

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

Terapia con células madre adipocíticas de origen mesenquimal en un modelo experimental de insuficiencia hepática secundaria a colestasis microquirúrgica extrahepático

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Salvador Argudo Garijo

Directores

M^a Ángeles Aller Reyero
María Paz de Miguel González
Isabel Prieto Nieto

Madrid, 2014

Universidad Complutense de Madrid



**Terapia con células madre adipocíticas de origen mesenquimal
en un modelo experimental de insuficiencia hepática
secundaria a colestasis microquirúrgica extrahepática**

TESIS DOCTORAL

Salvador Argudo Garijo

Madrid 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



**Terapia con células madre adipocíticas de origen mesenquimal en
un modelo experimental de insuficiencia hepática secundaria a
colestasis microquirúrgica extrahepática**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

SALVADOR ARGUDO GARIJO

Directores:

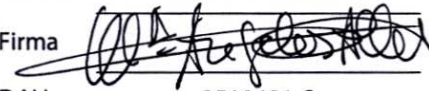
M^a Ángeles Aller Reyero
Maria Paz de Miguel González
Isabel Prieto Nieto

**TESIS DOCTORAL
MADRID 2013**

INFORME DEL DIRECTOR/ES DE LA TESIS

El trabajo presentado por Salvador Argudo Garijo se fundamenta en el tratamiento con celulas madre de la fibrosis biliar en particular utilizando un modelo experimental de colestasis extrahepática microquirúrgica. Los resultados obtenidos permiten demostrar que este tratamiento puede ser eficaz sin cursar con complicaciones secundarias. Tanto la metodología empleada como los resultados obtenidos que son discutidos en base a una bibliografía actualizada permiten considerar que este trabajo pueda ser presentado para optar al Grado de Doctor en Medicina.

Fecha 26 de abril de 2013

Firma 
D.N.I. 2519481-S

Fecha 23 de abril de 2013

Firma 
D.N.I. 08982905-V

Fecha 23 de abril de 2013

Firma 
D.N.I. 6556404-R

EVALUADORES ESPECIALISTAS EN LA MATERIA

Nombre Laureano Lorente Ruigomez	D.N.I. 14924549-X
Centro Facultad de Medicina .Universidad Complutense de Madrid	
Nombre Cruz Garcia Martin	D.N.I. 0148654-Y
Centro Facultad de Medicina.Universidad Complutense de Madrid	

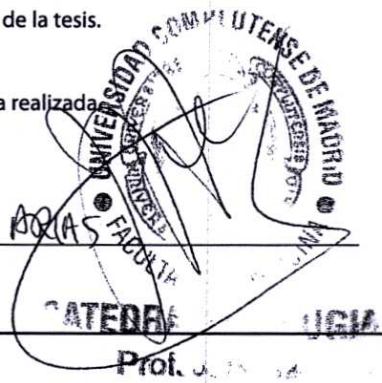
APROBACIÓN DEL DEPARTAMENTO/COMISIÓN RESPONSABLE DEL PROGRAMA DE POSTGRADO (3)

A la vista de los informes emitidos por los Directores de la Tesis, así como los informes de los especialistas indicados en el apartado anterior, se autoriza la admisión a trámite de la Tesis Doctoral, enviándose a esa Comisión de Doctorado, para la designación y nombramiento del Tribunal, dando conformidad a la siguiente documentación que se adjunta:

- * Informe del cumplimiento de los criterios establecidos para garantizar la calidad de la tesis.
- * Informes favorables de los especialistas indicados.
- * Informe del Director/res de la Tesis Doctoral.
- * Informes de idoneidad de cada uno de los miembros del tribunal de la propuesta realizada.

Fecha 28 de febrero de 2013

Fdo: 



Este apartado unicamente deberá cumplimentarse el caso de que corresponda

- FORMATO PUBLICACIONES
- MENCIÓN EUROPEA
- AUTORIZACIÓN PRESENTACIÓN EN OTRO IDIOMA

Conforme:

Fdo: _____



D. JAIME ARIAS PÉREZ, CATEDRÁTICO NUMERARIO DE LA FACULTAD DE MEDICINA Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada: “**TERAPIA CON CELULAS MADRE ADIPOCITICAS DE ORIGEN MESENQUIMAL EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE INSUFICIENCIA HEPATICA SECUNDARIA A COLESTASIS MICROQUIRURGICA**”, ha sido realizada por **D. Salvador Argudo Garijo** y dirigida por las Dras. Maria Angeles Aller Reyero, Maria Paz de Miguel González e Isabel Prieto Nieto.

El tema del presente estudio es de gran trascendencia en la actualidad por la elevada morbi-mortalidad mundial que comporta la cirrosis. En particular, la cirrosis por colestasis extrahepática, en adultos, y por atresia biliar, en niños, es una de las causas de patología inflamatoria fibrogénica en el hígado cuya única alternativa en la mayoría de los pacientes es la realización de un trasplante hepático. Por este motivo el planteamiento de nuevas y más eficaces alternativas terapéuticas en ésta patología, como la administración de células madre mesenquimales, y su ensayo previo en animales de experimentación, abre un esperanzador futuro para esta devastadora enfermedad. En la **Introducción** se actualiza éste tema con una bibliografía que recoge los trabajos clásicos, así como las últimas publicaciones científicas, tanto sobre la fisiopatología de la insuficiencia hepática colestásica, como de las terapias antifibrogénicas. La **hipótesis y los objetivos** del trabajo son claros y concisos. El **Material y Métodos** se caracteriza por su rigor metodológico, dada la complejidad del modelo microquirúrgico escogido y del aislamiento y diferenciación de las células madre obtenidas de tejido adipocítico humano. El diseño experimental es correcto y está suficientemente explicado como para permitir reproducir los experimentos y las técnicas utilizadas en el trabajo a otros investigadores. Los **Resultados** de éste estudio permiten verificar la hipótesis de Investigación y se exponen con gran claridad, incluyéndose numerosas Tablas y Figuras que permiten una comprensión clara de los principales resultados. Finalmente, en la **Discusión** se integran todos los datos

obtenidos tras el estudio de las alteraciones que comporta la colestasis obstructiva en la rata y se demuestra que la administración de células madre mesenquimales de origen adipocítico humano en dicho modelo microquirúrgico de colestasis extrahepática en la rata, por sus efectos anti-inflamatorios e inmunosupresores mejoran la insuficiencia hepática y reducen la fibrosis y la proliferación biliar. Las **Conclusiones** obtenidas en éste estudio experimental son de gran interés porque demuestran la utilidad de la administración de células madre mesenquimales en la patología hepática secundaria a colestasis extrahepática. La importancia de éste trabajo de investigación se fundamentaría por tanto en que sus resultados permiten, en primer lugar un mejor conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la producción de la cirrosis hepática y, además supone una esperanzadora opción terapéutica para los pacientes que sufren esta devastadora enfermedad y cuya única solución en la actualidad es generalmente el trasplante hepático.

Por todas las razones expuestas considero que este trabajo de investigación es de indudable valor en el campo de la hepatología y que puede optar su autor a la obtención del Grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

Madrid, 28 de febrero de 2013



A mi familia

Quiero expresar mi agradecimiento a las siguientes personas e instituciones, sin las cuales este trabajo no hubiera sido posible:

- Al equipo de Ingeniería Celular del Hospital Universitario de La Paz, en especial a Sherezade Fuentes y Alejandro Blázquez, que han desarrollado un enorme trabajo con el aislamiento y cultivo de las células madre, así como en el procesamiento de las muestras histológicas, vital en la elaboración de este trabajo.
- Al Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario de La Paz. A la Dra Carlota Largo (Dr en Veterinaria) y a Pedro, Pablo e Isabel, auxiliares del animalario, que me instruyeron y ayudaron en el manejo y cuidado de los animales de experimentación.
- A Manuel Losada y Arturo Cruz, que me enseñaron la técnica de la colestasis microquirúrgica extrahepática en ratas.
- Al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de La Paz, y al Dr Nistal, por su aportación en el estudio histológico
- A Rosario Madero, del Servicio de Estadística del Hospital Universitario La Paz y a Santiago Cano, del Servicio de Estadística de la Universidad Complutense de Madrid, por su ayuda en el análisis estadístico de los resultados obtenidos en el trabajo.
- A mis compañeros adjuntos en el Servicio de Cirugía General Del Hospital de Arganda, que me ayudaron en la labor asistencial para poder dedicar más tiempo a este trabajo de investigación.
- A la Fundación Mutua Madrileña, por su aportación económica a través de la concesión de una beca destinada a la financiación de este proyecto.
- Al Profesor Jaime Arias, del que tanto he aprendido en relación a modelos experimentales de insuficiencia hepática e inflamación, y por su estímulo constante.
- A mis directores de tesis, las Dras María Ángeles Aller, María Paz De Miguel e Isabel Prieto, por su gran dedicación y capacidad de trabajo, y su paciencia.

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: albúmina

ALT: alanin aminotransferasa

Ang II: angiotensina II

ANOVA: análisis de la varianza

AST: aspartato aminotransferasa

B

B: bazo

Bb: bilirrubina

Bb T: bilirrubina total

Bb D: bilirrubina directa

C

C-2s: ratas con colestasis microquirúrgica y 2 semanas de evolución

CA: cayado aórtico

CCM-5s: ratas con colestasis microquirúrgica (5 semanas de evolución) e inyección de células madre adipocíticas preferenciadas a hepatocito a las 2 semanas de p.o.

CCM-8s: ratas con colestasis microquirúrgica (8 semanas de evolución) e inyección de células

madre adipocíticas preferenciadas a hepatocito a las 2 semanas de p.o.

CER: circulación colateral espleno-renal

CM-A-1: ratas con colestasis microquirúrgica (8 semanas de evolución) e inyección de células madre adipocíticas indiferenciadas a las 24 horas de postoperatorio

CM-A-14: ratas con colestasis microquirúrgica (8 semanas de evolución) e inyección de células madre adipocíticas indiferenciadas a las 2 semanas de postoperatorio

CM-H-1: ratas con colestasis microquirúrgica (8 semanas de evolución) e inyección de células madre adipocíticas preferenciadas a hepatocitos a las 24 horas de postoperatorio.

CM-H-14: ratas con colestasis microquirúrgica (8 semanas de evolución) e inyección de células madre adipocíticas preferenciadas a hepatocitos a las 2 semanas de postoperatorio .

CM-S: ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica e inyección intrahepática de solución salina isotónica (0.9%)

COL: “collagen” (colágeno)

CPE: circulación colateral para-esofágica

CPF: catéter de perfusión de formaldehído

CPR: circulación colateral pararrectal

Cr: Creatinina

CS-5s: ratas con colestasis microquirúrgica (5 semanas de evolución) e inyección de solución salina isotónica a las 2 semanas de post operatorio.

CS-8s: ratas con colestasis microquirúrgica (8 semanas de evolución) e inyección de solución salina isotónica a las 2 semanas de post operatorio.

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

CXC: “Chemokines” (Quimioquinas)

D

DMEM: “*Dulbecco’s modified Eagle’s medium*” (medio de Eagle modificado por Dulbecco)

DMSO: dimetil sulfóxido

D: duodeno

E

E: esófago

ECM: “extracellular matrix” (matriz extracelular)

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EP: espacio porta

ERi: circulación colateral esplenorrenal inferior

ERs: circulación colateral esplenorrenal superior

Es: estómago

F

F: falciforme (Ligamento)

FA: fosfatasa alcalina

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

FSH: hormona folículo estimulante

G

GAGs: glicosaminoglicanos

GGT: γ -glutamilttransferasa

H

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

HIF-1 α : “*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)

I

IFN γ : interferón-gamma

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

IL: Interleuquina

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

L

LA: líquido ascítico

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

LC: lóbulo caudado hepático

LDH: Lactato deshidrogenasa

LDL: “*low density lipoprotein*”
(lipoproteína 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)

ml: mililitros

MMPs: “*Matrix metalloproteinases*”
(Metaloproteinasas de la matriz)

MMP-2: “*Matrix metalloproteinases-2*”
(Metaloproteínasa de la matriz-2)

MRP: “*multidrug resistance proteina*”
(proteínas relacionadas con resistencia a múltiples fármacos)

N

NASH: “*Non-alcoholic steatohepatitis*”
esteatohepatitis no alcohólica

NK: células *natural killer*

NKT: “*Natural killer T cells*” (células T *natural killer*)

NO: óxido nítrico

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 α : “*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*” (coactivador 1-alfa del receptor gamma activado por los proliferadores de los 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*” (receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas)

PT: peso testicular

PrT: proteínas totales

PT/PC: relación peso testicular / peso corporal

R

R: recto

RANTES: “*Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*” (regulación de activación, expresión y secreción de células T)

Ri: riñón

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

S

SAMe: S- adenosil- metionina

SCE: “*Scandinavian Committee on Enzymes* » (Comité Escandinavo de Enzimas)

SO: ratas pseudo-operadas

SVF: “*stromal vascular fraction*” (fracción vascular estromal)

T

TD: ligamento triangular derecho

TGF: “*transforming growth factor*” (factor transformador de crecimiento)

TIMP: “*Tissue inhibitor of Metalloproteinases*” (inhibidor tisular de metaloproteinasas)

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

ÍNDICE	Pag.
I. RESUMEN / ABSTRACT	1
II. INTRODUCCIÓN	10
1. COLESTASIS EN LA CLÍNICA HUMANA.....	10
2. ANATOMÍA DE LA VÍA BILIAR EN LA RATA.....	13
3. COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA EXPERIMENTAL.....	15
4. FISIOPATOLOGÍA DE LA COLESTASIS.....	18
5. TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS HEPÁTICA.....	26
5.A. Terapia molecular de la fibrosis hepática.....	31
5.A.1. Eliminación de la causa de la fibrosis hepática y de sus mediadores.....	31
5.A.2. Reducción de la inflamación y de la respuesta inmune.....	31
5.A.3. Intervención en vías de señalización específicas: interacciones ligando-receptor y señalización intracelular.....	35
5.A.4. Inhibición de la fibrogénesis.....	38
5.A.5. Resolución de la Fibrosis.....	40
5.B. Terapia celular de la fibrosis hepática.....	42
5.B.1 Terapia celular de la fibrosis hepática por trasplante de hepatocitos.....	43
5.B.2. Terapia con células madre embrionarias.....	47
5.B.3. Terapia con células madre mesenquimales adultas ..	49
5.B.4. Terapia con células madre mesenquimales derivadas de adipocitos.....	56
5.B.4.a <i>Aplicaciones de las células madre mesenquimales derivadas de adipocitos (AD-MSCs)</i>	58
5.B.4.B <i>Aplicaciones de las células madre mesenquimales derivadas de adipocitos (AD-MSCs) a la patología hepática</i>	62
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	68

IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	70
1. MATERIAL.....	70
1.A. ANIMALES.....	70
1.B. INSTALACIONES.....	70
1.B.1. Animalario.....	70
1.B.2. Sala de operaciones.....	70
1.B.3. Sala de evolución postoperatoria.....	71
1.B.4. Sala de sacrificio y procesado de muestras.....	71
1.B.5. Área de conservación de muestras.....	72
1.B.6. Eliminación de residuos biológicos.....	72
1.C. FARMACOS.....	72
1.C.1. Anestésicos.....	72
1.C.2. Otros fármacos.....	72
1.D. MATERIAL.....	72
1.D.1. Instrumental quirúrgico.....	73
1.D.2. Material de sutura y ligadura.....	73
1.D.3. Material quirúrgico complementario.....	73
1.D.4. Otros materiales para procedimiento operatorio y de extracción de muestras.....	74
1.D.5. Material de laboratorio.....	74
1.E. EQUIPOS DE LABORATORIO.....	75
1.E.1. Procesado de muestras sanguíneas.....	75
1.E.2. Estudios bioquímicos en suero.....	75
1.E.3. Laboratorio de Anatomía Patológica.....	75
1.E.3.a. Laboratorio general.....	75
1.E.3.b. Laboratorio de inmunohistoquímica.....	76
1.E.3.c. Laboratorio de análisis de imagen.....	76
1.F. REACTIVOS DE LABORATORIO.....	77
1.F.1. Estudios bioquímicos en suero.....	77
1.F.2. Laboratorio de Ingeniería Celular.....	78
1.F.3. Estudio histopatológico.....	79
2. MÉTODOS.....	80
2.A. CONDICIONES DE UTILIZACIÓN Y ESTABULACIÓN DE LOS ANIMALES.....	80
2.B. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	80

2.C. TÉCNICA ANESTÉSICA.....	84
2.D. TÉCNICA QUIRÚRGICA.....	85
2.D.1 Pseudo-operación	85
2.D.2 Colestasis extrahepática microquirúrgica	86
2.E. MANTENIMIENTO Y TRATAMIENTO POSTOPERATORIO.....	90
2.F. OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE DE LIPOASPIRADO HUMANO.....	92
2.G. CARACTERIZACIÓN CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	93
2.H. CARACTERIZACIÓN CELULAR FUNCIONAL MEDIANTE DIFERENCIACIÓN.....	93
2.I. DIFERENCIACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE ADIPOCITOS EN CELULAS PROGENITORAS HEPATOCITARIAS.....	94
2.J. ADMINISTRACIÓN INTRAHEPÁTICA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE ORIGEN ADIPOCÍTICO...	95
2.K. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES.....	96
2.K.1 Cuantificación del líquido ascítico.....	96
2.K.2 Circulación colateral portosistémica.....	96
2.K.3 Vasculopatía venosa mesentérica.....	96
2.K.4 Extracción sanguínea, perfusión intracardiaca y necropsia.....	97
2.K.5 Recogida de muestras histológicas.....	99
2.K.6 Eliminación de restos los biológicos.....	99
2.L. DETERMINACIONES SÉRICAS DE FUNCIÓN HEPÁTICA ...	99
2.L.1 Bilirrubina total y directa.....	100
2.L.2 Alanin aminotransferasa (ALT) y Aspartato aminotransferasa (AST).....	100
2.L.3 Lactatodeshidrogenasa (LDH).....	100
2.L.4 Fosfatasa alcalina (FA).....	100
2.L.5 γ -glutamilttransferasa (GGT).....	101
2.L.6 Ácidos biliares.....	101
2.L.7 Proteínas totales.....	101
2.L.8 Albúmina.....	102
2.L.9 Creatinina.....	102
2.M. ESTUDIO MICROSCÓPICO E HISTOPATOLÓGICO	102

2.M.1 Fijación.....	102
2.M.2 Inclusión.....	103
2.M.3 Procesado de los cortes.....	103
2.M.4 Estudio con microscopía de fluorescencia.....	103
2.M.5 Tinciones histológicas.....	104
2.M.5.a Hematoxilina & Eosina.....	104
2.M.5.b Tricrómico de Masson.....	104
2.M.5.c Rojo picrosirio.....	106
2.M.6. Evaluación histológica por microscopía óptica.....	107
2.N. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.....	108

V. RESULTADOS..... 110

1. RESULTADOS DE LOS GRUPOS PRELIMINARES.....	110
1.A. Supervivencia.....	110
1.B. Complicaciones post-operatorias.....	111
1.C. Ascitis.....	111
1.D. Circulación colateral porto-sistémica.....	112
1.E. Vasculopatía venosa mesentérica.....	113
1.F. Evolución del peso corporal.....	113
1.G. Peso hepático.....	114
1.H. Peso esplénico.....	115
1.I. Peso testicular.....	116
1.J. Determinaciones séricas de función hepática.....	117
1.K. Estudio histopatológico hepático.....	119
2. RESULTADOS DE LOS GRUPOS DEFINITIVOS.....	121
2.A. SUPERVIVENCIA.....	122
2.A.1 Resultados de la serie IV.....	123
2.A.2 Resultados de la serie V.....	123
2.A.3 Resultados de la serie VI.....	125
2.B. COMPLICACIONES POSTOPERATORIAS.....	127
2.C. ASCITIS.....	128
2.D. CIRCULACION COLATERAL VENOSA PORTO-SISTÉMICA.....	130
2.E. VASCULOPATIA VENOSA MESENTÉRICA.....	135

2.F. EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL.....	137
2.G. PESO HEPATICO.....	138
2.H. PESO ESPLÉNICO.....	142
2.I. PESO TESTICULAR.....	145
2.J. DETERMINACIONES SÉRICAS DE FUNCIÓN HEPÁTICA	148
2.K. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO HEPÁTICO.....	151
VI. DISCUSIÓN.....	171
VII. CONCLUSIONES.....	201
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	203
ANEXO 1: Tablas.....	276

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 en un modelo experimental microquirúrgico de colestasis extrahepática podría revertir la fibrosis biliar hepática y, por consiguiente, 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. En primer lugar se diseñó un grupo preliminar, constituido a su vez por 3 subgrupos: Un subgrupo de ratas pseudooperadas (SO) y otros 2 subgrupos, formados por ratas con colestasis microquirúrgica que se diferenciaban entre sí en función del período postoperatorio en el cual se les administraban células madre (precoz, a las 24 horas, o tardío, a las 2 semanas de postoperatorio), así como respecto del tipo de células madre administradas (células madre de origen mesenquimal indiferenciadas vs. células madre mesenquimales prediferenciadas a hepatocitos). Una vez analizados los resultados preliminares de este primer grupo, se realizaron otros grupos experimentales adicionales: 1 grupo de colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de post-operatorio (C-2s); 2 grupos formados por ratas con colestasis microquirúrgica a las que se administraban bien suero salino o células madre mesenquimales a las 2 semanas de post- operatorio y se sacrificaban a las 5 semanas de evolución (CS-5s y CCM-5s) y por último, otros 2 grupos constituidos por ratas con colestasis microquirúrgica a las que se administraban suero salino o células madre mesenquimales a las 2 semanas del post-operatorio y se sacrificaban a las 8 semanas de evolución (CS-8s y CCM-8s). En todos los animales se ha estudiado la presencia de ascitis, de vasculopatía venosa mesentérica, hipertensión portal y el desarrollo de circulación colateral porto-sistémica. Así mismo, 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 Rojo Sirio y

tricroómico de Masson para cuantificar el área de fibrosis hepática, de proliferación biliar y de hepatocitos. Además, con microscopio de fluorescencia se ha demostrado la persistencia de las células madre mesenquimales de origen adipocítico con las que fueron tratadas las ratas con colestasis.

Resultados: Respecto a los tres grupos iniciales estudiados, se obtuvieron datos histológicos y bioquímicos más favorables en el grupo de ratas con colestasis microquirúrgica a las que se administraron por vía intrahepática a las dos semanas del postoperatorio células madre mesenquimales de origen adipocítico que fueron prediferenciadas *in vitro* a hepatocitos. Por lo tanto, los grupos de estudio que se diseñaron posteriormente estaban formados por ratas con colestasis microquirúrgica a los que se les administraron a las dos semanas del postoperatorio suero salino o bien este tipo de células madre, puesto que habían demostrado mayor efectividad, y los animales fueron sacrificados a las 5 o a las 8 semanas de evolución con el objeto de estudiar este modelo experimental a corto y a largo plazo.

La supervivencia en los distintos grupos fue la siguiente: las ratas con colestasis microquirúrgica y evolución postoperatoria de dos semanas sobrevivieron el 100% (6/6). Respecto a las ratas con colestasis de cinco semanas de evolución, a las que se administró solución salina intrahepática sobrevivieron el 91,7% (11/12) en tanto que si se les administraron células madre adipocíticas prediferenciadas a hepatocitos sobrevivieron el 73,3% (11/15). Por último, las ratas con colestasis estudiadas a las 8 semanas de evolución, cuando se les administró solución salina sobrevivieron el 46,6% (7/15) mientras que a las que se administraron células madre adipocíticas prediferenciadas a hepatocitos sobrevivieron el 39,2% (11/28). Además, se apreció una tendencia al incremento de la mortalidad precoz en los grupos a los que se administraron células madre, mientras que en las ratas que recibieron suero era mayor la mortalidad tardía.

Las ratas colestásicas sacrificadas a las ocho semanas del post-operatorio a las que se les administró solución salina isotónica, presentaron un incremento de ascitis ($p < 0.05$) respecto de ratas estudiadas a las dos y a las cinco semanas del post-operatorio, tanto si recibieron solución salina isotónica o células madre. Las ratas colestásicas presentaron un menor desarrollo de circulación colateral porto-sistémica a las dos semanas de evolución respecto al resto de los grupos, siendo este resultado significativo en el caso de la circulación esplenorrenal ($p < 0,05$). Además, mientras todas las ratas colestásicas (100%) sacrificadas a

las ocho semanas desarrollaron circulación colateral, tanto si recibieron solución salina como células madre, las ratas colestásicas sacrificadas a las cinco semanas y administración de células madre mostraron un descenso no significativo de la circulación colateral respecto a las ratas a las que sólo se le inoculó suero por vía intrahepática. El desarrollo de vasculopatía venosa mesentérica de grado I fue similar en las ratas estudiadas a las dos (75%) y a las cinco semanas, tanto si se les administró suero (72,7%) como células madre (72,7%). Las ratas colestásicas estudiadas a las ocho semanas de evolución presentaron vasculopatía venosa mesentérica de grado I en el 100% de los casos, tanto si recibieron suero como células madre.

El incremento del peso corporal fue mayor en los grupos de ratas colestásicas sacrificadas a las ocho semanas de evolución, independientemente de la administración de suero o células madre respecto a las ratas sacrificadas a las dos semanas ($p < 0,01$) y a las ratas de cinco semanas de evolución a las que se les administraron células madre ($p < 0,05$). En el grupo de ratas estudiadas a las ocho semanas tratadas con suero salino se produjo un aumento significativo del peso hepático respecto a las ratas de dos semanas de postoperatorio ($p < 0,01$), a las ratas de cinco semanas de evolución, tanto si recibieron suero como células madre ($p < 0,001$), y al grupo de ratas de ocho semanas tratadas con células madre ($p < 0,01$). Este incremento significativo de peso hepático en las ratas de ocho semanas de postoperatorio tratadas con suero se realizó a expensas de todos los lóbulos hepáticos excepto del lóbulo medio. Además, también hubo un aumento significativo de la relación peso hepático/peso corporal en el grupo de ratas con ocho semanas de evolución tratadas con suero respecto al resto de los grupos estudiados ($p < 0,001$). En este mismo grupo de animales también se produjo un aumento significativo del peso esplénico respecto al grupo de dos semanas de postoperatorio ($p < 0,05$), así como de la relación peso esplénico/peso corporal en los grupos tratados con células madre, tanto a las cinco como a las ocho semanas del postoperatorio ($p < 0,05$), y de los grupos tratados con suero, también tanto a las cinco ($p < 0,01$) como a las ocho semanas de evolución ($p < 0,001$), respecto a las ratas de dos semanas de postoperatorio. Se comprobó también una disminución significativa del peso testicular en las ratas de cinco semanas, tanto con suero ($p < 0,05$), como con células madre ($p < 0,01$) y en las ratas de ocho semanas de evolución a las que se administró suero ($p < 0,001$), respecto a las ratas colestásicas de dos semanas de evolución. Así mismo, se comprobó un descenso significativo de la relación peso

testicular/peso corporal en el grupo de ratas tratadas con suero a las ocho semanas de postoperatorio ($p < 0,01$) respecto al grupo de ratas con dos semanas de evolución colestásica. En relación a los parámetros bioquímicos de colestasis y función hepática, en tanto que los valores son similares en los grupos de cinco semanas de evolución tratadas con células madre o con suero, se apreció una mejoría no significativa en las concentraciones séricas de bilirrubina, gamma-glutamiltanspeptidas, proteínas totales y albúmina en el grupo de ratas con ocho semanas de evolución tratadas con células madre respecto de las ratas que recibieron suero.

En cuanto al estudio histopatológico, se ha demostrado mediante la utilización del microscopio de inmunofluorescencia la persistencia de células madre que fueron administradas a las ratas con colestásicas con cinco y ocho semanas de evolución. Al observar las preparaciones histológicas de hígado con hematoxilina&eosina, no se apreciaban diferencias entre los grupos de ratas colestásicas tratadas bien con suero o con células madre. Sin embargo, a las ocho semanas de evolución se comprobó una progresión más rápida aunque no significativa de los signos de colestasis en el grupo de ratas tratadas con suero respecto de las tratadas con células madre. También, 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 ($p < 0,001$) en el área de hepatocitos en el grupo de ratas tratadas con suero de ocho semanas respecto de las estudiadas a las cinco semanas de evolución. Estas diferencias no fueron significativas entre las ratas colestásicas tratadas con células madre a las cinco y ocho semanas de evolución. En el grupo de colestasis tratadas con suero de ocho semanas de evolución se produjo un aumento significativo ($p < 0,01$) de la proliferación biliar respecto al grupo tratado con células madre en el lóbulo caudado.

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 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.

I. ABSTRACT

Introduction. The development of hepatic fibrosis and portal hypertension in multiple chronic liver diseases with diverse etiologies is a multifunctional process, mediated by inflammatory cells that release fibrogenic mediators, which also result in excessive angiogenesis. The administration of mesenchymal stem cells of adipocytic origin, in a microsurgical experimental model of extrahepatic cholestasis could revert liver biliary fibrosis and therefore, chronic liver failure as well as splanchnic angiogenic hyperactivity. This is involved in the appearance of simultaneous enlargement of the spleen and liver, porto-systemic collateral circulation, portal hypertensive enteropathy and mesenteric venous vasculopathy.

Material and Methods. A study using male Wistar rats has been performed to verify this hypothesis. First, a preliminary group was designed, made up of 3 sub-groups: one Sham Operated rats (SO) group, and two groups with microsurgical cholestasis, which were differentiated from each other according to the post-operative period during which they were administered stem cells (early, at 24 hours, late at 2 weeks post-operation). These two cholestatic rat groups were also different in terms of the stem cells administered (undifferentiated mesenchymal stem cells vs. pre-differentiated mesenchymal stem cells to hepatocytes). Once the results for this preliminary group were analyzed, other additional experimental groups were included: 1 group of microsurgical cholestatic rats, sacrificed at 2 weeks post-operation (C-2s); 2 groups formed by rats with microsurgical cholestasis which were either administered saline solution (CS-5s) or pre-differentiated mesenchymal stem cells to hepatocytes (CCM-8S) at 2 weeks post-operation and sacrificed at 5 weeks of evolution and lastly, another 2 groups made up of microsurgical cholestatic rats which were administered saline solution (CS-8s) or pre-differentiated mesenchymal stem cells to hepatocytes (CCM-8s) at 2 weeks post-operation and sacrificed at 8 weeks of evolution

In all animals studied, ascites, mesenteric venous vasculopathy, portal hypertension and the development of porto-systemic collateral circulation were detected. Likewise, the serum concentration levels of the hepatic and biliary functions were quantified by photolorimetry. Lastly, a histopathological liver study was performed with optical microscopy and Sirius Red and Masson's trichrome staining to quantify the area of hepatic fibrosis, bile duct proliferation and hepatocytes. Moreover, with fluorescent microscopy the persistence of

adipose-derived mesenchymal stem cells was verified in those cholestatic rats treated with these stem cells.

Results: Regarding the three initial groups studied, favorable histological and biochemical data were obtained from the rats with microsurgical cholestasis intrahepatically administered adipose-derived mesenchymal stem cells pre-differentiated *in vitro* to hepatocytes at 2 weeks post-operation compared to those in which undifferentiated mesenchymal stem cells were injected into the liver. Therefore, the study groups made up later always included rats with microsurgical cholestasis administered saline solution at 2 weeks post-operation or this kind of stem cells since they had displayed greater effectiveness. The animals were sacrificed at 5 or 8 weeks of evolution in order to study this experimental model in the short and long term.

The survival of the different groups was as follows: All the rats (100%) with microsurgical cholestasis at 2 weeks post-operation survived compared to rats at 5 weeks of post-operative evolution, which were administered saline solution intrahepatically, where only 91.7% (11/12) survived. Meanwhile, 73.3% (11/15) of those rats administered adipose-derived mesenchymal stem cells survived. Lastly, the rats with cholestasis studied at 8 weeks post-operative evolution, when administered saline solution, 46.6% (7/15) survived whereas those administered adipose-derived mesenchymal stem cells only 39.2% (11/28) survived. Also, there was a higher early mortality rate tendency in the groups administered stem cells, whereas the rats administered saline solution had a higher later mortality rate.

The cholestatic rats sacrificed at 8 weeks post-operation presented an increase in ascites ($p < 0.05$) compared to rats studied at 2 and 5 weeks post-operation, whether they received saline solution or stem cells. The cholestatic rats presented a lesser development of porto-systemic collateral circulation at 2 weeks evolution compared to the rest of the groups, the result being significant in the case of splenorenal circulation ($p < 0.05$). Furthermore, while all the cholestatic rats (100%) sacrificed at 8 weeks, whether administered saline solution or stem cells and the cholestatic rats sacrificed at 5 weeks and administered stem cells showed an insignificant decrease in collateral circulation compared to rats that were only inoculated with saline intrahepatically. The development of grade 1 mesenteric venous vasculopathy was similar in rats studied at 2 (75%) and 5 weeks, whether they were administered saline (72.7%) or stem cells (72.7%). The cholestatic rats studied at 8 weeks evolution presented grade 1 mesenteric

venous vasculopathy in 100% of the cases, whether they were administered saline or stem cells.

The increase in body weight was greater in the cholestatic rats sacrificed at 8 weeks evolution, regardless of whether they were administered saline or stem cells compared to rats sacrificed at 2 weeks ($p<0.01$) and rats at 5 weeks evolution administered stem cells ($p<0.05$). In the group of rats studied at 8 weeks treated with saline solution, there was a significant increase in hepatic weight at 2 weeks post-operation ($p<0.01$), compared to rats at 5 weeks evolution, whether they were administered saline or stem cells ($p<0.001$) and compared to the group of rats at 8 weeks treated with stem cells ($p<0.01$). This significant increase in hepatic weight in rats at 8 weeks post-operation treated with saline was performed at the expense of all the hepatic lobes except for the middle lobe. Furthermore, there was also a significant increase in the hepatic/body weight relation in the group of rats at 8 weeks evolution treated with saline solution compared to the rest of the groups studied ($p<0.001$). In this same group of animals, there was also a significant increase in splenic weight compared to the group at 2 weeks post-operation ($p<0.05$) and a significant increase in terms of splenic/body weight relation in the groups treated with stem cells, at 5 and 8 weeks post-operation ($p<0.05$) and the groups treated with saline, at 5 ($p<0.01$) and 8 ($p<0.001$) weeks evolution, compared to rats at 2 weeks post-operation. The significant decrease in testicular weight was also verified in rats at 5 weeks post-operation, whether treated with saline ($p<0.05$) or stem cells ($p<0.01$) and in rats at 8 weeks evolution administered saline ($p<0.001$) compared to those cholestatic rats at 2 weeks evolution. Likewise, a significant decrease in the testicular/body weight was verified in the group of rats treated with saline at 8 weeks post-operation ($p<0.05$) compared to the group of rats with 2 weeks of cholestatic evolution. In terms of the biochemical parameters of cholestasis and hepatic function, while the values are similar in the groups at 5 weeks evolution treated with either saline or stem cells, there was an insignificant improvement in the serum concentrations of bilirubin, gamma-glutamyl transpeptidase, total proteins and albumin in the group of rats at 8 weeks evolution treated with stem cells compared to rats treated with saline.

In terms of the histopathological study, by using immunofluorescence microscopy, the persistence of stem cells administered to cholestatic rats with 5 and 8 weeks evolution was demonstrated. When observing the histological preparations of the liver with hematoxiline and eosine, no differences between the groups of cholestatic rats treated with saline or stem cells were noted. However,

at 8 weeks evolution, a subtle but faster progression was noted in the signs of cholestasis in the group of rats treated with saline compared to those treated with stem cells. Also, a significant increase in the areas of fibrosis ($p < 0.05$) and biliary proliferation ($p < 0.05$) was demonstrated, as well as a significant decrease ($p < 0.01$) in the hepatocytes content in the group of rats treated with saline at 8 weeks compared to those studied at 5 weeks evolution. These differences were not significant among the cholestatic rats treated with stem cells at 5 and 8 weeks evolution. Lastly, at 8 weeks evolution, the group of rats administered saline presented a significant increase in the area of fibrosis compared to those treated with stem cells, although it was only significant ($p < 0.05$) in the caudate lobe. Interestingly enough, in the group of cholestatic rats treated with saline at 8 weeks evolution, there was a significant increase ($p < 0.05$) in biliary proliferation compared to the group treated with stem cells also in the caudate lobe.

Conclusion: The relevance of the current research study is based on the possibility of extrapolating the results obtained to human clinical practice, in which cirrhosis of different etiologies results in a high morbi-mortality rate today. In particular, treatment with adipose-derived mesenchymal stem cells, predifferentiated *in vitro* to hepatocytes, could be useful for reducing complications secondary to chronic liver diseases of biliary origin in humans.

Key words: cholestasis, microsurgery, portal hypertension, ascites, inflammation, adipose-derived mesenchymal stem cells.

II. INTRODUCCIÓN

1. COLESTASIS EN LA CLINICA HUMANA

Las enfermedades colestásicas hepáticas son consecuencia de trastornos de la síntesis hepatobiliar y de la excreción de la bilis, lo cual comporta la llegada a la circulación sanguínea de productos biliares (Hirschfield et al., 2010). En estas patologías, la lesión de los conductos biliares o de los hepatocitos puede inducir un amplio rango de manifestaciones clínicas que incluyen desde alteraciones aisladas de la bioquímica hepática hasta el fallo hepático o el cáncer hepatobiliar. Las causas del síndrome colestásico pueden ser congénitas, inmunológicas, estructurales –obstructivas/vasculares- y tóxicas (Hirschfield et al., 2010). Se pueden desarrollar varias formas de colestasis, bien por una alteración de la secreción biliar, por una obstrucción del flujo biliar, o por una combinación de ambas. A su vez, el deterioro en el flujo biliar que conduce a la colestasis puede acontecer de forma aguda o crónica. Como consecuencia se produce una retención de ácidos biliares, bilirrubina y otros solutos colefilicos en el hígado y en la sangre y un déficit de ácidos biliares en el intestino.

Aunque los colangiocitos sólo representan una pequeña proporción (3-5%) de las células que forman el parénquima hepático (Alpini et al., 2001; Hirschfield et al., 2010), desempeñan un papel fisiopatológico relevante en la composición de la bilis durante su tránsito por la vía biliar, que implica la secreción y absorción de agua, electrolitos y otros solutos orgánicos de la bilis hepatocelular (Alvaro et al., 1997; Alpini et al., 2001; Racanelli y Rehermann, 2006; Glaser et al., 2006). Los colangiocitos son unas células epiteliales ciliadas que delimitan la vía biliar, una intrincada red de conductos biliares interconectados que aumentan progresivamente su diámetro desde los conductos de Hering hasta la vía biliar extrahepática (Alpini et al., 2002; Lorente et al., 2009) (Figura 1).

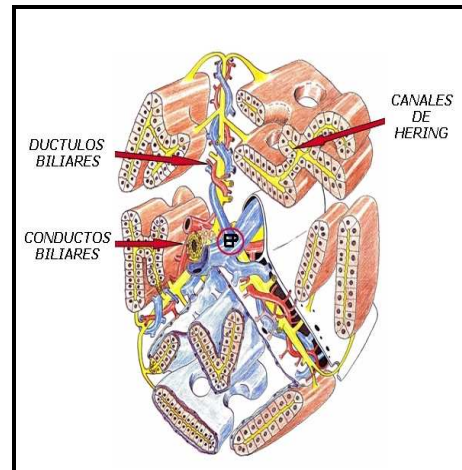


Figura 1. Unidad funcional hepática. Los canalículos biliares drenan en los canales de Hering y estos a su vez en los ductulos biliares, que desembocan en los conductos biliares interlobulares, situados en los espacios porta (EP). (Arias et al., 1993)

Los colangiocitos de los grandes conductos biliares interlobulares intervienen fundamentalmente en funciones secretoras, en tanto que los que delimitan los conductos biliares intrahepáticos más pequeños, los colangiolos y los conductos de Hering están implicados en las respuestas inflamatoria y proliferativa (Alpini et al., 1996; Alpini et al., 1997). Los cilios de los colangiocitos se extienden desde la membrana plasmática apical hasta la luz del conducto biliar y regulan funciones mecanosensoriales, osmosensoriales y quimiosensoriales (Masyuk et al., 2006; Masyuk et al., 2008). La estimulación de los colangiocitos por vías paracrina y endocrina induce la secreción de agua y la alcalinización de la bilis (Strazzabosco et al., 1991; Kanno et al., 2001; Esteller, 2008). En éste proceso se integran estímulos prosecretores (secretina, glucagón, polipéptido intestinal vasoactivo –VIP-, acetilcolina –Ach-, y bombesina) y antisecretorios (somatostatina y endotelina-1) (Fiorotto et al., 2007; Minagawa et al., 2007; Strazzabosco et al., 2009).

El hepatocito es una célula poligonal polarizada que posee una membrana plasmática con una superficie basolateral, localizada en el espacio de Disse, subyacente a las células endoteliales del sinusoides, y una cara apical que delimita el canalículo biliar (Li y Crawford, 2004). El transporte de proteínas desde la membrana basolateral (sinusoidal) hasta la apical (canalicular) desplaza los ácidos biliares desde la sangre sinusoidal hasta el canalículo biliar mediante una eficiente circulación enterohepática estrechamente regulada (Zollner y Trauner, 2008; Boyer, 2009). La membrana plasmática basolateral contiene

proteínas transportadoras que utilizan gradientes de Na⁺ y de pH para captar solutos orgánicos desde la sangre hacia el interior del hepatocito. Y la membrana canalicular tiene sistemas de transporte activo que facilitan la secreción de solutos orgánicos hacia la luz canalicular. Receptores nucleares regulan la transcripción de genes que codifican proteínas implicadas en los sistemas de transporte hepatobiliar, de síntesis y detoxificación de ácidos biliares y de fibrogénesis (Fiorucci et al., 2004; Fickert et al., 2009; Wagner et al., 2010). Los ácidos biliares son internalizados a través de la membrana basolateral de los hepatocitos por las proteínas cotransportadora de Na⁺/taurocolato y transportadora de aniones orgánicos (*Na⁺/taurocholate cotransporter and organic anion transporting proteins, OATP2/OATPB1*) (Konig et al. 2006). Los principales solutos orgánicos secretados en la bilis son sales biliares conjugadas con taurina o con glicina (ursodeoxicolato, colato, quenodeoxicolato, deoxicolato y litocolato), fosfatidilcolina, colesterol, glucurónidos de bilirrubina y glutatión (Nathanson y Boyer, 1991; Li y Crawford, 2004). La exportación activa hacia la bilis es mediada por la bomba canalicular exportadora de sales biliares (*canalicular bile SALT export pump, ABCB11*) y por la bomba canalicular exportadora conjugada (*canalicular conjugate export pump; MRP2*). MRP2 regula el transporte canalicular de aniones orgánicos, como la bilirrubina (Lam et al., 2010; Nies et al., 2007). Por último, La formación de micelas mixtas en la bilis resulta de la presencia de ácidos biliares, colesterol y fosfatidilcolina y la bomba exportadora de fosfolípidos proteína 3 resistente a mult fármacos (*multi-drug-resistant 3 protein; MDR3*) controla activamente éste proceso (Davit-Spraul et al., 2010).

Si la etiología de la colestasis es obstructiva, dependiendo del nivel anatómico de la obstrucción, se clasifica en intrahepática y extrahepática. Las causas más frecuentes de colestasis intrahepática en la clínica humana son la colangitis esclerosante, la cirrosis biliar primaria, la atresia biliar y las hepatopatías de etiología alcohólica, vírica, o farmacológica (Trauner et al., 1998; Rutherford et al., 2006; O'Leary et al., 2007; Hirschfield et al., 2010; Pakarinen y Rintala, 2011; Aithal et al., 2011), en tanto que la patología litiásica y tumoral predominan en la colestasis extrahepática (Hirschfield et al., 2010; Lau y Lau, 2012).

Pero, independientemente de cual sea su causa, este síndrome se manifiesta clínicamente por ictericia, coluria, acolia y prurito (Schaffner et al.,

1979; Sherlock, 1984; Bergasa et al., 1995a; Bergasa et al., 1995b; Li et al., 2004; Heathcote, 2007; Oude Elferink et al., 2011). Desde el punto de vista bioquímico, la colestasis cursa con niveles séricos elevados de bilirrubina, ácidos biliares (Ac bil), fosfatasa alcalina y γ -Glutamil transferasa e hipercolesterolemia (Li y Crawford, 2004; Shiha et al., 2009). Finalmente cursa con fibrosis, cirrosis y signos clínicos de insuficiencia hepática y encefalopatía hepática (Boyer 2007; Newton et al., 2008) Incluso, si la obstrucción es crónica se ha demostrado la evolución tumoral de éste proceso (Xia et al., 2007; Aller et al., 2010a; Yang et al., 2011).

En conclusión, la patología derivada de la colestasis incluye aspectos morfológicos: acúmulo o estasis de bilis en la vía biliar y en los hepatocitos; funcionales: disminución de la secreción hepática de bilis y del flujo biliar canalicular; y clínicos: retención en la circulación sanguínea de sustancias que normalmente son excretadas en la bilis (Sherlock, 1998; Li MK et al., 2004; Zollner et al., 2008; Chu et al., 2010; Hirschfield et al., 2010; Kremer et al., 2011).

2. ANATOMÍA DE LA VÍA BILIAR EN LA RATA

El hígado de la rata se compone de cuatro lóbulos, denominados medio (LM), lateral izquierdo (LLI), lateral derecho (LLD) y caudado (LC) que, a su vez poseen una vascularización porto-arterial y un drenaje biliar y venoso individualizado (Castaing et al., 1980; Lorente et al., 1995; Lorente et al., 2009) (Figura 2). Además, algunos autores describen el proceso caudado (PC) como el segmento de parénquima comprendido entre los lóbulos caudado y lateral derecho (Aller et al., 2008; Lorente et al., 2009).

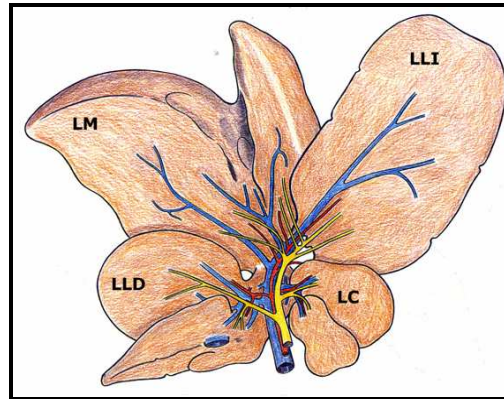


Figura 2. El hígado de la rata se compone de cuatro lóbulos: lateral derecho (LLD), medio (LM), lateral izquierdo (LLI) y caudado (LC) que, a su vez poseen una vascularización porto-arterial y un drenaje biliar y venoso individualizado.

La vía biliar tiene una estructura similar a un árbol, en el cual el colédoco y los conductos biliares lobulares corresponderían al tronco que se ramificarían progresivamente en los conductos biliares interlobulares (Figura 3), los ductulos biliares o canales de Hering y, finalmente los canalículos biliares (Figura 1) (Benedetti et al., 1996; Aller et al., 2008; Lorente et al., 2009).

La vía biliar extrahepática en la rata esta constituida por el colédoco, que en su trayectoria ascendente recibe en el hilio hepático los siguientes conductos biliares lobulares: conductos inferiores o caudales, correspondientes a los lóbulos caudado y lateral derecho; y conductos superiores o craneales, correspondientes a los lóbulos lateral izquierdo y medio (Aller et al., 2008; Lorente et al., 2009) (Figura 3).

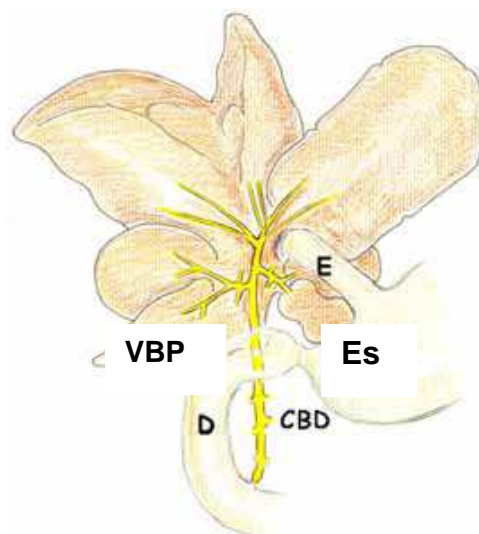


Figura 3. Distribución más frecuente de los conductos biliares lobulares principales en la rata. VBP: Vía biliar principal; E: Esófago; Es: Estómago; D: Duodeno

3. COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA EXPERIMENTAL

La ictericia obstructiva causa una elevada incidencia de morbi-mortalidad en la clínica humana (O'Connor, 1985; Poupon et al., 2000). Las severas repercusiones hepáticas y sistémicas de la colestasis (Schaffner et al., 1979; O'Connor, 1985; Sherlock 1986; Li y Crawford 2004; Nguyen et al., 2010; Chu et al., 2010; Hirschfield et al., 2010; Kremer et al., 2011) han sido la causa de la creación de diversos modelos experimentales que permitan una mejor comprensión de su patogénesis, profilaxis y tratamiento.

La ligadura del colédoco en la rata es un modelo experimental utilizado tanto para el estudio de la hipertensión portal (Katsuta et al., 2005; Abrales et al., 2006) como, en especial, de la colestasis extrahepática (Rodríguez-Garay, 2004; Aller et al., 2009b; Aller et al., 2010a). En esencia, la técnica quirúrgica consiste en la resección del colédoco entre dos ligaduras. Esta técnica es macroquirúrgica, ya que no requiere medios de magnificación para su realización. Sin embargo, las ratas con colestasis extrahepática macroquirúrgica desarrollan un pseudoquiste biliar hiliar por dilatación del extremo proximal ligado del colédoco, que se infecta en muchas ocasiones por microorganismos Gram negativos de procedencia intestinal 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 et al., 1993a; Aller et al., 1993b; Aller et al., 2004a; Aller et al., 2009b). El cultivo de la bilis almacenada en éstos pseudoquistes hiliares es positivo y los gérmenes más frecuentes *Escherichia coli* y *Enterococcus* (Aller et al., 1993a; Aller et al., 2004a), lo cual evidencia que en éste modelo experimental se produce traslocación bacteriana intestinal.

Para evitar estas complicaciones infecciosas propusimos la realización de una técnica microquirúrgica consistente en 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 drenan cada uno de los cuatro lóbulos hepáticos en la rata (Aller et al., 1993b; Lorente et al., 1995; Aller et al., 2009a; Aller et al., 2009b; Aller et al., 2010a). Con esta 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 et al., 1993b; Aller et al., 2004a; Aller et al., 2009a, Aller et al., 2009b; Aller et al., 2010a).

En particular, éste modelo de colestasis extrahepática microquirúrgica, al conseguir mayor supervivencia, permite obtener a largo plazo un nuevo modelo de fibrosis hepática que puede ser de gran utilidad para el estudio de nuevas terapias antifibrogénicas. En este sentido, los dos modelos experimentales más utilizados para estudiar la insuficiencia hepática crónica son la administración de tetracloruro de Carbono y la colestasis por ligadura y sección del colédoco (Assimakopoulos y Vagianos, 2009).

En el modelo de colestasis extrahepática en la rata se consideran dos fases evolutivas: precoz, si la colestasis se mantiene cuatro semanas, y tardío cuando se supera este período postoperatorio (Assimakopoulos y Vagianos, 2009). Así, cuando la ictericia obstructiva es aguda la colemia predomina sobre la lesión del parénquima hepático, no existiendo todavía ni hipertensión portal ni cirrosis, si bien induce efectos inotrópicos y cronotrópicos negativos sobre el corazón (Joubert, 1978; Yang et al., 2010; Nahavandi et al., 2001; Mani et al., 2002; Hajrasouliha et al., 2004), altera la respuesta vasoconstrictora simpática (Bomzon et al., 1985; Jacob et al., 1993) y causa una intensa diuresis y natriuresis, que pueden incluso desembocar en hipovolemia (Wait y Kahng 1989; Green y Better, 1995). Como consecuencia, se producen hipotensión arterial y disfunción renal prerrenal, que es agravada por la endotoxemia que acompaña a éste modelo experimental. Por el contrario, cuando la evolución de la colestasis es crónica (más de cuatro semanas), además de la colemia, la endotoxemia y la traslocación bacteriana intestinal (Deitch et al., 1990; Clements et al., 1996; Clements et al., 1998), se produce una lesión significativa hepática, con cirrosis biliar, hipertensión portal y ascitis (Green y Better, 1995; Geerts et al., 2008) que se asocia a una lesión renal similar fisiopatológicamente al síndrome hepatorenal de los enfermos cirróticos. Por éste motivo la colestasis obstructiva extrahepática crónica en la rata se ha propuesto como un modelo experimental válido para el estudio de la fisiopatología y de nuevas opciones terapéuticas en esta grave situación en la clínica humana (Assimakopoulos y Vagianos, 2009).

En general, la mayoría de estos modelos experimentales han sido utilizados para el estudio de aquellos mecanismos patogénicos implicados en los procesos inflamatorios causantes de diversas patologías. En particular, en el caso del modelo experimental de colestasis, se han estudiado la anatomía de la vía biliar extrahepática en la rata Wistar (Lorente et al., 1995), la incidencia de infecciones postoperatorias (Aller et al., 1993a), la técnica microquirúrgica de colestasis extrahepática en la rata (Aller et al., 1993b) y, entre las alteraciones hepáticas secundarias a colestasis, los parámetros sanguíneos propios de lesión hepatobiliar, el grado de fibrosis y proliferación biliar (Aller et al., 2004a; Aller et al., 2004b) y el metabolismo oxidativo hepato-intestinal (López et al., 1999) y cerebral (García-Moreno et al., 2002).

Esta técnica microquirúrgica de colestasis extrahepática puede ser también realizada en el ratón (Aller et al., 2009a; Aller et al., 2009b). El hígado del ratón, al igual que el de la rata, está compuesto por cuatro lóbulos que reciben los mismos nombres. La principal diferencia en la vía biliar de ambos roedores es que el ratón posee vesícula biliar. Por ello, si se efectúa ligadura del colédoco se produce una marcada dilatación de la vesícula biliar que puede evolucionar a perforación y coleperitoneo (Abralde et al., 2006). Por ello la colestasis extrahepática microquirúrgica en el ratón precisa añadir una colecistectomía. La disección, ligadura y sección de los conductos biliares de los lóbulos medio y lateral izquierdo se simplifica si se realiza previamente la disección de la vesícula biliar y del conducto cístico (Aller et al., 2009a; Aller et al., 2009b).

La utilización profiláctica de antibióticos de amplio espectro (Ceftacídima 50mg/kg) y la administración semanal de vitamina K1 (8 mg/kg i.m.) permite reducir la mortalidad precoz de éstos animales (Beck y Lee, 1995; Huang et al., 2003; Akimoto et al., 2005; Abralde et al., 2006).

A largo plazo, ambos modelos de colestasis extrahepática, macro y microquirúrgica, cursan con hepatomegalia asociada al desarrollo de una intensa fibrosis, proliferación biliar y de un moderado grado de infiltración inflamatoria portal, así como de muerte hepatocitaria por necrosis y/o apoptosis, si bien la pérdida de la arquitectura hepática normal típica de cirrosis se observa en raras ocasiones (Kountouras et al., 1984; Aller et al., 1993b; Aller et al., 2004b; Abralde et al., 2006).

Respecto de las alteraciones extrahepáticas destacan la ictericia, la coluria (Huang et al., 2003; Aller et al., 2004a), la hipertensión portal con esplenomegalia y circulación colateral portosistémica (Aller et al., 1993a; Huang et al., 2003; Aller et al., 2004a; Chan et al., 2004; Katsuta et al., 2005), la insuficiencia renal (Assimakopoulos y Vagianos, 2009) la encefalopatía hepática (Bergasa et al., 1992; Garcia-Moreno et al., 2002; García-Moreno et al., 2005; Butterworth et al., 2009; Huang LT et al., 2010; Magen et al., 2010; Assimakopoulos et al., 2010; Eslimi et al., 2011) y la ascitis (Huang YT et al., 2003; Aller et al., 2010a; Aller et al., 2010c). Por lo tanto, la colestasis extrahepática experimental no es sólo un modelo idóneo para estudiar la patología hepática secundaria a la obstrucción biliar, sino también sus complicaciones extrahepáticas.

4. FISIOPATOLOGIA DE LA COLESTASIS

Las alteraciones hepáticas que se producen como consecuencia de 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 et al., 2008; 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 músculo liso- α , colágeno, metaloproteasas de la matriz, inhibidores tisulares de metaloproteasas y proteoglicanos (Mormone et al., 2011; Meran y Steadman, 2011; Fragiadaki y Mason, 2011)

Inmediatamente después de la obstrucción completa de la vía biliar en la rata se produce un intenso incremento (60%) de la presión biliar intraductal (Slott et al., 1990; Azmaiparashvili et al., 2009) y ésto es seguido por alteraciones patológicas de la matriz extracelular (Desmouliere et al., 1997). Por el contrario, la descompresión biliar, al suprimir el estrés mecánico, revierte las lesiones hepáticas inducidas por la ligadura del colédoco (Ramm et al., 2000; Matsumoto et al., 2002; Costa et al., 2003; Kirkland et al., 2010). Estos estudios demuestran

la relevancia de la energía mecánica en la etiopatogenia de la patología hepática secundaria a la obstrucción de la vía biliar.

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 et al., 2004; Wang et al., 2005). Aunque se produce una activación predominante de genes metabólicos en todas las fases posteriores a la ligadura del colédoco, desde una fase inmediata (1 día) hasta una fase tardía (21 días), la afectación de vías metabólicas específicas es diferente dependiendo de la duración de la obstrucción (Campbell et al., 2004). En tanto que algunos genes son activados en el periodo precoz de la colestasis, por ejemplo genes implicados en la disrupción del metabolismo lipídico y en la fibrosis, otros genes, como son los implicados en mecanismos de protección celular frente a la agresión por acumulación tóxica de ácidos biliares, son inhibidos (Kojima et al., 2004).

Después de la ligadura del colédoco el hígado de la rata sufre severas alteraciones hemodinámicas, portales y arteriales, que pueden comportar lesiones por isquemia-reperfusión y estrés oxidativo (Huang et al., 2009; Yang et al., 2012; Oguz et al., 2012). El aumento de la resistencia vascular en el sistema portal hepático secundario a colestasis extrahepática produce hipertensión portal (Ohara et al., 1993; Li y Yang, 2005; Van Steenkiste et al., 2010) e isquemia hepática, asociadas a una síntesis deficitaria del enzima Oxido Nítrico Sintasa-inducible (iNOS) y de oxido nítrico (NO) (Barón et al., 2000; Lee et al., 2010).

La vía biliar es vascularizada por el plexo peribiliar (Gaudio et al., 1996; Li et al., 2007; Toki et al., 2011), localizado alrededor de los conductos biliares de menor calibre, haciéndose así progresivamente más estrecho y más simple (Gaudio et al., 1996). Estas características del plexo peribiliar permiten asumir que el aumento de presión intraductal con dilatación de la vía biliar en la colestasis extrahepática podría comprimir el plexo peribiliar con la consiguiente isquemia de la vía biliar. Sin embargo, se ha descrito que después de la disminución del flujo sanguíneo a través de la vena porta se produce un aumento del flujo arterial hepático o "*hepatic arterial buffer response*" (Lautt, 1983). Además, dos semanas después de 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 et al., 1996). A su vez, la lesión por isquemia-reperfusión ha sido implicada en la patogénesis de la colestasis intrahepática (Tanaka et al., 2006; Toki et al., 2011).

Las ratas con ligadura del colédoco sufren una excesiva acumulación de ácidos biliares hidrofóbicos que son considerados la causa principal de hepatotoxicidad (Gartung et al., 1996; Poli, 2000). Además, se produce un deterioro parcial de las funciones de la cadena transportadora de electrones mitocondriales y estrés oxidativo (Poli, 2000; Huang et al., 2003). La retención y el acúmulo de sales biliares hidrofóbicas (tauro- y glicoquenodesoxicolato) puede inhibir la actividad antioxidante hepática de catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reducido y superóxido dismutasa, así como inducir necrosis hepatocitaria al activar la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Orellana et al., 1997; Wang et al., 2007; Portincasa et al., 2007; Assimakopoulos et al., 2007; Arduini et al., 2011). Existe por tanto una estrecha relación entre la ictericia obstructiva experimental y el estrés oxidativo (Orellana et al., 1997; Assimakopoulos et al., 2004; Wang et al., 2007). Así, se ha demostrado que el tratamiento con antioxidantes mejora el estado redox celular hepático (Assimakopoulos et al., 2004; Soyly et al., 2006), y las funciones hepáticas al inhibir la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) (Soyly et al., 2006; Assimakopoulos et al., 2007; Portincasa et al., 2007; Tahan et al., 2007).

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 a la incorrecta utilización del oxígeno por la hepatotoxicidad de las sales biliares, constituirían factores etiológicos esenciales de la inhibición del metabolismo energético hepático. Como consecuencia, el hígado reduce su capacidad funcional para poder satisfacer las necesidades metabólicas tisulares. La lesión oxidativa hepática podría disminuir el contenido intracelular de proteínas que participan en la síntesis energética y en las funciones de membrana, como son las proteínas reguladoras del transporte de H₂O e iones (Portincasa et al., 2007), lo cual induciría edema intersticial y celular. Además, el aumento de peroxidación lipídica hepática, un marcador de estrés oxidativo (Portincasa et al., 2007), puede relacionarse con el aumento de

la permeabilidad de membrana, el aumento de la degradación de los componentes de la matriz extracelular y el edema (Kennett y Davies, 2007).

La acumulación intersticial de fragmentos de glicosaminoglicanos (GAGs) sería un importante mecanismo de la formación del edema debido a las propiedades hidrofílicas de GAGs, en particular de hialuronan (Day y de la Motte, 2005; Cantor y Nadkarni, 2006; Stern et al., 2006; Kennett y Davies, 2007; Yung y Chan 2007; Bartlett et al., 2007; Jiang et al., 2007). GAGs son largas cadenas de polisacáridos no ramificadas compuestas de unidades repetidas de disacáridos que tienden a adoptar conformaciones en espiral, muy extendidas 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 et al., 2007; Solís-Herruzo et al., 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 et al., 2007), 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 (Evanko et al., 2007). 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). La rigidez de la matriz extracelular y la tensión mecánica que resulta de la adhesión celular a sustratos rígidos es fundamental para determinar el fenotipo expresado por muchas células en cultivo (Bischofs y Schwarz, 2003).

En el modelo de fibrosis biliar por CCl_4 en la rata se ha descrito la inducción precoz de rigidez hepática. 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 et al., 2007). Este aumento precoz en la rigidez hepática podría ser la causa de la diferenciación de los miofibroblastos en las patologías hepáticas (Georges et al., 2007; Muddu et al., 2007). La expresión de la función miofibroblasto aporta a las células estrelladas hepáticas activadas la capacidad para comportarse como células musculares lisas y, por consiguiente, responden

a las sustancias vasoactivas contrayéndose (Lee y Friedman, 2010). Además, la contracción de las células estrelladas activadas regula el diámetro de la vascularización hepática y altera el flujo sanguíneo y la presión hepática (Winaw et al., 2008).

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 (Azouz et al., 2004; Morwood y Nicholson, 2006; Szabo et al., 2007; Muddu et al., 2007; Winaw et al., 2008). Sin embargo, el espacio intersticial parece ser el que modula la actividad inflamatoria de las células inmunes tras la ligadura del colédoco en la rata (Aller et al., 2008). 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; Adair-Kirk y Senior, 2008; Yung y Chan, 2007). Las metaloproteasas de la matriz (MMPs) son una familia de enzimas que degradan componentes de la matriz extracelular que son expresadas en los tejidos inflamados (Cuenca et al., 2006; Malemud 2006; Zitka et al., 2010; Löffek et al., 2011;) y, en particular, en el hígado colestásico (Harty et al., 2005; Bergheim et al., 2006). La destrucción enzimática de la matriz extracelular cursa con la liberación inmediata de los mediadores secuestrados en dicha matriz (Stern et al., 2006; Yung y Chan, 2007).

Los fragmentos de la matriz extracelular están constituidos por moléculas con funciones proinflamatorias que pueden potenciar la respuesta inmune activando la respuesta inmune innata y la adquirida (Morwood y Nicholson, 2006). Así, las proteínas de la matriz extracelular y el hialuronan ejercen una función proinflamatoria uniéndose a los receptores *Toll-like* (TLR)-4 y TLR-2 (Szabo et al., 2007), con activación del complejo regulador transcripcional NF κ B/I κ B α y la producción de citoquinas proinflamatorias, como TNF- α e IL-1 β , y de quimioquinas que inducen la activación y el reclutamiento intersticial de leucocitos (Morwood y Nicholson, 2006). Los linfocitos T, una vez activados, se polarizan hacia la producción de distintos perfiles de citoquinas (Zhu et al., 2010; Yagi et al., 2011). El tipo 1 (Th₁) sintetiza Interferon γ (IFN- γ) e IL-2 y, los de tipo 2 (Th₂) producen IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13. Las citoquinas Th₂ están

implicadas fundamentalmente en la mediación de la inflamación alérgica y los trastornos fibroproliferativos crónicos (Azouz et al., 2004).

Los macrófagos residentes en el hígado, o células de Kupffer, se localizan fundamentalmente en el área periportal del lobulillo y, debido a su localización, podrían desempeñar un papel fundamental en la lesión secundaria a isquemia-reperfusión (Kolios et al., 2006; Abu-Amara et al., 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 et al., 2005; Abrahám et al., 2008; Zandieh et al., 2011; Cheng et al., 2011).

Las células de Kupffer están claramente afectadas en la obstrucción biliar (Minter et al., 2005; Abrahám et al., 2008; Zandieh et al., 2011; Cheng et al., 2011) y muestran una activación de la fagocitosis y una marcada respuesta proinflamatoria frente a endotoxina y a la proteína de unión a lipopolisacárido (*lypopolysaccharide-binding protein*, LBP), ambas aumentadas en colestasis extrahepática (O'Neil et al., 1997; Minter et al., 2005; Kolios et al., 2006; Isayama et al., 2006; Minter et al., 2009; Kassel et al., 2011). La hipersensibilidad a endotoxina en colestasis es la causa de la síntesis aumentada de citoquinas proinflamatorias y del aumento de la peroxidación lipídica (Harry et al., 1999; Isayama et al., 2006; Abrahám et al., 2008), con agravamiento de la apoptosis que, finalmente progresa a necrosis (Moazzam et al., 2002; Lida et al., 2010). Sin embargo, la deplección de células de Kupffer agrava la inflamación y la necrosis hepatocelular en ratones con colestasis (Gehring et al. 2006). La respuesta proinflamatoria inducida por LPS en ratas con ligadura de coledoco es inhibida por lipoproteínas de alta densidad (HDL), que, a su vez, inhibe las vías proinflamatorias hepáticas, restaura la actividad de eNOS y reduce la presión portal (Thabut et al., 2007).

La inflamación se asocia siempre a la infiltración intersticial por leucocitos, un proceso que es regulado por quimioquinas (Aller et al., 2006; Mantovani et al., 2011). En la colestasis extrahepática monocitos/macrófagos infiltran el hígado, que hiperexpresa a su vez proteína quimioattractora de monocitos (*monocyte chemoattractant protein*, MCP-1), una quimioquina CC y, como resultado éstos monocitos favorecen la respuesta inflamatoria (Imamura et al., 2005; Sigal et al., 2010). Además, la colestasis extrahepática estimula la síntesis de quimioquinas CXC que son, en parte, responsables de la infiltración de los tractos portales por

neutrófilos (Saito y Maher 2000; Gujral et al., 2003; Patsenker et al., 2008; Aller et al., 2010a).

Los neutrófilos son componentes esenciales de la respuesta inflamatoria precoz a la agresión que sufre el hígado por colestasis (Shivakumar et al., 2004; Laschke et al., 2010; Jaeschke, 2011). En la colestasis extrahepática experimental la infiltración intersticial por neutrófilos ocurre ya a los tres días de la ligadura del colédoco (Levy et al., 1993; Gujral et al., 2003; Georgiev et al., 2008). Las células del epitelio biliar contribuyen a la inflamación produciendo quimioattractantes de neutrófilos (Saito y Maher, 2000; Dold et al., 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 et al., 2008)

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 et al., 2008). En ratas con ligadura de colédoco a largo plazo persiste una importante migración celular alrededor de la triada portal y de la vena central que se asocia con un aumento de citoquinas proinflamatorias en el hígado (Fernández-Martínez et al., 2009). Sin embargo, las citoquinas proinflamatorias inducen una respuesta hepatocitaria heterogénea al estímulo colestásico con una inhibición selectiva de los hepatocitos de la zona periportal (Donner et al., 2007).

Ambos tipos celulares presentes en el intersticio hepático, las células estrelladas y los miofibroblastos, tienen la capacidad de expresar un fenotipo inmune. En particular, las células estrelladas hepáticas 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 et al., 2007; Friedman, 2008; Wasmuth et al., 2010; Wasmuth y Weiskirchen, 2010). El alojamiento de leucocitos en el espacio intersticial hepático es favorecido por las células estrelladas hepáticas ya que éstas células expresan MMPs, lo cual aumenta la degradación de la matriz extracelular (Rockey, 2006; Gressner et al., 2007; Aller et al., 2010a; Day et al., 2011). Por lo tanto, las células estrelladas hepáticas

cambian su fenotipo contráctil a un fenotipo inmune. Se considera que éstos dos fenotipos están íntimamente relacionados, e incluso son interdependientes (Rockey, 2006).

La infiltración del hígado colestásico por células inflamatorias (monocitos, neutrófilos) también sería secundaria a traslocación bacteriana intestinal. Endotoxinas y bacterias de procedencia intestinal alcanzarían el hígado en elevadas concentraciones como consecuencia del aumento de la permeabilidad de la barrera mucosa intestinal (Balzan et al., 2007). La traslocación bacteriana intestinal es una complicación de la hipertensión portal y, por consiguiente, se produce en ratas con ligadura de colédoco (Garcia-Tsao y Wiest, 2004; Sztrymf et al., 2005; Karatepe et al., 2010; Huang CY et al., 2011). Las bacterias que colonizan la luz intestinal constituyen un gran reservorio de productos microbianos, como LPS, endotoxinas y otros fragmentos de la pared bacteriana, que son capaces de inducir la síntesis de citoquinas proinflamatorias (Garcia-Tsao y Wiest, 2004). Por lo tanto, la traslocación bacteriana es un mecanismo etiopatogénico de infecciones bacterianas en la colestasis experimental (Sztrymf et al., 2005; Abdeldayem et al., 2007). El aumento de la producción de TNF- α puede inducir traslocación bacteriana en ratas con cirrosis y ascitis ya que el bloqueo de TNF- α es capaz de inhibirlo sin aumentar la incidencia de infecciones sistémicas (Sztrymf et al., 2004; Francés et al., 2007; Aller et al. 2010c; Corradi et al., 2012)

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 (Kurz et al., 2003; Davis 2011; Geudens y Gerhardt, 2011). Aunque el objetivo final de la proliferación endotelial es formar nuevos vasos sanguíneos para el transporte de oxígeno, sustratos y células sanguíneas (fase vascular), el endotelio posee otras funciones antes de que los nuevos vasos se desarrollen (fase prevascular) (Aller et al., 2007a, Aller et al., 2007b). Así, en las fases iniciales de la respuesta inflamatoria (fenotipos de isquemia-reperfusión y leucocitario), las nuevas células endoteliales podrían adoptar una función anti-inflamatoria. Dichas propiedades, anti-oxidantes y anti-inmunes, favorecerían la resolución, así como la progresión al fenotipo angiogénico vascular (Aller et al., 2007b). La angiogénesis requiere la migración de células endoteliales al espacio

intersticial, con la consiguiente proliferación y diferenciación en capilares (Aller et al., 2007b).

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. Después de una semana de ligadura de colédoco, a pesar de la intensa proliferación biliar, el plexo arterial peribiliar mantiene su arquitectura normal. Por el contrario, 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 et al., 1996; Glaser et al., 2009; Glaser et al., 2011).

El papel fundamental que ejercen los colangiocitos en la angiogénesis que ocurre después de la ligadura del colédoco en la rata ha sido corroborado al asociar la ligadura de la arteria hepática a la colestasis por ligadura del colédoco. En ésta situación, el hígado sufre un aumento de 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 et al., 2006). Igualmente, en el trasplante de hígado en el ser humano la regeneración biliar se produce a expensas de una proliferación inicial del compartimento epitelial, seguido del compartimento vascular que parece ser inducido por la expresión epitelial de VEGF-A (Van den Heuvel et al., 2006).

5. TRATAMIENTO DE LA FIBROSIS HEPÁTICA

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 et al., 2011; Cohen-Naftaly y Friedman, 2011). 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 et al., 1997, Parola et al., 2008).

Se estima que 170 millones de pacientes sufren insuficiencia hepática crónica en el mundo y, de ellos un 25-30% desarrollarán fibrosis significativa y, eventualmente cirrosis. 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 y es también principal factor predisponente de carcinoma hepatocelular, que cursa a su vez con un 85-90% de mortalidad (Gupta et al., 1999)

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 et al., 2009; Hirschfield et al., 2010; Mormone et al., 2011; Cohen-Naftaly y Friedman, 2011; Solís-Herruzo et al., 2011; Hytioglou et al., 2012; Wynn y Ramalingam, 2012).

En realidad, la fibrosis es la consecuencia patológica común de muchas enfermedades inflamatorias crónicas y consiste en una acumulación excesiva de tejido conectivo fibroso (componentes de la matriz extracelular, como el colágeno y la fibronectina) en el interior y alrededor de un tejido inflamado y lesionado. Si éste proceso persiste, se convierte en una patología irreversible que causa una cicatrización permanente con disfunción orgánica e, incluso fallecimiento de los pacientes que sufren insuficiencia hepática o renal terminal, fibrosis pulmonar

idiopática y fracaso cardíaco (Paz y Shoenfeld, 2009; Wynn y Ramalingam, 2012).

La cascada de eventos que comportan el desarrollo de la fibrosis hepática se inicia con neocrosis y apoptosis hepatocitaria, en respuesta a la agresión repetida, que activan la señalización inflamatoria por medio de citoquinas y quimioquinas, la desregulación de la respuesta inmune , tanto innata como adaptativa, el reclutamiento de células inmunes, una transición epitelio-mesenquimal de tipo 2 con diferenciación de células epiteliales (los hepatocitos) en células mesenquimales y la activación de células fibrogénicas, todo lo cual culmina con un desbalance del turn-over de la matriz extracelular que favorece la síntesis excesiva y posterior depósito (Cohen-Naftaly y Friedman, 2011; Fragiadaki y Masson, 2011; Ellis y Mann 2012; Wynn y Ramalingam, 2012). Estos sucesivos procesos patológicos, unidos a la activación de las vías de regulación transcripcional y a alteraciones epigenéticas, constituyen elementos clave como dianas terapéuticas para intentar detener la progresión o, incluso, revertir la fibrosis, si bien en la actualidad el único tratamiento curativo de la cirrosis es el trasplante de hígado. Los análisis epidemiológicos predicen un pico de insuficiencia hepática crónica avanzada en la próxima década, con el subsiguiente aumento del número de pacientes que desarrollarán una insuficiencia hepática terminal y que precisarán por tanto un trasplante hepático. Sin embargo, el grave deterioro de los enfermos cirróticos y la escasez de órganos donantes limitan la aplicación de esta técnica quirúrgica. Además, el trasplante hepático se complica como resultado de incompatibilidades inmunológicas y porque no siempre es efectivo. Así, un grupo de pacientes que reciben un trasplante de hígado como tratamiento de la cirrosis vírica B o C, desarrollan una progresión fibrótica fulminante de la cirrosis en un plazo de 2-3 años (Poynard et al., 1997). Y, aunque indudablemente es la terapia de elección actual, el trasplante ortotópico de hígado sufre las consecuencias de la escasez de hígados donantes, de lesión intra- operatoria y de riesgo de rechazo del injerto. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas terapias médicas capaces de detener o revertir la fibrosis constituye un reto urgente que ha impulsado a numerosos autores a investigar en esta área de la hepatología (Hirschfield et al., 2010; Bissell 2011; Mormone et al., 2011; Ellis y Mann 2012; Russo y Parola 2012).

La fibrosis hepática crónica es por tanto un problema de salud de proporciones significativas. El desarrollo experimental de modelos preclínicos, en

particular en el ratón, han proporcionado una plétora de posible 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). Es cierto que existe un número creciente de publicaciones que sugiere que la fibrosis hepática puede revertir en todas las insuficiencias hepáticas crónicas, independientemente de su etiología, si se elimina su agente etiológico o se trata la patología de origen. Las evidencias más comunicadas de la regresión de la fibrosis hepática derivan de los estudios a largo plazo sobre los efectos de las terapias antivirales en la hepatitis C crónica. Los resultados de estos estudios indican que la regresión de la fibrosis hepática se asocia con mejoría de la sintomatología clínica de los enfermos, lo cual refuerza la regresión histológica demostrada como un fenómeno real (Bissell 2011; Ellis y Mann 2012; Hytioglou et al., 2012).

La resolución de la fibrosis probablemente es secundaria a un aumento de la actividad de colagenasas intersticiales y a una disminución de la expresión de TIMP, lo cual contribuye al aclaramiento de las células estrelladas hepáticas activadas. A su vez, la eliminación de estas células estrelladas activadas puede ser el resultado de apoptosis, especialmente en pacientes con hepatitis crónica C, senescencia y/o reversión hacia la quiescencia (González et al., 2009; Cohen-Naftaly y Friedman 2011; Friedman 2012, Figura 4). La senescencia celular es un programa genéticamente controlado que impide la división celular una vez que las células exceden su capacidad proliferativa finita. El perfil genético de las células estrelladas hepáticas senescentes está definido, en parte, por la inducción de p53, p21 y p16. Además, estas células senescentes son más susceptibles de ser destruidas por células Natural Killer (NK) (Krizhanovsky et al., 2008). Por último, la reversión de células estrelladas se asocia a la re-expresión de genes propios de un fenotipo quiescente, como son el receptor activado proliferador de peroxisoma ("*peroxisome proliferator activated receptor gamma*"; PPAR- γ) o sus ligandos (Hazra et al., 2004).

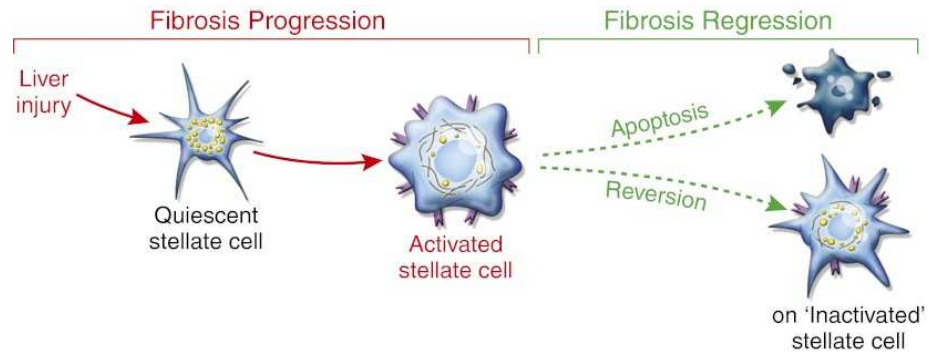


Figura 4: Fases de la activación de las células estrelladas secundaria a la agresión hepática, progresión y regresión de la fibrosis (Friedman et al., 2012).

Durante mucho tiempo, la fibrosis fue considerada un proceso irreversible, al menos clínicamente, siendo usualmente tratada con agentes anti-inflamatorios e inmunosupresores, como D-Penicilamina, Colchicina, Corticoides, Azatioprina, Mofetil micofenolato, Ciclofosfamida, Ciclosporina, antagonistas del receptor de Endotelina-1 (Bosentan), inhibidores de Angiotensina II o Tamoxifen, entre otros, pero siempre con resultados frustrantes (Paz y Shoefeld, 2010). Idealmente, la terapia para la fibrosis hepática debería de ser hepato-específica, selectiva para actuar sobre la cascada fibrogénica, incluyendo la inhibición del depósito de matriz extracelular, la activación de la degradación de la matriz, la estimulación de la muerte de las células estrelladas hepáticas (por necrosis o apoptosis) y además debería de ser bien tolerada si se administra durante periodos prolongados de tiempo (Mormone et al., 2011, Figura 5).

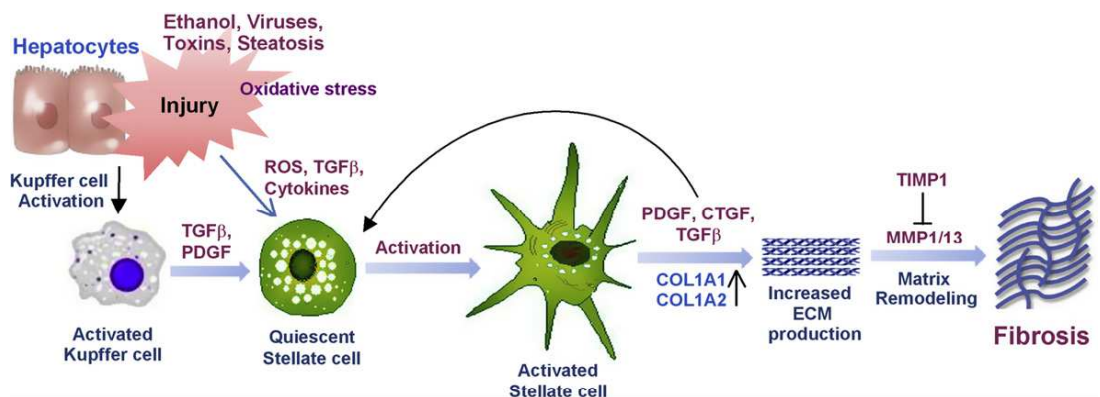


Figura 5: Conceptos “clave” implicados en la activación de las células estrelladas y patogénesis de la fibrosis hepática. **TGF:** “transforming growth factor” (factor transformador de crecimiento). **PDGF:** “platelet-derived growth factor”. **PDGF:** “platelet-derived growth factor” (factor de crecimiento derivado de plaquetas). **ROS:** “reactive oxygen species” (especies reactivas del oxígeno). **CTGF:** “connective tissue growth factor” (factor de crecimiento del tejido conectivo) **ECM:** “extracellular matrix” (matriz extracelular). **COL:** “collagen” (colágeno). **TIMP:** “Tissue inhibitor of Metalloproteinases” (inhibidor tisular de metaloproteinasas). **MMPs:** “Matrix metalloproteinases” (Metaloproteinasas de la matriz) (Mormone et al., 2011).

5. A. Terapia molecular de la fibrosis hepática

Existen diversas estrategias moleculares para diseñar agentes antifibróticos:

- Eliminar la causa de la lesión hepática y sus mediadores
- Reducir la inflamación y la respuesta inmune
- Intervenir en vías de señalización específicas: interacción ligando-receptor, señalización intracelular.
- Reducir la fibrogénesis, inhibir la síntesis de matriz extracelular.
- Resolver la fibrosis aumentando la degradación de la cicatriz o estimulando la apoptosis de las células estrelladas.

5.A.1. Eliminación de la causa de la fibrosis hepática y de sus mediadores

Hasta la actualidad la eliminación o el control de la etiología subyacente es el tratamiento antifibrótico más eficaz. Indudablemente las medidas terapéuticas que eliminan la causa específica de la lesión hepática (virus de la hepatitis B o C, alcohol, obstrucción de la vía biliar, esteatosis hepática...) reducen la fibrosis y estabilizan la función hepática (Bisell 2011). En este sentido, la terapia con interferón-gamma (γ -IFN) fue uno de los primeros agentes que demostró su efectividad para bloquear la fibrogénesis e inhibir la activación de las células estrelladas hepáticas en los pacientes con hepatitis vírica (Pockross et al. 2007). La eliminación del exceso de hierro en la hemocromatosis o del cobre en la enfermedad de Wilson, la abstinencia de alcohol, la descompresión de la vía biliar y la pérdida de peso en pacientes con NASH (*Non-alcoholic steatohepatitis*) son medidas capaces de inducir una reducción intensa de la fibrosis (Hammel et al. 2001; Dixon y Wells, 2004; Cohen-Naftaly y Friedman 2011).

5.A.2. Reducción de la inflamación y de la respuesta inmune

En pacientes con patología hepática colestásica, la administración de ácido ursodesoxicólico es el único tratamiento médico disponible. El efecto colerético

del ácido ursodesoxicólico, su capacidad para convertir el pool total de ácidos biliares más hidrofóbico, su efecto estabilizador de la membrana hepatocitaria, y sus acciones antioxidante y anti-apoptótica contribuyen a su efecto beneficioso, en particular en la cirrosis biliar primaria y en la colestasis obstétrica (Rockey 2008; Hirschfiel et al., 2010; Cohen-Naftaly y Friedman 2011).

Cuando los hepatocitos son lesionados liberan cuerpos apoptóticos, citoquinas y mediadores inflamatorios (Cohen-Naftaly y Friedman 2011, Figura 6). Por ello, la reducción de estos mediadores o la inhibición de la apoptosis hepatocitaria con fármacos anti-apoptóticos, como el inhibidor de Capasa 3, podrían ser medidas eficaces, pero desafortunadamente no han tenido éxito en la clínica por sus efectos secundarios (Cohen-Naftaly y Friedman 2011).

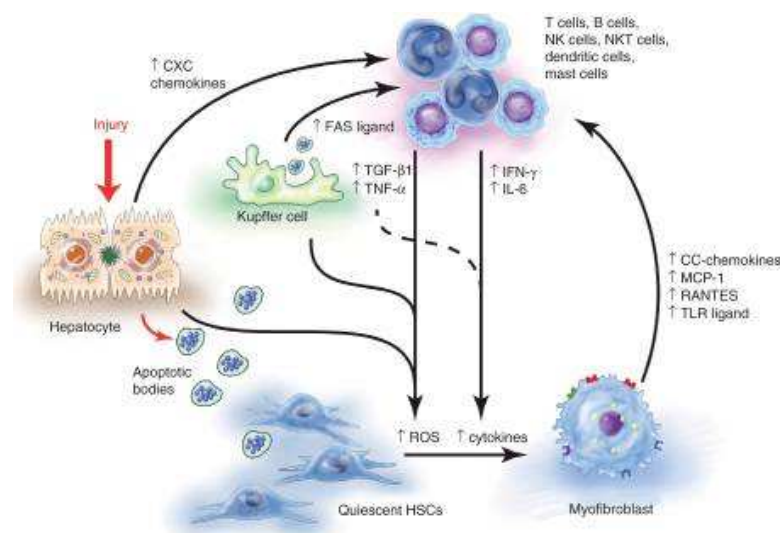


Figura 6: Cascada inflamatoria durante la fibrosis hepática. Los hepatocitos lesionados liberan cuerpos apoptóticos que son fagocitados por células de Kupffer y por células estrelladas hepáticas (HSCs), que a su vez inducen la activación de las HSCs. La estimulación paracrina por especies reactivas de oxígeno (ROS), quimioquinas y citoquinas también induce la activación de las HSCs. Las quimioquinas procedentes tanto de los hepatocitos lesionados como de las HSCs activadas también inducen el reclutamiento de células inflamatorias que potencian esta cascada inflamatoria. TGF: transforming growth factor (Factor transformador de crecimiento); ROS: reactive oxygen species (especies reactivas de Oxígeno); CXC: Chemokines (Quimioquinas); MCP: monocyte chemotactic proteína (proteína quimiotáctica de Monocitos); IL: Interleukin (Interleuquina); NKT: natural killer T cells (células T Natural Killer). NK; Natural killer cells; TNF: tumoral necrosis factor (Factor de necrosis tumoral); IFN: Interferon (Cohen-Naftaly y Friedman 2011).

Puesto que la inflamación persistente casi siempre termina en fibrosis, todos los fármacos que actúan inhibiendo la cascada inflamatoria poseen actividad anti-fibrogénica. Ya que el círculo vicioso de la formación de la cicatriz

se inicia por estrés oxidativo, reducir la formación de especies reactivas el oxígeno (ROS; “*Reactive Oxygen Species*”) también atenúa la respuesta inflamatoria que, a su vez reduce la activación de las células estrelladas hepáticas y la fibrogénesis y disminuyen la lesión hepatocitaria. Los compuestos antioxidantes incluyen suplementos dietéticos y fármacos que han sido probados en modelos animales y en ensayos clínicos, y son Vitamina E, Fosatidilcolina, S-adenosil- metionina (SAMe), silimarina, N-acetil-cisteína y resveratrol (Kawada et al. 1998; Sanyal et al 2010; Martínez-Chantar et al. 2002; Vercelino et al. 2010; Mormone et al. 2011). NADPH-oxidasa, una enzima que induce estrés oxidativo, es activada por angiotensina II (Ang II) en zonas inflamadas del parénquima hepático. La administración a largo plazo de Losartán, un inhibidor de la Ang II, reduce la expresión de NADPH-oxidasa, y los genes profibrogénicos de Colágeno I, metaloproteasa de la matriz-2 (*Matrix Metalloprotease-2*; MMP-2) y de uroquinasa (Colmenero et al, 2009).

Fármacos anti-inflamatorios como corticoides, colchicina e IL-10 han sido también probados para reducir la fibrosis hepática (Mormone et al. 2011). El uso de dexametasona en cultivos celulares reduce la señalización por TGF- β 1 en células estrelladas hepáticas (Bolkenius et al. 2004), pero su acción sobre las células de Kupffer acelera la fibrogénesis como consecuencia del aumento de TIMP-1 en ratas con ligadura del colédoco (Melgert et al. 2001). Esta respuesta dual enfatiza la complejidad de la señalización del proceso fibrogénico y la dificultad de utilizar un fármaco como los corticoides, que tiene múltiples mecanismos de acción (Cohen-Naftaly y Friedman 2011).

Otra estrategia anti-inflamatoria consiste en neutralizar las citoquinas pro-inflamatorias utilizando citoquinas anti-inflamatorias específicas y/o antagonistas de sus receptores, como los compuestos anti-TNF- α (Infliximab, Etanercept y Pentoxifinlina) para reducir las complicaciones y mejora el pronóstico, mas que para inhibir la fibrosis (Lebrec et al., 2010; Cohen-Naftaly y Friedman, 2011)

Fármacos anti-inflamatorios como corticoides, colchicina e IL-10 han sido también probados para reducir la fibrosis hepática (Mormone et al. 2011). El uso de dexametasona en cultivos celulares reduce la señalización por TGF- β 1 en células estrelladas hepáticas (Bolkenius et al. 2004), pero su acción sobre las células de Kupffer acelera la fibrogénesis como consecuencia del aumento de TIMP-1 en ratas con ligadura del colédoco (Mefert et al. 2001). Esta respuesta dual enfatiza la complejidad de la señalización del proceso fibrogénico y la

dificultad de utilizar un fármaco como los corticoides, que tiene múltiples mecanismos de acción (Cohen-Naftaly y Friedman 2011).

En la actualidad se ha demostrado que múltiples elementos que integran la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, participan en la diferenciación y activación de los fibroblastos. Por ello, la modulación de de éstos mecanismos inmunes implicados en la fibrogénesis están siendo propuesto como potenciales terapias para las frecuentes y graves patologías fibróticas que sufre el ser humano (Wynn y Ramalingam, 2012).

Ya que los miofibroblastos activados son las células que protagonizan la patogenia de las enfermedades fibróticas, diversas estrategias anti-fibróticas experimentales están intentando actuar sobre la activación, proliferación y/o reclutamiento de los fibroblastos, como Pirfenidona (Richeldi y Du Bois, 2011), anticuerpos contra TGF- β 1 (Nakanish et al., 2007) o contra CTGF o integrina $\alpha_v\beta_6$, que es responsable de la activación de TGF- β constitutivamente latente (Munger et al., 1999). Bortezomib, un inhibidor del proteasoma induce apoptosis de las células estrelladas hepáticas (Anan et al., 2006) y los inhibidores de proteinquinasa serina/treonina reducen el número de fibrocitos circulantes (Kralovics et al., 2005). Ya que los miofibroblastos que sintetizan componentes de la matriz extracelular son las células que protagonizan la patogenia común de las patologías fibróticas, cualquier terapia que bloquee con éxito su actividad podría poseer amplias propiedades anti-fibróticas (Wynn y Ramanlingam, 2012).

El bloqueo de mecanismos o moléculas proinflamatorias, como TNF- α o IL-17^a, los receptores de PDGF y VEGF, los inhibidores de Jaks, una familia de trosinaquinasa que transducen señales mediadas por citoquinas, están siendo investigadas en la fibrosis hepática (Raghu et al., 2008; Verstovsek, 2010; Wilson et al., 2010).

La respuesta inmune de tipo Th2 es un potente activador de la fibrosis progresiva (Wynn y Ramanlingam, 2012) y por ello los anticuerpos monoclonales humanizados IL-13 e IL-4 (Corren et al., 2011) están siendo probados por diversos laboratorios farmacéuticos.

Los macrófagos también ejercen una actividad profibrótica en las fases precoces de la respuesta de reparación tisular porque sintetizan mediadores inflamatorios que pueden aumentar la lesión tisular, como son IL-1 β , TNF- α y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, además de mediadores profibróticos, como TGF- β 1. Sin embargo, en los estadios tardíos de la reparación tisular, un

subtipo de macrófagos (M_2) se transforman en un fenotipo supresor que expresa diversos mediadores anti-inflamatorios, como IL-10, Arg 1, y ligandos -2 y Relm- α , que promueven la resolución de la respuesta inflamatoria (Murray et al., 2011; Wynn y Ramalingam, 2012). Por ello, anticuerpos monoclonales anti-CCL2 (MCP-1) implicados en el reclutamiento de monocitos (Ekert et al., 2011), de amiloide P sérico recombinante humano, también denominado Pentraxina 2, que inhibe la inflamación y la fibrosis al inducir la producción de IL-10 en macrófagos pro-resolución (M_2) (Castaño et al., 2009), inhibidores de elastasa de neutrófilos, inhibidores de deacetilasas de histonas, enzimas que regulan la transcripción genética de fibrocitos (McKinsey, 2012), son todas alternativas terapéuticas anti-fibróticas. En particular, la expansión de una población de células Treg-específicas de colágeno tipo V y la activación y/o el reclutamiento de poblaciones específicas de macrófagos son estrategias particularmente atractivas porque se fundamentan en la alteración del carácter de la respuesta inmune, más que en su simple disrupción, lo que podría poseer un efecto anti-fibrótico más prolongado (Wynn y Ramalingam, 2012).

5.A.3. Intervención en vías de señalización específicas: interacciones ligando-receptor y señalización intracelular.

El descubrimiento de la expresión de receptores nucleares y de membrana por las células estrelladas hepáticas ha impulsado nuevas posibilidades de terapias antifibróticas. Las posibles dianas son el sistema renina-angiotensina y los receptores de Serotonina, Canabinoides y endotelina 1 (ET-1), así como las vías de señalización intracelular en las que están implicados los receptores nucleares PPAR γ , Farnesoide X, receptor de Pregnano X y receptor hepático X. NF κ B también es una ruta de señalización crítica en el control de la supervivencia y las respuestas celulares de las células estrelladas hepáticas (Cohen-Naftaly y Friedman, 2011).

- Receptores neuroquímicos. Al menos tres clases de neurotransmisores son expresados por los miofibroblastos: Canabinoides, opioides y Serotonina, y cada uno de los cuales regula actividades fibrogénicas clave en la célula. Dos receptores de Canabinoides acoplados a proteína G (CB1 y CB2) son expresados en el hígado. El receptor CB1 está activado en los miofibroblastos y estimula la fibrosis, en tanto que la señalización a través del receptor CB2 es

antifibrótica, aunque puede amplificar la inflamación (Hezode et al., 2005; Julien et al., 2005; Deveaux et al., 2009). Por lo tanto, antagonizar CB1 es la estrategia anti-fibrótica más prometedora. En un estudio clínico de dos años de evolución, el antagonista CB1 Rimobanant consiguió una significativa pérdida de peso corporal y mejoró funciones metabólicas, disminuyó los triglicéridos y aumentó la sensibilidad a la Insulina, pero un elevado porcentaje de pacientes desarrollaron una depresión clínica como consecuencia del antagonismo del receptor CB1 en el SNC (Gelfaud y Cannon, 2006). Por ello, en la actualidad se están intentando sintetizar antagonistas del receptor canabinoide CB1 que no atraviesen la barrera hemato-encefálica.

Los opioides y sus receptores son otros potenciales dianas terapéuticas en pacientes con colangitis esclerosante primaria. Los opioides endógenos ejercen acciones proliferativas y profibrogénicas en las células estrelladas hepáticas (De Minicis et al., 2008). Naltrexona, un antagonista opiáceo es antifibrótico en modelos experimentales de fibrosis hepática (Ebrahinkhani et al., 2006). Los miofibroblastos humanos también expresan receptores de Serotonina que median proliferación y fibrogénesis. La antagonización con Metiofenina o Spiperona induce apoptosis de los miofibroblastos y reduce la fibrosis (Ruddell et al., 2006).

- Sistema Renina-Angiotensina.

La Angiotensina II (Ang-II) es un factor clave en la fibrogénesis. Ang-II es secretada por las células estrelladas hepáticas y se une al receptor AT1, también expresado por éstas células (Bataller et al., 2003b) e induce la contracción y proliferación y aumenta la síntesis de colágeno I (Tharaux et al., 2000). Consecuentemente, el bloqueo del sistema Renina-Angiotensina con inhibidores del enzima convertidor de Ang (IECAs) o por bloqueantes de los receptores AT1 podrían representar una interesante estrategia para el tratamiento de la fibrosis hepática que se están probando actualmente en la clínica humana. La Endotelina 1 (ET-1) y el óxido nítrico (NO) son importantes controladores de la contractilidad de las células estrelladas hepáticas. ET-1 es un potente vasoconstrictor hepático presente en elevadas concentraciones en la cirrosis hepática (Yokomori et al., 2011). El bloqueo de los receptores de ET-1 tipo A y la administración de vasodilatadores, como PGE₂ y donantes de NO, ejercen una actividad anti-fibrótica y reducen la hipertensión portal (Cho et al., 2000).

Las Adipoquinas contribuyen a las complicaciones de la obesidad, incluyendo el síndrome metabólico y la fibrosis hepática. Alteraciones metabólicas son consideradas el primer “hit” de la lesión hepática relacionada con la obesidad, seguido de estrés oxidativo e inflamación (Marra et al., 2005). La leptina y su antagonista, la adiponectina, son secretadas por el tejido adiposo y por células estromales, en particular por las células estrelladas hepáticas (Ikejima et al., 2007). Los niveles séricos de leptina se correlacionan con el grado de obesidad y promueve la fibrogénesis a través de la activación de la vía de señalización JAK/STAT (Choi et al., 2010). Por el contrario, los niveles séricos de Adiponectina se correlacionan inversamente con la grasa corporal y antagonizan la fibrogénesis (Wedemeyer et al., 2009).

Grelina, una hormona intestinal que regula la ingesta, disminuye en hepatopatías crónicas y se correlaciona con la expresión de genes profibrogénicos. Así, en ratas la administración de Grelina recombinante ejerce efectos hepato-protectores y antifibróticos en el hígado que deben ser comprobados en el ser humano (Moreno et al., 2010).

Muchas citoquinas proliferativas, incluyendo PDGF, FGF y TNF- α señalizan a través de receptores tirosina-quinasa, una familia de receptores moleculares de superficie que fosforilan residuos específicos de tirosina siguiendo a la unión con su ligando. La antagonización de vías mediadas por PDGF o VEGF reducen la proliferación de células estrelladas hepáticas (Gonzalo et al., 2007; Tugnes et al., 2007). Por ejemplo, Sorafenilo, un inhibidor múltiple de receptores tirosina-quinasa utilizado en el tratamiento del carcinoma hepatocelular, actúa sobre las vías de señalización del receptor PDGF y Raf/ERK (Wang et al., 2010). Gleevec y Nilotinilo, otros pequeños antagonistas tirosina-quinasa reducen la fibrosis hepática inhibiendo la fosforilación de ERK y Akt inducidas por PDGF y TGF- β (Yostriji et al., 2005; Liu et al., 2011). Las células estrelladas hepáticas expresan también diferentes receptores de factores de transcripción nucleares, incluyendo PPAR γ , FXR y PXR (Mann y Mann, 2009). Las Tiazolidonas, antidiabéticos orales agonistas de PPAR γ , reducen la síntesis de colágeno y la activación de las células estrelladas hepáticas (Galli et al., 2002). La unión de ácidos biliares a FXR (receptores hepáticos X) es anti-fibrótico al reducir la expresión de colágeno I (Fiorucci et al., 2004). Además, ésta cascada de señalización disminuye la supervivencia de las células estrelladas hepáticas activadas (Fiorucci et al., 2005).

5.A.4. *Inhibición de la fibrogénesis.*

La inhibición de la producción de matriz extracelular es una de las estrategias terapéuticas más interesantes y el número de citoquinas implicadas se amplía continuamente. TGF β_1 es el más potente inductor de colágeno I y de otros constituyentes de la matriz y, por lo tanto, la inhibición de sus acciones constituye un objetivo prioritario del tratamiento de la fibrosis hepática. La disrupción de la síntesis o de la actividad de TGF- β reduciría la síntesis de colágeno y la formación de tejido cicatricial y aceleraría la degradación de la matriz (George et al, 1999; Okuno et al, 2011). Se ha demostrado la existencia de una correlación directa entre los niveles plasmáticos de TGF- β_1 y el grado de fibrosis de Ishak, lo cual sugiere que dichas concentraciones circulantes constituirían un indicador de la necesidad de establecer un tratamiento de la fibrosis (Kim, 2011).

El medio-ambiente, la dieta y ciertos hábitos, son factores de riesgo para la progresión de la fibrosis. La cafeína ejerce un efecto antifibrótico posiblemente por antagonizar el receptor hepático de Adenosina A₂A y la adenosina generada por el metabolismo del etanol desempeña un papel muy importante en la esteatosis hepática inducida por etanol a través de los receptores A₁ y A₂B (Freedman et al., 2009; Modi et al., 2010; Robson y Schuppan, 2010). La cafeína inhibe la expresión de CTGF activada por TGF- β en los hepatocitos a través de vías dependientes de PPAR γ y SMAD2/3 (Gressner et al., 2008).

Se ha demostrado que varios compuestos herbáceos inhiben directamente la síntesis de colágeno, como Pirfenidona (Rockey, 2008), colchicina, una planta alcaloide con propiedades anti-inflamatorias (Nikolaidis et al., 2006). Este tipo de tratamiento es muy utilizado en Asia y precisa de mayor desarrollo en Occidente. La más prescrita es sho-saiko-to, que reduce la síntesis hepática de colágeno de tipos I y III y el contenido de hidroxiprolina (Sakaida et al., 1998). La salvia y la Curcumina (presente en el curry) son anti-fibróticos e inhiben la síntesis de matriz extracelular, suprimen la proliferación e inducen la apoptosis de las células estrelladas hepáticas (O'Connell y Rushworth, 2008).

Comparado con otras estrategias genéticas anti-sentido, como los oligonucleótidos anti-sentido, las ribozimas o DNA-zimas, los siRNA han demostrado ser más potentes inhibidores de cualquier gen diana con una elevada especificidad de secuencia (Agaard y Rossi, 2007). Por éste motivo, los

siRNA constituyen una poderosa alternativa terapéutica para tratar la fibrosis hepática en el futuro (Mormone et al., 2011).

La mayoría de los genes que deben ser modificados son los responsables de la activación y proliferación de las células estrelladas hepáticas, y los de la síntesis y/o depósito de colágeno, que son los marcadamente activados durante la fibrogénesis hepática, incluyendo CTGF, TGF- β 1, PDGF, TIMPs y el inhibidor -1 del activador de Plasminógeno (Hu y Xie, 2009). Sin embargo, estas moléculas intervienen en muchos procesos fisiológicos y su inhibición puede producir efectos adversos. Se ha conseguido el silenciamiento específico del gen de TGF- β 1 mediante siRNAs en células estrelladas hepáticas que reduce la producción de colágeno I, TIMP 1 y citoquinas inflamatorias (Cheng et al., 2009; De Vriese et al., 2006). La inhibición de los productos finales de la glicación avanzada de receptores (receptor for advanced glycation and products, RAGE) utilizando vectores siRNA específicos tiene importantes efectos anti-fibrogénicos. Mediante ésta técnica genética disminuye la síntesis de colágeno I y los niveles séricos de pro-colágeno tipo III, laminina y ácido hialurónico (De Vriese et al., 2006). La supresión de la expresión activada de NF- κ B y de la activación de las células estrelladas hepáticas mediante la inhibición de la degradación de I κ B α , la inhibición de la producción de matriz extracelular y la atenuación de la lesión hepática puede constituir una alternativa para prevenir la fibrosis hepática inhibiendo RAGE (Mormone et al., 2011).

En base a estudios recientes, los micro RNAs (MiRNAs) se han postulado como biomarcadores y como dianas terapéuticas. Los miRNAs pertenecen a una pequeña clase de pequeñas moléculas de RNA no codificantes que controlan la expresión de proteínas a nivel post-transcripcional (Nilsen, 2007). En la fibrosis hepática, la activación de las células estrelladas hepáticas, que es regulada por múltiples vías de transducción de señales, se considera un evento crucial. Por lo tanto, las proteínas de las vías de señalización implicadas podrían ser importantes dianas para los miRNAs (Mormone et al., 2011). Por análisis comparativo bioinformático de microarrays en células estrelladas hepáticas quiescentes y activadas, se ha comprobado que, cuando están activadas 13 vías de señalización están estimuladas y 22 inhibidas por miRNA (Guo et al., 2009). Estudiando fibrosis hepática con técnicas de microarrays se ha demostrado que miembros de la familia miR-29 media la regulación de fibrosis hepática experimental y está implicado en la señalización de TGF- β y NF- κ B en células

estrelladas hepáticas, con la subsiguiente activación de genes de matriz extracelular (Roderburg et al., 2011).

5.A.5. Resolución de la Fibrosis.

Se puede aumentar la degradación de la matriz extracelular, o bien estimular la apoptosis de las células estrelladas hepáticas. En el primer supuesto, posibles opciones terapéuticas son inducir la activación de enzimas endógenos que degradan la matriz extracelular rica en colágeno o administrar dichos enzimas utilizando terapia génica. MMP-8 y activador de Plasminógeno tipo uroquinasa inducen la degradación de colágeno in vivo (Siller-López et al., 2004; Salgado et al., 2000) y la activación de MMPs (MMP-8 y MMP-1) mediante su transfección con adenovirus mejora la fibrosis (Iimuro et al., 2003; Siller-López et al., 2004). Por otra parte, la inhibición de TIMP induce, no sólo la activación de MMPs, sino también reduce la supervivencia de las células estrelladas hepáticas, lo cual comporta la apoptosis y eliminación de las células fibrogénicas. Así, Polaorezina inhibe la expresión de TIMP-1 y TIMP-2 y atenúa la fibrosis (Sugino et al., 2008).

En el segundo caso, la eliminación de los miofibroblastos por apoptosis es uno de los fenómenos clave de la respuesta endógena hepática para eliminar las cicatrices. Las interacciones entre las células estrelladas hepáticas y la matriz circundante modula la producción de apoptosis. La degradación de la matriz fibrosa y, especialmente del colágeno I y de TIMP-I reduce las señales de supervivencia de las células estrelladas hepáticas. Por el contrario, el aumento de la supervivencia de las células estrelladas hepáticas puede ser el resultado de un aumento de la expresión de proteínas anti-apoptóticas, tales como Bcl-2 (Novo et al., 2006) y de factores de transcripción, en particular de NF- κ B. La inhibición de NF- κ B por gliotoxina, un derivado fúngico, por inhibidores de ACE y por sulfasalazina acelera la recuperación de la fibrosis (Pahl et al., 1996; Oakley et al., 2005). Los antagonistas de CB1 (Rimonabant) o de 5-HT también causan la apoptosis de los miofibroblastos (Ruddell et al., 2006). El reto actual es inhibir específicamente la supervivencia de los miofibroblastos sin lesionar los hepatocitos ni estimular el sistema inmune.

Otro tipo celular fundamental en éste proceso son las células NK, cuya acción es anti-fibrogénica. Su activación, por consiguiente, podría ser una novedosa alternativa terapéutica en el hígado fibrótico (Gao et al., 2009). Cuando

las células estrelladas hepáticas adoptan el fenotipo miofibroblasto pueden ser susceptibles a apoptosis inducida por las células NK, en parte mediante la inactivación del ligando inhibidor de células NK y la activación de los receptores TRAIL (Radaeva et al., 2006). Además, la producción de IFN- γ , un hito fundamental de la activación de las células NK, es otro importante mecanismo que contribuye a los efectos antifibróticos de las células NK. IFN- γ , no sólo inhibe directamente la activación de las células estrelladas hepáticas, sino que también potencia la citotoxicidad de las células NK contra las células estrelladas hepáticas mediante la activación de NKG2D y la expresión de TRAIL por las NK (Jeong et al., 2006). De hecho, la administración de IFN- γ a pacientes con hepatitis B reduce significativamente el grado de fibrosis (Weng et al., 2003).

Los múltiples intentos terapéuticos para prevenir y/o revertir la fibrosis implican la necesidad de idear estrategias anti-fibróticas integrales que intervengan simultáneamente sobre mediadores inflamatorios, citoquinas profibróticas, respuestas inmunes innata y adaptativa alteradas y sobre cambios intrínsecos celulares y/o tisulares intrínsecos. Estos tratamientos integrales serán probablemente la forma más exitosa de tratar esta patología tan compleja y tan difícil de manejar. Por este motivo, el futuro precisa incorporar terapias combinadas basadas en el fenotipado genético y biológico del estadio clínico de los pacientes diagnosticados de fibrosis para seleccionar los grupos de enfermos más homogéneos para aplicar ensayos específicos (Paz y Shoenfeld, 2010; Wynn y Ramalingam, 2012).

Diversos estudios están sugiriendo que, aunque la fibrosis está ligada inicialmente con una intensa respuesta inflamatoria, existen mediadores y vías de señalización inductoras de fibrosis que son diferentes de los mecanismos responsables de la inflamación. Por ello, quizás para diseñar terapias efectivas para la fibrosis debemos considerarla como un proceso patológico distinto de la inflamación. Además, ya que los mediadores inflamatorios están íntimamente relacionados con la reparación tisular y regulan tanto el inicio como la resolución de la fibrosis, es preciso separar los efectos beneficiosos de la inflamación para que la fibrosis pueda ser enlentecida o revertida y el tejido normal regenerado, que es el objetivo último de la investigación en fibrosis (Wynn y Ramalingam, 2012).

5.B. Terapia celular de la fibrosis hepática

Las consecuencias devastadoras de las enfermedades que cursan con fibrosis y los frustrantes resultados obtenidos, en general, con diversas combinaciones de fármacos anti-inflamatorios e inmunomoduladores ha impulsado la investigación de una posible alternativa terapéutica, como es la terapia celular de estas patologías. El tipo de células utilizadas son fundamentalmente tres: los hepatocitos, las células madre embrionarias y las células madre adultas. Muchos excelentes estudios sobre células madre, ingeniería de biomateriales y nanobiotecnología han obtenido resultados que prometen revolucionar el campo de la medicina regenerativa hepática. Conseguir imitar el sistema tisular hepático combinado con la ingeniería genética constituye una herramienta muy poderosa para conseguir la expansión ex vivo de las células madre, así como el mantenimiento de funciones especializadas para poder realizar en el futuro trasplantes personalizados (Li et al., 2013).

La terapia celular tiene el objetivo de reponer la población de células lesionadas para restaurar la función tisular. Este tipo de medicina regenerativa que consiste en restituir directamente las células perdidas se llevó a cabo con éxito por primera vez en 1956 con el primer trasplante de médula ósea y constituye la única terapia con células madre utilizada con éxito habitualmente en la clínica humana. Otros tipos de células madre adultas, entre las que destacan las células madre mesenquimales, que se pueden obtener de tejidos de fácil acceso, como la grasa, y que pueden transformarse en diversos linajes celulares, son objeto de intenso estudio y se están utilizando en numerosos ensayos clínicos (Cohen et al, 2011).

Una de las dificultades de la terapia celular consiste en disponer de una fuente y un número suficiente de células para trasplantar, además de lograr una eficiencia aceptable en la supervivencia del implante. Para resolver éste problema, las células madre adultas se aíslan y cultivan en laboratorio para multiplicar su número antes de ser trasplantadas. Sin embargo, en muchas ocasiones, el cultivo in vitro de las células afecta su capacidad de división y de diferenciación a largo plazo. Estas alteraciones son secundarias, en parte, a las limitaciones que existen para reproducir en el laboratorio el medio ambiente natural del organismo, donde existen factores de crecimiento, una matriz celular, el contacto con otros tipos celulares y una estructura tridimensional en la que ubicarse dentro del órgano. Por otra parte, la adaptación al cultivo genera un

estrés que aumenta el riesgo de mutaciones y otras aberraciones genéticas. Además, la terapia celular presenta los mismos riesgos de rechazo que los trasplantes, por lo que es necesario el tratamiento inmunosupresor y cierta compatibilidad entre donante y receptor (Eguizabal et al, 2013).

5.B.1. Terapia celular de la fibrosis hepática por trasplante de hepatocitos

Una alternativa al trasplante ortotópico de hígado como tratamiento convencional de las enfermedades hepáticas crónicas o terminales es el trasplante de hepatocitos humanos (THC) que permitiría mantener las funciones hepáticas hasta la obtención de un órgano donante y en determinados casos incluso lograr la regeneración hepática (Fisher y Strom, 2006; Nussler et al., 2006; Navarro-Alvarez et al., 2007; Smets et al, 2008; Puppi y Dhawan, 2009; Pareja et al., 2010). El trasplante de hepatocitos embrionarios adultos en ratas con insuficiencia hepática cirrótica por administración de tetracloruro de carbono o con hepatectomía parcial, implantados en el bazo o por vía portal, ha conseguido aumentar la supervivencia de los animales, reducir el grado de encefalopatía hepática y mejorar significativamente la función metabólica hepática (Arkadopoulos et al., 1998; Cai et al., 2002; Khawashita et al., 2008; Zhang et al., 2009). El THC se basa en el empleo de hepatocitos humanos adultos, viables y metabólicamente funcionales y consta de tres pasos: el aislamiento de los hepatocitos de hígados desechados para trasplante convencional, la preparación de las suspensiones celulares y, finalmente su implante en el receptor (Haridass et al., 2008; Pareja et al., 2010). Los hepatocitos humanos se aíslan normalmente de hígados rechazados para su trasplante ortotópico, como son los hígados con esteatosis y los procedentes de donantes en parada cardíaca del segmento IV hepático obtenido cuando se utiliza la técnica del trasplante de hígado dividido para dos receptores (Najimi y Sokal, 2005; Puppi y Dhawan, 2009; Puppi et al., 2012; Hughes et al., 2012). La viabilidad de los hepatocitos obtenidos depende del período de isquemia al que son sometidos. Por ello, en la actualidad se añade N-acetilcisteína a la solución de preservación de la Universidad de Wisconsin ya que consigue aumentar tanto la viabilidad celular como su función metabólica (Hughes et al., 2012).

Berry y Friend, en 1969, fueron los primeros en desarrollar el procedimiento para el aislamiento de hepatocitos de la rata mediante la perfusión del hígado *in situ* con colágenasa, un enzima proteolítico que digiere el parénquima hepático y

permite el aislamiento de sus componentes celulares (Mitry et al., 2002; Terry et al., 2006; Berry y Friend, 1969). En la actualidad y, en base a ésta técnica, los hepatocitos se obtienen por digestión del hígado con colagenasa a 37°C que se perfunde por la arteria hepática y la vena porta, determinándose su viabilidad mediante el test de exclusión del colorante azul tripán y la funcionalidad de las células mediante estudio metabonómico enzimático (síntesis de urea, actividad de citocromos P-450), con técnicas de Resonancia Magnética Nuclear espectroscópica y por la cuantificación no invasiva de la respiración celular mitocondrial (Pareja et al., 2010; Puppi et al., 2012; . Con éste método se obtienen entre 6×10^6 y 2×10^7 hepatocitos vivos/g de hígado (Donato et al., 2004; Donato et al., 2005; Pareja et al., 2010). Tras su aislamiento, los hepatocitos pueden administrarse en fresco o congelarse y, aunque la criopreservación permite su almacenamiento en bancos y su utilización diferida y repetida, la congelación induce una pérdida de su viabilidad y de su funcionalidad de hasta un 50% (Terry et al., 2006; Terry et al., 2007; Pareja et al., 2010; Puppi et al., 2012; Hughes et al., 2012). La criopreservación induce lesión mitocondrial, pérdida de la capacidad de síntesis de ATP con alteración de la capacidad de la cadena respiratoria, aumento de la permeabilidad mitocondrial y disminución de la respiración celular (Puppi et al., 2012). Para reducir estas alteraciones derivadas de la criopreservación de los hepatocitos se utiliza solución de Wisconsin con 10% de Dimetil sulfóxido como agente crioprotector (Pareja et al, 2010).

Por último, el implante celular se realiza mediante infusión a través de un catéter situado generalmente en la vena porta por punción transhepática percutánea, por cateterización de la vena mesentérica superior (Mitry et al., 2003; Pareja et al., 2010; Hughes et al., 2012) o, bien en la arteria esplénica o hepática (Najimi y Sokal, 2005), por el que se perfunden los hepatocitos suspendidos en un medio compuesto de un buffer de proteínas plasmáticas con agentes anticoagulantes y glucosa en condiciones de hipotermia, al que se puede añadir compuestos como la N-acetilcisteína, que reducen el estrés oxidativo y la apoptosis (Mitry et al., 2003; Pareja et al., 2010). Después de su inyección, los hepatocitos infundidos alcanzan los sinusoides hepáticos, penetran la capa de células endoteliales y el espacio de Disse para integrarse en el parénquima hepático (Najimi y Sokal, 2005). El hígado ofrece el medioambiente idóneo para la supervivencia de éstos hepatocitos infundidos hasta que colonizan el hígado, tanto por las características especiales del flujo sanguíneo hepático,

como por su matriz extracelular (Najimi y Sokal, 2005). Sin embargo, muchos de éstos hepatocitos se pierden después del trasplante por inflamación, lesión vascular e isquemia (Puppi et al., 2012). En ratas, el sistema inmune innato, representado en el hígado por las células de Kupffer y los neutrófilos, destruye más del 70% de los hepatocitos perfundidos durante las primeras 24 horas, independientemente de si las hepatocitos son singénicos o alogénicos (Joseph et al., 2002; Puppi et al., 2012). Inmediatamente tras el trasplante de los hepatocitos, se activa el factor tisular y, subsiguientemente, las cascadas de la coagulación y del Complemento (Hughes et al., 2012). Por ello, la administración de N-acetil-cisteína y de dextranos de bajo peso molecular pueden ser un importante factor profiláctico de ésta complicación precoz (Stephenne et al., 2005; Gustafson et al., 2011). Después de ésta fase inicial, las células humanas alogénicas supervivientes sufren la acción del sistema inmune adquirido y son principalmente atacadas por células T CD4⁺ y CD8⁺. En definitiva, tras la infusión de los hepatocitos en el receptor el porcentaje de células que se implantan con éxito es mucho menor que las obtenidas después de su aislamiento. Esta pérdida celular es también secundaria a apoptosis, posiblemente por anoikis o desaparición de la adherencia celular (Serralte et al., 2003; Zvibel et al., 2002; Gómez-Lechón et al., 2004; Hughes et al., 2012; Puppi et al., 2012).

Este es el motivo por el cual se ha ensayado a nivel experimental el trasplante de hepatocitos en localizaciones ectópicas, como en los espacios subrenal, subcutáneo o intramuscular, aunque la cavidad peritoneal es la única utilizada en la clínica humana (Puppi et al., 2012). El problema que presenta el peritoneo es que los hepatocitos trasplantados sufren la respuesta inmune del receptor y además, les falta anclaje y por ello no sobreviven bien en éste medio (Hughes et al., 2012). Para evitar su destrucción, los hepatocitos humanos actualmente se encapsulan en alginato y así pueden ser fácilmente administradas por vía intraperitoneal porque, al estar inmunoaisladas en sus microcápsulas forman islotes funcionantes (Najimi y Sokal, 2005; Puppi y Dhawan, 2005; Hughes et al., 2012). Así, cuando se cultivan éstas microcápsulas de hepatocitos en líquido ascítico de pacientes con insuficiencia hepática, mantienen la síntesis Albúmina y de Factor VII durante dos semanas (Philippeos et al., 2010).

El éxito del THC depende de la disponibilidad de hepatocitos viables y funcionales en número y calidad suficientes y del desarrollo de protocolos más

eficaces de criopreservación para optimizar los procesos de congelación/descongelación que, en la actualidad, inducen la pérdida de la viabilidad de gran número de los hepatocitos trasplantados. Además, en los pacientes cirróticos la masa celular hepática que se puede administrar es inferior al 5-10% de la masa hepática teórica ($200-400 \times 10^6$ cel/Kg de peso corporal) por el elevado riesgo de trombosis portal (Smets et al., 2008; Fisher y Strom, 2006). En éstos enfermos sólo se trasplantan un límite máximo de $30-100 \times 10^6$ células/Kg de peso corporal, lo cual implica la necesidad de buscar vías de administración alternativas, como la arteria esplénica o la vía intraperitoneal (Smet et al., 2008; Fisher y Strom 2006; Pareja et al., 2010)

Una de las mayores limitaciones para el desarrollo de programas clínicos de terapia celular hepática es la escasa disponibilidad de hepatocitos viables. Otro importante problema es aumentar la supervivencia y proliferación de los hepatocitos donantes en el hígado del receptor, habiéndose propuesto someter a éste hígado a isquemia/reperfusión asociado a irradiación previa o a una hepatectomía parcial (Haridass et al., 2008; Ott, 2010; Puppi et al., 2012) o la embolización de la vena porta (Puppi et al., 2012). La irradiación inhibe la proliferación de los hepatocitos del receptor, en tanto que promueve la proliferación preferente y la integración de los hepatocitos trasplantados mediante la supresión de la actividad de las células de Kupffer y la eliminación del ácido hialurónico por las células endoteliales sinusoidales (Hughes et al., 2012; Puppi et al., 2012). Sin embargo, la irradiación activa las células estrelladas hepáticas y, por tanto a largo plazo puede ser causa de fibrosis hepática (Sempoux et al., 1997). El hígado humano es muy radiosensible, una sola dosis de 30Gy aplicada a todo el parénquima puede producir un fallo hepático agudo por lesión endotelial y enfermedad veno-oclusiva (Puppi et al., 2012). Por eso, en la actualidad la irradiación hepática se debe aplicar en una única dosis y confinada a una porción de un lóbulo hepático y el tiempo óptimo para trasplantar los hepatocitos donantes son las primeras 24 horas post-irradiación, aunque el procedimiento tiene éxito hasta los 7 días (Puppi et al., 2012). La realización de una embolización reversible de la vena porta es un método menos invasivo para inducir la regeneración de los hepatocitos trasplantados y la hipertrofia de los lóbulos no embolizados. Se utiliza un material absorbible (gelfoam) que permite la re-permeabilización completa de la vena porta en un un período medio de 13 días. Este procedimiento se puede realizar

incluso en la clínica humana por vía percutánea (Puppi et al., 2012). Es posible que una combinación de irradiación hepática y embolización portal reversible constituya un método más seguro y más efectivo en el ser humano (Koenig et al., 2011; Hughes et al., 2012).

5.B.2. Terapia con células madre embrionarias

Durante los años 80 del siglo XX se realizó un logro importante que ofrece la posibilidad de solucionar la limitada fuente de células para terapia: el aislamiento y cultivo de células madre embrionarias de ratón. Realizar éste procedimiento en humanos requirió casi dos décadas más, en parte por la escasa disponibilidad de embriones y por las condiciones de cultivo más complejas respecto a las células de ratón (De Miguel, 2008).

Una célula madre es una célula indiferenciada con capacidad de dividirse y producir linajes celulares especializados. Una característica fundamental de las células madre es que pueden mantenerse (en el cuerpo o en una placa de cultivo) de forma indefinida, por lo que constituyen una fuente inagotable de vida. Dependiendo de su origen y grado de especialización se distinguen dos tipos principales de células madre: las embrionarias y las adultas. Las primeras son pluripotentes, es decir, tienen la capacidad de generar todos los tejidos del organismo; las segundas son multipotentes, proceden de un tejido diferenciado que puede dar lugar sólo a unos pocos tipos de células especializadas (De Miguel, 2008; De Miguel et al., 2010; Ihsikawa et al., 2010).

Las células madre embrionarias humanas se obtienen de embriones sobrantes donados por parejas que se han sometido a programas de fecundación in vitro. Se aíslan de la masa celular interna del embrión en etapa de blastocisto (entre 5 y 7 días, tras la fecundación) y, más tarde, a partir de las gónadas en desarrollo (células germinales en embriones de entre 6 y 8 semanas). Tras el nacimiento se pueden aislar células multipotentes del cordón umbilical o de ciertos tejidos del adulto (De Miguel, 2008; De Miguel et al., 2010). En el hígado, las células madre embrionarias son parte del compartimento extrahepático y debido a su capacidad pluripotente pueden constituir en el futuro una fuente de hepatocitos (Navarro-Alvarez et al., 2010). Además, estas células pueden diferenciarse in vitro en células funcionalmente similares a hepatocitos (*hepatocitos-like*) en condiciones específicas y similares a las del desarrollo embrionario (Banas et al., 2007b). Varias moléculas pueden activar esta

señalización, a través de las vías del receptor de activina A y Wnt3a, entre los que se incluyen activina A, factores de crecimiento fibroblástico (bFGF, aFGF y FGF10), proteínas morfogenéticas óseas (BMP2 y BMP4), ácido retinoico, factor de crecimiento hepatocitario (HGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), dexametasona, insulina-transferrina-selenio (ITS), oncostatina M, dimetilsulfoxido y butirato sódico, entre otros factores (Lavon y Benvenisty, 2005; Cai et al., 2007; Hay et al., 2008; Snykers et al., 2009).

Las células madre embrionarias humanas poseen dos propiedades excepcionales. Una es su gran capacidad de proliferación en cultivo, en tanto que las células madre adultas sólo se dividen un número determinado de veces, las embrionarias lo hacen de forma ilimitada, es decir, son virtualmente inmortales. Además, son pluripotentes, pueden originar cualquier célula del organismo adulto. Por el contrario, las células madre adultas, al ser multipotentes, generan un número limitado de tipos celulares (De Miguel, 2008; De Miguel et al., 2010). En 2006 Takahasi y Yamanaka fueron los primeros en demostrar la inducción de células madre pluripotentes (iPS) a partir de fibroblastos embrionarios o adultos de ratón añadiendo cuatro factores: factor de transcripción ligado a octámero 3/4 (*Oct3/4*), *sex-determining region Y box 2* (*Sox2*), homólogo del oncogen viral de la mielocitomatosis (*c-Myc*) y factor 4 Krüppel-like (*Klf4*) (Takahasi y Yamanaka, 2006). Si es posible la generación de células madre pluripotentes a partir de tejido adulto de un paciente individual, éstas células facilitarían mucho las aplicaciones terapéuticas de las células madre obviando los problemas de rechazo inmune que comporta el trasplante alogénico (Ishikawa et al., 2010). Se ha demostrado que las células iPS humanas son similares a las células madre embrionarias en su morfología, expresión genética, antígenos de superficie celular, y capacidad de auto-replicarse a largo plazo (Masaki et al., 2008).

Sin embargo, la pluripotencia, que hace tan valiosas las células madre embrionarias además de plantear problemas éticos, las hace difíciles de controlar en el laboratorio. Se desconoce el grado de diferenciación apropiado para el trasplante que facilitarían la integración y supervivencia en el tejido receptor. Las células menos diferenciadas podrían poseer mayor plasticidad, lo cual las permitiría integrarse más fácilmente en el organismo, pero al conservar las propiedades proliferativas típicas de las células indiferenciadas, podrían causar

tumores, como teratomas, en los receptores (De Miguel, 2008; De Miguel et al., 2010; Ishikawa et al., 2010).

5.B.3. Terapia con células madre mesenquimales adultas

Las células madre de origen mesenquimal (MSCs) son consideradas como uno de los tipos celulares más prometedores en términos terapéuticos. MSCs fueron aisladas con éxito por primera vez de médula ósea hace 20 años (Friedenstein et al., 1976), y posteriormente han sido aisladas de prácticamente la totalidad de tejidos fetales y adultos (Da Silva et al., 2006; Patel et al., 2013), como el bazo y el corazón (Hoogduljn et al., 2007), el páncreas (Baertschiger et al., 2008), músculo esquelético (Williams et al., 1999), cápsula sinovial (De Bari et al., 2001), líquido amniótico y placenta (In't Anker et al., 2003), pulpa dental (Gronthos et al., 2006), hueso (Kadiyala et al., 1997), cordón umbilical (Erices et al., 2000; Bieback et al., 2004), tejido adiposo (Zuk et al., 2002) y en general de todos los órganos conectivos adultos. Además, las MSCs se han convertido en una herramienta poderosa en Medicina regenerativa por dos razones. La primera, es que pueden crecer en medios de cultivo conservando su capacidad multipotencial (Pittenger et al., 1999), aunque se almacenen por largo tiempo (Parekkadan y Milwid, 2010) y, la segunda, es que son capaces de diferenciarse (o transdiferenciarse) en diferentes tipos celulares como osteoblastos, condrocitos, adipocitos, miocitos, cardiomiocitos, hepatocitos, células epiteliales, células endoteliales y neuronas (Thomson et al., 1998; Pittenger et al., 1999; Lee et al., 2004; Ren et al., 2010). Además, no inducen reacciones adversas tras su trasplante alogénico (Parekkadan y Milwid, 2010) y existen evidencias de que la mayoría, si no todas, pueden derivarse de un nicho perivascular común (Caplan, 2008). No existe un anticuerpo específico anti-MSc, lo que se traduce en que las MSC no son un grupo celular homogéneo (Patel et al., 2013). Por el contrario, es su heterogeneidad lo que las hace difíciles de caracterizar (Dominici et al., 2009). Los investigadores utilizan diferentes métodos de aislamiento y crecimiento, así como una amplia gama de protocolos, lo cuál hace difícil la comparación y el contraste de resultados entre distintos estudios. La Sociedad Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy*, ISCT) ha establecido los criterios para definir las MSCs (Dominici et al., 2008). En primer lugar, las MSCs deben ser plásticas-adherentes en condiciones estándar de cultivo. En segundo lugar, deben expresar CD105, CD73 y CD90, y no

expresar CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α y CDA19 y el receptor celular de superficie HLA-DR, del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase II. Finalmente, deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condroblastos (Patel et al., 2013). Por tanto, las MSCs poseen potencial para la diferenciación mesodérmica (osteogénica, condrogénica y adipogénica), ectodérmica (neurogénica) y endodérmica (hepatogénica y células de los islotes beta pancreáticos) mediadas por factores genéticos y ambientales (Patel et al., 2013).

La migración de las MSCs hacia los tejidos lesionados parece estar mediada por quimioquinas, en particular por el factor 1 derivado de células estromales (*stromal cell derived factor*; SDF-1) y por integrina β 1. De hecho las MSCs humanas expresan receptores para las quimioquinas CCR1, CCR4, CCR7, CCR9, CCR10, CXCR1, CXCR3, CXCR4, CXCR5 y CX3CR1 (Granero-Molto et al, 2008; Patel et al., 2013). Para colonizar las zonas lesionadas las MSCs utilizan mecanismos de migración transendotelial similares a los usados por los leucocitos, adhiriéndose al endotelio vascular mediante un restringido grupo de moléculas de adhesión, como selectina P, integrina β 1 y molécula de adhesión al endotelio vascular-11 (*vascular cell adhesion molecule-1*; VCAM-1) (Rüster et al., 2006). Aunque los mecanismos de migración e implante de las MSCs no se conocen en profundidad actualmente, si se acepta que un medio ambiente anti-inflamatorio es más propicio para el implante de las MSCs humanas que un entorno pro-inflamatorio (Freytes et al., 2013).

Respecto del mecanismo de acción de las MSCs parece estar mediado por múltiples moléculas que actúan de forma sinérgica o alternativa dependiendo de las condiciones medioambientales a las que son expuestas (Patel et al., 2013). Además de su capacidad de funcionar como células estructurales, cuando se diferencian en el tipo celular correspondiente al tejido lesionado reemplazando diversos tejidos, como cartílago, hueso, tendones, vasos, nervios y parénquimas hepático y renal (Aronin y Tuan, 2010), las MSCs han demostrado que pueden realizar una modulación endógena tisular secretando un amplio espectro de moléculas bioactivas (Phinney y Prockop, 2007), que estimularán células progenitoras. Así, las MSCs liberan múltiples citoquinas, entre las que se incluyen TGF- β , IL-10, IL-6, ciclooxigenasa-1 (COX-1) y COX-2, responsables de la síntesis de prostaglandina-E2 (PEG2). Además, las MSCs inhiben la diferenciación de las células dendríticas mediante la secreción de IL-6 y reducen

la inflamación tisular secretando IL-10, TGF- β 1 e IL-6 (Djouad et al., 2007; Patel et al., 2013). Las MSCs también tienen funciones proangiogénicas y anti-fibróticas (Shyu et al., 2006; Jackson et al., 2012) mediante la secreción de factor de crecimiento básico fibroblástico (bFGF), VEGF-A y Adrenomedulina, entre otros, que promueven la proliferación de células endoteliales microvasculares (Gruber et al., 2005; Au et al., 2008). Sus propiedades anti-fibróticas se derivan de la producción de factor de crecimiento hepatocitario (HGF), IL-10, Adrenomedulina y MMP-9, que promueven la lisis de la matriz extracelular y la inhibición de la diferenciación de los miofibroblastos (Kanemura et al., 2008; Kim et al., 2011; Jackson et al., 2012).

La expresión de estos factores por MSCs induce una variedad de respuestas: la supervivencia y proliferación de células endógenas (Prockop, 2007); inhibición de la respuesta inflamatoria e inmune; reducción de la apoptosis (Hung et al., 2007); e incluso la transferencia de mitocondrias (Spees et al., 2006). Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual las MSCs administradas permanecen en los tejidos lesionados y mantienen el fenotipo diferenciado apropiado ya que gran cantidad de la población trasplantada sufre apoptosis en las fases iniciales o migran a los pulmones y el hígado (Patel et al., 2013). Tras estudios en lesiones cerebrales y cardíacas, se ha sugerido que la presencia transitoria de las MSCs parece ser suficiente para que ejerzan sus efectos terapéuticos. Además, las MSCs residentes también suprimen los sistemas de vigilancia inmunitaria y crean un medioambiente ideal para la reparación tisular secretando factores que lo alteran (Aronin y Tuan, 2010; Patel et al., 2013). Múltiples estudios clínicos han evaluado la terapia con MSCs en distintos ámbitos. Así, la capacidad de inmunosupresión de las MSCs, ha orientado la terapia celular en base a dos aspectos fundamentales: la supresión de la respuesta inmune en enfermedades autoinmunes, y la posibilidad de prevenir o tratar el rechazo de un órgano trasplantado. Específicamente, las MSCs han demostrado su efectividad en diferentes patologías, como la diabetes mellitus, el infarto cardíaco, la fibrosis/cirrosis hepática, la fibrosis renal, la osteogénesis imperfecta, y enfermedades auto-inmunes, como el rechazo de injerto contra huésped, la enfermedad de Crohn, la encefalomiелitis y la esclerosis múltiple (Le Blanc et al., 2005; Kebriaei et al., 2009; Kharaziha et al., 2009; Shabbir et al., 2010; Peng et al., 2011; Ezquer et al., 2012; De Santiago et al., 2012; El Ansary et al., 2012; Wise y Ricardo, 2012; Dalai et al., 2012; Bonab

et al., 2012). En la prevención del rechazo del injerto las MSCs evitan la activación de las células T (English et al., 2010; English y Wood, 2013). La combinación de MSCs y dosis bajas de inmunosupresores disminuirían el rechazo del injerto y aumentaría la funcionalidad a largo plazo de éste. Ya se están realizando estudios clínicos en humanos evaluando esta novedosa y prometedora terapia (Roemeling-van Rhijn et al., 2012; Casiraghi et al., 2013). Así, la administración de MSCs junto con Ciclosporina A disminuye el rechazo de injertos cutáneos (Sbano et al., 2008; Khosrotehran et al., 2013), de islotes pancreáticos (Kim et al., 2011; Hematti et al., 2013), de corazón, en el cual las menores cifras de rechazo se obtenían con la administración de MSCs en combinación con rapamicina (Eggenhofer et al., 2011) y de riñón (Lee et al., 2013).

La enfermedad injerto contra huésped es una complicación severa que se produce tras el trasplante alogénico de MSCs de origen hematopoyético, y es producido por las células T del donante. Basado en el efecto inmunosupresor de las MSCs mediado por la inhibición de las células T, se han publicado varios estudios clínicos en los que se ha comprobado la eficacia del tratamiento con MSCs de la enfermedad injerto contra huésped resistente a la terapia con corticoides (Prasad et al., 2011; Ringden et al., 2006; Kim et al., 2013). La enfermedad injerto contra huésped ha sido reproducida experimentalmente mediante la inyección de células madre de origen hematopoyético y esplenocitos del donante en ratones previamente irradiados. Las células madre mesenquimales provenientes de médula ósea y tejido adiposo previenen o disminuyen la enfermedad injerto contra huésped (Yañez et al., 2006). Se ha comprobado en estudios experimentales que las MSCs no se diferencian en células del tejido lesionado, pero sí provocan una disminución en la respuesta de las células Th1 y por tanto del rechazo del huésped (Kim et al., 2011). Por tanto, estos datos confirmarían la utilidad de una posible terapia con MSCs, bien solas o en combinación con dosis subterapéuticas de inmunosupresores, en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y en el rechazo del trasplante de órganos (Fan et al., 2013).

Asimismo, algunos ensayos clínicos con MSCs derivadas de médula ósea ya han empezado a aportar los primeros datos positivos en pacientes en los que la terapia convencional inmunosupresora no es eficaz. Por ejemplo en pacientes

con enfermedad de Crohn (Duijvestein et al., 2010; van Deen et al., 2013), lupus (Liang et al., 2010; Wang et al., 2012) o esclerosis múltiple (Karussis et al., 2010; Ryu et al., 2013). Otros ensayos clínicos están en fase de reclutamiento como es el caso de la colitis ulcerativa, la artritis reumatoide o la diabetes tipo I (www.clinicaltrials.gov). La terapia con MSCs es capaz de mejorar los síntomas de las enfermedades autoinmunes e inflamatorias mediante a inhibición de la respuesta inmune periférica, disminuyendo la infiltración de linfocitos T en las zonas afectadas y la producción de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas. Además de evitar estos procesos indeseables, esta terapia es capaz de promover la aparición de una respuesta tolerogénica aumentando el número de linfocitos T reguladores y la producción de citoquinas antiinflamatorias por parte de éstos (De Miguel et al., 2011).

En pacientes trasplantados, la administración sistémica de MSCs (generalmente procedentes del donante) previa al trasplante, tanto en monoterapia como en combinación con agentes inmunosupresores como la ciclosporina A, la rapamicina o el micofenolato, administrados de forma subterapéutica, ha demostrado ser de gran utilidad para aumentar la supervivencia del trasplante (English y Wood, 2013; Reading et al., 2013). El mecanismo de acción de las MSCs en estos casos parece ser el aumento en la generación de linfocitos T reguladores y de células dendríticas tolerogénicas, así como la prevención de la activación de los linfocitos T.

El campo en el que los ensayos clínicos están más avanzados es el del trasplante de médula ósea y la prevención y tratamiento de la enfermedad del injerto contra huésped (*Graft versus Host Disease*, GvHD). Existen varias publicaciones con grupos reducidos de pacientes con GvHD que no responden a terapias inmunosupresoras convencionales, que sin embargo demuestran resultados muy positivos mediante la administración de MSCs, que incluso llegan a conseguir una remisión completa de a enfermedad (Fang et al., 2006, 2007; Kim et al., 2013). Dos ensayos clínicos más se han centrado en la enfermedad injerto contra el huésped, una aplicación que no es sorprendente teniendo en cuenta la eficacia de las MSC derivadas de la médula ósea a nivel clínico, y la similitud en las propiedades inmunomoduladoras entre ambas fuentes de células madre (Puissant et al., 2005; Tobin et al., 2013).

Además de esta capacidad de regeneración tisular, las MSCs son inmunoprivilegiadas debido a su baja expresión del complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (MHC-II) y de moléculas inmunoestimuladoras en su superficie, lo cual las convierte en invisibles para el sistema inmune. Además, las MSCs poseen capacidad inmunoreguladora y pueden ejercer un efecto inmunosupresor en diferentes circunstancias. Esta enorme plasticidad combinada con su capacidad de regular la actividad de células del sistema inmune las hace extremadamente valiosas en la terapia con células madre de un amplio abanico de enfermedades, como hemos descrito anteriormente.

Hay evidencias que sugieren que las MSCs tienen propiedades inmunosupresoras. En el año 2000 dos grupos de investigadores demostraron que las células madre de origen mesenquimal obtenidas de médula ósea de humano e inyectadas en localización intraperitoneal, eran capaces de sobrevivir durante más de 1 año en un feto bovino, una vez que éste había desarrollado capacidad inmune, sin provocar rechazo alguno (Lyehty et al., 2000; Almeida-Porada et al., 2000). Más sorprendente fue el inesperado efecto inmunosupresor que las MSCs mostraron tanto *in vitro* como *in vivo*, en el ratón, el mandril y en humanos, incluso a través de un mecanismo independiente del MHC, a pesar de las diferencias entre especies (Bartholomew et al., 2002; Di Nicola et al., 2002; Lee et al., 2002; Djouad et al., 2003). Además, después de una administración sistémica, las MSCs alcanzan casi todos los órganos (Devine et al., 2003), aunque muestran preferencia por los tejidos lesionados, con presencia de inflamación y por los órganos linfoides (Zappia et al., 2005; Ge et al., 2009; Yagi et al., 2010). Todas estas propiedades de las MSCs las hacen candidatas a su utilización en terapia inmunomoduladora. Desde entonces, se ha obtenido mucha información sobre diferentes aspectos relativos a la capacidad inmunomoduladora de las MSCs. De esta manera, se pueden distinguir distintos tipos de respuesta inmune, así como diferentes variedades de células y moléculas implicadas. Lo más interesante es que la inmunosupresión mediada por las MSCs no es exclusivamente resultado de su efecto inhibitorio directo, sino que implica también el reclutamiento de otras células inmunorreguladoras (De Miguel et al., 2012; Li et al., 2012; Patel et al., 2013).

Para ejercer su efecto inmunosupresor las MSCs son capaces de inhibir el reclutamiento, la proliferación y la actividad biológica de los mastocitos, las células T y B y los linfocitos *Natural Killer* estimulados por IL-2 o IL-15, con lo

cual atenuan la respuesta inmune aguda a la agresión (Corcione et al., 2006; Sotiropoulou et al., 2006; Ren et al., 2008; Brown et al., 2011; Jackson et al., 2012). Se ha demostrado que las MSCs inhiben la activación y la proliferación de los linfocitos en respuesta a antígenos alogénicos y que, además inducen el desarrollo células T reguladoras CD8⁺ (Treg), las cuales a su vez pueden suprimir estas respuestas de los linfocitos y prohibir la diferenciación de progenitores de monocitos y de CD34⁺ en células dendríticas presentadoras de antígenos (Djouad et al., 2003; Djouad et al., 2007; Patel et al., 2012). Las células T estimuladas en presencia de MSCs quedan paralizadas en la fase G1 del ciclo celular al inhibir la ciclina D2 (Glennie et al., 2005). Las MSCs también alteran la activación, la proliferación, la secreción de IgG, la diferenciación, la síntesis de anticuerpos y el comportamiento quimiotáctico de los linfocitos B (Aronni y Tuan, 2010). Por último, la expresión de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), CD40 y CD 86 por las células dendríticas en proceso de maduración son inhibidas también por las MSCs (Aronni y Tuan, 2010). Sin embargo, varios estudios sugieren que los efectos inmunomoduladores de las MSCs no son universales, sino que el fenotipo que expresan es transitorio y depende del contexto en el cual se encuentran. Por lo tanto, el medioambiente inflamatorio alteraría la polarización de las MSCs hacia un fenotipo inmunosupresor o inmunoestimulador (Dazzi y Krampera, 2011). Recientemente se ha demostrado que el efecto inmunosupresor de las MSCs puede ser parcialmente mediado por quimioquinas y factores inmuno-inhibidores, como el óxido nítrico, la indoleamina-2 y la 3-dioxigenasa (Ren et al., 2008).

Existe una gran controversia en cuanto a la posibilidad de que las MSCs puedan degenerar en la formación de tumores. La causa podría estar en su inestabilidad cromosómica, degenerando directamente en génesis tumoral (Miura et al., 2006) o bien en el efecto inmunosupresor que las MSCs ejercen en el tejido sobre el que asientan. Además, se ha podido comprobar en diferentes estudios experimentales que las MSCs favorecen el crecimiento de las células tumorales, cuestión que debe ser tenida en cuenta cuando se lleve a cabo terapia con MSCs (Jung et al., 2013). Por el contrario, también se ha propuesto la utilización de MSCs tratadas previamente con genes antitumorales para atacar directamente las células cancerosas y así reducir la progresión tumoral. Estas MSCs conteniendo genes antitumorales son capaces de localizar el tumor independientemente de su tipo y de su grado de invasión y de liberar los agentes

anticancerosos (Hu et al., 2010; Dai LJ, et al., 2011; Studeny et al., 2012) Afortunadamente, los estudios clínicos realizados hasta ahora no han reportado efectos adversos en un número significativo de pacientes y, por lo tanto el uso terapéutico de MSCs puede ser considerado seguro (Gjorgieva et al., 2013). Sin embargo, son precisos datos que ratifiquen su seguridad y su inmunogenicidad en animales inmunosuprimidos a largo plazo, así como la fuente de su obtención y el número de células que deben ser infundidas (Yi y Song, 2012).

5.B.4. Terapia con células madre mesenquimales derivadas de adipocitos

Las células madre mesenquimales adultas (MSC), originalmente derivadas del estroma de la médula ósea, han demostrado su capacidad de diferenciación en distintos linajes de células mesodérmicas como los adipocitos, condrocitos, mioblastos u osteoblastos (Grigoriadis et al., 1988; Ferrari et al., 1998; Pittenger et al., 1999). También son capaces de diferenciarse en derivados del neuroectodermo (Woodbury et al., 2000) y del endodermo (Schwartz et al., 2002). Por todo ello, este tipo celular representa una herramienta terapéutica muy interesante en el campo de la regeneración tisular. Sin embargo, uno de los mayores inconvenientes del empleo de células MSCs extraídas de la médula ósea es que el método para obtener el tejido suele ser doloroso, requiere anestesia general o epidural y, tras el procesamiento de la médula, el rendimiento obtenido es bajo (1 MSC por cada 10^5 células estromales adherentes obtenidas) (Gronthos et al., 2001). Por tanto, estas células han de pasar por expansión celular *ex vivo*, que retrasa, encarece, y dificulta el proceso, además de incrementar el riesgo de contaminación durante el procedimiento.

Por tanto, el tejido ideal a utilizar como fuente de células madre adultas debería: 1. tener la capacidad de generar células con posibilidad de diferenciación múltiple semejante a las MSCs de médula ósea; 2. ser de fácil obtención, por procedimientos poco iatrogénicos; y 3. producir un número suficiente de células madre para no tener que someter a éstas a procesos de expansión excesivamente largos (Arnalich-Montiel, 2008).

El tejido adiposo humano es una fuente ideal de MSC ya que cumpliría todas las anteriores premisas; es decir, capacidad de diferenciación de las MSC en múltiples estirpes celulares, fácil accesibilidad al tejido, y alto rendimiento celular. Zuk y cols. fueron los primeros en demostrar en el año 2000 el potencial

de las células madres derivadas de células adipocíticas (AD-MSCs) para diferenciarse en múltiples linajes celulares (Zuk et al., 2001; Zuk et al., 2002) y Seo y cols. describieron por primera vez la diferenciación con éxito de éstas AD-MSCs en hepatocitos (Seo et al., 2005). Diferentes estudios han demostrado la capacidad de diferenciación de estas células, similar a la ya descrita para las MSC aisladas del estroma de médula ósea, a células tan diversas como mioblastos, adipocitos, osteoblastos, condroblastos, neuronas, hepatocitos y células epiteliales, entre otras (Zuk et al., 2001; Zuk et al., 2002; Gimble y Guilak 2003; Ogawa et al., 2004; Brzoska et al., 2005; Seo et al., 2005).

En todos los contextos, es importante considerar el potencial uso autólogo y alogénico de las células madres derivadas de células adipocíticas (AD-MSCs). Las AD-MSCs autólogas ofrecen ventajas desde el punto de vista regulatorio, de histocompatibilidad e infeccioso, ya que, al igual que las MSCs derivadas de la médula ósea pueden ser aisladas ex vivo, expandidas y trasplantadas de nuevo en un mismo paciente. Este autotrasplante obvia problemas éticos y el rechazo inmunológico (Ishikawa et al., 2010). Además, es posible obtener un número suficiente de células del tejido adiposo mediante un procedimiento mínimamente invasivo y sin peligro de efectos adversos para el paciente (Ishikawa et al., 2010). Las AD-MSCs son muy similares a las MSCs derivadas de la médula ósea. Estas células son CD45⁺, CDCD34⁺ y CD105⁺ (De Ugarte et al., 2003; Wagner et al., 2005).

Puesto que a menudo no es factible disponer de productos celulares autólogos para un paciente, recientes estudios apoyan la evaluación del trasplante alogénico de las AD-MSCs. Estudios independientes de tres laboratorios diferentes han determinado que las AD-MSCs humanas cultivadas, a diferencia de las células de la fracción vascular estromal (SVF) adiposa aisladas, reducen la expresión de sus antígenos de histocompatibilidad de superficie y no estimulan reacciones linfocitarias mixtas cuando se co-cultivan con los monocitos de la sangre periférica alogénica. Si esto se confirma, este hallazgo tendría un profundo impacto en la aplicación de las AD-MSCs en el trasplante alogénico. La disponibilidad inmediata de estas células alogénicas, vía banco celular, permitiría a los médicos usarlas directamente en el momento de utilizarlas, por ejemplo en la sala de operaciones, en vez de limitar su uso a procedimientos electivos.

Además, las AD-MSCs pueden ser usadas clínicamente tras una mínima manipulación (sin cultivos celulares), sin necesidad de ser incluidas en ensayos clínicos.

5.B.4.a. *Aplicaciones de las células madre mesenquimales derivadas de adipocitos (AD-MSCs)*

Las células madre poseen diversas formas de actuación terapéutica, hasta ahora se han descrito cuatro: la primera y más conocida implica que las células madre se diferencien en células del tejido lesionado, sustituyendo de esta forma a las que no sirven y reparando así el órgano. La segunda es un uso de las células como secretoras de factores que promueven la supervivencia o la proliferación de células del tejido lesionado que aún son “salvables”, y por tanto las células madre funcionarían como dispositivos de regeneración indirecta como factorías y distribuidoras de “medicamentos” in situ (biorreactores). Dentro de este mecanismo estaría la posibilidad de que células madre sanas se fusionen con células diferenciadas enfermas y juntas puedan reparar el tejido dañado. La tercera y menos estudiada es en la que las células madre transplantadas actúan secretando factores que reclutan o “despiertan” progenitores propios del tejido dañado, de forma que éstos se diferencien normalmente para pueda ser reparado. Se ha demostrado que por ejemplo en la mayoría de los casos de isquemia (por ejemplo, pero no exclusivamente, cardíaca) hay una cierta reparación tisular mediada por progenitores en este caso miocárdicos, pero que no es suficiente para sustituir todo el miocardio necrosado. El trasplante de células madre podría actuar aumentando el número de progenitores y por tanto la reparación (Qayyum et al., 2012; Przyby et al., 2013; Chen et al., 2013; Harada et al., 2013). Y por último, la cuarta, se debe a las propiedades inmunomoduladoras que estas células ejercen tanto in vitro como in vivo (De Miguel et al., 2008; De Miguel et al., 2011).

Las células madre derivadas del tejido adiposo han mostrado potencial para diferenciarse en células y órganos de origen mesodérmico. Cada vez hay más evidencia sobre la habilidad de estas células para diferenciarse en células de origen no mesodérmico, tales como neuronas, células pancreáticas endocrinas, hepatocitos, células endoteliales y cardiomiocitos. Esta característica de poder diferenciarse en múltiples fenotipos es lo que les confiere sus

interesantes y prometedoras aplicaciones en medicina regenerativa (Ishikawa et al., 2010).

Un sencillo procedimiento quirúrgico, como una liposucción, la posibilidad de un repetido acceso al tejido adiposo subcutáneo, y procedimientos poco complicados de aislamiento celular basados en la digestión enzimática hacen que las AD-MSCs sean muy atractivas para los clínicos e investigadores. Además, con la incidencia cada vez mayor de obesidad en el mundo, el tejido adiposo subcutáneo se ha convertido en una fuente de células madre fácilmente accesible. Se puede conseguir abundante cantidad de AD-MSCs de los lipoaspirados con una tasa de complicaciones de alrededor del 0,1%. Una propiedad de gran interés es que estas células son más fáciles de cultivar y crecen más rápido que las derivadas de la médula ósea. Se estima que hasta el 1% de las células del tejido adiposo son AD-MSCs, en comparación con el 0,001-0,002% de las que se encuentran en la médula ósea. Teniendo en cuenta la seguridad y la elevada frecuencia de la liposucción, además de las grandes cantidades de tejido adiposo que se pueden obtener (desde 100 ml hasta 3L) el lipoaspirado parece ser una prometedora fuente de células autólogas para uso clínico (Witkowska-Zimny y Walenko, 2011, Aguenta et al., 2012). El volumen de lipoaspirado que se puede extraer sin efectos adversos depende del índice de masa corporal del paciente donante, pero la equivalencia sería de 40 ml de médula ósea y 800ml de tejido adiposo, así que la grasa aporta 1300 veces más MSCs adherentes que la médula ósea (Ishikawa et al., 2010),

Así, la generación de tejido adiposo, de hueso, de cartílago o su aplicación para el tratamiento de la diabetes mellitus, de patologías neurológicas, como la enfermedad de Alzheimer o la esclerosis múltiple, de fístulas anales relacionadas o no con la enfermedad de Crohn, de cardiopatías e isquemia crónica de las extremidades, de enfermedades de la cornea o de diversas patologías hepáticas son todas posibles opciones para la terapia con AD-MSCs (Yarak y Okamoto; 2010; Mariani y Facchini, 2012; Dhanasekaran et al., 2013).

Numerosos grupos de investigación en todo el mundo han realizado estudios experimentales de la posible aplicación terapéutica de las células madre mesenquimales, por ejemplo en incontinencia urinaria en uretra y vejiga (Jack et al., 2005), o en reparación de tejido óseo (Yoon et al., 2007; Seong et al., 2010). En su aplicación tras infarto de miocardio (Bai y Alt, 2010), se ha comprobado

que se produce mejoría en los animales de experimentación y también en los pacientes, fundamentalmente por inducción angiogénica (Planat-Benard et al., 2004), aunque existe aún cierto riesgo de arritmias, probablemente provocado por la interferencia de células acompañantes que no se diferencian en cardiomiocitos. La identificación de un subgrupo de células madre que tenga una alta capacidad de diferenciación cardiomiogénica permitirá avanzar en este sentido (Menasche, 2005). En estudios realizados por nuestro grupo investigador (Arnalich-Montiel et al., 2008), hemos transplantado con éxito estas AD-MSCs en bolsillos corneales en un modelo experimental de lesión corneal en conejos, demostrando la facultad de estas células de sobrevivir en la córnea sin provocar rechazo, y de diferenciarse en queratocitos funcionales, las células mesenquimales del estroma corneal, de modo que son capaces de regenerar parcialmente la córnea dañada (De Miguel et al., 2010).

Además de su capacidad de servir como células estructurales cuando se diferencian en las células propias del tejido lesionado, las AD-MSCs son capaces de modular el tejido endógeno por medio de la secreción de un amplio espectro de moléculas bioactivas (Phinney et al., 2007; Salgado et al., 2010) que promueven la regeneración tisular gracias a la acción de los progenitores celulares propios del tejido que está dañado. La expresión de estos factores por las AD-MSCs induce una gran variedad de respuestas, que incluyen pero no están restringidas a promoción de la supervivencia y proliferación de los progenitores celulares y otros tipos celulares más diferenciados propios del tejido (Prockop, 2007; Lee et al., 2012), inducción de angiogénesis (Shyu et al., 2006; Szöke y Brinckmann, 2012; Harada et al., 2013), inhibición de la respuesta inflamatoria e inmune, y reducción de la apoptosis (Hung et al., 2007; Choi et al., 2011; Zhang et al., 2011; Peng et al., 2012).

Además de las propias moléculas producidas naturalmente por las AD-MSCs, estas células pueden ser modificadas genéticamente para producir factores paracrinos: por ejemplo, las citoquinas MDA-7 y PEDF sobreexpresadas en AD-MSCs sirven como terapia anticancerígena en cáncer de próstata experimental, aprovechando la capacidad innata de estas células de migrar hacia el lugar del tumor (Zolochovka et al., 2011). Del mismo modo, la sobreexpresión de citosindeaminasa: uracil-fosforibosiltransferasa en AD-MSCs es capaz de inhibir el glioblastoma intracerebral (Altanerova et al., 2011).

Varias moléculas secretadas por las AD-MSCs son responsables del reclutamiento de progenitores celulares al lugar del daño tisular. En regeneración cardíaca por ejemplo, se ha demostrado que las AD-MSCs son beneficiosas tras la isquemia o el infarto de miocardio no solo debido a su acción angiogénica (Hong et al., 2010; Yang et al., 2012) sino también al reclutamiento de células progenitoras del músculo cardíaco que anidan en el miocardio isquémico contribuyendo a su regeneración (Sanz-Ruiz, 2008; Fernández-Aviles et al., 2008). Otro ejemplo demostrado de este tipo de acción terapéutica de las AD-MSCs es su uso estético para la reducción de arrugas inducidas por los rayos UVB, efecto mediado por la inhibición de la apoptosis y la estimulación de la secreción de colágeno de los fibroblastos endógenos de la dermis (Kim et al., 2009; Altman et al., 2010; Beeson et al., 2011).

Las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo han demostrado unas cualidades inmunomoduladoras superiores incluso a las ya demostradas por las MSCs provenientes de médula ósea (Melief et al., 2013). Las AD-MSCs poseen una baja inmunogenicidad y, además, son capaces de evadir la respuesta inmune del organismo (Puissant et al., 2005; Cui et al., 2007). Asimismo, se ha comprobado que las AD-MSCs procedentes de tejido adiposo no provocan alorreactividad *in vitro* contra linfocitos incompatibles, a la vez que suprimen la respuesta linfocitaria funcional y proliferativa frente a mitógenos (Puissant et al., 2005), e incluso suprimen la diferenciación de las células dendríticas (Ivanova-Todorova et al., 2009). Interesantemente, esta inhibición de la respuesta linfocitaria es estrictamente local, lo que sitúa a las AD-MSCs como un candidato idóneo en la regulación de la respuesta inmune tras el trasplante alogénico (De Miguel et al., 2011). La eficiencia de las AD-MSCs como moduladores del sistema inmune ha sido ampliamente demostrada (Martínez-González et al., 2012; Peng et al., 2012; Melief et al., 2013). Existen dos líneas generales de investigación a este respecto: la primera es el uso de las AD-MSCs para suprimir la respuesta inmune en enfermedades inflamatorias y autoinmunes, y la segunda es su uso en la prevención y el tratamiento del rechazo en pacientes trasplantados (De Miguel et al., 2011).

Generalmente, la terapia consiste en la infusión sistémica de las AD-MSCs en dosis únicas o repetidas, demostrando un resultado mejor con su administración precoz. Estas células han probado su eficacia inmunomoduladora

en escenarios singénicos, alogénicos e incluso xenogénicos y en patologías experimentales tan dispares como la encefalomiелitis autoinmune (Constantin et al., 2009), la artritis inducida por colágeno (González et al., 2009), la colitis (González-Rey et al., 2009) y la pérdida de audición autoinmune (Zhou et al., 2011). La esclerosis múltiple puede ser también incluida en el campo de la modulación de la respuesta inmune/inflamatoria por las AD-MSCs. En un modelo de ratones, se demostró que por vía intravenosa, las AD-MSCs inyectadas podían anidar en los ganglios linfáticos y el cerebro, y que actúan suprimiendo la respuesta autoinmune en fases precoces de la enfermedad así como induciendo neuroregeneración local mediante progenitores endógenos (Constantin et al., 2009). Los marcados efectos inmunosupresores de las AD-MSCs reportados por varios grupos independientes impulsó la investigación de estas células en la esclerosis múltiple. Basado en los positivos resultados encontrados con el uso de las MSCs derivadas de la médula ósea, también se esperan resultados similares tras el uso de ADSCs.

5.B.4.b. *Aplicaciones de las células madre mesenquimales derivadas de adipocitos (AD-MSCs) a la patología hepática*

Las AD-MSCs pueden producir factores tróficos capaces de inhibir la fibrosis y la apoptosis, de promover la angiogénesis y de estimular a las células progenitoras del huesped para que proliferen y se diferencien en células maduras funcionalmente in vivo. Su demostrada capacidad para diferenciarse en múltiples tipos celulares in vitro e in vivo, entre ellos células similares a hepatocitos, o hepatocito-like, ha impulsado su investigación como una prometedora alternativa terapéutica para la gran cantidad de pacientes que sufren hepatopatías graves (Ishikawa et al., 2010).

En primer termino se sugirió el trasplante de AD-MSCs indiferenciadas, que son manipuladas mínimamente ex vivo y obtenidas fácilmente en un corto período de tiempo (Banas et al., 2008). AD-MSCs fueron trasplantadas en ratones inmunodeficientes con insuficiencia hepática aguda secundaria a la administración de CCl4 y se demostró una disminución significativa de los niveles séricos de amonio, fosfatasa alcalina, AST y ALT a las 24 horas de la inyección. Además, la presencia de unas pocas AD-MSCs humanas HLA-I inmunoteñidas se observó en diferentes áreas del parenquima hepático murino, lo cual

demonstró in vivo la capacidad regenerativa hepática de éstas células. Respecto de su mecanismo de acción, las AD-MSCs pueden actuar directamente, induciendo la señalización intracelular y/o indirectamente, secretando factores bioactivos que inducirían a su vez que otras células vecinas secretaran agentes funcionalmente activos (Ishikawa et al., 2010). Las AD-MSCs secretan un amplio espectro de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento y, de hecho producen y liberan una potente citoquina anti-inflamatoria, como IL-1RA, IL6, que induce una respuesta de fase aguda en el hígado, las quimioquinas, IL-8 y MCP-1, los factores hematopoyéticos G-CSF y GM-CSF, HGF, que es anti-cirrótica porque promueve la apoptosis de las células estrelladas hepáticas, y NGF, que induce la regeneración de hepatocitos y, además en concentraciones superiores que las MSCs derivadas de la médula ósea y que los fibroblastos dérmicos humanos. Su incorporación al hígado y la mejoría de la función hepática sugieren por tanto que la capacidad regenerativa de las de AD-MSCs puede ser atribuida a su actividad trófica (Ishikawa et al., 2010). Las AD-MSCs pueden actuar sobre células madre endógenas, como las células progenitoras hepáticas y las células ovas, induciendo así la regeneración hepática mediante la liberación de factores hematopoyéticos (Piscaglia et al., 2007). La recuperación del parénquima hepático lesionado por éste tipo de células madre es mediado, al menos en parte, por la liberación de factores que promueven la reparación tisular (Crisóstomo et al., 2008). Sus acciones inhibitoras sobre las células estrelladas hepáticas, suprimiendo su proliferación y su función profibrogénica pueden ser también de tipo paracrino (Oakley et al., 2003; Mirotsoy et al., 2007; Parekkadan et al., 2007) Aunque no se produce ningún cambio en la morfología patológica del hígado, los efectos de las células madre trasplantadas no fueron transitorios, lo cual impulsó múltiples estudios posteriores para estudiar la histopatología a largo plazo.

En animales se ha demostrado el potencial terapéutico de las AD-MSCs en la patología hepática aguda y crónica (Banas et al., 2008; Yukawa et al., 2009; Banas et al., 2009; Liang et al., 2009). Así, la administración por vía intraperitoneal de AD-MSCs obtenidas de tejido adiposo porcino a conejos con insuficiencia aguda-sobre-crónica, inducida por la administración de CCL4 y D-Galactosamina, ha demostrado no sólo mejoría en los parámetros de función hepática, sino una disminución significativa de las lesiones histopatológicas del parénquima hepático (Zhu et al., 2013). En éste modelo experimental, la

supervivencia de los conejos a los que se administraron células madre aumentó significativamente a los 7 días del p.o., y a los 28 días de evolución la arquitectura trabecular hepática fue prácticamente normal, con un infiltrado moderado de células mononucleares, lo cual indicaba la recuperación del fallo hepático agudo (Zhu et al., 2013). Curiosamente, el aumento de la supervivencia y la mejoría de la función hepatocelular en éste modelo experimental se correlacionaba con la cantidad de AD-MSCs trasplantadas. Utilizando albúmina como marcador molecular de hepatocitos e inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para albúmina porcina se demostró la persistencia de las células trasplantadas 21 días post-inyección. Lo más interesante de éste estudio es que las AD-MSCs diferenciadas hacia hepatocitos una vez trasplantadas aumentaba con el tiempo (Zhu et al., 2013). Además las AD-MSCs inhibieron la muerte y promovieron la regeneración de los hepatocitos, por lo tanto uno de los mecanismos por los que mejora la función hepática puede ser secundario a la liberación de citoquinas y otros factores tróficos beneficiosos, como VEGF, HGGF, bFGF, TGF- β y factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1 like), por las células madre trasplantadas (Rehman et al., 2004; Nakagami et al., 2005; Sadat et al., 2007; Zhu et al., 2013)

La administración de AD-MSCs también ha demostrado su utilidad en un modelo de cirrosis hepática por esteatohepatitis en el ratón, restableciendo la síntesis hepatocitaria de albúmina y reduciendo la fibrosis (Seki et al., 2013). Mediante análisis de expresión genética se comprobó la activación de diversos genes responsables de procesos anti-inflamatorios y de regeneración/reparación tras la inyección de las AD-MSCs. Además, éstas células consiguieron la inhibición de genes relacionados con la respuesta inmune, disminuyendo así el número de células CD11b⁺ y Gr-1⁺ intrahepáticas y el índice de células CD8⁺/CD4⁺. Estos hallazgos ratifican la inhibición por las AD-MSCs de genes implicados en la inflamación hepática relacionados con la presentación de antígenos y la activación de los linfocitos T *helper* o ayudantes (Seki et al., 2013).

En la fibrosis hepática inducida por administración de tioacetamida en la rata la administración intrahepática de 1×10^6 AD-MSCs humanas se ha comprobado que éstas células se diferenciaban en células hepatocito-like capaces de secretar albúmina y α -fetoproteína una semana después de su trasplante (Harn et al., 2012). La función hepática, evaluada por la concentración

sérica de bilirrubina y de albumina y por el tiempo de protrombina, así como la actividad inflamatoria y la fibrosis hepática mejoraron significativamente con el trasplante de AD-MSCs (Harn et al., 2012). En otro tipo de fibrosis hepática de etiología tóxica en la rata, como es la obtenida por la administración de CCl₄, la inyección de AD-MSCs por vía intraportal, al reducir la fibrosis, mejora la microcirculación hepática (Wang et al., 2012). En éstos animales se comprobó una disminución significativa del índice de perfusión arterial hepática, un incremento de la perfusión portal y una disminución de VEGF y de los microvasos neoformados, asociado a una marcada mejoría de los parámetros de función hepatocitaria (Wang et al., 2012)..

Para evitar el rechazo, en la rata también se han realizado modelos experimentales de patología hepática en los cuales se administran AD-MSCs alogénicas. En éste caso las células madre se obtienen de la grasa subcutánea de la rata y se administran 2×10^6 células a través de la vena del pene después de ser sometidas a 15 minutos de isquemia-reperusión hepática asociado a una hepatectomía del 70%. Los resultados de éste estudio demuestran que la regeneración hepática a los 2 días del p.o. es significativamente mayor en las ratas que recibieron las AD-MSCs. El índice mitótico de los hepatocitos, los niveles de antígeno nuclear celular anti-proliferante y de otras proteínas asociadas con la regeneración, como fosfo-ERK1/2, fosfo-JNK, fosfo-p38 MAPK, c-fos, c-jun y c-myc, fueron también significativamente superiores en éstas ratas ya en las primeras 24 horas de evolución (Seki et al., 2012). Los autores proponen que el efecto beneficioso de las AD-MSCs se basa en su acción paracrina sobre la regeneración hepática periportal mediante la secreción de citoquinas y factores de crecimiento que activan en los hepatocitos los genes implicados en la regeneración hepatocitaria precozmente después de la realización de una hepatectomía en la rata (Feingold et al., 1988; Nakamura et al., 1989; Westwick et al., 1995; Cressman et al., 1996; Talarmin et al., 1999; Hsu et al., 2006; Wang et al., 2009; Donahower et al., 2010; Seki et al., 2012)

Pero también es posible la diferenciación hepatocitaria in vitro de las AD-MSCs humanas, obteniendo unas células hepatocito-like o similares a hepatocitos que expresan marcadores, proteínas y enzimas hepáticos y que adquieren algunas de las funciones de los hepatocitos primarios (Banas et al., 2007a). La inducción de éstas células similares a hepatocitos a expensas de AD-

MSCs es posible en un periodo de tiempo relativamente corto (13 días) cuando son expuestas a un medioambiente con activina A y FGF-4 (Banas et al., 2008). Los componentes de éste cóctel primitivo de factores de crecimiento fueron posteriormente modificados añadiendo dimetilsulfóxido, nicotinamida e insulina-transferrina-selenio, lo cual permitió acortar el tiempo necesario para la diferenciación de las AD-MSCs hacia el linaje hepatocitario (Ishikawa et al., 2010).

Esta asombrosa plasticidad de las AD-MSCs para diferenciarse en células hepatocito-like depende de la activación de diversas vías de señalización implicadas en el desarrollo y la diferenciación hepatocitaria, como los factores de transcripción HNFs, las proteínas *CCAAT/enhancer-binding*, las proteínas *GATA-binding*, HNF3b/FOXA2; HNFA3a/FOXA1, GATA4, HNF6/ONECUT1 y HNF1, que por técnicas genéticas de *microarrays* se han demostrado activados diez veces más que en las AD-MSCs indiferenciadas (Bossard y Zaret, 1998; Lee et al., 2005; Yamamoto et al., 2008). Los factores de transcripción hepatoespecíficos regulan la la transactivación de varios factores endodérmicos y hepatocito-específicos, incluyendo transtiretina, albúmina y tirosina aminotransferasa (Costa et al., 2003). En estudios experimentales de hepatectomía parcial (Aurich et al., 2009), se ha observado el anidamiento de estas células en el lóbulo que recibió AD-MSCs. En la cirrosis hepática experimental se ha observado que las AD-MSCs anidan al menos durante 24 horas tras el tratamiento con CCL4 (Banas et al., 2007). Estos resultados son mejores cuando se inyectan células madre mesenquimales previamente diferenciadas in vitro hacia hepatocitos, con lo que se disminuye además la fibrosis (Banas et al., 2007b; Aurich et al., 2009).

Respecto de la vía más apropiada de administración de las AD-MSCs para tratar el hígado fibrótico de la rata, la mayoría de los estudios experimentales han utilizado una vena periférica, en particular la vena de la cola, (Seo et al., 2005; Sgodda et al., 2007; Banas et al., 2007b; Banas et al., 2008; Banas et al., 2009), y en menos ocasiones por vía portal (Liang et al., 2009; Wang et al., 2012) o directamente en el parénquima hepático (Sato et al., 2005; Wang et al., 2012). Cualquier tipo de patología hepática cursa con afectación sistémica de las células madre (Peled et al., 1999; Hattori et al., 2001, Mavier et al., 2004; De Falco et al., 2004; Aurich et al., 2007; Gilchrist y Plevris, 2010). Así, la expresión de SDF-1, de G-CSF y de otros mediadores aumenta en sangre periférica, en

tanto que SDF-1 y CXCR4 disminuyen en la médula ósea. Estas alteraciones inducen el reclutamiento de MSCs y de células madre hematopoyéticas en sangre periférica, desde donde alcanzan el hígado. Cuando las AD-MSCs se inyectan por la vena de la cola, llegan al hígado por vía sistémica sanguínea atraídos por señales quimiotácticas liberadas por el hígado lesionado (Aiuti et al., 1997; Hattori et al., 2001), en tanto que si se administran por vía portal o en el hígado las células madre alcanzan directamente el hígado sin pasar a la circulación sistémica. En el estudio realizado por Kim y cols. la acción de las AD-MSCs sobre la fibrosis y la insuficiencia hepática ha demostrado ser más beneficiosa cuando las células se habían administrado por la vena de la cola, lo cual se atribuye a sus efectos endocrinos y/o paracrinos (Kim et al., 2011). Tras la administración de las AD-MSCs por la vena de la cola su distribución intrahepática es dispersa en el parénquima, en tanto que cuando se administran por la vena porta o en el hígado las células madre se distribuyen en forma de racimos o acúmulos a lo largo de la vena porta o del lugar de la inyección, respectivamente (Kim et al., 2011). Sin embargo, estos resultados no son constantes, ya que en un modelo de fibrosis hepática por CCl₄ en el ratón el trasplante de AD-MSCs por vía portal consiguió reducir la fibrosis y mejorar la microcirculación intrahepática y éstos efectos no se consiguieron cuando el trasplante de las células madre se realizaban por la vena de la cola (Wang et al., 2012).

III. 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 hepáticas como extrahepáticas.

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 hemorragia si no se realiza su profilaxis. Por el contrario, evitar estas complicaciones que se producen con precocidad 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 tratamiento anti-inflamatorio. Así, los tratamientos farmacológicos anti-inflamatorios ensayados hasta la actualidad 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 esfuerzos dirigidos a evitar la evolución cirrótica de la patología inflamatoria hepática constituyen un objetivo fundamental en la actualidad.

En particular, en el presente trabajo experimental se ha ensayado el tratamiento de la patología hepática colestásica utilizando células madre mesenquimales adipocíticas ya que se ha demostrado que estas células pluripotenciales, a su capacidad para diferenciarse en hepatocitos, unen su 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 humano 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 se reduce la gravedad evolutiva a largo plazo de la patología hepática secundaria a colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL

1.A. ANIMALES

Se han utilizado 152 ratas macho de la cepa Wistar 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)*. Los pesos corporales de los animales oscilaron entre 240 y 450 gramos.

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 y 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 en éste estudio 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:

- 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 nº serie 211069.
- Centrífuga refrigerada *superspeed Du Pont Instrument* (GIRALT Sorval® RC-5B).
- Balanza de precisión para pesado de los animales Jadever LPW- 1260 nº 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 O₂ (suministro centralizado). También disponible en bombona: 10.6 m³ de O₂ a 200 Kg/cm²
- Arcón congelador Koxka a -80 °C.

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 (figura 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°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. K₁ 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®).
- 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 ½
(King™ Amebil S.A. Vizcaya. España)
- Guantes quirúrgicos de látex natural con polvo (estériles). Talla
7 ½ (Medi-Grip® Plus. Ansell Ltd. UK)
- Gasas de 10 × 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, 0.9 g/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 (Labsystem) 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 sanguíneas

- 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:

- Mesa de tallado de órganos con aspiración.
- Procesador automático de tejidos con vacío.
- Estación de trabajo para inclusión.
- Teñidor automático.
- Montador automático de cubreobjetos.
- Criocentrífuga.
- Microtomos motorizados.
- Baños de flotación.
- Criostato.
- Balanzas de precisión.
- Congeladores de -20°C.

- Estufas de incubación.
- Estufas de secado.
- Vórtex.
- Agitador orbital.
- Agitadores magnéticos.
- Microscopios ópticos convencionales.
- Fotomicroscopio.
- Microscopio de fluorescencia.
- Microscopio invertido
- Cabina de extracción de gases.
- Campana de flujo laminar
- Incubador de CO₂
- Baño con agitación

1.E.3.b Laboratorio de inmunohistoquímica:

- Inmunoteñidor automático.
- Estación de trabajo para técnicas de inmunohistoquímica de tecnología capilar.
- Incubador con termostato 20-56°C.
- Placa calefactora 30-200°C.
- Estufas de incubación.

1.E.3.c 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
 - 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).
- **γ - 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).
- **Acidos biliares**

- Kit de método enzimático colorimétrico de ácidos biliares (Randox Laboratories Ltd. United Kingdom Cat.No.BI3863).
- **Lactato deshidrogenasa (LDH)**
 - *LDH Olympus System Reagent* (Olympus Irlanda ref. OSR6126).
 - *Olympus System Calibrator* (Olympus Irlanda ref. 66300).
- **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).

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
- **Tinción de Hematoxilina-Eosina:**
 - Hematoxilina de Harris.....0,5g.
 - Eosina1g.
 - Agua destilada100ml
- **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 Tricómico 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 se realizó de acuerdo con la legislación vigente en nuestro país durante el tiempo en el que se ha realizado la parte experimental del presente trabajo 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 et al. 2009a).

Los animales se mantuvieron a una temperatura de 20 ± 2 °C, y con una humedad relativa del 65 ± 10 %. Las condiciones de luz / oscuridad fueron cíclicas estableciéndose períodos alternos de 12 horas (8:00 –20:00 /20:00 – 8:00). Los animales se mantuvieron en estanterías, y en grupos de 2 en cajas homologadas para tal fin: Plexiglas de 42x65x15 cm (Letica, España) móviles con lecho de viruta (Panlab S.L. Barcelona). Dichas cajas fueron etiquetadas, y consignándose en éstas últimas los datos de identificación de los animales allí alojados. 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 et al., 2009a).

2.B DISEÑO EXPERIMENTAL

La colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata se ha estudiado en 2 periodos evolutivos diferentes: precoz, con una evolución de 24 horas (CM-1) y tardía, con una evolución de 14 días (CM-14).En ambos grupos se ha realizado

el tratamiento de las alteraciones causadas por la colestasis extrahepática con dos tipos de células madre mesenquimales obtenidas de tejido adiposo procedente de lipoaspirado de pacientes intervenidas en el Hospital de La Paz:

1. Células madre mesenquimales de origen adipocítico.
2. Células madre mesenquimales de origen adipocítico prediferenciadas en células progenitoras hepatocitarias antes de su administración intrahepática a los animales con colestasis.

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

Se diseñó inicialmente un grupo “preliminar” formado por 3 series de animales: Una primera serie, constituida por animales sin tratamiento, y otras 2 series compuestas por varios subgrupos, integrados por ratas con colestasis microquirúrgica que se diferenciaban entre sí en función del tipo de células madre que se les administraba y del tiempo evolutivo en el que dicha administración se llevaba a cabo. En todos los grupos, el sacrificio se realizaba a las 8 semanas de post-operatorio (p.o):

- **Serie I:** sin tratamiento:
 - Grupo 1 (n=4): ratas pseudo-operadas (SO).
 - Grupo 2 (n=4): ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica e inyección intrahepática de solución salina isotónica (0.9%) (CM-S).
- **Serie II:** administración precoz de células madre mesenquimales de origen adipocítico (24horas de evolución postoperatoria):
 - Grupo 3 (n=3): ratas con colestasis microquirúrgica e inyección de células mesenquimales de origen adipocítico, que fueron prediferenciadas a hepatocitos previa a su administración intrahepática a las 24 horas del p.o. (CM-H-1).
 - Grupo 4 (n=5): ratas con colestasis microquirúrgica e inyección intrahepática de células mesenquimales de origen adipocítico no diferenciadas a las 24 horas de p.o. (CM-A-1).
- **Serie III:** administración tardía de de células madre mesenquimales de origen adipocítico (14 días de evolución postoperatoria):
 - Grupo 5 (n=4): ratas con colestasis microquirúrgica e inyección de células mesenquimales de origen adipocítico

prediferenciadas a hepatocito a las 2 semanas de p.o. (CM-H-14).

- Grupo 6 (n=4): ratas con colestasis microquirurgica e inyección intrahepática de células mesenquimales de origen adipocítico no diferenciadas a las 2 semanas del p.o. (CM-A-14).

El objetivo de esta primera serie de animales era doble:

1. Identificar el estadio del p.o. tras la realización de la colestasis más adecuado para la inyección de células.
2. Determinar el tipo de células (indiferenciadas o prediferenciadas hacia el linaje hepatocitario) más efectivas para el tratamiento de la insuficiencia hepática colestásica.

Tras el estudio y análisis de los resultados obtenidos en estos grupos preliminares, comprobamos que la evolución más favorable correspondía a los animales del grupo 5. Por ello, para el estudio definitivo se diseñaron otros 5 grupos de ratas: 1 grupo de ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica, que se sacrificaron a las 2 semanas de p.o., y otros 4 grupos que se diferenciaban, a su vez en dos factores: a. en el material inoculado en el hígado (células madre mesenquimales de origen adipocítico y prediferenciadas *in vitro* hacia células progenitoras hepáticas vs suero salino) y, b. en el tiempo evolutivo de estudio (Tabla 1):

- **Serie IV (n=8):** Está constituida por ocho animales con colestasis microquirúrgica que fueron sacrificados a las 2 semanas del p.o. (C-2s).
- **Serie V:** Formada por ratas colestásicas a las que se les administró en un periodo evolutivo tardío (14 días de evolución p.o.) las células madre mesenquimales de origen adipocítico o bien, solución salina isotónica. Estos animales fueron estudiados hasta las 5 semanas de p.o. Esta Serie V se subdivide, a su vez en los siguientes grupos:
 - **Grupo I (n=15):** Colestasis microquirúrgica e inyección de solución salina isotónica a las 2 semanas de p.o. Los animales supervivientes fueron sacrificados a las 5 semanas de p.o. (CS-5s).
 - **Grupo II (n=15):** Colestasis microquirúrgica e inyección de células de origen adipocítico prediferenciadas a hepatocito a las

2 semanas de p.o. Los animales supervivientes también fueron sacrificados a las 5 semanas del p.o.(CCM-5s).

- **Serie VI:** Formada por ratas colestásicas a las que se les administró en un periodo evolutivo tardío (14 días de evolución p.o.) células madre de origen adipocítico o solución salina isotónica y evolución de la colestasis microquirúrgica a largo plazo (8 semanas de postoperatorio): Esta Serie VI se subdivide, a su vez en los siguientes Grupos:
 - **Grupo III (n=16):** Colestasis microquirúrgica e inyección de solución salina isotónica a las 2 semanas de p.o. Los animales supervivientes fueron sacrificados a las 8 semanas de p.o. (CS-8s).
 - **Grupo IV (n=30):** Colestasis microquirúrgica e inyección de células de origen adipocítico prediferenciadas a hepatocito a las 2 semanas de p.o. Los animales supervivientes fueron sacrificados a las 8 semanas de p.o.(CCM-8s).

Tabla 1: Grupos de ratas correspondientes al diseño del estudio experimental

SERIE I	GRUPO 1 (SO)	n=4	Pseudo-operadas
	GRUPO 2 CM-S	n=4	Colestasis microquirúrgica e inyección intrahepática de solución salina isotónica (0.9%)
SERIE II	GRUPO 3 CM-A-1	n=5	Colestasis microquirúrgica e inyección intrahepática de células mesenquimales adipocíticas indiferenciadas a las 24 horas de p.o.
	GRUPO 4 CM-H-1	n=3	Colestasis microquirúrgica e inyección de células mesenquimales adipocíticas prediferenciadas a hepatocitos a las 24 horas de p.o.
SERIE III	GRUPO 5 CM-A-14	n=4	Colestasis microquirúrgica e inyección intrahepática de células mesenquimales adipocíticas indiferenciadas a las 2 semanas del p.o.

	GRUPO 6 CM-H-14	n=4	Colestasis microquirúrgica e inyección de células mesenquimales adipocíticas prediferenciadas a hepatocito a las 2 semanas de p.o.
SERIE IV	C-2s	n=8	Colestasis microquirúrgica sacrificadas a las 2 semanas de p.o.
SERIE V	GRUPO I CS-5s	n=15	Colestasis microquirúrgica e inyección de solución salina isotónica a las 2 semanas de evolución y sacrificados a las 5 semanas de p.o.
	GRUPO II CCM-5s	n=15	Colestasis microquirúrgica e inyección de células adipocíticas prediferenciadas a hepatocito a las 2 semanas de evolución y sacrificados a las 5 semanas de p.o.
SERIE VI	GRUPO III CS-8s	n=16	Colestasis microquirúrgica e inyección de solución salina isotónica a las 2 semanas de evolución y sacrificados a las 8 semanas de p.o.
	GRUPO IV CCM-8s	n=30	Colestasis microquirúrgica e inyección de células adipocíticas prediferenciadas a hepatocito a las 2 semanas de evolución y sacrificados a las 8 semanas de p.o.

En todas la ratas se extraía analítica de la vena cava inferior el día de la administración de las células madre de origen adipocítico o de la solución salina isotónica, y una segunda analítica en el sacrificio

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 Nava, 2009).

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 O₂. Esta pauta 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 consciencia se produce habitualmente entre los 5 y 10 minutos. Por la sensibilidad de los pequeños roedores a la hipotermia (Rodríguez, 1989), durante el postoperatorio inmediato se colocó a las ratas en un ambiente cálido suministrado por una manta eléctrica (Aller y Nava, 2009).

2.D. TÉCNICA QUIRÚRGICA

2.D.1. PSEUDO-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 7).

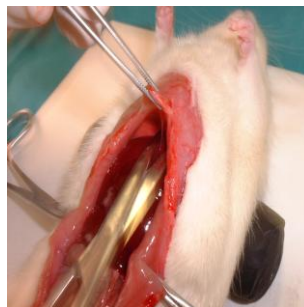


Figura 7. Laparotomía media y sección del ligamento falciforme en la rata.

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 (Figura 8) (Lorente et al., 2009). 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[®] (polyglactin 910) de 4/0, y piel con sutura continua de seda de 4/0. (Lorente et al., 2009).

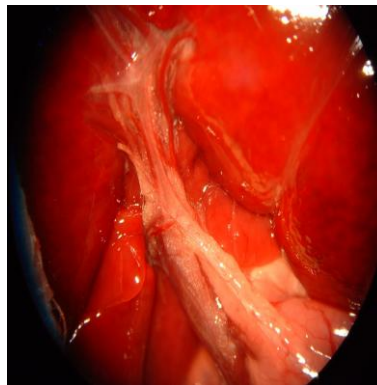


Figura 8. La vía biliar extrahepática en la rata es anterior respecto de las ramas de la arteria hepática y éstas a su vez son anteriores respecto de las ramas portales.

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 9) (Aller et al., 2008; Lorente et al., 2009). Esta característica anatómica permite reseca los conductos biliares que drenan cada lóbulo hepático en continuidad con el colédoco mediante la utilización de una técnica microquirúrgica (Aller et al., 1993; Aller et al., 2009d)

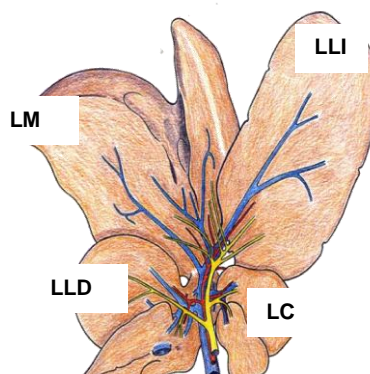


Figura 9: Representación del hígado de la rata dividido en cuatro lóbulos: medio (LM), lateral izquierdo (LLI), lateral derecho (LLD) y caudado (LC). En el hilio se puede apreciar la relación entre las ramas portales, arteriales y biliares, así como la ausencia de vesícula biliar. VBP, vía biliar principal, AH, arteria hepática, VP, vena porta.

Tras inducir la 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 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 10).

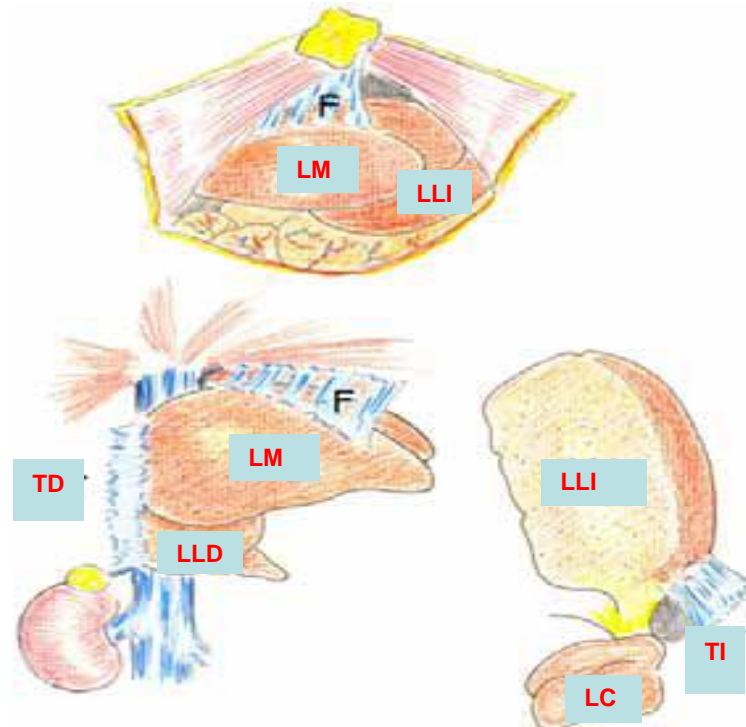


Figura 10: Ligamentos principales del hígado de la rata. F: Ligamento falciforme; TD: Ligamento triangular derecho; TI: Ligamento triangular izquierdo; LM: Lóbulo medio; LLI: Lóbulo lateral izquierdo; LMD: Lóbulo medio derecho; LMI: Lóbulo medio izquierdo; LLD: Lóbulo lateral derecho; LC: Lóbulo caudado

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.

La tracción del duodeno hacia la izquierda del animal permite visualizar el colédoco, que se liga y se secciona proximalmente al inicio de su porción intrapancreática (Figuras 11 y 12). 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.

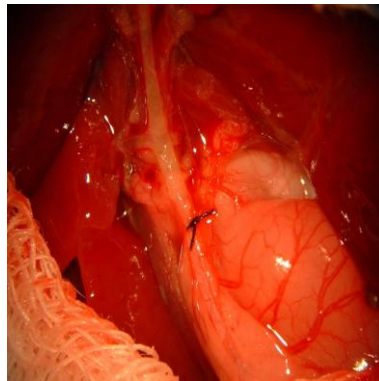


Figura 11. Ligadura del colédoco previa al inicio de su porción intrapancreática



Figura 12: Ligadura y sección del colédoco, con dilatación de la vía biliar extrahepática.

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 y se secciona el conducto biliar lo más próximo posible de su salida del parénquima hepático (Figuras 13 y 14). La disección, ligadura y sección del conducto biliar del LLD se realiza de igual forma (Figura 14).

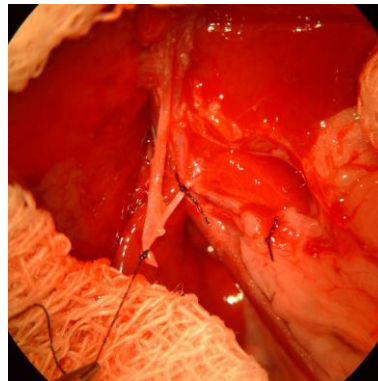


Figura 13. Tracción del extremo proximal ligado del colédoco y ligadura del conducto biliar procedente del lóbulo caudado (LC).

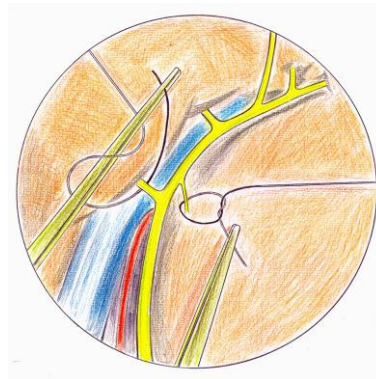


Figura 14. Disección y ligadura de los conductos biliares de los lóbulos caudado y lateral derecho en el hígado de la rata

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). Estos últimos se diseccionan y se ligan independientemente. Por último, se disecciona, se liga y se secciona el conducto biliar del LLI (Figura 15) (Aller et al., 1993; Aller et al., 2009b).

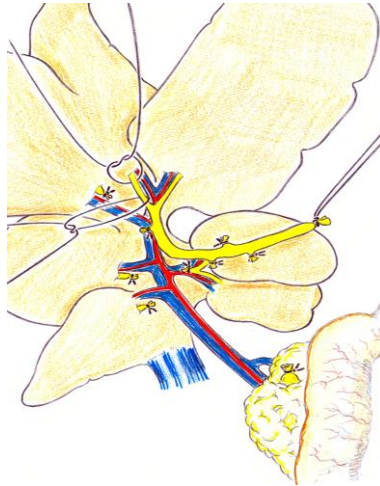


Figura 15: Aspecto del hilio hepático de la ratona una vez realizada la exéresis microquirúrgica de los conductos biliares que drenan los lobulillos hepáticos inferiores. A continuación se procede a la disección, ligadura y sección de los conductos biliares que drenan los lobulillos superiores, medio (en la figura) y lateral izquierdo.

Previa 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 16), se reintegran las asas intestinales al interior de la cavidad abdominal y se procede al cierre del plano peritoneo-músculo-aponeurótico con sutura continua reabsorbible vycril[®] (polyglactin 910) de 4/0, y de la piel con sutura continua de seda de 4/0.

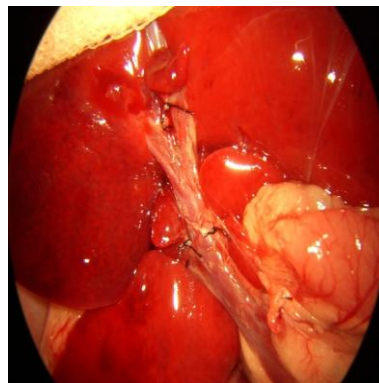


Figura 16: Aspecto del hilio hepático una vez completada la exéresis de la vía biliar principal, con las ligaduras correspondientes de los conductos biliares que drenan los cuatro lóbulos. Se comprueba la integridad de la arteria hepática y de la vena porta, así como de sus ramas lobulares.

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, 1989; Aller y Nava, 2009), 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 Nava, 2009).

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, dependiendo del grupo de estudio, a las 5 y a las 8 semanas del período p.o., durante el cual 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 et al., 2009e). Además, con el objetivo de evitar el posible rechazo del xenotrasplante, se les administró Tacrolimus, (0.05 mg/Kg IM, 2 veces a la semana) desde las 24 horas previas a la inyección de células madre o suero (dependiendo de si trataba del grupo de estudio o grupo control) hasta el momento del sacrificio.

2.F. OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE DE LIPOASPIRADO HUMANO

Se han utilizado las células madre mesenquimales obtenidas durante un proyecto anterior financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias, extraídas de tejido adiposo obtenido de liposucciones estéticas electivas. El tejido obtenido de los pacientes donantes que así lo consintieron, siguiendo las directivas del BOE 2006/17/CE del 8 de febrero del 2006, fue procesado como más adelante se detalla. La fracción vasculo estromal (SVF) fue aislada del tejido adiposo utilizando un procedimiento basado en el descrito por Zuk y cols en 2001 (Zuk et al., 2001):

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% a 37° 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 medio se retira, dejando un pellet con la SVF.
2. Los eritrocitos contaminantes de esta fracción se lisan con un buffer de NH₄Cl 160 mM, 10 mM de KHCO₃ y 1 mM de EDTA e incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. Dicho buffer se inhibe con PBS 5:1.
3. El SVF libre de eritrocitos contaminantes se aísla por centrifugación en las mismas condiciones anteriores, resuspendida en medio de cultivo y sembrada a una densidad aproximada de 30.000 células por cm² y cultivada toda la noche a 37° C y 5% de CO₂ en medio de cultivo (DMEM con 10% FBS).
4. Posteriormente 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 levantan con tripsina-EDTA al 0,05% en HBSS (Sigma) y se procede a su congelación en rampa (0,5°C/min) en medio de criopreservación (medio de cultivo con 10% DMSO, Sigma, San Louis, MS, USA) hasta los -80°C, para luego sumergirlas en N₂ líquido.

2.G. CARACTERIZACIÓN CELULAR MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Las células mesenquimales de estirpe adipocítica, una vez descongeladas, son examinadas para determinar la expresión de moléculas de superficie típicas de células madre utilizando citometría de flujo. En concreto, se separan las células en función de si expresan marcadores de células madre mesenquimales utilizando anticuerpos primarios marcadores de células mesenquimales o estromales acompañantes CD31, CD34, CD45, CD105 y Stro-1 (Sigma) y anticuerpos marcadores de mesodermo (Vimentina; Sigma). En todos los casos se han utilizado anticuerpos secundarios anti-CD34 conjugado con ficoeritrina (Becton Dickinson) y/o anti- CD105 conjugado con fluoresceína (Chemicon). (Zuk et al., 2001; Zuk et al, 2002). Han sido establecidos un mínimo de 3 criterios como necesarios para considerar una población celular como células madre de origen mesenquimal (Dominici et al., 2006). Primero, las células madre de origen mesenquimal deben poseer una plasticidad adherente cuando son mantenidas en condiciones estándar de cultivo. Segundo, las células madre de origen mesenquimal deben expresar los marcadores CD105, CD73 y CD90, y carecer de la expresión de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79α o CD19 y de moléculas de superficie HLA-DR. Tercero, las células madre de origen mesenquimal deben tener la capacidad de diferenciarse en los linajes mesodérmicos adipogénicos, condrogénicos y osteogénicos. Curiosamente, más del 90% de las células adherentes cultivada en SVF adquieren el marcador CD105 (Yoshimura et al., 2006; Varma et al., 2007). Consecuentemente, los cultivos de SVF han sido utilizados con objetivos terapéuticos en la mayoría de los estudios publicados.

2.H. CARACTERIZACIÓN CELULAR FUNCIONAL MEDIANTE DIFERENCIACIÓN

Se realiza una caracterización funcional de las células madre mesenquimales mediante inducción de la 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 3 veces por semana, y el último día se medirá la actividad fosfatasa alcalina en células control y 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) para a las 24 horas retirar el medio y cambiarlo por medio de diferenciación adipogénica sin insulina. El medio con insulina se añade, de esta manera, cada 72 horas, lavándolo a las 24 horas con medio sin insulina y se mantiene este protocolo durante 2 semanas, tras las cuales se revela la presencia de vacuolas lipídicas intracelulares mediante tinción Red Oil-O

2.1. 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 hepatogénicas siguiendo el protocolo ya establecido por Seo y cols. en 2005 con pequeñas modificaciones: (Seo et al., 2005): Las células se cultivan

durante 7 días sobre un delgado sustrato 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 (R&D Systems); 10 ng/ml rh OSM, 10ng/ml rhHGF (todos de R&D Systems); 1% P/S (Gibco); 0.6% Glutamax (Gibco), que se referesca cada 2 días. Después del tiempo necesario (entre 2 y 4 semanas), se confirma la diferenciación dirigida hacia hepatocitos verificándose la expresión por las células madre de albúmina mediante inmunocitoquímica frente a albúmina (anticuerpo de Dako).

Previamente a su trasplante, las células mesenquimales prediferenciadas hacia el linaje hepatocitario se marcan con BromodeoxiUridina (1:1000) y fluorocromo CMDil (Molecular Probes, 1:200) con el objeto de identificarlas posteriormente en el parénquima hepático de la rata.

2.J. ADMINISTRACIÓN INTRAHEPÁTICA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE ORIGEN ADIPOCÍTICO

La técnica utilizada para la administración de células madre ha sido mediante infiltración lobular hepática. Esta técnica consiste en la obtención de una suspensión de células madre (número de células madre: 4×10^6 células/rata en 1 cc de solución salina, *Hanks balanced SALT solution*, HBSS, Invitrogen) e inyección mediante aguja de calibre 18G en los lóbulos hepáticos medio, lateral izquierdo y lateral derecho de 0.33 ml/lóbulo. Una vez inoculadas las células madre de origen adipocítico o la solución salina isotónica, se aplica un material hemostático sobre el sitio de punción hepática (Figura 17).

Los animales han sido tratados las 24 horas previas y tras la infiltración hepática de solución salina isotónica (1ml) o de células madre de origen adipocítico con inmunosupresión (Tacrolimus, 0.05 mg/Kg, 2 días a la semana) como profilaxis de rechazo, ya que son células de procedencia humana, y por lo tanto se trata de un xenotrasplante.



Figura 17: Inoculación de las células madre de origen adipocítico o la solución salina isotónica en el parénquima hepático. Inmediatamente después, se aplica un material hemostático (Tachosil®) sobre el sitio de punción hepática

2.K. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES

Los animales supervivientes en cada serie fueron sacrificados por exanguinación a las 5 o a las 8 semanas del post-operatorio, en función del grupo al que pertenecieran. 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.K.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.

2.K.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, es decir, en las áreas esplenorenal (ER), gastroesofágica (colaterales paraesofágicas) (PE), y pararrectal (PR).

2.K.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 et al. 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 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 18). 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 et al., 2000).

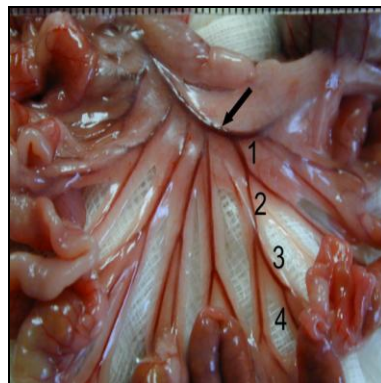


Figura 18. Vascularización venosa mesentérica en la que se observa la vena mesentérica superior (flecha) y sus ramas venosas de primer (1), segundo (2), tercer (3) y cuarto (4) orden.

2.K.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 19). 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, se dividió en tres alícuotas, que se congelaron a -80 °C hasta su utilización para determinar diferentes marcadores bioquímicos.

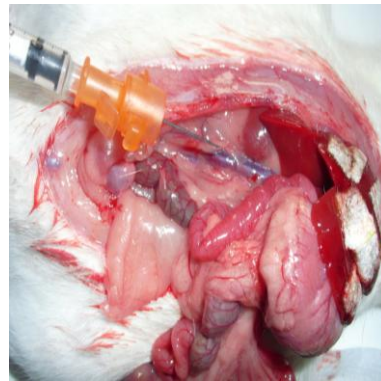


Figura 19: *Extracción sanguínea de la vena cava inferior infrahepática*

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 claviclar, 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 SF 0.9% a través de este catéter, con la ayuda de una máquina de perfusión. Inmediatamente después de la inserción del catéter, se realiza la sección de la aurícula derecha del corazón de la rata lo que permite la exanguinación del animal (Figura 20). Este proceso de perfusión-lavado de los tejidos con suero fisiológico dura unos 15 minutos, tras los cuáles se inicia la perfusión de formaldehído al 2%, durante unos 30 minutos aproximadamente.

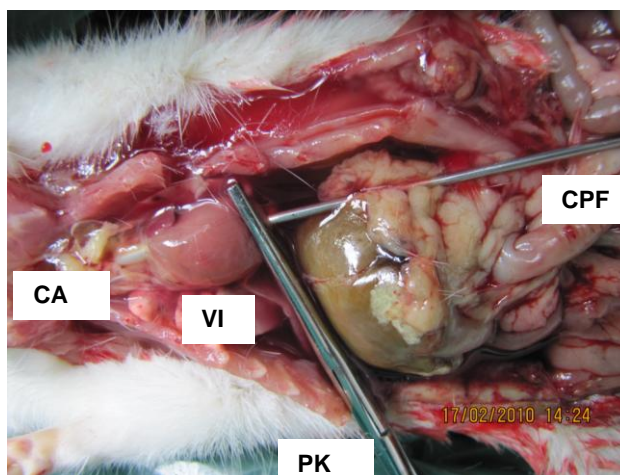


Figura 20: Se puede apreciar el catéter de perfusión de formaldehído (CPF) insertado en el ventrículo izquierdo (VI) y con el extremo distal en la luz del cayado aórtico (CA), fijado con una pinza de Kocher (PK)

2.K.5. Recogida de muestras histológicas

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

2.K.6. Eliminación de los restos biológicos

Una vez tomadas las muestras los restos de los animales y los tejidos desechados de las vísceras fueron depositadas 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 CONENUR, 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.L. DETERMINACIONES SÉRICAS DE FUNCIÓN HEPÁTICA

Para la valoración de la reversibilidad de las alteraciones producidas por la colestasis precoz y tardía con células madre prediferenciadas a hepatocitos y sin diferenciar, respectivamente, se han estudiado parámetros bioquímicos séricos de insuficiencia hepática y de colestasis (AST, ALT, LDH, GGT, Bb total y directa, ácidos biliares, FA, proteínas totales y albúmina).

2.L.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, y es color 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 (Martíneck, 1966; Sorrinson et al., 1971; Royer et al., 1973).

2.L.2. Alanin-Aminotransferasa (ALT) Y Aspartato- Aminotransferasa (AST)

La valoración de AST se fundamenta en la reacción por la que el α -cetoglutarato y el aspartato sufren una reacción catalizada por la AST, transformándose en L-Glutamato y oxalacetato, cuya reacción con NADH e Hidrogeniones da lugar a malato y a NAD^+ , por acción de la enzima Malato Deshidrogenasa. El método de valoración se basa en esta oxidación del NADH a 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 α -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 NAD^+ (Bergmeyer et al., 1976; Bergmeyer et al., 1978; Bergmeyer et al., 1980).

2.L.3. Lactato Deshidrogenasa (LDH)

Para la cuantificación de los niveles séricos de LDH se utilizó un método cinético espectrofotométrico de 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 en la 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.L.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 metodología DGKC (Izquierdo et al., 1982; Tietz et al., 1983; Tietz, 1987).

2.L.5. γ - 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 γ -glutamil de un sustrato donante (γ -glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida) a un receptor (glicilglicina), dando lugar γ -glutamilglicilglicina y 5-amino-2-nitrobenzoato. El aumento de la concentración de éste último produce cambios en la absorbancia en una longitud de onda de 410 nm., siendo por tanto la misma directamente proporcional a la actividad enzimática de GGT. (Schuman et al., 2002; Panteghini M, 2006).

2.L.6. Ácidos Biliares

La concentración sérica de ácidos biliares se valoró utilizando un test cinético fotocolorimétrico enzimático. En una primera reacción los ácidos biliares son oxidados por la enzima 3- α hidroxisteroide dehidrogenasa, con la subsiguiente reducción del Thio-NAD a Thio-NADH. La tasa de formación de éste último se determina midiendo los cambios en la absorbancia específica en 405 nm.

2.L.7. Proteínas Totales

Las proteínas totales se determinaron mediante el test colorimétrico "Biuret", basado en que los grupos -CO-NH- unidos entre sí dan una reacción con formación de color violeta con las sales cúpricas en medio

alcalino, siendo la más representativa y simple la que da con el reactivo de Biuret. Se valora la absorbancia de la muestra por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm. Es en la actualidad, constituye el método más exacto y simple para la determinación de las proteínas totales (Henry et al.1957; Peters 1968).

2.L.8. 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 a temperatura ambiente (Doumas et al., 1971; Webster et al., 1974).

2. L.9. Creatinina

Los niveles séricos de Creatinina se cuantificaron utilizando un test químico cinético fotocolorimétrico. 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. (Folin, 1904; Cook, 1971; Larsen, 1972; Lamb et al., 2006).

2.M. ESTUDIO MICROSCÓPICO E HISTOPATOLÓGICO

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

2.M.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 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 24 horas.

2.M.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.M.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 pegadas 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 cuál 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.M.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 determinada 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.M.5. Tinciones histológicas

2.M.5. a) Hematoxilina & Eosina:

Las secciones realizadas se han de hidratar para que la hematoxilina - eosina puedan 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. La tinción con Hematoxilina-Eosina es una tinción general que nos 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 y montaje. La deshidratación se lleva a cabo por alcoholes de gradación creciente. A continuación, se realiza un 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.

2.M.5. b) Tricrómico de Masson:

Primeramente, se tiñen las secciones con un tinte ácido tal como escarlata de Biebrich. Todos los elementos acidófilos del tejido tales como el citoplasma celular, el músculo y el colágeno se unirán a los tintes ácidos. Las secciones entonces 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.

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 Mason: 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 en grifo
- Ácido fosfomolibdico – naranja G hasta decoloración del tejido: 4 minutos: 3 g de ácido fosfomolibdico + 2 g de naranja Gen 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)

A continuación, se toman fotos de las muestras hepáticas teñidas con tricrómico para hallar la cantidad de área ocupada por hepatocitos y la cantidad de área ocupada por proliferación biliar.

2.M.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, y de las áreas de hepatocitos y de proliferación biliar en las tinciones con tricrómico de Masson. De 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.M.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 histológicas 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: < 5 puntos
- Diagnóstico histopatológico intermedio-bueno: 5-12 puntos
- Diagnóstico histopatológico intermedio-malo: 13-20 puntos
- Diagnóstico histopatológico malo: > 20 puntos

Para realizar las tinciones con rojo sirio y tricrómico de Masson se eligieron los 2 casos de ratas con células madre prediferenciadas a hepatocitos inyectadas a las 2 semanas de p.o. y sacrificadas a 8 que ofrecieron mejores resultados bioquímicos y macroscópicos en la necropsia, y aquellos 2 casos de ratas a las que se inyectó suero salino a las 2 semanas de p.o. que peores resultados ofrecieron. 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, el único en el cuál no se habían inyectado células madre.

2.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, expresándolos mediante una medida de centralización (media aritmética) y una medida de dispersión (desviación estándar) ($x \pm DE$).

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.

La comparación entre variables cualitativas y cuantitativas se ha realizado mediante la función Chi Cuadrado, estableciendo la significación estadística en función de los residuos corregidos, considerándose un resultado significativo cuando dicho residuo no está incluido en el intervalo $(-2,+2)$.

Para comparar las variables cuantitativas se utilizó la prueba de Análisis de la varianza (ANOVA) con un factor (grupo) y ANOVA con 2 factores (grupo y semanas del estudio). En éste último caso, cuando existía un contraste estadísticamente significativo se empleó el test de Duncan para contrastes a posteriori. Previamente, se había comprobado que las variables estudiadas se ajustaban a una distribución Normal mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los resultados se consideran estadísticamente significativos cuando $p < 0,05$.

Respecto de los estudios histopatológicos, para comparar el efecto del lóbulo en el que se inyectan células y de las células en los grupos con distinta

evolución p.o. sobre las variables cuantitativas (porcentaje del área de proliferación biliar, hepatocitos y fibrosis), se utilizó un modelo de regresión de efectos mixtos para controlar la correlación de las medidas dentro de los mismos individuos. Se consideraron como efectos fijos lóbulo, grupo y semanas de evolución p.o. así como sus posibles efectos de interacción. Se usó la correlación de Bonferroni para analizar las correspondientes comparaciones “post-hoc”. Los resultados se consideran estadísticamente significativos cuando $p < 0.05$.

V. RESULTADOS

1. RESULTADOS DE LOS GRUPOS PRELIMINARES

1.A. Supervivencia:

La supervivencia global fue del 41,7%, produciéndose el fallecimiento de 14 de los 24 animales que formaban el grupo piloto inicial, sin que se aprecien diferencias estadísticamente significativas ($p=0,26$). La supervivencia por grupos se expone en la tabla 2 y en la figura 21 mediante una curva de Kaplan Meier.

Tabla 2: Supervivencia de las ratas de los grupos preliminares con evolución p.o. de 8 semanas. **SO:** pseudo-operadas. **CM-S:** colestasis microquirúrgica e inyección intrahepática de solución salina isotónica (0.9%) **CM-H-1:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas prediferenciadas a hepatocitos a las 24 h p.o. **CM-A-1:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas no diferenciadas a las 24h p.o. **CM-H-14:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas prediferenciadas a hepatocito a las 2 semanas del p.o. **CM-A-14:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas no diferenciadas a las 2 semanas p.o.

GRUPO	SUPERVIVENCIA
I. SO (n=4)	n=4 (100%)
II. CM-S (n=4)	n=1 (25%)
III. CM-H-1 (n=3)	n=1 (33,3%)
IV. CM-A-1 (n=5)	n=2 (40%)
V. CM-H-14 (n=4)	n=0 (0%)
VI. CM-A-14 (n=4)	n=2 (50%)

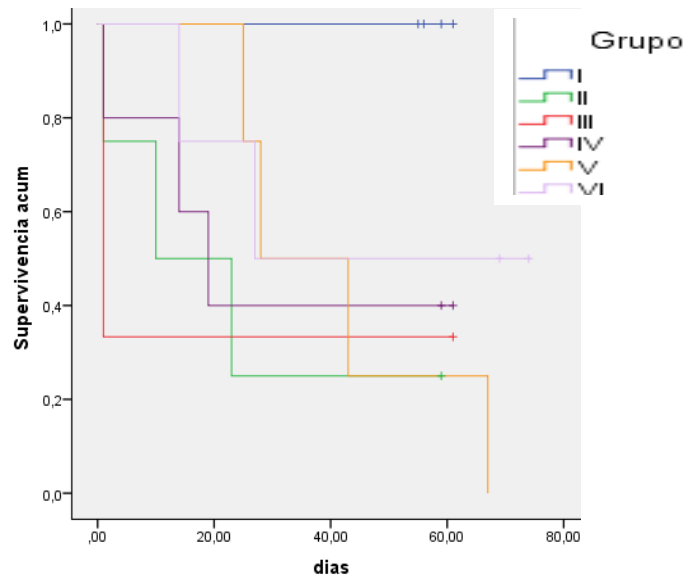


Figura 21: Curva de supervivencia de Kaplan Maier: correspondiente a los grupos preliminares. El grupo I presenta la mayor supervivencia, con un 100%, mientras que en el grupo V fallecen todos sus integrantes. El resto de supervivencias son: grupo II (25%), grupo III (33,3%), grupo IV (40%) y grupo VI (50%), Las diferencias de supervivencia entre los grupos no son significativas ($p=0,26$).

1.B. Complicaciones postoperatorias

Las ratas correspondientes a los grupos preliminares de 8 semanas de evolución postoperatoria presentaron las siguientes complicaciones:

1. Peritonitis biliar y fallecimiento secundario en 3 casos
2. Sepsis originada por infección de la cicatriz de laparotomía en 1 caso
3. Eventración de la laparotomía en 3 casos

1.C Ascitis

La media del volumen de líquido ascítico encontrada en las ratas colestásicas fue de $2,78 \pm 5,16$ ml sin que se apreciaran diferencias significativas entre los distintos grupos (tabla 3).

Tabla 3: Volumen de líquido ascítico (L.A.) en los grupos preliminares con evolución p.o. de 8 semanas. **SO:** pseudo-operadas. **CM-S:** colestasis microquirúrgica e inyección de solución salina isotónica (0.9%). **CM-H-1:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas prediferenciadas a hepatocitos a las 24 h p.o. **CM-A-1:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas no diferenciadas a las 24h p.o. **CM-A-14:** colestasis microquirurgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas no diferenciadas a las 2 semanas p.o.

GRUPO	VOLUMEN L.A. (cc)
SO (n=4)	0
CM-S (n=1)	3
CM-H-1 (n=1)	0
CM-A-1 (n=2)	7,5 ± 10,6
CM-A-14 (n=2)	3,5 ± 4,95

Media ± DE

1.D Circulación colateral porto-sistémica

Todas las ratas colestásicas que integran los grupos preliminares presentan circulación colateral, sin que se aprecien diferencias significativas (tabla 4).

Tabla 4: Circulación colateral porto-sistémica en los grupos preliminares con evolución p.o. de 8 semanas: CPE (circulación paraesofágica), CER (circulación esplenorrenal), CPR (circulación pararrectal); **SO:** pseudo-operadas. **CM-S:** colestasis microquirúrgica e inyección de solución salina isotónica (0.9%). **CM-H-1:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas prediferenciadas a hepatocitos a las 24 h p.o. **CM-A-1:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas no diferenciadas a las 24h p.o. **CM-A-14:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas no diferenciadas a las 2 semanas p.o.

GRUPO	CPE		CER		CPR	
	n	%	n	%	n	%
SO (n=4)	0	0%	0	0%	0	0%
CM-S (n=1)	1	100%	1	100%	1	100%
CM-H-1 (n=1)	1	100%	0	0%	1	100%
CM-A-1 (n=2)	2	100%	2	100%	2	100%
CM-A-14 (n=2)	2	100%	2	100%	1	50%

1.E: Vasculopatía venosa mesentérica

Todas las ratas pertenecientes a los grupos preliminares, excepto el grupo SO (pseudo operadas), presentan vasculopatía venosa mesentérica, sin que se aprecien diferencias significativas (tabla 5).

Tabla 5: VVM (vasculopatía venosa mesentérica) en ratas de los grupos preliminares con 8 semanas evolución po: **SO:** pseudo-operadas. **CM-S:** colestasis microquirúrgica e inyección de solución salina isotónica (0.9%). **CM-H-1:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas prediferenciadas a hepatocitos a las 24 h p.o. **CM-A-1:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas no diferenciadas a las 24h p.o. **CM-A-14:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas no diferenciadas a las 2 semanas p.o.

GRUPO	VVM	
	n	%
SO (n=4)	0	0%
CM-S (n=1)	1	100%
CM-H-1 (n=1)	1	100%
CM-A-1 (n=2)	2	100%
CM-A-14 (n=2)	2	100%

1.F. Evolución del peso corporal

Los resultados correspondientes al peso corporal de los animales, tanto al inicio como al final del estudio, así como el incremento de peso corporal, se representan en la tabla 6. El incremento del peso corporal es mayor en los grupos SO y CM-S (tabla 6).

Tabla 6: Peso corporal inicial (PCI;g), peso corporal final (PCF;g), e incremento de peso corporal (Δ peso; g) en ratas de los grupos preliminares con evolución po de 8 semanas: **SO:** pseudo-operadas. **CM-S:** colestasis microquirúrgica e inyección de solución salina isotónica (0.9%) **CM-A-1:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas no diferenciadas a las 24h p.o. **CM-H-1:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas prediferenciadas a hepatocitos a las 24 h p.o. **CM-A-14:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas no diferenciadas a las 2 semanas p.o. **CM-H-14:** con colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas prediferenciadas a hepatocito a las 2 semanas p.o.

GRUPO	PCI (g)	PCF (g)	Δ PC (g)
SO (n=4)	292,12 \pm 33,29	369,83 \pm 18,72	57,35 \pm 51,64
CM-S (n=1)	267,25 \pm 173,50	274,00	16,00
CM-H-1 (n=1)	295,16 \pm 1,75	285,00	10,00
CM-A-1 (n=2)	276,30 \pm 57,05	271,75 \pm 11,66	7,25 \pm 1,76
CM-H-14 (n=0)	295,87 \pm 39,29	-	-
CM-A-14 (n=2)	310,62 \pm 42,35	276,75 \pm 7,42	2,50 \pm 2,12

Media \pm DE

1.G Peso hepático

El peso hepático (PH), los pesos de los lóbulos hepáticos, y la relación peso hepático/peso corporal (PH/PC) se expresan en la tabla 6. El PH y la relación PH/PC son menores en el grupo de ratas pseudo operadas (SO) (tabla 7).

Tabla 7: Peso hepático (PH), peso del lóbulo medio (PLM), del lóbulo lateral derecho (PLLD), del lóbulo lateral izquierdo (PLLI), del lóbulo caudado (PLC), y Relación peso hepático- peso corporal (PH/PC) en los grupos preliminares de ratas con 8 semanas de evolución p.o. **SO:** pseudo-operadas. **CM-S:** colestasis microquirúrgica e inyección de solución salina isotónica (0.9%). **CM-H-1:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas prediferenciadas a hepatocitos a las 24 h p.o. **CM-A-1:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas no diferenciadas a las 24h p.o. **CM-A-14:** colestasis microquirúrgica e inyección a de células madre mesenquimales adipocíticas no diferenciadas a las 2 semanas p.o.

GRUPO	PLM (g)	PLLD (g)	PLLI (g)	PLC (g)	PH (g)	PH/P C x100
SO (n=4)	4,42 ± 0,34	2,52 ± 0,12	3,78 ± 0,33	0,96 ± 0,26	11,69 ± 0,99	3,15 ± 0,11
CM-S (n=1)	3,87	3,52	3,7	1,22	12,31	4,49
CM-H-1 (n=1)	6,04	3,54	5,81	0,32	15,71	5,51
CM-A-1 (n=2)	6,13 ± 0,6	5,55 ± 0,84	6,79 ± 0,06	2,09 ± 0,04	20,57 ± 0,34	7,57 ± 0,44
CM-A-14 (n=2)	6,53 ± 2,1	4,02 ± 1,86	5,17 ± 2,75	2,17 ± 1,29	17,9 ± 8,01	6,5 ± 3,06

Media ±D

1.H Peso esplénico

No se aprecian diferencias significativas en el peso esplénico entre los distintos grupos. Sin embargo, la relación peso esplénico/peso corporal es significativamente mayor ($p= 0,04$) en los grupos CM-A-1 (colestasis microquirúrgica e inyección intrahepática de células madre mesenquimales adipocíticas no diferenciadas a las 24h p.o.) y CM-H-14 (con colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas prediferenciadas a hepatocito a las 2 semanas p.o) respecto del grupo de animales pseudooperados (SO) (tabla 8).

Tabla 8: Peso esplénico (PE; g), Relación peso esplénico / peso corporal x 100 (PE/PC; %) en los grupos preliminares con 8 semanas de evolución p.o. **SO:** pseudo-operadas. **CM-S:** colestasis microquirúrgica e inyección de solución salina isotónica (0.9%). **CM-H-1:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas prediferenciadas a hepatocitos a las 24 h p.o. **CM-A-1:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas no diferenciadas a las 24h p.o. **CM-A-14:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas no diferenciadas a las 2 semanas p.o.

GRUPO	PE (g)	PE/PC (%)
SO (n=4)	0,63 ± 0,11	0,16 ± 0,02
CM-S (n=1)	0,53	0,19
CM-H-1 (n=1)	1,04	0,36
CM-A-1 (n=2)	0,98 ± 0,41	0,48* ± 0,05
CM-A-14 (n=2)	0,88 ± 0,21	0,31* ± 0,08

Media ± DE; * p< 0,05: Valor estadísticamente significativo respecto de SO.

1.1 Peso testicular

El peso testicular (PT) y la relación peso testicular/peso corporal (PT/PC) se exponen en la tabla 9. Tanto el PT como la relación PT/PC son significativamente menores ($p < 0,01$) en los grupos CM-A-1 (colestasis microquirúrgica e inyección intrahepática de células madre mesenquimales adipocíticas no diferenciadas a las 24h p.o. y CM-H-14 (con colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas prediferenciadas a hepatocito a las 2 semanas p.o) respecto de las ratas del grupo de pseudooperadas (SO) (tabla 9).

Tabla 9: Peso testicular (PT;g) y Relación peso testicular / peso corporal x 100 (PT/PC; %) en los grupos preliminares con 8 semanas de evolución p.o. **SO:** pseudo-operadas. **CM-S:** colestasis microquirúrgica e inyección de solución salina isotónica (0.9%). **CM-H-1:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas prediferenciadas a hepatocitos a las 24 h p.o. **CM-A-1:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas no diferenciadas a las 24h p.o. **CM-A-14:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas no diferenciadas a las 2 semanas p.o.

GRUPO	PT	PT/PC (%)
SO (n=4)	2,88 ± 0,21	0,77 ± 0,03
CM-S (n=1)	1,77	0,64
CM-H-1 (n=1)	0,56	0,20
CM-A-1 (n=2)	0,61** ± 0,19	0,28** ± 0,06
CM-A-14 (n=2)	0,91** ± 0,07	0,32** ± 0,02

Media ± DE; **: p<0,01: Valor estadísticamente significativo respecto de SO

1.J Determinaciones séricas de función hepática

Hay un aumento significativo (p<0,001) de los valores de Bilirrubina total (BT) y bilirrubina directa (BD) en los grupos CM-A-1 (colestasis microquirúrgica e inyección intrahepática de células madre mesenquimales adipocíticas no diferenciadas a las 24h p.o.) y CM-A-14 (colestasis microquirúrgica e inyección intrahepática de células madre mesenquimales de origen adipocítico no diferenciadas a las 2 semanas p.o) respecto del grupo de ratas pseudo-operadas (SO) (tabla 10).

Tabla 10: Concentraciones séricas de Bilirrubina Total (BT; mg/dl) y Bilirrubina Directa (BD; mg/dl), Aspartato amino-transferasa (AST; U/L) y Alanin amino-transferasa (ALT; U/L) en los grupos preliminares de 8 semanas de evolución po: **SO:** pseudo-operadas. **CM-S:** colestasis microquirúrgica e inyección de solución salina isotónica (0.9%). **CM-H-1:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas prediferenciadas a hepatocitos a las 24 h p.o. **CM-A-1:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas no diferenciadas a las 24h p.o. **CM-H-14:** con colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas prediferenciadas a hepatocitos a las 2 semanas p.o. **CM-A-14:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales adipocíticas no diferenciadas a las 2 semanas p.o.

GRUPO	BT (mg/dl)	BD (mg/dl)	AST (U/L)	ALT (U/L)
SO (n=4)	0,12 ± 0,02	0,03 ± 0,01	105,75 ± 38,35	45,75 ± 12,52
CM-S (n=1)	7,16	3,15	315,00	64,00
CM-H-1 (n=1)	11,12	5,95	158,00	43,00
CM-A-1 (n=2)	14,36*** ± 0,14	7,76*** ± 0,20	217,50 ± 54,44	44,50 ± 3,53
CM-H-14 (n=1)	8,13	3,97	144,00	28,00
CM-A-14 (n=2)	7,24*** ± 2,25	2,94*** ± 1,10	524,00 ± 432,74	57,50 ± 51,61

Media ± DE; ***p<0,001: Valor estadísticamente significativo respecto de SO

Las concentraciones séricas de Lactato-dehidrogenasa (LDH) y de Gamma-glutamil-transpeptidasa (γ-GT) no varían de forma significativa, en tanto que se produce un aumento significativo (p<0,05) de los valores de ácidos biliares en los grupos CM-A-1 (colestasis microquirúrgica e inyección intrahepática de células madre mesenquimales adipocíticas no diferenciadas a las 24h p.o.) y CM-A-14 (colestasis microquirúrgica e inyección intrahepática de células madre mesenquimales de origen adipocítico no diferenciadas a las 2 semanas p.o) respecto del grupo de ratas pseudo-operadas (SO). Las ratas del grupo CM-A-14 (colestasis microquirúrgica e inyección intrahepática de células madre mesenquimales de origen adipocítico no diferenciadas a las 2 semanas p.o) presentan un descenso significativo (p<0,01) de los niveles de albúmina respecto a las ratas de los grupos SO (pseudo-operadas) y CM-A-1 (colestasis microquirúrgica e inyección intrahepática de células madre mesenquimales de origen adipocítico no diferenciadas a las 24h p.o) (tabla 11).

Tabla 11: Concentraciones séricas de Lactato-dehidrogenasa (LDH;U/L), Gamma-glutamil transpeptidasa (GGT;U/L), ácidos biliares (AB) y albúmina (Alb) en los grupos preliminares de 8 semanas de evolución po: **SO:** pseudo-operadas. **CM-S:** colestasis microquirúrgica e inyección intrahepática de solución salina isotónica (0.9%). **CM-H-1:** colestasis microquirúrgica e inyección intrahepática de células madre mesenquimales de origen adipocítico prediferenciadas a hepatocitos a las 24 h p.o. **CM-A-1:** colestasis

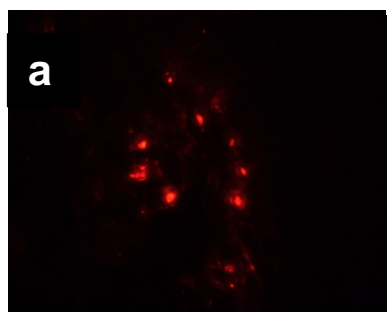
microquirúrgica e inyección intrahepática de células madre mesenquimales de origen adipocítico no diferenciadas a las 24h p.o. **CM-H-14**: con colestasis microquirúrgica e inyección intrahepática de células madre mesenquimales de origen adipocítico prediferenciadas a hepatocito a las 2 semanas p.o. **CM-A-14**: colestasis microquirúrgica e inyección intrahepática de células madre mesenquimales de origen adipocítico no diferenciadas a las 2 semanas p.o.

GRUPO	LDH (U/L)	GGT (U/L)	AB ($\mu\text{mol/L}$)	Alb (g/dl)
SO (n=4)	1515,80 \pm 626,72	1,00 \pm 0,00	22,05 \pm 19,74	3,09 $\square\square$ \pm 0,25
CM-S (n=1)	2140,80	16,00	73,88	1,89
CM-H-1 (n=1)	1300,30	22,00	38,23	2,53
CM-A-1 (n=2)	1075,00 \pm 44,54	118,50 \pm 111,01	67,55* \pm 17,48	2,47 $\square\square$ \pm 0,43
CM-H-14 (n=1)	1876,70	23,00	43,39	2,13
CM-A-14 (n=2)	1961,90 \pm 1728,87	28,00 \pm 15,55	65,08* \pm 6,75	0,55 \pm 0,29

Media \pm DE; * $p < 0,05$: Valor estadísticamente significativo respecto de SO
Media \pm DE; $\square\square$ $p < 0,01$: Valor estadísticamente significativo respecto de CM-A-14

1.K Estudio histopatológico hepático

En el estudio con inmuno fluorescencia se comprobó la presencia de células madre mesenquimales de origen adipocítico marcadas en los grupos en los que se había administrado células. Estas células estaban presentes en todos los lóbulos menos en el lóbulo caudado (Figura 21).



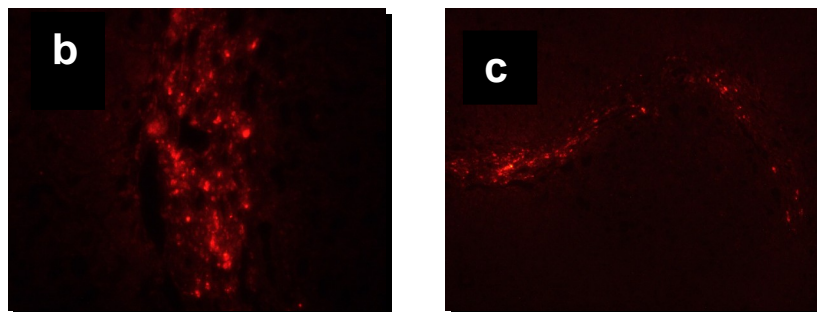


Figura 21: Se puede apreciar por mediante observación con microscopio de inmunofluorescencia la presencia de células madre mesenquimales de origen adipocítico en aquellos grupos a los que se administraban células madre: **a)** CM-H-1: colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales de origen adipocítico prediferenciadas a hepatocitos a las 24 h p.o. **b)** CM-A-1: colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales de origen adipocítico no diferenciadas a las 24h p.o. **c)** CM-A-14: colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales de origen adipocítico no diferenciadas a las 2 semanas p.o.

En el grupo de pseudo operadas se puede observar en el estudio de microscopía óptica y tinción con HE que el hígado mantiene una arquitectura normal, sin presentar proliferación biliar ni fibrosis (Figura 22).

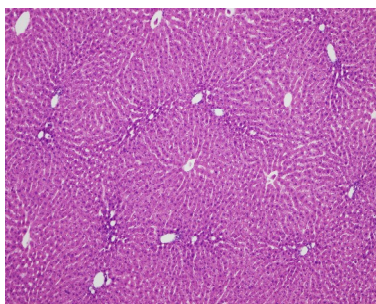


Figura 22: Imagen de microscopía óptica correspondiente a un hígado de rata pseudo-operada (SO) (Hematoxilina Eosina).

Todos los grupos estudiados, salvo en el grupo de pseudooperadas, presentaban en el microscopio óptico proliferación biliar, inflamación periportal, dilatación de la vena centrolobulillar, nódulos de regeneración, necrosis hepatocitaria, fibrosis, así como trombosis portal y suprahepática, sin que se apreciaran diferencias evidentes en ninguno de los grupos (Figura 23).

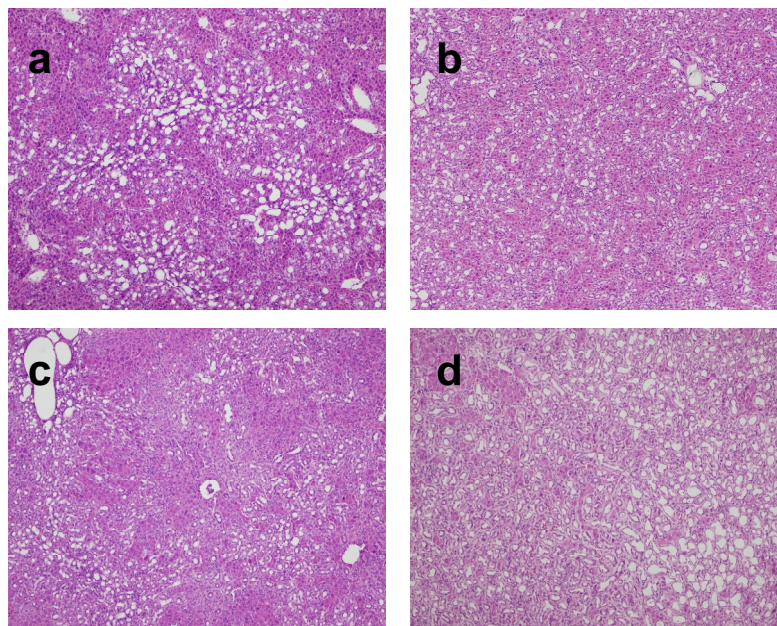


Figura 23: Imagen de microscopía óptica con Hematoxilina Eosina correspondiente a un hígado de rata correspondiente a los siguiente grupos: **a)** CM-S: colestasis microquirúrgica e inyección de solución salina isotónica (0.9%). **b)** CM-H-1: colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales de origen adipocítico prediferenciadas a hepatocitos a las 24 h p.o. **c)** CM-A-1: colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales de origen adipocítico no diferenciadas a las 24h p.o. **d)** CM-A-14: colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales de origen adipocítico no diferenciadas a las 2 semanas p.o.

2. RESULTADOS DE LOS GRUPOS DEFINITIVOS

De esta forma, tras analizar los resultados de este grupo preliminar de ratas, concluimos que las células madre mesenquimales de origen adipocítico más adecuadas para la reversión de la patología colestásica serían aquellas prediferenciadas a hepatocito, y que el periodo evolutivo de colestasis microquirúrgica en la rata en el cual las lesiones hepáticas ya están completamente establecidas es de 14 días. Además, se diseñó el estudio con la intención de analizar el posible efecto terapéutico de las células madre en dos momentos evolutivos distintos: a las 5 y a las 8 semanas de evolución p.o. A continuación, se describen los resultados correspondientes a los grupos formados por ratas con colestasis microquirúrgica a las que se les administraron por vía intra-hepática solución salina isotónica (0.9%) o células madre prediferenciadas a hepatocito a las 2 semanas de evolución, y que fueron sacrificadas a las 5 o 8 semanas del p.o. (Tabla 12).

Tabla 12: Relación de series y grupos de ratas correspondientes al diseño del estudio experimental. **SO:** pseudo-operadas. **CM-S:** colestasis microquirúrgica e inyección de solución salina isotónica (0.9%). **CM-H-1:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales de origen adipocítico prediferenciadas a hepatocitos a las 24 h p.o. **CM-A-1:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales de origen adipocítico no diferenciadas a las 24h p.o. **CM-H-14:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales de origen adipocítico prediferenciadas a hepatocito a las 2 semanas p.o. **CM-A-14:** colestasis microquirúrgica e inyección de células madre mesenquimales de origen adipocítico no diferenciadas a las 2 semanas p.o. **C-2s:** Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas p.o. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 5 semanas p.o. **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 8 semanas p.o. **CMQ:** Colestasis microquirúrgica. **SS:** Suero salino. **SC-a:** células madre mesenquimales de origen adipocítico no diferenciadas. **SC-h:** células madre mesenquimales de origen adipocítico prediferenciadas a hepatocito.

		CIRUGÍA	24 horas po	2 semanas po	5 semanas po	8 semanas po
SERIE I	SO (n=4)	SO	-	-	-	Sacrificio (n=4)
	CM-S (n=4)	CMQ	SS	SS	-	Sacrificio (n=1)
SERIE II	CM-A-1 (n=5)	CMQ	SC-a	-	-	Sacrificio (n=2)
	CM-H-1 (n=3)	CMQ	SC-h	-	-	Sacrificio (n=1)
SERIE III	CM-A-14 (n=4)	CMQ	-	SC-a	-	Sacrificio (n=2)
	CM-H-14 (n=4)	CMQ	-	SC-h	-	Sacrificio (n=0)
SERIE IV	C 2s (n=8)	CMQ	-	Sacrificio (n=8)		
SERIE V	CS-5s (n=12)	CMQ	-	SS	Sacrificio (n=11)	
	CCM-5s (n=15)	CMQ	-	SC-h	Sacrificio (n=11)	
SERIE VI	CS-8s (n=16)	CMQ	-	SS	-	Sacrificio (n=7)
	CCM-8s (n=30)	CMQ	-	SC-h	-	Sacrificio (n=11)

2.A SUPERVIVENCIA

2.A.1 RESULTADOS DE LA SERIE IV: colestasis de 2 semanas de evolución

La Serie IV está compuesta por ratas colestásicas (n=8), que fueron sacrificadas a las 2 semanas del postoperatorio (C-2s), siendo su supervivencia del 100%.

2.A.2 RESULTADOS DE LA SERIE V: colestasis de 5 semanas de evolución

La Serie V está compuesta por dos grupos de ratas con colestasis que fueron sacrificadas a las 5 semanas del p.o., uno de ellos con administración intrahepática de solución salina isotónica (CS-5s) y otro de ratas a las que se les administraron células madre de origen adipocítico (CCM-5s). Esta última Serie estaba formada inicialmente por 27 animales, de los cuáles 22 permanecían vivos en el momento del sacrificio (supervivencia de 81,4%).

La supervivencia de los animales pertenecientes a esta serie en función del periodo p.o. fueron los siguientes:

- Supervivencia intraoperatoria: 88,9% (24/27)
- Supervivencia precoz (primera semana p.o.): 95,8% (23/24)
- Supervivencia tardía (después de la primera semana p.o.): 95,7%(22/23).

A su vez, la supervivencia en función de que se administrara suero salino o células madre fue la siguiente:

a. Supervivencia en el grupo de colestasis y administración intrahepática de suero salino (CS-5s):

De los 12 animales en los que se inoculó suero, 11 permanecían vivos a las 5 semanas de postoperatorio (supervivencia 91,7%). Los datos de supervivencia en función del periodo post operatorio son los siguientes (Tabla 13, Figura 24):

- Supervivencia intraoperatoria: 100% (12/12)
- Supervivencia precoz (primera semana p.o.): 100% (12/12)
- Supervivencia tardía (después de la primera semana p.o.): 91,7% (11/12)

b. Supervivencia en el grupo de colestasis y administración intrahepática de células madre adipocíticas prediferenciadas a hepatocitos (CCM-5s):

De los 15 animales en los que se inocularon células madre a las 2 semanas de la colestasis, 11 permanecían vivos a las 5 semanas de post operatorio (supervivencia 73,3%)

Los datos de supervivencia en función del periodo post operatorio son los siguientes (Tabla 13, figura 24):

- Supervivencia intraoperatoria: 80% (12/15)
- Supervivencia precoz (primera semana post operatoria): 11/12 (91,7%)
- Supervivencia tardía (a partir de la primera semana post operatoria): 11/11 (100%)

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

- Hay un descenso no significativo de la supervivencia intra- operatoria en el grupo CCM-5s respecto al grupo CS-5s (80% vs. 100%; RR 0,8, IC al 95% 0,62 -1,03)
- Hay un descenso no significativo de la supervivencia precoz en el grupo CCM-5s respecto al grupo CS-5s (91,7% vs. 100%; RR 0,91, IC al 95% 0,77 -1,08)
- Hay un aumento no significativo de la supervivencia tardía en el grupo CCM-5s respecto al grupo CS-5s (100% vs. 91,7%; RR 1,09, IC al 95% 0,92 - 1,29)

Tabla 13: Supervivencia acumulada en diferentes periodos del post-operatorio en ratas de la Serie V: **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre adipocíticas prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o.

SUPERVIVENCIA	CS-5s (n=12)	CCM-5s (n=15)
Intraoperatoria	100% (12/12)	80% (12/15)
Precoz (1ª semana)	100% (12/12)	91,7% (11/12)
Tardía (>1 semana)	91,7% (11/12)	11/11 (100%)
Global	91,7% (11/12)	73,3% (11/15)

2.A.3 RESULTADOS DE LA SERIE VI: colestasis de 8 semanas de evolución

La Serie VI está compuesta por dos grupos de ratas con colestasis que fueron sacrificadas en un periodo comprendido entre las 8 y las 9 semanas del p.o., a uno de ellos se les administró por vía intrahepática solución salina isotónica (CS-8s) y a otro de ratas se les administraron células madre de origen adipocítico por vía intrahepática (CCM-8s) 2 semanas después de la operación.

De los 43 animales que constituían este grupo, 18 permanecían vivos en el momento del sacrificio (supervivencia de 41,8%). Los resultados de supervivencia en función del periodo post operatorio fueron los siguientes:

- Supervivencia intraoperatoria: 83,7% (36/43)
- Supervivencia precoz (primera semana del p.o.): 86,1% (31/36)
- Supervivencia tardía (a partir de la primera semana del p.o. operatoria): 58,1% (18/31).

La supervivencia de estos animales, sacrificados a las 8 semanas del p.o., dependiendo de si se administraba en el hígado solución salina o bien células madre mesenquimales de origen adipocítico y prediferenciadas a hepatocitos a las 2 semanas de colestasis fue la siguiente:

a. Supervivencia en el grupo de colestasis y administración intrahepática de suero salino (CS-8s)

De los 15 animales en los que se inoculó suero a las 2 semanas de colestasis, 7 permanecían vivos a las 8 semanas de postoperatorio (supervivencia 46,6%). Los datos de supervivencia en función del periodo post-operatorio son los siguientes (Tabla 14, Figura 24):

- Supervivencia intraoperatoria: 100% (15/15)
- Supervivencia precoz (primera semana p.o.): 13/15: 86,7%
- Supervivencia tardía (a partir de la primera semana p.o.): 7/13 (53,8%)

b. Supervivencia en el grupo de colestasis y administración intrahepática de células madre adipocíticas prediferenciadas a hepatocitos (CCM-8s)

De los 28 animales en los que se inocularon células madre prediferenciadas a hepatocitos a las 2 semanas de colestasis, 11 permanecían vivos a las 8 semanas del p.o. (supervivencia 39,2%).

A su vez, los resultados de supervivencia en función del periodo p.o. son los siguientes (Tabla 11, Figura 24):

- Supervivencia intraoperatoria: 75% (21/28)
- Supervivencia precoz (primera semana p.o.): 85,7% (18/21)
- Supervivencia tardía (a partir de la primera semana p.o.): 61,1% (11/18).

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

- Hay un descenso significativo de la supervivencia intraoperatoria en el grupo CCM-8s respecto al grupo CS-8s (75% vs. 100%; RR 0,75, IC al 95% 0,60 - 0,92)
- Hay un descenso no significativo de la supervivencia precoz en el grupo CCM-8s respecto al grupo CS-8s (85,7% vs. 86,7%; RR 0,98, IC al 95% 0,75 - 1,28)
- Hay un aumento no significativo de la supervivencia tardía en el grupo CCM-8s respecto al grupo CS-8s (61,1% vs. 53,8%; RR 1,19, IC al 95% 0,60 - 2,11)

Tabla 14: Supervivencia acumulada en diferentes periodos del post-operatorio en las ratas de la Serie VI: **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 8 semanas de p.o.

SUPERVIVENCIA	CS-8s (n=16)	CCM-8s (n=28)
Intraoperatoria	100% (15/15)	75% (21/28)
Precoz (1ª semana)	86,7% (13/15)	85,7% (18/21)
Tardía (>1 semana)	53,8% (7/13)	61,1% (11/18)
Global	46,6% (7/15)	39,2% (11/28)

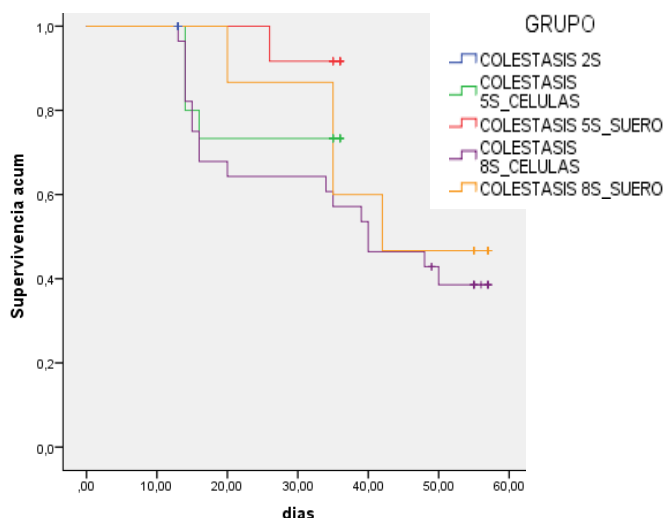


Figura 24.: Curva de supervivencia de Kaplan Meier: C-2s: Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas p.o. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas p.o. **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas p.o.

2.B COMPLICACIONES POST-OPERATORIAS

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

- Pared abdominal: Eventración e infección de la cicatriz de la laparotomía, con formación de lesiones ulcerosas en 2 casos del grupo CS-5s y en otros 2 casos del grupo de CCM-5s (figura 25).
- Complicaciones hemorrágicas:
 - Hemoperitoneo tras punción de parénquima hepático: 1 caso en el grupo CCM-8s
 - Sangrado por la laparotomía: 1 caso en el grupo CS-5s, debido a la lesión de los abundantes vasos colaterales neoformados, falleciendo el animal por shock hipovolémico, sin que fuera posible la extracción sanguínea de la vena cava inferior para la posterior realización de analítica.
- Morbilidad hepática: Se identificó la presencia de pequeños quistes biliares y abscesos hepáticos en 1 caso del grupo CS-5s y en 2 casos del grupo CCM-5s

- Sistema digestivo: Se comprobó la presencia úlceras gástricas en 2 casos del grupo C-2s (figura 25)
- Síndrome adherencial moderado En un caso del grupo CCM-5s

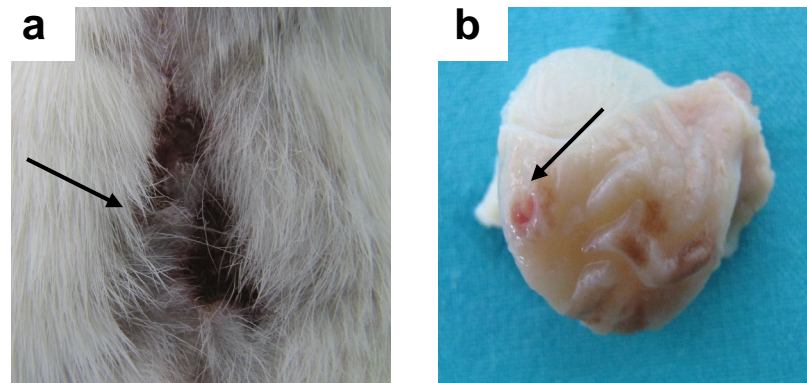


Figura 25: Complicaciones post operatorias: **a.** Úlcera sobre la cicatriz de laparotomía secundaria a infección local. **B.** Ulceración de la mucosa gástrica en una rata del grupo C-2s (Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas p.o.)

2.C. ASCÍTIS

La presencia de ascitis en los grupos C-2s (ratas con colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas), CS-5s y CCM-5s (ratas con colestasis microquirúrgica, con administración intrahepática de suero salino o de células madre a las 2 semanas de p.o., respectivamente, y sacrificio a las 5 semanas) es prácticamente inapreciable. Por el contrario, en las ratas de los grupos con 8-9 semanas de evolución el desarrollo de ascitis fue constante, aunque muy variable entre los diferentes animales que constituyen cada grupo. Así, en las ratas pertenecientes al grupo CS-8s (ratas con colestasis microquirúrgica, y administración intrahepática de suero salino a las 2 semanas de p.o. y sacrificio a las 8 semanas) se aprecia un incremento significativo ($p < 0,05$) del volumen de líquido ascítico respecto al resto de los grupos, excepto en el grupo CCM-8s (ratas con colestasis microquirúrgica y administración intrahepática de células madre a las 2 semanas de p.o. y sacrificio a las 8 semanas) (tabla 15, ANEXO I, y figuras 26 y 27).

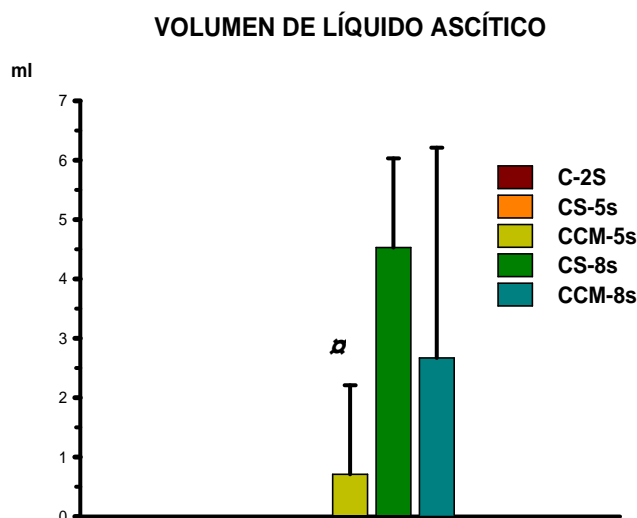


Figura 26: Volumen de **líquido ascítico** en los grupos de ratas con colestasis microquirúrgica de las series IV, V y VI: **C-2s:** Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas p.o. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 5 semanas p.o. **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 8 semanas p.o. Media \pm DE; **a** $p < 0,05$: Resultado estadísticamente significativo respecto de CS-8s.

Resulta llamativo que en las ratas colestásicas de más larga evolución, que es cuando la insuficiencia hepática se ha descompensado y comienza a aparecer ascitis desde la 5^a-6^a semana del p.o., el volumen de líquido ascítico acumulado en la cavidad abdominal cuando se sacrifican las ratas, a las 8-9 semanas de evolución, es menor en aquellos animales colestásicos a los que se les administraron células madre respecto de los que tan solo recibieron solución salina (Figuras 26 y 27).

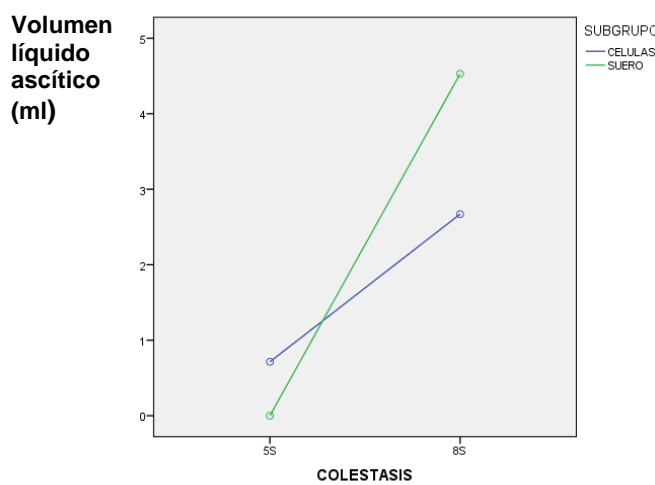


Figura 27: Diferencia en el desarrollo de líquido ascítico en ratas con colestasis microquirúrgica y administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos o suero salino, y sacrificio a las 5 y 8 semanas de p.o.

2.D CIRCULACION COLATERAL VENOSA PORTO-SISTÉMICA

Se han estudiado aquellas áreas donde se desarrolla habitualmente circulación colateral venosa en la rata, es decir, en las áreas esplenorrenal (CER), gastroesofágica (colaterales paraesofágicas: CPE), y pararrectal (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 28).
- 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 pararrectal izquierda (Figura 28).

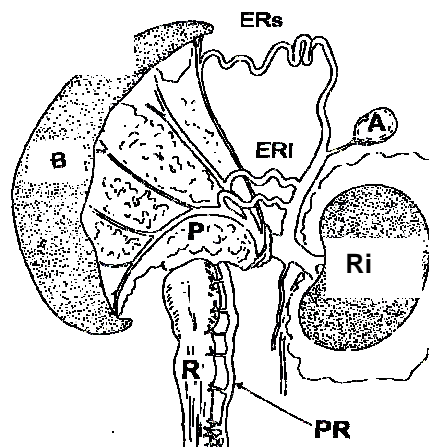


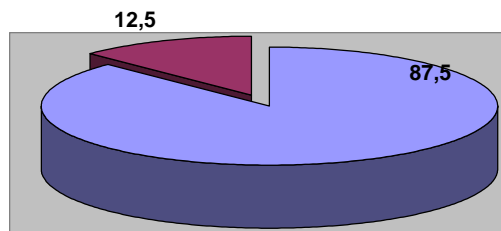
Figura 28: Representación de la circulación colateral porto-sistémica tras colestasis microquirúrgica en la rata. Ri: Riñón; A: Glándula adrenal; B: Bazo; P: Páncreas; ERs: Circulación espleno renal superior; ERI: Circulación espleno renal inferior; R: Recto; PR: Circulación para rectal;

Las ratas del grupo C-2s, de dos semanas de evolución colestásica, son las que presentan menor circulación colateral. A las 5 semanas de la intervención, se produce un menor desarrollo de circulación colateral porto-sistémica en todas las áreas anatómicas exploradas (paraesofágica, esplenorrenal y pararectal) en

el grupo CCM5-s respecto al grupo CS-5s, siendo significativa ($p < 0.05$) esta diferencia en el caso de la circulación esplenorrenal. Sin embargo, no hay diferencias en cuanto al desarrollo de circulación colateral venosa en los grupos CS-8s y CCM-8s, estando presente en ambos grupos en todas las áreas anatómicas descritas (tabla 16, ANEXO I, figuras 29, 30, 31 y 32).

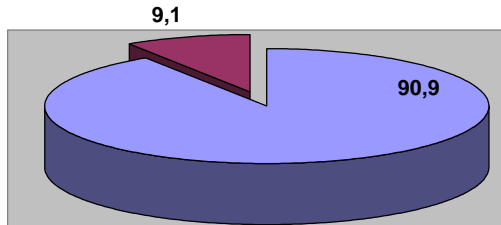
CPE (%) en el GRUPO C-2s

■ PRESENTE ■ AUSENTE



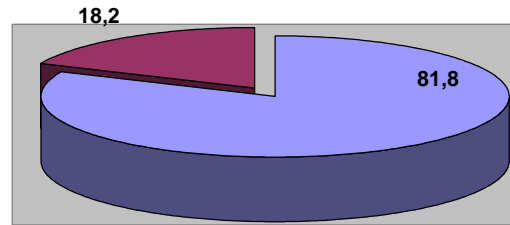
CPE (%) EN SERIE V (CS-5s y CCM-5s)

■ PRESENTE ■ AUSENTE



CS-5s

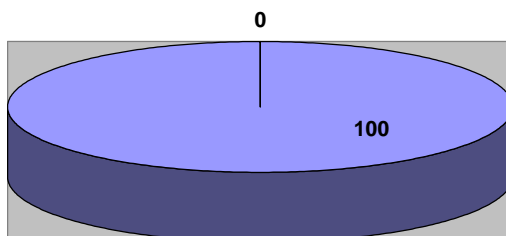
■ PRESENTE ■ AUSENTE



CCM-5s

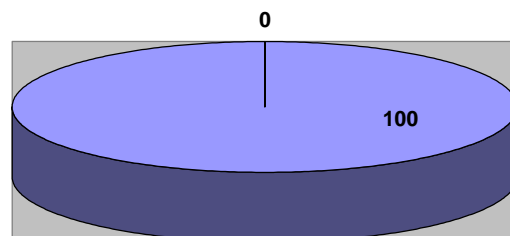
CPE (%) EN SERIE VI (CS-8s y CCM-8s)

■ PRESENTE ■ AUSENTE



CS-8s

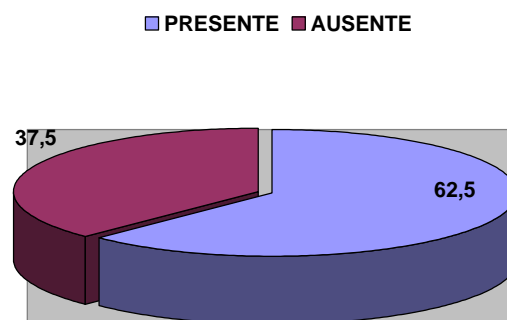
■ PRESENTE ■ AUSENTE



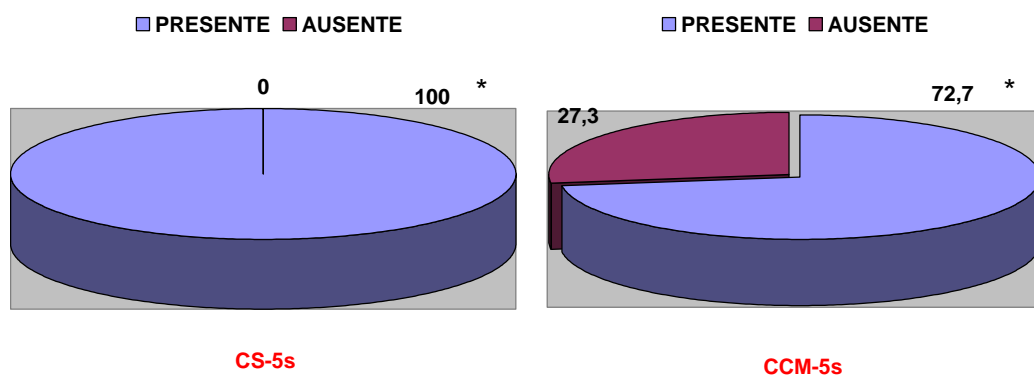
CCM-8s

Figura 29: Circulación colateral para esofágica (CPE) en grupos de ratas con colestasis microquirúrgica extrahepática las series IV, V y VI .Hay una disminución no significativa de la CPE en el grupo CCM-5s (81.8%) respecto a CS-5s (90.9%), siendo similares las cifras de CPE en CCM-5s (90.9%) y en CS-2s (87.5%). Tanto CS-8s como CCM-8s presentan CPE en el 100% de los casos. **C-2s: Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.**

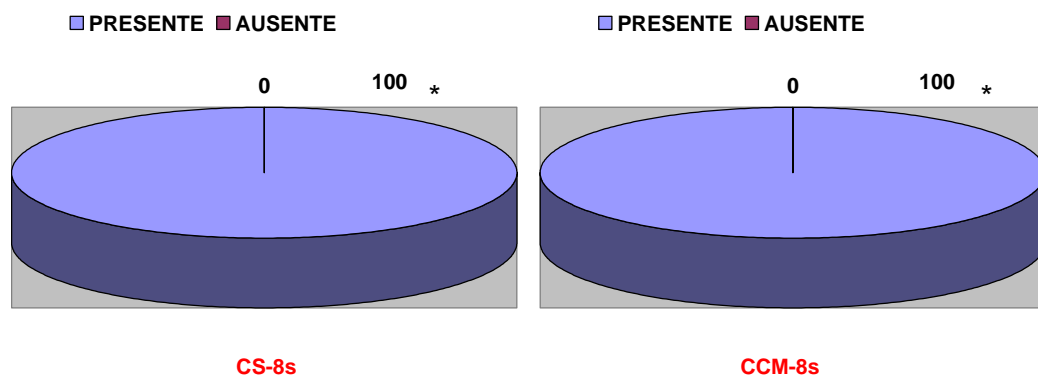
CIRCULACIÓN COLATERAL ESPLÉNORRENAL (%) EN EL GRUPO C-2S



CER (%) EN SERIE V (CS-5s y CCM-5s)

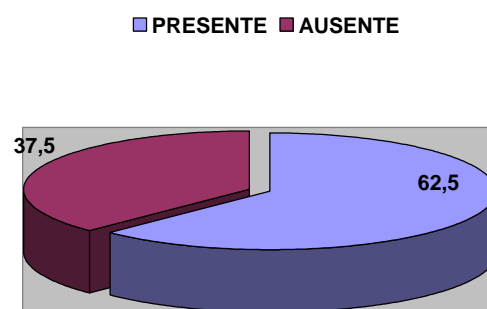


* $p < 0,05$: Valor estadísticamente significativo respecto de CS-2s

CER (%) EN SERIE VI (CS-8s y CCM-8s)

* $p < 0,05$: Valor estadísticamente significativo respecto de CS-2s

Figura 30: Circulación colateral espleno renal (CER) en grupos de ratas con colestasis microquirúrgica extrahepática de las series IV, V y VI.). Hay un aumento significativo ($p < 0,05$) de la CER en todos los grupos respecto a CS-2s. En CCM-5s se aprecia un descenso no significativo de CER respecto a CS5s (72.7% frente a 100%, respectivamente). La CER está presente en el 100% de los casos de CS-8s y CCM-8s.
C-2s: Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o.
CCM-5s: Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o.
CCM-8s: Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.

CPR (%) EN EL GRUPO C-2S

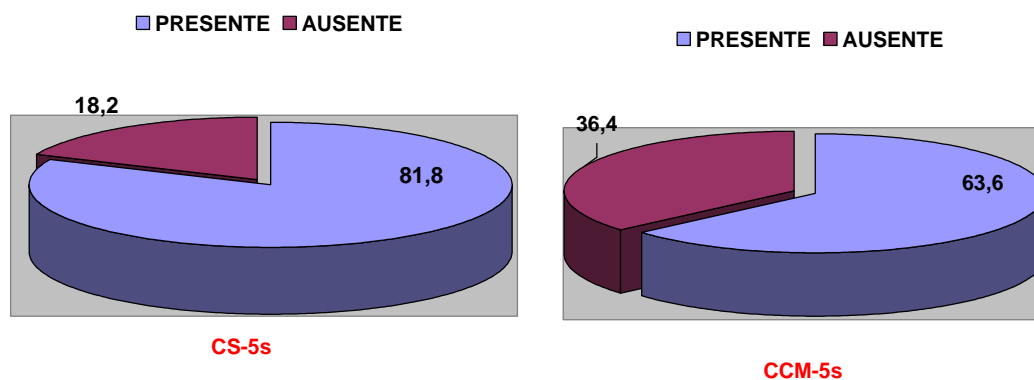
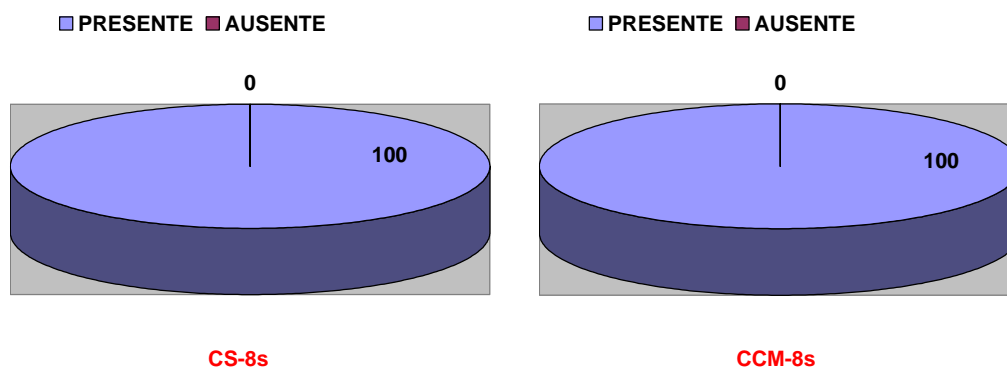
CPR (%) EN SERIE V (CS-5s y CCM-5s)**CPR (%) EN SERIE VI (CS-8s y CCM-8s)**

Figura 31: Circulación pararectal (CPR) en grupos de ratas con colestasis microquirúrgica extrahepática de las series IV, V y VI. Hay un descenso no significativo de CPR en CCM-5s (63.6%) respecto a CS-5s (81.8%). La cifras de CPR son similares en CS-2s (62.5%) y CCM-5s (63.6%). La CPR está presente en el 100% de los casos de CS-8s y CCM-8s. **C-2s: Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.**

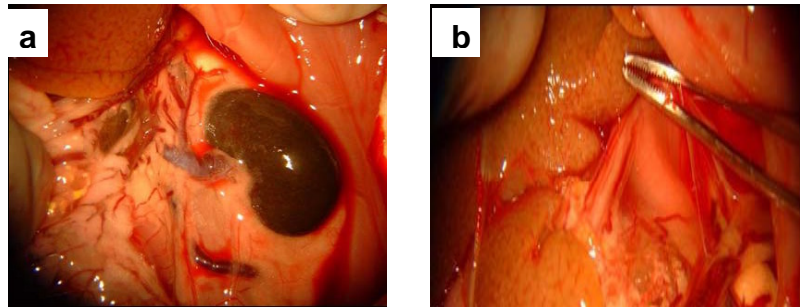


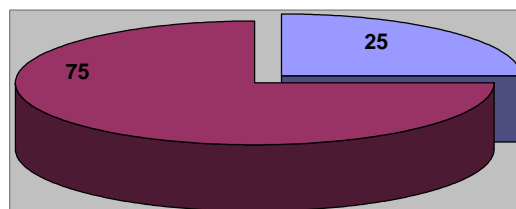
Figura 32: Imagen fotográfica en la que se observa la existencia de circulación colateral venosa esplenorrenal (a) y paraesofágica (b) en una rata con colestasis microquirúrgica extrahepática a la que se le administró solución salina intrahepática a las 8 semanas de evolución post-operatoria.

2.E VASCULOPATIA VENOSA MESENTERICA

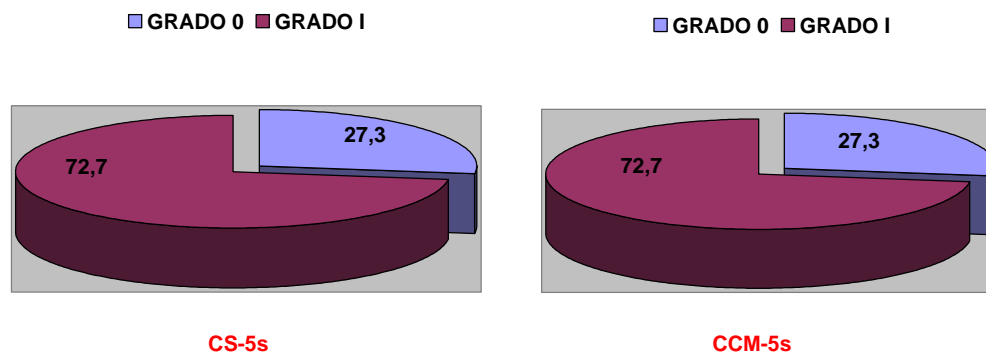
En ninguno de los grupos de animales estudiados se aprecia vasculopatía venosa mesentérica (VVM) de tipo II. Los grupos C-2s (colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o.), CS-5s (colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o.) y CCM-5s (colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o.) presentan incidencias muy similares de ausencia de VVM (grado=0) y de vasculopatía de grado I. Los grupos Cs-8s (colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o.) y CCM-8s (colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 8 semanas de p.o.) presentan vasculopatía grado I en todos los casos (tabla 17, ANEXO I, figuras 33 y 34).

VVM EN GRUPO C-2s (serie IV)

■ GRADO 0 ■ GRADO I



VVM (%) EN SERIE V (CS-5s y CCM-5s)



VVM (%) EN SERIE VI (CS-8s y CCM-8s)

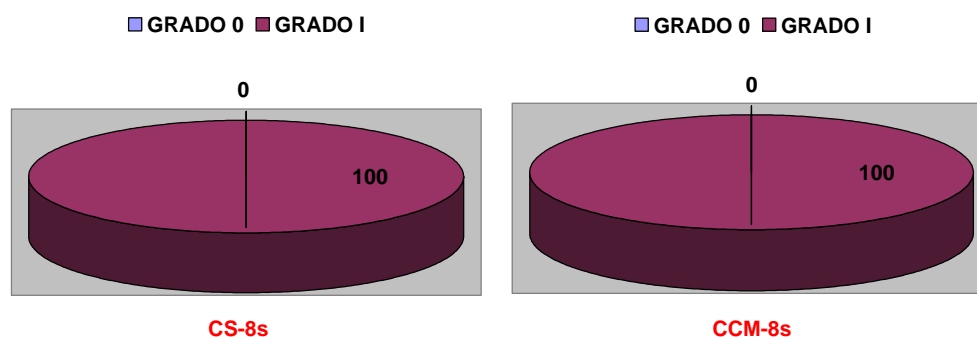


Figura 33: Vasculopatía venosa mesentérica de grado 0 (ausente), grado I (secundaria al clampaje de la vena mesentérica superior) y grado II (espontánea) en grupos de ratas con colestasis microquirúrgica de las series IV, V y VI. Se aprecian cifras similares de VVM grado I en los grupos CS-2s (75%), CS-5s (72.7%) y CCM-5s (72.7%). La VVM tipo I está presente en todos los casos de los grupos CS-8s y CCM-8s. **C-2s:** Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 8 semanas de p.o.

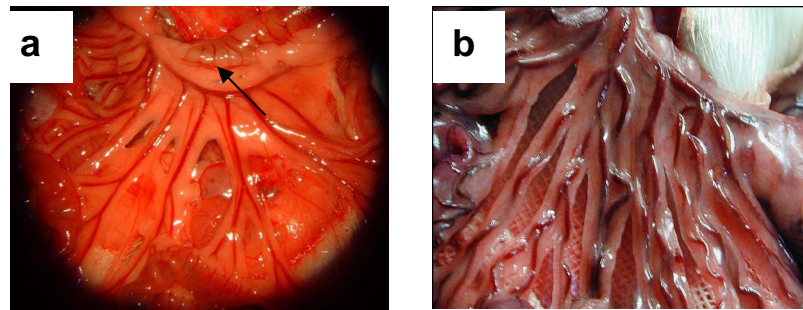


Figura 34: Vascularización venosa mesentérica: (a) Rata del grupo C-2s (colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o.) en la que se observan la vena mesentérica superior (flecha) y sus ramas. (b) Rata del grupo CS-8s (colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o.) en la que se aprecia vasculopatía de grado I, con dilatación y tortuosidad tras el clampaje transitoria (2 minutos) la vena mesentérica superior.

2.F EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL

Los resultados correspondientes al peso corporal inicial (PCI) y final (PCF) de los animales, tanto al inicio como al final del estudio, así como el incremento de PC, se representan en la Tabla 18, ANEXO I. El PCI es significativamente mayor en el grupo C-2s (colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o) respecto del resto de los grupos ($p < 0,001$). En cuanto al PCF, los grupos CS-5s (Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o) y Cs-8s (colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o.) presentan un peso significativamente menor ($p < 0,05$) que el grupo C-2s. En el grupo CCM-5s (colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 5 semanas de p.o.) el peso corporal al sacrificio también es significativamente menor ($p < 0,01$) que en el grupo C-2s. Además, se produce un aumento significativo ($p < 0,05$) del PCF en el grupo CCM-8s (colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 8 semanas de p.o) respecto al grupo CCM-5s. En lo que al incremento del peso corporal (ΔPC) se refiere, se produce un aumento significativo del mismo en los grupos CS-8s ($p < 0,01$) y CCM-8s ($p < 0,05$) respecto al grupo C-2s. Además, el ΔPC es significativamente mayor en los grupos CS-8s ($p < 0,01$) y CCM-8s ($p < 0,05$) que en el grupo CCM-5s (figura 35).

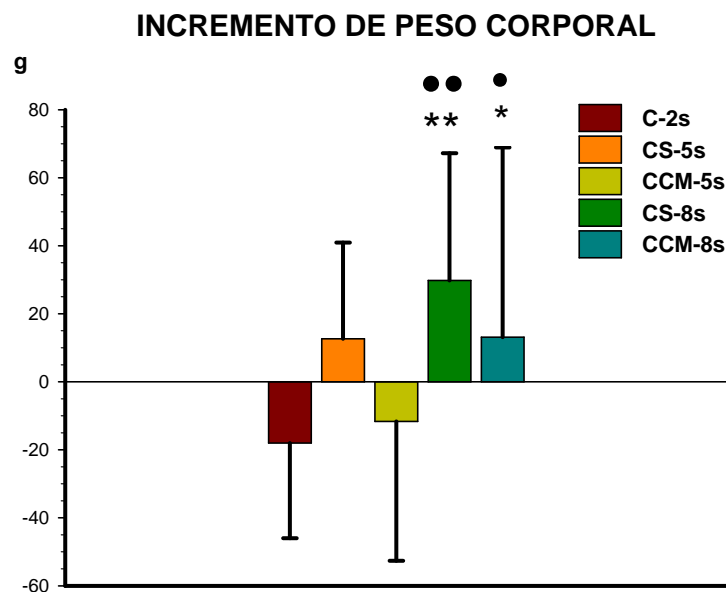


Figura 35 Incremento de peso corporal (Δ peso; g) en grupos de ratas con colestasis microquirúrgica. Hay un aumento significativo del peso corporal de CS-8s ($p < 0.01$) y CCM-8s ($p < 0.05$) respecto a CS-2s. También se produce un aumento significativo del peso corporal de CS-8s ($p < 0.01$) y CCM-8s ($p < 0.05$) respecto a CCM-5s. **C-2s:** Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 8 semanas de p.o.

Media \pm DE; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Valor estadísticamente significativo respecto de CS-2s; ● $p < 0,05$; ●● $p < 0,01$: Resultado estadísticamente significativo respecto de CCM-5s

2.G PESO HEPÁTICO (PH)

En relación al PH, éste es significativamente superior en el grupo CS-8s respecto a los grupos CS-5s y CCM-5s ($p < 0,001$), C-2s y CCM-8s ($p < 0,01$). Además, el PH es significativamente superior ($p < 0,05$) en los grupos CCM-8s y C-2s respecto al grupo CCM-5s (figura 35, tabla 19, ANEXO I). La relación PH/PC es significativamente superior ($p < 0,001$) en el grupo CS-8s respecto al resto de los grupos C-2s, CCM-5s, CS-5s y CCM-8s (Figura 36).

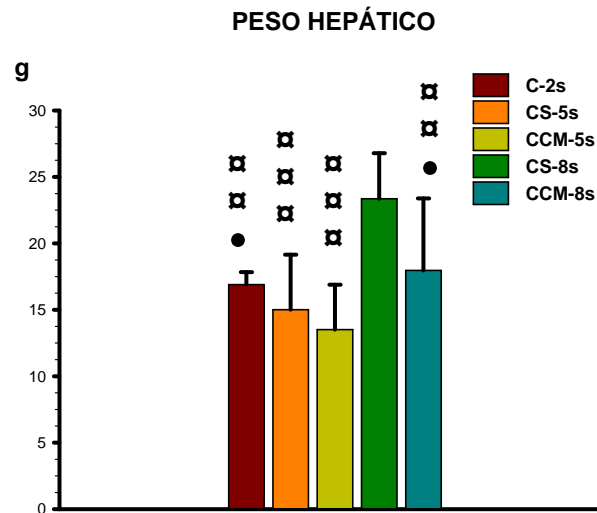


Figura 35: Peso hepático (PH;g) en ratas con colestasis microquirúrgica. Hay un descenso significativo del PH en CS-2s ($p < 0.01$), CS-5s ($p < 0.001$) y CCM-5s ($p < 0.001$) y CCM-8s ($p < 0.01$) respecto a CS-8s. Además hay un aumento significativo del PH en CS-2s ($p < 0.05$) y CCM-8s ($p < 0.05$) respecto a CCM-5s. **C-2s:** Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o. Media \pm DE; □ $p < 0,05$; □□ $p < 0,01$; □□□ $p < 0,001$: Valor estadísticamente significativo respecto de CS-8s; ● $p < 0,05$: Resultado estadísticamente significativo respecto de CCM-5s.

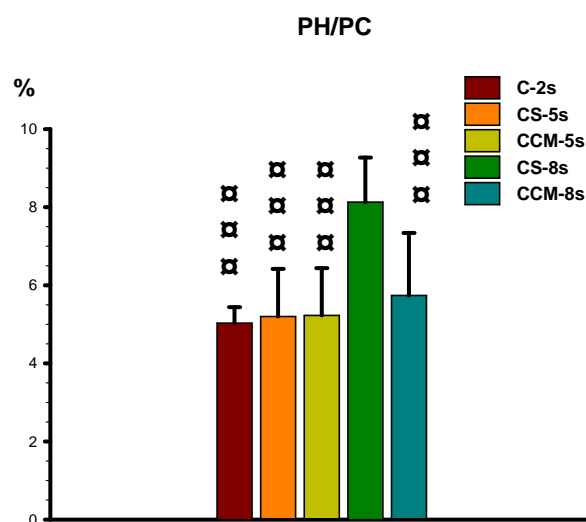


Figura 36: Relación peso hepático / peso corporal $\times 100$ (PH/PC; %) en ratas con colestasis microquirúrgica extrahepática. Hay un descenso significativo del PH en CS-2s ($p < 0.001$), CS-5s ($p < 0.001$), CCM-5s ($p < 0.001$) y CCM-8s ($p < 0.001$) respecto a CS-8s. **C-2s: Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o. Media \pm DE; \square $p < 0,05$; $\square\square$ $p < 0,01$; $\square\square\square$ $p < 0,001$: Valor estadísticamente significativo respecto de CS-8s.**

Es de interés destacar que la evolución de la hepatomegalia, tanto en valor absoluto, como cuando se estudia la relación peso hepático/peso corporal, desde la 5ª hasta la 8ª semanas del p.o. es inferior en las ratas con colestasis a las que se les administran por vía intrahepática células madre respecto de aquellas que sólo recibieron suero salino (Figuras 37 y 38). En la figura 39 se puede apreciar el aspecto macroscópico del hígado en una rata con colestasis microquirúrgica y administración intrahepática de células madre mesenquimales y otra del grupo con suero tras realizar el sacrificio a las 8 semanas de po.

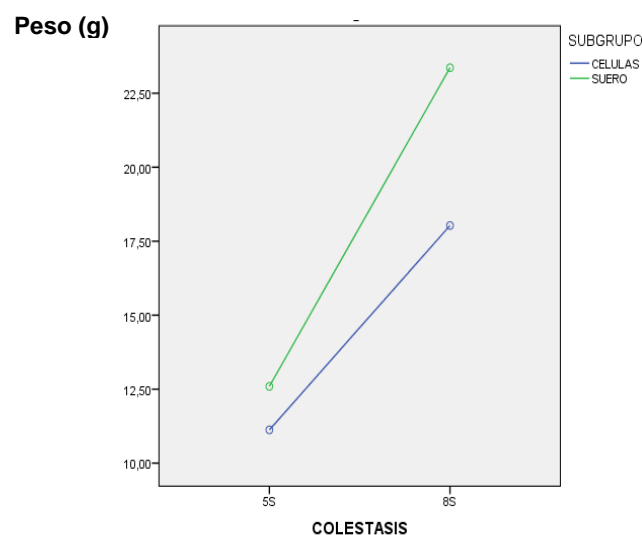


Figura 37: Peso hepático (PH;g), en ratas con colestasis microquirúrgica y administración de células madre prediferenciadas a hepatocito o suero salino, y sacrificio a las 5 y 8 semanas de p.o.: Se aprecia un mayor incremento del peso hepático en los grupos control (CS-5s y CCM-8s) que en los grupos con administración de células (CCM-5s y CCM-8s).

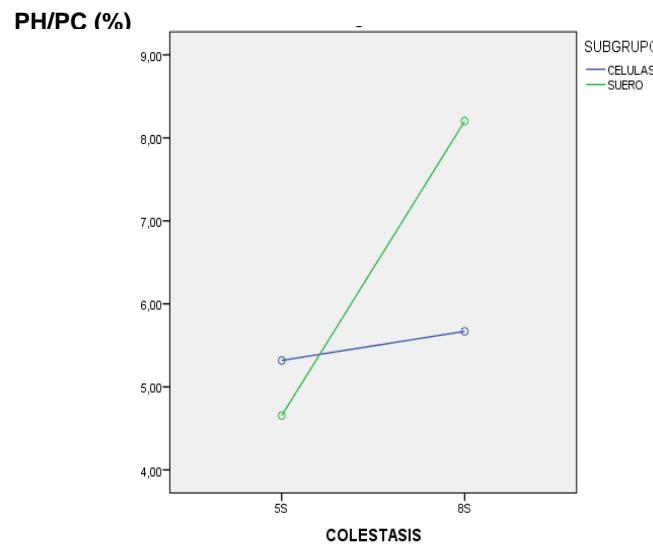


Figura 38: Relación peso hepático / peso corporal x 100 (PH/PC; %) en ratas con colestasis microquirúrgica y administración de células madre preferenciadas a hepatocito o suero salino, y sacrificio a las 5 y 8 semanas de p.o.. El incremento del PH/PC es más acentuado en los grupos control (CS-5s y CCM-8s) que en los grupos con administración de células (CCM-5s y CCM-8s).

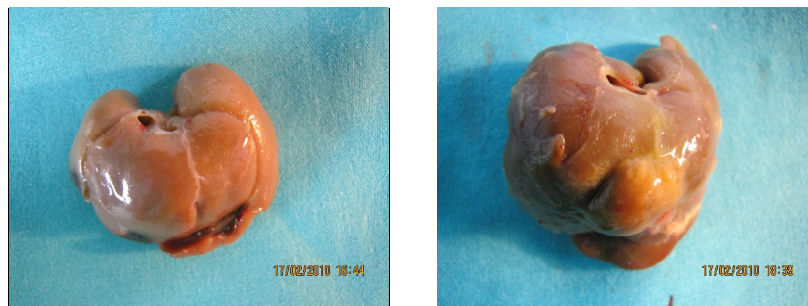


Figura 39. Fotografía comparativa del aspecto macroscópico del hígado en una rata con colestasis microquirúrgica y administración intrahepática de células madre mesenquimales (izquierda) y otra del grupo con suero a 8 semanas (derecha). Se aprecia hepatomegalia, ictericia y aumento de la consistencia en el hígado en mayor grado en la rata con colestasis y administración intrahepática de solución salina respecto del hígado correspondiente a una rata colestásica a la que se administraron células madre mesenquimales de origen adipocítico preferenciadas a hepatocitos..

Respecto de la evolución de los pesos lobulares hepáticos, se produce una disminución significativa ($p < 0,05$) del peso del lóbulo medio hepático (LM) en el grupo CCM-5s respecto a los grupos C-2s y CS-8s. También se puede comprobar un aumento significativo ($p < 0,001$) del peso del lóbulo lateral derecho (LLD) en el grupo CS-8s respecto al resto de grupos. El peso del LLI es significativamente mayor en el grupo CS-8s respecto a los grupos CCM-5s, CS-5s ($p < 0,001$), C-2s ($p < 0,01$) y CCM-8s ($p < 0,05$). Además, el peso del LLI también es significativamente superior ($p < 0,05$) en el grupo CCM-8s respecto a

los grupos CCM-5s y CS-5s. Por último, el peso del lóbulo caudado (LC) es significativamente superior en el grupo CS-8s respecto a los grupos C-2s ($p<0,01$), CS-5s, CCM-5s y CCM-8s ($p<0,05$), (Tabla 20)

Tabla 20: Peso de los lóbulos medio (PLM), lateral derecho (PLLD), lateral izquierdo (PLLI) y caudado (PLC) en ratas con colestasis microquirúrgica extrahepática: C-2s: Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. CS-5s: Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. CCM-5s: Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o. CS-8s: Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. CCM-8s: Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.

GRUPO	PLM (g)	PLLD (g)	PLLI	PLC
C-2s (n=8)	6,49● +/- 0,56	3,76□□□□ +/- 0,75	5,15□□ +/- 0,95	1,47□□ +/- 0,44
CS-5s (n=11)	5,16 +/- 1,57	3,69□□□□ +/- 1,24	4,23□□□□* +/- 1,60	1,53□ +/- 0,78
CCM-5S (n=11)	4,65 +/- 1,75	3,39□□□□ +/- 0,91	4,20□□□□* +/- 1,20	1,52□ +/- 0,44
CS-8s (n=7)	6,46● +/- 1,05	7,20 +/- 1,90	7,36 +/- 1,11	2,32 +/- 0,33
CCM-8s (n=11)	5,89 +/- 1,63	4,64□□□□ +/- 1,86	5,80□ +/- 1,65	1,61□ +/- 0,72

Media \pm DE; □ $p<0,05$; □□ $p<0,01$; □□□ $p<0,001$: Valor estadísticamente significativo respecto de CS-8s; ● $p<0,05$: Resultado estadísticamente significativo respecto de CCM-5s. * $p<0,05$: Resultado estadísticamente significativo respecto de CCM-8s

2.H. PESO ESPLÉNICO

Si bien todas presentan esplenomegalia, solo el grupo CS-8s presenta un incremento significativo del peso esplénico (PE) respecto al grupo C-2s ($p<0,05$). La relación PE/PC es significativamente menor en el grupo C-2s respecto a los grupos CS-8s ($p<0,001$), CS-5s ($p<0,01$), CCM-5s y CCM-8s ($p<0,05$) (tabla 21, ANEXO I, figuras 40 y 41).

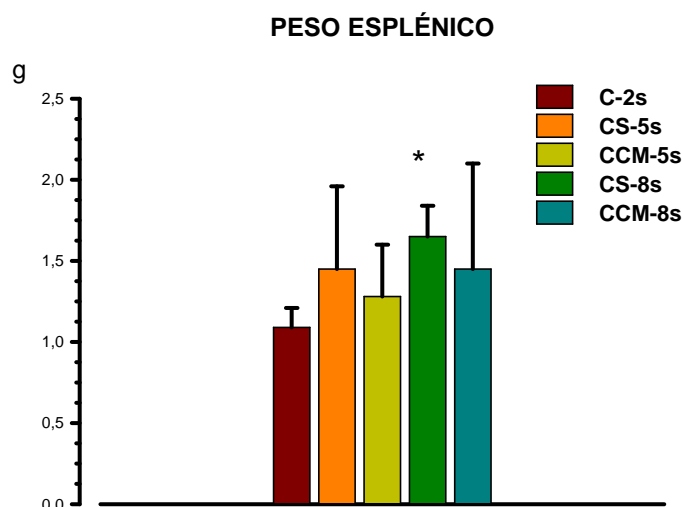


Figura 40: Peso esplénico (PE;g) en ratas con colestasis microquirúrgica: **C-2s:** Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. Hay un aumento significativo del PE en CS-8s respecto a Cs-2s ($p < 0.05$). **C-2s:** Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.

Media \pm DE; * $p < 0,05$: Valor estadísticamente significativo respecto de CS-2s.

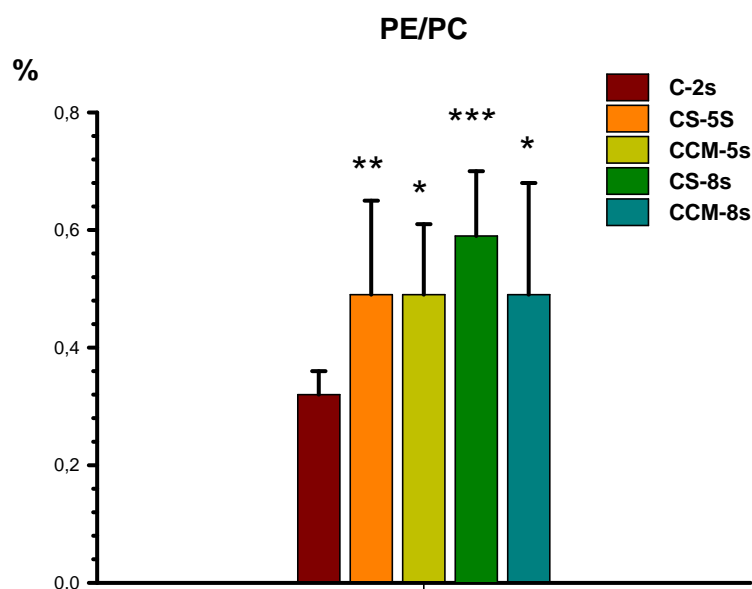


Figura 41: Relación peso esplénico / peso corporal $\times 100$ (PE/PC; %) en ratas con colestasis microquirúrgica. Se aprecia un aumento significativo del PE/PC en Cs-5s ($p < 0,01$), CCM-5s y CCM-8s ($p < 0,05$) y CS-8s ($p < 0,001$) respecto a CS-2s. **C-2s:** Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre

prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CS-8s**: Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **CCM-8s**: Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.

Media \pm DE; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$: Valor estadísticamente significativo respecto de CS-2s

Al igual que ocurría con la hepatomegalia, el incremento del peso esplénico es inferior desde la quinta hasta la octava semanas de evolución p.o. en las ratas colestásicas que recibieron células madre respecto de aquellas a las que se inyectó sólo suero salino intrahepático (Figura 42). Además, mientras en este periodo de evolución po se produce un aumento de la relación PE/PC en el grupo tratado con suero, en el grupo tratado con células hay un descenso de la relación PE/PC (figura 43). En la figura 44 se puede apreciar el aspecto macroscópico del bazo de una rata con colestasis microquirúrgica y administración intrahepática de células madre mesenquimales y otra del grupo con suero tras realizar el sacrificio a las 8 semanas de po.

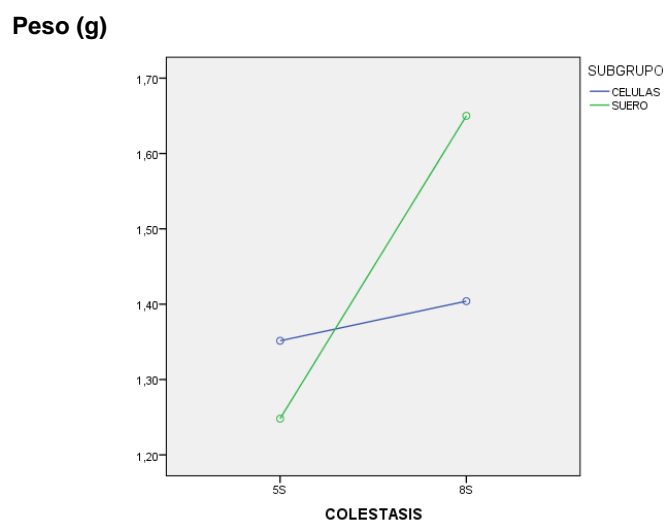


Figura 42: Peso esplénico (PE;g), en ratas con colestasis microquirúrgica y administración de células madre prediferenciadas a hepatocito o suero salino, y sacrificio a las 5 y 8 semanas de p.o. El incremento del PE es mayor en grupos control (CS-5s y CS-8s) que en los grupos con células (CCM-5s y CCM-8s).

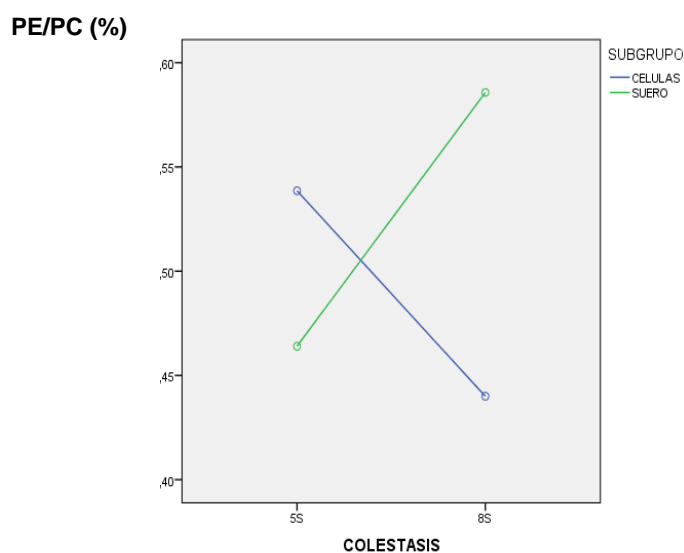


Figura 43: Relación peso esplénico / peso corporal x 100 (PE/PC; %) en ratas con colestasis microquirúrgica y administración de células madre prediferenciadas a hepatocito o suero salino, y sacrificio a las 5 y 8 semanas de p.o. Mientras que en los grupos con células (CCM-5s y CCM-8s) se produce un descenso progresivo del PE/PC, en los grupos control (CS-5s y CS-8s), la tendencia del cociente PE/PC es inversa, presentando un aumento progresivo.

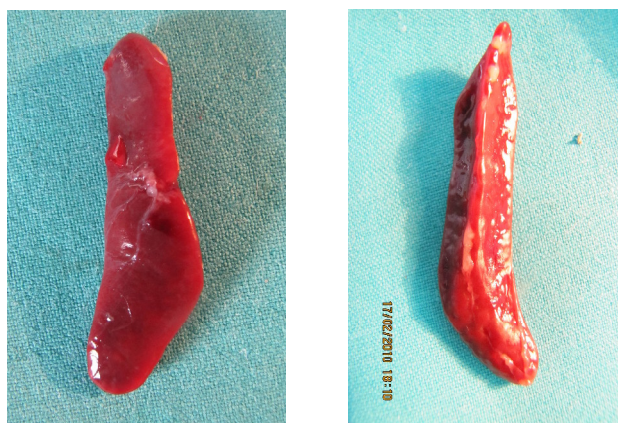


Figura 44: Fotografía comparativa del tamaño de un bazo de una rata del grupo CCM-8s (Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.) y otra del grupo CS-8s (Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o.).

2.I. PESO TESTICULAR

El peso testicular es significativamente mayor en el grupo C-2s respecto a los grupos CS-8s ($p < 0,001$), CCM-5s ($p < 0,01$) y CS-5s ($p < 0,05$). Sin embargo, no se aprecian diferencias significativas en relación al peso testicular entre los grupos C-2s y CCM-8s (Tabla 22, ANEXO I; Figura 45).

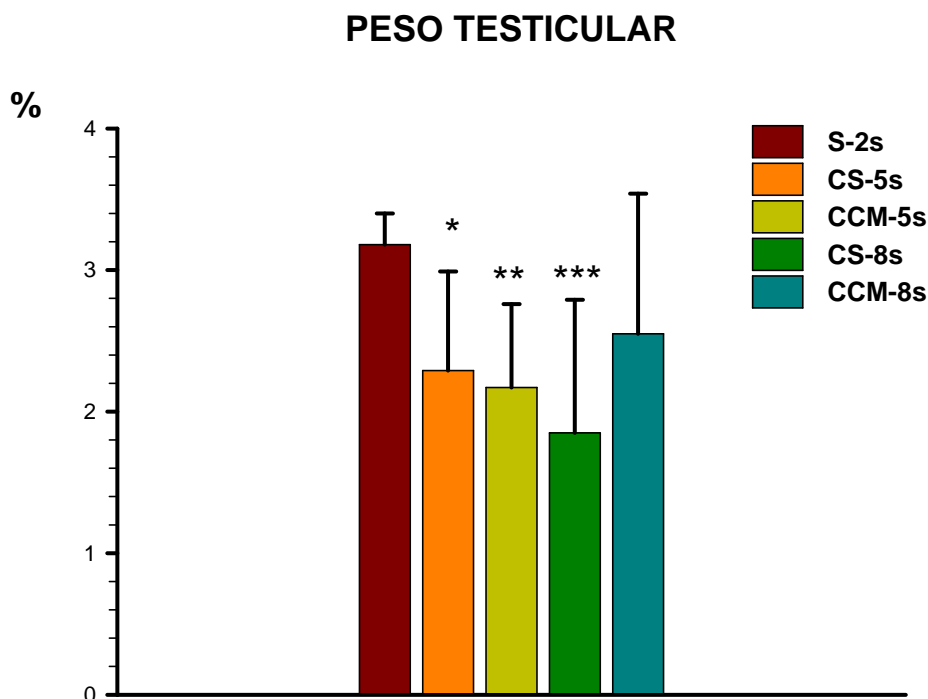


Figura 45: Peso testicular bilateral (PT;g) en ratas con colestasis microquirúrgica.. Hay un descenso significativo del PT en los grupos CS-5s ($p < 0,05$), CCM-5s ($p < 0,01$) y CS-8s ($p < 0,001$) respecto a CS-2s. **C-2s:** Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o. Media \pm DE; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$: Valor estadísticamente significativo respecto de CS-2s.

La relación PT/PC es significativamente menor en el grupo CS-8s respecto a los grupos C-2s ($p < 0,01$) y CS-5s ($p < 0,05$) (tabla 22, ANEXO I, figura 46).

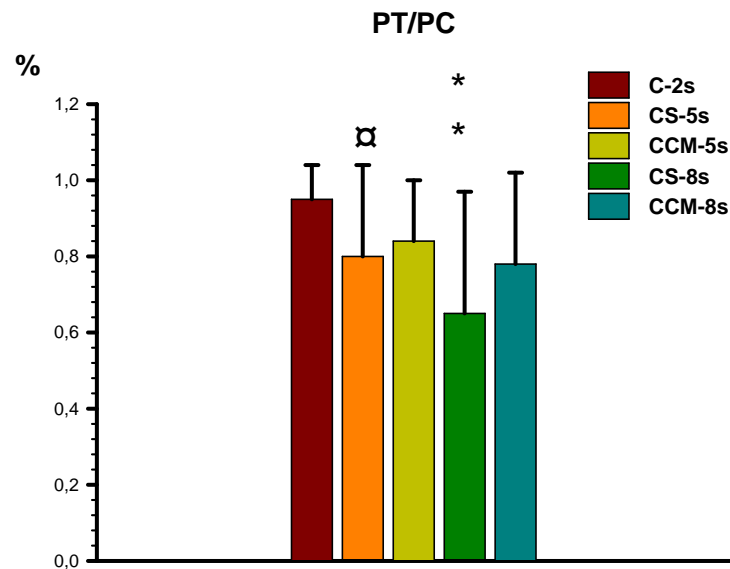


Figura 46: Relación peso testicular / peso corporal x 100 (PT/PC; %) en ratas con colestasis microquirúrgica. Hay un descenso significativo del PT/PC en CS-8s ($p < 0,01$) respecto a CS-2s. Además, hay un aumento significativo del PT/PC en CS-5s ($p < 0,05$) respecto a CS-8s. **C-2s:** Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o. Media \pm DE; ** $p < 0,01$: Valor estadísticamente significativo respecto de CS-2s; * $p < 0,05$: Resultado estadísticamente significativo respecto de CS-8s.

Como se observa en la Figura 47, la atrofia testicular que sufren las ratas con colestasis a las que se les inyectaron células madre en el hígado desciende desde la 5ª hasta la 8ª semanas de evolución, en tanto que las ratas colestásicas que sólo recibieron suero salino muestran una atrofia testicular progresiva. En la figura 48 se puede apreciar el aspecto macroscópico de los testículos de una rata con colestasis microquirúrgica y administración intrahepática de células madre mesenquimales y otra del grupo con suero tras realizar el sacrificio a las 8 semanas de po.

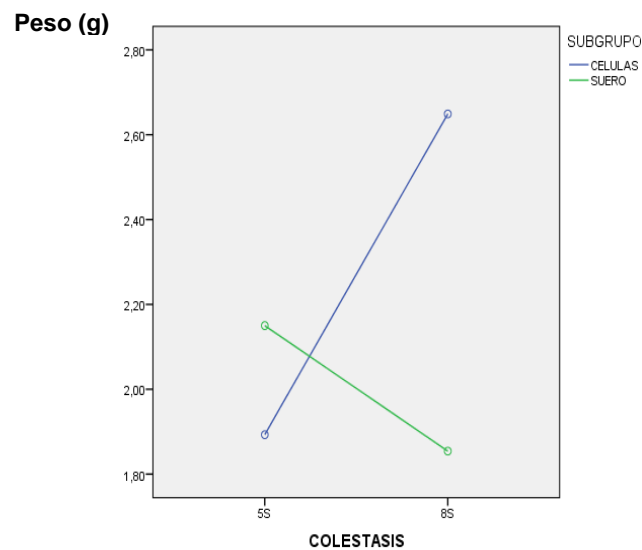


Figura 47: Peso testicular bilateral (PT;g) en ratas con colestasis microquirúrgica y administración de células madre prediferenciadas a hepatocito o suero salino, y sacrificio a las 5 y 8 semanas de p.o. La atrofia testicular se produce solo en el grupo tratado con suero salino.

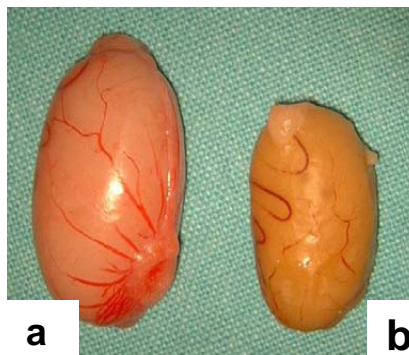


Figura 48: Imagen comparativa del tamaño testicular en una rata del grupo de CCM-8s (Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.) (a) y en otra rata del grupo CS-8s (Colestasis microquirúrgica extrahepática con administración intrahepática de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o.), en la cual es manifiesta la atrofia testicular (b).

2.J DETERMINACIONES SÉRICAS DE FUNCIÓN HEPÁTICA

No se aprecian diferencias significativas en relación a los parámetros bioquímicos de función hepatobiliar entre los grupos CS-5s (Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o) y CCM-5s (Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5

semanas de p.o.) de la serie V. Por el contrario, en las ratas del grupo CCM-8s (Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.) de la serie VI, hay un incremento no significativo de los niveles de albúmina y de proteínas respecto al grupo CS-8s (Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o.), además de una disminución de los parámetros de colestasis (BT, BD y GGT) (tablas 23 y 24, ANEXO I; figuras 49, 50 Y 51).

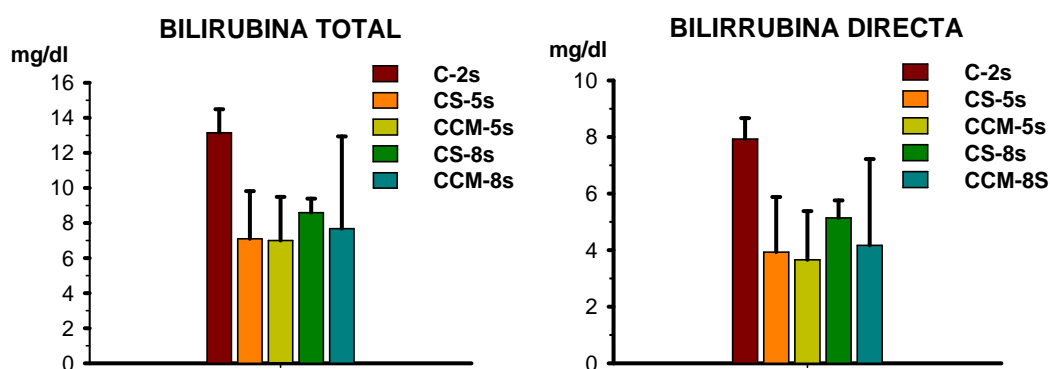
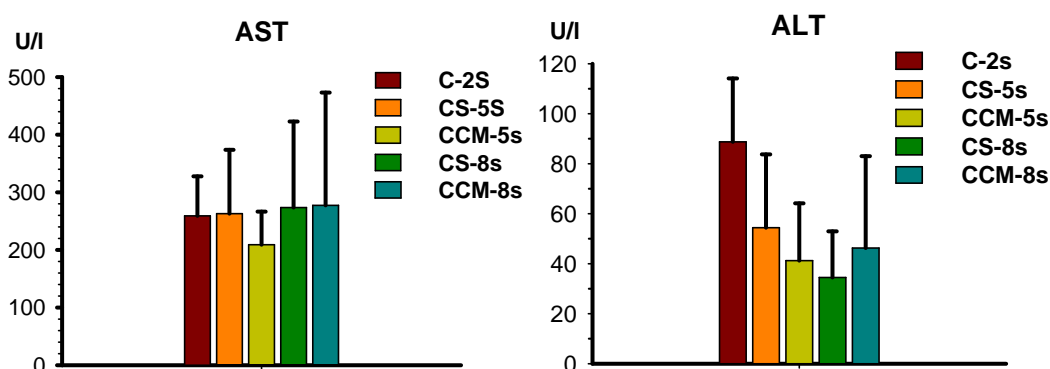


Figura 49. Concentración sérica de Bilirrubina Total (g/dl) y Bilirrubina Directa (mg/dl) en grupos de ratas con colestasis microquirúrgica **C-2s:** Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.



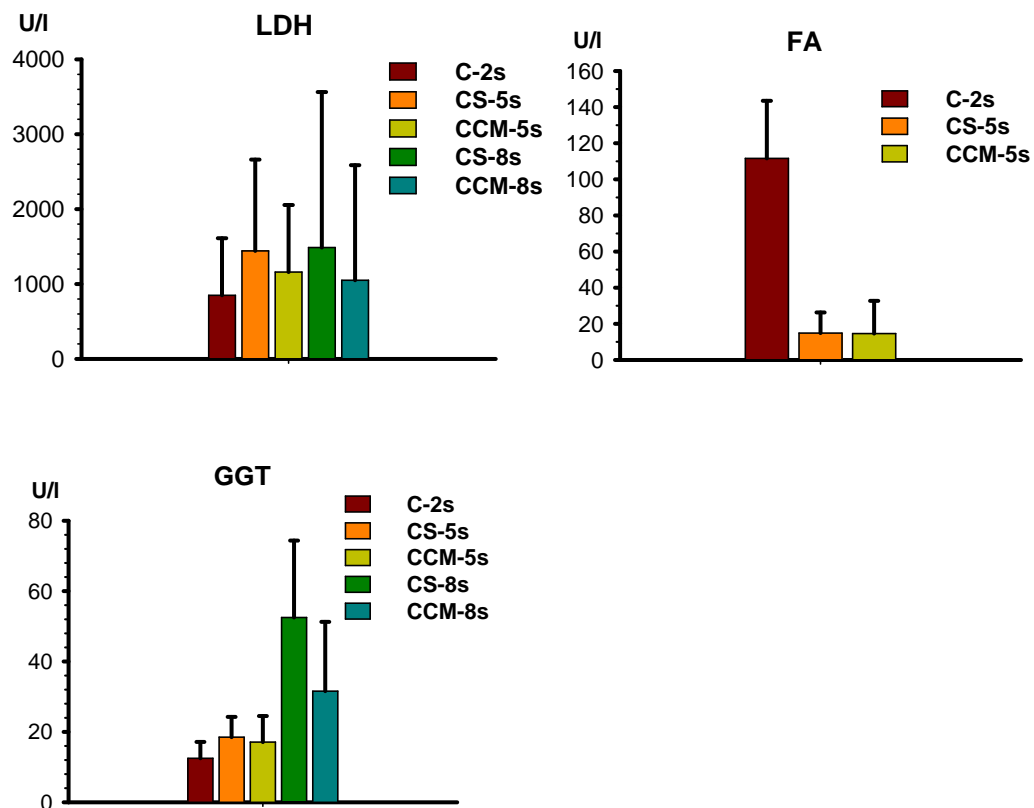
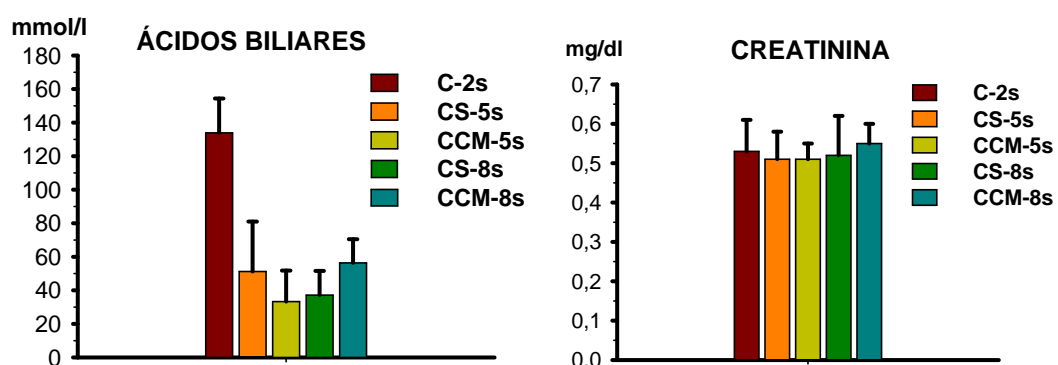


Figura 50. Concentraciones séricas de AST (U/l), ALT (U/l), LHD(U/l), FA(U/l) Y GGT(U/l) en grupos de ratas con colestasis microquirúrgica **C-2s**: Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. **CS-5s**: Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CCM-5s**: Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CS-8s**: Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **CCM-8s**: Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.



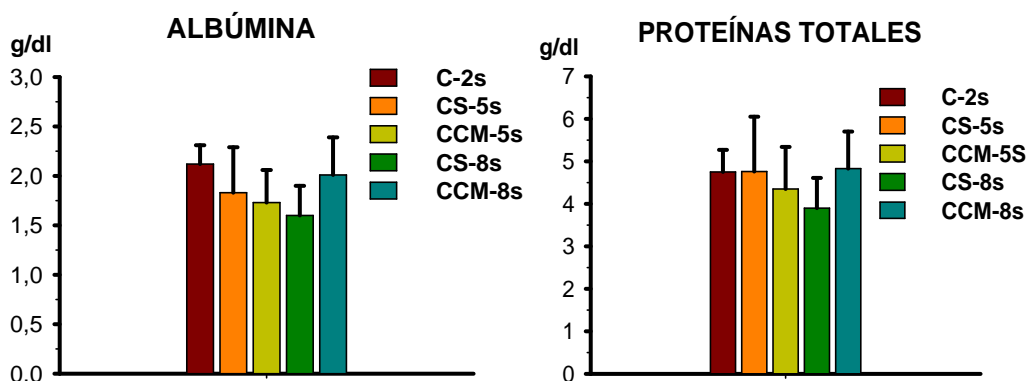


Figura 51. Concentraciones séricas de Ácidos biliares ($\mu\text{mol/l}$), Creatinina (mg/dl), Albúmina (mg/dl) y proteínas totales (mg/dl) en grupos de ratas con colestasis microquirúrgica **C-2s**: Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. **CS-5s**: Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CCM-5s**: Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CS-8s**: Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **CCM-8s**: Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.

2.K ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO HEPÁTICO

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 de 5 como en los de 8 semanas de evolución p.o. (figura 52).

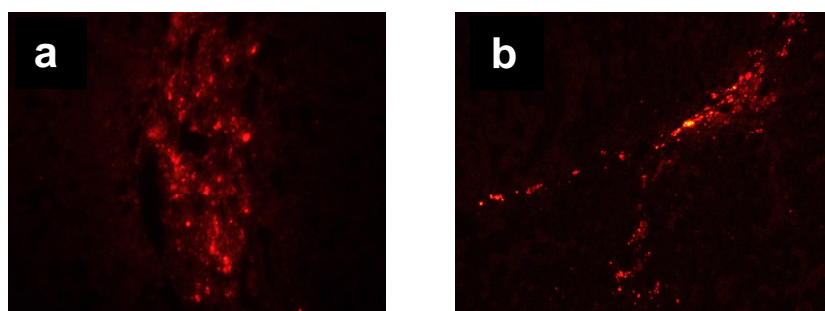


Figura 52. Imágenes obtenidas mediante el microscopio de inmunofluorescencia en las que se aprecia la presencia de células madre mesenquimales de origen adipocítico: **a)** CCM-5 (Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o.). **b)** CCM-8s (Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.).

Estudio con microscopía óptica

Una vez examinadas todas las preparaciones con tinción H&E (figura 53), y tras asignar las puntuaciones correspondientes (tablas 25 y 26) y proceder a

clasificar a cada individuo en función de la puntuación final obtenida (tabla 27, figura 54), no se aprecian claras diferencias entre los grupos de ratas colestásicas a las cinco semanas del p.o. (CS-5s y CCM-5s). Sin embargo, sí parecen encontrarse diferencias en ambos grupos entre el lóbulo medio, en el que se inyectaban células, y el lóbulo caudado, que fue el único lóbulo en el que no se inyectaron células madre, de tal forma que la progresión de los datos histológicos de colestasis crónica eran más evidentes en el lóbulo medio que en el caudado. Por el contrario, en las ratas con colestasis estudiadas a las 8-9 semanas de evolución p.o., (grupos CS-8s y CCM-8s) es evidente la progresión de los signos histopatológicos propios de fibrosis biliar, siendo más acentuados en el grupo de ratas que no fueron tratadas con células madre (CS-8s). Además, las diferencias observadas entre los lóbulos medio y caudado de los grupos estudiados en un período evolutivo previo (5 semanas), tiende a desaparecer a las 8 semanas. Sin embargo, no se aprecia significación estadística en las diferencias descritas (Figuras 53 y 55; Tablas 28, 29 y 30).

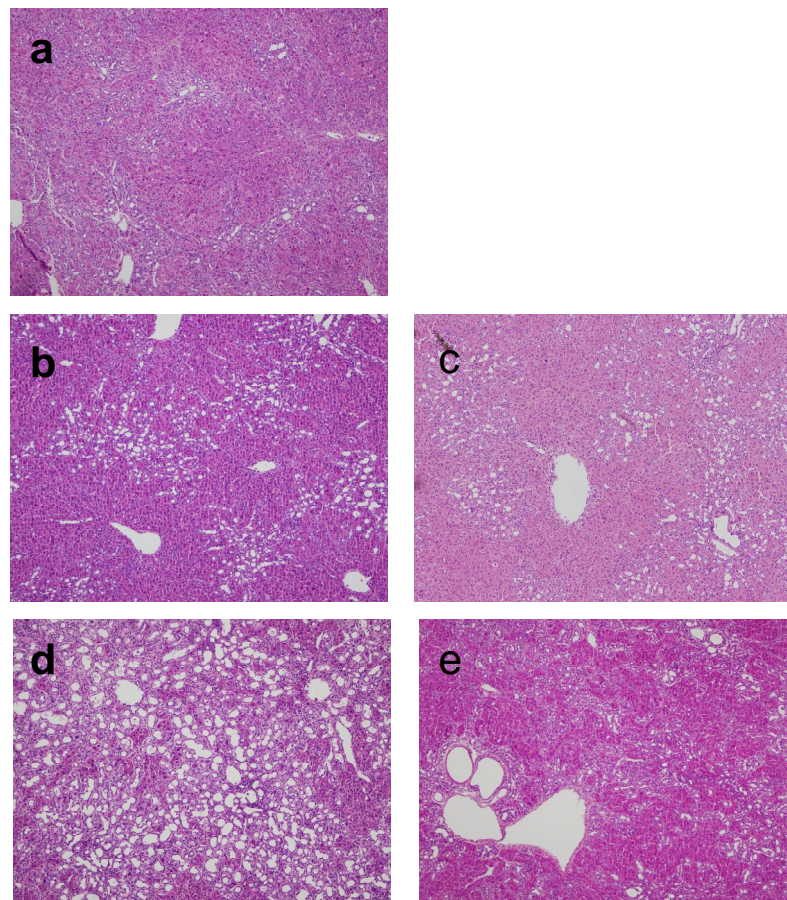


Figura 53. Imágenes obtenidas mediante el microscopio óptico correspondientes a los grupos: **a)** C-2s: Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. **b)** CS-5s: Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de suero salino y

sacrificio a las 5 semanas de p.o. **c) CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **d) CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **e) CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o. (Hematoxilina&Eosina; 10 X)

Tabla 25: Puntuaciones asignadas a las diferentes variables histológicas evaluados en los hígados de ratas del grupo CS-5s (Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o.).

RATA	CHR36		CHR38		CHR40		CHR44		CHR52	
	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
Colestasis	+	+	+	+	+	+		+	+	+
Nódulos Reg	+								+	
Prolif Ductal	++	+	+	+	+	+		++	+	+
Binucleación	++	+	++	+	++	+		+	+++	+
Infiltrado Infl.	+	+	++	+++	+++	++		++	++	+
Necrosis			+		+	+				
Trombos										
Fibrosis	++	+	++	++	++	+		+	++	+
Peliosis									+	
Dilatación vcl	+									
Estructura	M/R	B/R	R	R/B	R/M	R		R	R	R/B
Congestión					+	+				
Función	M/R	R	R	R/B	R	R		R/M	R	R/B
TOTAL	15	9	13	11	15	12		12	15	8

RATA	CHR54		CHR56		CHR58		CHR60		CHR62	
	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
Colestasis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nódulos Reg					+					
Prolif. Ductal	+	+	++	+	+	+	++	+	+	+
Binucleación	+	++	++	+	+	+	++	+	+	+
Infiltrado Infl.	++	++	++	++	++	++	+++	+	+++	+++
Necrosis			+						+	+
Trombos							++			
Fibrosis	+		+	+	++	+	+		++	++

Peliosis			+				+			
Dilatación vcl										
Estructura	b/r	b/r	R	r/b	R	r/b	R	b/r	b/r	b/r
congestión										+
Función	b/r	b	r	r/b	r	r/b	r	r	b/r	b/r
TOTAL	9	9	14	9	12	9	16	8	12	13

Mejor puntuación = 2 Peor puntuación = 39 Bueno<5 Int-buena 6-12 Int-mala 13-19 Mala>20.

Tabla 26: Puntuaciones asignadas a las diferentes variables histológicas evaluados en los hígados de ratas del grupo CCM-5s (Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o.).

RATA	CHR33		CHR35		CHR37		CHR39		CHR41	
	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
Colestasis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nódulos Reg	++		+							
Prolif. Ductal	++	++	++	+	+	+	++	++	++	++
Binucleación	+	++	++	++	+	++	++	+	++	++
Infiltrado Infl.	++	++	+++	++	++	+++	++	+	+++	++
Necrosis	+		+		+					
Trombos					+					
Fibrosis	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+
Peliosis	+			+	++					
Dilatación vcl			+							
Estructura	R	R	R	B	B	B	R/M	R/M	R	R/B
Congestión										
Función	R	R	R	R	R	R/B	R/M	R/M	R	R/B
TOTAL	15	13	17	11	12	10	13	11	13	11

RATA	CHR43		CHR51		CHR55		CHR57		CHR61	
	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
Colestasis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nódulos Reg					+		+		+	
Prolif. Ductal	+	++	++	+	+	+	++	++	++	++

Binucleación	+++	++	++	++	++	++	+	+	+	+
Infiltrado Infl.	+++	++	++	++	++	+++	++	++	+	+
Necrosis					+					
Trombos							+		+	
Fibrosis			+	+	++	+	+	++	+	+
Peliosis							+	+	+	+
Dilatación vcl							+	+	+	
Estructura	R/B	R/B	R/B	B/R	R/B	B/R	R/M	R	M	B/R
congestión										
Función	B	R/B	R/B	B/R	R	B/R	M	R	M	B/R
TOTAL	11	10	11	10	15	11	16	14	16	10

Mejor puntuación = 2 Peor puntuación = 39 Bueno < 5 Int-buena 6-12 Int-mala 13-19 Mala > 20

Tras analizar las distintas variables histológicas descritas y clasificar los distintos animales en función de las puntuaciones totales obtenidas se puede concluir (tabla 27, figura 54):

1. Prácticamente no se aprecian diferencias histológicas entre los grupos de colestasis de 5 semanas de evolución p.o. Tanto en los grupos de animales CS-5s como en los pertenecientes al CCM-5s, el resultado intermedio-malo es el predominante en el lóbulo medio, mientras que el resultado intermedio-bueno es el más frecuente en el lóbulo caudado.
2. Por tanto, las alteraciones histológicas asociadas a la colestasis son más intensas en el lóbulo medio que en el caudado a las 5 semanas de evolución p.o.

Tabla 27: Clasificación histológica correspondiente a los grupos de colestasis de 5 semanas de evolución en función de las puntuaciones asignadas a las variables histológicas estudiadas. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o.

	COLESTASIS 5 S			
	CS-5s		CCM-5s	
	LM	LC	LM	LC
RESULTADO BUENO	0	0	0	0
RESULTADO INTERMEDIO-BUENO	3 (33,3%)	8 (88,9%)	3 (30%)	8 (80%)
RESULTADO INTERMEDIO-MALO	6 (66,7%)	1 (11,1%)	7 (70%)	2 (20%)
RESULTADO MALO	0	0	0	0

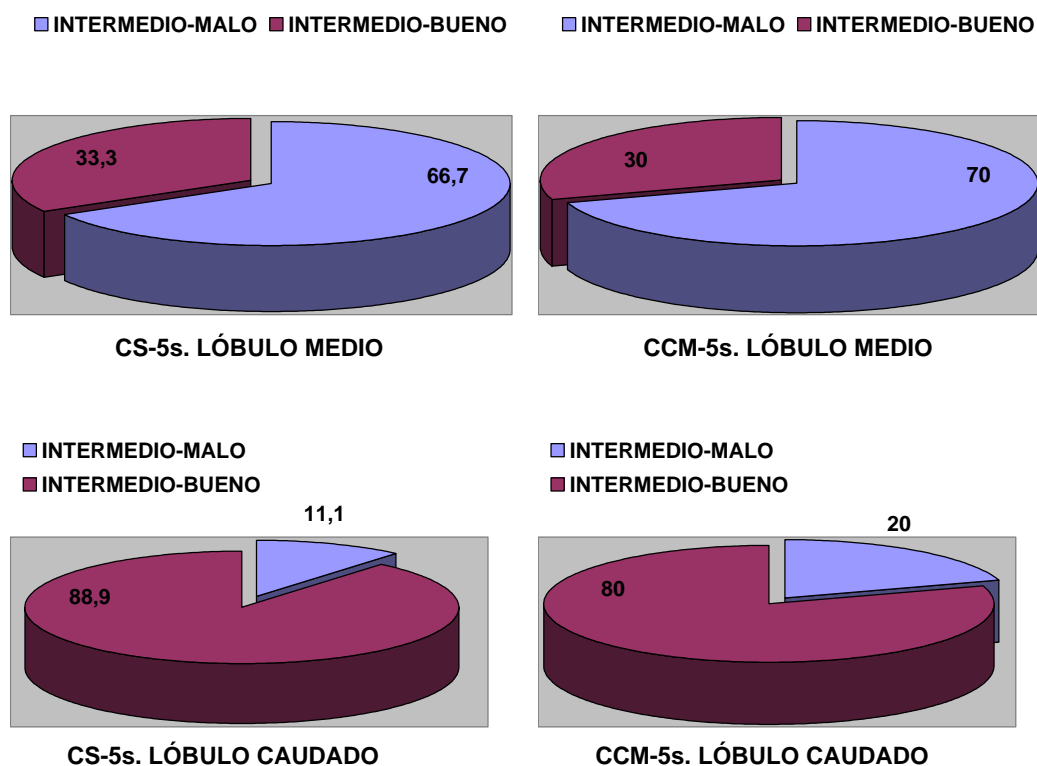


Figura 54: Comparación de los resultados histológicos globales en los lóbulos medio y caudado de los grupos de ratas con colestasis sacrificados a las 5 semanas de evolución p.o.: CS-5s (Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de suero salino) y CCM-5s (Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre prediferenciadas a hepatocito).

Tabla 28: Puntuaciones asignadas a las diferentes variables histológicas evaluados en los hígados de ratas del grupo CS-8s (Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o.).

RATA	CHR 68		CHR 69		CHR 70		CHR 72	
	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
Colestasis	+	+	+	+	+	+	+	+
Nódulos Reg	-	-	+++	+	++	+	+++	+++
Prolif. Ductal	++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++
Binucleación	+	+	+++	++	++	+++	+++	+++
Infiltrado Infl.	+	++	++	++	+	++	+	+
Necrosis						SUP		
Trombos								
Fibrosis	+	+	++	++	++	++	+++	+++
Peliosis							++	++
Dilatación vcl	++	+	+	++	++	+	+	+
Estructura	B	B	M	M	M	M	M	M
Función	R	B	R/M	R/M	R/M	R/M	M	M
Congestión			+					
TOTAL	11	10	21	18	17	18	23	23

RATA	CHR 74		CHR 76		CHR 78		CHR 88	
	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
Colestasis	+	+	+	+	+	+	+	+
Nódulos Reg	+++	+++	++	++	++	+++	++	+++
Prolif. Ductal	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++
Binucleación	++	++	++	++	++	+	++	++
Infiltrado Infl.	++	+	++	+	++	+	+	+
Necrosis								
Trombos								
Fibrosis	++	+	++	++	+++	+++	++	
Peliosis	++	++	+	+	+	+	+	+
Dilatación vcl	++	+	+	++	+	+	+	++
Estructura	M	M	M	M	M	M	R	R
Función	M	M	M	M	M	M	M	R
Congestión								
TOTAL	22	20	20	20	21	20	18	16

Mejor puntuación = 2 Peor puntuación = 39 Bueno < 5 Int-buena 6-12 Int-mala 13-19
Mala > 20

Tabla 29: Puntuaciones asignadas a las diferentes variables histológicas evaluados en los hígados de ratas del grupo CCM-8s (Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.).

RATA	CHR 65		CHR 67		CHR75		CHR79	
	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
LOBULO								
Colestasis	+	+	+	+	+	+	+	+
Nódulos Reg				+	++	+++	+++	+++
Prolif Ductular	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	++
Binucleación	+++	++	+	++	++	++	++	+
Infiltrado Infl.	++	++	+	+	+	+	+	+
Necrosis								
Trombos	+							
Fibrosis	+++	+++	+	+	++	+++	++	++
Peliosis					++	++	+	
Dilatación vcl	+				++	++	+	++
Estructura	R	M	B	B	M	M	R	M
Función	M	M	R	R	M	M	M	R
Congestión								
TOTAL	20	17	8	10	21	23	19	17

RATA	CHR83		CHR92		CHR100		CHR105	
	LM	LC	LM	LC	LM	LC	LM	LC
LOBULO								
Colestasis	+	+	+	+	+	+	+	+
Nódulos Reg	++	++	-	++	-	-	+	-
Prolif Ductular	++	++	++	++	++	++	++	+
Binucleación	++	++	+	++	+	+	+	+
Infiltrado Infl.	+	+	+	+	+	+	+	+
Necrosis								
Trombos								
Fibrosis	+++	++	+	++	+	+	++	+
Peliosis	+	+	+	+	+		+	+
Dilatación vcl	+	+	++	+	+	+	+	+

Estructura	R	R	R	R	R	R	R	R
Función	R	R/M	R	R	R/B	R/M	R/M	R/M
Congestión								
TOTAL	17	16	13	16	12	11	14	11

Mejor puntuación = 2 Peor puntuación = 39 Bueno<5 Int-buena 6-12 Int-mala 13-19 Mala>20

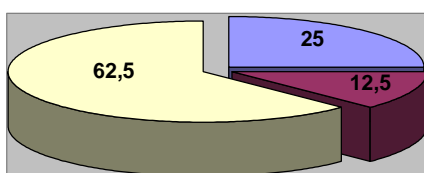
Una vez sumadas las puntuaciones correspondientes a las alteraciones histológicas presentes en cada animal, y tras llevar a cabo la clasificación histológica en función de la puntuación obtenida podemos afirmar que:

1. Las alteraciones histológicas correspondientes a la colestasis son más marcadas en el grupo CS-8s que en el grupo CCM-8s
2. En el grupo CS-8s el resultado MALO es el predominante, mientras que el resultado INTERMEDIO-MALO es el más frecuente en el grupo CCM-8s.
3. El resultado MALO apenas está presente en el grupo CCM-8s, y mucho menos en el lóbulo caudado.
4. El resultado INTERMEDIO-BUENO (el mejor posible en este estadio evolutivo) es más frecuente en el grupo CCM-8s.
5. La tendencia a presentar alteraciones histológicas más marcadas en el lóbulos medio respecto al caudado a 5 semanas de evolución p.o, es prácticamente inapreciable a 8 semanas de evolución p.o

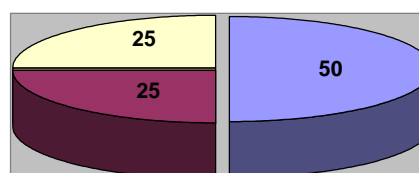
Tabla 30: Clasificación histológica correspondiente a los grupos de colestasis de 8 semanas de evolución en función de las puntuaciones asignadas a las variables histológicas estudiadas: **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o

	COLESTASIS 8 S			
	SUERO 8S		CÉLULAS 8S	
	LM	LC	LM	LC
RESULTADO BUENO	0	0	0	0
RESULTADO INTERMEDIO-BUENO	1 (12,5%)	1 (12,5%)	2 (25%)	3 (37,5%)
RESULTADO INTERMEDIO-MALO	2 (25%)	3 (37,5%)	4 (50%)	4 (50%)
RESULTADO MALO	5 (62,5%)	4 (50%)	2 (25%)	1 (12,5%)

■ INERMEDIO-MALO ■ INTERMEDIO-BUENO ■ INERMEDIO-MALO ■ INTERMEDIO-BUENO
 ■ MALO ■ MALO

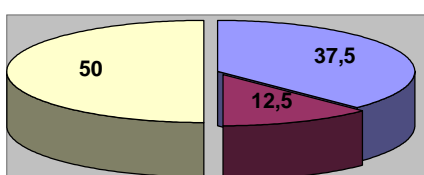


CS-8s. LÓBULO MEDIO

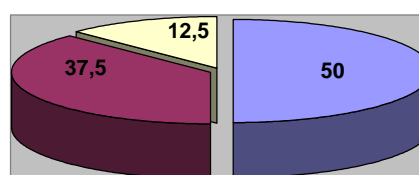


CCM-8s. LÓBULO MEDIO

■ INERMEDIO-MALO ■ INTERMEDIO-BUENO ■ INERMEDIO-MALO ■ INTERMEDIO-BUENO
 ■ MALO ■ MALO



CS-8s. LÓBULO CAUDADO



CCM-8s. LÓBULO CAUDADO

Figura 55: Comparación de resultados histológicos en los lóbulos medio y caudado de los grupos CS-8 (Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o) y CCM-8s (Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre preferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.).

Además, se realizó tinción con Rojo Picrosirio (figura 56) y Tricrómico de Mason (figuras 57) en los lóbulos medio y caudado, correspondientes a 2 individuos de cada grupo. Las microfotografías obtenidas se convirtieron a sistema binario (B/W; figura 58) y fueron analizadas mediante un programa de

análisis de imagen \diamond IMAGEJ. Posteriormente, se procedió a cuantificar las áreas de hepatocitos, proliferación biliar y fibrosis.

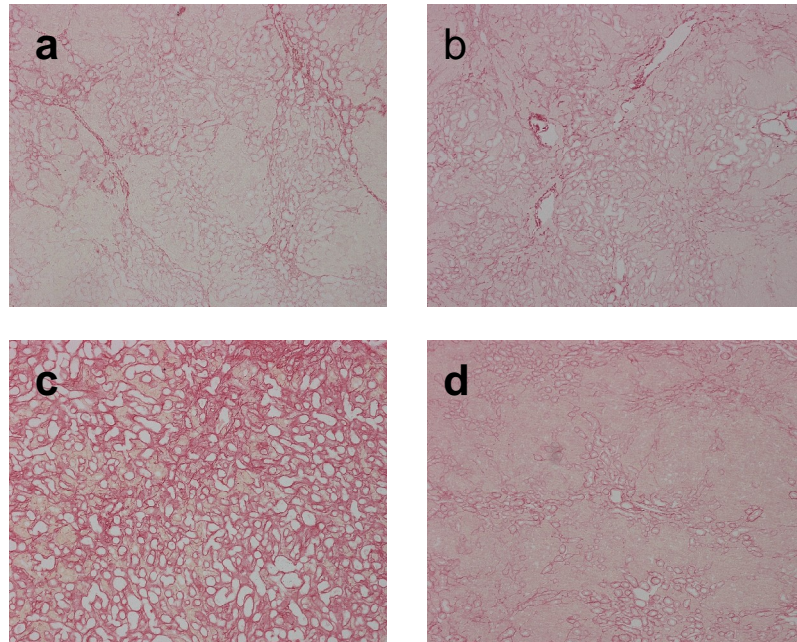


Figura 56: Imágenes obtenidas mediante microscopía óptica con tinción de Rojo Picosirio correspondiente a los grupos. **a)** CS-5s: Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **b)** CCM-5s: Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **c)** CS-8s: Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **d)** CCM-8s: Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.

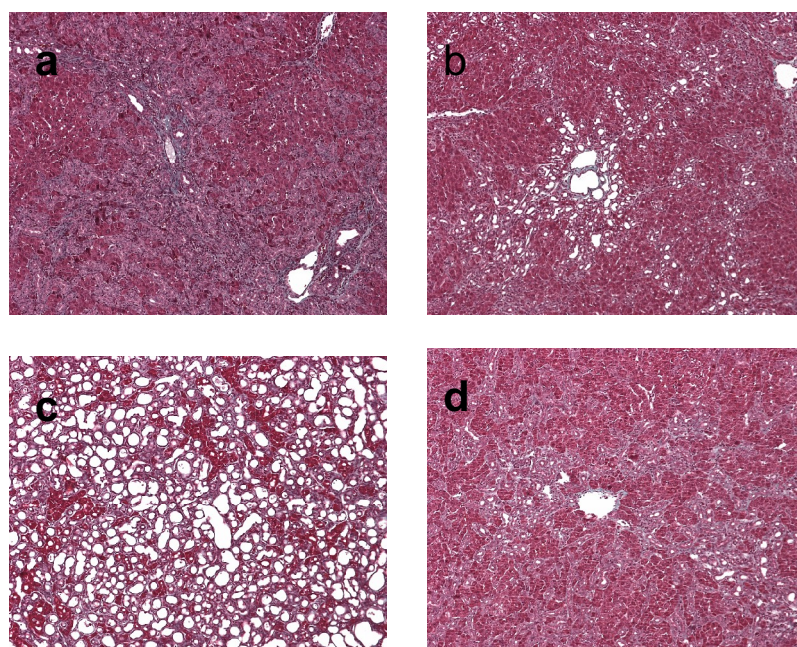


Figura 57: Imágenes obtenidas mediante microscopio óptica con tinción de Tricrómico de Masson correspondiente a los grupos: **a)** CS-5s: Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **b)** CCM-5s: Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **c)** CS-8s: Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **d)** CCM-8s: Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.

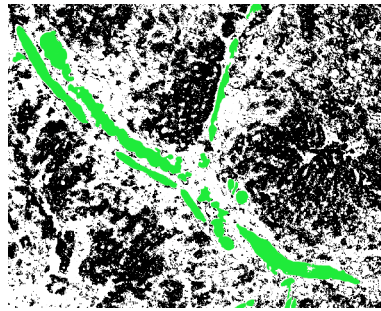


Figura 58: Tinción de Tricrómico de Masson convertido en sistema binario: negro=hepatocitos; verde= vasos; blanco: fibrosis.

Las conclusiones obtenidas fueron las siguientes:

A. Fibrosis

Se cuantificaron el área de fibrosis total y del porcentaje del área de fibrosis respecto del área de parénquima hepático en distintas preparaciones correspondientes a los lóbulos medio y caudado (tabla 31). Una vez realizado el análisis estadístico se puede concluir que (figura 59):

1. No se aprecian diferencias entre lóbulos (no hay efecto lóbulo).
2. En el grupo de ratas con colestasis que sólo recibieron suero salino se produce un incremento significativo (17,6%; $p=0,05$) en el porcentaje de fibrosis a las 8 semanas respecto a las 5 semanas de evolución p.o. En el grupo de ratas a las que se administraron células madre, este incremento en el porcentaje de fibrosis a las 8 semanas es menor, si bien la diferencia no es significativa (4,44; $p=0,36$) respecto a las 5 semanas de evolución.
3. No hay diferencias significativas en el porcentaje de fibrosis entre el grupo de ratas colestásicas a las que se administraron células madre y el grupo de colestasis con suero a 5 y 8 semanas. Sin embargo, a las 8 semanas de po, el porcentaje de fibrosis en el grupo con suero es mayor que en el grupo de células madre, con tendencia a la significación estadística (+7,65; $p=0,15$).

Tabla 31: Porcentaje del área de fibrosis hepática en preparaciones histológicas teñidas con Rojo Picrosirio. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 5 semanas p.o. **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 8 semanas p.o.

	PORCENTAJE DEL ÁREA DE FIBROSIS
CS-5S	21,93 ± 2,79
CCM-5S	27,44 ± 2,80
CS-8S	39,54 ± 3,38*
CCM-8S	31,88 ± 3,38

Media ± DE; * $p < 0.05$: Resultado estadísticamente significativo respecto a CS-5s

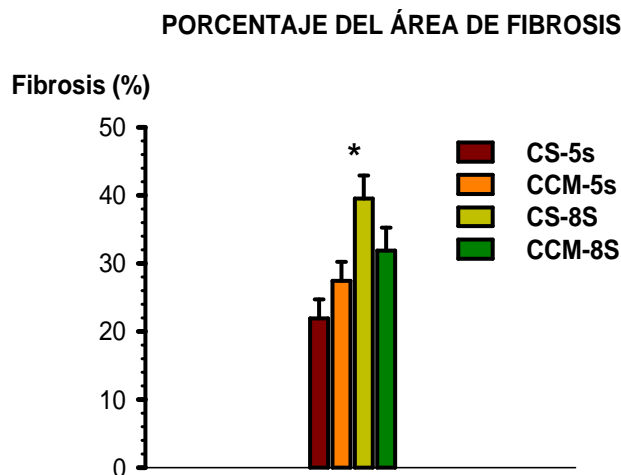


Figura 59: Porcentaje del área de fibrosis hepática en ratas con colestasis microquirúrgica. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.

Media ± DE; * $p < 0,05$: Resultado estadísticamente significativo respecto a CS-5s.

El incremento en el porcentaje de fibrosis es inferior desde la quinta hasta la octava semanas de evolución p.o. en las ratas colestásicas que recibieron células madre respecto de aquellas a las que se inyectó sólo suero salino intrahepático. La diferencia en el porcentaje de fibrosis entre la 8 y las 5 semanas de evolución po es significativa solo en el grupo de ratas tratadas con suero salino (Figura 60).

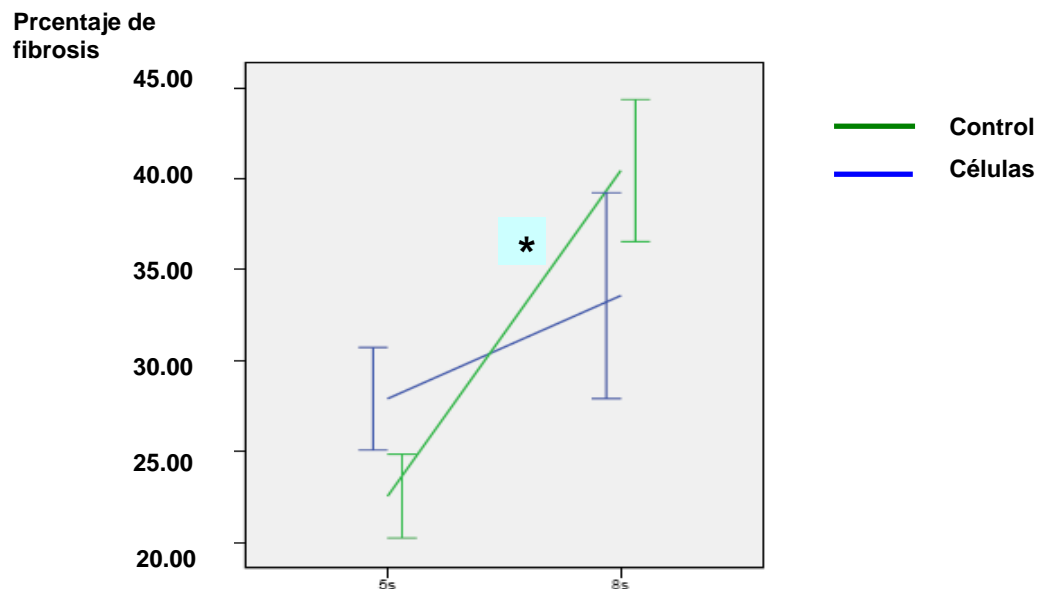


Figura 60: Evolución del porcentaje de fibrosis en los grupos de ratas colestásicas a las que se administraron células madre (azul) y las ratas colestásicas con suero (control: verde) a las 5 y 8 semanas de evolución p.o.

Media \pm DE; * $p < 0,05$: Resultado estadísticamente significativo

B. Proliferación biliar

Se realizó el cálculo del área de proliferación biliar, del área hepática total y del porcentaje del área de proliferación biliar respecto del parénquima hepático total en distintas preparaciones correspondientes a los lóbulos medio y caudado. En función de los resultados obtenidos, se puede concluir que (tabla 32, figura 61):

1. Se aprecia efecto lóbulo. Por lo tanto, la proliferación biliar no es homogénea en todo el hígado, sino que se aprecian diferencias en función del lóbulo en el que se realice el estudio.
2. En el grupo de ratas con colestasis que solo recibieron suero salino, tanto en el lóbulo caudado (14,78; $p=0,05$) como en el medio (7,08; $p=0,03$), hay un incremento significativo en el porcentaje de proliferación biliar a las 8 semanas respecto a las 5 semanas de evolución. En el grupo de ratas con

células madre, este incremento en el porcentaje de proliferación biliar en ambos lóbulos a las 8 semanas es inferior, si bien no significativo (LC: 2,4; $p=0,32$. LM: 4,08; $p=0,13$) respecto a las 5 semanas.

3. En el LC, a las 8 semanas del p.o., el porcentaje de proliferación biliar en las ratas a las que se administró suero salino es significativamente superior (+10,14; $p=0,01$) al grupo de ratas tratadas con células madre. Por el contrario, a las 5 semanas de evolución no hay diferencias significativas.
4. En el LM, no se aprecian diferencias significativas en el porcentaje de proliferación biliar entre el grupo de ratas con colestasis que recibieron suero (control) y el que recibió terapia con células madre, ni a las 5 ni a las 8 semanas de evolución p.o.
5. En el grupo de animales con colestasis que recibieron terapia celular, a las 8 semanas de po, hay un incremento significativo en el porcentaje de proliferación biliar en el LM respecto al LC (+2,95; $p=0,02$). Esta diferencia es menor y no significativa a las 5 semanas (+1,33; $p=0,25$).
6. En el grupo de ratas control (colestasis e inyección intrahepática de suero), a las 8 semanas de po, hay un incremento significativo en el porcentaje de proliferación biliar en el LC respecto al LM (+7,93; $p=0,000$). Esta diferencia es menor y no significativa a las 5 semanas (+0,23; $p=0,85$).

Tabla 32.: Porcentaje del área de proliferación biliar en preparaciones histológicas hepáticas teñidas con Tricrómico de Mason. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 5 semanas p.o. **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 8 semanas p.o. **LC:** Lóbulo cuadado. **LM:** lóbulo medio.

		PORCENTAJE DE PROLIFERACIÓN BILIAR
CS-5S	LM	3,09±1,32
	LC	3,31±1,38
CCM-5S	LM	6,84±1,27
	LC	5,51±1,26
CS-8S	LM	10,18±1,29*
	LC	18,11±1,56 [^] •
CCM-8S	LM	10,92±1,32 [∞]
	LC	7,97±1,51

Media \pm DE; * $p < 0,05$: Resultado estadísticamente significativo respecto a CS-5s.LM; ^ $p < 0,05$: Resultado estadísticamente significativo respecto a CS-5s.LC; $\theta p < 0,01$: Resultado estadísticamente significativo respecto a CCM-8s.LC; $\bullet p < 0,001$: Resultado estadísticamente significativo respecto a CS-8s.LM; $\infty p < 0,05$: Resultado estadísticamente significativo respecto a CCM-8s.LC;

PORCENTAJE DE PROLIFERACIÓN BILIAR

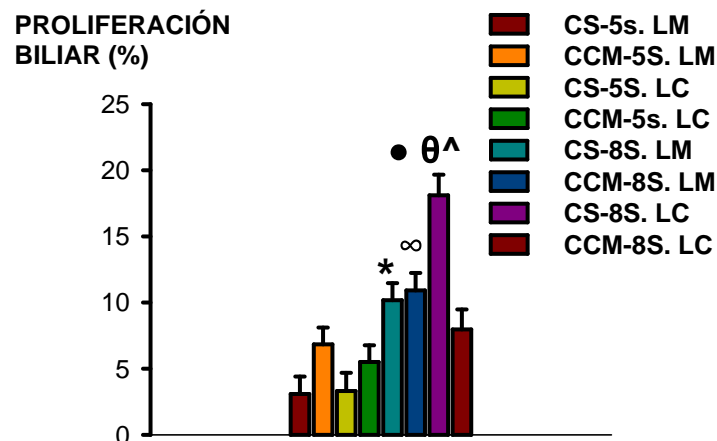


Figura 61: Porcentaje del área proliferación biliar en ratas con colestasis microquirúrgica. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración intrahepática de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.. **LM:** Lóbulo medio. **LC:** Lóbulo caudado

Media \pm DE; * $p < 0,05$: Resultado estadísticamente significativo respecto a CS-5s.LM; ^ $p < 0,05$: Resultado estadísticamente significativo respecto a CS-5s.LC; $\infty p < 0,05$: Resultado estadísticamente significativo respecto a CCM-8s.LC; $\theta p < 0,01$: Resultado estadísticamente significativo respecto a CCM-8s.LC; $\bullet p < 0,001$: Resultado estadísticamente significativo respecto a CS-8s.LM.

El incremento en el porcentaje de proliferación biliar es inferior desde la quinta hasta la octava semanas de evolución p.o. en las ratas colestásicas que recibieron células madre respecto de aquellas a las que se inyectó sólo suero salino intrahepático. Esta diferencia se aprecia con mayor intensidad en el lóbulo caudado que en el medio. (Figura 62).

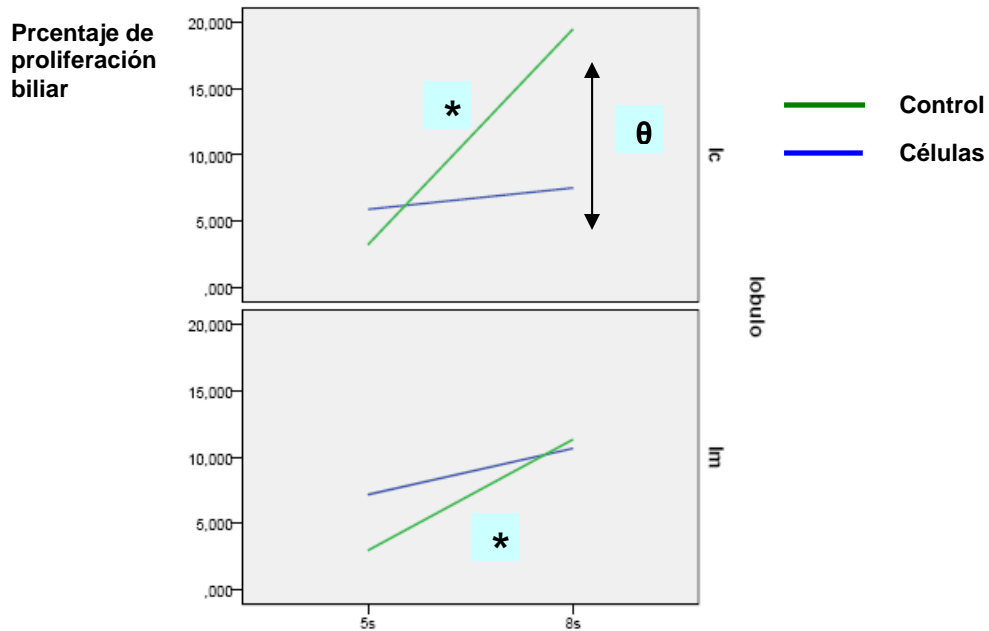


Figura 62: Evolución del porcentaje de proliferación biliar en los grupos de células y control a las 5 y 8 semanas.

Media \pm DE; * $p < 0,05$: Resultado estadísticamente significativo; $\theta p < 0,01$: Resultado estadísticamente significativo.

C. Área de hepatocitos

Se cuantificó también el área de hepatocitos, el área total hepática y el porcentaje del área de proliferación biliar en distintas preparaciones correspondientes a los lóbulos medio y caudado. Las conclusiones fueron las siguientes (tabla 33, figura 63):

1. Se aprecia efecto lóbulo. Por lo tanto, el área de hepatocitos no es homogénea en todo el hígado, sino se aprecian diferencias en función del lóbulo en el que se realice el estudio.
2. En el grupo de ratas con colestasis que solo recibieron suero salino, tanto en el lóbulo caudado (23,61; $p=0,000$) como en el medio (20,26; $p=0,001$), hay un descenso significativo en el porcentaje del área de hepatocitos a las 8 semanas respecto a las 5 semanas de evolución. En el grupo de ratas con células madre, se aprecia un aumento en el porcentaje del área de hepatocitos en el LC a las 8 semanas respecto a 5 semanas de evolución, con tendencia a la significación estadística (14,07; $p=0,054$). Este incremento en el porcentaje del área de hepatocitos en el LM en el grupo de células a las 8 semanas respecto a 5 semanas es prácticamente inapreciable (0,30; $p=0,96$).

3. A las 8 semanas de po, se aprecia un aumento no significativo en el área de hepatocitos en el grupo de ratas con células madre respecto al grupo de ratas con colestasis que solo recibieron suero salino, tanto en el LC (18,60; $p=0,14$) como en el LM (6,41; $p=0,40$), habiendo una tendencia a la significación estadística en el LC.
4. A las 5 semanas de po, en el LC, el porcentaje del área de hepatocitos es significativamente mayor en el grupo de ratas con colestasis que recibieron suero salino respecto al grupo de ratas con células madre (19,07; $p=0,03$). En el LM, también se produce un incremento en el grupo de ratas a las que se administró suero salino, si bien esta diferencia no es estadísticamente significativa (14,15; $p=0,11$).
5. En el grupo de ratas con células madre, a las 8 semanas de po. el porcentaje del área de hepatocitos es significativamente mayor en el LC que en el LM (+13,67; $p=0,03$).

Tabla 33: Porcentaje del área de hepatocitos en preparaciones histológicas hepáticas teñidas con Tricrómico de Mason. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 5 semanas p.o. **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 8 semanas p.o. **LC:** Lóbulo caudado. **LM:** lóbulo medio.

		PORCENTAJE DE ÁREA DE HEPATOCITOS
CS-5S	LM	48,33±3,51*
	LC	53,17±3,91 ^{^∞}
CCM-5S	LM	34,18±3,50
	LC	34,09±3,76
CS-8S	LM	28,07±3,69
	LC	29,56±3,95
CCM-8S	LM	34,49±6,54
	LC	48,17±5,66 [•]

Media \pm DE; * $p<0,001$: Resultado estadísticamente significativo respecto a CS-8s.LM; [^] $p<0,001$: Resultado estadísticamente significativo respecto a CS-8s.LC; [∞] $p<0,05$: Resultado estadísticamente significativo respecto a CCM-5s.LC; [•] $p<0,05$: Resultado estadísticamente significativo respecto a CCM-8s. LM.

PORCENTAJE ÁREA DE HEPATOCITOS

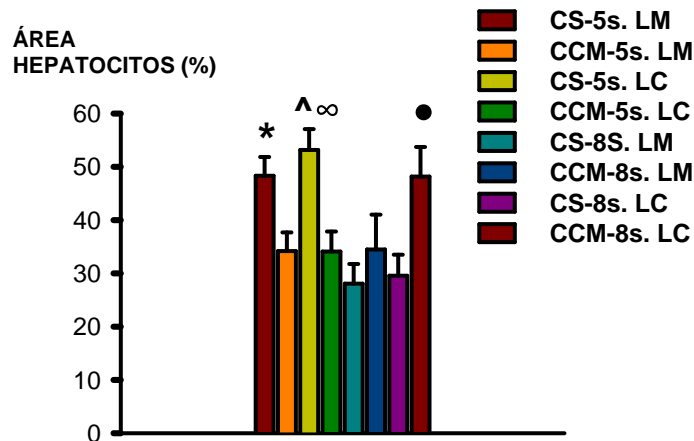


Figura 63: Porcentaje del área de hepatocitos en ratas con colestasis microquirúrgica. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.. **LM:** Lóbulo medio. **LC:** Lóbulo caudado.

Media \pm DE; * $p < 0,001$: Resultado estadísticamente significativo respecto a CS-8s.LM; ^ $p < 0,001$: Resultado estadísticamente significativo respecto a CS-5s.LC; ∞ $p < 0,05$: Resultado estadísticamente significativo respecto a CCM-5s.LC; • $p < 0,05$: Resultado estadísticamente significativo respecto a CCM-8s. LM.

En el lóbulo caudado, desde la quinta hasta la octava semanas de evolución po, se produce un descenso significativo en el área de hepatocitos en el grupo de ratas colestásicas tratadas con suero salino ($p < 0,001$), mientras que en el grupo de ratas tratadas con células se produce un aumento. En el lóbulo medio, el descenso en el área de hepatocitos es menor desde la quinta hasta la octava semanas de evolución p.o. en las ratas colestásicas que recibieron células madre respecto de aquellas a las que se inyectó sólo suero salino intrahepático, (Figura 64).

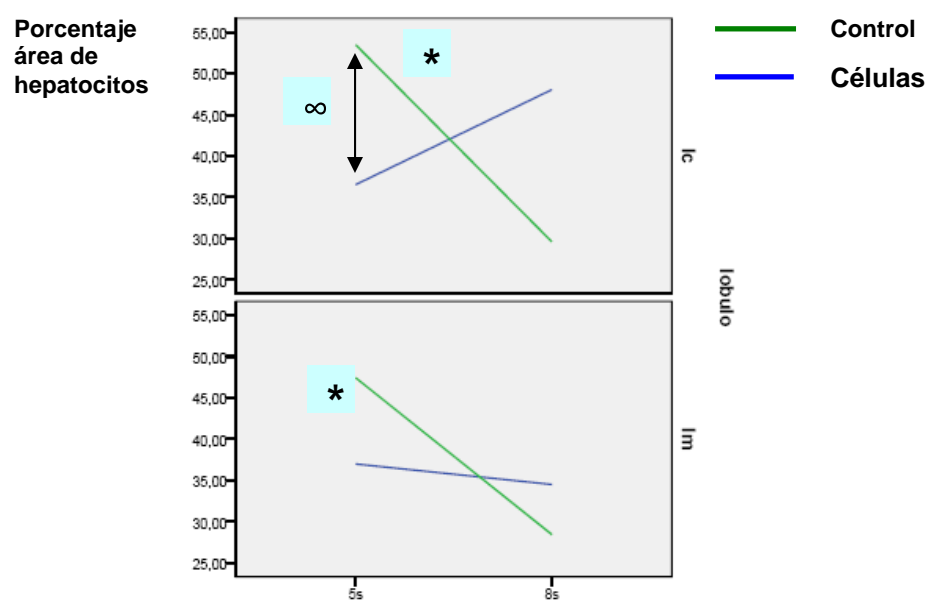


Figura 64: Evolución del porcentaje del área de hepatocitos en los grupos de células y control a las 5 y 8 semanas.

Media \pm DE; * $p < 0,001$: Resultado estadísticamente significativo; $\infty p < 0,05$: Resultado estadísticamente significativo.

VI. DISCUSIÓN

La administración intrahepática de células madre mesenquimales de origen adipocítico en un modelo experimental microquirúrgico de colestasis extrahepática a las dos semanas de evolución post-operatoria produce efectos beneficiosos más evidentes a largo plazo, esto es, en aquellos animales sacrificados tras ocho semanas de insuficiencia hepática colestásica, 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 y 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, mientras es difícil observar diferencias a 5 semanas, sí que se pueden apreciar diferencias significativas a 8 semanas: Así en el grupo con células a 8 semanas (CCM-8s) 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 el incremento del peso corporal, en la relación peso hepático/peso corporal, peso esplénico/peso corporal y 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 los grupos de 8 semanas, mientras que a las 5 semanas la progresión es más evidente en el grupo de suero (CS-8s), siendo significativo en el caso de la circulación espleno renal. La progresión de la vasculopatía mesentérica es similar en el grupo de células y en el control, tanto a 5 como a 8 semanas. Además, podemos encontrar un descenso no significativo en los parámetros de colestasis a 8 semanas en el grupo de células, mientras que no se aprecian diferencias en los parámetros de función hepática. La supervivencia global es baja, sobre todo a 8 semanas, posiblemente en relación a la inmunosupresión farmacológica. Además, hay un aumento no significativo de la supervivencia en el grupo control a 5 y 8 semanas, en relación al aumento de la mortalidad intra operatoria secundaria al rechazo agudo en el grupo de células.

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 mesenquimales

derivadas de adipocitos y prediferenciadas a hepatocitos podría ser de utilidad para reducir las complicaciones secundarias a las hepatopatías crónicas de origen biliar.

La ligadura de la vía biliar de la rata es un modelo experimental utilizado para estudiar la hipertensión portal y la colestasis extrahepática (Lee et al., 1986; Sanchez-Patan et al., 2008). Respecto a su utilización como modelo de colestasis extrahepática, en este modelo experimental pueden ser estudiados una amplia variedad de alteraciones que pueden ser clasificadas en intra y extra-hepáticas. Las alteraciones intra-hepáticas secundarias a colestasis microquirúrgica extra-hepática en la rata son múltiples, presentando hipertensión portal leve, fibrosis severa e intensa proliferación ductular biliar, que son más intensas a largo plazo (6-8 semanas) (Aller et al., 2008b).

En este trabajo se ha utilizado un modelo experimental de colestasis consistente en la resección con técnica microquirúrgica de la vía biliar extrahepática de la rata (Aller et al., 1993b). Esta técnica microquirúrgica se consideró de elección para el estudio de la colestasis extrahepática, ya que a diferencia de las técnicas macroquirúrgicas, consistentes en la ligadura y sección del colédoco, evita la producción de un pseudoquistes biliar con las subsiguientes complicaciones infecciosas locales (colangitis), regionales (abscesos hepáticos y peritonitis) y sistémicas (abscesos pulmonares, sepsis, shock séptico) (Aller et al., 2004a; Aller et al., 2009c).

La colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata se realiza disecando en continuidad el colédoco con los correspondientes conductos biliares de los lóbulos caudado, lateral derecho, medio y lateral izquierdo del hígado. Durante la micro disección se debe evitar la lesión de la arteria hepática propia así como de sus ramas lobulares. Por último, los conductos lobulares biliares se ligan a ras del parénquima hepático para evitar la persistencia de vía biliar extrahepática residual (Diéguez et al., 2002; Aller et al., 2009c).

El modelo resultante tras la resección microquirúrgica de la vía biliar extrahepática en la rata es de insuficiencia hepática progresiva lo que obliga a la administración de vitamina K para evitar la muerte de los animales por hemorragia durante las primeras semanas del post-operatorio (Aller et al., 2008a; Aller et al., 2010a). Se consigue así que los animales desarrollen hepatomegalia, asociada a una intensa respuesta proliferativa ductular biliar con apoptosis de

hepatocitos y colangiocitos y fibrosis (Sanchez-Patan et al., 2008; Aller et al., 2008b).

La respuesta inflamatoria hepática secundaria a la colestasis extrahepática se ha sugerido que posee similitud con la correspondiente a las heridas, ya que cursa con isquemia, estrés oxidativo y nitrosativo, infiltración leucocitaria, angiogénesis y fibrogénesis (Aller et al., 2008a; Aller et al., 2010b). Entre los factores etiopatogénicos, destacan la hipertensión intraductular 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 C y activación de la apoptosis. Sin embargo, la apoptosis también puede ser iniciada en el retículo endoplásmico. El acúmulo de sales biliares podría 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 et al., 2010; Aller et al., 2010b).

En los hígados colestásicos de la rata la proliferación ductular biliar se considera que es un proceso dinámico caracterizado por una continua formación y destrucción de colangiocitos por apoptosis (Glaser et al., 2010). Ya que los colangiocitos tienen la capacidad de inducir fibrogénesis, se ha sugerido que la fibrosis biliar se podría revertir favoreciendo la fagocitosis de los colangiocitos apoptóticos, por fagocitos profesionales como son los macrófagos (Popov et al., 2010). Sin embargo, es posible que el proceso de polarización de los macrófagos durante la colestasis implique diversas subpoblaciones. Así en respuesta a TNF- α e Interferon- γ (IFN- γ) los macrófagos se pueden polarizar hacia el clásico fenotipo M1 que se caracteriza por la elevada expresión de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12 e IL-23 (Wynn et al., 2011). Sin embargo, los macrófagos también pueden polarizarse hacia el fenotipo alternativo M2a cuando sufren la influencia de IL-4 y IL-13, consideradas citoquinas relacionadas con células Th₂. Asimismo, fenotipo M2b puede ser inducido por IL-1 β , en tanto que el fenotipo macrofágico M2c puede derivar del estímulo por IL-10, TGF- β o por glucocorticoides (Butcher y Galkina, 2012). En particular en el hígado colestásico, las células cebadas también podrían ser una fuente potencial de IL-1 β , IL-4, IL-13 e IL-10, las cuáles podrían polarizar a los macrófagos según un fenotipo M2 que, a su vez, causaría entre otras alteraciones, fibrosis. Al contrario que los macrófagos con fenotipo M1, los macrófagos M2 están implicados en los procesos cicatriciales ya que

causan remodelación de la matriz extracelular, esferocitosis y reclutamiento de fibroblastos (Wynn et al., 2011; Butcher y Galkina, 2012). En este supuesto el incremento de células cebadas espláncnicas en las ratas con hipertensión portal secundaria a colestasis extrahepática microquirúrgica podría ser uno de los factores causantes de fibrosis hepática (Aller et al., 2010d).

La colestasis extrahepática en la rata podría ser considerada un modelo experimental de fibrosis hepática (Hayashi y Sakai, 2011). Entre los factores que podría favorecer la fibrogénesis en este modelo experimental destacan los opioides endógenos, en particular producidos por los colangiocitos (Glasser et al., 2010). Entre las funciones que caracterizan el epitelio biliar proliferante en la colestasis extrahepática experimental, destacan las relaciones con la producción de mediadores neuroendocrinos en particular los opioides (Glasser et al., 2010; Alpini et al., 1988). La activación de los receptores opioides a su vez produce un incremento de la proliferación de células estrelladas hepáticas con incremento de la producción de colágeno (De Minicis et al., 2008). La fibrosis hepática posterior a la ligadura biliar o la exéresis de la vía biliar extrahepática en ratones, es la consecuencia de un proceso inflamatorio de origen biliar (Kershenovich Stalnikowitz y Weissbrod, 2003; Li y Crawford, 2004). Además, se producen cambios inflamatorios, como estrés oxidativo y nitrosativo (Britton y Bacon 1994; Huang et al., 2003) y una activación de la defensa contra la agresión oxidativa (Singh et al., 1992), edema del tracto portal (Isayama et al., 2006) y reclutamiento de células inflamatorias, sobre todo por neutrófilos en las regiones periductales del hígado (Saito y Maher, 2000). Además, la fibrosis hepática es un proceso de cicatrización caracterizado por la acumulación de proteínas de matriz extracelular, en particular de colágeno (Kershenovich Stalnikowitz y Weissbrod, 2003; Bataller y Brenner, 2005; Sanchez-Patan et al., 2008; Aller et al., 2008a). Aunque todas las células hepáticas pueden tener potencial fibrogénico (Friedman et al., 1985; Sedlacek et al., 2001), las células hepáticas estrelladas son las principales productoras de colágeno en el hígado (Canbay et al., 2002; Siller-Lopez et al., 2004). La evolución del hígado hacia la fibrosis en la colestasis extra-hepática de larga evolución (6-8 semanas) en la rata, permite que estos modelos experimentales sean muy útiles para el estudio de la reversibilidad de la fibrosis hepática (Xia et al., 2006).

La progresión de la fibrosis está en estrecha relación con la causa de la enfermedad hepática crónica, habiendo sido identificados cuatro patrones de

progresión de la fibrosis que dependen, a su vez, del lugar topográfico de la lesión tisular, de la implicación de diferentes poblaciones de células hepáticas similares a miofibroblastos y del mecanismo profibrogénico predominante (Pinzani y Romboute, 2004; Parola et al., 2008; Cassiman et al., 2002). Estos cuatro tipos de fibrosis hepática han sido denominados: fibrosis en puentes, típica de las hepatitis virales crónicas; fibrosis perisinusoidal o pericelular, típica de la esteato-hepatitis no alcohólica (*Non Alcoholic SteatoHepatitis*; NASH); fibrosis centrolobular, secundaria al estasis venoso, como ocurre en el fallo hepático crónico y, por último, fibrosis biliar (Parola y Pinzani, 2009).

En la fibrosis biliar se aprecia proliferación de canalículos biliares y de células hepáticas periductales similares a miofibroblastos en la interfase entre las áreas portales y el parénquima, lo cual induce la formación característica de septos fibrosis porto-portales (Parola y Pinzani, 2009).

Además, el hígado de rata con colestasis extrahepática microquirúrgica muestra un aumento significativo de la infiltración de células cebadas. En concreto, en el hígado de estas ratas se ha demostrado la acumulación de células cebadas en los espacios porta y en los septos fibrosos, asociado con fibrosis y proliferación biliar (Aller et al., 2008b). 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 et al., 1995). Incluso 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 pueden estar implicadas en la fibrogénesis hepática (Farrell et al., 1995; Francis et al., 2010). Experimentalmente, en un modelo de colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata también se ha demostrado que las células cebadas se acumulan en los espacios portales y alrededor de los conductos biliares proliferantes (Takeshita y Shibayama, 2005).

En la fibrosis biliar se aprecia proliferación de canalículos biliares y de células hepáticas periductales similares a miofibroblastos en la interfase entre las áreas portales y el parénquima, lo cual induce la formación característica de septos fibrosis porto-portales (Parola y Pinzani., 2009).

Las colangiopatías, tanto en adultos como en niños, se caracterizan por la presencia de colestasis, pérdida de colangiocitos por necrosis o apoptosis, proliferación de colangiocitos, esto es, reacción ductular, así como inflamación portal y periportal y fibrosis (Friedman, 2008b). Concretamente, la fibrosis y la cirrosis hepática son características histológicas propias de pacientes que se encuentran en estadios avanzados de cirrosis biliar primaria, pero son raramente descritas en modelos experimentales de cirrosis biliar primaria en roedores. Resultados recientes publicados en relación a la cirrosis biliar primaria demuestran que el perfil Th1 es predominante en los hígados y que la activación de NKT y TLR3 (*toll-like receptor*) contribuyen al desarrollo de fibrosis hepática en modelos de cirrosis biliar primaria en roedores (Wu et al., 2011). Por otro lado, la elevación de células Th17, la disminución de Treg y el aumento de células NK son características y esenciales en la patogénesis de la cirrosis biliar primaria, pero el papel que desarrollan en la formación de la fibrosis hepática todavía es desconocido (Chuang et al., 2006; Tanaka et al., 2012).

Asimismo, las lesiones hepáticas son un factor fundamental en la inducción de transición epitelio-mesenquimal (Choi y Diehl, 2009). Tres tipos de células hepáticas se ha demostrado que pueden experimentar dicha transición, como son los hepatocitos, los colangiocitos y las células estrelladas hepáticas. En particular los colangiocitos pueden sufrir una completa transición epitelio-mesenquimal induciendo la expresión de genes mesenquimales y adquiriendo un fenotipo migratorio (Deng et al., 2011). Asimismo, colangiocitos de ratas con fibrosis biliar co-expresan marcadores epiteliales y mesenquimales, una característica propia de la transición epitelio-mesenquimal (Omenetti et al., 2008; Choi y Diehl, 2009). Por lo tanto, se ha concluido que la atresia biliar y en general las hepatopatías asociadas a proliferación ductular, cursan con transición epitelio-mesenquimal, no solo producida por hepatocitos, sino también por colangiocitos (Diaz et al., 2009; Choi y Diehl, 2009).

En la actualidad, uno de los objetivos fundamentales en investigación hepática, es la reversibilidad de la fibrosis, causante de hipertensión portal. Hasta fechas recientes se consideraba que la fibrosis del hígado era irreversible y la única posibilidad terapéutica consistía en el control de los factores exógenos y endógenos (Ismail y Pinzani, 2011). Sin embargo, el descubrimiento de la actividad de los distintos subtipos de macrófagos en la producción y resolución de la fibrosis ha modificado las expectativas terapéuticas respecto de esta

patología. Así la interacción entre el sistema de quimioquinas y los macrófagos en procesos que causan la resolución de la fibrosis, es objeto de investigación con el objeto de obtener terapias eficaces (Desmet y Roskams, 2004; Mitchell et al., 2009).

Los modelos animales han sido muy útiles en el estudio de la fisiopatología de la fibrosis y cirrosis hepáticas (Tsukamoto et al., 1990; Iredale, 2007). Aunque en la actualidad no existe un modelo experimental que reproduzca exactamente el proceso de fibrosis hepática en el ser humano (Iredale, 2007), el estudio de modelos de fibrosis hepática en animales y en particular la rata, son fundamentales para el ensayo de nuevas terapias antifibrogénicas (Hoefs, 2011). Por esta razón, el modelo de fibrosis por colestasis extrahepática microquirúrgica se ha utilizado en el presente trabajo. La colestasis extrahepática microquirúrgica es causante de apoptosis hepatocitaria, asociada a la proliferación ductular biliar y al acúmulo de células cebadas alrededor de los conductos biliares proliferantes (Aller et al., 2008b). A su vez, macrófagos derivados de la médula ósea, se ha descrito que en las reacciones ductulares biliares a la agresión, son capaces de fagocitar los hepatocitos tanto apoptóticos como necrosados, estimulando el excesivo acúmulo de miofibroblastos con progresiva producción de matriz extracelular, disregulación de las células endoteliales hepáticas con remodelación vascular que causa fibrosis, hipertensión venosa portal y ascitis (Boulter et al., 2012; Diehl, 2012).

Otras consecuencias patológicas de la colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata es la producción de circulación colateral portosistémica secundaria a la hipertensión portal, así como la ascitis (Aller et al., 2004b). Se ha propuesto que la hipertensión portal induce una respuesta inflamatoria de origen esplácnico y con repercusión sistémica que sería de interés caracterizar, principalmente por sus implicaciones terapéuticas (Aller et al., 2007b). En la rata, la hipertensión portal se podría considerar que durante su evolución cambian los mecanismos que la producen. Así en fases precoces se atribuye el aumento de la resistencia al flujo portal, pero cuando se desarrolla la circulación colateral portosistémica, el mantenimiento de la hipertensión portal se atribuye al incremento del flujo sanguíneo arterial mesentérico (Sikuler et al., 1985; Sikuler y Groszmann, 1986; Vorobioff et al., 1983; Vorobioff et al., 1984).

En esencia, la hipertensión portal cursa con circulación hiperdinámica esplácnica y sistémica de naturaleza multifactorial (Kroeger y Goszmann, 1985; Bosch et al., 1992; Iwakiri y Groszmann, 2006). En las ratas, con hipertensión portal prehepática la circulación hiperdinámica se atribuye a dos mecanismos: 1) El incremento de mediadores vasodilatadores, como son óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO), TNF- α , glucagón, prostaciclina (PGI₂), endocannabinoides, adrenomedulina y sulfuro de hidrógeno (H₂S) (Iwakiri y Groszmann, 2006). 2) La anómala respuesta a mediadores vasoconstrictores ya endógenos como noradrenalina, endotelina y vasopresina, o bien exógenos como fármacos alfa-agonistas (Bomzon y Blendis, 1987; Blanco-Rivero et al., 2009; Sastre et al., 2012).

En el modelo microquirúrgico de colestasis extrahepática en la rata la hipertensión portal se asocia también con gran desarrollo de la circulación colateral portosistémica, principalmente de tipo esplenorenal, así como ascitis a corto plazo. Aunque se ha sugerido que el desarrollo de circulación colateral portosistémica se debe a la apertura de vasos preexistentes, en la actualidad se considera que es un proceso de neoangiogénesis mediado principalmente por el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) (Fernandez et al., 2005).

En la hipertensión portal el flujo linfático esplácnico también podría influenciar su evolución. En particular, el tracto gastrointestinal sufre edema en la hipertensión portal, favoreciendo así el incremento del flujo linfático e, incluso causando dilatación de los vasos linfáticos (Ikeda et al., 2001). Es posible que esta dilatación vascular linfática se produzca tanto por el excesivo drenaje de líquido intersticial, como por estasis linfático, inducido por la acción de mediadores inflamatorios, liberados por las células cebadas, en el endotelio linfático. Asimismo, estos mediadores podrían inhibir la actividad contráctil propulsora de la linfa. En este supuesto, tanto el edema intersticial como la dilatación vascular linfática podrían influenciar la evolución de la hipertensión portal, tanto en el ámbito esplácnico como sistémico (Aller et al., 2007b; Aller et al., 2010b).

Entre los factores intestinales que podrían estar implicados en la producción de traslocación bacteriana destacan la disbacteriosis y el aumento de permeabilidad intestinal (Garcia-Tsao et al., 1993; Wiest y Rath 2003). Se ha sugerido que en la hipertensión portal experimental podría existir un eje

inflamatorio hepato-intestinal, con producción hepática de mediadores proinflamatorios como son TNF- α , IL-1 β y NO, en tanto que en el tracto gastrointestinal se produce un incremento de IL-10, una citoquina con poderosa acción antiinflamatoria, y también mediadora de la respuesta por células Th2 (Aller et al., 2005; Palma et al., 2005). Por esta razón, se ha sugerido que la respuesta inflamatoria esplácnica asociada a la hipertensión portal podría estar implicada en la producción de traslocación bacteriana intestinal a los ganglios linfáticos mesentéricos (Llamas et al., 2010).

La hipertensión portal causa una respuesta inflamatoria tanto esplácnica como sistémica, con implicación de las células cebadas en su etiopatogenia (Aller et al., 2007b; Aller et al., 2007c). Entre los procesos inflamatorios en los que se ha demostrado la participación de las células cebadas, destacan las enfermedades autoinmunes, como son la esclerosis múltiple, la dermatitis atópica, la psoriasis y la artritis reumatoide (Theoharides et al., 2012).

Sin embargo, durante la evolución de la colestasis experimental se produce una alteración heterogénea de la distribución de citoquinas pro- y antiinflamatorias esplácnicas. En esencia, aumenta la concentración de TNF- α , IL-1 β e IL-10 en el tracto gastrointestinal y ganglios linfáticos mesentéricos, en tanto se reduce a nivel hepático y no se demuestran concentraciones significativas esplácnicas (García-Domínguez et al., 2010). Se ha sugerido que la respuesta inflamatoria esplácnica en la colestasis microquirúrgica experimental, por estar mediada por células cebadas y presentar incremento de las concentraciones esplácnicas de IL-4 e IL-10, podría ser considerada una respuesta de tipo Th2 (García-Domínguez et al., 2010). En este supuesto, la respuesta inflamatoria esplácnica post-colestasis microquirúrgica experimental estaría mediada predominantemente por citoquinas de tipo Th2 (Ogasawara et al., 2006).

En este modelo experimental de colestasis, la ictericia es también un factor importante en tanto que mediador de la respuesta inflamatoria. En particular, la bilirrubina posee numerosas propiedades bioquímicas y biológicas (Vitek y Schawertner, 2007). La bilirrubina ejerce una acción protectora contra el estrés oxidativo (Vitek y Schawertner, 2007), tiene propiedades antiapoptóticas y antimutagénicas (Bulmer et al., 2007) y por último, es un potente inmunomodulador (Moseley, 1999). En un modelo de endotoxemia en el ratón se ha demostrado que una sola dosis de bilirrubina ejerce efecto antioxidante así

como una intensa actividad anti-inflamatoria (Moseley, 1999). Por lo tanto, en el modelo experimental de colestasis extrahepática microquirúrgica no se debe excluir el importante efecto antioxidante e inmunomodulador que realizaría la bilirrubina.

Se podría considerar que en la hipertensión portal secundaria a colestasis extrahepática microquirúrgica, las células cebadas intestinales efectuarían un importante efecto patogénico en las distintas fases evolutivas de la enteropatía hipertensiva portal. En sus fases iniciales podrían participar en la redistribución del flujo sanguíneo en la pared intestinal y, en particular, en la mucosa y submucosa, ocasionando fenómenos de isquemia-revascularización que, a su vez, causarían estrés oxidativo y nitrosativo con edema intersticial, aumento de la expresión de quimioquinas y reclutamiento de leucocitos. A su vez, la respuesta inflamatoria intestinal favorecería el reclutamiento y proliferación de células cebadas con la subsiguiente producción de factores de crecimiento (TGF- β_1 y VEGF) que a largo plazo remodelarían la pared intestinal.

La complejidad de la historia natural y la etiología de la fibrosis hepática han hecho muy difícil el diseño de modalidades terapéuticas. Hasta la fecha, han sido propuestos, o incluso, utilizados en ensayos clínicos, muchas medidas terapéuticas anti-fibróticas (Friedman et al., 2007), pero sus efectos se han limitado a detener la progresión de las alteraciones histopatológicas sin conseguir beneficios clínicos (Tanaka et al., 2012).

El actual conocimiento de la eficacia potencial de los agentes antifibróticos está limitado a modelos animales de fibrosis hepática, incluida la colestasis extrahepática. De hecho, en la clínica humana podría ser perjudicial administrar a los pacientes agentes antifibróticos sin tratar la causa primaria de la lesión hepática subyacente (Pinzani et al., 2011). Así, en ratas con ligadura de la vía biliar la recuperación del flujo biliar conduce a un proceso de fibrinolisis que tiene como consecuencia una regresión casi completa de la fibrosis hepática. Debido a que el pico máximo de remodelación del tejido conectivo y de la actividad fibrinolítica está asociado con apoptosis masiva de los colangiocitos neoformados y su fagocitosis por macrófagos, se cree que los macrófagos podrían activar las metaloproteinasas y constituirse así como células con efecto fibrinolítico en la fibrosis biliar experimental (Popov et al., 2010). Por el contrario, y debido a los diferentes fenotipos que pueden adoptar los macrófagos, la

migración hepática de los macrófagos, mediada por el receptor celular CCR8, estimula la inflamación y la fibrosis hepática en ratas con ligadura del colédoco (Heymann et al., 2011). Además, los macrófagos y los factores que expresan, tanto por su capacidad dual para actuar como pro- y anti-fibróticos, como por su potencial para regular la activación de los miofibroblastos residentes o reclutados, intervienen en todo el proceso de fibrosis hepática (Wynn y Barron, 2010).

Las células mesenquimales o estromales poseen la increíble capacidad de conservar la memoria de su origen embrionario y, por lo tanto, son capaces de recapitular fases precoces del desarrollo embrionario (Kragl et al., 2009). En particular, la utilización de células mesenquimales para el tratamiento de múltiples enfermedades se fundamenta en su gran capacidad para recapitular el desarrollo normal embrionario. En este sentido, las células mesenquimales trasplantadas en tejidos u órganos patológicos, favorecen la reversibilidad de las alteraciones e inducen la homeostasia (De Miguel et al., 2012).

En particular, en el modelo experimental de colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata, el trasplante de células mesenquimales revierte parcialmente diversas alteraciones sistémicas que han sido relacionadas con la gravedad de la insuficiencia hepática que ocasiona dicha intervención microquirúrgica. Entre las alteraciones revertidas por la terapia con células mesenquimales destacan las que están relacionadas con la excesiva actividad angiogénica esplácnica. En este modelo experimental de insuficiencia hepática, la hepatosplenomegalia, la circulación colateral portosistémica, la enteropatía hipertensiva portal y la vasculopatía venosa mesentérica, son alteraciones relacionadas con la hiperactividad angiogénica esplácnica, cuyos mecanismos fisiopatológicos aún se desconocen (Aller et al., 2004b; Aller et al., 2007c; Aller et al., 2010a).

La reversibilidad de la hiperactividad angiogénica en la colestasis extrahepática experimental mediante tratamiento con células mesenquimales intrahepáticas puede ser atribuidas a mecanismos tanto locales (hepáticos) y regionales (esplácnico), como sistémicos. Los mecanismos loco-regionales podrían estar relacionados con la hipertensión portal. Así, la hipertensión portal podría inducir una respuesta adaptativa al estrés hipóxico esplácnico (Aller et al., 2010a). La hipoxia aumenta la expresión de factores de transcripción o sus coactivadores, como HIF-1 α (*hipoxia inducible factor-1alpha*) y PCG-1 α

(*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) que, a su vez, inducen la producción de factores de crecimiento angiogénicos (Fong, 2008). El mecanismo mejor estudiado ha sido el mediado por HIF-1 α . Se ha demostrado que la hipoxia induce la proliil-hidroxilación de HIF-1 α , que estabiliza la proteína y así se trasloca al núcleo para inducir la transcripción de factores de crecimiento angiogénico, como por ejemplo VEGF-A (*vascular endothelial factor-A*) (Pugh et al., 2003).

La angiogénesis excesiva es una respuesta asociada a la hipoxia, sin embargo, existen importantes diferencias entre las respuestas angiogénicas según el contexto en que se estudien. Por ejemplo, la angiogénesis es normal asociada al ejercicio físico y es patológica en individuos de edad avanzada, tanto en la respuesta a la isquemia como al infarto ya cerebral o miocárdico. A su vez, en los ancianos la respuesta angiogénica se asocia con frecuencia al desarrollo de tumores malignos, y se ha propuesto que la agresividad de los tumores se reduce con la edad avanzada porque la respuesta angiogénica es más deficiente (Lähteenvou y Rosenzweig, 2012). Sin embargo, en los ancianos la disminución de la capacidad angiogénica, que se asocia a una reducida densidad de los vasos sanguíneos en la microcirculación, cursa con diversas alteraciones endocrinas y metabólicas sistémicas que permiten elaborar una hipótesis integradora. Entre los cambios de función endocrina los ancianos presentan disminución de la producción de hormona del crecimiento, de IGF-1 (*insulin-like growth factor*) y de estrógenos. Además aumenta entre un 20% y 50% la producción de glucocorticoides ya que existe un bloqueo de la respuesta inhibitoria que los glucocorticoides ejercen sobre la producción de ACTH (*adrenocorticotrophic hormone*). Asimismo, en las mujeres la menopausia aumenta el riesgo de enfermedades cardiovasculares ya que los estrógenos están implicados en múltiples aspectos del proceso angiogénico. Así, los estrógenos estimulan la producción de NO (*nitric oxide*), mejoran la disfunción endotelial, incrementan la actividad de telomerasa y, en general, protegen tanto a las células endoteliales como a las células vasculares lisas de la senescencia, ya que promueven la migración de células progenitoras endoteliales y su capacidad proliferativa (Carmeliet et al., 2003).

Sin embargo, la terapia hormonal sustitutiva en mujeres post-menopáusicas ha demostrado que no reduce la patología cardiovascular, e incluso en algunos casos la agrava. A su vez, los andrógenos estimulan la producción de VEGF e

inducen la angiogénesis mediante la estimulación en la síntesis de eritropoyetina. Por lo tanto, se podría concluir que la angiogénesis es una respuesta del organismo a múltiples estímulos fisiológicos y patológicos la cual no puede ser considerada independientemente del contexto metabólico sistémico en el que se encuentra (Oellerich y Potente, 2012; Fontana et al., 2012; Lähteenvou y Rosenzweig, 2012).

En este sentido, las ratas con colestasis extrahepática presentan hipogonadismo, una alteración frecuentemente asociada a la insuficiencia hepática crónica (Foresta et al., 2008). En pacientes con cirrosis hepática se produce una disminución de las concentraciones plasmáticas de testosterona, en tanto que aumentan las concentraciones de estrógenos. Estas alteraciones se correlacionan con el grado Child Pugh y, por tanto, reflejan el grado de insuficiencia hepática (Wang et al., 1991) y se asocian con incremento de hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH). Por esta razón, se ha sugerido que el hipogonadismo en la cirrosis hepática podría ser atribuido a una disfunción hipotálamo-hipofisaria (Moradian et al., 1985). Además, la atrofia testicular, que como la ginecomastia son manifestaciones clínicas del hipogonadismo cirrótico, se asocia con la existencia de circulación colateral portosistémica (Zaitoun et al., 1998). Por el contrario, la administración de estrógenos y testosterona se ha descrito que mejoran parcialmente la disfunción hipotálamo-hipofisaria-gonadal tanto en ratas como en pacientes cirróticos (Sakamoto et al., 2005; Foresta et al., 2008).

El hipogonadismo con disminución sérica de testosterona libre se asocia con obesidad central y osteoporosis (Katznelsson et al., 1996; Collier et al., 2002). Por el contrario, el incremento sérico de testosterona en pacientes con cirrosis hepática e hipogonadismo, cursa con el incremento de grasa en las regiones cervical y torácica. Esta redistribución de la grasa corporal se ha observado en dichos pacientes cuando son sometidos a terapia sustitutiva hormonal con testosterona y se atribuye a que dicho tratamiento produce disminución de la obesidad central y disminución de la resistencia a insulina, sin causar cambios significativos del perfil lipídico plasmático (triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL (*low density lipoprotein*) y colesterol HDL (*high density lipoprotein*) (Yurci et al., 2011).

Sin embargo, la regulación del metabolismo del colesterol está alterada en los casos de insuficiencia hepática crónica (Aller et al., 2007b). El colesterol es precursor de todas las hormonas esteroideas y posee una acción fundamental en la proliferación celular (Fernandez et al., 2005). Los mamíferos obtienen el colesterol principalmente de la dieta y por biosíntesis endógena. Ya que la ingesta de colesterol es limitada, el organismo suple las necesidades de colesterol mediante su síntesis, la cual se puede realizar por cualquier tipo de célula, pero es el hígado el que protagoniza su biosíntesis. Para evitar el acumulo de colesterol plasmático, éste se convierte en esteres que son almacenados como gotas grasas citoplasmáticas. Asimismo, LXR (*liver x receptors*) son reguladores de la transcripción de genes, que responden al exceso de colesterol activando la transcripción de genes implicados en el transporte inverso de colesterol (Goedeke y Fernandez-Hernando, 2012).

La esteroidogénesis es un proceso complejo por el cual se convierte el colesterol en hormonas esteroideas con actividad biológica. Las células esteroidogénicas acumulan una pequeña cantidad de hormonas esteroideas. Por esta razón, cuando se requieren estas hormonas se precisa una rápida síntesis tanto en las glándulas suprarrenales, como en las gónadas. En particular, ACTH, estimula la síntesis de hormonas esteroideas en las glándulas suprarrenales en tanto que LH actúa en las gónadas (Miller y Bose, 2011).

Los esteroides sexuales, esto es andrógenos, estrógenos y progesterona, son a su vez importantes mediadores de la respuesta inflamatoria (Gilliver, 2010). Los esteroides sexuales se han implicado tanto en la producción de patología inflamatoria como en la mediación de acciones antiinflamatorias (Straub, 2007; Gilliver, 2010). Entre sus acciones protectoras o beneficiosas destaca la progesterona en su acción protectora contra el asma, en las mujeres, la testosterona por la protección que confiere a los hombres contra la artritis reumatoide y la protección contra la arteriosclerosis femenina de los estrógenos. Asimismo, los estrógenos favorecen la resolución de la inflamación post-traumática y es bien conocida su capacidad anti-inflamatoria en las heridas (Enosawa y Hirasawa, 1989; Verthelyi, 2001). Las hormonas esteroides actúan regulando la transcripción de determinados genes tras unirse a receptores nucleares, pero también tienen la capacidad de realizar acciones no-genómicas. En particular, las células endoteliales son muy sensibles a la acción de las hormonas esteroides, destacando los estrógenos. Los estrógenos, como también

la aldosterona, actúan en el endotelio por un doble mecanismo, genómico y no-genómico, esto es, por transcripción genética y por efecto biológico celular, combinándose así sus acciones en la superficie celular y en el núcleo (Cunningham y Gilkeson, 2011; Rauschemberger et al., 2011).

Por lo tanto, en la insuficiencia hepática crónica experimental colestásica se podría sugerir que la alteración del metabolismo de las hormonas sexuales derivadas del colesterol participarían en las alteraciones vasculares esplácnicas y sistémicas que se producen y en consecuencia la disregulación del metabolismo lipídico, suprarrenal y/o gonadal causaría la instauración de un patrón hormonal sexual cuyos efectos ya beneficiosos o perjudiciales precisan ulterior estudio en este modelo experimental. A su vez, la respuesta inflamatoria esplácnica secundaria tanto a la hipertensión portal como a la insuficiencia hepática integraría dichas supuestas alteraciones ya que la respuesta de fase aguda inherente a la inflamación es principalmente hepato-intestinal, altera el metabolismo de las lipoproteínas y, por lo tanto, el transporte lipídico (Aller et al., 2007b). Por lo tanto, la respuesta de fase aguda mediada por amiloide sérico A puede alterar el transporte inverso de colesterol promoviendo la extracción del exceso de colesterol de los macrófagos (Van der Westhuyzen et al., 2007). Así, durante la respuesta de fase aguda HDL, considerada anti-inflamatoria, adquiere propiedades pro-inflamatorias por la actividad de amiloide sérico A, entre otros factores. Consecuentemente, la respuesta inflamatoria, mediante la respuesta de fase aguda, regularía el metabolismo lipoproteico y, a su vez, el transporte de colesterol (Lund-Katz y Philips, 2010).

Ya que las células cebadas se ha descrito que participan en la fisiopatología de la hipertensión portal experimental (Aller et al., 2007c) se debe considerar los efectos que los esteroides sexuales pueden ejercer sobre ellas. Así, estradiol se ha demostrado que estimula la degranulación de células cebadas e incrementa la secreción de histamina y serotonina, en tanto que progesterona aunque inhibe la proliferación de células cebadas, es capaz tanto de inhibir como de estimular la secreción de histamina y serotonina (Gilliver, 2010).

La asociación en el modelo experimental de colestasis en la rata de insuficiencia hepática crónica, inflamación esplácnica, con ascitis y exacerbada respuesta angiogénica e hipogonadismo, sugiere la existencia de una alteración

metabólica subyacente de causa multifactorial, cuya terapéutica debe poseer un objetivo integrador para evitar la inhibición de algunos mecanismos patológicos en detrimento de otros que son beneficiosos. Por esta razón, la terapia con células madre mesenquimales ofrece una alternativa a las asociaciones terapéuticas al uso. Los efectos terapéuticos de las células madre mesenquimales pueden ser atribuidos a su capacidad para diferenciarse y transdiferenciarse en las células específicas de un tejido, así como a sus propiedades secretoras de factores paracrin, los cuales pueden estimular la supervivencia o la recuperación funcional de las células residentes, e incluso regular el microambiente local y la respuesta inmune (Baksh et al., 2004).

Durante el periodo embrionario precoz, las células mesenquimales con origen en el epitelio primitivo pueden sufrir una transición mesenquimo-epitelial y así regresar a su fenotipo epitelial original. Asimismo, pueden migrar y alcanzar localizaciones lejanas y, por este mecanismo, participan en la reparación de tejidos y órganos lesionados o disfuncionales (Bobis et al., 2006). En el presente trabajo, su administración intrahepática a ratas colestásicas ha demostrado que revierte parcialmente las alteraciones secundarias a la hipertensión portal y a la insuficiencia hepática, como son la hepatomegalia, la ascitis, la circulación colateral y el hipogonadismo. Esta gran acción terapéutica sistémica ya que no ha podido ser atribuida a similar magnitud en la reversibilidad de la insuficiencia hepática, permite sugerir otros posibles mecanismos de acción como por ejemplo, su capacidad reguladora de las alteraciones metabólicas tanto esplácnicas como sistémicas que inciden en este complejo modelo experimental. En esencia, estas alteraciones metabólicas podrían reflejar la capacidad desdiferenciadora orgánica que posee la respuesta inflamatoria que se induce en la rata, tras realizar una colestasis extrahepática microquirúrgica (Aller et al., 2010b; Aller et al., 2012). En este sentido, el trasplante de células madre mesenquimales induciría la diferenciación orgánica y, por tanto, la disminución de la respuesta inflamatoria tanto esplácnica como sistémica. Se incluiría entre estos efectos diferenciadores la disminución de la actividad angiogénica, la reducción del volumen ascítico y la inhibición parcial del hipogonadismo.

En el modelo inmunosuprimido de colestasis en la rata, utilizando como donante de las células madre mesenquimales a seres humanos no se puede excluir la acción perjudicial de la terapia inmunosupresora ni su potencial efecto beneficioso anti-inflamatorio. Asimismo, tampoco se pueden excluir posibles

menoscabos funcionales de las células madre mesenquimales derivadas de la edad de los donantes. Varios estudios funcionales han abordado esta cuestión respecto de los cambios asociados a la edad, en el potencial regenerativo de las células madre mesenquimales (Lepperdinger, 2011).

Aunque los efectos terapéuticos hepáticos de las células madre mesenquimales se podrían superponer a los obtenidos en otras patologías que cursan con fibrosis (Hanson et al., 2010) sus efectos beneficiosos espláncnicos en la colestasis extrahepática experimental no solamente serían secundarios a la resolución parcial de la patología hepática. En este supuesto, otros mecanismos diferentes de los ya demostrados serían los responsables (Li y Fu, 2012). Las citoquinas IL-4 y IL-13, producidas por las células Th2, así como TGF- β 1 estimulan directamente la síntesis de colágeno en fibroblastos humanos y de ratón. Al igual que los fibroblastos y los miofibroblastos, los macrófagos responden a las citoquinas Th2 y numerosos estudios han implicado a las IL-4/IL-13 como estimuladoras de macrófagos en la patogénesis de la fibrosis (Duffield et al., 2005; Edwards et al., 2006; Wynn y Barron 2010). Por este motivo, la reversibilidad parcial de la fibrosis hepática en ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica tras la administración de células madre de origen mesenquimal podría ser atribuída a su capacidad anti-inflamatoria (Guo et al., 2007). Múltiples evidencias sugieren que las células madre por sí mismas, en particular las de origen mesenquimal, segregan una variedad de citoquinas pro- y anti-inflamatorias cuyo efecto último sería la limitación de la inflamación (Burchfield y Dimmeler, 2008). En la actualidad se acepta que las células madre de origen mesenquimal poseen propiedades antiinflamatorias, mediadas específicamente a través de la expresión de citoquinas y de la infiltración de células inflamatorias, pero estos efectos pueden no influir sobre todos los aspectos de la inmunidad innata. Específicamente, las células madre de origen mesenquimal inhiben la proliferación de linfocitos T, alteran la secreción de citoquinas e inducen un fenotipo de carácter predominantemente anti-inflamatorio (Aggarwal y Pittenger, 2005). Pero, la inmunosupresión mediada por células madre de origen mesenquimal no es exclusivamente el resultado de un efecto inhibitor directo, sino que implica la activación de otras células moduladoras, como los monocitos. A través de una comunicación entre las células madre de origen mesenquimal y su entorno, los monocitos inflamatorios permiten a las células madre de origen mesenquimal adquirir sus propiedades inmunosupresoras.

Además, éstas células madre pueden también activar e inducir la proliferación de células T reguladoras (Tregs) (Trento y Dazzi, 2010). De esta manera, las células madre de origen mesenquimal podrían intervenir en la reparación de la lesión hepática secundaria a colestasis extrahepática de una manera similar a la cicatrización de una herida cutánea. Así, podemos proponer que las células madre mesenquimales interactuarían con células inflamatorias, incluidas células T y células Natural Killer para inducir la expresión de un fenotipo más tolerante y anti-inflamatorio (Aggarwal y Pittenger, 2005; Branski et al., 2009; Lau et al., 2009).

La inducción de un microambiente de inmunotolerancia por las células madre de origen mesenquimal, podría favorecer la regeneración tisular y, además, reducir la fibrosis. En concreto, la transición mesénquimo-epitelial, es un fenómeno por el cuál una célula cambia de un fenotipo mesenquimal a otro epitelial, siendo éste un proceso fundamental durante el desarrollo embriológico, la cicatrización de las heridas y la regeneración tisular (Otto y Wright, 2011). Incluso, se ha sugerido que los hepatocitos pueden realizar una transición epitelio-mesenquimal tras sufrir una lesión tisular de origen colestásico, y que la solución de la colestasis consistiría en inducir el proceso inverso (Bridle et al., 2009).

El trasplante hepático de células madre mesenquimales es obvio que introduce a éstas en una encrucijada vital para el organismo, desde las primeras fases del desarrollo embrionario (Burke y Tosh D, 2012). Señales paracrinas entre las células hepáticas residentes y las mesenquimales trasplantadas podría reiniciar las propias del desarrollo hepático a través de mecanismos sistémicos. El hígado lesionado del adulto posee el potencial para regenerar e incluso sus mecanismos regeneradores son similares a los que rigen la morfogénesis del hígado fetal (Boulter et al., 2012). En particular, tras la agresión de la vía biliar los colangiocitos son capaces de producir ligandos *Hedgehog*, y los hepatocitos pueden producir similares morfogenos (Omenetti et al., 2011; Diehl, 2012). A su vez, este potencial morfogénico hepático se potencia por su papel hemopoyético fetal (Zhao y Duncan, 2005) adquiriendo así una capacidad inductora del metabolismo sistémico que podría ser influida y reeditada por las células madre mesenquimales trasplantadas.

Además de su empleo para regular la respuesta inmunitaria (Shi et al., 2012), las células madre mesenquimales han sido utilizadas para estimular la reparación tisular (Adams et al., 2007; Duncan et al., 2009; Trento y Dazzi, 2010). Estas células madre pueden mejorar la recuperación del daño tisular por una vía paracrina al producir factores que estimulan la reparación tisular (Crisostomo et al., 2008). Las células madre mesenquimales trasplantadas en un tejido lesionado expresan factores de señalización paracrina, como citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, que favorecen la angiogénesis, disminuyen la inflamación, activan los sistemas de señalización anti-apoptóticos, pueden diferenciarse en las áreas lesionadas, modulan la matriz extracelular que produce una remodelación tisular más favorable y, finalmente, pueden activar células madre vecinas residentes en el tejido (Oertel y Shafritz, 2008; Crisostomo et al., 2008; Kuroda et al., 2010; De Miguel et al., 2010).

La terapia con células madre adultas también ha sido utilizada para tratar la insuficiencia hepática (Burra et al., 2008). Se ha demostrado recientemente que las células madre mesenquimales estimulan la reparación tisular en situaciones de patología hepática. Así, el trasplante de células madre mesenquimales aisladas de cordón umbilical, de tejido adiposo y de médula ósea humanas, o de médula ósea de rata mejoran la función hepática en roedores con un fallo hepático agudo producido por tetracloruro de carbono (Duncan et al., 2009). La infusión de células similares a hepatocitos previamente diferenciadas in vitro desde células madre de origen mesenquimal, también mejora la insuficiencia hepática aguda (Kuo et al., 2008; Banas et al., 2009). En los modelos de fallo hepático que han sido estudiados, se ha demostrado un descenso en los niveles séricos de enzimas hepáticas. Por el contrario, en el presente estudio, realizado en ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica, la mejoría de la función hepática se ha demostrado monitorizando los niveles séricos de albúmina. Este resultado ofrece un atractivo especial en la búsqueda de efectos beneficiosos de la terapia hepática con células madre de origen mesenquimal en la hepatopatía crónica, ya que los resultados hasta el momento actual han sido desalentadores. En éste sentido, cada vez hay más evidencias que sugieren que las células madre mesenquimales pueden inducir fibrosis y cirrosis hepática. Por ejemplo, en modelos de cirrosis hepática en el ratón, poblaciones exógenas de células madre de origen mesenquimal favorecen la aparición de miofibroblastos, que

están implicados en la formación de la fibrosis (Russo et al., 2006; di Bonzo et al., 2008).

Dos mecanismos primarios han sido propuestos para explicar los efectos terapéuticos de las células madre mesenquimales o de los hepatocitos diferenciados *in vitro* a partir de éstas células en la patología hepática. En primer lugar, las células madre mesenquimales podrían generar células que funcionaran como hepatocitos normales. De hecho, una vez inyectadas en el hígado, las células madre trasplantadas expresan marcadores de los hepatocitos del donante. Por lo tanto, la diferenciación de las células madre mesenquimales o de las células similares a hepatocitos derivadas de las células madre de origen mesenquimal hacia el linaje hepatocitario debe ocurrir en el microambiente del parénquima hepático (Abdell Aziz et al., 2007; Kuo et al., 2008; Banas et al., 2009).

El segundo mecanismo por el cual las células madre de origen mesenquimal podrían promover la reparación hepática es indirecto. Factores solubles secretados por éstas células facilitan la recuperación hepática en respuesta a una lesión aguda. Estudios realizados en trasplantes avalan el papel autónomo de las células madre de origen mesenquimal en la reparación hepática. Las células madre mesenquimales segregan numerosas proteínas, pero todavía se desconoce qué factores son los responsables de la recuperación hepática (Van Poll et al., 2008; Duncan et al., 2009). Estos hallazgos permiten considerar a la terapia hepática mediante células madre de origen mesenquimal como una opción terapéutica muy prometedora, aunque todavía quedan muchas preguntas sin responder, como por ejemplo, qué poblaciones celulares son las que poseen mayor actividad terapéutica (células madre mesenquimales, hepatocitos derivados de células madre mesenquimales, o factores secretados por células madre de origen mesenquimal), y qué tipos de enfermedades hepáticas son susceptibles de ser tratadas con las terapias descritas (Duncan et al., 2009).

Las células madre de origen mesenquimal representan una fuente celular alternativa al trasplante hepático para sustituir a los hepatocitos primarios debido a su potencial de diferenciación múltiple y a su casi ilimitada disponibilidad. Dependiendo del tipo de patología hepática subyacente, su modo de acción consiste en sustituir el parénquima hepático enfermo o bien, estimular la

regeneración hepática mediante sus efectos anti-inflamatorio y anti-apoptótico y su estimulación de la proliferación celular (Christ y Stock, 2012).

Las células madre de origen mesenquimal representan una fuente celular alternativa al trasplante hepático para sustituir a los hepatocitos primarios debido a su potencial de diferenciación múltiple y a su casi ilimitada disponibilidad. Dependiendo del tipo de patología hepática subyacente, su modo de acción consiste en sustituir el parénquima hepático enfermo o bien, estimular la regeneración hepática mediante sus efectos anti-inflamatorio y anti-apoptótico y su estimulación de la proliferación celular (Christ y Stock, 2012).

Las células aisladas del tejido adiposo subcutáneo o peritoneal expresan marcadores de superficie propios de células madre mesenquimales y poseen la capacidad de diferenciación en múltiples líneas celulares. Las células madre de origen mesenquimal procedentes de tejido adiposo humano situadas in vitro en condiciones que favorecen la diferenciación hepatocitaria adoptan una creciente funcionalidad hepatocitaria, que incluye la formación de urea, la síntesis de glucógeno, la activación del enzima citocromo P450, y la expresión de transcriptos hepatocitarios específicos, como sintetasa carbamilo fosfato, albúmina y citocromo P450 tipo 3A4 (Aurich et al., 2009).

Las células madre mesenquimales derivadas de adipocitos poseen características similares a las células madre de origen mesenquimal obtenidas de la médula ósea, pero son mucho más abundantes y fáciles de obtener, y por tanto constituyen un tratamiento prometedor de la fibrosis hepática (Wang et al., 2012; Ouyang et al., 2012). Las células madre mesenquimales derivadas de adipocitos poseen un efecto terapéutico sobre la fibrosis hepática inducida por CCl₄ (tetracloruro de carbono), tras ser inyectadas por vía intraportal, que podría ser una vía mejor que su trasplante a través de la vena de la cola (Wang et al., 2012).

Las células madre estromales derivadas de adipocitos o células madre mesenquimales adipocíticas, conservan la capacidad adherente y multipotente propias de los tipos celulares aislados del tejido adiposo (Al Battah et al., 2011). Las células madre mesenquimales derivadas de adipocitos representan un elevado potencial para almacenarse en bancos de células que serían una alternativa o un complemento a los bancos de células sanguíneas del cordón umbilical en muchas de las potenciales aplicaciones terapéuticas en las que

células madre mesenquimales podrían ser utilizadas (Detante et al., 2009; Oishi et al., 2009). La mayoría de la investigación y del trabajo académico se centran en la remodelación tisular y en la diferenciación de las células madre mesenquimales derivadas de adipocito en tipos celulares somáticos especializados en reemplazar tejidos y órganos lesionados, incluido el hígado (Tremolada et al., 2010; Meirelles y Nardi, 2009).

Las células madre mesenquimales derivadas de adipocitos pueden ser fácilmente aisladas a partir de materiales de desecho procedentes de liposucciones (lipoaspirado) y de cirugía reconstructiva, como en el caso de las dermolipectomías (Zuk et al., 2001). Seo y colaboradores demostraron por primera vez que estas células madre se pueden diferenciar en células similares a hepatocitos mediante un protocolo de un solo paso utilizando factor de crecimiento hepatocitario (*Hepatocyte Growth factor*; HGF), oncostatina (OSM) y dimetil sulfóxido (DMSO) (Seo et al., 2005).

En la actualidad, los mecanismos moleculares responsables de la plasticidad de las células madre mesenquimales derivadas de adipocitos y de su capacidad de diferenciarse en células similares a hepatocitos no son conocidos. Sin embargo, estudios en modelos animales han demostrado los efectos beneficiosos de éste tipo de células madre sobre la regeneración tisular hepática. En este estudio, el trasplante de células madre de origen mesenquimal derivadas de adipocitos en ratas con colestasis extrahepática e insuficiencia hepática crónica ha demostrado que las células madre de origen mesenquimal derivadas de adipocito prediferenciadas a hepatocito han sido capaces de implantarse en el hígado enfermo y de mejorar su función. Tal vez, el trasplante de éstas células madre en ratas colestásicas permita recuperar muchas de las funciones propias de los hepatocitos, entre las que se incluirían el metabolismo proteico, la regulación de la respuesta inmune innata y la degradación de compuestos tóxicos (Dhawan et al., 2010).

Los hepatocitos son células polarizadas que a través de su superficie apical, secretan bilis y productos tóxicos de desecho en los canaliculos biliares. Además, gracias a su estructura única y a la expresión de varias enzimas, están implicados en la síntesis de proteínas, en el metabolismo de los carbohidratos, en la síntesis de colesterol, sales biliares y fosfolípidos, así como en la detoxificación y activación de sustancias exógenas (Al Battah et al., 2011).

Por lo tanto, en las ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica, las células madre mesenquimales derivadas de adipocitos, al disminuir la respuesta pro- inflamatoria y, de forma secundaria, la fibrosis, podrían favorecer el crecimiento de la población hepatocitaria, potenciándose así las funciones propias de estas células epiteliales especializadas, los hepatocitos. En resumen, el trasplante experimental de células madre de origen mesenquimal derivadas de adipocitos en la colestasis extrahepática, permitiría la recuperación parcial de la función hepatocitaria, lo cual al aumentar la supervivencia del animal brindaría un tiempo extra para poder optar a otros tratamientos más agresivos de la insuficiencia hepática colestásica crónica, como por ejemplo el trasplante hepático. Así, el trasplante de éste tipo de células madre podría ser considerado como una alternativa terapéutica en aquellos pacientes con insuficiencia hepática severa en los que el tratamiento quirúrgico no es posible. Esta aplicación terapéutica de las células madre de origen mesenquimal ha sido también propuesta en pacientes que sufren rechazo del injerto contra el huésped, agudo y crónico, y en otras enfermedades autoinmunes, en las que la cirugía no está tampoco indicada (Ringden y Le Blanc, 2011).

La insuficiencia hepática crónica es una enfermedad sistémica en la cuál múltiples órganos, como el riñón y el cerebro, podrían ser afectados como consecuencia de una intensa respuesta inflamatoria (Bataller y Benner, 2005). Además, pueden producirse alteraciones de las células hematopoyéticas. Así, en cirrosis experimental a largo plazo (12 semanas de administración de CCl₄), se ha comprobado un descenso de los sinusoides en la médula ósea y un considerable acúmulo de focos de necrosis celular y apoptosis. Estos cambios demuestran que las lesiones del endotelio sinusoidal de la médula ósea y los cambios asociados en las células hematopoyéticas se intensifican con la persistencia de fibrosis/cirrosis hepática. (Zhao et al., 2010). Las células procedentes de la médula ósea desempeñan un papel fundamental en la regeneración parenquimatosa y en la fibrosis hepática. El tetracloruro de carbono o la Tioacetamida estimulan la diferenciación de las células procedentes de la médula ósea en células estrelladas hepáticas y en miofibroblastos, induciendo así la fibrosis hepática. En los modelos experimentales de fibrosis hepática inducida por la ligadura del colédoco, los fibrocitos productores de colágeno son también reclutados desde la médula ósea. Además, el consumo excesivo de alcohol estimula tanto la llegada de células estrelladas hepáticas desde la

médula ósea como la producción por estas células de citoquinas profibrogénicas en un modelo de esteatosis hepática inducida con alcohol en el ratón (Fujimiya et al., 2009).

Para que se inicie la respuesta de la médula ósea, el hígado lesionado debe señalar la activación de los tipos celulares implicados en la respuesta reparadora. El factor 1 derivado del estroma (*Stromal-derived factor 1*; SDF-1 o CXCL4) ha sido uno de los factores quimioatrayentes de células madre mejor caracterizado. En el hígado lesionado SDF-1 es sobreexpresado en los conductos biliares, y desempeña un papel muy importante en el reclutamiento de células madre y células progenitoras extrahepáticas hacia el tejido dañado. Además, el receptor de SDF-1, CXCR4, es expresado por diferentes poblaciones de células madre de la médula ósea, incluidas las células madre de origen mesenquimal. Se ha comprobado también que el hígado enfermo secreta factor de crecimiento hepatocitario (*hepatocyte growth factor*; HGF) para reclutar células de la médula ósea. Todo esto resulta en un aumento de la supervivencia de las células madre implantadas, posiblemente como consecuencia de un incremento en la expresión de SDF-1 por las células del epitelio biliar que, por otra parte, podrían estar también implicadas en el aumento de la densidad hepática de las células cebadas que ocurre tras la colestasis extrahepática microquirúrgica (Aller et al., 2008b; Eckersley-Maslin et al., 2009). Muchos de los genes que son activados por la agresión hepática secundaria a la ligadura del colédoco incluyen los que inducen la síntesis de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento, como SDF-1 y HGF. Por lo tanto, los factores secretados por el hígado colestásico producen el reclutamiento de células madre procedentes de la médula ósea (Kallis K et al., 2007; Eckersley-Maslin et al., 2009).

Este eje hígado-médula ósea que contribuye al desarrollo embrionario hepático, a la homeostasis hepática y a la patología hepática, podría estar basado en la función hematopoyética que asume el hígado desde la tercera semana de gestación hasta poco tiempo después del nacimiento (Collardeau-Frachon y Scoazec, 2008). La recapitulación de algunas de éstas funciones hematopoyéticas durante las enfermedades hepáticas explicarían que se active la respuesta de la médula ósea en las situaciones de lesión hepática grave (Eckersley-Maslin et al., 2009; Gilchrist y Plevris, 2010).

Varios grupos han utilizado células autólogas de médula ósea como terapia para la cirrosis. Una amplia variedad de vías de administración han sido utilizadas, como la infusión directa de las células madre en la vena porta o la arteria hepática, o bien la infusión periférica de las mismas. Sin embargo, los estudios experimentales sugieren que la vía de administración puede no ser importante (Gilchrist y Plevris, 2010; Lyra et al., 2010). Los hepatocitos derivados de células de la médula ósea pueden desarrollarse por tres mecanismos primarios. En el primero, la médula ósea podría albergar teóricamente células madre de origen endodérmico especializadas que serían capaces de producir hepatocitos y otras células epiteliales. Estas células serían análogas a las células madre de origen mesenquimal. Segundo, una única población de células madre podría dar lugar a diferentes linajes de células sanguíneas y hepatocitarias. Y tercero, al contrario que en la diferenciación, los hepatocitos derivados de la médula ósea podrían tener su origen en la fusión celular (Duncan et al., 2009). Por lo tanto, en los casos de insuficiencia hepática severa, el deterioro que sufre la médula ósea impediría su función clave en la sustitución de los hepatocitos enfermos (Zhao et al., 2010). Sin embargo, la terapia con células madre mesenquimales podría utilizar los mediadores (SDF-1, HGF y otros) liberados por el hígado enfermo en la sangre periférica y en los espacios de Disse, favoreciendo así el implante de las células trasplantadas en el hígado (Gilchrist y Plevris, 2010).

El trasplante de células madre mesenquimales en ratas colestásicas, no solo induce la expansión de la subpoblación hepatocitaria del hígado, sino que también reduce la fibrosis y la proliferación ductular biliar. Este efecto terapéutico de las células madre de origen mesenquimal podría atribuirse a su capacidad para disminuir la respuesta inflamatoria hepática producida por la colestasis extrahepática, que podría implicar la desdiferenciación del parénquima hepático lesionado (Aller et al., 2012).

Se ha propuesto que la reacción ductular que se produce en la colestasis extrahepática corresponde a estadios finales de la metaplasia o desdiferenciación colangiocítica de los hepatocitos (Desmet, 2011a), lo cual induce la activación de células progenitoras existentes en el hígado, de células progenitoras formadas de novo en el hígado, o de ambas (Desmet, 2011b). En esencia, las reacciones ductulares hepáticas adoptan una configuración en "placa ductal". Las placas ductales son formas primitivas de conductos biliares

intra-hepáticos formados durante el desarrollo embriológico del hígado, y consisten en una doble luz perforada en forma de hendidura (Desmet, 2011a; Van Eyken et al., 1988).

La mayoría de las reacciones tisulares ocurren en forma de pequeñas o mini-placas ductales, formadas por un pequeño vaso sanguíneo central, rodeado por una pequeña cantidad de mesénquima derivado del espacio de Disse original, y por una doble capa de células epiteliales biliares que delimitan una hendidura luminal, circular, casi virtual, entre ambas capas. Frecuentemente, se observa una dilatación tubular en uno o más sitios a lo largo del perímetro luminal. Esta configuración corresponde a las placas ductales embrionarias con estructura en bicapa en un estadio precoz de remodelación (Desmet, 2011a). De hecho, la denominada metaplasia colangiocítica de los hepatocitos podría representar una desdiferenciación hacia tipos celulares más primitivos (Desmet et al., 1995). Este concepto de desdiferenciación es ratificado por diversos trabajos publicados en la literatura científica. La desdiferenciación de los hepatocitos es una consecuencia reversible de un proceso específico de señalización activado por la matriz extracelular (Godoy et al., 2009).

La reacción ductular de tipo I predomina tras la obstrucción aguda y total de la vía biliar que ocurre en la colestasis extrahepática microquirúrgica. Este tipo de reacción es el resultado de la proliferación de colangiocitos preexistentes, lo cual tiene como consecuencia la elongación, ramificación y la dilatación luminal de los conductos biliares (Desmet, 2011a). La elongación, dilatación y ramificación de los conductos biliares tras la obstrucción biliar y la inflamación subsiguiente adapta la estructura tridimensional de los conductos a la expansión del mesénquima portal causado por el edema y la inflamación (Desmet, 2011a). La reacción ductular tipo 2A ha sido interpretada como una “metaplasia ductular de los hepatocitos”, y conlleva un cambio en su polaridad secretora. Este tipo de reacción ductular se suele observar en las áreas periportales, y de forma característica, en las situaciones de colestasis crónica. Los hepatocitos colestásicos activan las células hepáticas estrelladas, que adquieren un fenotipo de miofibroblastos, responsables de un aumento de la producción de matriz de tejido conectivo. Estas reacciones ductulares de tipos 1 y 2A son reversibles cuando el proceso causante es eliminado, de tal forma que el exceso de estructuras tubulares neoformadas desaparecen por apoptosis, y la fibrosis asociada regresa considerablemente. Tal reversibilidad demuestra la asombrosa

plasticidad de tejidos y células (Desmet, 2011a). La reacción ductular de tipo 2A se desarrolla en ratas con colestasis extrahepática microquirúrgica de larga evolución, y se caracteriza por la formación de una excreción canalicular adicional y de una mayor superficie de reabsorción colangiocítica, lo cual favorece la recirculación cole-hepática en la colestasis crónica (Aller et al., 2008b; Desmet 2011a).

La reacción ductular de tipo 2A, que es la que ocurre en las ratas con colestasis extrahepática, presenta una configuración en placa ductal, y esta estructura podría ser similar a la del hígado embrionario, aunque en este caso correspondería a estadios finales de la desdiferenciación colangiocítica (Desmet, 2011a). Si esto fuera así, podríamos proponer que el tratamiento de ratas colestásicas con células madre de origen mesenquimal, al reducir la reacción ductular, activaría la diferenciación hepática, favoreciendo por tanto la especialización hepatocitaria.

El modelo microquirúrgico de colestasis extrahepática utilizado en este estudio experimental, podría ser de interés para el estudio de los mecanismos fisiopatológicos implicados en las malformaciones de las placas ductales en adultos, concretamente, en la fibrosis hepática congénita (Ma y Brunt, 2012). La fibrosis hepática congénita es un tipo de malformación de las placas ductales con características histológicas propias, como son la aberrante proliferación interlobular de conductillos biliares y la fibrosis periductal (Venkatanarasimha et al., 2011). La presencia de hipertensión portal y varices suelen ser los síntomas iniciales en la fibrosis hepática congénita. Aunque en la mayoría de los pacientes el diagnóstico se realiza durante la adolescencia o en la etapa adulta precoz, esta patología hepática también se puede manifestar en la infancia o en la quinta o sexta décadas de la vida (Venkatanarasimha et al., 2011; Ma y Brunt, 2012). Sin embargo, la hipotética capacidad de las células madre mesenquimales para revertir las alteraciones biliares características de la colestasis extra-hepática experimental y, consecuentemente, la patología asociada a las malformaciones de las placas ductales biliares, permite considerar su trasplante como una terapia eficaz para esta frecuente enfermedad (Erlinger 2011; Raynaud et al., 2011).

El mecanismo que podría estar implicado en el proceso de desdiferenciación inducido por las células madre mesenquimales en el hígado de

la rata colestásica, podría ser también similar al descrito durante las fases precoces del desarrollo embrionario. Los hepatocitos y los colangiocitos derivan ambos de unas células precursoras comunes presentes en el hígado embrionario, denominadas hepatoblastos. El hígado se desarrolla a partir de un divertículo derivado del endodermo ventral, que se extiende hacia el *septum transversum*, una estructura localizada entre las cavidades peritoneal y pericárdica (Lemaigre, 2009). El endodermo del intestino proximal ventral desarrolla dos protrusiones; la porción craneal dará lugar a los conductos biliares intrahepáticos, mientras que la porción caudal será el origen de la vía biliar extrahepática (Raynaud et al., 2011; Strazzabosco y Fabris, 2012).

Durante el desarrollo embrionario, una subpoblación de hepatoblastos se alinean en la región adyacente al mesénquima portal y empiezan a expresar diversos marcadores de origen biliar como SOX9, osteopontina y CK19 (Lemaigre, 2010). Esta lámina de células, conocida como placa ductal, constituye las estructuras ductales primitivas. Este proceso ocurre a través de un estadio intermedio en el cual las células de la placa ductal adoptan un patrón simétrico de expresión genética. Las células adyacentes a la vena porta expresan marcadores biliares, incluyendo SOX9, en tanto que las células adyacentes al parénquima expresan el marcador de hepatoblasto HNF4 α . Los hepatoblastos adyacentes al parénquima se diferencian hacia el linaje biliar y llegan a ser histológicamente indistinguibles de las células precursoras periportales localizadas en las estructuras ductulares neoformadas (Greenbaum, 2011). Las células de la placa ductal dan lugar a los hepatocitos periportales y a los colangiocitos que constituyen los conductos biliares interlobulares, los ductos intralobulares y los canales de Hering, pero no los hepatocitos pericentrales (Carpentier et al., 2011). Estos resultados proporcionan suficiente evidencia para afirmar que tanto las células biliares de los canales de Hering como las células ovals derivan de la placa ductal (Greenbaum, 2011; Carpentier et al., 2011). Por lo tanto, la placa ductal en el hígado embrionario da lugar a los colangiocitos que forman todos los segmentos de los conductos biliares intrahepáticos, así como a los hepatocitos periportales y a las células progenitoras hepáticas (Carpentier et al., 2011).

Se ha propuesto que la respuesta inflamatoria causante de patología fibrótica hepática es de naturaleza sistémica y estaría protagonizada por dos ejes funcionales de estirpe embriológica. Se re-expesaría en este supuesto un eje sistémico neurogénico, que incluiría alteraciones relacionadas con la recapitulación de funciones amnióticas. Esta respuesta neurogénica al estrés causa alteraciones hidroelectrolíticas y hemodinámicas, así como activa los sistemas hipotálamo-hipofisario-adrenocortical, simpático-medular adrenal y renina-angiotensina-aldosterona, con liberación de catecolaminas, glucocorticoides y mineralocorticoides. En consecuencia, estos mediadores se acumularían en el espacio intersticial hepático, produciendo un microambiente con características similares al propio de las fases embrionarias precoces. A su vez, se estimularía un eje sistémico relacionado con la actividad de la médula ósea, y con origen embriológico en el saco vitelino, que liberaría células madre hematopoyéticas y mesenquimales con destino al parénquima hepático lesionado. Los macrófagos y las células cebadas de origen medular óseo infiltrarían el tejido hepático e inducirían su fibrosis. Asimismo, la angiogénesis exacerbada por la isquemia tisular hepática favorecería la formación de nuevos vasos sanguíneos también implicados en la proliferación biliar y, por tanto, en la producción de hepatomegalia (Aller et al., 2012). Por último, la incidencia de ambos ejes inflamatorios en el parénquima hepático causarían su remodelación acorde con la agresión sufrida que, en este caso, es la colestasis extrahepática.

Según este concepto sistémico de la respuesta inflamatoria, en la colestasis extrahepática experimental el trasplante de células madre mesenquimales, al revertir parcialmente las alteraciones esplánicas, podría inhibir la recapitulación de los citados ejes patológicos de origen embrionario y, por lo tanto, su mecanismo de acción terapéutico, no solo sería local o paracrino sino también sistémico, esto es, endocrino.

Los resultados del presente estudio experimental permiten sugerir que el trasplante de las células madre mesenquimales derivadas de adipocitos en el hígado de ratas colestásicas podrían inducir un proceso de desdiferenciación similar al ocurrido durante el desarrollo embrionario.

Por consiguiente, los hepatocitos periportales podrían originarse a partir de una malformación de la placa ductal, esto es, de una reacción ductular secundaria a la obstrucción biliar que ocurre en colestasis. Por lo tanto, la función

de estos nuevos hepatocitos podría mitigar las complicaciones propias de la insuficiencia hepática colestásica. Además, éste mecanismo de regeneración hepática podrían reducir la intensidad de la respuesta inflamatoria esplácnica y sistémica, en cuyo caso también reduciría la hipertensión portal y el desarrollo de circulación colateral porto-sistémica en éste modelo experimental.

La relevancia del presente proyecto de investigación se fundamenta en la posible extrapolación de los resultados obtenidos a la clínica humana, en la cual la hipertensión portal y la cirrosis de diferentes etiologías, comportan una elevada morbi-mortalidad en la actualidad. En particular, el conocimiento de los mecanismos implicados en la etiopatogenia de la fibrosis asociada a la insuficiencia hepática crónica colestásica permitiría, tanto la profilaxis como el eficaz tratamiento de las complicaciones asociadas en éstos pacientes, entre las que destacan la encefalopatía hepática, varices esofágicas y el síndrome hepatorenal.

En conclusión, aunque los resultados terapéuticos de las células madre mesenquimales humanas 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.

VII. CONCLUSIONES

1. La colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata, según su estadio evolutivo, causa diferente grado de insuficiencia hepática crónica por fibrosis biliar. Así, a las ocho semanas de evolución la insuficiencia hepática es significativamente más severa que a las cinco semanas de evolución postoperatoria.

2. El tratamiento a las dos semanas de evolución de la colestasis con células madre mesenquimales de origen adipocítico prediferenciadas a hepatocitos, aunque no modifica el grado de insuficiencia hepática a las cinco semanas del postoperatorio, disminuye el desarrollo de circulación colateral porto-sistémica de tipos esplenorrenal y paraesofágica.

3. El tratamiento a las dos semanas del postoperatorio de la colestasis extrahepática microquirúrgica con células madre mesenquimales de origen adipocítico causa a las ocho semanas de evolución una disminución de la hepato-esplenomegalia y de la atrofia testicular asociadas a la disminución del volumen de líquido ascítico.

4. El estudio histológico a las ocho semanas de evolución postoperatoria de los hígados colestásicos en los animales que fueron tratados con células madre mesenquimales demuestra una disminución significativa del grado de fibrosis y de la proliferación ductular biliar, así como un aumento del área de hepatocitos. Esta disminución en la intensidad de los hallazgos histopatológicos asociados a la colestasis extrahepática se asocia con un menor grado de desestructuración hepática.

5. El conjunto de los hallazgos del presente trabajo experimental demuestran que el tratamiento con células madre de origen adipocítico prediferenciadas a hepatocitos revierte parcialmente la patología hepática crónica en el modelo de colestasis extrahepática microquirúrgica en la rata.

La relevancia del presente proyecto de investigación se fundamenta en la posible extrapolación de los resultados obtenidos a la clínica humana, en la cual la hipertensión portal y la cirrosis de diferentes etiologías, comportan una elevada morbi-mortalidad en la actualidad. En particular, el conocimiento de los

mecanismos implicados en la etiopatogenia de la fibrosis asociada a la insuficiencia hepática crónica colestásica permitiría, tanto la profilaxis como el eficaz tratamiento de las complicaciones asociadas en éstos pacientes, entre las que destacan la encefalopatía hepática, varices esofágicas y el síndrome hepatorenal.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007; 59: 75-86.
- Abdel Aziz MT, Atta HM, Mahfouz S, Fouad HH, Roshdy NK, Ahmed HH, Rashed LA, Sabry D, Hassouna AA, Hasan NM. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. *Clin Biochem.* 2007;40:893-9.
- 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.
- 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.
- 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.
- Adair-Kirk TL, Senior RM. Fragments of extracellular matrix as mediators of inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40:1101-10.
- Adams B, Xiao Q, Xu Q. Stem cell therapy for vascular disease. *Trends Cardiovasc Med.* 2007;17:246-51.
- Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005;105:1815-22.
- Aguena M, Fanganiello RD, Tissiani LA, Ishiy FA, Atique R, Alonso N, Passos-Bueno. Optimization of parameters for a more efficient use of adipose-derived stem cells in regenerative medicine therapies. *Stem Cells Int.* 2012; 2012: 303610.
- Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and

- provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med.* 1997; 185: 111-20.
- 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.
- Al Battah F, De Kock J, Vanhaecke T, Rogiers V. Current status of human adipose-derived stem cells: differentiation into hepatocyte-like cells. *The Scientific World Journal.* 2011;11:1568-81.
- 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; 1993, pp 283-315.
- Aller MA, Lorente I, Alonso MS, Rodriguez G, Arias J. Different types of response to hepatic arterial ischemia in rats with cholestasis. *Surg Res Comm* 1993a; 14: 269-280.
- Aller MA, Lorente L, Alonso MS, Arias J. A model of cholestasis in the rat, using a microsurgical technique. *Scand J Gastroenterol.* 1993b; 28: 10-14.
- 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.
- 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, Arias JL, García-Domínguez J, Arias JL, Durán M, Arias J. Experimental obstructive cholestasis: the wound-like inflammatory liver response. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2008a;1:6.
- 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* 2008b; 2: 71-7.
- 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 JL, 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 JL, Prieto I, Losada M, Arias J. Bile duct ligation: step-by-step to cholangiocyte inflammatory tumorigenesis. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2010b ;22:651-61.
- 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 Inflamm.* 2010c; 2010:148689.

- Aller MA, García-Domínguez J, Vergara P, Arias J. Mast cells in wound-healing cholestatic liver response. *Burns*. 2010d;36: 292-4.
- 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*. 2012; 21: 497-503.
- Almeida-Porada G, Porada CD, Tran N, Zanjani ED. Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. *Blood* 2000; 95: 3620-7.
- Alpini G, Lenzi R, Sarkozi L, Tavoloni N. Biliary physiology in rats with bile ductular cell hyperplasia. Evidence for a secretory function of proliferated bile ductules. *J Clin Invest*. 1988; 81: 569-78.
- Alpini G, Roberts S, Kuntz SM, Ueno Y, Gubba S, Podila PV, LeSage G, LaRusso NF. Morphological, molecular, and functional heterogeneity of cholangiocytes from normal rat liver. *Gastroenterology*. 1996; 110: 1636-43.
- Alpini G, Glaser S, Robertson W, Rodgers RE, Phinizy JL, Lasater J, LeSage GD. Large but not small intrahepatic bile ducts are involved in secretin-regulated ductal bile secretion. *Am J Physiol*. 1997; 272: G1064-74.
- Alpini G, Ueno Y, Glaser SS, Marzioni M, Phinizy JL, Francis H, Lesage G. Bile acid feeding increased proliferative activity and apical bile acid transporter expression in both small and large rat cholangiocytes. *Hepatology*. 2001; 34: 868-76.
- Alpini G, McGill JM, Larusso NF. The pathobiology of biliary epithelia. *Hepatology*. 2002; 35: 1256-68.
- Altman AM, Abdul Khalek FJ, Seidensticker M, Pinilla S, Yan Y, Coleman M, Song YH, Butler CE, Alt EU. Human tissue-resident stem cells combined with hyaluronic acid gel provide fibrovascular-integrated soft-tissue augmentation in a murine photoaged skin model. *Plast Reconstr Surg*. 2010; 125: 63-73.
- Altanerova V, Cihova M, Babic M, Rychly B, Ondicova K, Mravec B, Altaner C. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells expressing yeast cytosine deaminase: uracil phosphoribosyltransferase inhibit intracerebral rat glioblastoma. *Int J Cancer*. 2012; 130: 2455-63.

- Alvaro D, Alpini G, Jezequel AM, Bassotti C, Francia C, Fraioli F, Romeo R, Marucci L, Le Sage G, Glaser SS, Benedetti A. Role and mechanisms of action of acetylcholine in the regulation of rat cholangiocyte secretory functions. *J Clin Invest.* 1997; 100: 1349-62.
- Alvaro D, Mennone A, Boyer JL. Role of kinases and phosphatases in the regulation of fluid secretion and Cl⁻/HCO₃⁻ exchange in cholangiocytes. *Am J Physiol.* 1997; 273: G303-13.
- Anan A, Baskin-Bey ES, Isomoto H, Mott JL, Bronk SF, Albrecht JH, Gores GJ. Proteasome inhibition attenuates hepatic injury in the bile duct-ligated mouse. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006; 291: G709-1.
- 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. Zaragoza, 1993, pp 99-125.
- Arkadopoulos N, Lilja H, Suh KS, Demetriou AA, Rozga J. Intrasplenic transplantation of allogeneic hepatocytes prolongs survival in anhepatic rats. *Hepatology.* 1998; 28: 1365-70
- Arnalich-Montiel F, Pastor S, Blazquez-Martinez A, Fernandez-Delgado J, Nistal M, Alio JL, De Miguel MP. Adipose-derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma. *Stem Cells.* 2008; 26: 570-9.
- Arnalich Montiel, F. Terapia celular aplicada a la regeneración del estroma corneal: uso de las células madre de tejido adiposo en modelos experimentales. Tesis Doctoral, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, 2008.
- 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, 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. Bile duct ligation in rats: a reliable model of hepatorenal syndrome? *World J Gastroenterol.* 2009; 15: 121-3.
- 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.
- Au P, Tam J, Fukumura D, Jain RK. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. *Blood.* 2008;111: 4551-8.
- Aurich H, Sgodda M, Kaltwasser P, Vetter M, Weise A, Liehr T, Brulport M, Hengstler JG, Dollinger MM, Fleig WE, Christ B. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut.* 2009; 58: 570-81.
- Aurich I, Mueller LP, Aurich H, Luetzkendorf J, Tislijar K, Dollinger MM, Schormann W, Walldorf J, Hengstler JG, Fleig WE, Christ B. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut.* 2007; 56: 405-15.
- Azmaiparashvili E, Kordzaia D, Dzidziguri D. Biliary hypertension as the cell proliferation trigger in bile duct ligated rats. *Georgian Med News.* 2009: 111-6.
- Azouz A, Razzaque MS, El-Hallak M, Taguchi T. Immunoinflammatory responses and fibrogenesis. *Med Electron Microsc.* 2004; 37: 141-8.
- Baertschiger RM, Bosco D, Morel P, Serre-Beinier V, Berney T, Buhler LH, Gonelle-Gispert C. Mesenchymal stem cells derived from human exocrine pancreas express transcription factors implicated in beta-cell development. *Pancreas.* 2008; 37: 75-84.
- Bai X, Alt E. Myocardial regeneration potential of adipose tissue-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 401: 321-6
- Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 2004; 8: 301-16.

- 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, Quinn G, Okochi H, Ochiya T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology.* 2007a; 46: 219-28.
- Banas A, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T. Stem cell plasticity: learning from hepatogenic differentiation strategies. *Dev Dyn.* 2007b; 236: 3228-41.
- Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kawamata M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. *Stem Cells.* 2008; 26: 2705-12.
- 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.
- Barón V, Hernández J, Noyola M, Escalante B, Muriel P. Nitric oxide and inducible nitric oxide synthase expression are downregulated in acute cholestasis in the rat accompanied by liver ischemia. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2000; 127: 243-9.
- Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res.* 2001; 268: 189-200.
- Bartlett AH, Hayashida K, Park PW. Molecular and cellular mechanisms of syndecans in tissue injury and inflammation. *Mol Cells.* 2007; 24: 153-66.
- Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and prolong skin graft survival *in vivo*. *Exp Haematol* 2002; 30: 42-48.
- Bataller R, Sancho-Bru P, Ginès P, Lora JM, Al-Garawi A, Solé M, Colmenero J, Nicolás JM, Jiménez W, Weich N, Gutiérrez-Ramos JC, Arroyo V, Rodés J. Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II. *Gastroenterology.* 2003;125:117-25.

- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 2005; 115: 209-18.
- Beck PL, Lee SS. Vitamin K1 improves survival in bile-duct-ligated rats with cirrhosis. *J Hepatol.* 1995; 23: 235.
- Beeson W, Woods E, Agha R. Tissue engineering, regenerative medicine, and rejuvenation in 2010: the role of adipose-derived stem cells. *Facial Plast Surg.* 2011; 27: 378-87.
- Benedetti A, Bassotti C, Rapino K, Marucci L, Jezequel AM. A morphometric study of the epithelium lining the rat intrahepatic biliary tree. *J Hepatol.* 1996; 24: 335-42.
- Bergasa NV, Rothman RB, Vergalla J, Xu H, Swain MG, Jones EA. Central mu-opioid receptors are down-regulated in a rat model of cholestasis. *J Hepatol.* 1992; 15: 220-4.
- Bergasa NV, Alling DW, Talbot TL, Swain MG, Yurdaydin C, Turner ML, Schmitt JM, Walker EC, Jones EA. Effects of naloxone infusions in patients with the pruritus of cholestasis. A double-blind, randomized, controlled trial. *Ann Intern Med.* 1995a; 123: 161-7.
- Bergasa NV, Sabol SL, Young WS 3rd, Kleiner DE, Jones EA. Cholestasis is associated with preproenkephalin mRNA expression in the adult rat liver. *Am J Physiol.* 1995b; 268: G346-54.
- Bergheim I, Guo L, Davis MA, Lambert JC, Beier JI, Dubeau I, Luyendyk JP, Roth RA, Arteel GE. Metformin prevents alcohol-induced liver injury in the mouse: Critical role of plasminogen activator inhibitor-1. *Gastroenterology.* 2006; 130: 2099-112.
- 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; 70: F31-40.
- Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin Chem.* 1978; 24: 58-73.
- Bergmeyer HU, Hørder M. International federation of clinical chemistry. 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; 18: 521-34.
- Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol.* 1969; 43: 506-20.
- Beuers U, Hohenester S, de Buy Wenniger LJ, Kremer AE, Jansen PL, Elferink RP. The biliary HCO₃⁻ umbrella: a unifying hypothesis on pathogenetic and therapeutic aspects of fibrosing cholangiopathies. *Hepatology.* 2010 52: 1489-96.
- Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells.* 2004; 22: 625-34.
- Bischofs IB, Schwarz US. Cell organization in soft media due to active mechanosensing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 9274-9.
- 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.
- Blanco-Rivero J, Aller MA, Arias J, Ferrer M, Balfagón G. Long-term portal hypertension increases the vasodilator response to acetylcholine in rat aorta: role of prostaglandin I₂. *Clin Sci (Lond).* 2009;117: 365-74.
- Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006; 44: 215-30.
- Bolkenius U, Hahn D, Gressner AM, Breitkopf K, Dooley S, Wickert L. Glucocorticoids decrease the bioavailability of TGF-beta which leads to a reduced TGF-beta signaling in hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 325: 1264-70.
- Bomzon A, Gali D, Better OS, Blendis LM. Reversible suppression of the vascular contractile response in rats with obstructive jaundice. *J Lab Clin Med.* 1985; 105: 568-72.
- Bomzon A, Blendis LM. Vascular reactivity in experimental portal hypertension. *Am J Physiol.* 1987 ;252: G158-62
- Bonab MM, Sahraian MA, Aghsaie A, Karvigh SA, Hosseinian SM, Nikbin B, Lotfi J, Khorramnia S, Motamed MR, Togha M, Harirchian MH, Moghadam

- NB, Alikhani K, Yadegari S, Jafarian S, Gheini MR. Autologous mesenchymal stem cell therapy in progressive multiple sclerosis: an open label study. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2012; 7: 407-14.
- Bosch J, Pizcueta P, Feu F, Fernández M, García-Pagán JC. Pathophysiology of portal hypertension. *Gastroenterol Clin North Am.* 1992; 21: 1-14.
- Bossard P, Zaret KS. GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation. *Development.* 1998; 125: 4909-17.
- Boulter L, Govaere O, Bird TG, Radulescu S, Ramachandran P, Pellicoro A, Ridgway RA, Seo SS, Spee B, Van Rooijen N, Sansom OJ, Iredale JP, Lowell S, Roskams T, Forbes SJ. Macrophage-derived Wnt opposes Notch signaling to specify hepatic progenitor cell fate in chronic liver disease. *Nat Med.* 2012; 18: 572-9.
- Boyer JL. New perspectives for the treatment of cholestasis: lessons from basic science applied clinically. *J Hepatol.* 2007; 46: 365-71.
- Boyer JL. It's all about bile. *Hepatology.* 2009; 49:711-23.
- Branski LK, Gauglitz GG, Herndon DN, Jeschke MG. A review of gene and stem cell therapy in cutaneous wound healing. *Burns.* 2009; 35: 171-80.
- Bridle KR, Popa C, Morgan ML, Sobbe AL, Clouston AD, Fletcher LM, Crawford DH. Rapamycin inhibits hepatic fibrosis in rats by attenuating multiple profibrogenic pathways. *Liver Transpl.* 2009; 15: 1315-24.
- Britton RS, Bacon BR. Role of free radicals in liver diseases and hepatic fibrosis. *Hepatogastroenterology.* 1994; 41: 343-8.
- 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.
- Brzoska M, Geiger H, Gauer S, Baer P. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 330: 142-50.
- Bulmer AC, Ried K, Coombes JS, Blanchfield JT, Toth I, Wagner KH. The anti-mutagenic and antioxidant effects of bile pigments in the Ames Salmonella test. *Mutat Res.* 2007; 629: 122-32.

- Burchfield JS, Dimmeler S. Role of paracrine factors in stem and progenitor cell mediated cardiac repair and tissue fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2008;1:4.
- Burke ZD, Tosh D. Ontogenesis of hepatic and pancreatic stem cells. *Stem Cell Rev*. 2012; 8: 586-96.
- Burra P, Tomat S, Villa E, Gasbarrini A, Costa AN, Conconi MT, Forbes SJ, Farinati F, Cozzi E, Alison MR, Russo FP; Italian Association for the Study of the Liver (AISF). Experimental hepatology applied to stem cells. *Dig Liver Dis*. 2008; 40: 54-61.
- Butcher MJ, Galkina EV. Phenotypic and functional heterogeneity of macrophages and dendritic cell subsets in the healthy and atherosclerosis-prone aorta. *Front Physiol*. 2012; 3: 44.
- Butterworth RF, Lalonde R, Power C, Baker GB, Gamrani H, Ahboucha S. Dehydroepiandrosterone sulphate improves cholestasis-associated fatigue in bile duct ligated rats. *Neurogastroenterol Motil*. 2009; 21: 1319-25.
- Cai J, Ito M, Nagata H, Westerman KA, Lafleur D, Chowdhury JR, Leboulch P, Fox IJ. Treatment of liver failure in rats with end-stage cirrhosis by transplantation of immortalized hepatocytes. *Hepatology*. 2002; 36: 386-94
- Cai J, Zhao Y, Liu Y, Ye F, Song Z, Qin H, Meng S, Chen Y, Zhou R, Song X, Guo Y, Ding M, Deng H. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology*. 2007; 45: 1229-39.
- Caplan AI. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell*. 2008; 3: 229-3.
- 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, Higuchi H, Bronk SF, Taniai M, Sebo TJ, Gores GJ. Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology*. 2002; 123: 1323-30.
- Cantor JO, Nadkarni PP. Hyaluronan: the Jekyll and Hyde molecule. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2006; 5: 257-60.
- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003; 9: 653-60.

- Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2011; 10:417-27.
- Carpentier R, Suñer RE, van Hul N, Kopp JL, Beaudry JB, Cordi S, Antoniou A, Raynaud P, Lepreux S, Jacquemin P, Leclercq IA, Sander M, Lemaigre FP. Embryonic ductal plate cells give rise to cholangiocytes, periportal hepatocytes, and adult liver progenitor cells. *Gastroenterology.* 2011; 141: 1432-8.
- Casiraghi F, Perico N, Remuzzi G. Mesenchymal stromal cells to promote solid organ transplantation tolerance. *Curr Opin Organ Transplant.* 2013; 18: 51-8.
- Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, Deneef C, Roskams T. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. *J Hepatol.* 2002; 36: 200-9.
- Castaing D, Houssin D, Bismuth H. Anatomy of the liver and portal system of the rat. En: *Hepatic and portal surgery of the rat.* Edit. Masson. Paris, 1980, pp 27-46.
- 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; 31: 581-6.
- Castaño AP, Lin SL, Surowy T, Nowlin BT, Turlapati SA, Patel T, Singh A, Li S, Lupher ML Jr, Duffield JS. Serum amyloid P inhibits fibrosis through Fc gamma R-dependent monocyte-macrophage regulation in vivo. *Sci Transl Med.* 2009; 1: 5ra13.
- Chagraoui J, Lepage-Noll A, Anjo A, Uzan G, Charbord P. Fetal liver stroma consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition. *Blood.* 2003; 101: 2973-82
- 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.
- Chen YT, Yang CC, Zhen YY, Wallace CG, Yang JL, Sun CK, Tsai TH, Sheu JJ, Chua S, Chang CL, Cho CL, Leu S, Yip HK. Cyclosporine-assisted adipose-

- derived mesenchymal stem cell therapy to mitigate acute kidney ischemia-reperfusion injury. *Stem Cell Res Ther.* 2013; 4: 62.
- 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.
- Cheng K, Yang N, Mahato RI. TGF-beta1 gene silencing for treating liver fibrosis. *Mol Pharm.* 2009; 6: 772-9.
- Cho JJ, Hocher B, Herbst H, Jia JD, Ruehl M, Hahn EG, Riecken EO, Schuppan D. An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis. *Gastroenterology.* 2000;118:1169-78.
- Choi EW, Shin IS, Lee HW, Park SY, Park JH, Nam MH, Kim JS, Woo SK, Yoon EJ, Kang SK, Ra JC, Youn HY, Hong SH. Transplantation of CTLA4Ig gene-transduced adipose tissue-derived mesenchymal stem cells reduces inflammatory immune response and improves Th1/Th2 balance in experimental autoimmune thyroiditis. *J Gene Med.* 2011; 13: 3-1
- Choi SS, Diehl AM. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver. *Hepatology.* 2009; 50: 2007-13.
- Choi SS, Syn WK, Karaca GF, Omenetti A, Moylan CA, Witek RP, Agboola KM, Jung Y, Michelotti GA, Diehl AM. Leptin promotes the myofibroblastic phenotype in hepatic stellate cells by activating the hedgehog pathway. *J Biol Chem.* 2010; 285: 36551-60.
- Christ B, Stock P. Mesenchymal stem cell-derived hepatocytes for functional liver replacement. *Front Immunol.* 2012; 3: 168.
- Chu D, Adler DG. Malignant biliary tract obstruction: evaluation and therapy. *J Natl Compr Canc Netw.* 2010; 8: 1033-44.
- Chuang YH, Lian ZX, Tsuneyama K, Chiang BL, Ansari AA, Coppel RL, Gershwin ME. Increased killing activity and decreased cytokine production in NK cells in patients with primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun.* 2006; 26: 232-40
- Clements WD, Parks R, Erwin P, Halliday MI, Barr J, Rowlands BJ. Role of the gut in the pathophysiology of extrahepatic biliary obstruction. *Gut.* 1996; 39: 587-93.

- Clements WD, Erwin P, McCaigue MD, Halliday I, Barclay GR, Rowlands BJ. Conclusive evidence of endotoxaemia in biliary obstruction. *Gut*. 1998; 42: 293-9.
- Cohen-Naftaly M, Friedman SL. Current status of novel antifibrotic therapies in patients with chronic liver disease. *Therap Adv Gastroenterol*. 2011; 4: 391-417.
- Collardeau-Frachon S, Scoazec JY. Vascular development and differentiation during human liver organogenesis. *Anat Rec (Hoboken)*. 2008;291:614-27.
- Collier JD, Ninkovic M, Compston JE. Guidelines on the management of osteoporosis associated with chronic liver disease. *Gut*. 2002; 50 Suppl 1: i1-9.
- Constantin G, Marconi S, Rossi B, Angiari S, Calderan L, Anghileri E, Gini B, Bach SD, Martinello M, Bifari F, Galiè M, Turano E, Budui S, Sbarbati A, Krampera M, Bonetti B. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells*. 2009; 27: 2624-35.
- Cook JGH. Creatinine assay in the presence of protein. *Clin Chim Acta*. 1971; 32: 485-6.
- Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006; 107: 367-72.
- 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.
- Corren J, Lemanske RF, Hanania NA, Korenblat PE, Parsey MV, Arron JR, Harris JM, Scheerens H, Wu LC, Su Z, Mosesova S, Eisner MD, Bohen SP, Matthews JG. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. *N Engl J Med*. 2011; 365: 1088-98.
- Costa AM, Tuchweber B, Lamireau T, Yousef IM, Balabaud C, Rosenbaum J, Desmoulière A. Role of apoptosis in the remodeling of cholestatic liver injury following release of the mechanical stress. *Virchows Arch*. 2003; 442: 372-80.

- Costa RH, Kalinichenko VV, Holterman AX, Wang X. Transcription factors in liver development, differentiation, and regeneration. *Hepatology*. 2003; 38: 1331-47.
- Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science*. 1996; 274: 1379-83.
- Crisostomo PR, Markel TA, Wang Y, Meldrum DR. Surgically relevant aspects of stem cell paracrine effects. *Surgery*. 2008; 143: 577-81.
- Cuenca J, Martín-Sanz P, Alvarez-Barrientos AM, Boscá L, Goren N. Infiltration of inflammatory cells plays an important role in matrix metalloproteinase expression and activation in the heart during sepsis. *Am J Pathol*. 2006; 169: 1567-76.
- Cui L, Yin S, Liu W, Li N, Zhang W, Cao Y. Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2. *Tissue Eng*. 2007; 13: 1185-95.
- Cunningham M, Gilkeson G. Estrogen receptors in immunity and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011; 40: 66-73.
- Da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006;119:2204-13.
- Dai LJ, Moniri MR, Zeng ZR, Zhou JX, Rayat J, Warnock GL. Potential implications of mesenchymal stem cells in cancer therapy. *Cancer Lett*. 2011; 305: 8-20.
- Dalal J, Gandy K, Domen J. Role of mesenchymal stem cell therapy in Crohn's disease. *Pediatr Res*. 2012; 71: 445-51.
- Davis GE. Angiogenesis and Proteinases: Influence on Vascular Morphogenesis, Stabilization and Regression. *Drug Discov Today Dis Models*. 2011; 8: 13-20.
- Davit-Spraul A, Gonzales E, Baussan C, Jacquemin E. The spectrum of liver diseases related to ABCB4 gene mutations: pathophysiology and clinical aspects. *Semin Liver Dis* 2010; 30: 134-146.

- Day AJ, de la Motte CA. Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation? *Trends Immunol.* 2005; 26: 637-43.
- 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.
- Dazzi F, Krampera M. Mesenchymal stem cells and autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011; 24: 49-57.
- Deitch EA, Sittig K, Li M, Berg R, Specian RD. Obstructive jaundice promotes bacterial translocation from the gut. *Am J Surg.* 1990; 15: 79-84.
- De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1928-42.
- De Falco E, Porcelli D, Torella AR, Straino S, Iachininoto MG, Orlandi A, Truffa S, Biglioli P, Napolitano M, Capogrossi MC, Pesce M. SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells. *Blood.* 2004; 104: 3472-82.
- De Miguel MP. Biología de las Células Madre: preguntas y respuestas. En: Células madre de cordón umbilical y Medicina Regenerativa. CEU Ediciones, 2008, capítulo 2, pp: 37-54.
- De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Alcaina Y. Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. *Stem Cell Rev.* 2010; 6: 633-49.
- De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Blázquez-Martínez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J, Arnalich-Montiel F. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med.* 2012; 12: 574-91.
- De Minicis S, Candelaresi C, Marzioni M, Saccomano S, Roskams T, Casini A, Risaliti A, Salzano R, Cautero N, di Francesco F, Benedetti A, Svegliati-Baroni G. Role of endogenous opioids in modulating HSC activity in vitro and liver fibrosis in vivo. *Gut.* 2008; 57: 352-64.
- De Santiago J, Bare DJ, Semenov I, Minshall RD, Geenen DL, Wolska BM, Banach K. Excitation-contraction coupling in ventricular myocytes is

- enhanced by paracrine signaling from mesenchymal stem cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2012; 52:1 249-56.
- 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.
- De Vriese AS, Tilton RG, Mortier S, Lameire NH. Myofibroblast transdifferentiation of mesothelial cells is mediated by RAGE and contributes to peritoneal fibrosis in uraemia. *Nephrol Dial Transplant.* 2006; 21: 2549-55.
- 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.
- Desmet V, Roskams T, Van Eyken P. Ductular reaction in the liver. *Pathol Res Pract.* 1995;191: 513-24.
- Desmet VJ, Roskams T. Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth. *J Hepatol.* 2004; 40: 860-7.
- 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.
- Detante O, Moisan A, Dimastromatteo J, Richard MJ, Riou L, Grillon E, Barbier E, Desruet MD, De Fraipont F, Segebarth C, Jaillard A, Hommel M, Ghezzi C, Remy C. Intravenous administration of ^{99m}Tc-HMPAO-labeled human mesenchymal stem cells after stroke: in vivo imaging and biodistribution. *Cell Transplant.* 2009; 18: 1369-79.

- Deveaux V, Cadoudal T, Ichigotani Y, Teixeira-Clerc F, Louvet A, Manin S, Nhieu JT, Belot MP, Zimmer A, Even P, Cani PD, Knauf C, Burcelin R, Bertola A, Le Marchand-Brustel Y, Gual P, Mallat A, Lotersztajn S. Cannabinoid CB2 receptor potentiates obesity-associated inflammation, insulin resistance and hepatic steatosis. *PLoS One*. 2009;4:e5844.
- Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* 2003; 101: 2999-3001.
- Dhanasekaran M, Indumathi S, Poojitha R, Kanmani A, Rajkumar JS, Sudarsanam D. Plasticity and banking potential of cultured adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Bank*. 2013; 14: 303-15.
- Dhawan A, Puppi J, Hughes RD, Mitry RR. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010; 7: 288-98.
- Di Bonzo LV, Ferrero I, Cravanzola C, Mareschi K, Rustichell D, Novo E, Sanavio F, Cannito S, Zamara E, Bertero M, Davit A, Francica S, Novelli F, Colombatto S, Fagioli F, Parola M. Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential. *Gut*. 2008; 57: 223-31.
- Díaz R, Kim JW, Hui JJ, Li Z, Swain GP, Fong KS, Csiszar K, Russo PA, Rand EB, Furth EE, Wells RG. Evidence for the epithelial to mesenchymal transition in biliary atresia fibrosis. *Hum Pathol*. 2008; 39: 102-15.
- 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 AM. Neighborhood watch orchestrates liver regeneration. *Nat Med*. 2012; 18: 497-9.
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or non specific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99: 3838-43.

- Dixon JB, Bhathal PS, Hughes NR, O'Brien PE. Nonalcoholic fatty liver disease: Improvement in liver histological analysis with weight loss. *Hepatology*. 2004; 39: 1647-54.
- Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noël D, Jorgensen C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 2003a; 102: 3837-44.
- Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, Cantos C, Jorgensen C, Noël D. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells*. 2007b; 25: 2025-32.
- 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.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8: 315-7.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Swearingen M, Myint H, Rich E, Martinson J, Klingemann H. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2008; 8: 15-7.
- Dominici M, Paolucci P, Conte P, Horwitz EM. Heterogeneity of multipotent mesenchymal stromal cells: from stromal cells to stem cells and viceversa. *Transplantation* 2009; 87: S36-S42.
- Donahower BC, McCullough SS, Hennings L, Simpson PM, Stowe CD, Saad AG, Kurten RC, Hinson JA, James LP. Human recombinant vascular endothelial growth factor reduces necrosis and enhances hepatocyte regeneration in a mouse model of acetaminophen toxicity. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010; 334: 33-43.
- Donato MT, Jiménez N, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells

- expressing individual human P450 enzymes. *Drug Metab Dispos.* 2004 ;32:699-706.
- Donato MT, Serralta A, Jiménez N, Pérez G, Castell JV, Mir J, Gómez-Lechón MJ. Liver grafts preserved in Celsior solution as source of hepatocytes for drug metabolism studies: comparison with surgical liver biopsies. *Drug Metab Dispos.* 2005; 33: 108-14.
- 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 estandars and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 1971;31: 87-96.
- Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Lang R, Iredale JP. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest.* 2005; 115: 56-65.
- Duijvestein M, Vos AC, Roelofs H, Wildenberg ME, Wendrich BB, Verspaget HW, Kooy-Winkelaar EM, Koning F, Zwaginga JJ, Fidder HH, Verhaar AP, Fibbe WE, van den Brink GR, Hommes DW. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut.* 2010 ; 59: 1662-9.
- Duncan AW, Dorrell C, Grompe M. Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology.* 2009; 137: 466-81.
- Ebrahimkhani MR, Kiani S, Oakley F, Kendall T, Shariftabrizi A, Tavangar SM, Moezi L, Payabvash S, Karoon A, Hoseininik H, Mann DA, Moore KP, Mani AR, Dehpour AR. Naltrexone, an opioid receptor antagonist, attenuates liver fibrosis in bile duct ligated rats. *Gut.* 2006; 55: 1606-16.
- Eckersley-Maslin MA, Warner FJ, Grzelak CA, McCaughan GW, Shackel NA. Bone marrow stem cells and the liver: are they relevant? *J Gastroenterol Hepatol.* 2009; 24: 1608-16.
- Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol.* 2006; 80: 1298-307.

- Eggenhofer G, Steinmann JF, Renner P, Slowik P, Piso P, Geissler EK, Schlitt HJ, Dahlke MH, Popp FC. Mesenchymal stem cells together with mycophenolate mofetil inhibit antigen presenting cell and T cell infiltration into allogeneic heart grafts. *Transpl Immunol* 2011; 24: 157-163.
- Ellis EL, Mann DA. Clinical evidence for the regression of liver fibrosis. *J Hepatol*. 2012; 56: 1171-80.
- Ekert JE, Murray LA, Das AM, Sheng H, Giles-Komar J, Rycyzyn MA. Chemokine (C-C motif) ligand 2 mediates direct and indirect fibrotic responses in human and murine cultured fibrocytes. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2011; 4: 23.
- El-Ansary M, Abdel-Aziz I, Mogawer S, Abdel-Hamid S, Hammam O, Teaema S, Wahdan M. Phase II trial: undifferentiated versus differentiated autologous mesenchymal stem cells transplantation in Egyptian patients with HCV induced liver cirrhosis. *Stem Cell Rev*. 2012; 8: 972-81.
- English K, French A, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation? *Cell Stem Cell* 2010; 7: 431-42
- English K, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells in transplantation rejection and tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013; 3
- Enosawa S, Hirasawa K. Sex-associated differences in the survival of skin grafts in rats. Enhancement of cyclosporine immunosuppression in male compared with female recipients. *Transplantation*. 1989; 47:933-7.
- Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000; 109: 235-42.
- Erlinger S. Ductal plate malformations: a morphogenetic classification based on genetic defects. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2011; 35: 604-6.
- 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.
- Esteller A. Physiology of bile secretion. *World J Gastroenterol*. 2008; 14: 5641-9.
- Evanko SP, Tammi MI, Tammi RH, Wight TN. Hyaluronan-dependent pericellular matrix. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007; 59: 1351-65.
- Ezquer F, Ezquer M, Contador D, Ricca M, Simon V, Conget P. The antidiabetic effect of mesenchymal stem cells is unrelated to their transdifferentiation

- potential but to their capability to restore Th1/Th2 balance and to modify the pancreatic microenvironment. *Stem Cells*. 2012; 30: 1664-74.
- Fan X, Gay FP, Ong SY, Ang JM, Chu PP, Bari S, Lim TK, Hwang WY. Mesenchymal stromal cell supported umbilical cord blood ex vivo expansion enhances regulatory T cells and reduces graft versus host disease. *Cytotherapy*. 2013; 15: 610-9.
- Fang B, Song YP, Liao LM, Han Q, Zhao RC. Treatment of severe therapy-resistant acute graft-versus-host disease with human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplant*. 2006; 38: 389-90.
- Fang B, Song Y, Liao L, Zhang Y, Zhao RC. Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Transplant Proc*. 2007; 39: 3358-62.
- Farrell DJ, Hines JE, Walls AF, Kelly PJ, Bennett MK, Burt AD. Intrahepatic mast cells in chronic liver diseases. *Hepatology*. 1995; 22: 1175-81.
- Feingold KR, Soued M, Adi S, Staprans I, Shigenaga J, Doerrler W, Moser A, Grunfeld C. Tumor necrosis factor-increased hepatic very-low-density lipoprotein production and increased serum triglyceride levels in diabetic rats. *Diabetes*.; 39: 1569-74.
- Fernández C, Martín M, Gómez-Coronado D, Lasunción MA. Effects of distal cholesterol biosynthesis inhibitors on cell proliferation and cell cycle progression. *J Lipid Res*. 2005; 46: 920-9.
- 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.
- 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.
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998; 279: 1528-30.

- Fickert P, Fuchsbichler A, Wagner M, Silbert D, Zatloukal K, Denk H, Trauner M. The role of the hepatocyte cyokeratin network in bile formation and resistance to bile acid challenge and cholestasis in mice. *Hepatology*. 2009; 50: 893-9.
- Fiorotto R, Spirlì C, Fabris L, Cadamuro M, Okolicsanyi L, Strazzabosco M. Ursodeoxycholic acid stimulates cholangiocyte fluid secretion in mice via CFTR-dependent ATP secretion. *Gastroenterology*. 2007; 133: 1603-13.
- Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Severino B, Fiorentina R, Baldoni M, Caliendo G, Santagada V, Morelli A, Cirino G. PAR1 antagonism protects against experimental liver fibrosis. Role of proteinase receptors in stellate cell activation. *Hepatology*. 2004; 39: 365-75.
- Fiorucci S, Antonelli E, Rizzo G, Renga B, Mencarelli A, Riccardi L, Orlandi S, Pellicciari R, Morelli A. The nuclear receptor SHP mediates inhibition of hepatic stellate cells by FXR and protects against liver fibrosis. *Gastroenterology*. 2004;127:1497-512.
- Fiorucci S, Rizzo G, Antonelli E, Renga B, Mencarelli A, Riccardi L, Orlandi S, Pruzanski M, Morelli A, Pellicciari R. A farnesoid x receptor-small heterodimer partner regulatory cascade modulates tissue metalloproteinase inhibitor-1 and matrix metalloprotease expression in hepatic stellate cells and promotes resolution of liver fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;314:584-95.
- Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation*. 2006; 82: 441-9.
- Folin O. Beitrag zur chemie des kreatinins und kreatins im hame. *Physiol Chem*. 1904; 41: 223-42.
- Fong GH. Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia. *Angiogenesis*. 2008;11:21-40.
- Fontana L, Vinciguerra M, Longo VD. Growth factors, nutrient signaling, and cardiovascular aging. *Circ Res*. 2012; 110: 1139-50.
- Foresta C, Schipilliti M, Ciarleglio FA, Lenzi A, D'Amico D. Male hypogonadism in cirrhosis and after liver transplantation. *J Endocrinol Invest*. 2008; 31: 470-8.
- Fragiadaki M, Mason RM. Epithelial-mesenchymal transition in renal fibrosis - evidence for and against. *Int J Exp Pathol*. 2011; 92: 143-50.

- 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.
- Francis H, Meininger CJ. A review of mast cells and liver disease: What have we learned? *Dig Liver Dis.* 2010; 42: 529-36.
- Freedman ND, Everhart JE, Lindsay KL, Ghany MG, Curto TM, Shiffman ML, Lee WM, Lok AS, Di Bisceglie AM, Bonkovsky HL, Hoefs JC, Dienstag JL, Morishima C, Abnet CC, Sinha R; HALT-C Trial Group. Coffee intake is associated with lower rates of liver disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2009;50:1360-9.
- Freytes DO, Kang JW, Marcos-Campos I, Vunjak-Novakovic G. Macrophages modulate the viability and growth of human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2013; 114: 220-9.
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976; 4: 267-74.
- Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissell DM. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985; 82: 8681-5.
- Friedman SL, Rockey DC, Bissell DM. Hepatic fibrosis 2006: report of the Third AASLD Single Topic Conference. *Hepatology.* 2007; 45: 242-9.
- Friedman SL. Hepatic fibrosis -- overview. *Toxicology.* 2008; 254: 120-9.
- 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. Fibrogenic cell reversion underlies fibrosis regression in liver. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109: 9230-1.
- Fujimiya T, Liu J, Kojima H, Shirafuji S, Kimura H, Fujimiya M. Pathological roles of bone marrow-derived stellate cells in a mouse model of alcohol-induced fatty liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009; 297: G451-60.

- Galli A, Crabb DW, Ceni E, Salzano R, Mello T, Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Trozzi L, Surrenti C, Casini A. Antidiabetic thiazolidinediones inhibit collagen synthesis and hepatic stellate cell activation in vivo and in vitro. *Gastroenterology*. 2002; 122: 1924-40.
- Gao B, Radaeva S, Park O. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. *J Leukoc Biol*. 2009; 86: 513-28.
- García-Domínguez 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, Albillos A, Barden GE, West AB. Bacterial translocation in acute and chronic portal hypertension. *Hepatology*. 1993; 17: 1081-5.
- García-Tsao G, Wiest R. Gut microflora in the pathogenesis of the complications of cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004; 18: 353-72.
- Gartung C, Ananthanarayanan M, Rahman MA, Schuele S, Nundy S, Soroka CJ, Stolz A, Suchy FJ, Boyer JL. Down-regulation of expression and function of the rat liver Na⁺/bile acid cotransporter in extrahepatic cholestasis. *Gastroenterology*. 1996; 110: 199-209.
- 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, Barbaro B, Alvaro D, Glaser S, Francis H, Ueno Y, Meininger CJ, Franchitto A, Onori P, Marziani 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*. 2006; 130: 1270-82.
- 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 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.
- Gehring S, Dickson EM, San Martin ME, van Rooijen N, Papa EF, Harty MW, Tracy TF Jr, Gregory SH. Kupffer cells abrogate cholestatic liver injury in mice. *Gastroenterology*. 2006; 130: 810-22.
- Gelfand EV, Cannon CP. Rimonabant: a cannabinoid receptor type 1 blocker for management of multiple cardiometabolic risk factors. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 47: 1919-26
- George J, Roulot D, Koteliansky VE, Bissell DM. In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor beta type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 ; 96: 12719-24.
- 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.
- Gilchrist ES, Plevris JN. Bone marrow-derived stem cells in liver repair: 10 years down the line. *Liver Transpl*. 2010; 16: 118-29.
- Gilliver SC. Sex steroids as inflammatory regulators. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010; 120: 105-15.

- Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*. 2003 ; 5: 362-9.
- Gjorgieva D, Zaidman N, Bosnakovski D. Mesenchymal Stem Cells for Anti-Cancer Drug Delivery. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2013. [Epub ahead of print].
- Glaser S, Francis H, Demorrow S, Lesage G, Fava G, Marzioni M, Venter J, Alpini G. Heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *World J Gastroenterol*. 2006; 12: 3523-36.
- 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 regulation of cholangiocyte proliferation and function during extrahepatic cholestasis. *Dig Liver Dis*. 2010; 42: 245-52.
- 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.
- Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 2005;105: 2821-7.
- Godoy P, Hengstler JG, Ilkavets I, Meyer C, Bachmann A, Müller A, Tuschl G, Mueller SO, Dooley S. Extracellular matrix modulates sensitivity of hepatocytes to fibroblastoid dedifferentiation and transforming growth factor beta-induced apoptosis. *Hepatology*. 2009; 49: 2031-43.
- Goedeke L, Fernández-Hernando C. Regulation of cholesterol homeostasis. *Cell Mol Life Sci*. 2012; 69: 915-30.
- Gómez-Lechón MJ, Serralta A, Donato MT, Jiménez N, O'connor E, Castell JV, Mir J. The immunosuppressant drug FK506 prevents Fas-induced apoptosis in human hepatocytes. *Biochem Pharmacol*. 2004; 68:2 427-33.

- González MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Büscher D, Delgado M. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis Rheum.* 2009; 60: 1006-19.
- Gonzalez SA, Fiel MI, Sauk J, Cancchis PW, Liu RC, Chiriboga L, Yee HT, Jacobson IM, Talal AH. Inverse association between hepatic stellate cell apoptosis and fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat.* 2009; 16:141-8.
- Gonzalez-Rey E, Anderson P, González MA, Rico L, Büscher D, Delgado M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut.* 2009; 58: 929-39.
- Gonzalo T, Beljaars L, van de Bovenkamp M, Temming K, van Loenen AM, Reker-Smit C, Meijer DK, Lacombe M, Opdam F, Kéri G, Orfi L, Poelstra K, Kok RJ. Local inhibition of liver fibrosis by specific delivery of a platelet-derived growth factor kinase inhibitor to hepatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007 ;321:856-65.
- Granero-Molto F, Weis JA, Longobardi L, Spagnoli A. Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: application to bone and cartilage repair. *Expert Opin Biol Ther.* 2008; 8: 255-68.
- Green J, Better OS. Systemic hypotension and renal failure in obstructive jaundice-mechanistic and therapeutic aspects. *J Am Soc Nephrol.* 1995; 5: 1853-71.
- Greenbaum LE. The ductal plate: a source of progenitors and hepatocytes in the adult liver. *Gastroenterology.* 2011;141: 1152-5.
- Gressner OA, Lahme B, Demirci I, Gressner AM, Weiskirchen R. Differential effects of TGF-beta on connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) expression in hepatic stellate cells and hepatocytes. *J Hepatol.* 2007; 47: 699-710.
- Gressner OA, Lahme B, Rehbein K, Siluschek M, Weiskirchen R, Gressner AM. Pharmacological application of caffeine inhibits TGF-beta-stimulated connective tissue growth factor expression in hepatocytes via PPARgamma and SMAD2/3-dependent pathways. *J Hepatol.* 2008; 49: 758-67.

- Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol.* 1988; 106: 2139-51.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13625-30.
- Gronthos S, Simmons PJ, Graves SE, Robey PG. Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone.* 2001; 28: 174-81.
- Gruber R, Kandler B, Holzmann P, Vögele-Kadletz M, Losert U, Fischer MB, Watzek G. Bone marrow stromal cells can provide a local environment that favors migration and formation of tubular structures of endothelial cells. *Tissue Eng.* 2005; 11: 896-903.
- Guilak F, Lott KE, Awad HA, Cao Q, Hicok KC, Fermor B, Gimble JM. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol.* 2006; 206: 229-37.
- 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.
- Guo CJ, Pan Q, Cheng T, Jiang B, Chen GY, Li DG. Changes in microRNAs associated with hepatic stellate cell activation status identify signaling pathways. *FEBS J.* 2009; 276 : 5163-76.
- Guo J, Lin GS, Bao CY, Hu ZM, Hu MY. Anti-inflammation role for mesenchymal stem cells transplantation in myocardial infarction. *Inflammation.* 2007; 30: 97-104.
- Gupta S, Rajvanshi P, Sokhi R, et al. Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium. *Hepatology* 1999; 29: 509-519.
- Gustafson EK, Elgue G, Hughes RD, Mitry RR, Sanchez J, Haglund U, Meurling S, Dhawan A, Korsgren O, Nilsson B. The instant blood-mediated inflammatory reaction characterized in hepatocyte transplantation. *Transplantation* 2011; 91:632-8.

- 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.
- Hammel P, Couvelard A, O'Toole D, Ratouis A, Sauvanet A, Fléjou JF, Degott C, Belghiti J, Bernades P, Valla D, Ruszniewski P, Lévy P. Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *N Engl J Med.* 2001; 344: 418-23.
- Hanson SE, Bentz ML, Hematti P. Mesenchymal stem cell therapy for nonhealing cutaneous wounds. *Plast Reconstr Surg.* 2010; 125: 510-6.
- Harada Y, Yamamoto Y, Tsujimoto S, Matsugami H, Yoshida A, Hisatome I. Transplantation of freshly isolated adipose tissue-derived regenerative cells enhances angiogenesis in a murine model of hind limb ischemia. *Biomed Res.* 2013; 34: 23-9.
- Haridass D, Narain N, Ott M. Hepatocyte transplantation: waiting for stem cells. *Curr Opin Organ Transplant.* 2008; 13: 627-32.
- Harn HJ, Lin SZ, Hung SH, Subeq YM, Li YS, Syu WS, Ding DC, Lee RP, Hsieh DK, Lin PC, Chiou TW. Adipose-derived stem cells can abrogate chemical-induced liver fibrosis and facilitate recovery of liver function. *Cell Transplant.* 2012; 21: 2753-64.
- Harunari N, Armendariz R, Zhu KQ, Deubner H, Engrav LH, Muangman P, Carrougher GJ, Gibran NS. Comparison of collagen nodules and mast cells between human hypertrophic scar and thick scar in the female red duroc pig. *Wound Repair Regen.* 2005; 13: A27.
- Harry D, Anand R, Holt S, Davies S, Marley R, Fernando B, Goodier D, Moore K. Increased sensitivity to endotoxemia in the bile duct-ligated cirrhotic rat. *Hepatology.* 1999; 30: 1198-205.
- Harty MW, Huddleston HM, Papa EF, Puthawala T, Tracy AP, Ramm GA, Gehring S, Gregory SH, Tracy TF Jr. Repair after cholestatic liver injury correlates with neutrophil infiltration and matrix metalloproteinase 8 activity. *Surgery.* 2005; 138: 313-20.

- Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Honjo T, Tateno M, Shieh JH, Hackett NR, Quitariano MS, Crystal RG, Rafii S, Moore MA. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*. 2001; 97: 3354-60.
- Hay DC, Fletcher J, Payne C, Terrace JD, Gallagher RC, Snoeys J, Black JR, Wojtacha D, Samuel K, Hannoun Z, Pryde A, Filippi C, Currie IS, Forbes SJ, Ross JA, Newsome PN, Iredale JP. Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires ActivinA and Wnt3a signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 105: 12301-6.
- Hayashi H, Sakai T. Animal models for the study of liver fibrosis: new insights from knockout mouse models. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011; 300 :G729-38.
- Hazra S, Miyahara T, Rippe RA, Tsukamoto H. PPAR Gamma and Hepatic Stellate Cells. *Comp Hepatol*. 2004;3 Suppl 1:S7.
- Hazra S, Xiong S, Wang J, Rippe RA, Krishna V, Chatterjee K, Tsukamoto H. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces a phenotypic switch from activated to quiescent hepatic stellate cells. *J Biol Chem*. 2004; 279: 11392-401.
- Heathcote EJ. Diagnosis and management of cholestatic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007; 5: 776-82.
- Hematti P, Kim J, Stein AP, Kaufman D. Potential role of mesenchymal stromal cells in pancreatic islet transplantation. *Transplant Rev (Orlando)*. 2013; 27: 21-9.
- Henry RJ, Golub OJ, Sobel C. Some of the variables involved in the fractionation of serum proteins by paper electrophoresis. *Clin Chem*. 1957; 3: 49-64.
- Heymann F, Hammerich L, Storch D, Bartneck M, Huss S, Rüsseler V, Gassler N, Lira SA, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. Hepatic macrophage migration and differentiation critical for liver fibrosis is mediated by the chemokine receptor C-C motif chemokine receptor 8 in mice. *Hepatology*. 2012; 55: 898-909.
- Hézode C, Roudot-Thoraval F, Nguyen S, Grenard P, Julien B, Zafrani ES, Pawlotsky JM, Dhumeaux D, Lotersztajn S, Mallat A. Daily cannabis smoking as a risk factor for progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2005; 42: 63-71.

- Hirschfield GM, Heathcote EJ, Gershwin ME. Pathogenesis of cholestatic liver disease and therapeutic approaches. *Gastroenterology*. 2010; 139:1481-96.
- Hoefs JC, Morgan T, Ilagan BJ. Testing beneficial therapy in human cirrhosis using animal models of cirrhosis. *Dig Dis Sci*. 2011; 56: 929-30.
- Holt AP, Salmon M, Buckley CD, Adams DH. Immune interactions in hepatic fibrosis. *Clin Liver Dis*. 2008; 12: 861-82.
- Hong SJ, Traktuev DO, March KL. Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010; 15: 86-91.
- Hoogduljin MJ, Crop MJ, Peeters AM, Van Osch GJ, Balk AH, Ijzermans JN, Weimar W, Baan CC. Human heart, spleen and peripheral fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem Cells Dev* 2007; 16: 597-604.
- 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.
- Hu PF, Xie WF. Targeted RNA interference for hepatic fibrosis. *Expert Opin Biol Ther*. 2009; 10: 1305-12.
- Hu YL, Fu YH, Tabata Y, Gao JQ. Mesenchymal stem cells: a promising targeted-delivery vehicle in cancer gene therapy. *J Control Release*. 2010; 147:154-62.
- Huang CY, Hsiao JK, Lu YZ, Lee TC, Yu LC. Anti-apoptotic PI3K/Akt signaling by sodium/glucose transporter 1 reduces epithelial barrier damage and bacterial translocation in intestinal ischemia. *Lab Invest*. 2011; 91: 294-309.
- 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.
- Huang LT, Chen CC, Sheen JM, Chen YJ, Hsieh CS, Tain YL. The interaction between high ammonia diet and bile duct ligation in developing rats: assessment by spatial memory and asymmetric dimethylarginine. *Int J Dev Neurosci*. 2010; 28: 169-74.

- Huang YT, Hsu YC, Chen CJ, Liu CT, Wei YH. Oxidative-stress-related changes in the livers of bile-duct-ligated rats. *J Biomed Sci.* 2003; 10: 170-8.
- Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A. Current status of hepatocyte transplantation. *Transplantation.* 2012; 93: 342-7.
- Hung SC, Pochampally RR, Chen SC, Hsu SC, Prockop DJ. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells* 2007; 25: 2363-70.
- 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.
- Imuro Y, Nishio T, Morimoto T, Nitta T, Stefanovic B, Choi SK, Brenner DA, Yamaoka Y. Delivery of matrix metalloproteinase-1 attenuates established liver fibrosis in the rat. *Gastroenterology.* 2003; 124: 445-58.
- Ikeda R, Michitaka K, Yamauchi Y, Matsui H, Onji M. Changes in gastrointestinal lymph and blood vessels in patients with cirrhotic portal hypertension. *J Gastroenterol.* 2001; 36: 689-95.
- Ikejima K, Okumura K, Kon K, Takei Y, Sato N. Role of adipocytokines in hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007 Suppl 1: S87-92.
- Imamura M, Ogawa T, Sasaguri Y, Chayama K, Ueno H. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology.* 2005; 128: 138-46.
- Ingber DE. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J.* 2006; 20: 811-27.
- In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R, Fibbe WE, Kanhai HH. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 2003; 102: 1548-9.
- 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.
- Ishikawa T, Banas A, Hagiwara K, Iwaguro H, Ochiya T. Stem cells for hepatic regeneration: the role of adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2010; 5: 182-9.
- Ismail MH, Pinzani M. Reversal of hepatic fibrosis: pathophysiological basis of antifibrotic therapies. *Hepatic Medicine: Evidence and Research* 2011; 3: 69-80.
- Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, Tivchev P, Altunkova I, Kyurkchiev DS. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol Lett*. 2009; 126: 37-42.
- 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; 42: 173-6.
- Jack GS, Almeida FG, Zhang R, Alfonso ZC, Zuk PA, Rodríguez LV. Processed lipoaspirate cells for tissue engineering of the lower urinary tract: implications for the treatment of stress urinary incontinence and bladder reconstruction. *J Urol*. 2005; 174: 2041-5.
- 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, Said O, Finberg J, Bomzon A. Peripheral vascular neuroeffector mechanisms in experimental cholestasis. *Am J Physiol*. 1993; 265: G579-86.
- Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *Am J Pathol*. 2011; 178: 175-86.

- Jaeschke H. Therapeutic strategies against ischemia-reperfusion injury: stem cell therapy and beyond. *Crit Care Med.* 2012; 40: 1381-2.
- Jeong WI, Park O, Radaeva S, Gao B. STAT1 inhibits liver fibrosis in mice by inhibiting stellate cell proliferation and stimulating NK cell cytotoxicity. *Hepatology.* 2006; 44: 1441-51.
- Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007; 23: 435-61.
- Joseph B, Malhi H, Bhargava KK, Palestro CJ, McCuskey RS, Gupta S. Kupffer cells participate in early clearance of syngeneic hepatocytes transplanted in the rat liver. *Gastroenterology* 2002; 123: 1677-85.
- Joubert P. An in vivo investigation of the negative chronotropic effect of cholic acid in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1978; 5: 1-8.
- Julien B, Grenard P, Teixeira-Clerc F, Van Nhieu JT, Li L, Karsak M, Zimmer A, Mallat A, Lotersztajn S. Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver.. *Gastroenterology.* 2005; 128: 742-55.
- Jung Y, Kim JK, Shiozawa Y, Wang J, Mishra A, Joseph J, Berry JE, McGee S, Lee E, Sun H, Wang J, Jin T, Zhang H, Dai J, Krebsbach PH, Keller ET, Pienta KJ, Taichman RS. Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis. *Nat Commun.* 2013; 4: 1795.
- Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential *in vivo* and *in vitro*. *Cell Transplant* 1997; 6: 125-34.
- Kallis YN, Alison MR, Forbes SJ. Bone marrow stem cells and liver disease. *Gut.* 2007; 56: 716-24.
- Kanemura H, Imuro Y, Takeuchi M, Ueki T, Hirano T, Horiguchi K, Asano Y, Fujimoto J. Hepatocyte growth factor gene transfer with naked plasmid DNA ameliorates dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *Hepatol Res.* 2008; 38: 930-9.
- Kanno N, LeSage G, Glaser S, Alpini G. Regulation of cholangiocyte bicarbonate secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001; 281: G612-25.
- Karatepe O, Acet E, Battal M, Adas G, Kemik A, Altiok 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.
- Karussis D, Karageorgiou C, Vaknin-Dembinsky A, Gowda-Kurkalli B, Gomori JM, Kassis I, Bulte JW, Petrou P, Ben-Hur T, Abramsky O, Slavin S. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol.* 2010; 67: 1187-94.
- 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.
- 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.
- Katznelson L, Finkelstein JS, Schoenfeld DA, Rosenthal DI, Anderson EJ, Klibanski A. Increase in bone density and lean body mass during testosterone administration in men with acquired hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81: 4358-65.
- Katznelson L, Kleinberg D, Vance ML, Stavrou S, Pulaski KJ, Schoenfeld DA, Hayden DL, Wright ME, Woodburn CJ, Klibanski A. Hypogonadism in patients with acromegaly: data from the multi-centre acromegaly registry pilot study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2001; 54: 183-8.
- Kawada N, Seki S, Inoue M, Kuroki T. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology.* 1998; 27: 1265-74.
- Kawashita Y, Guha C, Moitra R, Wang X, Fox IJ, Roy-Chowdhury J, Roy-Chowdhury N. Hepatic repopulation with stably transduced conditionally immortalized hepatocytes in the Gunn rat. *J Hepatol.* 2008;49:99-106.
- Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, Holland K, Rowley S, McGuirk J, Devetten M, Jansen J, Herzig R, Schuster M, Monroy R, Uberti J. Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009; 15:804-11.

- 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.
- Kershenovich Stalnikowitz D, Weissbrod AB. Liver fibrosis and inflammation. A review. *Ann Hepatol.* 2003; 2: 159-63.
- Kharaziha P, Hellström PM, Noorinayer B, Farzaneh F, Aghajani K, Jafari F, Telkabadi M, Atashi A, Honardoost M, Zali MR, Soleimani M. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2009; 21: 1199-205.
- Khosrotehrani K. Mesenchymal stem cell therapy in skin: why and what for? *Exp Dermatol.* 2013; 22: 307-10
- Kim CH, Lee JH, Won JH, Cho MK. Mesenchymal stem cells improve wound healing in vivo via early activation of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor. *J Korean Med Sci.* 2011; 26: 726-3.
- Kim M, Choi YS, Yang SH, Hong HN, Cho SW, Cha SM, Pak JH, Kim CW, Kwon SW, Park CJ. Muscle regeneration by adipose tissue-derived adult stem cells attached to injectable PLGA spheres. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 348: 386-92.
- Kim N, Im KI, Lim JY, Jeon EJ, Nam YS, Kim EJ, Cho SG. Mesenchymal stem cells for the treatment and prevention of graft-versus-host disease: experiments and practice. *Ann Hematol.* 2013. [Epub ahead of print].
- Kim SG, Kim YM, Choi JY, Han JY, Jang JW, Cho SH, Um SH, Chon CY, Lee DH, Jang JJ, Yu E, Lee YS. Oltipraz therapy in patients with liver fibrosis or cirrhosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase II trial. *J Pharm Pharmacol.* 2011; 63: 627-35
- 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 WS, Park BS, Park SH, Kim HK, Sung JH. Kim WS, Park BS, Park SH, Kim HK, Sung JH. Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: activation of dermal fibroblast by secretory factors. *J Dermatol Sci.* 2009; 53: 96-102.
- Kim YH, Wee YM, Chol MY, Lim DG, Kim SC, Han DJ. IL-10 induced by CD11b+ cells and IL-10 activated regulatory T cells play a role in immune

- modulation of mesenchymal stem cells in rat islet allograft. *Mol Med* 2011; 17: 697-708.
- 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.
- Koenig S, Yuan Q, Krause P, Christiansen H, Rave-Fraenk M, Kafert-Kasting S, Kriegbaum H, Schneider A, Ott M, Meyburg J. Regional transient portal ischemia and irradiation as preparative regimen for hepatocyte transplantation. *Cell Transplant*. 2011; 20: 303-11.
- 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.
- König J, Seithel A, Gradhand U, Fromm MF. Pharmacogenomics of human OATP transporters. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2006; 372: 432-43.
- 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.
- Kragl M, Knapp D, Nacu E, Khattak S, Maden M, Epperlein HH, Tanaka EM. Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature*. 2009; 460: 60-5.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005; 352: 1779-90.
- Kramer HJ Impaired renal function in obstructive jaundice: roles of the thromboxane and endothelin systems. *Nephron*. 1997; 77:1-12
- Kremer AE, Oude Elferink RP, Beuers U. Pathophysiology and current management of pruritus in liver disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2011; 35: 89-97.

- Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, Yee H, Zender L, Lowe SW. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*. 2008; 134: 657-67.
- Kroeger RJ, Groszmann RJ. Increased portal venous resistance hinders portal pressure reduction during the administration of beta-adrenergic blocking agents in a portal hypertensive model. *Hepatology*. 1985; 5: 97-101.
- Kuo TK, Hung SP, Chuang CH, Chen CT, Shih YR, Fang SC, Yang VW, Lee OK. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology*. 2008; 134: 2111-21.
- Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, Nishikawa K, Tanimura Y, Makinoshima H, Goda M, Akashi H, Inutsuka A, Niwa A, Shigemoto T, Nabeshima Y, Nakahata T, Nabeshima Y, Fujiyoshi Y, Dezawa M. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107: 8639-43.
- Kurz H, Burri PH, Djonov VG. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News Physiol Sci*. 2003; 18: 65-70.
- Lähteenvuo J, Rosenzweig A. Effects of aging on angiogenesis. *Circ Res*. 2012; 110: 1252-64.
- Lam P, Soroka CJ, Boyer JL. The bile salt export pump: clinical and experimental aspects of genetic and acquired cholestatic liver disease. *Semin Liver Dis* 2010; 30: 125–33.
- Lamb E, Newman DJ, Price C.P. Kidney Function Test . En *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis* Fourth Edition. Edit. Elsevier Saunders. St Louis. Missouri. USA. 2006, pp 797–835.
- Larsen K. Creatinine assay in the presence of protein with LKB 8600 reaction rate analyser. *Clin Chim Acta*. 1972; 38: 475-6.
- 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 K, Paus R, Tiede S, Day P, Bayat A. Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Exp Dermatol*. 2009; 18: 921-33.
- Lautt WW. Relationship between hepatic blood flow and overall metabolism: the hepatic arterial buffer response. *Fed Proc*. 1983; 42: 1662-6.
- Lavon N, Benvenisty N. Study of hepatocyte differentiation using embryonic stem cells. *J Cell Biochem*. 2005;15; 96.
- Le Blanc K, Götherström C, Ringdén O, Hassan M, McMahon R, Horwitz E, Anneren G, Axelsson O, Nunn J, Ewald U, Nordén-Lindeberg S, Jansson M, Dalton A, Aström E, Westgren M. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation*. 2005 ; 79: 1607-14.
- Lebrec D, Thabut D, Oberti F, Perarnau JM, Condat B, Barraud H, Saliba F, Carbonell N, Renard P, Ramond MJ, Moreau R, Poynard T; Pentocir Group. Pentoxifylline does not decrease short-term mortality but does reduce complications in patients with advanced cirrhosis. *Gastroenterology*. 2010; 138: 1755-62.
- Lee CS, Friedman JR, Fulmer JT, Kaestner KH. The initiation of liver development is dependent on Foxa transcription factors. *Nature*. 2005; 435: 944-7.
- Lee H, Park JB, Lee S, Baek S, Kim H, Kim SJ. Intra-osseous injection of donor mesenchymal stem cell (MSC) into the bone marrow in living donorkidney transplantation; a pilot study. *J Transl Med*. 2013; 11: 96.
- Lee J, Roh KB, Kim SC, Lee J, Park D. Soy peptide-induced stem cell proliferation: involvement of ERK and TGF- β 1. *J Nutr Biochem*. 2012; 23: 1341-51.
- 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 SS, Girod C, Braillon A, Hadengue A, Lebrec D. Hemodynamic characterization of chronic bile duct-ligated rats: effect of pentobarbital sodium. *Am J Physiol.* 1986; 251(2 Pt 1): G176-80.
- Lee ST, Jang JH, Cheong JW, *et al.* Treatment of high-risk acute myelogenous leukemia by myeloablative chemoradiotherapy followed by co-infusion of tcell-depleted haematopoietic stem cells and culture expanded marrow mesenchymal stem cells from a related donor with one fully mismatched human leukocyte antigen haplotype. *Br J Haematol* 2002; 118: 1128-31.
- Lee Y, Friedman SL. Fibrosis in the liver: acute protection and chronic disease. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2010; 97: 151-200.
- Lemaigre FP. Mechanisms of liver development: concepts for understanding liver disorders and design of novel therapies. *Gastroenterology.* 2009; 137: 62-79.
- Lemaigre FP. Molecular mechanisms of biliary development. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2010; 97: 103-26.
- Lepperdinger G. Inflammation and mesenchymal stem cell aging. *Curr Opin Immunol.* 2011; 23: 518-24.
- Levick SP, McLarty JL, Murray DB, Freeman RM, Carver WE, Brower GL. Cardiac mast cells mediate left ventricular fibrosis in the hypertensive rat heart. *Hypertension.* 2009; 53: 1041-7.
- Levy R, Schlaeffer F, Keynan A, Nagauker O, Yaari A, Sikuler E. Increased neutrophil function induced by bile duct ligation in a rat model. *Hepatology.* 1993; 17: 908-14.
- Li H, Fu X. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cutaneous wound repair and regeneration. *Cell Tissue Res.* 2012; 348: 371-7.
- Li MK, Crawford JM. The pathology of cholestasis. *Semin Liver Dis.* 2004; 24: 21-42.
- Li T, Yang Z. Research progress of vasculopathy in portal hypertension. *World J Gastroenterol.* 2005; 11: 6079-84.
- Li W, Ren G, Huang Y, Su J, Han Y, Li J, Chen X, Cao K, Chen Q, Shou P, Zhang L, Yuan ZR, Roberts AI, Shi S, Le AD, Shi Y. Mesenchymal stem

- cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death Differ.* 2012; 19: 1505-13.
- Li WG, Hu SX, Xue BD, Jiang ZG, Huang ZQ. Observation of hepatohilar peribiliary vascular plexus with complete absence of hepatic artery blood supply in rats. *Transplant Proc.* 2007; 39: 3424-8.
- Li YS, Harn HJ, Hsieh DK, Wen TC, Subeq YM, Sun LY, Lin SZ, Chiou TW. Cells and Materials for Liver Tissue Engineering. *Cell Transplant.* 2012.
- Liang J, Zhang H, Hua B, Wang H, Lu L, Shi S, Hou Y, Zeng X, Gilkeson GS, Sun L. Allogenic mesenchymal stem cells transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69: 1423-9.
- Liang L, Ma T, Chen W, Hu J, Bai X, Li J, Liang T. Therapeutic potential and related signal pathway of adipose-derived stem cell transplantation for rat liver injury. *Hepatol Res.* 2009; 39: 822-32.
- 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.
- Lin Y, Chen X, Yan Z, Liu L, Tang W, Zheng X, Li Z, Qiao J, Li S, Tian W. Multilineage differentiation of adipose-derived stromal cells from GFP transgenic mice. *Mol Cell Biochem.* 2006; 285: 69-78.
- 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.
- Löffek S, Schilling O, Franzke CW. Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J.* 2011; 38: 191-208.
- 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, Arias J, Aller MA, Durán H. Anatomía e histología hepática: Anatomía. En: *Cirugía Hepática Experimental*. Arias J, Lorente L, Aller MA, Rodríguez J, Alonso MS, Trobo JI, Durán H. Edit. Kronos. Zaragoza, 1993, pp 41-94.
- 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.
- Lorente L, Aller MA, Arias J. Liver Anatomy En: *Microsurgery In Liver Research*, Aller MA; Arias J. Eds. Bentham Scientific Publishers, 2009, pp 99-107.
- Lund-Katz S, Phillips MC. High density lipoprotein structure-function and role in reverse cholesterol transport. *Subcell Biochem*. 2010; 51: 183-227.
- Lyehty KW, Mackenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000; 6: 1282-6.
- Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, Braga EL, Oliveira SA, Fortes MF, Silva AG, Brustolim D, Genser B, Dos Santos RR, Lyra LG. Infusion of autologous bone marrow mononuclear cells through hepatic artery results in a short-term improvement of liver function in patients with chronic liver disease: a pilot randomized controlled study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2010; 22: 33-42.
- Liu Y, Wang Z, Kwong SQ, Lui EL, Friedman SL, Li FR, Lam RW, Zhang GC, Zhang H, Ye T. Inhibition of PDGF, TGF- β , and Abl signaling and reduction of liver fibrosis by the small molecule Bcr-Abl tyrosine kinase antagonist Nilotinib. *J Hepatol*. 2011; 55: 612-25.
- Ma C, Brunt EM. Histopathologic evaluation of liver biopsy for cirrhosis. *Adv Anat Pathol*. 2012; 19: 220-30.
- Magen I, Avraham Y, Ackerman Z, Vorobiev L, Mechoulam R, Berry EM. Cannabidiol ameliorates cognitive and motor impairments in bile-duct ligated mice via 5-HT_{1A} receptor activation. *Br J Pharmacol*. 2010; 159: 950-7.
- Malemud CJ. Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front Biosci*. 2006; 11: 1696-701.

- Mani AR, Nahavandi A, Moosavi M, Safarinejad R, Dehpour AR. Dual nitric oxide mechanisms of cholestasis-induced bradycardia in the rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002; 29: 905-8.
- Mann J, Mann DA. Transcriptional regulation of hepatic stellate cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009; 61 :497-512.
- 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.
- Mariani E, Facchini A. Clinical applications and biosafety of human adult mesenchymal stem cells. *Curr Pharm Des.* 2012; 18: 1821-45
- Martinek RG. Improved micro-method for determination of serum bilirubin. *Clin Chim Acta.* 1966; 13: 161-70.
- Martínez-Chantar ML, García-Trevijano ER, Latasa MU, Pérez-Mato I, Sánchez del Pino MM, Corrales FJ, Avila MA, Mato JM. Importance of a deficiency in S-adenosyl-L-methionine synthesis in the pathogenesis of liver injury. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76: 1177S-82S.
- Martínez-González I, Moreno R, Petriz J, Gratacós E, Aran JM. Engraftment potential of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells after transplantation in the fetal rabbit. *Stem Cells Dev.* 2012; 21: 3270-7.
- Marra F, Efsen E, Romanelli RG, Caligiuri A, Pastacaldi S, Batignani G, Bonacchi A, Caporale R, Laffi G, Pinzani M, Gentilini P. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulate profibrogenic and proinflammatory actions in hepatic stellate cells. *Gastroenterology.* 2000; 119: 466-78.
- Masaki H, Ishikawa T, Takahashi S, Okumura M, Sakai N, Haga M, Kominami K, Migita H, McDonald F, Shimada F, Sakurada K. Heterogeneity of pluripotent marker gene expression in colonies generated in human iPS cell induction culture. *Stem Cell Res.* 2007; 1: 105-15.
- Masyuk AI, Masyuk TV, Splinter PL, Huang BQ, Stroope AJ, LaRusso NF. Cholangiocyte cilia detect changes in luminal fluid flow and transmit them into intracellular Ca²⁺ and cAMP signaling. *Gastroenterology.* 2006; 131: 911-20.
- Masyuk AI, Masyuk TV, LaRusso NF. Cholangiocyte primary cilia in liver health and disease. *Dev Dyn.* 2008; 237 :2007-12.

- Matsumoto Y, Niimoto S, Katayama K, Hirose K, Yamaguchi A, Torigoe K. Effects of biliary drainage in obstructive jaundice on microcirculation, phagocytic activity, and ultrastructure of the liver in rats. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2002; 9: 360-6.
- Mavier P, Martin N, Couchie D, Préaux AM, Laperche Y, Zafrani ES. Expression of stromal cell-derived factor-1 and of its receptor CXCR4 in liver regeneration from oval cells in rat. *Am J Pathol.* 2004; 165: 1969-77.
- McKinsey TA. Therapeutic potential for HDAC inhibitors in the heart. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2012; 52: 303-19.
- Meirelles Lda S, Nardi NB. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front Biosci.* 2009; 14: 4281-98.
- Melief SM, Zwaginga JJ, Fibbe WE, Roelofs H. Adipose Tissue-Derived Multipotent Stromal Cells Have a Higher Immunomodulatory Capacity Than Their Bone Marrow-Derived Counterparts. *Stem Cells Transl Med.* 2013. [Epub ahead of print]
- Menasché P. Stem cells for clinical use in cardiovascular medicine: current limitations and future perspectives. *Thromb Haemost.* 2005; 94: 697-701.
- Mentink-Kane MM, Cheever AW, Wilson MS, Madala SK, Beers LM, Ramalingam TR, Wynn TA. Accelerated and progressive and lethal liver fibrosis in mice that lack interleukin (IL)-10, IL-12p40, and IL-13R α 2. *Gastroenterology.* 2011; 141 :2200-9.
- Meran S, Steadman R. Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *Int J Exp Pathol.* 2011; 92: 158-67.
- Miller WL, Bose HS. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *J Lipid Res.* 2011; 52: 2111-35.
- Minagawa N, Nagata J, Shibao K, Masyuk AI, Gomes DA, Rodrigues MA, Lesage G, Akiba Y, Kaunitz JD, Ehrlich BE, Larusso NF, Nathanson MH. Cyclic AMP regulates bicarbonate secretion in cholangiocytes through release of ATP into bile. *Gastroenterology.* 2007; 133: 1592-602.
- 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.

- 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 and mortality in the setting of biliary obstruction. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009; 296: G45-54.
- Mirotsoy M, Zhang Z, Deb A, Zhang L, Gneccchi M, Noiseux N, Mu H, Pachori A, Dzau V. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 1643-8.
- Mitchell C, Couton D, Couty JP, Anson M, Crain AM, Bizet V, Rénia L, Pol S, Mallet V, Gilgenkrantz H. Dual role of CCR2 in the constitution and the resolution of liver fibrosis in mice. *Am J Pathol.* 2009; 174: 1766-75.
- Mitry RR, Hughes RD, Dhawan A. Progress in human hepatocytes: isolation, culture & cryopreservation. *Semin Cell Dev Biol.* 2002; 13: 463-7.
- Mitry RR, Hughes RD, Aw MM, Terry C, Mieli-Vergani G, Girlanda R, Muiesan P, Rela M, Heaton ND, Dhawan A. Human hepatocyte isolation and relationship of cell viability to early graft function. *Cell Transplant.* 2003; 12: 69-74.
- Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA, Fu B, Patel V, Seo BM, Sonoyama W, Zheng JJ, Baker CC, Chen W, Ried T, Shi S. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells* 2006; 24: 1095-103.
- 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.
- Modi AA, Feld JJ, Park Y, Kleiner DE, Everhart JE, Liang TJ, Hoofnagle JH. Increased caffeine consumption is associated with reduced hepatic fibrosis. *Hepatology.* 2010; 51: 201-9.
- Moezi L, Shafaroodi H, Sarkar S, Emami-Razavi SH, Sanatkar M, Mirazi N, Dehpour AR. Involvement of nitrergic and opioidergic systems in the hypothermia induced by cholestasis in rats. *Pathophysiology.* 2006; 13: 227-32.
- Moreno M, Chaves JF, Sancho-Bru P, Ramalho F, Ramalho LN, Mansego ML, Ivorra C, Dominguez M, Conde L, Millán C, Marí M, Colmenero J, Lozano JJ, Jares P, Vidal J, Fornés X, Arroyo V, Caballería J, Ginès

- P, Batailler R. Ghrelin attenuates hepatocellular injury and liver fibrogenesis in rodents and influences fibrosis progression in humans. *Hepatology*. 2010;51:974-85.
- Mooradian AD, Shamma'a M, Salti I, Cortas N. Hypophyseal-gonadal dysfunction in men with non-alcoholic liver cirrhosis. *Andrologia*. 1985; 17: 72-9.
- Morwood SR, Nicholson LB. Modulation of the immune response by extracellular matrix proteins. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2006; 54: 367-74.
- Mormone E, George J, Nieto N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chem Biol Interact*. 2011; 193: 225-31.
- Moseley RH. Sepsis and cholestasis. *Clin Liver Dis*. 1999; 3: 465-75.
- 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.
- Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, Ishino K, Ishida H, Shimizu T, Kangawa K, Sano S, Okano T, Kitamura S, Mori H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med*. 2006; 12: 459-65.
- Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell*. 1999; 96: 319-28.
- Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011; 11: 723-37.
- Nahavandi A, Dehpour AR, Mani AR, Homayounfar H, Abdoli A, Abdolhoseini MR. The role of nitric oxide in bradycardia of rats with obstructive cholestasis. *Eur J Pharmacol*. 2001; 411: 135-41.
- Najimi M, Sokal E. Liver cell transplantation. *Minerva Pediatr*. 2005; 57: 243-5.
- Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y, Kikuchi Y, Saito Y, Tamai K, Ogihara T, Kaneda Y. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25: 2542-7.

- Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 1989; 342: 440-3.
- Nakanishi H, Sugiura T, Streisand JB, Lonning SM, Roberts JD Jr. TGF-beta-neutralizing antibodies improve pulmonary alveologenesis and vasculogenesis in the injured newborn lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 293: L151-6
- Nathanson MH, Boyer JL. Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology*. 1991; 14: 551-66.
- Navarro-Alvarez N, Soto-Gutierrez A, Kobayashi N. Hepatocyte Transplantation: A step forward. *Curr Opin Organ Transplant* 2007; 12: 652-8.
- Navarro-Alvarez N, Soto-Gutierrez A, Kobayashi N. Hepatic stem cells and liver development. *Methods Mol Biol*. 2010; 640: 181-236.
- Newton JL, Hollingsworth KG, Taylor R, El-Sharkawy AM, Khan ZU, Pearce R, Sutcliffe K, Okonkwo O, Davidson A, Burt J, Blamire AM, Jones D. Cognitive impairment in primary biliary cirrhosis: symptom impact and potential etiology. *Hepatology*. 2008; 48: 541-9.
- Nguyen DL, Juran BD, Lazaridis KN. Primary biliary cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2010; 24: 647-54.
- Nies AT, Keppler D. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflugers Arch* 2007; 453: 643–59.
- Nikolaidis N, Kountouras J, Giouleme O, Tzarou V, Chatzizisi O, Patsiaoura K, Papageorgiou A, Leontsini M, Eugenidis N, Zamboulis C. Colchicine treatment of liver fibrosis. *Hepatogastroenterology*. 2006; 53: 281-5.
- Nilsen TW. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet*. 2007; 23: 243-9.
- Novo E, Marra F, Zamara E, Valfrè di Bonzo L, Monitillo L, Cannito S, Petrai I, Mazzocca A, Bonacchi A, De Franco RS, Colombatto S, Autelli R, Pinzani M, Parola M. Overexpression of Bcl-2 by activated human hepatic stellate cells: resistance to apoptosis as a mechanism of progressive hepatic fibrogenesis in humans. *Gut*. 2006; 55: 1174-82.
- Nussler A, Konig S, Ott M, Sokal E, Christ B, Thasler W, Brulport M, Gabelein G, Schormann W, Schulze M, Ellis E, Kraemer M, Nocken F, Fleig W, Manns M, Strom SC, Hengstler JG. Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases. *J Hepatol*. 2006; 45: 144-59.

- Oakley F, Trim N, Constandinou CM, Ye W, Gray AM, Frantz G, Hillan K, Kendall T, Benyon RC, Mann DA, Iredale JP. Hepatocytes express nerve growth factor during liver injury: evidence for paracrine regulation of hepatic stellate cell apoptosis. *Am J Pathol.* 2003; 163: 1849-58.
- Oakley F, Meso M, Iredale JP, Green K, Marek CJ, Zhou X, May MJ, Millward-Sadler H, Wright MC, Mann DA. Inhibition of inhibitor of kappaB kinases stimulates hepatic stellate cell apoptosis and accelerated recovery from rat liver fibrosis. *Gastroenterology.* 2005; 128: 108-20.
- O'Connell MA, Rushworth SA. Curcumin: potential for hepatic fibrosis therapy? *Br J Pharmacol.* 2008; 153: 403-5.
- O'Connor MJ. Mechanical biliary obstruction. A review of the multisystemic consequences of obstructive jaundice and their impact on perioperative morbidity and mortality. *Am Surg.* 1985; 51: 245-51.
- Oellerich MF, Potente M. FOXOs and sirtuins in vascular growth, maintenance, and aging. *Circ Res.* 2012; 110: 1238-51.
- Oertel M, Shafritz DA. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1782: 61-74.
- Ogasawara M, Yamauchi K, Satoh Y, Yamaji R, Inui K, Jonker JW, Schinkel AH, Maeyama K. Recent advances in molecular pharmacology of the histamine systems: organic cation transporters as a histamine transporter and histamine metabolism. *J Pharmacol Sci.* 2006; 101: 24-30.
- Ogawa R, Mizuno H, Hyakusoku H, Watanabe A, Migita M, Shimada T. Chondrogenic and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. *J Nippon Med Sch.* 2004; 71: 240-1.
- Oguz S, Kanter M, Erboga 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.
- Oishi K, Noguchi H, Yukama H, Hayashi S. Differential ability of somatic stem cells. *Cell Transplant.* 2009; 18: 581-589.
- Okuno M, Akita K, Moriwaki H, Kawada N, Ikeda K, Kaneda K, Suzuki Y, Kojima S. Prevention of rat hepatic fibrosis by the protease inhibitor, camostat

- mesilate, via reduced generation of active TGF-beta. *Gastroenterology*. 2001; 120: 1784-800.
- O'Leary MJ, Xue A, Scarlett CJ, Sevette A, Kee AJ, Smith RC. Parenteral versus enteral nutrition: effect on serum cytokines and the hepatic expression of mRNA of suppressor of cytokine signaling proteins, insulin-like growth factor-1 and the growth hormone receptor in rodent sepsis. *Crit Care*. 2007; 11: R79.
- Omenetti A, Porrello A, Jung Y, Yang L, Popov Y, Choi SS, Witek RP, Alpini G, Venter J, Vandongen HM, Syn WK, Baroni GS, Benedetti A, Schuppan D, Diehl AM. Hedgehog signaling regulates epithelial-mesenchymal transition during biliary fibrosis in rodents and humans. *J Clin Invest*. 2008; 118: 3331-42.
- Omenetti A, Choi S, Michelotti G, Diehl AM. 4.Hedgehog signaling in the liver. *J Hepatol*. 2011; 54: 366-73.
- O'Neil S, Hunt J, Filkins J, Gamelli R. Obstructive jaundice in rats results in exaggerated hepatic production of tumor necrosis factor-alpha and systemic and tissue tumor necrosis factor-alpha levels after endotoxin. *Surgery*. 1997; 122: 281-6.
- Orellana M, Avalos N, Abarca M, Valdés E. Microsomal and peroxisomal fatty acid oxidation in bile duct ligated rats: a comparative study between liver and kidney. *Gen Pharmacol*. 1997; 28: 525-9.
- Ott M. A symphony of techniques for liver cell therapy, only applicable to rats? *J Hepatol*. 2008 ;49: 6-8.
- Otto WR, Wright NA. Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2011 ;4:20.
- Oude Elferink RP, Kremer AE, Beuers U. Mediators of pruritus during cholestasis. *Curr Opin Gastroenterol*. 2011; 27: 289-93.
- Ouyang J, Shao J, Zou H, Lou Y, Yu Y. Hepatic differentiation of rat mesenchymal stem cells by a small molecule. *Chem Med Chem*. 2012; 7: 1447-52.
- Pahl HL, Krauss B, Schulze-Osthoff K, Decker T, Traenckner EB, Vogt M, Myers C, Parks T, Warring P, Mühlbacher A, Czernilofsky AP, Baeuerle PA. The

- immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor NF-kappaB. *J Exp Med.* 1996; 183: 1829-40.
- Palma MD, Aller MA, Vara E, Nava MP, Garcia C, Arias-Diaz J, Balibrea JL, Arias J. Portal hypertension produces an evolutive hepato-intestinal pro- and anti-inflammatory response in the rat. *Cytokine.* 2005; 31: 213-26.
- Pakarinen MP, Rintala RJ. Surgery of biliary atresia. *Scand J Surg.* 2011; 100: 49-53.
- Panteghini M, Bais R, W.van Solinge W. Enzymes. En: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis* Fourth Edition. Edit. Elsevier Saunders St Louis. Missouri. USA . 2006, pp 597 – 643.
- Pareja E, Martínez A, Cortés M, Bonora A, Moya A, Sanjuán F, Gómez-Lechón MJ, Mir J. [Hepatic cell transplantation. Technical and methodological aspects. *Cir Esp.* 2010; 87: 139-47.
- Parekkadan B, van Poll D, Megeed Z, Kobayashi N, Tilles AW, Berthiaume F, Yarmush ML. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 363: 247-52.
- 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.
- Patel DM, Shah J, Srivastava AS. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Stem Cells Int.* 2013; 2013: 496218.
- Parekkadan B, Milwid JM. Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annu Rev Biomed Eng.* 2010; 12: 87-117.
- Patsenker E, Popov Y, Stickel F, Jonczyk A, Goodman SL, Schuppan D. Inhibition of integrin alphavbeta6 on cholangiocytes blocks transforming growth factor-beta activation and retards biliary fibrosis progression. *Gastroenterology.* 2008; 135: 660-70.
- Paz Z, Shoenfeld Y. Antifibrosis: to reverse the irreversible. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2010; 38: 276-86.
- Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. Dependence of

- human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science*. 1999; 283: 845-8.
- Peng L, Xie DY, Lin BL, Liu J, Zhu HP, Xie C, Zheng YB, Gao ZL. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: short-term and long-term outcomes. *Hepatology*. 2011; 54: 820-8.
- Peng W, Gao T, Yang ZL, Zhang SC, Ren ML, Wang ZG, Zhang B. Adipose-derived stem cells induced dendritic cells undergo tolerance and inhibit Th1 polarization. *Cell Immunol*. 2012; 278: 152-7.
- Peters T Jr. Proposals for standardization of total protein assays. *Clin Chem*. 1968; 14: 1147-59.
- Petrie Aronin CE, Tuan RS. Therapeutic potential of the immunomodulatory activities of adult mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2010 ;90:67-74.
- Philippeos C, Dhawan A, Hughes RD. Effects of ascitic fluid on alginate-encapsulated human hepatocytes in vitro. *Hepatology* 2010; 52 (suppl): 1106A.
- Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem Cells* 2007; 25: 2896-902
- Pinzani M, Romanelli RG, Magli S. Progression of fibrosis in chronic liver diseases: time to tally the score. *J Hepatol*. 2001; 34: 764-7.
- 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.
- Piscaglia AC, Shupe TD, Oh SH, Gasbarrini A, Petersen BE. Granulocyte-colony stimulating factor promotes liver repair and induces oval cell migration and proliferation in rats. *Gastroenterology*. 2007; 133: 619-31.
- 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.
- Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B,

- Pénicaud L, Casteilla L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004; 109: 656-63.
- Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med*. 2000; 21: 49-98.
- Popov Y, Sverdlov DY, Bhaskar KR, Sharma AK, Millonig G, Patsenker E, Krahenbuhl S, Krahenbuhl L, Schuppan D. Macrophage-mediated phagocytosis of apoptotic cholangiocytes contributes to reversal of experimental biliary fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010; 298: G323-34.
- 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.
- Poupon R, Chazouillères O, Poupon RE. Chronic cholestatic diseases. *J Hepatol*. 2000; 32: 129-40.
- 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.
- Prasad VK, Lucas KG, Kleiner GI, *et al*. Efficacy and safety of ex vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (prochymal) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study. *Boil Blood Marrow Transplant* 2011; 17: 534-41.
- Prockop DJ. “Stemness” does not explain the repair of many tissues by mesenchymal stem/multipotent stromal cells (MSCs). *Clin Pharmacol Ther* 2007; 82: 241-3.
- Przybyt E, Krenning G, Brinker MG, Harmsen MC. Adipose stromal cells primed with hypoxia and inflammation enhance cardiomyocyte proliferation rate in vitro through STAT3 and Erk1/2. *J Transl Med*. 2013; 11: 39.
- Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*. 2003; 9: 677-84.
- Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L, Blancher A.

- Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol.* 2005; 129: 118-29.
- Puppi J, Dhawan A. Human hepatocyte transplantation overview. *Methods Mol Biol.* 2009; 481: 1-16.
- Puppi J, Strom SC, Hughes RD, Bansal S, Castell JV, Dagher I, Ellis EC, Nowak G, Ericzon BG, Fox IJ, Gómez-Lechón MJ, Guha C, Gupta S, Mitry RR, Ohashi K, Ott M, Reid LM, Roy-Chowdhury J, Sokal E, Weber A, Dhawan A. Improving the techniques for human hepatocyte transplantation: report from a consensus meeting in London. *Cell Transplant.* 2012; 21: 1-10.
- Qayyum AA, Haack-Sørensen M, Mathiasen AB, Jørgensen E, Ekblond A, Kastrup J. Adipose-derived mesenchymal stromal cells for chronic myocardial ischemia (MyStromalCell Trial): study design. *Regen Med.* 2012; 7: 421-8.
- Racanelli V, Rehmann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology.* 2006; 43: S54-62.
- Radaeva S, Sun R, Jaruga B, Nguyen VT, Tian Z, Gao B. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology.* 2006; 130: 435-52.
- Ramm GA, Carr SC, Bridle KR, Li L, Britton RS, Crawford DH, Vogler CA, Bacon BR, Tracy TF. Morphology of liver repair following cholestatic liver injury: resolution of ductal hyperplasia, matrix deposition and regression of myofibroblasts. *Liver.* 2000; 20: 387-96.
- Rauschemberger MB, Sandoval MJ, Massheimer VL Cellular and molecular actions displayed by estrone on vascular endothelium. *Mol Cell Endocrinol.* 2011; 339:136-43.
- Raynaud P, Carpentier R, Antoniou A, Lemaigre FP. Biliary differentiation and bile duct morphogenesis in development and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011; 43: 245-56.
- Raynaud P, Tate J, Callens C, Cordi S, Vandersmissen P, Carpentier R, Sempoux C, Devuyst O, Pierreux CE, Courtoy P, Dahan K, Delbecq K,

- Lepreux S, Pontoglio M, Guay-Woodford LM, Lemaigre FP. A classification of ductal plate malformations based on distinct pathogenic mechanisms of biliary dysmorphogenesis. *Hepatology*. 2011; 53: 1959-66.
- Reading JL, Yang JH, Sabbah S, Skowera A, Knight RR, Pinxteren J, Vaes B, Allsopp T, Ting AE, Busch S, Raber A, Deans R, Tree TI. Clinical-grade multipotent adult progenitor cells durably control pathogenic T cell responses in human models of transplantation and autoimmunity. *J Immunol*. 2013; 190: 4542-5.
- Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004; 109: 1292-8.
- Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008; 2: 141-50.
- Ren H, Zhao Q, Cheng T, Lu S, Chen Z, Meng L, Zhu X, Yang S, Xing W, Xiao Y, Ren Q, Chi Y, Gu D, Yang R, Han ZC. No contribution of umbilical cord mesenchymal stromal cells to capillarization and venularization of hepatic sinusoids accompanied by hepatic differentiation in carbon tetrachloride-induced mouse liver fibrosis. *Cytotherapy*. 2010; 12: 371-83.
- Richeldi L, du Bois RM. Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis: the CAPACITY program. *Expert Rev Respir Med*. 2011; 5: 73-8.
- Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lönnies H, Marschall HU, Dlugosz A, Szakos A, Hassan Z, Omazic B, Aschan J, Barkholt L, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 2006; 81: 1390-7.
- Ringden O, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells for treatment of acute and chronic graft-versus-host disease, tissue toxicity and hemorrhages. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011; 24: 65-72.
- Robson SC, Schuppan D. Adenosine: tipping the balance towards hepatic steatosis and fibrosis. *J Hepatol*. 2010; 52: 941-3.
- Rockey DC. Hepatic fibrosis, stellate cells, and portal hypertension. *Clin Liver Dis*. 2006; 10: 459-79, vii-viii.

- Rockey DC. Current and future anti-fibrotic therapies for chronic liver disease. *Clin Liver Dis.* 2008; 12: 939-62.
- Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, Janssen J, Koppe C, Knolle P, Castoldi M, Tacke F, Trautwein C, Luedde T. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology.* 2011; 53: 209-18.
- Rodriguez-Garay EA, Rodríguez GP, Pisani G, Taborda M, Viglianco RA. Reversible cholestasis induced by experimental partial obstruction of the bile duct; Biochemical, morphometric and hepatic transport kinetic studies. *Pathophysiology.* 2004; 11: 7-15.
- Rodríguez J. Anestesia. En: Arias J, Aller MA, Lorente L, Rodríguez J, De Pedro JA, Brandau D, Durán H. *Trasplante experimental de órganos.* Edit. Garsi Madrid. 1989, pp 65-8.
- Roemeling-van Rhijn M, Weimar W, Hoogduijn MJ. Mesenchymal stem cells: application for solid-organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2012 Feb;17(1):55-62.
- 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; 5: 167-73.
- Ruddell RG, Oakley F, Hussain Z, Yeung I, Bryan-Lluka LJ, Ramm GA, Mann DA. A role for serotonin (5-HT) in hepatic stellate cell function and liver fibrosis. *Am J Pathol.* 2006; 169: 861-76.
- Rutherford AE, Pratt DS. Cholestasis and cholestatic syndromes. *Curr Opin Gastroenterol.* 2006; 22: 209-14.
- Russo FP, Alison MR, Bigger BW, Amofah E, Florou A, Amin F, Bou-Gharios G, Jeffery R, Iredale JP, Forbes SJ. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology.* 2006; 130: 1807-21.
- Russo FP, Parola M. Stem cells in liver failure. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2012; 26: 35-45.
- Rüster B, Göttig S, Ludwig RJ, Bistrrian R, Müller S, Seifried E, Gille J, Henschler R. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood.* 2006; 108: 3938-44.
- Ryu CH, Park KY, Hou Y, Jeong CH, Kim SM, Jeun SS. Gene Therapy of Multiple Sclerosis Using Interferon β -Secreting Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 696738.

- Sadat S, Gehmert S, Song YH, Yen Y, Bai X, Gaiser S, Klein H, Alt E. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 363: 674-9.
- Saito JM, Maher JJ. Bile duct ligation in rats induces biliary expression of cytokine-induced neutrophil chemoattractant. *Gastroenterology.* 2000; 118: 1157-68.
- Sakaida I, Matsumura Y, Akiyama S, Hayashi K, Ishige A, Okita K. Herbal medicine Sho-saiko-to (TJ-9) prevents liver fibrosis and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *J Hepatol.* 1998; 28: 298-306.
- Sakamoto M, Ueno T, Nakamura T, Sakata R, Hasimoto O, Torimura T, Sata M. Improvement of portal hypertension and hepatic blood flow in cirrhotic rats by oestrogen. *Eur J Clin Invest.* 2005; 35: 220-5.
- Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2010; 5: 103-10.
- Salgado S, Garcia J, Vera J, Siller F, Bueno M, Miranda A, Segura A, Grijalva G, Segura J, Orozco H, Hernandez-Pando R, Fafutis M, Aguilar LK, Aguilar-Cordova E, Armendariz-Borunda J. Liver cirrhosis is reverted by urokinase-type plasminogen activator gene therapy. *Mol Ther.* 2000; 2: 545-51.
- Sánchez-Patán F, Anchuelo R, Corcuera MT, Casado I, Gómez-Aguado F, Aller MA, Cruz A, Alonso MJ, Arias J. Biliary fibrosis in microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat. *Microsurgery.* 2008; 28: 361-6.
- Sanyal AJ, Chalasani N, Kowdley KV, McCullough A, Diehl AM, Bass NM, Neuschwander-Tetri BA, Lavine JE, Tonascia J, Unalp A, Van Natta M, Clark J, Brunt EM, Kleiner DE, Hoofnagle JH, Robuck PR; NASH CRN. Pioglitazone, vitamin E, or placebo for nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med.* 2010; 362: 1675-85.
- Sanz-Ruiz R, Santos ME, Muñoa MD, Martín IL, Parma R, Fernández PL, Fernández-Avilés F. Adipose tissue-derived stem cells: the friendly side of a classic cardiovascular foe. *J Cardiovasc Transl Res.* 2008; 1: 55-63

- Sastre E, Balfagón G, Revuelta-López E, Aller MA, Nava MP, Arias J, Blanco-Rivero J. Effect of short- and long-term portal hypertension on adrenergic, nitrenergic and sensory functioning in rat mesenteric artery. *Clin Sci (Lond)*. 2012; 122 :337-48.
- 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.
- Sbano P, Cuccia A, Mazzanti B, Urbani S, Giusti B, Lapini I, Rossi L, Abbate R, Marseglia G, Nannetti G, Torricelli F, Miracco C, Bosi A, Fimiani M, Saccardi R. Use of donor bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of skin allograft rejection in a preclinical rat model. *Arch Dermatol Res* 2008; 300: 115-24.
- Scandinavian Committee on Enzymes . *Scand J Clin Lab Invest*. 1976; 33: 287-306.
- Schaffner F, Popper H: Classification and mechanism of cholestasis. In: *Liver and biliary disease. Pathophysiology. Diagnosis. Management*. London. Edited by Wright R, Alberti KGMM, Karran S, Millward-Sadler GH: W.B. Saunders Company Ltd. 1979, pp 296-323.
- Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Ferard G, Ferrero CA, Franck PF, Gella FJ, Hoelzel W, Jorgensen PJ, Kanno T, Kessner A, Klauke R, Kristiansen N, Lessinger JM, Linsinger TP, Misaki H, Panteghini M, Pauwels J, Schiele F, Schimmel HG, Weidemann G, Siekmann L; International Federation of procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 6. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of gamma-glutamyltransferase. *Clin Chem Lab Med*. 2002; 40: 734-8.
- Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*. 2002; 109: 1291-302.

- Sedlacek N, Jia JD, Bauer M, Herbst H, Ruehl M, Hahn EG, Schuppan D. Proliferating bile duct epithelial cells are a major source of connective tissue growth factor in rat biliary fibrosis. *Am J Pathol.* 2001; 158: 1239-44.
- Seki A, Sakai Y, Komura T, Nasti A, Yoshida K, Higashimoto M, Honda M, Usui S, Takamura M, Takamura T, Ochiya T, Furuichi K, Wada T, Kaneko S. Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a murine steatohepatitis-induced cirrhosis model. *Hepatology.* 2013. [Epub ahead of print].
- Seki T, Yokoyama Y, Nagasaki H, Kokuryo T, Nagino M. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell transplantation promotes hepatic regeneration after hepatic ischemia-reperfusion and subsequent hepatectomy in rats. *J Surg Res.* 2012; 178: 63-70.
- Sempoux C, Horsmans Y, Geubel A, Fraikin J, Van Beers BE, Gigot JF, Lerut J, Rahier J. Severe radiation-induced liver disease following localized radiation therapy for biliopancreatic carcinoma: activation of hepatic stellate cells as an early event. *Hepatology.* 1997; 26: 128-34.
- 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.
- Seong JM, Kim BC, Park JH, Kwon IK, Mantalaris A, Hwang YS. Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed Mater.* 2010; 5: 062001
- Serralta A, Donato MT, Orbis F, Castell JV, Mir J, Gómez-Lechón MJ. Functionality of cultured human hepatocytes from elective samples, cadaveric grafts and hepatectomies. *Toxicol In Vitro.* 2003; 17: 769-74.
- 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.
- Shabbir A, Zisa D, Lin H, Mastri M, Roloff G, Suzuki G, Lee T. Activation of host tissue trophic factors through JAK-STAT3 signaling: a mechanism of mesenchymal stem cell-mediated cardiac repair. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010; 299: H1428-38.
- Sherlock S. Chronic hepatitis and cirrhosis. *Hepatology.* 1984; 4(1 Suppl): 25S-28S.

- Sherlock S, Epstein O. Primary biliary cirrhosis. The present position. *Ann N Y Acad Sci.* 1986; 465: 378-85.
- Sherlock S. Overview of chronic cholestatic conditions in adults: terminology and definitions. *Clin Liver Dis.* 1998; 2: 217-33.
- 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.
- Shiha G, Sarin SK, Ibrahim AE, Omata M, Kumar A, Lesmana LA, Leung N, Tozun N, Hamid S, Jafri W, Maruyama H, Bedossa P, Pinzani M, Chawla Y, Esmat G, Doss W, Elzanaty T, Sakhuja P, Nasr AM, Omar A, Wai CT, Abdallah A, Salama M, Hamed A, Yousry A, Waked I, Elshahar M, Fateen A, Mogawer S, Hamdy H, Elwakil R. Liver fibrosis: consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL). *Hepatol Int.* 2009; 3: 323-33.
- Shivakumar P, Campbell KM, Sabla GE, Miethke A, Tiao G, McNeal MM, Ward RL, Bezerra JA. Obstruction of extrahepatic bile ducts by lymphocytes is regulated by IFN-gamma in experimental biliary atresia. *J Clin Invest.* 2004; 114: 322-9.
- Shiha G, Sarin SK, Ibrahim AE, Omata M, Kumar A, Lesmana LA, Leung N, Tozun N, Hamid S, Jafri W, Maruyama H, Bedossa P, Pinzani M, Chawla Y, Esmat G, Doss W, Elzanaty T, Sakhuja P, Nasr AM, Omar A, Wai CT, Abdallah A, Salama M, Hamed A, Yousry A, Waked I, Elshahar M, Fateen A, Mogawer S, Hamdy H, Elwakil R; Jury of the APASL Consensus Development Meeting 29 January 2008 on Liver Fibrosis With Without Hepatitis B or C. Liver fibrosis: consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL). *Hepatol Int.* 2009; 3: 323-33.
- Shyu KG, Wang BW, Hung HF, Chang CC, Shih DT. Mesenchymal stem cells are superior to angiogenic growth factor genes for improving myocardial performance in the mouse model of acute myocardial infarction. *J Biomed Sci* 2006; 13: 47-58.

- Sigal M, Siebert N, Zechner D, Menschikow E, Abshagen K, Vollmar B, Eipel C. Darbepoetin- α inhibits the perpetuation of necro-inflammation and delays the progression of cholestatic fibrosis in mice. *Lab Invest.* 2010; 90: 1447-56.
- Sikuler E, Kravetz D, Groszmann RJ. Evolution of portal hypertension and mechanisms involved in its maintenance in a rat model. *Am J Physiol.* 1985; 248: G618-25
- Sikuler E, Groszmann RJ. Hemodynamic studies in long- and short-term portal hypertensive rats: the relation to systemic glucagon levels. *Hepatology.* 1986; 6: 414-8.
- Siller-López F, Sandoval A, Salgado S, Salazar A, Bueno M, Garcia J, Vera J, Gálvez J, Hernández I, Ramos M, Aguilar-Cordova E, Armendariz-Borunda J. Treatment with human metalloproteinase-8 gene delivery ameliorates experimental rat liver cirrhosis. *Gastroenterology.* 2004; 126: 1122-33.
- Singh S, Shackleton G, Ah-Sing E, Chakraborty J, Bailey ME. Antioxidant defenses in the bile duct-ligated rat. *Gastroenterology.* 1992; 103: 1625-9.
- Slott PA, Liu MH, Tavoloni N. Origin, pattern, and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat. *Gastroenterology.* 1990; 99: 466-77.
- Smets F, Najimi M, Sokal EM. Cell transplantation in the treatment of liver diseases. *Pediatr Transplant.* 2008; 12: 6-13.
- Snykers S, De Kock J, Rogiers V, Vanhaecke T. In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. *Stem Cells.* 2009; 27: 577-605.
- 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.
- Sokal EM, Smets F, Bourgois A, Van Maldergem L, Buts JP, Reding R, Bernard Otte J, Evrard V, Latinne D, Vincent MF, Moser A, Soriano HE. Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety, and metabolic follow-up. *Transplantation.* 2003; 76: 735-8.

- Sorinson SN, Illicheva KV, Tsybasova AI. Current diazo-methods for the determination of bilirubin (100th anniversary of Hijmans van den Bergh). *Lab Delo*. 1971; 3: 143-7.
- Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*. 2006; 24: 74-85.
- Spees JL, Olson SD, Whitney MJ, Prockop DJ. Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 1283-8.
- Stéphenne X, Vosters O, Najimi M, Beuneu C, Dung KN, Wijns W, Goldman M, Sokal EM. Tissue factor-dependent procoagulant activity of isolated human hepatocytes: relevance to liver cell transplantation. *Liver Transpl*. 2007; 13: 599-606.
- Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol*. 2006; 85: 699-715.
- Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev*. 2007; 28: 521-74.
- Strazzabosco M, Sakisaka S, Hayakawa T, Boyer JL. Effect of UDCA on intracellular and biliary pH in isolated rat hepatocyte couplets and perfused livers. *Am J Physiol*. 1991; 260(1 Pt 1): G58-69
- Strazzabosco M, Fiorotto R, Melero S, Glaser S, Francis H, Spirli C, Alpini G. Differentially expressed adenylyl cyclase isoforms mediate secretory functions in cholangiocyte subpopulation. *Hepatology*. 2009; 50: 244-52.
- Strazzabosco M, Fabris L. Development of the bile ducts: essentials for the clinical hepatologist. *J Hepatol*. 2012; 56: 1159-70.
- 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.

- Studený M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res.* 2002; 62: 3603-8.
- Sugino H, Kumagai N, Watanabe S, Toda K, Takeuchi O, Tsunematsu S, Morinaga S, Tsuchimoto K. Polaprezinc attenuates liver fibrosis in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008; 23: 1909-16
- Szabo G, Mandrekar P, Dolganiuc A. Innate immune response and hepatic inflammation. *Semin Liver Dis.* 2007; 27: 339-50.
- Szöke K, Brinckmann JE. Concise review: therapeutic potential of adipose tissue-derived angiogenic cells. *Stem Cells Transl Med.* 2012; 1: 658-67
- Sztrymf B, Rabiller A, Nunes H, Savale L, Lebrec D, Le Pape A, de Montpreville V, Mazmanian M, Humbert M, Hervé P. Prevention of hepatopulmonary syndrome and hyperdynamic state by pentoxifylline in cirrhotic rats. *Eur Respir J.* 2004; 23: 752-8.
- 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.
- Tahan G, Tarcin O, Tahan V, Eren F, Gedik N, Sahan E, Biberoglu N, Guzel S, Bozbas A, Tozun N, Yucel O. The effects of N-acetylcysteine on bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats. *Dig Dis Sci.* 2007; 52: 3348-54.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126: 663-76.
- 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.
- Talarmin H, Rescan C, Cariou S, Glaise D, Zanninelli G, Bilodeau M, Loyer P, Guguen-Guillouzo C, Baffet G. The mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade activation is a key signalling pathway involved in the regulation of G(1) phase progression in proliferating hepatocytes. *Mol Cell Biol.* 1999;19: 6003-11.

- Tanaka H, Leung PS, Kenny TP, Gershwin ME, Bowlus CL. Immunological orchestration of liver fibrosis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2012; 43: 220-9.
- Tanaka Y, Chen C, Maher JM, Klaassen CD. Kupffer cell-mediated downregulation of hepatic transporter expression in rat hepatic ischemia-reperfusion. *Transplantation*. 2006; 82: 258-66.
- Terry C, Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD. Cryopreservation of isolated human hepatocytes for transplantation: State of the art. *Cryobiology*. 2006; 53: 149-59.
- Terry C, Hughes RD, Mitry RR, Lehec SC, Dhawan A. Cryopreservation-induced nonattachment of human hepatocytes: role of adhesion molecules. *Cell Transplant*. 2007; 16: 639-47.
- 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*. 2007; 46: 1893-906.
- Tharaux PL, Chatziantoniou C, Fakhouri F, Dussaulte JC. Angiotensin II activates collagen I gene through a mechanism involving the MAP/ER kinase pathway. *Hypertension*. 2000; 36: 330-6.
- Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, Delivanis DA, Sismanopoulos N, Zhang B, Asadi S, Vasiadi M, Weng Z, Miniati A, Kalogeromitros D. Mast cells and inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1822: 21-33.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998; 282: 1145-7.
- Tietz NW, Bayse DD, Copeland W. Selection of reaction conditions for the measurement of alkaline phosphatase activity. In: *Proceedings of the Second International Symposium on Clinical Enzymology*, Weinstock A; Tietz NW; Rodgerson D.O. Eds. American Association for Clinical Chemistry, Washington, D.C. 1976, pp. 51-66.
- Tietz NW, Rinker AD, Shaw LM. International Federation of Clinical Chemistry. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 5. IFCC method for alkaline phosphatase (orthophosphoric-monoester phosphohydrolase, alkalineoptimum, EC 3.1.3.1). IFCC Document Stage 2,

- Draft 1, 1983-03 with a view to an IFCC Recommendation. *Clin Chim Acta*. 1983.135: 339F-367F.
- Tietz NW. Probable source of discrepancies in alkaline phosphate assays. *Clin Chem*. 1987; 33: 625.
- Tobin LM, Healy ME, English K, Mahon BP. Human mesenchymal stem cells suppress donor CD4(+) T cell proliferation and reduce pathology in a humanized mouse model of acute graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol*. 2013; 172: 333-48
- Tobita M, Uysal AC, Ogawa R, Hyakusoku H, Mizuno H. Periodontal tissue regeneration with adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2008; 14: 945-53.
- Toki F, Takahashi A, Suzuki M, Ootake S, Hirato J, Kuwano H. Development of an experimental model of cholestasis induced by hypoxic/ischemic damage to the bile duct and liver tissues in infantile rats. *J Gastroenterol*. 2011; 46: 639-47.
- Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular pathogenesis of cholestasis. *N Engl J Med*. 1998; 339: 1217-27.
- Tremolada C, Palmieri G, Ricordi C. Adipocyte transplantation and stem cells: plastic surgery meets regenerative medicine. *Cell Transplant*. 2010; 19: 1217-23.
- Trento C, Dazzi F. Mesenchymal stem cells and innate tolerance: biology and clinical applications. *Swiss Med Wkly*. 2010; 140: w13121
- Tsukamoto H, Matsuoka M, French SW. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Semin Liver Dis*. 1990; 10: 56-65.
- Tugues S, Fernandez-Varo G, Muñoz-Luque J, Ros J, Arroyo V, Rodés J, Friedman SL, Carmeliet P, Jiménez W, Morales-Ruiz M. Antiangiogenic treatment with sunitinib ameliorates inflammatory infiltrate, fibrosis, and portal pressure in cirrhotic rats. *Hepatology*. 2007; 46: 1919-26.
- van Deen WK, Oikonomopoulos A, Hommes DW. Stem cell therapy in inflammatory bowel disease: which, when and how? *Curr Opin Gastroenterol*. 2013. [Epub ahead of print].

- Van den Heuvel MC, de Jong KP, Boot M, Slooff MJ, Poppema S, Gouw AS. Preservation of bile ductules mitigates bile duct loss. *Am J Transplant.* 2006; 6: 2660-71.
- Van der Westhuyzen DR, de Beer FC, Webb NR. HDL cholesterol transport during inflammation. *Curr Opin Lipidol.* 2007; 18: 147-51.
- Van Eyken P, Sciot 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.
- Varma MJ, Breuls RG, Schouten TE, Jurgens WJ, Bontkes HJ, Schuurhuis GJ, van Ham SM, van Milligen FJ. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev.* 2007; 16: 91-104.
- Venkatanarasimha N, Thomas R, Armstrong EM, Shirley JF, Fox BM, Jackson SA. Imaging features of ductal plate malformations in adults. *Clin Radiol.* 2011 ;66: 1086-93.
- Vercelino R, Crespo I, de Souza GF, Cuevas MJ, de Oliveira MG, Marroni NP, González-Gallego J, Tuñón MJ. S-nitroso-N-acetylcysteine attenuates liver fibrosis in cirrhotic rats. *J Mol Med (Berl).* 2010; 88: 401-11.
- Verstovsek S. Therapeutic potential of Janus-activated kinase-2 inhibitors for the management of myelofibrosis. *Clin Cancer Res.* 2010; 16: 1988-9.
- Verthelyi D. Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *Int Immunopharmacol.* 2001; 1: 983-93.
- Vítek L, Schwertner HA. The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Adv Clin Chem.* 2007; 43: 1-57

- Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation in portal-hypertensive rat model: a primary factor for maintenance of chronic portal hypertension. *Am J Physiol.* 1983; 244: G52-7.
- Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Increased blood flow through the portal system in cirrhotic rats. *Gastroenterology.* 1984; 87: 1120-6.
- Wagner M, Zollner G, Trauner M. Nuclear receptor regulation of the adaptive response of bile acid transporters in cholestasis. *Semin Liver Dis.* 2010; 30: 160-77.
- Wait RB, Kahng KU. Renal failure complicating obstructive jaundice. *Am J Surg.* 1989; 157: 256-63.
- 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.
- Wang D, Zhang H, Liang J, Li X, Feng X, Wang H, Hua B, Liu B, Lu L, Gilkeson GS, Silver RM, Chen W, Shi S, Sun L. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus: 4 years experience. *Cell Transplant.* 2012. [Epub ahead of print].
- Wang G, Shen H, Rajaraman G, Roberts MS, Gong Y, Jiang P, Burczynski F. Expression and antioxidant function of liver fatty acid binding protein in normal and bile-duct ligated rats. *Eur J Pharmacol.* 2007; 560: 61-8.
- 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.
- Wang WB, Fan JM, Zhang XL, Xu J, Yao W. Serial expression analysis of liver regeneration-related genes in rat regenerating liver. *Mol Biotechnol.* 2009; 43: 221-31.
- Wang Y, Gao J, Zhang D, Zhang J, Ma J, Jiang H. New insights into the antifibrotic effects of sorafenib on hepatic stellate cells and liver fibrosis. *J Hepatol.* 2010; 53: 132-44.
- Wang Y, Lian F, Li J, Fan W, Xu H, Yang X, Liang L, Chen W, Yang J. Adipose derived mesenchymal stem cells transplantation via portal vein improves

- microcirculation and ameliorates liver fibrosis induced by CCl₄ in rats. *J Transl Med.* 2012; 10: 133
- Wang YJ, Wu JC, Lee SD, Tsai YT, Lo KJ. Gonadal dysfunction and changes in sex hormones in postnecrotic cirrhotic men: a matched study with alcoholic cirrhotic men. *Hepatogastroenterology.* 1991; 38: 531-4.
- Wang Y, Lian F, Li J, Fan W, Xu H, Yang X, Liang L, Chen W, Yang J. Adipose derived mesenchymal stem cells transplantation via portal vein improves microcirculation and ameliorates liver fibrosis induced by CCl₄ in rats. *J Transl Med.* 2012; 10: 133.
- Wasmuth HE, Tacke F, Trautwein C. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis.* 2010; 30: 215-25.
- Wasmuth HE, Weiskirchen R. Pathogenesis of liver fibrosis: modulation of stellate cells by chemokines. *Z Gastroenterol.* 2010; 48: 38-45.
- Waynforth HB, Flecknell PA. Anaesthesia and postoperative care. In: Waynforth HB, Flecknell PA, editors. *Experimental and Surgical Technique in the Rat.* London. Elsevier Academic Press. 2004; pp 100-152.
- Webster D, Bignell AH, Attwood EC. An assessment of the suitability of bromocresol green for the determination of serum albumin. *Clin Chim Acta.* 1974; 53: 101-8.
- Wedemeyer I, Bechmann LP, Odenthal M, Jochum C, Marquitan G, Drebber U, Gerken G, Gieseler RK, Dienes HP, Canbay A. Adiponectin inhibits steatotic CD95/Fas up-regulation by hepatocytes: therapeutic implications for hepatitis C. *J Hepatol.* 2009; 50: 140-9.
- Wells RG, Kruglov E, Dranoff JA. Autocrine release of TGF-beta by portal fibroblasts regulates cell growth. *FEBS Lett.* 2004; 559: 107-10.
- Weng HL, Wang BE, Jia JD, Wu WF, Xian JZ, Mertens PR, Cai WM, Dooley S. Effect of interferon-gamma on hepatic fibrosis in chronic hepatitis B virus infection: a randomized controlled study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2005; 3: 819-28.
- Westwick JK, Weitzel C, Leffert HL, Brenner DA. Activation of Jun kinase is an early event in hepatic regeneration. *J Clin Invest.* 1995; 95: 803-10.

- Wiest R, Rath HC. Gastrointestinal disorders of the critically ill. Bacterial translocation in the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2003; 17: 397-425.
- Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, Gochuico BR, Rosas IO, Cheever AW, Wynn TA. Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *J Exp Med.* 2010; 207: 535-52.
- Williams JT, Southerland SS, Souza J, Calcutt AF, Cartledge RG. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg* 1999; 65: 22-6.
- Winau F, Quack C, Darmoise A, Kaufmann SH. Starring stellate cells in liver immunology. *Curr Opin Immunol.* 2008; 20: 68-74.
- Witkowska-Zimny M, Walenko K. Stem cells from adipose tissue. *Cell Mol Biol Lett.* 2011; 16: 236-57.
- Wise AF, Ricardo SD. Mesenchymal stem cells in kidney inflammation and repair. *Nephrology (Carlton).* 2012; 17: 1-10.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 2000; 61: 364-70.
- Wu SJ, Yang YH, Tsuneyama K, Leung PS, Illarionov P, Gershwin ME, Chuang YH. Innate immunity and primary biliary cirrhosis: activated invariant natural killer T cells exacerbate murine autoimmune cholangitis and fibrosis. *Hepatology.* 2011; 53: 915-25.
- Wynn TA, Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis.* 2010; 30:2 45-57.
- Wynn TA. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *J Exp Med.* 2011; 208: 1339-50.
- Xia JL, Dai C, Michalopoulos GK, Liu Y. Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation. *Am J Pathol.* 2006; 168 :1500-12.
- Xia X, Demorrow S, Francis H, Glaser S, Alpini G, Marziani M, Fava G, Lesage G. Cholangiocyte injury and ductopenic syndromes. *Semin Liver Dis.* 2007; 27: 401-12.

- Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, Yarmush ML. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant* 2010; 19: 667-79.
- 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.
- Yang J, Zhang H, Zhao L, Chen Y, Liu H, Zhang T. Human adipose tissue-derived stem cells protect impaired cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation injury through hypoxia-induced paracrine mechanism. *Cell Biochem Funct.* 2012; 30: 505-14.
- Yang YY, Liu H, Nam SW, Kunos G, Lee SS. Mechanisms of TNF α -induced cardiac dysfunction in cholestatic bile duct-ligated mice: interaction between TNF α and endocannabinoids. *J Hepatol.* 2010; 53: 298-306.
- Yang JD, Kim WR, Coelho R, Mettler TA, Benson JT, Sanderson SO, Therneau TM, Kim B, Roberts LR. Cirrhosis is present in most patients with hepatitis B and hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011; 9: 64-70.
- Yang H, Zhao LF, Zhao ZF, Wang Y, Zhao JJ, Zhang L. Heme oxygenase-1 prevents liver fibrosis in rats by regulating the expression of PPAR γ and NF- κ B. *World J Gastroenterol.* 2012; 18:1680-8.
- Yañez R, Lamana ML, García-Castro J, Colmenero I, Ramírez M, Bueren JA. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* 2006; 24: 2582-91.
- Yarak S, Okamoto OK. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. *An Bras Dermatol.* 2010; 85: 647-56
- Yi T, Song SU. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res.* 2012; 35: 213-21.
- Yokomori H, Oda M, Yasogawa Y, Nishi Y, Ogi M, Takahashi M, Ishii H. Enhanced expression of endothelin B receptor at protein and gene levels in human cirrhotic liver. *Am J Pathol.* 2001; 159: 1353-62.

- Yoon E, Dhar S, Chun DE, Gharibjanian NA, Evans GR. In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *Tissue Eng.* 2007; 13: 619-27.
- Yoshiji H, Kuriyama S, Miyamoto Y, Thorgeirsson UP, Gomez DE, Kawata M, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Tsujinoue H, Nakatani T, Thorgeirsson SS, Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model. *Hepatology* 2000; 32: 1248-54.
- Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, Sato K, Inoue K, Nagase T, Koshima I, Gonda K. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol.* 2006; 208: 64-76.
- Yukawa H, Noguchi H, Oishi K, Takagi S, Hamaguchi M, Hamajima N, Hayashi S. Cell transplantation of adipose tissue-derived stem cells in combination with heparin attenuated acute liver failure in mice. *Cell Transplant.* 2009; 18: 611-8.
- Yung S, Chan TM. Glycosaminoglycans and proteoglycans: overlooked entities?. *Perit Dial Int.* 2007; 27 Suppl 2: S104-9.
- Yurci A, Yucesoy M, Unluhizarci K, Torun E, GURSOY S, BASKOL M, GUVEN K, OZBAKIR O. Effects of testosterone gel treatment in hypogonadal men with liver cirrhosis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2011; 35: 845-54.
- Zaitoun AM, Apelqvist G, Wikell C, Al-Mardini H, Bengtsson F, Record CO. Quantitative studies of testicular atrophy following portacaval shunt in rats. *Hepatology.* 1998; 28: 1461-6.
- 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.
- Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, Giunti D, Ceravolo A, Cazzanti F, Frassoni F, Mancardi G, Uccelli A. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005; 106: 1755-61.

- Zhang H, Liu Z, Li R, Wang D, Liu W, Li J, Yu H, Zhang F, Dou K. Transplantation of embryonic small hepatocytes induces regeneration of injured liver in adult rat. *Transplant Proc.* 2009; 41: 3887-92.
- Zhang S, Dai H, Wan N, Moore Y, Dai Z. Promoting long-term survival of insulin-producing cell grafts that differentiate from adipose tissue-derived stem cells to cure type 1 diabetes. *PLoS One.* 2011; 6: e29706
- Zhao R, Duncan SA. Embryonic development of the liver. *Hepatology.* 2005; 41: 956-67.
- Zhao S, Fu YM, Li XF, Jin ZF, Zhao RB, Huang Q, Zhang FM, Zhang WH. Alterations of bone marrow sinusoidal endothelium in rat and patients with liver cirrhosis. *Dig Dis Sci.* 2010; 55: 654-61.
- Zhou Y, Yuan J, Zhou B, Lee AJ, Lee AJ, Ghawji M Jr, Yoo TJ. The therapeutic efficacy of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on experimental autoimmune hearing loss in mice. *Immunology.* 2011; 133: 133-40.
- Zhu, J., Yamane, H. and Paul, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu. Rev. Immunol.* 2010; 28: 445-89.
- Zhu Y, Kodvawala A, Hui DY. Apolipoprotein E inhibits toll-like receptor (TLR)-3- and TLR-4-mediated macrophage activation through distinct mechanisms. *Biochem J.* 2010; 428: 47-54.
- Zhu W, Shi XL, Xiao JQ, Gu GX, Ding YT, Ma ZL. Effects of xenogeneic adipose-derived stem cell transplantation on acute-on-chronic liver failure. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2013; 12: 60-7.
- 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, Trauner M. Mechanisms of cholestasis. *Clin Liver Dis.* 2008; 12: 1-26.
- Zolochevska O, Xia X, Williams BJ, Ramsay A, Li S, Figueiredo ML. Sonoporation delivery of interleukin-27 gene therapy efficiently reduces prostate tumor cell growth in vivo. *Hum Gene Ther.* 2011; 22: 1537-50.
- 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; 7: 211-28.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002; 13: 4279-95.

Zvibel I, Smets F, Soriano H. Anoikis: roadblock to cell transplantation? *Cell Transplant*. 2002; 11: 621-30.

ANEXO I: TABLAS

Tabla 15: Volumen de líquido ascítico en los grupos de ratas con colestasis microquirúrgica de las series IV, V y VI: **C-2s:** Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas p.o. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 5 semanas p.o. **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 8 semanas p.o.

GRUPO	Ascitis (ml)
C-2s (n=8)	0 \square
CS-5s (n=12)	0 \square
CCM-5s (n=11)	0,71±1,49 \square
CS-8s (n=7)	4,53±4,91
CCM-8s (n=11)	2,67±3,54

Media \pm DE; \square $p < 0.05$: Resultado estadísticamente significativo respecto del grupo CS-8s.

Tabla 16: Circulación colateral portosistémica en ratas con colestasis microquirúrgica en las series IV, V y VI: Areas paraesofágica (CPE), esplenorrenal (CER), y pararrectal (CPR) **C-2s:** Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 8 semanas de p.o.

GRUPO	CPE		CER		CPR	
	n	%	n	%	n	%
C-2s (n=8)	7	87,5	5	62,5	5	62,5
CS-5s (n=11)	10	90,9	11	100*	9	81,8
CCM-5S (n=11)	9	81,8	8	72,7*	7	63,6
CS-8s (n=7)	7	100	7	100*	7	100
CCM-8s (n=11)	11	100	11	100*	11	100

* $p < 0.05$: Valor estadísticamente significativo respecto de CS-2s.

Tabla 17: Vasculopatía venosa mesentérica de grado 0 (ausente), grado I (secundaria al clampaje de la vena mesentérica superior) y grado II (espontánea) en los grupos de ratas con colestasis microquirúrgica de las series IV, V y VI.: **C-2s**: Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. **CS-5s**: Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CCM-5s**: Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CS-8s**: Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **CCM-8s**: Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 8 semanas de p.o.

GRUPO	GRADO 0		GRADO I		GRADO II	
	n	%	n	%	n	%
C-2s (n=8)	2	25	6	75	0	0
CS-5s (n=11)	3	27,3	8	72,7	0	0
CCM-5S (n=11)	3	27,3	8	72,7	0	0
CS-8s (n=7)	0	0	7	100	0	0
CCM-8s (n=11)	0	0	11	100	0	0

Tabla 18: Peso corporal inicial (PCI;g), peso corporal final (PCF;g), e incremento de peso corporal (ΔPC ; g) en los grupos de ratas con colestasis microquirúrgica : **C-2s: Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. **CS-5s**: Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CCM-5s**: Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CS-8s**: Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **CCM-8s**: Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocitos y sacrificio a las 8 semanas de p.o.)**

GRUPO	PCI (g)	PCF (g)	Δ PC (g)
CS-2s (n=8)	362,81 +/- 24,81	336,88 +/- 23,48	-25,94 +/- 19,13
CS-5s (n=11)	274,63*** +/- 22,76	282,55* +/- 29,42	7,73 +/- 23,76
CCM-5S (n=11)	278,53*** +/- 28,32	264,23** +/- 32,64	-20,41 +/- 35,37
CS-8s (n=7)	269,28*** +/- 32,04	287,21* +/- 45,61	29,29**●● +/- 37,26
CCM-8s (n=11)	291,75*** +/- 32,76	316,64● +/- 64,43	21,91*● +/- 52,66

Media \pm DE; *p<0.05; **p<0,01; ***p<0.001: Valor estadísticamente significativo respecto de CS-2s; ●p<0.05; ●●p<0.01: Resultado estadísticamente significativo respecto de CCM-5s

Tabla 19: Peso hepático (PH;g) y Relación peso hepático / peso corporal \times 100 (PH/PC; %) en ratas con colestasis microquirúrgica C-2s: Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. CS-5s: Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. CCM-5s: Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o. CS-8s: Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. CCM-8s: Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.

GRUPO	PH	PH/PC x100
C-2s (n=8)	16,89 $\square\square\square$ ● +/- 0,94	5,03 $\square\square\square$ +/- 0,41
CS-5s (n=12)	14,62 $\square\square\square$ +/- 4,11	5,15 $\square\square\square$ +/- 1,27
CCM-5S (n=11)	12,41 $\square\square\square$ +/- 4,84	5,23 $\square\square\square$ +/- 1,20
CS-8s (n=7)	23,36 +/- 3,43	8,20 +/- 1,05
CCM-8s (n=11)	17,95 $\square\square\square$ ● +/- 5,42	5,74 $\square\square\square$ +/- 1,59

Media \pm DE; $\square\square$ $p < 0,01$; $\square\square\square$ $p < 0,001$: Valor estadísticamente significativo respecto de CS-8s; ● $p < 0,05$: Resultado estadísticamente significativo respecto de CCM-5s

Tabla 21: Peso esplénico (PE;g), Relación peso esplénico / peso corporal x 100 (PE/PC; %) en ratas con colestasis microquirúrgica **C-2s:** Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. **C-2s:** Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.

GRUPO	PE	PE/PC (%)
C-2s (n=8)	1,09 +/- 0,12	0,32 +/- 0,04
CS-5s (n=12)	1,47 +/- 0,52	0,51** +/- 0,15
CCM-5S (n=11)	1,27 +/- 0,32	0,48* +/- 0,12
CS-8s (n=7)	1,65* +/- 0,18	0,58*** +/- 0,11
CCM-8s (n=11)	1,45 +/- 0,65	0,46* +/- 0,19

Media \pm DE; * $p < 0.05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0.001$: Valor estadísticamente significativo respecto de CS-2s.

Tabla 22: *Peso testicular bilateral (PT;g) Y Relación peso testicular / peso corporal x 100 (PT/PC; %) en ratas con colestasis microquirúrgica. C-2s: Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. CS-5s: Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. CCM-5s: Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o. CS-8s: Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. CCM-8s: Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.*

GRUPO	PT	PT/PC (%)
C-2s (n=8)	3,18 +/- 0,22	0,95 +/- 0,09
CS-5s (n=12)	2,44* +/- 0,49	0,86 \square +/- 0,14
CCM-5S (n=11)	2,16** +/- 0,58	0,81 +/- 0,17
CS-8s (n=7)	1,85*** +/- 0,94	0,64** +/- 0,32
CCM-8s (n=11)	2,55 +/- 0,98	0,78 +/- 0,24

Media \pm DE; * $p < 0.05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0.001$: Valor estadísticamente significativo respecto de CS-2s; $\square p < 0.05$: Resultado estadísticamente significativo respecto de CS-8s

Tabla 23: *Concentraciones séricas de Bilirrubina Total (BT; mg/dl) y Bilirrubina Directa (BD; mg/dl), AST (U/L), ALT (U/L), LDH (U/L), FA(U/L) y GGT ((U/L) en grupos de ratas con colestasis microquirúrgica C-2s: Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. CS-5s: Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. CCM-5s: Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o. CS-8s: Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. CCM-8s: Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.*

GRUPO	BT (mg/dl)	BD (mg/dl)	AST (U/L)	ALT (U/L)	LDH (U/L)	FA (U/L)	GGT (U/L)
C-2s (n=8)	13,15 ± 1,34	7,93 ± 0,74	259,13 ± 68,65	88,75 ± 25,36	849,33 ± 762,24	111,62 ± 31,89	12,50 ± 4,66
CS-5s (n=11)	7,10 ± 2,72	3,93 ± 1,95	263,00 ± 110,83	54,40 ± 29,35	1442,36 ± 1218,91	14,90 ± 11,41	18,50 ± 5,76
CCM-5S (n=10)	7,00 ± 2,49	3,66 ± 1,72	209,11 ± 57,41	41,22 ± 22,94	1159,68 ± 895,72	14,63 ± 18,08	17,11 ± 7,41
CS-8s (n=4)	8,59 ± 0,80	5,14 ± 0,62	273,50 ± 149,39	34,50 ± 18,45	1487,45 ± 2076,35	-	52,50 ± 21,86
CCM-8s (n=10)	7,68 ± 5,26	4,17 ± 3,05	277,43 ± 195,63	46,29 ± 36,73	1050,71 ± 1536,71	-	31,57 ± 19,70

Tabla 24. Concentraciones séricas de ácidos biliares (Ac. Bil; $\mu\text{mol/L}$), creatinina (Cr; mg/dl), albúmina (Alb;g/dl) y proteínas totales (PT;g/dl) en grupos de ratas con colestasis microquirúrgica **C-2s:** Colestasis microquirúrgica y sacrificio a las 2 semanas de p.o. **CS-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CCM-5s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 5 semanas de p.o. **CS-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de suero salino y sacrificio a las 8 semanas de p.o. **CCM-8s:** Colestasis microquirúrgica con administración de células madre prediferenciadas a hepatocito y sacrificio a las 8 semanas de p.o.

GRUPO	Ac bil ($\mu\text{mol/L}$)	Cr (mg/dl)	Alb (g/dl)	PT (g/dl)
C-2s (n=8)	133,92 ± 20,45	0,53 ± 0,08	2,12 ± 0,19	4,75 ± 0,52
CS-5s (n=11)	51,24 ± 29,75	0,51 ± 0,07	1,83 ± 0,46	4,76 ± 1,29
CCM-5S (n=10)	33,31 ± 18,51	0,51 ± 0,04	1,73 ± 0,33	4,35 ± 0,99
CS-8s (n=4)	37,17 ± 14,41	0,52 ± 0,10	1,60 ± 0,30	3,90 ± 0,71
CCM-8s (n=10)	56,37 ± 14,11	0,55 ± 0,05	2,01 ± 0,38	4,83 ± 0,87

