS. Concise review: clinical translation of wound healing therapies based on mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 2012; 1: 44-50.
- Jacob G, Nassar N, Hayam G, Ben-Haim S, Edoute Y, Better OS, Bomzon A. Cardiac function and responsiveness to beta-adrenoceptor agonists in rats with obstructive jaundice. *Am J Physiol* 1993;265:G314-20.
- Jaeschke H. Mechanisms of Liver Injury II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 ;290:G1083-8.
- Jaeschke H. Therapeutic strategies against ischemia-reperfusion injury: stem cell therapy and beyond. *Crit Care Med*. 2012; 40: 1381-2.
- Jahanyar J, Koerner MM, Loebe M, Youker KA, Torre-Amione G, Noon GP. The role of mast cells after solid organ transplantation. *Transplantation*. 2008;85:1365-71.
- Jaillon S, Galdiero MR, Del Prete D, Cassatella MA, Garlanda C, Mantovani A. Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Semin Immunopathol*. 2013;35:377-94.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Jalan R, Gines P, Olson JC, Mookerjee P, Moreau R, Garcia-Tsao G, Arroyo V, Kamath PS. Acute-on-chronic liver failure. *J Hepatol* 2012; 57: 1336-48.
- Jalan R, Williams R. Acute-on-chronic liver failure: pathophysiological basis of therapeutic options. *Blood Purif.* 2002;20:252-61.
- Janani C, Ranjitha Kumari BD. PPAR gamma gene - A review. *Diabetes Metab Syndr.* 2015;9:46-50.
- Jang Y, Kim M, Cho M, Baik S, Cho Y, Kwon S. Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic fibrosis in a thioacetamide-induced cirrhotic rat model. *BMC Gastroenterol.* 2014. 25;14:198.
- Jaster R, Lichte P, Fitzner B, Brock P, Glass A, Karopka T, Gierl L, Koczan D, Thiesen HJ, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma overexpression inhibits pro-fibrogenic activities of immortalised rat pancreatic stellate cells. *J Cell Mol Med.* 2005;9:670-82.
- Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol.* 2013; 14:996-1006.
- Jhandier MN, Kruglov EA, Lavoie EG, Sévigny J, Dranoff JA. Portal fibroblasts regulate the proliferation of bile duct epithelia via expression of NTPDase2. *J Biol Chem.* 2005; 280:22986-92.
- Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007; 23: 435-61.
- Jiang JX, Venugopal S, Serizawa N, Chen X, Scott F, Li Y, Adamson R, Devaraj S, Shah V, Gershwin ME, Friedman SL, Török NJ. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 2 plays a key role in stellate cell activation and liver fibrogenesis in vivo. *Gastroenterology.* 2010;139:1375-84.
- Jiao K, Sun Q, Chen B, Li S, Lu J. Vitamin K1 attenuates bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats. *Scand J Gastroenterol.* 2014;49:715-21.
- Jing XY, Yang XF, Qing K, Ou-yang Y. Roles of the lipid metabolism in hepatic stellate cells activation *Chin Med Sci J.* 2013;28:233-6.
- Jover-Cobos M, Noiret L, Lee K, Sharma V, Habtesion A, Romero-Gomez M, Davies N, Jalan R. Ornithine phenylacetate targets alterations in the expression and activity of glutamine synthase and glutaminase to reduce ammonia levels in bile duct ligated rats. *J Hepatol.* 2014;60:545-53.
- Jüngst C, Lammert F. Cholestatic liver disease. *Dig Dis* 2013; 31: 152-4.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Kadota Y, Yagi H, Inomata K, Matsubara K, Hibi T, Abe Y, Kitago M, Shinoda M, Obara H, Itano O<sup>1</sup>, Kitagawa Y. Mesenchymal stem cells support hepatocyte function in engineered liver grafts. *Organogenesis*. 2014;10:268-77.
- Kaler B, Karram T, Morgan WA, Bach PH, Yousef IM, Bomzon A. Are bile acids involved in the renal dysfunction of obstructive jaundice? An experimental study in bile duct ligated rats. *Ren Fail* 2004;26:507-16.
- Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*. 2003;112:1776-84.
- Kalluri REMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest*. 2009;119:1417-9.
- Kamali S, Karahan S. Effects of glutamine and curcumin on bacterial translocation in jaundiced rats. *World J Gastroenterol* 2010;16:4313-20.
- Kamath PS, Kim WR. The model for end-stage liver disease (MELD). *Hepatology* 2007;45: 797–805.
- Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER, Kim WR. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology*. 2001;33:464-70.
- Kamiya A, Inagaki Y. Stem and progenitor cell systems in liver development and regeneration. *Hepatol Res*. 2015;45:29-37.
- Kang Q, Chen A. Curcumin eliminates oxidized LDL roles in activating hepatic stellate cells by suppressing gene expression of lectin-like oxidized LDL receptor-1. *Lab Invest*. 2009;89:1275-90.
- Kanherkar RR, Bhatia-Dey N, Makarev E<sup>2</sup>, Csoka AB. Cellular reprogramming for understanding and treating human disease. *Front Cell Dev Biol*. 2014;2:67.
- Karatepe O, Acet E, Battal M, Adas G, Kemik A, Altioek M, Kamali G, Koculu S, Catay A, Kamali S, Karahan S. Effects of glutamine and curcumin on bacterial translocation in jaundiced rats. *World J Gastroenterol*. 2010; 16: 4313-20.
- Karp CL, Murray PJ. Non-canonical alternatives: What a macrophage is 4. *J Exp Med*. 2012; 209: 427-31.
- Kassel KM, Owens AP 3rd, Rockwell CE, Sullivan BP, Wang R, Tawfik O, Li G, Guo GL, Mackman N, Luyendyk JP. Protease-activated receptor 1 and hematopoietic cell tissue factor are required for hepatic steatosis in mice fed a Western diet. *Am J Pathol*. 2011; 179: 2278-89.
- Kassel KM, Sullivan BP, Luyendyk JP. Lipopolysaccharide enhances transforming growth factor  $\beta$ 1-induced platelet-derived growth factor-B

## BIBLIOGRAFÍA

---

- expression in bile duct epithelial cells. *J Gastroenterol Hepat.* 2012;27:714-21.
- Katsuta Y, Zhang XJ, Ohsuga M, Akimoto T, Komeichi H, Shimizu S, Inami T, Miyamoto A, Satomura K, Takano T. Hemodynamic features of advanced cirrhosis due to chronic bile duct ligation. *J Nihon Med Sch.* 2005;72:217-25.
- Ke Z, Zhou F, Wang L, Chen S, Liu F, Fan X, Tang F, Liu D, Zhao G. Down-regulation of Wnt signaling could promote bone marrow-derived mesenchymal stem cells to differentiate into hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;367:342-8.
- Kennett EC, Davies MJ. Degradation of matrix glycosaminoglycans by peroxynitrite/peroxynitrous acid: evidence for a hydroxyl-radical-like mechanism. *Free Radic Biol Med.* 2007;42:1278-89.
- Kennett EC, Davies MJ. Glycosaminoglycans are fragmented by hydroxyl, carbonate, and nitrogen dioxide radicals in a site-selective manner: implications for peroxynitrite-mediated damage at sites of inflammation. *Free Radic Biol Med.* 2009;47:389-400.
- Kilicoglu B, Gencay C, Kismet K, Serin Kilicoglu S, Erguder I, Erel S, Sunay AE, Erdemli E, Durak I, Akkus MA. The ultrastructural research of liver in experimental obstructive jaundice and effect of honey. *Am J Surg* 2008;195:249-56.
- Kim J, Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol.* 2009;37:1445-53.
- Kim SJ, Park KC, Lee JU, Kim KJ, Kim DG. Therapeutic potential of adipose tissue-derived stem cells for liver failure according to the transplantation routes. *J Korean Surg Soc.* 2011; 81: 176-86.
- Kim TY, Kim DJ.. Acute-on-chronic liver failure. *Clin Mol Hepatol.* 2013;19:349-59.
- Kinnman N, Housset C. Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:d496-503.
- Kirkland JG, Godfrey CB, Garrett R, Kakar S, Yeh BM, Corvera CU. Reversible surgical model of biliary inflammation and obstructive jaundice in mice. *J Surg Res.* 2010; 164: 221-7.
- Kisseleva T, Cong M, Paik Y, Scholten D, Jiang C, Benner C, Iwaisako K, Moore-Morris T, Scott B, Tsukamoto H, Evans SM, Dillmann W, Glass CK, Brenner DA. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:9448-53.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Kisseleva T, Brenner DA. Mechanisms of fibrogenesis. *Exp Biol Med.* 2008; 233:109-22.
- Kloek JJ, Marsman HA, van Vliet AK, Gouma DJ, van Gulik TM. Biliary drainage attenuates postischemic reperfusion injury in the cholestatic rat liver. *Surgery.* 2008;144:22-31.
- Koenderman L, Buurman W Daha M R. The innate immune response. *Immunology Letters.* 2014; 162:95-102.
- Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, Kamitani S, Kawasaki S, Nagase T. Histamine stimulates human lung fibroblast migration. *Mol Cell Biochem* 2010;337:77-81.
- Kojima K, Hosokawa M, Kobayashi K, Tainaka H, Chiba K. Microarray analysis of hepatic gene expression during long-term cholestasis induced by common bile duct ligation in rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 2004; 115-116: 63-75.
- Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol.* 2006; 12: 7413-20.
- Komatsu M. Liver autophagy: physiology and pathology. *J Biochem.* 2012;152:5-15.
- Kordes C, Sawitzka I, Götze S, Herebian D, Häussinger D. Hepatic stellate cells contribute to progenitor cells and liver regeneration. *J Clin Invest.* 2014;124:5503-15.
- Korpos E, Wu C, Sorokin L. Multiple roles of the extracellular matrix in inflammation. *Curr Pharm Des.* 2009;15:1349-57.
- Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol.* 1984;65:305-11.
- 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;276:26605-13.
- Kramer HJ. Impaired renal function in obstructive jaundice: roles of the thromboxane and endothelin systems. *Nephron.* 1997; 77:1-12.
- Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006; 24:386-398.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Kremers WK, van Ijperen M, Kim WR, Freeman RB, Harper AM, Kamath PS, Wiesner RH.:MELD score as a predictor of pretransplant and posttransplant survival in OPTN/UNOS status 1 patients. *Hepatology*. 2004; 39:764-9.
- Kruglov EA, Nathanson RA, Nguyen T, Dranoff JA. Secretion of MCP-1/CCL2 by bile duct epithelia induces myofibroblastic transdifferentiation of portal fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290:G765-71.
- Kuhlmann WD, Peschke P. Hepatic progenitor cells, stem cells, and AFP expression in models of liver injury. *Int J Exp Pathol* 2006;87:343-59.
- Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E<sup>1</sup>, Mourdjeva M, Oreshkova T, Belemezova K, Kyurkchiev S.Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014;6:552-70.
- Laleman W. Role of vasoactive substances and cellular effectors in the pathophysiology of cirrhotic portal hypertension: the past, the present and the future--Georges Brohée Lecture. *Acta Gastroenterol Belg* 2009;72:9-16.
- Lamb EJ, Vickery S, Dalton RN, Stevens PE. Estimating GFR with ID-MS traceable creatinine assays. *Ann Clin Biochem*. 2006; 43 (Pt 4):327.
- Lange C, Bassler P, Lioznov MV, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC.Hepatocytic gene expression in cultured rat mesenchymal stem cells. *Transplant Proc*. 2005;37: 276-9.
- Lange C, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC.Hepatocytic differentiation of mesenchymal stem cells in cocultures with fetal liver cells. *World J Gastroenterol*. 2006;12:2394-7.
- Lanzoni G, Oikawa T, Wang Y, Cui CB, Carpino G, Cardinale V, Gerber D, Gabriel M, Dominguez-Bendala J, Furth ME, Gaudio E, Alvaro D, Inverardi L, Reid LM.Concise review: clinical programs of stem cell therapies for liver and pancreas. *Stem Cells*.;31:2047-60.
- Laschke MW, Dold S, Jeppsson B, Schilling MK, Menger MD, Thorlacius H. Rho-kinase inhibitor attenuates cholestasis-induced CXC chemokine formation, leukocyte recruitment, and hepatocellular damage in the liver. *J Surg Res*. 2010; 159: 666-73.
- Lau T, Ahmad J: Clinical applications of the Model for End-Stage Liver Disease (MELD) inhepatic medicine.*Hepat Med*. 2013 ;11;5:1-10.
- Lautt WW. Relationship between hepatic blood flow and overall metabolism: the hepatic arterial buffer response. *Fed Proc*. 1983; 42: 1662-6.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Lazaridis KN, Strazzabosco M, Larusso NF. The cholangiopathies: disorders of biliary epithelia. *Gastroenterology* 2004;127:1565-77.
- Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol.* 2003 ;31:890-6.
- Lee JH, Park HJ, Jang IK, Kim HE, Lee DH, Park JK, Lee SK, Yoon HH. In vitro differentiation of human liver-derived stem cells with mesenchymal characteristics into immature hepatocyte-like cells. *Transplant Proc.* 2014;46:1633-7.
- Lee KC, Yang YY, Huang YT, Lee FY, Hou MC, Lin HC, Lee SD. Administration of a low dose of sildenafil for 1 week decreases intrahepatic resistance in rats with biliary cirrhosis: the role of NO bioavailability. *Clin Sci (Lond).* 2010; 119: 45-55.
- Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology.* 2004;40:1275-84.
- Lee PC, Yang YY, Huang CS, Hsieh SL, Lee KC, Hsieh YC, Lee TY, Lin HC. Concomitant inhibition of oxidative stress and angiogenesis by chronic hydrogen-rich saline and N-acetylcysteine treatments improves systemic, splanchnic and hepatic hemodynamics of cirrhotic rats. *Hepatol Res.* 2014 [Epub ahead of print].
- Lee SJ, Namkoong S, Kim YM, Kim CK, Lee H, Ha KS, Chung HT, Kwon YG, Kim YM. Fractalkine stimulates angiogenesis by activating the Raf1/MED/ERK and PI3K/AKT/eNOS-dependent signal pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H2836-46.
- Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011;25:195-206.
- Leke R, de Oliveira DL, Mussulini BH, Pereira MS, Kazlauskas V, Mazzini G, Hartmann CR, Silveira TR, Simonsen M, Bak LK, Waagepetersen HS, Keiding S, Schousboe A, Portela LV. Impairment of the organization of locomotor and exploratory behaviors in bile duct-ligated rats. *PLoS One.* 2012;7:e36322.
- Leke R, Oliveira DL, Forgiarini LF, Escobar TD, Hammes TO, Meyer FS, Keiding S, Silveira TR, Schousboe A. Impairment of short term memory in rats with hepatic encephalopathy due to bile duct ligation. *Metab Brain Dis* 2013; 28: 187-92.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Lemaigre FP. Mechanisms of liver development: concepts for understanding liver disorders and design of novel therapies. *Gastroenterology*. 2009; 137: 62-79.
- Lemoine S, Cadoret A, El Mourabit H, Thabut D, Housset C. Origins and functions of liver myofibroblasts. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832:948-54.
- Leonhardt J, Kuebler JF, Turowski C, Tschernig T, Geffers R, Petersen C. Susceptibility to experimental biliary atresia linked to different hepatic gene expression profiles in two mouse strains. *Hepatol Res* 2010; 40: 196-203.
- Li MK, Crawford JM. The pathology of cholestasis. *Semin Liver Dis*. 2004; 24: 21-42.
- Li T, Zhu J, Ma K, Liu N, Feng K, Li X, Wang S, Bie P. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation promotes liver regeneration after portal vein embolization in cirrhotic rats. *J Surg Res*. 2013;184:1161-73.
- Li Y, Song D, Zhang Y, Lee SS. Effect of neonatal capsaicin treatment on haemodynamics and renal function in cirrhotic rats. *Gut*. 2003;52:293-9.
- Licata LA, Nguyen CT, Burga RA, Falanga V, Espat NJ, Ayala A, Thorn M, Junghans RP, Katz SC. Biliary obstruction results in PD-1-dependent liver T cell dysfunction and acute inflammation mediated by Th17 cells and neutrophils. *J Leukoc Biol*. 2013;94:813-23.
- Lida A, Yoshidome H, Shida T, Takano S, Takeuchi D, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Miyazaki M. Hepatocyte nuclear factor-kappa beta (NF-kappaB) activation is protective but is decreased in the cholestatic liver with endotoxemia. *Surgery*. 2010; 148: 477-89.
- Liedtke C, Luedde T, Sauerbruch T, Scholten D, Streetz K, Tacke F, Tolba R, Trautwein C, Trebicka J, Weiskirchen R: Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2013; 6:19.
- Lin CS, Lin G, Lue TF. Allogeneic and xenogeneic transplantation of adipose-derived stem cells in immunocompetent recipients without immunosuppressants. *Stem Cells Dev*. 2012; 10;21:2770-8.
- Lindahl U, Kjellen L. Pathophysiology of heparin sulphate: many diseases, few drugs. *J Intern Med* 2013; 273:555-71.
- Ling L, Ni Y, Wang Q, Wang H, Hao S, Hu Y, Jiang W, Hou Y. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells derived from human fetal lung to hepatocyte-like cells. *Cell Biol Int*. 2008;32:1091-8.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Lipsett PA, Pitt HA. Acute cholangitis. *En: Biliary Tract Surgery. Ed. Pitt HA. Surgical Clinical of North America* 1990; 70: 1297-312.
- Liu WH, Ren LN, Chen T, Liu LY, Tang LJ. Stages based molecular mechanisms for generating cholangiocytes from liver stem/progenitor cells. *World J Gastroenterol.* 2013;19:7032-41.
- Liu WH, Ren LN, Chen T, You N, Liu LY, Wang T, Yan HT, Luo H, Tang LJ. Unbalanced distribution of materials: the art of giving rise to hepatocytes from liver stem/progenitor cells. *J Cell Mol Med.* 2014;18:1-14.
- Liu Z, Sakamoto T, Yokomuro S, Ezure T, Subbotin V, Murase N, Contrucci S, Demetris AJ. Acute obstructive cholangiopathy in interleukin-6 deficient mice: compensation by leukemia inhibitory factor (LIF) suggests importance of gp-130 signaling in the ductular reaction. *Liver* 2000;20:114-24.
- Ljubuncic P, Tanne Z, Bomzon A. Evidence of a systemic phenomenon for oxidative stress in cholestatic liver disease. *Gut.* 2000;47:710-6.
- Llamas MA, Aller MA, Marquina D, Nava MP, Arias J. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes increases in chronic portal hypertensive rats. *Dig Dis Sci.* 2010 ;55:2244-54.
- López L, Begega A, Arias JL, Lorente L, Aller MA, Durán Poveda M, Arias J. Citocromo Oxidasa Hepática en Ratas con Colestasis Microquirúrgica y con Anastomosis Portocava. *Rev Esp Enferm Dig.* 1999; 91: 365-73.
- Lorente L., Rodríguez-Gomez J., Rodríguez Fabian G., Alonso MS., Duran HJ., Duran MC., Aller MA., Arias J. *Técnicas microquirúrgicas En: Rodríguez G, Lorente L, Rodríguez JB, Alonso MS, Durán HJ, Durán MC, Aller MA, Arias J. Microcirugía Experimental. Nueva Editorial Médica, 2000; 75-84.*
- Lorente L, Aller MA, Duran HJ, Cejalvo D, Lloris JM, Arias J. Extrahepatic biliary anatomy in Wistar rats. *Surg Res Comm* 1995; 17: 31-38.
- Lu T, Yang C, Sun H, Lv J, Zhang F, Dong XJ. FGF4 and HGF promote differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytes via the MAPK pathway. *Genet Mol Res.* 2014;13:415-24.
- Lua I, James D, Wang J, Wang KS, Asahina K. Mesodermal mesenchymal cells give rise to myofibroblasts, but not epithelial cells, in mouse liver injury. *Hepatology.* 2014;60:311-22.
- Ma HC Shi XL, Ren HZ, Yuan XW, Ding YT. Targeted migration of mesenchymal stem cells modified with CXCR4 to acute failing liver improves liver regeneration. *World J Gastroenterol.* 2014;20:14884-94.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Ma X, Schickel ME, Stevenson MD, Sarang-Sieminski AL, Gooch KJ, Ghadiali SN, Hart RT. Fibers in the extracellular matrix enable long-range stress transmission between cells. *Biophys J*. 2013;104:1410-8.
- Mack CL. The pathogenesis of biliary atresia: evidence for a virus-induced autoimmune disease. *Semin Liver Dis*. 2007;27:233-42.
- Maggini J, Mirkin G, Bognanni I, Holmberg J, Piazzón IM, Nepomnaschy I, Costa H, Cañones C, Raiden S, Vermeulen M, Geffner JR. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One*. 2010;5:e9252.
- Maggs JR, Chapman RW. An update on primary sclerosing cholangitis. *Curr Opin Gastroenterol*. 2008;24:377-83.
- Mahmoud MF, Swefy SE, Hasan RA, Ibrahim A. Role of cannabinoid receptors in hepatic fibrosis and apoptosis associated with bile duct ligation in rats. *Eur J Pharmacol*. 2014;742:118-24.
- Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006;43:S31-44.
- Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD, Peine CJ, Rank J, ter Borg PC. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology* 2000; 31: 864-71.
- Mallat A, Lodder J, Teixeira-Clerc F, Moreau R, Codogno P, Lotersztajn S. Autophagy: a multifaceted partner in liver fibrosis. *Biomed Res Int*. 2014;2014:869390.
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:519-31.
- Marra F, Tacke F. Roles for chemokines in liver disease. *Gastroenterology*. 2014; 147:577-594.e1.
- Martinek RG. Improved micro-method for determination of serum bilirubin. *Clin Chim Acta*. 1966; 161-70.
- Martínez-Prieto C, Ortíz MC, Fortepiani LA, Ruiz-Maciá J, Atucha NM, García-Estaño J. Haemodynamic and renal evolution of the bile duct-ligated rat. *Clin Sci (Lond)*. 2000;98:611-7.
- Marziani M, Alpini G, Saccomanno S, Candelaresi C, Venter J, Rychlicki C, Fava G, Francis H, Trozzi L, Glaser S, Benedetti A. Glucagon-like peptide-1 and its receptor agonist exendin-4 modulate cholangiocyte adaptive response to cholestasis. *Gastroenterology* 2007;133:244-55.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Marzioni M, Glaser S, Francis H, Marucci L, Benedetti A, Alvaro D, Taffetani S, Ueno Y, Roskams T, Phinzy JL, Venter J, Fava G, Lesage GD, Alpini G. Autocrine/paracrine regulation of the growth of the biliary tree by the neuroendocrine hormone serotonin. *Gastroenterology* 2005;128:121-37.
- Marzioni M, Saccomanno S, Candelaresi C, Rychlicki C, Agostinelli L, Trozzi L, De Minicis S, Benedetti A. Clinical implications of novel aspects of biliary pathophysiology. *Dig Liver Dis* 2010; 42: 238-44.
- Marzioni M, Agostinelli L, Candelaresi C, Saccomanno S, De Minicis S, Maroni L, Mingarelli E, Rychlicki C, Trozzi L, Banales JM, Benedetti A, Baroni GS. Activation of the developmental pathway neurogenin-3/microRNA-7a regulates cholangiocyte proliferation in response to injury. *Hepatology*. 2014;60:1324-35.
- Masyuk TV, Ritman EL, LaRusso NF. Quantitative assessment of the rat intrahepatic biliary system by three-dimensional reconstruction. *Am J Pathol*. 2001 ;158:2079-88.
- Matsunaga Y, Kawasaki H, Terada T. Stromal mast cells and nerve fibers in various chronic liver diseases: relevance to hepatic fibrosis. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1923-32.
- McKleroy W, Lee TH, Atabai K. Always cleave up your mess: targeting collagen degradation to treat tissue fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013;304:L709-21.
- Mederacke I: Liver fibrosis: mouse models and relevance in human liver diseases. *Gastroenterol* 2013, 51:55–62.
- Meier RP, Mahou R, Morel P, Meyer J, Montanari E, Muller YD, Christofilopoulos P, Wandrey C, Gonelle-Gispert C, Bühler LH. Microencapsulated human mesenchymal stem cells decrease liver fibrosis in mice. *J Hepatol*. 2014;. pii: S0168-8278:00796-X.
- Meier RP, Müller YD, Morel P, Gonelle-Gispert C, Bühler LH. Transplantation of mesenchymal stem cells for the treatment of liver diseases, is there enough evidence? *Stem Cell Res*. 2013;11:1348-64.
- Meinecke AK, Nagy N, Lago GD, Kirmse S, Klose R, Schrödter K, Zimmermann A, Helfrich I, Rundqvist H, Theegarten D, Anhenn O, Orian-Rousseau V, Johnson RS, Alitalo K, Fischer JW, Fandrey J, Stockmann C. Aberrant mural cell recruitment to lymphatic vessels and impaired lymphatic drainage in a murine model of pulmonary fibrosis. *Blood*. 2012;119:5931-42.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Mejias M, Coch L, Berzigotti A, Garcia-Pras E, Gallego J, Bosch J, Fernandez M. Antiangiogenic and antifibrogenic activity of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in bile duct-ligated portal hypertensive rats. *Gut*. 2014. pii: gutjnl-2014-307138. [Epub ahead of print].
- Mejias M, Garcia-Pras E, Gallego J, Mendez R, Bosch J, Fernandez M. Relevance of the mTOR signaling pathway in the pathophysiology of splenomegaly in rats with chronic portal hypertension. *J Hepatol* 2010; 52: 529-39.
- Mejias M, Coch L, Berzigotti A, Garcia-Pras E, Gallego J, Bosch J, Fernandez M. Antiangiogenic and antifibrogenic activity of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in bile duct-ligated portal hypertensive rats. *Gut*. 2014 May 21. pii: gutjnl-2014-307138.
- Mencin A, Kluwe J, Schwabe RF. Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases. *Gut*. 2009;58:704-20.
- Méndez M, Méndez-López M, López L, Aller MA, Arias J, Cimadevilla JM, Arias JL. Spatial memory alterations in three models of hepatic encephalopathy. *Behav Brain Res*. 2008;188:32-40.
- Meng F, Wang K, Aoyama T, Grivennikov SI, Paik Y, Scholten D, Cong M, Iwaisako K, Liu X, Zhang M, Osterreicher CH, Stickel F, Ley K, Brenner DA, Kisseleva T. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology*. 2012;143:765-76.e1-3.
- MG, Summers R, Alpini G, Glaser S. Ca<sup>2+</sup>-dependent cytoprotective effects of ursodeoxycholic and tauroursodeoxycholic acid on the biliary epithelium in a rat model of cholestasis and loss of bile ducts. *Am J Pathol* 2006;168:398-409.
- Miao CG, Yang YY, He X, Huang C, Huang Y, Zhang L, Lv XW, Jin Y, Li J. Wnt signaling in liver fibrosis: progress, challenges and potential directions. *Biochimie*. 2013;95:2326-35.
- Mieli-Vergani G, Vergani D. Biliary atresia. *Semin Immunopathol*. 2009; 31:371-81.
- Miñano C, Garcia-Tsao G. Clinical pharmacology of portal hypertension. *Gastroenterol Clin North Am*. 2010;3:681-95.
- Minter RM, Bi X, Ben-Josef G, Wang T, Hu B, Arbabi S, Hemmila MR, Wang SC, Remick DG, Su GL. LPS-binding protein mediates LPS-induced liver injury

## BIBLIOGRAFÍA

---

- and mortality in the setting of biliary obstruction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009; 296: G45-54.
- Minter RM, Fan MH, Sun J, Niederbichler A, Ipaktchi K, Arbabi S, Hemmila MR, Remick DG, Wang SC, Su GL. Altered Kupffer cell function in biliary obstruction. *Surgery.* 2005; 138: 236-45.
- Miyoshi H, Rust C, Guicciardi ME, Gores GJ. NF-kappaB is activated in cholestasis and functions to reduce liver injury. *Am J Pathol* 2001;158:967-75.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 2008;451:1069-75.
- Moazzam FN, Brems JJ, Yong SL, Filkins JP, Fisher SG, Holt DR, Gamelli RL, Ding JW. Endotoxin potentiates hepatocyte apoptosis in cholestasis. *J Am Coll Surg.* 2002; 194: 731-9.
- Moezi L, Dehpour AR. Cardiovascular abnormalities in obstructive cholestasis: the possible mechanisms. *Liver Int.* 2013;33:7-15.
- Molnarfi N, Benkhoucha M, Funakoshi H, Nakamura T, Lalive PH. Hepatocyte growth factor: A regulator of inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2014; pii: S1568-9972(14)00285-7.
- Mombeini T, Roushanzamir F, Jorjani M, Pourpak Z, Gaskari SA, Mehr SE, Dehpour AR. Alteration in specific opioid-receptor labeling on peripheral blood leukocytes of bile duct-ligated rat. *Pathophysiology* 2006;13:111-7.
- Mookerjee RP. Acute-on-chronic liver failure: the liver and portal haemodynamics. *Curr Opin Critical Care* 2011; 17: 170-6.
- Moon TC, Befus AD, Kulka M. Mast cell mediators: their differential release and the secretory pathways involved. *Front Immunol.* 2014;5:569.
- Moreau R, Jalan R, Gines P, Pavesi M, Angeli P, Cordoba J, Durand F, Gustot T, Saliba F, Domenicali M, Gerbes A, Wendon J, Alessandria C, Laleman W, Zeuzem S, Trebicka J, Bernardi M, Arroyo V; CANONIC Study Investigators of the EASL-CLIF Consortium. Acute-on-Chronic Liver Failure Is a Distinct Syndrome That Develops in Patients With Acute Decompensation of Cirrhosis. *Gastroenterology.* 2013; pii: S0016-5085.291-6.
- Morel O, Morel N, Jesel L, Freyssinet JM, Toti F. Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis. *Semin Immunopathol.* 2011;33:469-86.
- Morell CM, Fabris L, Strazzabosco M. Vascular biology of the biliary epithelium. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013;28 Suppl 1:26-32.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Mormone E, George J, Nieto N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chem Biol Interact.* 2011; 193: 225-31.
- Morwood SR, Nicholson LB. Modulation of the immune response by extracellular matrix proteins. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2006; 54: 367-74.
- Motawi TM, Atta HM, Sadik NA, Azzam M. The therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and simvastatin in a rat model of liver fibrosis. *Cell Biochem Biophys.* 2014;68:111-25.
- Muddu AK Guha IN, Elsharkawy AM, Mann DA. Resolving fibrosis in the diseased liver: translating the scientific promise to the clinic. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39:695-714.
- Nakamura K, Tanoue A. Etiology of biliary atresia as a developmental anomaly: recent advances. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2013;20:459-64.
- Nakanuma Y, Yasoshima M, Tsuneyama K, Harada K. Histopathology of primary biliary cirrhosis with emphasis on expression of adhesion molecules. *Semin Liver Dis* 1997;17:35-47.
- Nanji AA, Jokelainen K, Rahemtulla A, Miao L, Fogt F, Matsumoto H, Tahan SR, Su GL. Activation of nuclear factor kappa B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology* 1999;30:934-43
- Narayanaswamy B, Gonde C, Tredger JM, Hussain M, Vergani D, Davenport M. Serial circulating markers of inflammation in biliary atresia--evolution of the post-operative inflammatory process. *Hepatology.* 2007;46:180-7.
- Navaneethan U, Jayanthi V, Mohan P. Pathogenesis of cholangitis in obstructive jaundice-revisited. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2011;57:97-104.
- Ng, CP, Swartz MA. Mechanisms of Interstitial Flow-Induced Remodeling of Fibroblast–Collagen Cultures. *Ann Biomed Engin* 2006; 34: 446-454.
- Nishikawa Y, Sone M, Nagahama Y, Kumagai E, Doi Y, Omori Y, Yoshioka T, Tokairin T, Yoshida M, Yamamoto Y, Ito A, Sugiyama T, Enomoto K. Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes bile ductular transdifferentiation of mature rat hepatocytes in vitro. *J Cell Biochem.* 2013;114:831-43.
- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* 2000;24:372-6.
- Novo E, Cannito S, Paternostro C, Bocca C, Miglietta A, Parola M. Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis. *Arch Biochem Biophys.* 2014;548:20-37.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Torbenson M, Smedh U, Moran TH, Li Z, Huang J, Thomas SA, Diehl AM. Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut* 2004;53:438-45.
- Ochiya T, Yamamoto Y, Banas A. Commitment of stem cells into functional hepatocytes. *Differentiation*. 2010;79:65-73.
- Oertelt S, Lian ZX, Cheng CM, Chuang YH, Padgett KA, He XS, Ridgway WM, Ansari AA, Coppel RL, Li MO, Flavell RA, Kronenberg M, Mackay IR, Gershwin ME: Anti-mitochondrial antibodies and primary biliary cirrhosis in TGF- $\beta$  receptor II dominant-negative mice. *J Immunol* 2006, 177:1655–1660.
- Oguz S, Kanter M, Erboğa M, Erenoglu C. Protective effects of thymoquinone against cholestatic oxidative stress and hepatic damage after biliary obstruction in rats. *J Mol Histol*. 2012; 43: 151-9.
- Ohara N, Voelkel NF, Chang SW. Tissue eicosanoids and vascular permeability in rats with chronic biliary obstruction. *Hepatology*. 1993; 18: 111-8.
- Ohara H, Nakazawa T, Kawa S, Kamisawa T, Shimosegawa T, Uchida K, Hirano K, Nishino T, Hamano H, Kanno A, Notohara K, Hasebe O, Muraki T, Ishida E, Naitoh I, Okazaki K. Establishment of a serum IgG4 cut-off value for the differential diagnosis of IgG4-related sclerosing cholangitis: a Japanese cohort. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28:1247-51.
- Ohara SP, Tabibian JH, Splinter PL, LaRusso NF. The dynamic biliary epithelia: molecules, pathways, and disease. *J Hepatol*. 2013;58:575-82.
- Olson JC, Wendon JA, Kramer DJ, Arroyo V, Jalan R. Intensive care of the patient with cirrhosis. *Hepatology* 2011; 54: 1864-72.
- Omenetti A, Diehl AM. Hedgehog signaling in cholangiocytes. *Curr Opin Gastroenterol* 2011;27:268-75.
- Onozuka I, Kakinuma S, Kamiya A, Miyoshi M, Sakamoto N, Kiyohashi K, Watanabe T, Funaoka Y, Ueyama M, Nakagawa M, Koshikawa N, Seiki M, Nakauchi H, Watanabe M. Cholestatic liver fibrosis and toxin-induced fibrosis are exacerbated in matrixmetalloproteinase-2 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;406:134-40.
- Paizis G, Cooper ME, Schembri JM, Tikellis C, Burrell LM, Angus PW. Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver. *Gastroenterology* 2002;123:1667-76.
- Parekkadan B, van Poll D, Megeed Z, Kobayashi N, Tilles AW, Berthiaume F, Yarmush ML. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by

## BIBLIOGRAFÍA

---

- mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 363: 247-52.
- Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One.* 2007 Sep 26;2:e941.
- Park BJ, Lee YJ, Lee HR. Chronic liver inflammation: clinical implications beyond alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20:2168-75..
- Park SM. The crucial role of cholangiocytes in cholangiopathies. *Gut Liver* 2012; 6: 295-304.
- Parola M, Marra F, Pinzani M. Myofibroblast-like cells and liver fibrogenesis: Emerging concepts in a rapidly moving scenario. *Mol Aspects Med.* 2008; 29: 58-66.
- Parola M, Pinzani M. Hepatic wound repair. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2009 25; 2: 4.
- Pascual-Miguelañez I, Salinas-Gomez J, Fernandez-Luengas D, Villar-Zarra K, Clemente LV, Garcia-Arranz M, Olmo DG. Systemic Treatment of Acute Liver Failure with Adipose Derived Stem Cells. *J Invest Surg.* 2014. [Epub ahead of print].
- Patwari P, Lee RT. Mechanical control of tissue morphogenesis. *Circ Res* 2008; 103: 234-43.
- Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol.* 2014;14:181-94.
- Peral de Castro C, Jones SA, Ní Cheallaigh C, Hearnden CA, Williams L, Winter J, Lavelle EC, Mills KH, Harris J Autophagy regulates IL-23 secretion and innate T cell responses through effects on IL-1 secretion. *J Immunol.* 2012; 189:4144-53.
- Perepelyuk M, Terajima M, Wang AY, Georges PC, Janney PA, Yamauchi M, Wells RG. Hepatic stellate cells and portal fibroblasts are the major cellular sources of collagens and lysyl oxidases in normal liver and early after injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013;304:G605-14.
- Peters T Jr. Proposals for standardization of total protein assays. *Clin Chem.* 1968; 1147-59.
- Petersen C, Davenport M. Aetiology of biliary atresia: what is actually known? *Orphanet J Rare Dis.* 2013;8:128.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Petersen C. Biliary atresia: the animal models. *Semin Pediatr Surg.* 2012;21:185-91.
- Petro E Petrides and David Brenner Proceedings of Fibroproliferative disorders: from biochemical analysis to targeted therapies): eCollection 2012.
- Pi L, Ding X, Jorgensen M, Pan JJ, Oh SH, Pintilie D, Brown A, Song WY, Petersen BE. Connective tissue growth factor with a novel fibronectin binding site promotes cell adhesion and migration during rat oval cell activation. *Hepatology.* 2008;47:996-1004.
- Pilling D, Fan T, Huang D, Kaul B, Gomer RH. Identification of markers that distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts. *PLoS One.* 2009;4:e7475.
- Pinzani M, Rombouts K. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. *Dig Liver Dis.* 2004; 36: 231-42.
- Pinzani M, Rosselli M, Zuckermann M. Liver cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011; 25: 281-90.
- Pittenger MF, MacKay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-7.
- Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med.* 2000; 21: 49-98.
- Polimeno L, Azzarone A, Zeng QH, Panella C, Subbotin V, Carr B, Bouzahzah B, Francavilla A, Starzl TE. Cell proliferation and oncogene expression after bile duct ligation in the rat: Evidence of a specific growth effect on bile duct cells. *Hepatology* 1995; 21: 1070-78.
- Pollheimer MJ, Fickert P, Stieger B. Chronic cholestatic liver diseases: Clues from histopathology for pathogenesis. *Mol Aspects Med* 2014; 37:35-56.
- Poncellet AJ, Vercruysse J, Saliez A, Gianello P. Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic in vitro, intracardiac injection elicits an immune response in vivo. *Transplantation.* 2007;83:783-90.
- Portincasa P, Grattagliano I, Testini M, Caruso ML, Wang DQ, Moschetta A, Calamita G, Vacca M, Valentini AM, Renna G, Lissidini G, Palasciano G. Parallel intestinal and liver injury during early cholestasis in the rat: modulation by bile salts and antioxidants. *Free Radic Biol Med.* 2007; 42: 1381-91.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997; 349: 825–32.
- Prieto I, Aller MA, Santamaría L, Nava MP, Madero R, Pérez-Robledo JP, Arias J. Prehepatic portal hypertension produces increased mast cell density in the small bowel and in mesenteric lymph nodes in the rat. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005;20:1025-31.
- Proell V, Carmona-Cuenca I, Murillo MM, Huber H, Fabregat I, Mikulits W. TGF-beta dependent regulation of oxygen radicals during transdifferentiation of activated hepatic stellate cells to myofibroblastoid cells. *Comp Hepatol* 2007;6:1.
- Pu KM, Sava P, Gonzalez AL. Microvascular targets for anti-fibrotic therapeutics. *Yale J Biol Med*. 2013;86:537-54.
- Qian J, Niu M, Zhai X, Zhou Q, Zhou Y.  $\beta$ -Catenin pathway is required for TGF- $\beta$ 1 inhibition of PPAR $\gamma$  expression in cultured hepatic stellate cells. *Pharmacol Res*. 2012;66:219-25.
- Qin Y, Guan J, Zhang C. Mesenchymal stem cells: mechanisms and role in bone regeneration. *Postgrad Med J*. 2014;90:643-7.
- Ramachandran P, Iredale JP. Macrophages: central regulators of hepatic fibrogenesis and fibrosis resolution. *J Hepatol*. 2012;56:1417-9.
- Ramachandran P, Pellicoro A, Vernon MA, Boulter L, Aucott RL, Ali A, Hartland SN, Snowdon VK, Cappon A, Gordon-Walker TT, Williams MJ, Dunbar DR, Manning JR, van Rooijen N, Fallowfield JA, Forbes SJ, Iredale JP. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:E3186-95
- Ramadori G, Saile B. Inflammation, damage repair, immune cells, and liver fibrosis: specific or nonspecific, this is the question. *Gastroenterology* 2004;127:997-1000.
- Ramadori G, Saile B. Portal tract fibrogenesis in the liver. *Lab Invest* 2004;84:153-9.
- Ramakrishna G, Rastogi A, Trehanpati N, Sen B, Khosla R, Sarin SK. From cirrhosis to hepatocellular carcinoma: new molecular insights on inflammation and cellular senescence. *Liver Cancer*. 2013;2:367-83.
- Ramapa V, Aithal GP. Jaundice: applying lessons from physiology. *Surgery Oxford* 2011; 29: 603-9.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Rebecca G. Wells The Portal Fibroblast: Not Just a Poor Man's Stellate Cell. *Gastroenterology* 2014;147:41–47.
- Rehm J, Shield KD. Global alcohol-attributable deaths from cancer, liver cirrhosis, and injury in 2010. *Alcohol Res.* 2013;35:174-83.
- Ren ZP, Sun LP, Xia YC, Tong QX. Effect of the protease inhibitor MG132 on the transforming growth factor- $\beta$ /Smad signaling pathway in HSC-T6 cells. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci.* 2013;33:501-4.
- Repchinsky C. Up-to-date drug information. *Can Fam Physician* 2001;47:1545.
- Reynolds BM, Dargan EL. Acute obstructive cholangitis: A distinct clinical syndrome. *Ann Surg* 1959; 150: 299-303.
- Rhodes JM, Simons M. The extracellular matrix and blood vessel formation: not just a scaffold. *J Cell Mol Med* 2007;11:176-205.
- Ritzel RM, Capozzi LA, McCullough LD. Sex. Stroke and inflammation: The potential for estrogen-mediated immunoprotection in stroke. *Horm Behav* 2012; 2013;63:238-53.
- Robert L. Hyaluronan, a truly "youthful" polysaccharide. Its medical applications. *Pathol Biol.* 2014; S0369-8114:00115-1.
- Roberts SK, Ludwig J, Larusso NF. The pathobiology of biliary epithelia. *Gastroenterology* 1997;112:269-79.
- Rockey DC. Hepatic fibrosis, stellate cells, and portal hypertension. *Clin Liver Dis.* 2006; 10: 459-79.
- Rodriguez G., Lorente L., Rodriguez JB., Alonso MS., Duran HJ., Durán MC., Aller MA, Arias J. *Microcir. Experimental. Nueva Editorial Médica.* 1999; 1-193.
- Rodríguez-Garay EA: Cholestasis: human disease and experimental animal models; *Ann Hepatol.* 2003; 2:150-8.
- Roeb E, Purucker E, Breuer B, Nguyen H, Heinrich PC, Rose-John S, Matern S. TIMP expression in toxic and cholestatic Liver injury in rat. *J Hepatol* 1997; 27: 535-44.
- Roemeling-van Rhijn M, Weimar W, Hoogduijn MJ. Mesenchymal stem cells: application for solid-organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2012 ;17:55-62.
- Roskams T. Relationships among stellate cell activation, progenitor cells, and hepatic regeneration. *Clin Liver Dis.* 2008;12:853-60.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Rosselli M, MacNaughtan J, Jalan R, Pinzani M. Beyond scoring: a modern interpretation of disease progression in chronic liver disease. *Gut*. 2013;62:1234-41.
- Roy S, Sen CK. miRNA in wound inflammation and angiogenesis. *Microcirculation* 2012; 19: 224-32.
- Royer M, Dubin M, Kravetz D. Evaluation of the Malloy-Evelyn and Jendrassik-Cleghorn methods for the determination of plasma bilirubin. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 1973; 167-73.
- Russo FP, Parola M. Stem cells in liver failure. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2012; 26: 35-45.
- Rutkowski JM, Swartz MA. A driving force for change: interstitial flow as a morphoregulator. *Trends Cell Biol* 2006; 17: 44-50.
- Said A, Williams J, Holden J, Remington P, Gangnon R, Musat A, Lucey MR. Model for end stage liver disease score predicts mortality across a broad spectrum of liver disease. *J Hepatol*. 2004; 40: 897-903.
- Saito JM, Maher JJ. Bile duct ligation in rats induces biliary expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant. *Gastroenterology*. 2000; 118: 1157-68.
- Salerno F, Guevara M, Bernardi M, Moreau R, Wong F, Angeli P, Garcia-Tsao G, Lee SS. Refractory ascites: pathogenesis, definition and therapy of a severe complication in patients with cirrhosis. *Liver Int*. 2010;30:937-47.
- Sampson EJ, Baird MA, Burtis CA, Smith EM, Witte DL, Bayse DD. A coupled-enzyme equilibrium method for measuring urea in serum: optimization and evaluation of the AACC study group on urea candidate reference method. *Clin Chem*. 1980; 816-26.
- Sánchez, M., Frutos, G. y Cuesta, P. L. Estadística y matemáticas aplicadas. Editorial Síntesis. 1996.
- Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, Kawano Y, Kobune M, Sato T, Miyanishi K, Takayama T, Takahashi M, Takimoto R, Iyama S, Matsunaga T, Ohtani S, Matsuura A, Hamada H, Niitsu Y. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*. 2005; 106: 756-63.
- Scholten D, Osterreicher CH, Scholten A, Iwaisako K, Gu G, Brenner DA, Kisseleva T. Genetic labeling does not detect epithelial-to-mesenchymal transition of cholangiocytes in liver fibrosis in mice. *Gastroenterology*. 2010;139:987-98.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Scholten D, Reichart D, Paik YH, Lindert J, Bhattacharya J, Glass CK, Brenner DA, Kisseleva T. Migration of fibrocytes in fibrogenic liver injury. *Am J Pathol.* 2011;179:189-98.
- Schumann G, Klauke R, Canalias F, Bossert-Reuther S, Franck P, Gella F, Jørgensen P, Kang D, Lessinger J, Panteghini M, Ceriotti F. IFCC Primary Reference Procedures for the Measurement of Catalytic Activity Concentrations of Enzymes at 37 °C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). Committee on Reference Systems for Enzymes (C-RSE); 2002.
- Seki E, de Minicis S, Inokuchi S, Taura K, Miyai K, van Rooijen N, Schwabe RF, Brenner DA. CCR2 promotes hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* 2009; 50:185-97.
- Seki E, Schwabe RF. Hepatic inflammation and fibrosis: Functional links and key pathways. *Hepatology.* 2014. [Epub ahead of print].
- Seki E, Schwabe RF. Hepatic inflammation and fibrosis: Functional links and key pathways. *Hepatology.* 2014; [Epub ahead of print].
- Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 328: 258-64.
- Seo YS, Shah VH. The role of gut-liver axis in the pathogenesis of liver cirrhosis and portal hypertension. *Clin Mol Hepatol.* 2012;18:337-46.
- Sgodda M, Aurich H, Kleist S, Aurich I, König S, Dollinger MM, Fleig WE, Christ B. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo. *Exp Cell Res.* 2007; 313: 2875-86.
- Sherlock S. Cholestasis. En: *Diseases of the Liver and Biliary System.* Ed. Sherlock S. Blackwell Scientific Publications. London 1989; 8ª Edición. Chapter 13; pp. 248-272.
- Shi Q, Ghosh RP, Engelke H, Rycroft CH, Cassereau L, Sethian JA, Weaver VM, Liphardt JT. Rapid disorganization of mechanically interacting systems of mammary acini. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:658-63.
- Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol.* 2012; 33: 136-43.
- Sicklick JK, Choi SS, Bustamante M, McCall SJ, Pérez EH, Huang J, Li YX, Rojkind M, Diehl AM. Evidence for epithelial-mesenchymal transitions in adult liver cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;291:G575-83.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Sipeki N, Antal-Szalmas P, Lakatos PL, Papp M. Immune dysfunction in cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2014;20:2564-77.
- Snykers S, Vanhaecke T, Papeleu P, Luttun A, Jiang Y, Vander Heyden Y, Verfaillie C, Rogiers V. Sequential exposure to cytokines reflecting embryogenesis: the key for in vitro differentiation of adult bone marrow stem cells into functional hepatocyte-like cells. *Toxicol Sci.* 2006;94:330-41.
- Sokol RJ, Mack C. Etiopathogenesis of biliary atresia. *Semin Liver Dis.* 2001;21:517-24.
- Solís-Herruzo JA, Solís-Muñoz P, Muñoz Yagüe T, García-Ruiz I. Molecular targets in the design of antifibrotic therapy in chronic liver disease. *Rev Esp Enferm Dig.* 2011; 103: 310-23.
- Somi MH, Kalageychi H, Hajipour B, Musavi G, Khodadadi A, Shokri N, Hashemi R, Bagheri I, Mutab Laleh F. Lipoic acid prevents hepatic and intestinal damage induced by obstruction of the common bile duct in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17:1305-10.
- Soylu AR, Aydogdu N, Basaran UN, Altaner S, Tarcin O, Gedik N, Umit H, Tezel A, Dokmeci G, Baloglu H, Ture M, Kutlu K, Kaymak K. Antioxidants vitamin E and C attenuate hepatic fibrosis in biliary-obstructed rats. *World J Gastroenterol.* 2006; 12: 6835-41.
- Spence JR, Lange AW, Lin SC, Kaestner KH, Lowy AM, Kim I, Whitsett JA, Wells JM. Sox 17 regulates organ lineage segregation of ventral foregut progenitor cells. *Dev Cell* 2009; 17: 62-74.
- SPSS. SPSS Statistics 19.0 Command Syntax Reference. SPSS Inc. 2010.
- Starzl TE, Francavilla A, Halgrimson CG, Francavilla FR, Porter KA, Brown TH, Putnam CW. The origin, hormonal nature, and action of hepatotrophic substances in portal venous blood. *Surg Gynecol Obstet.* 1973;137:179-99.
- Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol.* 2006;85:699-715.
- Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature.* 1987;327:239-42.
- Streckbein P, Jäckel S, Malik CY, Obert M, Kähling C, Wilbrand JF, Zahner D, Heidinger K, Kampschulte M, Pons-Kühnemann J, Köhler K, Sauer H, Kramer M, Howaldt HP. Reconstruction of critical-size mandibular defects in immunoincompetent rats with human adipose-derived stromal cells. *J Craniomaxillofac Surg.* 2013;41:496-503.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Suarez V, Puerta A, Santos LE, Perez JM, Varon A, Botero RC. Portal hypertensive biliopathy: A single center experience and literatura review. *World J Hepatol* 2013; 5: 137-44.
- Sun K, Xie X, Xie J, Jiao S, Chen X, Zhao X, Wang X, Wei L. Cell-based therapy for acute and chronic liver failures: distinct diseases, different choices. *Sci Rep.* 2014;4:6494.
- Sun S, Chen G, Xu M, Qiao Y, Zheng S. Differentiation and migration of bone marrow mesenchymal stem cells transplanted through the spleen in rats with portal hypertension. *PLoS One.* 2013;8:e83523.
- Sutton MT, Bonfield TL. Stem cells: innovations in clinical applications. *Stem Cells Int.* 2014;2014:516278.
- Suzuki A, Iwama A, Miyashita H, Nakauchi H, Taniguchi H. Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development.* 2003;130:2513-24.
- Suzuki K, Tanaka M, Watanabe N, Saito S, Nonaka H, Miyajima A. p75 Neurotrophin receptor is a marker for precursors of stellate cells and portal fibroblasts in mouse fetal liver. *Gastroenterology.* 2008;135:270-281.e3.
- Swanson KL, Wiesner RH, Krowka MJ.: Natural History of hepatopulmonary syndrome: Impact of liver transplantation. *Hepatology* 2005 ; 41: 1122.
- Syal G, Fausther M, Dranoff JA. Advances in cholangiocyte immunobiology. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012; 303: G1077-86.
- Syal G, Fausther M, Dranoff JA. Advances in cholangiocyte immunobiology. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012;303:G1077-86.
- Szabó E, Lódi C, Korpos E, Batmunkh E, Rottenberger Z, Deák F, Kiss I, Tokés AM, Lotz G, László V, Kiss A, Schaff Z, Nagy P. Expression of matrilin-2 in oval cells during rat liver regeneration. *Matrix Biol* 2007;26:554-60.
- Szabo G, Mandrekar P, Dolganiuc A. Innate immune response and hepatic inflammation. *Semin Liver Dis.* 2007; 27: 339-50.
- Sztrymf B, Libert JM, Mougeot C, Lebrec D, Mazmanian M, Humbert M, Herve P. Cirrhotic rats with bacterial translocation have higher incidence and severity of hepatopulmonary syndrome. *J Gastroenterol Hepatol.* 2005; 20: 1538-44.
- Tachibana M, Amato P, Sparman M, Gutierrez NM, Tippner-Hedges R, Ma H, Kang E, Fulati A, Lee HS, Sritanaudomchai H, Masterson K, Larson J, Eaton D, Sadler-Fredd K, Battaglia D, Lee D, Wu D, Jensen J, Patton P, Gokhale S, Stouffer RL, Wolf D, Mitalipov S. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell.* 2013; 153:1228-38.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Tacke F, Luedde T, Trautwein C. Inflammatory pathways in liver homeostasis. *Clin Rev Allerg Immunol* 2009; 36: 4-12.
- Tacke F. Functional role of intrahepatic monocyte subsets for the progression of liver inflammation and liver fibrosis in vivo. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5:S27.
- Takahashi K, Yamanaka S. "Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. *Development*. 2013; 140:2457-2461.
- Takahashi K, Yamanaka S. "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126:663-663.
- Takeshita A, Shibayama Y. Role of mast cells in hepatic remodeling during cholestasis and its resolution: relevance to regulation of apoptosis. *Exp Toxicol Pathol*. 2005; 56: 273-80.
- Taléns-Visconti R, Bonora A, Jover R, Mirabet V, Carbonell F, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Human mesenchymal stem cells from adipose tissue: Differentiation into hepatic lineage. *Toxicol In Vitro*. 2007;21:324-9.
- Tanaka H, Leung PS, Kenny TP, Gershwin ME, Bowlus CL. Immunological orchestration of liver fibrosis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2012; 43: 220-9.
- Tandon B, Garcia-Tsao G. Bacterial infection, sepsis and multiorgan failure in cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2008; 28: 26-42.
- Tannuri AC, Coelho MC, de Oliveira Gonçalves J, Santos MM, Ferraz da Silva LF, Bendit I, Tannuri U. Effects of selective bile duct ligation on liver parenchyma in young animals: histologic and molecular evaluations. *J Pediatr Surg*. 2012;47:513-22.
- Tarcin O, Basaranoglu M, Tahan V, Tahan G, Sücüllü I, Yilmaz N, Sood G, Snyder N, Hilman G, Celikel C, Tözün N. Time course of collagen peak in bile duct-ligated rats. *BMC Gastroenterol*. 2011 Apr 28;11:45.
- Tarlow BD, Finegold MJ, Grompe M. Clonal tracing of Sox9+ liver progenitors in mouse oval cell injury. *Hepatology*. 2014; 60:278-89.
- Teratani T, Yamamoto H, Aoyagi K, Sasaki H, Asari A, Quinn G, Sasaki H, Terada M, Ochiya T. Direct hepatic fate specification from mouse embryonic stem cells. *Hepatology*. 2005; 4:836-46.
- Terra C, Guevara M, Torre A, Gilabert R. Renal Failure in Patients with Cirrhosis and Sepsis Unrelated to Spontaneous Bacterial Peritonitis: Value of MELD score. *Gastroenterology* 2005; 129:1944.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Thabut D, Massard J, Gangloff A, Carbonell N, Francoz C, Nguyen-Khac E, Duhamel C, Lebrech D, Poynard T, Moreau R. Model for end-stage liver disease score and systemic inflammatory response are major prognostic factors in patients with cirrhosis and acute functional renal failure. *Hepatology* 2007b; 46: 1872-82.
- Thabut D, Tazi KA, Bonnefont-Rousselot D, Aller MA, Farges O, Guimont MC, Tellier Z, Guichard C. High-density lipoprotein administration attenuates liver proinflammatory response, restores liver endothelial nitric oxide synthase activity, and lowers portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology*. 2007a; 46: 1893-906.
- Tharaux PL, Chatziantoniou C, Fakhouri F, Dussaule JC. Angiotensin II activates collagen I gene through a mechanism involving the MAP/ER kinase pathway. *Hypertension*. 2000; 36: 330-6.
- Thompson MD, Monga SP. WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology*. 2007; 45:1298-305.
- Tiao MM, Wang FS, Huang LT, Chuang JH, Kuo HC, Yang YL, Huang YH. Activation of the developmental pathway neurogenin-3/microRNA-7a regulates cholangiocyte proliferation in response to injury. *Apoptosis*. 2014;19:30-41.
- Tietz NW, Rinker AD, Shaw LMIFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes Part 5. IFCC method for alkaline phosphatase (orthophosphoric-monoester phosphohydrolase, alkaline optimum, EC 3.1.3.1). *J Clin Chem Clin Biochem*. 1983; 731-48.
- Tietz NW Probable source of discrepancies in alkaline phosphate assays. *Clin Chem*. 1987; 625.
- Tsuji W, Rubin JP, Marra KG. Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. *World J Stem Cells*. 2014; 6:312-21.
- Tsukamoto H, Matsuoka M, French SW. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Semin Liver Dis*. 1990; 10: 56-65.
- Tsukamoto H, Zhu NL, Wang J, Asahina K, Machida K. Morphogens and hepatic stellate cell fate regulation in chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012;27 Suppl 2:94-8.
- Twig G, Hyde B, Shirihai OS. Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1777: 1092-7.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Usunier B, Benderitter M, Tamarat R, Chapel A. Management of fibrosis: the mesenchymal stromal cells breakthrough. *Stem Cells Int.* 2014; 2014:340257.
- Van den Heuvel MC, Gouw AS, Boot M, Slooff MJ, Poppema S, de Jong KP. The finest branches of the biliary tree might induce biliary vascularization necessary for biliary regeneration. *J Hepatol* 2006;44:947-55.
- Van Eyken P, Sciote R, Callea F, Van der Steen K, Moerman P, Desmet VJ. The development of the intrahepatic bile ducts in man: a keratin-immunohistochemical study. *Hepatology.* 1988 ;8: 1586-95.
- Van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology.* 2008; 47: 1634-43.
- Van Steenkiste C, Trachet B, Casteleyn C, van Loo D, Van Hoorebeke L, Segers P, Geerts A, Van Vlierberghe H, Colle I. Vascular corrosion casting: analyzing wall shear stress in the portal vein and vascular abnormalities in portal hypertensive and cirrhotic rodents. *Lab Invest.* 2010; 90: 1558-72.
- Vandermeulen M, Grégoire C, Briquet A, Lechanteur C, Beguin Y, Detry O. Rationale for the potential use of mesenchymal stromal cells in liver transplantation. *World J Gastroenterol.* 2014; 20:16418-32.
- Volarevic V, Nurkovic J, Arsenijevic N, Stojkovic M. Concise review: Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for the treatment of acute liver failure and cirrhosis. *Stem Cells.* 2014; 32:2818-23.
- Wakabayashi Y, Shimizu H, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Miyazaki M. Mechanism of neutrophil accumulation in sinusoids after extrahepatic biliary obstruction. *Hepatogastroenterology.* 2008; 55: 1179-83.
- Wanet A, Remacle N, Najjar M, Sokal E, Arnould T, Najimi M, Renard P. Mitochondrial remodeling in hepatic differentiation and dedifferentiation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;54:174-85.
- Wang G, Xiu P, Li F, Xin C, Li K. Vitamin A supplementation alleviates extrahepatic cholestasis liver injury through Nrf2 activation. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:273692.
- Wang H, Vohra BP, Zhang Y, Heuckeroth RO. Transcriptional profiling after bile duct ligation identifies PAI-1 as a contributor to cholestatic injury in mice. *Hepatology.* 2005 ; 42: 1099-108.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Wang JB, Liu C, Yeh YC, Liu CP, Chang CJ, Chen CY, Chin T. A novel rat model simulating biliary atresia after a Kasai operation. *J Invest Surg.* 2014; 27:183-90.
- Wang K. Molecular mechanisms of hepatic apoptosis. *Cell Death Dis.* 2014;5:e996.
- Wang W, Yan J, Wang H, Shi M, Zhang M, Yang W, Peng C, Li H. Rapamycin ameliorates inflammation and fibrosis in the early phase of cirrhotic portal hypertension in rats through inhibition of mTORC1 but not mTORC2. *PLoS One.* 2014 ;9:e83908.
- Wasmuth HE, Tacke F, Trautwein C. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis.* 2010; 30: 215-25.
- Waynforth H B, Flecknell P A. Experimental and surgical technique in the rat. *Elsevier.* 2004.
- Webster D, Bignell AH, Attwood EC. An assessment of the suitability of bromocresol green for the determination of serum albumin. *Clin Chim Acta.* 1974: 101-8.
- Wells RG. The portal fibroblast: not just a poor man's stellate cell. *Gastroenterology.* 2014;147:41-7.
- Wernersson S, Pejler G Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat Rev Immunol.* 2014;14:478-94.
- Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, Kremers W, Lake J, Howard T, Merion RM, Wolfe RA, Krom R; United Network for Organ Sharing Liver Disease Severity Score Committee. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology.* 2003; 124:91-6.
- Wight TN, Kinsella MG, Evanko SP, Potter-Perigo S, Merrilees MJ. Versican and the regulation of cell phenotype in disease. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840:2441-51.
- Wiig H, Swartz MA. Interstitial fluid and lymph formation and transport: physiological regulation and roles in inflammation and cancer. *Physiol Rev.* 2012; 92:1005-60.
- Winau F, Quack C, Darmoise A, Kaufmann SH. Starring stellate cells in liver immunology. *Curr Opin Immunol.* 2008; 20: 68-74.
- Winkler S, Borkham-Kamphorst E, Stock P, Brückner S, Dollinger M, Weiskirchen R<sup>6</sup>, Christ B Human mesenchymal stem cells towards non-alcoholic

## BIBLIOGRAFÍA

---

- steatohepatitis in an immunodeficient mouse model. *Exp Cell Res.* 2014; 326:230-9.
- Witek RP, Yang L, Liu R, Jung Y, Omenetti A, Syn WK, Choi SS, Cheong Y, Fearing CM, Agboola KM, Chen W, Diehl AM. Liver cell-derived microparticles activate hedgehog signaling and alter gene expression in hepatic endothelial cells. *Gastroenterology.* 2009; 136:320-330.e2.
- Woolf GM, Vierling JM. Disappearing intrahepatic bile ducts: the syndromes and their mechanisms. *Semin Liver Dis* 1993;13:261-75.
- Wu X B, Tao R. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2012; 11:360-371.
- Wu XB, Tao R. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2012;11:360-71.
- Wynn TA, Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis.* 2010; 30:2 45-57.
- Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012;18:1028-40.
- Xia X, Francis H, Glaser S, Alpini G, LeSage G. Bile acid interactions with cholangiocytes. *World J Gastroenterol* 2006;12:3553-63.
- Xu J, Liu X, Koyama Y, Wang P, Lan T, Kim IG, Kim IH, Ma HY, Kisseleva T. The types of hepatic myofibroblasts contributing to liver fibrosis of different etiologies. *Front Pharmacol.* 2014;5:167.
- Yagi R, Zhu J, Paul WE. An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. *Int Immunol.* 2011; 23: 415-20.
- Yamamoto Y, Banas A, Murata S, Ishikawa M, Lim CR, Teratani T, Hatada I, Matsubara K, Kato T, Ochiya T. A comparative analysis of the transcriptome and signal pathways in hepatic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells. *FEBS J.* 2008; 275: 1260-73.
- Yamane H, Paul WE. Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunol Rev.* 2013;252:12-23.
- Yamashiro T, Watanabe N, Yokoyama KK, Koga C, Tsuruo T, Kobayashi Y. Requirement of expression of P-glycoprotein on human natural killer leukemia cells for cell-mediated cytotoxicity. *Biochem Pharmacol.* 1998;55:1385-90.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Yamazaki S, Miki K, Hasegawa K, Sata M, Takayama T, Makuuchi M. Sera from liver failure patients and a demethylating agent stimulate transdifferentiation of murine bone marrow cells into hepatocytes in coculture with nonparenchymal liver cells. *J Hepatol.* 2003;39:17-23.
- Yang W, Benjamin IS, Moore K, Portmann B, Alexander B. The action of nitric oxide on hepatic haemodynamics during secondary biliary cirrhosis in the rat. *Eur J Pharmacol* 2003;461:41-8.
- Yang YY, Hsieh SL, Lee PC, Yeh YC, Lee KC, Hsieh YC, Wang YW, Lee TY, Huang YH, Chan CC, Lin HC. Long-term cannabinoid type 2 receptor agonist therapy decreases bacterial translocation in rats with cirrhosis and ascites. *J Hepatol.* 2014;61:1004-13.
- Yang JX, Zhang N, Wang HW, Gao P, Yang QP, Wen QP. CXCR4 receptor overexpression in mesenchymal stem cells facilitates treatment of acute lung injury in rats. *J Biol Chem.* 2015;290:1994-2006.
- Yin C, Evason KJ, Asahina K, Stainier DY. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *J Clin Invest.* 2013;123:1902-10.
- Yin L, Zhu Y, Yang J, Ni Y, Zhou Z, Chen Y, Wen L. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiated into hepatocyte-like cells in vivo and in vitro. *Mol Med Rep.* 2015; 11:1722-32.
- Yu B, He ZY, You P, Han QW, Xiang D, Chen F, Wang MJ, Liu CC, Lin XW, Borjigin U, Zi XY, Li JX, Zhu HY, Li WL, Han CS, Wangenstein KJ, Shi Y, Hui LJ, Wang X, Hu YP. Reprogramming fibroblasts into bipotential hepatic stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell.* 2013; 5;13:328-40.
- Zamora Nava LE, Aguirre Valadez J, Chávez-Tapia NC, Torre A. Acute-on-chronic liver failure: a review. *Ther Clin Risk Manag.* 2014;10:295-303.
- Zandieh A, Payabvash S, Pasalar P, Morteza A, Zandieh B, Tavangar SM, Dehpour AR. Gadolinium chloride, a Kupffer cell inhibitor, attenuates hepatic injury in a rat model of chronic cholestasis. *Hum Exp Toxicol.* 2011; 30: 1804-10.
- Zavadil J, Böttinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005;24:5764-74.
- Zhan L, Huang C, Meng X, Song Y, Wu XQ, Yang Y, Li J. Hypoxia-inducible factor-1alpha in hepatic fibrosis: A promising therapeutic target. *Biochimie.* 2015;108C:1-7.
- Zhang J, Zhou S, Zhou Y, Feng F, Wang Q, Zhu X, Ai H, Huang X, Zhang X. Hepatocyte growth factor gene-modified adipose-derived mesenchymal

## BIBLIOGRAFÍA

---

- stem cells ameliorate radiation induced liver damage in a rat model. *PLoS One*. 2014;9:e114670.
- Zheng GP, Ge MH, Shu Q, Rojas M, Xu J. Mesenchymal stem cells in the treatment of pediatric diseases. *World J Pediatr*. 2013; 9:197-211.
- Zheng YB, Gao ZL, Xie C, Zhu HP, Peng L, Chen JH, Chong YT. Characterization and hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic fluid and human bone marrow: a comparative study. *Cell Biol Int*. 2008;32:1439-48.
- Zhou D, Lin Z, Kong L, Li J. Phenotype transition of monocytes and liver injury. *Liver Int*. 2013;33:145.
- Zhou Q, Li L, Li J. Stem cells with decellularized liver scaffolds in liver regeneration and their potential clinical applications. *Liver Int*. 2014;. [Epub ahead of print].
- Zimmermann A, Zhao D, Reichen J. Myofibroblasts in the cirrhotic rat liver reflect hepatic remodeling and correlate with fibrosis and sinusoidal capillarization. *J Hepatol* 1999;30:646-52.
- Zimmermann HW, Seidler S, Nattermann J, Gassler N, Hellerbrand C, Zerneck A, Tischendorf JJ, Luedde T, Weiskirchen R, Trautwein C, Tacke F. Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14CD16 monocytes to inflammation and human liver fibrosis. *PLoS One*. 2010; 5:e11049.
- Zitka O, Kukacka J, Krizkova S, Huska D, Adam V, Masarik M, Prusa R, Kizek R. Matrix metalloproteinases. *Curr Med Chem*. 2010; 17: 3751-68.
- Zollner G, Wagner M, Fickert P, Geier A, Fuchsbichler A, Silbert D, Gumhold J, Zatloukal K, Kaser A, Tilg H, Denk H, Trauner M. Role of nuclear receptors and hepatocyte-enriched transcription factors for Ntcp repression in biliary obstruction in mouse liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289:G798-805.
- Zong Y, Panikkar A, Xu J, Antoniou A, Raynaud P, Lemaigre F, Stanger BZ. Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. *Development*. 2009; 136:1727-39.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001; 211-28.

***ANEXOS***



## Anexo

ÍNDICE ANEXO	Pag.
<b>ANEXO 1; COMUNICACIONES A CONGRESOS</b> .....	229
<b>ANEXO 2: TABLAS</b> .....	231
<b>I. Tabla 6: Volumen de líquido ascítico</b> .....	231
<b>II. Tabla 7: Circulación colateral portosistémica</b> .....	231
<b>III. Tabla 8: Vasculopatía venosa mesentérica</b> .....	232
<b>IV. Tabla 9: Peso corporal inicial (PCI;g), peso corporal final (PCF;g),         e incremento de peso corporal (<math>\Delta</math>peso; g)</b> .....	232
<b>V. Tabla 10: Peso hepático (PH;g), Relación peso hepático /         peso corporal x100 (PH/PC; %)</b> .....	233
<b>VI. Tabla 12: Peso esplénico (PE;g) y Relación peso esplénico /         peso corporal x 100 (PE/PC; %)</b> .....	233
<b>VII. Tabla 13: Peso testicular bilateral (PT;g) y Relación peso testicular /         peso corporal x 100 (PT/PC; %)</b> .....	234
<b>VIII. Tabla 14: Concentraciones séricas de Bilirrubina Total (BT; mg/dl)         y Bilirrubina Directa (BD; mg/dl), relación Bilirrubina Directa         respecto a Bilirrubina Total (BD/BTx100), AST (U/L), ALT (U/L),         FA(U/L) yGGT (U/L)</b> .....	235
<b>IX. Tabla 15: Concentraciones séricas de AST (U/L), ALT (U/L),         FA(U/L) y GGT(U/L)</b> .....	235
<b>X. Tabla 16: Concentraciones séricas de Urea (mg/dl), Creatinina         (Cr; mg/dl), Albúmina (Alb; g/dl) y Proteínas Totales(PT;g/dl)</b> .....	236
<b>XI. Tabla 17: Tiempo de Protrombina (TProt; seg), Actividad de         Protrombina (ActProt; %), Fibrinógeno (F; mg/dl), International         Normalized Ratio (INR), Tiempo de Cefalina (TCefal; seg)         Ratio de Tiempo de Cefalina (RatTCefal)</b> .....	237
<b>XII. Tabla 18: Determinación del “Model forend-stage Liver Disease” (MELD)</b>	237

- XIII. Tabla 19:** Puntuaciones asignadas a las diferentes variables  
*histopatológicas evaluadas en los hígados de ratas del grupo CMS  
(Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino)... 238*
- XIV. Tabla 20:** Puntuaciones asignadas a las diferentes variables  
*histopatológicas evaluadas en los hígados de ratas del grupo  
CCHP (Colestasis microquirúrgica con administración de células  
madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos)..... 239*
- XV. Tabla 21:** Puntuaciones asignadas a las diferentes variables  
*histopatológicas evaluadas en los hígados de ratas del grupo  
CRND (Colestasis microquirúrgica con administración de células  
madre adipocíticas de rata no diferenciadas)..... 241*
- XVI. Tabla 22:** Puntuaciones asignadas a las diferentes variables  
*histopatológicas evaluadas en los hígados de ratas del grupo  
CRPD (Colestasis microquirúrgica con administración de células  
madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos)..... 244*

### ANEXO I; COMUNICACIONES A CONGRESOS:

1. **AUTORES:** ARGUDO S, ALLER MA, DE MIGUEL MP, PRIETO I, FUENTES S, BLÁZQUEZ A, **GILSANZ C**, ALONSO A.

**TITULO:** “Resultados histopatológicos de la terapia experimental con células madre pre diferenciadas a hepatocito en un modelo de insuficiencia hepática secundario a colestasis extrahepática en ratas”

**TIPO DE PARTICIPACIÓN:** Comunicación Oral. PREMIO a la mejor Comunicación por Investigadores Jóvenes.

**CONGRESO:** XX Congreso de la Sociedad Española de Investigaciones Quirúrgicas

**LUGAR DE CELEBRACIÓN:** Albacete

**AÑO:** Octubre, 23-24, 2014.

XX Congreso  
Sociedad Española de Investigaciones Quirúrgicas

23-24 octubre de 2014  
Albacete

Premio Beca de Jóvenes

**“RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS DE LA TERAPIA EXPERIMENTAL CON CÉLULAS MADRE PRE DIFERENCIADAS A HEPATOCITO EN UN MODELO DE INSUFICIENCIA HEPÁTICA SECUNDARIO A COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA EN RATAS”**

presentado durante el XX Congreso de la Sociedad Española de Investigaciones Quirúrgicas celebrado en Albacete del 23 al 24 de Octubre de 2014

por los autores:

*Argudo Garijo Salvador; Aller Reyero María Ángeles; De Miguel González María Paz; Prieto Nieto Isabel; Fuentes Julián Sherezade; Blázquez Martínez Alejandro; Gilsanz Martín Carlos; Alonso-Poza Alfredo*

*Virveda*  
Julio Antonio Virseda  
Presidente del XX Congreso de la SEIQ

**2. AUTORES:** ARGUDO S, ALLER MA, DE MIGUEL MP, PRIETO I, ARIAS J, GILSANZ C, ALONSO A.

**TÍTULO:** “Terapia con células madre de origen mesenquimal en in modelo experimental de insuficiencia hepática”

**TIPO DE PARTICIPACIÓN:** Comunicación Oral.

**CONGRESO:** XXX Congreso Nacional de Cirugía de la Asociación Española de Cirujanos.

**LUGAR DE CELEBRACIÓN:** Madrid.

**AÑO:** Noviembre, 10-13, 2014.





## TERAPIA CON CÉLULAS MADRE DE ORIGEN MESENQUIMAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE INSUFICIENCIA HEPÁTICA

S. Argudo Garjón<sup>1</sup>, M.Á. Aller Reyero<sup>2</sup>, M.P. de Miguel González<sup>3</sup>, I. Prieto Nieto<sup>3</sup>, J. Arias Pérez<sup>2</sup>, C. Gilsanz Martín<sup>1</sup> y A. Alonso Poza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hospital Universitario del Sureste, Arganda del Rey. <sup>2</sup>Facultad de Medicina UCM, Madrid. <sup>3</sup>Hospital Universitario La Paz, Madrid.

### Resumen

**Objetivos:** Desarrollar un estudio experimental obteniendo un modelo de insuficiencia hepática mediante la realización colestasis extrahepática microquirúrgica en ratas, aplicando posteriormente una terapia mediante la administración intraparenquimatosa de células madre mesenquimales de origen adipocítico humano.

**Métodos:** Se realizó la colestasis microquirúrgica en 76 ratas Wistar, que se dividieron en 5 grupos: 1 grupo control (n = 6) que se sacrificaba a las 2 semanas de post-operatorio (C-2s); 2 grupos a los que se administraba de forma intraparenquimatosa bien suero salino (CS-5s; n = 12) o células madre mesenquimales (CCM-5s; n = 15) a las 2 semanas de post-operatorio y se sacrificaban a las 5 semanas de evolución y, por último, otros 2 grupos constituidos por ratas a las que se administraban suero salino (CS-8s; n = 15) o células madre mesenquimales (CCM-8s; n = 28) a las 2 semanas del post-operatorio y se sacrificaban a las 8 semanas de evolución. En todos los animales se realizaba necropsia en el momento del sacrificio, junto con estudio serológico e histopatológico de muestras hepáticas. Se realizó examen con microscopio de fluorescencia para detectar células madre previamente marcadas.

**Resultados:** La supervivencia fue del 100% en el grupo C-2s, 91,7% en CS-5s, 73,3% en CCM-5s, 46,6% en el grupo CS-8s y del 39,2% en CCM-8s. En relación a la ascitis, los grupos CS-8s y CCM-8s presentaron un incremento significativo de ascitis ( $p < 0,05$ ) respecto del resto de grupos. No se apreciaron diferencias significativas entre grupos en relación a la presencia de circulación colateral y vasculopatía venosa mesentérica. Hubo un incremento significativo del peso corporal en los grupos CS-8s y CCM-8s respecto a los grupos C-2s ( $p < 0,01$ ) y CCM-5s ( $p < 0,05$ ). En cuanto a la relación peso hepático/peso corporal, hubo un aumento significativo en el grupo CS-8s respecto al resto de los grupos estudiados ( $p < 0,001$ ). El grupo C-2s presentó un descenso significativo de la relación peso esplénico/peso corporal respecto del resto de grupos ( $p < 0,05$ ). En el grupo de ratas CS-8s hubo un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) de la relación peso testicular/peso corporal respecto al grupo C-2s. Se apreció una mejoría no significativa en las concentraciones séricas de bilirrubina, gamma-glutamiltanspeptidas, proteínas totales y albúmina en el grupo CCM-8s respecto a CS-8s. Con el microscopio de inmunofluorescencia se demostró la presencia de células madre en los grupos CCM-5s y CCM-8s. En relación a la histología hepática, se ha demostrado un incremento significativo en el área del porcentaje de fibrosis ( $p < 0,05$ ) y proliferación biliar ( $p < 0,05$ ), así como un descenso significativo ( $p < 0,01$ ) en el área de hepatocitos en el grupo de ratas CS-8s respecto de los grupos CS-5s y CCM-5s.

**Conclusiones:** El tratamiento con células madre de origen mesenquimal adipocítico y prediferenciadas in vitro a hepatocitos podría ser de utilidad para reducir las complicaciones secundarias a las hepatopatías crónicas de origen biliar en el ser humano.

ANEXO II; TABLAS:

**Tabla 6. Volumen de líquido ascítico.** **CM-S:** Colestasis con administración de suero salino. **CCRND:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas. **CCHP:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos. **CCRP:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos

GRUPO	ASCITIS (ml)
I CM-S (n=20)	4,26 ± 3,5
II (CCRND) (n=47)	2,44 ± 1,91
III (CCHP) (n=38)	2,53 ± 1,88
IV CCRP (n=30)	2,2 ± 2,46

Media ± DE

**Tabla 7. Circulación colateral portosistémica en ratas con colestasis microquirúrgica:** Areas paraesofágica (CPE), esplenorrenal (CER), y pararrectal (CPR). **SO:** Seudo-operadas. **CM-S:** Colestasis con administración de suero salino. **CCRND:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas. **CCHP:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos. **CCRP:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos

GRUPO	CPE		CER		CPR	
	n	%	n	%	n	%
I CM-S (n=20)	20	100	20	100	20	100
II (CCRND) (n=47)	47	100	47	100	47	100
III (CCHP) (n=38)	38	100	38	100	38	100
IV (CCRP) (n=30)	30	100	30	100	30	100

## ANEXOS

**Tabla 8. Vasculopatía venosa mesentérica:** grado 0 (ausente), grado I (secundaria al clampaje transitorio de la vena mesentérica superior) y grado II (espontánea). **CM-S:** Colestasis con administración de suero salino. **CCRND:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas. **CCHP:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos. **CCRP:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos.

GRUPO	GRADO 0		GRADO I		GRADO II	
	n	%	n	%	n	%
<b>CM-S</b> (n=20)	0	0	20	100	0	0
<b>CCRND</b> (n=47)	0	0	47	100	0	0
<b>CCHP</b> (n=38)	0	0	38	100	0	0
<b>CCRP</b> (n=30)	0	0	30	100	0	0

**Tabla 9. Peso corporal inicial (PCI;g), peso corporal final (PCF;g), e incremento de peso corporal ( $\Delta$  peso; g) en las ratas de los grupos de estudio.** **SO:** Seudo-operadas. **CM-S:** Colestasis con administración de suero salino. **CCRND:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas. **CCHP:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos. **CCRP:** Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos

GRUPO	PCI (g)	PCF (g)	$\Delta$ PC (g)
<b>C</b> <b>SO</b> (n=20)	292,13 ± 33,3	360 ± 10	86 <sup>000</sup> ; ** ± 23
<b>I</b> <b>CM-S</b> (n=20)	287,9 ± 41,57	315,25 <sup>●</sup> ± 44,39	32,39 <sup>00</sup> ± 26,17
<b>II</b> <b>CCRND</b> (n=47)	269,17 ± 50,23	322,08 ± 48,39	53,04 <sup>00</sup> ± 22,22
<b>III</b> <b>CCHP</b> (n=38)	326,47 <sup>♣♣</sup> ± 70,37	281,87 <sup>●●</sup> ± 42	-37,8 ± 22,73
<b>IV</b> <b>CCRP</b> (n=30)	311,87 <sup>♣</sup> ± 26,58	365,6 ± 35,39	56,05 <sup>00</sup> ± 35,98

## ANEXOS

Media  $\pm$  DE\*\*p<0.01: Valor estadísticamente significativo respecto de CM-S; ♣p<0.05; ♣♣ p<0,01: Valor estadísticamente significativo respecto de CCRND; ●p<0.05; ●●p<0.01: Valor estadísticamente significativo respecto de CCRP; <sup>oo</sup>p<0.01; <sup>ooo</sup>p<0.001: Valor estadísticamente significativo respecto de CCHP.

**Tabla 10. Peso hepático (PH;g), Relación peso hepático / peso corporal x 100 (PH/PC; %)** SO: Seudo-operadas **CM-S**: Colestasis con administración de suero salino. **CCRND**: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas. **CCHP**: Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos. **CCRP**: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos.

GRUPO	PH (g)	PH/PC x100
SO (n=20)	10,58*** $\pm$ 0,22	3,02*** $\pm$ 0,10
I CM-S (n=20)	23♦♦♦ $\pm$ 3,09	7,39♦♦♦ $\pm$ 1,18
II (CCRND) (n=47)	18,07♦♦ $\pm$ 4,99	5,67♦♦* $\pm$ 1,56
III (CCHP) (n=38)	17,03♦* $\pm$ 4,1	6,14♦♦♦ $\pm$ 1,78
IV CCRP (n=30)	19,28♦♦ $\pm$ 4,99	5,27♦♦* $\pm$ 1,25

Media  $\pm$  DE:♦p<0.05;♦♦p<0.01;♦♦♦p<0.001:Valor estadísticamente significativo respecto de SO;

\*p<0.05; \*\*\*p<0,001: Valor estadísticamente significativo respecto de CM-S.

**Tabla 12. Peso esplénico (PE;g) y Relación peso esplénico / peso corporal x 100 (PE/PC; %) en las ratas de los diferentes grupos de estudio:** SO: Seudo-operadas **CM-S**: Colestasis con administración de suero salino. **CCRND**: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas. **CCHP**: Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos. **CCRP**: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos.

## ANEXOS

GRUPO	PE	PE/PC (%)
<b>C</b> <b>SO</b> (n=20)	0,58 ± 0,01	0,15 ± 0,005
<b>I</b> <b>CM-S</b> (n=20)	1,70♦♦♦ ± 0,29	0,55♦♦♦ ± 0,11
<b>II</b> <b>(CCRND)</b> (n=47)	1,44♦♦♦ ± 0,23	0,45♦♦♦ ± 0,09
<b>III</b> <b>(CCHP)</b> (n=38)	1,28*♦♦♦ ± 0,58	0,46♦♦♦ ± 0,22
<b>IV</b> <b>CCRP</b> (n=30)	1,35♦♦♦ ± 0,3	0,37*♦♦ ± 0,08

Media ± DE; ♦♦p<0.01; ♦♦♦p<0.001: Valor estadísticamente significativo respecto de SO; \*p<0.05; Valor estadísticamente significativo respecto de CM-S.

**Tabla 13. Peso testicular bilateral (PT;g) y Relación peso testicular / peso corporal x 100 (PT/PC; %) en las ratas de los diferentes grupos de estudio: SO: Seudo-operadas CM-S: Colestasis con administración de suero salino. CCRND: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas. CCHP: Colestasis con administración de células madre humanas adipocíticas prediferenciadas a hepatocitos. CCRP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos**

GRUPO	PT	PT/PC (%)
<b>C</b> <b>SO</b> (n=20)	2,83 ± 0,04	0,78 ± 0,02
<b>I</b> <b>CM-S</b> (n=20)	1,6♦ ± 0,74	0,52 ± 0,27
<b>II</b> <b>(CCRND)</b> (n=47)	2,31 ± 0,7	0,72 ± 0,21
<b>III</b> <b>(CCHP)</b> (n=38)	1,65♦ ± 0,2	0,6 ± 0,37
<b>IV</b> <b>CCRP</b> (n=30)	3,24*** ± 0,58	0,89* ± 0,13

## ANEXOS

Media  $\pm$  DE;  $\blacklozenge p < 0.05$ : Valor estadísticamente significativo respecto de SO;  
 $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.001$ : Valor estadísticamente significativo respecto de CM-S.

**Tabla 14. Concentraciones séricas de Bilirrubina Total (BT; mg/dl) y Bilirrubina Directa (BD; mg/dl), relación Bilirrubina Directa respecto a Bilirrubina Total (BD/BTx100), AST (U/L), ALT (U/L), FA(U/L) y GGT ((U/L) en ratas con colestasis microquirúrgica. SO: pseudo-operadas; CM-S: Colestasis con administración de suero salino CCRND: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas. CCHP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos CCRP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos.**

GRUPO	BT (mg/dl)	BD (mg/dl)	BD/BT x100
SO (n=20)	0,09 $\pm$ 0,05	0,01 $\pm$ 0,01	-
CM-S (n=20)	8,57 $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$ $\pm$ 3,15	3,87 $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$ $\pm$ 1,68	45,84 $\pm$ 15,55
CCRND (n=47)	8,25 $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$ $\pm$ 2,19	4,96 $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$ $\pm$ 1,24	60,56 $***$ $\pm$ 5,45
CCHP (n=38)	8,19 $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$ $\pm$ 1,44	4,69 $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$ $\pm$ 1,18	56,95 $**$ $\pm$ 8,13
CCRP (n=30)	7,93 $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$ $\pm$ 1,88	4,78 $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge$ $\pm$ 1,03	58,03 $**$ $\pm$ 4,85

Media $\pm$ DE;  $\blacklozenge\blacklozenge\blacklozenge p < 0,001$ : Valor estadísticamente significativo respecto de SO;  
 $**p < 0.01$ ;  $***p < 0,001$ : Valor estadísticamente significativo respecto de CM-S.

**Tabla 15. Concentraciones séricas de AST (U/L), ALT (U/L), FA(U/L) y GGT ((U/L) en las ratas de los diferentes grupos de estudio: SO: pseudo-operadas; CM-S: Colestasis con administración de suero salino CCRND: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas. CCHP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos CCRP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos.**

## ANEXOS

GRUPO	AST (U/L)	ALT (U/L)	FA (U/L)	GGT (U/L)
SO (n=20)	146,6** ± 77,31	53,5 ± 29,77	112,34 ± 34,12	1 ± 0
CM-S (n=20)	252,33 ± 96,67	40,25 ± 12,77	37,37♣ ± 31,73	38,91♦♦♦ ± 23,46
CCRND (n=47)	209,82 ± 67,28	34,35♦♦ ± 7,42	182,04 ± 170,67	42,38♦♦♦ ± 21,68
CCHP (n=38)	154,66** ± 45,91	26**♦♦♦ ± 8,22	25,79♣♣ ± 12,84	33,91♦♦ ± 23,37
CCRP (n=30)	196 ± 35,89	32,73♦♦ ± 7,08	54,15♣ ± 31,14	26,66♦♦ ± 14,9

Media±DE;♦♦p<0,01;♦♦♦p<0,001: Valor estadísticamente significativo respecto de SO.;  
\*\*p<0.01;\*\*\*p<0,001: Valor estadísticamente significativo respecto de CM-S;  
♣p<0.5,♣♣p<0.01: Valor estadísticamente significativo respecto de CCRND.

**Tabla 16. Concentraciones séricas de Urea (mg/dl), Creatinina (Cr; mg/dl), Albúmina (Alb; g/dl) y Proteínas Totales (PT; g/dl) en las ratas de los diferentes grupos de estudio: SO: pseudo-operadas; CM-S: Colestasis con administración de suero salino CCRND: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas CCHP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos. CCRP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos**

GRUPO	Urea (mg/dl)	Cr (mg/dl)	Alb (g/dl)	PT (g/dl)
SO (n=20)	-	0,56 ± 0,04	3,02*** ± 0,14	5,97*** ± 0,38
CM-S (n=20)	37,02♣ ± 5,91	0,55 ± 0,07	1,61 ± 0,38	4,33 ± 1,38
CCRND (n=47)	34,47♣ ± 13,21	0,5♣♣ ± 0,05	1,84 ± 0,52	5,08* ± 0,94
CCHP (n=38)	51,59 ± 21,96	0,57 ± 0,06	2,07* ± 0,46	5,41** ± 0,74
CCRP (n=30)	36,62♣ ± 6,33	0,51♣ ± 0,03	2,12* ± 0,44	5,73*** ± 0,46

## ANEXOS

Media±DE; \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0,001: Valor estadísticamente significativo respecto de CM-S; ♠p<0.5, ♣♣p<0.01: Valor estadísticamente significativo respecto de CCHP.

**Tabla 17. Tiempo de Protrombina (TProt; seg), Actividad de Protrombina (ActProt; %), Fibrinógeno (F; mg/dl), International Normalized Ratio (INR), Tiempo de Cefalina (TCefal; seg) y Ratio de Tiempo de Cefalina (RatT), en los diferentes grupos de estudio: SO: pseudo-operada. CM-S: Colestasis con administración de suero salino CCRND: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas CCHP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos. CCRP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos.**

GRUPO	TProt (seg)	ActProt r( %)	F (mg/dl)	INR	T Cefal (seg)	Rat T Cef
SO (n=20)	12,17 ± 0,57	79,75* ± 2,22	11,25 ± 21,73	1,75*** ± 0,09	44,57*** ± 9,19	1,59*** ± 0,46
CM-S (n=20)	9,75 ± 0,49	117 ± 2,82	184,5 ± 3,53	2,05 ± 0,21	15,7 ± 1,41	0,55 ± 0,07
CCRND (n=47)	14,22 ± 2,75	74,9* ± 24,99	200,4♦ ± 70,59	1,25*** ± 0,25	30,13 ± 9,01	1,11*♦ ± 0,34
CCRP (n=30)	13,28 ± 2,89	80,57* ± 26,8	190,07 ± 50,30	1,19*** ± 0,24	22,35 ± 5,49	0,82♦♦♦ ± 0,2

Media ± DE: ♦p<0.05; ♦♦♦p<0.001: Valor estadísticamente significativo respecto de SO; \*p<0.05; \*\*\*p<0,001: Valor estadísticamente significativo respecto de CM-S

**Tabla 18. Determinación del “Model forend-stage Liver Disease”(MELD) en los diferentes grupos de estudio: SO: Seudooperadas CCRND: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas. CCRP: Colestasis con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos.**

GRUPO	MELD
SO (n=4)	12,71 ± 0,81
CCRND (n=47)	7,8** ± 2,64
CCRP (n=30)	7,71** ± 2,6

## ANEXOS

Media±DE; \*\*p<0,01: Valor estadísticamente significativo respecto de SO.

**Tabla 19.** Puntuaciones asignadas a las diferentes variables histopatológicas evaluadas en los hígados de ratas del grupo **CMS** (Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino).

RATA	CHRR50		CHRR51		CHRR52		CHRR53		CHRR54	
	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
Colestasis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nódulos Regeneración	++	-	+	-	-	-	+	+	+	-
Proliferación Ductal	++	+++	++	++	++	++	+	+	++	++
Binucleación	++	+	+	+	+	+	+	++	++	++
Infiltrado Inflamatorio	++	+	++	+++	+++	+++	+	+	++	+
Necrosis	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Trombosis	++	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Fibrosis	++	-	+	-	-	-	+	+	+	-
Peliosis	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Dilatación V. centrolobulillar	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
Estructura	R	M	M	M	M	M	R/B	R/B	R	R
Congestión	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Función	R	M	M	M	M	M	R/B	R/B	R	R
TOTAL	17	12	15	14	15	15	11	10	13	10

RATA	CHRR55		CHRR64		CHR68		CHR69		CHR70	
	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
Colestasis	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+
Nódulos Regeneración	-	-	-	-	-	-	+++	+	++	+
Proliferación Ductal	+	++	++	+	++	++	+++	+++	++	+++
Binucleación	+	++	++	+	+	+	+++	++	++	+++
Infiltrado Inflamatorio	+	+	+	+	+	++	++	++	+	++
Necrosis	+	++	++	-	-	-	-	-	-	SUP
Trombosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## ANEXOS

Fibrosis	+	-	+	-	+	+	++	++	++	++
Peliosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dilatación V.centrolobulillar	-	-	-	-	++	+	+	++	++	+
Estructura	R/B	R/M	R	B	B	B	M	M	M	M
Congestión	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Función	R/B	R/M	R	B	R	B	R/M	R/M	R/M	R/M
TOTAL	9	14	13	6	11	10	21	18	17	18

RATA	CHR72		CHR74		CHR76		CHR78	
	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
COLESTASIS	+	+	+	+	+	+	+	+
Nódulos Regeneración	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+++
Proliferación Ductal	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Binucleación	+++	+++	++	++	++	++	++	+
Infiltrado Inflamatorio	+	+	++	+	++	+	++	+
Necrosis	-	-	-	-	-	-	-	-
Trombosis	-	-	-	-	-	-	-	-
Fibrosis	+++	+++	++	+	++	++	+++	+++
Peliosis	++	++	++	++	+	+	+	+
Dilatación V. centrolobulillar	+	+	++	+	+	++	+	+
Estructura	M	M	M	M	M	M	M	M
Congestión	-	-	-	-	-	-	-	-
Función	M	M	M	M	M	M	M	M
TOTAL	23	23	22	20	20	20	21	20

Mejor puntuación = 2; Buena < 5; Intermedia-buena 5-12; Intermedia-mala 13-19; Mala > 20; Peor puntuación = 39

**Tabla 20.** Puntuaciones asignadas a las diferentes variables histopatológicas evaluadas en los hígados de ratas del grupo **CCHP** (Colestasis microquirúrgica con administración de células madre adipocíticas humanas prediferenciadas a hepatocitos).

## ANEXOS

RATA	CHR125		CHR130		CHR132		CHR134		CHR141	
	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
Colestasis	-	-	+	+	+	+	++	+	+	+
Nódulos Regeneración	-	-	+	-	+	++	+	++	+	
Proliferación Ductal	+++	+++	++	+++	++	+	+++	+++	++	++
Binucleación	+++	+++	+++	++	++	+	++	+++	+	+
Infiltrado Inflamatorio	+	+	+++	++	+++	+++	+	++	++	++
Necrosis	+	-	++		++	-	-	-	+	-
Trombosis	-	-	+++	++	-	-	-	-	-	-
Fibrosis	+++	+++	++	++	++	+	++	++	+	+
Peliosis	-	++	++	-	-	-	++	-	+	-
Dilatación V. centrolobulillar	-	-	++	-	+	-	+	+	-	-
Estructura	M	M	R	M	M	R/B	M	M	R/M	R/M
Congestión	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Función	M	M	M	M	M	B	M	M	R/M	R/M
TOTAL	17	18	26	18	21	12	20	20	15	12

RATA	CHR142		CHR144		CHR145		CHR148		CHR149	
	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
Colestasis	++	++	++	+	++	++	++	+	++	+
Nódulos Regeneración	+	-	++	+	+	+	++	++	+	-
Proliferación Ductal	++	+++	+++	+++	++	++	+++	++	+++	+++
Binucleación	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Infiltrado Inflamatorio	++	++	++	++	++	+	++	+	++	++
Necrosis	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Trombosis	-	-	+	-	-	-	+	-	++	
Fibrosis	++	+	+++	++	++	+	++	-	+++	++
Peliosis	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
Dilatación V. centrolobulillar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estructura	R	M	M	M	R/M	R	M	R/M	M	M
Congestión	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Función	R	M	M	M	R/M	R	M	R/M	M	M

## ANEXOS

TOTAL	15	15	21	16	17	12	12	20	20	15
-------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

RATA	CHR150		CHR152		CHR153		CHR154		CHR155	
LOBULO	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
Colestasis	+	++	-	+	+	+	+	+	+	+
Nódulos Regeneración	-	-	-	-	+	++	++	+	+	
Proliferación Ductal	+	++	-	+	+++	+++	+	+	++	+++
Binucleación	+	++	-	+	+	-	++	++	++	+
Infiltrado Inflamatorio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++
Necrosis	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-
Trombosis	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-
Fibrosis	+	-	+	+	+	+	++	+	+	+
Peliosis	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Dilatación V.centrolobulillar	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Estructura	R/B	R/M	B	B	M	M	B	B	R/B	R
Congestión	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Función	R/B	R/M	B	R/B	M	M	R/B	R/B	R/B	M
TOTAL	9	14	4	7-8	17	16	12	9-10	11	13

Mejor puntuación = 2; Buena < 5; Intermedia-buena 5-12; Intermedia-mala 13-19; Mala > 20; Peor puntuación = 39

**Tabla 21.** Puntuaciones asignadas a las diferentes variables histopatológicas evaluadas en los hígados de ratas del grupo **CRND** (Colestasis microquirúrgica con administración de células madre adipocíticas de rata no diferenciadas).

RATA	CHRR1		CHRR6		CHRR7		CHRR8		CHRR9	
LOBULO	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
Colestasis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nódulos Regeneración	+	++	-	-	-	+	-	+	+	
Proliferación Ductal	++	++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++
Binucleación	++	+	+	++	++	-	+	++	++	+
Infiltrado Inflamatorio	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+

## ANEXOS

Necrosis	-	-	-	-	-	+	++	-	+	-
Trombosis	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Fibrosis	+	+	+	++	+	+	++	+	++	+
Peliosis	+	+	++	-	+	-	+	-	+	-
Dilatación V.centrolobulillar	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
Estructura	M	R	M	R	M	R/B	M	R/M	M	M
Congestión	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Función	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	15	12	16	12	15	11	17	13	21	13

RATA	CHRR13		CHRR14		CHRR15		CHRR16		CHRR18	
	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
Colestasis	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+
Nódulos Regeneración	+++	+++	-	+	++	++	-	+	+	-
Proliferación Ductal	++	++	+++	++	++	++	+++	++	+++	+++
Binucleación	++	++	+	+	+	+	+	+	++	+
Infiltrado Inflamatorio	+	++	+	++	++	++	+	++	+	+
Necrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Trombosis	+	-	+	++	-	-	+	++	+	-
Fibrosis	++	++	+	+++	++	++	+	+++	++	+
Peliosis	+	+	++	-	+	+	++	-	+	-
Dilatación V.centrolobulillar	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-
Estructura	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
Congestión	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Función	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	19	20	17	18	19	19	17	18	21	13

RATA	CHRR19		CHRR20		CHRR25		CHRR26		CHRR31	
	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
Colestasis	+	+	++	+	+	+	++	++	+	+
Nódulos Regeneración	++	+	++	+	-	-	++	-	+	-
Proliferación Ductal	++	++	++	++	+++	+++	+	+++	+++	+

## ANEXOS

Binucleación	+	+	++	++	+	+	++	+	+	+
Infiltrado Inflamatorio	+	+	+	+	+	++	+	++	++	-
Necrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trombosis	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Fibrosis	++	++	+	+	++	++	++	++	++	+
Peliosis	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Dilatación V.centrolobulillar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estructura	R	R	R	R	M	M	R	M	M	B
Congestión	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Función	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	13	13	16	13	15	16	15	17	17	6

RATA	CHRR32		CHRR56		CHRR57		CHRR58		CHRR60	
LOBULO	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
Colestasis	-	+	++	+	++	++	+	+	+	+
Nódulos Regeneración	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Proliferación Ductal	-	+++	+	+	-	-	+	+++	+++	+++
Binucleación	+	+	+	+	½	+	+	½	++	++
Infiltrado Inflamatorio.	+	+	++	++	++	+	+++	++	++	++
Necrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trombosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fibrosis	+	+	++	+	++	+	++	++	-	-
Peliosis	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Dilatación V.centrolobulillar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estructura	B	M	R/B	R/B	B	R/B	R	M	M	M
Congestión	-	-	-	-	+	?	-	-	-	-
Función	-	-	R/B	R/B	B	R/B	R	M	M	M
TOTAL	6	13	12	10	9,5	9	12	14,5	15	14

RATA	CHRR61		CHRR62		CHRR65		CHRR66		CHRR67	
LOBULO	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
Colestasis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

## ANEXOS

Nódulos Regeneración	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
Proliferación Ductal	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	+	++
Binucleación	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
Infiltrado Inflamatorio	+++	+++	++	+	+++	+++	++	++	++	++
Necrosis	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Trombosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fibrosis	+	++	+	-	++	+	+	++	++	
Peliosis	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Dilatación V.centrolobulillar	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estructura	M	M	M	M	R	M	M/R	R	R/B	R
Congestión	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Función	M	M	M	M	R	M	M	R	R/B	R/M
TOTAL	16	17	14	13	14	16	16,5	13	11	11,5

Mejor puntuación = 2; Buena < 5; Intermedia-buena 5-12; Intermedia-mala 13-19; Mala > 20; Peor puntuación = 39

**Tabla 22.** Puntuaciones asignadas a las diferentes variables histopatológicas evaluadas en los hígados de ratas del grupo **CRPD** (Colestasis microquirúrgica con administración de células madre adipocíticas de rata prediferenciadas a hepatocitos).

RATA	CHRR39		CHRR41		CHRR43		CHRR46		CHRR47	
	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
Colestasis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nódulos Regeneración	+	-	-	+	+	-	++	-	++	-
Proliferación Ductal	+++	+++	++	++	++	+++	++	++	+	-
Binucleación	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+
Infiltrado Inflamatorio	+	+	+	+	++	-	++	+	++	++
Necrosis	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Trombosis	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
Fibrosis	++	+	-	-	++	+	+	-	++	-
Peliosis	+	-	-	+	-	-	-		-	-
Dilatación V.centrolobulillar	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
Estructura	M	M	R	R/M	R	M	R/M	R	M	B

## ANEXOS

Congestión	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Función	M	M	R	R/M	R	M	R/M	R	M	B
TOTAL	18	15	9	13	15	12	17	10	16	6

RATA	CHRR48		CHRR49		CHRR68		CHRR69		CHRR70	
	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
Colestasis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nódulos Regeneración	+	++	+	-	+++	-	+	+	+	-
Proliferación Ductal	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++
Binucleación	-	+	++	++	+++	+++	+	+	++	++
Infiltrado Inflamatorio	++	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Necrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trombosis	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Fibrosis	+	+	+	-	+	-	+	++	+++	+++
Peliosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dilatación V.centrolobulillar	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
Estructura	M	R	R	R/B	R/M	R/M	M	M	R/M	M
Congestión	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Función	M	R	R	R/B	M	M	M	M	R/M	M
TOTAL	14	13	14	12	18,5	16,5	16	17	17	18

RATA	CHRR71		CHRR72		CHRR73		CHRR74		CHRR75	
	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
Colestasis	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Nódulos Regeneración	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Proliferación Ductal	++	+++	++	+++	+++	+++	-	+++	+	+
Binucleación	+	++	+	++	++	++	-	++	++	++
Infiltrado Inflamatorio	+++	++	++	+++	++	++	-	+++	++	++
Necrosis		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trombosis	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fibrosis	+	+	+	++	+++	++	-	++	+	-
Peliosis	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## ANEXOS

Dilatación V.centrolobulillar	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Estructura	R	R	R/B	R/M	M	M	-	R/M	B/R	B/R
Congestión	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Función	R/M	M	R	M	M	M	-	M	B	B
TOTAL	16,5	15	10,5	16,5	18	16	-	16,5	9,5	8,5

RATA	CHRR76		CHRR77		CHRR78		CHRR80		CHRR81	
LOBULO	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
Colestasis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nódulos Regeneración	-	-	+	+	-	-	-	-	+++	+++
Proliferación Ductal	+++	+++	+1/2	+1/2	++	++	+	+	++	++
Binucleación	++	++	+++	++	++	+++	++	++	++	++
Infiltrado Inflamatorio	+++	+	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++
Necrosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trombosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fibrosis	++	+	++	++	+	+	+	-	+++	++
Peliosis	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Dilatación V.centrolobulillar	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
Estructura	M	R/M	R/B	R/B	R	R/M	B/R	B/R	M	M
Congestión	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Función	M	M	R	R	R	R/M	B	B	M	M
TOTAL	18	13,5	17	15	13	15	9	8	20	20

Mejor puntuación = 2; Buena < 5; Intermedia-buena 5-12; Intermedia-mala 13-19; Mala > 20; Peor puntuación = 39

