

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



TESIS DOCTORAL

TERAPIA DE LA ENFERMEDAD HEPÁTICA
EXPERIMENTAL MEDIANTE TRASPLANTE DE
CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE DE
CORDÓN UMBILICAL HUMANO

2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Ana Isabel Álvarez Mercado
D.L.: GR. 1790-2009
ISBN: 978-84-692-1317-9

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Tomás de Haro Muñoz
D.L.: En trámite
ISBN: En trámite

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II

TESIS DOCTORAL

TERAPIA DE LA ENFERMEDAD HEPÁTICA
EXPERIMENTAL MEDIANTE TRASPLANTE DE
CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE DE
CORDÓN UMBILICAL HUMANO

**Memoria presentada por la Licenciada Ana I. Álvarez
Mercado para optar al grado de Doctora por la
Universidad de Granada.**

Fdo.: Ana Isabel Álvarez Mercado

Vº Bº de los directores:

Fdo.: Luis Fontana Gallego

Fdo.: M^a José Sáez Lara Fdo.: Francisco Abadía Molina



ugr | Universidad
de Granada

Luis Fontana Gallego, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral titulada "Terapia de la Enfermedad Hepática Experimental Mediante Trasplante de Células Mononucleares de Sangre de Cordón Umbilical Humano", de la que es autora Dña. Ana Isabel Álvarez Mercado, ha sido realizada bajo mi dirección y asesoramiento y reúne las condiciones y calidad científica deseadas para ser presentada por la interesada para optar al grado de Doctora.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Granada, a 18 de diciembre de 2008.

Campus de Cartuja

18071 Granada
Tfno. 34 958 243 838
Fax. 34 958 248 960

Facultad de Farmacia

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



ugr

Universidad
de Granada

M^a José Sáez Lara, Profesora Sustituta Interina del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral titulada "Terapia de la Enfermedad Hepática Experimental Mediante Trasplante de Células Mononucleares de Sangre de Cordón Umbilical Humano", de la que es autora Dña. Ana Isabel Álvarez Mercado, ha sido realizada bajo mi dirección y asesoramiento y reúne las condiciones y calidad científica deseadas para ser presentada por la interesada para optar al grado de Doctora.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Granada, a 18 de diciembre de 2008.

Campus de Cartuja

18071 Granada

Tfno. 34 958 243 838

Fax. 34 958 248 960

Facultad de Farmacia

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



ugr | **Universidad
de Granada**

Francisco Abadía Molina, Profesor Titular del Departamento de Biología Celular de la Universidad de Granada

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral titulada "Terapia de la Enfermedad Hepática Experimental Mediante Trasplante de Células Mononucleares de Sangre de Cordón Umbilical Humano", de la que es autora Dña. Ana Isabel Álvarez Mercado, ha sido realizada bajo mi dirección y asesoramiento y reúne las condiciones y calidad científica deseadas para ser presentada por la interesada para optar al grado de Doctora.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Granada, a 18 de diciembre de 2008.

Campus de Cartuja

18071 Granada

Tfno. 34 958 243 838

Fax. 34 958 248 960

Facultad de Farmacia
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



ugr

Universidad
de Granada

Fermín Sánchez de Medina Contreras, Catedrático y Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral titulada "Terapia de la Enfermedad Hepática Experimental Mediante Trasplante de Células Mononucleares de Sangre de Cordón Umbilical Humano", de la que es autora Dña. Ana Isabel Álvarez Mercado, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Granada, a 18 de diciembre de 2008.

Campus de Cartuja

18071 Granada

Tfno. 34 958 243 838

Fax. 34 958 248 960

Facultad de Farmacia

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

1. Álvarez-Mercado AI, Sáez-Lara MJ, García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S, Abadía F, Cabello-Donayre M, Gil A, González-Gallego J, Fontana L. Xenotransplantation of human umbilical cord blood mononuclear cells to rats with D-Galactosamine-induced hepatitis. *Cell Transplant* 2008; 17:845-857.
2. Sáez Lara MJ, García Mediavilla MV, Sánchez Campos S, Abadía Molina F, Álvarez Mercado AI, Cabello Donayre M, Gil Hernández A, González Gallego J, Fontana Gallego L. Estudio de la diferenciación *in vitro* de células mononucleares procedentes de sangre de cordón umbilical humano en células con características de hepatocitos. *Gastroenterol Hepatol* 2007; 30 (Supl I): 135-136. Comunicación oral. XXXII Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH), 21-23 febrero 2007, Madrid.
3. Álvarez-Mercado AI, Sánchez-Campos S, García-Mediavilla MV, Abadía F, Sáez-Lara MJ, Cabello-Donayre M, Gil A, Gonzalez-Gallego J, Fontana L. Trasplante de células mononucleares humanas de sangre de cordón umbilical a ratas con hepatitis experimental. *Gastroenterol Hepatol* 2008; 31 (Supl I):89-159. Comunicación oral. XXXIII Congreso de la Asociación Española para el Estudio del Hígado (AEEH), 20-22 febrero 2008, Madrid.

Los gastos derivados de la realización de este trabajo han sido sufragados gracias a los siguientes proyectos y contratos de investigación:

1. Tratamiento de la Enfermedad Hepática Crónica Mediante el Trasplante de Células Madre. Entidad financiadora: Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (PI050520).

2. Trasplante de Células Madre Como Terapia de la Enfermedad Hepática Crónica. Entidad financiadora: Junta de Andalucía (P06-CTS-01365).

3. Empleo de Células Progenitoras de Cordón Umbilical en Modelos Experimentales de Enfermedad Hepática. Entidad financiadora: S. G. R. ATECO, S. L. Contrato 2851-00, suscrito con la Fundación Empresa Universidad de Granada.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
<hr/>	
II. ANTECEDENTES	5
<hr/>	
1. Células madre	7
1.2. Definición	7
1.3. Clasificación	8
1.3.1. Células madre embrionarias	9
1.3.2. Células madre germinales	10
1.3.3. Células madre somáticas	10
1.3.3.1. Células progenitoras mesenquimales	11
1.3.3.2. Células madre neuronales	12
1.3.3.3. Células madre hepáticas.....	10
1.3.3.4. Células progenitoras pancreáticas.....	12
1.3.3.5. Células madre del músculo esquelético	13
o células satélite.....	13
1.3.3.6. Células progenitoras de la epidermis	13
1.3.3.7. Células madre del pulmón	14
1.3.3.8. Células madre del epitelio intestinal.....	14
1.3.3.9. Células madre hematopoyéticas	15
1.3.3.9.1. Marcadores de las células madre hematopoyéticas .	16
1.3.3.9.2. Fuentes de las células madre hematopoyéticas	17
2. El hígado	19
2.1. Funciones del hígado	19
2.2. Enfermedades hepáticas	20
2.2.1. Esteatosis y esteatopatitis no alcohólica	21
2.2.2. Fibrosis	22
2.2.2.1. Marcadores de la fibrosis hepática.....	26
2.2.3. Cirrosis hepática.....	29
3. El fallo hepático fulminante	31
3.1. Modelo de fallo hepático fulminante/hepatitis inducido por D- galactosamina	33
4. Modelo de cirrosis hepática experimental producida por tioacetamida ..	35
4.1. Generalidades	35
4.2. Alteraciones histológicas producidas por la tioacetamida.....	36

4.3. Alteraciones bioquímicas producidas por la tioacetamida.....	37
4.4. Mecanismo de acción de la tioacetamida.....	41
4.5. Semejanzas y diferencias del modelo de tioacetamida con la cirrosis humana	42
5. Tratamiento actual de la fibrosis hepática.....	44
5.1. Colchicina y los corticoesteroides.....	44
5.2. Glicirrizina	45
5.3. Interferón α	45
5.4. Curcumina, resveratrol y talidomida.....	45
5.5. Liv 52.....	45
5.6. Óxido Nítrico	45
5.7. Otros	46
5.8. Terapia génica.....	46
5.9. Terapia celular	46
5.9.1. Trasplante de hepatocitos.....	47
5.9.1.1. Estudios en animales	47
5.9.1.2. Estudios en humanos	49
5.9.2. Trasplante de células madre	49
III. MATERIAL Y MÉTODOS	53
1. Material	54
1.1. Animales de experimentación.....	54
1.2. Reactivos y material utilizado.....	54
1.3. Aparatos	56
2. Métodos.....	58
2.1. Obtención de la sangre de cordón umbilical	58
2.2. Aislamiento de células mononucleares de sangre de cordón umbilical humano.....	58
2.3. Determinación del número y viabilidad de las células aisladas	60
2.4. Cultivo celular	61
2.5. Cambio de medio.....	63
2.6. Extracción y purificación de ARN de células en cultivo	63
2.7. Electroforesis en gel de agarosa	66
2.8. Reacción de la transcriptasa inversa.....	67
2.9. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.....	68
2.10. <i>Western blot</i>	70

2.11. Citometría de flujo	76
2.12. Modelo experimental de hepatitis aguda provocada por D-galactosamina	78
2.12.1. Diseño experimental del trasplante	80
2.13. Modelo experimental de cirrosis provocada por tioacetamida	81
2.13.1. Diseño experimental del trasplante	82
2.14. Metodología del trasplante celular	83
2.15. Sacrificio y toma de muestras	84
2.16. Determinación en plasma de marcadores bioquímicos de daño hepático	85
2.17. Inmunofluorescencia	85
2.18. Histología	87
2.19. Microscopía confocal	88
2.20. Análisis estadístico	89
IV. RESULTADOS	91
<hr/>	
1. Estudio <i>in vitro</i>	93
1.1. RT-qPCR	94
1.2. Inmunofluorescencia	97
1.3. <i>Western blot</i>	98
2. Estudio <i>in vivo</i>	100
2.1. Modelo experimental de hepatitis aguda provocado por D-galactosamina	100
2.1.1. Relación peso hígado/peso corporal	100
a. Efecto de la D-galactosamina	101
b. Detección de células humanas en los animales trasplantados	102
2.1.2. RT-qPCR	102
2.1.3. Citometría de flujo	103
2.1.4. Microscopía confocal	105
2.1.5. <i>Western blot</i>	106
2.1.6. Efecto de las CMCUH	106
2.1.7. Marcadores bioquímicos de daño hepático	107
2.2. Modelo experimental de cirrosis provocada por TAA	110
2.2.1. Relación peso hígado/peso corporal	110
2.2.2. Relación peso bazo/peso corporal	110
a. Efecto de la TAA	112

b. Detección de células humanas en los animales trasplantados.....	113
2.2.3. RT-qPCR	114
2.2.4. Citometría de flujo	114
2.2.5. Microscopía confocal	116
2.2.6. <i>Western blot</i>	116
2.2.7. Efecto de las CMCUH	121
2.2.8. Marcadores bioquímicos de daño hepático	119
2.2.9. Efecto de las CMCUH y de la inmunosupresión en el riñón	127
V. DISCUSIÓN	129
<hr/>	
VI. CONCLUSIONES	143
<hr/>	
VII. BIBLIOGRAFÍA	147
<hr/>	
VIII. GLOSARIO	185
<hr/>	
IX. ANEXOS	189
<hr/>	

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

1. Estudio *in vitro*

Figura 1. Tipos de células madre	8
Figura 2. Mecanismo del proceso fibrogénico.....	28
Figura 3. Aislamiento de células mononucleares de sangre de ordón umbilical	59
Tabla 1. Composición del medio de cultivo.....	62
Figura 4. CMCUH en cultivo.....	93
Figura 5. Expresión de ARNm de ALB, AFP, CK-18, GS, CD 45 y CYP 3A4 de CMCUH en cultivo	98
Figura 6. Inmunofluorescencia de las CMCUH en cultivo	97
Figura 7. Perfil proteico de las CMCUH en cultivo mediante <i>western blot</i>	98

2. Estudios *in vivo*

2.1. <i>Modelo experimental de hepatitis aguda provocada por D-galactosamina</i>	
Figura 8. Relación peso hígado/peso corporal	100
Figura 9. Aspecto del hígado de una rata control (C) y otra a la que se inyectó D-Gal (grupo G)	101
Figura 10. Histología del hígado de una rata control (C) y otra del grupo G	102
Figura 11. Detección de células CD45+ humanas por citometría de flujo	104
Figura 12. Detección de CYP3A4 humano en las ratas receptoras por microscopía confocal.....	105
Figura 13. Detección de CYP 3A4 humano en los hígados de las ratas receptoras tratadas con D-Gal mediante <i>western blot</i>	106
Figura 14. Histología grupos C y HUCBM	107
Tabla 2. Marcadores bioquímicos de daño hepático	109

2.2. Modelo experimental de cirrosis provocada por tioacetamida	
Figura 15. Relación peso hígado/peso corporal	111
Figura 16. Relación peso bazo/peso corporal	111
Figura 17. Aspetto del hígado de una rata control y otra a la que se le administró TAA durante 4 meses	112
Figura 18. Histología grupos C y T	113
Figura 19. Citometría de flujo.....	115
Figura 20. Detección de CYP3A4 humano en las ratas receptoras por microscopía confocal.....	116
Figura 21. Perfil proteico de las CMCUH en cultivo mediante <i>western blot</i>	117
Figura 22. Histología grupos CU y CS	118
Figura 23. Histología grupos TU y TS.....	119
Figura 24. Concentración plasmática de albúmina.....	120
Figura 25. Actividad plasmática de AST	121
Figura 26. Actividad plasmática ALT.....	121
Figura 27. Concentración plasmática de BILT	122
Figura 28. Concentración plasmática de BILD.....	123
Figura 29. Actividad plasmática de plasmática LDH.....	124
Figura 30. Actividad plasmática de γ -GT	125
Figura 31. Concentración plasmática de urea	126
Figura 32. Concentración plasmática de creatinina.....	126
Figura 33. Histología de riñón de los grupos C y T	127
Figura 34. Histología de riñón de los grupos CS y TS.....	128
Figura 35. Histología de riñón de los grupos CU y TU	128

ABREVIATURAS

ADN	Ácido dexosirribonucleico
ADNc	Ácido dexosirribonucleico complemetario
AFP	alfa-fetoproteína
ALB	Albúmina
ALP	Fosfatasa alcalina
ALT	Alanina aminotransferasa
APS	Persulfato amónico
APS	Persulfato amónico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleoicomensajero
AST	Aspartato aminotransferasa
BSA	Albúmina de suero bovino fetal
Ck-18	Citoqueratina 18
CMCU	Células mononucleares de cordón umbilical
CMCUH	Células mononucleares de cordón umbilical humanas
CMMO	Células madre de médula ósea
CYP 3A4	Citocromo P450 3A4
d	Días
DEPC	Dietil pirocarbonato
D-Gal	D-Galactosamina
DL50	Dosis letal 50
DMEM	Medio Dulbecco´s Modified Eagle´s
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
DPP	Dipeptidil peptidasa
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetracético
EE. UU	Estados Unidos
FBS	Suero bovino fetal
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FGFa	Factor de crecimiento fibroblástico ácido humano
FGFb	Factor de crecimiento fibroblástico básico humano
FHF	Fallo hepático fulminante
GADPH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GDH	Glutamato-deshidrogenasa
γ-GT	Gamma-glutamil transferasa
GOT	Transaminasa glutamicooxalacética
GS	Glutamina sintetasa
H	Horas
H2O DEPC	Agua tratada con dietilpirocarbonato
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HEPES	Tampón ácido N-(2-hydroxiethyl)-piperazina-N'-2-etano-sulfónico

HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos humano
Ig	Inmunoglobulina
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo-1
IgG	Inmunoglobulina G
IL1	Interleucina-1
KDa	Kilo dalton
KDR	Factor de crecimiento vascular
KDR	Factor de crecimiento vascular
LDH	Lactato deshidrogenasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LIF	Factor inhibidor de leucemia
Lin	Marcador de diferenciación de linaje celular
Log	Logaritmo
LPS	Lipopolisacárido
MCP-1	Proteína quimiostática de monocitos-1
min	Minutos
MMP	Metaloproteasa
NADP+	Nicotín adenín dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NADPH	Nicotín adenín dinucleótido fosfato (forma reducida)
NF-KB	Factor de transcripción nuclear Kappa B
NO	Óxido nítrico
NOD/SCID	Ratón inmunodeficiente diabético no obeso con inmunodeficiencia severa combinada
NT	Nucleótidos
° C	Grado centígrado
P	Peso
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PMFS	Fenil-metil-sulfonil fluoruro
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
RT-PCR	Transcriptasa reversa- reacción en cadena de la polimerasa
S	Svedberg
S. A	Sociedad anónima
SCF	Factor de crecimiento de células madre
SCID	Ratones inmunodeficientes
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis de proteínas en en gel de poliacrilamida condiciones desnaturizantes
S.E.M	Error típico
S.L	Sociedad limitada
TAA	Tioacetamida
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA
TEMED	Tetrametilenetilendamina
TGFα	Factor de transformación del crecimiento- α
TGF-β1	Factor de transformación del crecimiento- β
TNF-α	Factor de necrosis tumoral- α
U	Unidad
UV	Ultravioleta

V	Voltios
v	Volumen
VHB	virus de la hepatitis B
VHC	virus de la hepatitis C
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
W	Wattios
xg	Aceleración de la gravedad

I. Introducción y objetivos

Las enfermedades hepáticas suponen un alto coste para la sociedad ya que afectan aproximadamente al 17% de la población mundial. El tratamiento actual de la enfermedad hepática terminal consiste en el trasplante de hígado, pero está limitado por la escasez de órganos donantes. Además, hoy día no existe ningún tratamiento específico de la fibrosis que se desarrolla en las enfermedades hepáticas crónicas independientemente de su etiología (alcohol, virus, fármacos, tóxicos, patología biliar, enfermedades genéticas, etc). El desarrollo de alternativas es, por tanto, un objetivo fundamental de la investigación actual para mejorar el sufrimiento de muchos enfermos.

Dentro de estas alternativas se encuadra la terapia celular. Algunas de las células con las que se está investigando son los hepatocitos y las células madre hematopoyéticas. Por lo que se refiere al empleo de hepatocitos, numerosos grupos se encuentran investigando sobre trasplante de estas células en modelos animales de daño hepático. Desde 1998, además, se vienen llevando a cabo en diversos países experimentos similares en enfermos humanos con resultados alentadores.

Otra modalidad de células utilizadas son las progenitoras hematopoyéticas adultas, bien de médula ósea (CMMO), bien de sangre de cordón umbilical (CMCU). De entre los muchos trabajos publicados sobre terapia con células madre hematopoyéticas cabe destacar los de Lagasse *et al.*, Sakaida *et al.* y Nonome *et al.* Los primeros han demostrado que las CMMO dan lugar a hepatocitos funcionales en el hígado de ratones con tirosinemia, mientras que el grupo de Nonome consiguió resultados similares trasplantando CMCU a ratones con daño hepático por sobreexpresión de ligando Fas. Utilizando CMMO, Sakaida y colaboradores han descrito una reducción de la fibrosis hepática inducida en ratones mediante inyección de tetracloruro de carbono. Asimismo, se han llevado a cabo estudios clínicos de fase I no controlados y no aleatorizados con CMMO, consiguiéndose una mejora de la función hepática en algunos pacientes.

Nuestro grupo trabaja en el área de medicina regenerativa del hígado, y tiene como **objetivo a largo plazo** desarrollar una terapia dirigida al tratamiento de la enfermedad hepática. La terapia que estamos investigando y que aparece recogida en esta memoria se ha basado en la utilización de células mononucleares humanas aisladas a partir de sangre de cordón umbilical (CMCUH). En este sentido, nuestro **primer objetivo específico** ha consistido en investigar la capacidad de diferenciación *in vitro* de las CMCUH, con la idea de comprobar si pueden transdiferenciarse en hepatocitos. Además, como **segundo objetivo específico** hemos investigado la hipótesis de si el trasplante de CMCUH resulta útil como tratamiento de la patología hepática. Con este fin, hemos llevado a cabo experimentos de trasplante de estas células en dos modelos experimentales distintos de enfermedad, uno agudo y otro crónico. El modelo agudo simula las alteraciones hepáticas de la hepatitis vírica y no desarrolla fibrosis; el modelo crónico, en el que sí se forma una fibrosis intensa, mimetiza las lesiones de la cirrosis hepática.

II. Antecedentes

1.- CÉLULAS MADRE

1.1.- Definición

Las células madre son aquellas células dotadas simultáneamente de la capacidad de regenerar uno o más tipos de células diferenciadas y de autorrenovarse, es decir, producir más células madre (Fischbach y Fischbach, 2004). Las células madre componen un reservorio de células potenciales en varios estadios de desarrollo que pueden ser usadas para la restauración y regeneración de tejidos y órganos dañados. Bajo las condiciones apropiadas, se pueden diferenciar en tejidos y órganos especializados. Estas propiedades únicas las convierten en un prometedora herramienta para el estudio de terapias de enfermedades crónicas de hígado, corazón, lesiones espinales, Parkinson, Alzheimer, degeneración de la retina y diabetes *mellitus* (Banas *et al.*, 2007).

Las características más destacables de las células madre son: (Oertel y Shafritz., 2007).

- Capacidad de autorrenovación y automantenimiento.
- Multipotencialidad, es decir, son capaces de generar al menos dos linajes celulares distintos.
- Funcionalidad, es decir, capacidad de reconstrucción de tejidos a largo plazo.
- Trasplantabilidad.

Las células madre se pueden dividir simétrica o asimétricamente. Cuando se dividen simétricamente, cada célula hija es idéntica y mantiene el potencial de la célula de la que procede. Cuando se dividen asimétricamente, una de las células mantiene sus propiedades de célula madre, mientras la otra comienza el proceso de diferenciación; se conserva así su número en el tejido y, a la vez, se

produce la diferenciación en tejidos y órganos (Fischbach y Fischbach, 2004; Serakinci y Keith, 2006).

Se define la plasticidad o diferenciación potencial de una célula madre como su capacidad para transitar a través de la circulación, llegar a un nuevo tejido y alterar su función dependiendo del nuevo microambiente (Blau *et al.*, 2001). En general, las células madre se dividen raras veces pero, en presencia de un estímulo apropiado como puede ser un incremento de la demanda celular, pueden proliferar y diferenciarse. Esta situación se observa, por ejemplo, en la epidermis donde el tejido progenitor compuesto por células madre adultas, proporciona una amplia población celular capaz de proliferar y diferenciarse en más células maduras con funciones específicas que, por último, cesan de proliferar (Serakinci y Keith, 2006).

1.3.- Clasificación

Las células madre se clasifican en tres categorías: embrionarias, germinales y somáticas. Las somáticas son también conocidas como adultas o derivadas de tejidos celulares. Las células madre embrionarias se distinguen de las somáticas no sólo en los posibles linajes en que pueden diferenciarse sino en el mecanismo a través del cual se multiplican (Serakinci y Keith, 2006). Véase figura 1.

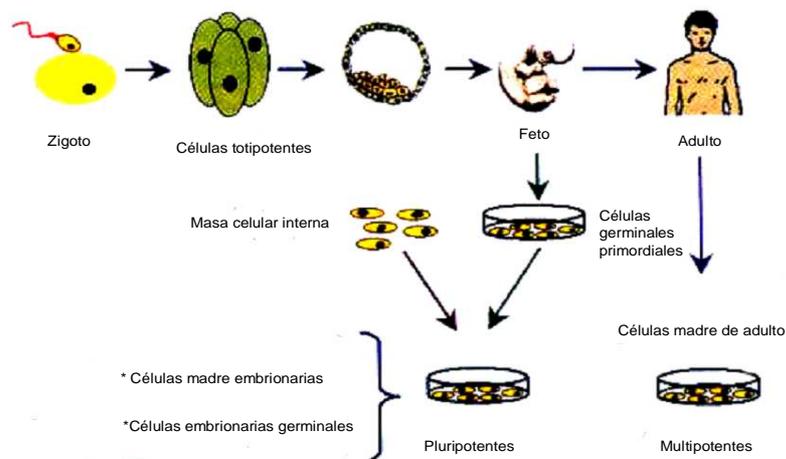


Fig. 1. Tipos de células madre. www.pulevasalud.com

1.3.1.- Células madre embrionarias

Desde el momento de la fecundación, una única célula, el cigoto, tiene la capacidad de diferenciarse y especializarse hasta formar un tejido embrionario o adulto. Cuando el cigoto llega al periodo bicelular experimenta una serie de divisiones mitóticas que producen un aumento en el número de células. Estas células, que se hacen más pequeñas y compactas en cada división segmentaria, se denominan blastómeros. Cuando existen entre doce y trece blastómeros, el ser humano en desarrollo se designa mórula. Las células internas de la mórula (masa celular interna) están rodeadas de una capa de células que constituyen la capa celular externa. La mórula esférica se forma unos tres días después de la fecundación y se introduce en el útero. A continuación, aproximadamente cuatro días después de la fecundación, aparece dentro de la mórula un espacio lleno de líquido denominado cavidad del blastocisto. Durante esta etapa del desarrollo o blastogenia, el producto de la concepción se conoce como blastocisto. Unos seis días después de la fecundación, el blastocisto se adhiere al epitelio endometrial (Moore y Persaud, 2005). Bajo condiciones óptimas, células de la masa celular interna del blastocisto preimplantado son capaces de proliferar indefinidamente, si bien el proceso natural es la pérdida de potencialidad y la especialización de funciones, considerándose un proceso unidireccional en la embriología (Ringe y Kaps, 2002).

Las células madre embrionarias se aislaron por primera vez en 1981 de embriones de ratón (Evans y Kaufman, 1981). En humanos, el aislamiento y descripción de las líneas celulares embrionarias tuvo lugar varios años después y fue realizado por Thomson *et al.* en 1998. Este tipo de células son las únicas capaces de autorrenovarse y diferenciarse en los distintos linajes celulares. Las células madre obtenidas de embriones en la etapa del blastocisto tienen la capacidad de formar todas las células del cuerpo ya que mantienen el cariotipo normal y una alta actividad telomerasa. Además, logran en cultivo un notable potencial de proliferación durante un largo periodo

de tiempo dando la posibilidad de una expansión ilimitada (Rojas *et al.*, 2004).

Su uso ha levantado una significativa discusión ética debido a la destrucción del blastocisto. La legislación y aceptación públicas concernientes a su utilización varía en los distintos países. Por otro lado, su uso se vuelve más dificultoso debido al pobre índice de éxito en el establecimiento de líneas celulares provenientes del blastocisto, a lo que se une que no todas las líneas están bien caracterizadas y la falta de disponibilidad, lo que supone un obstáculo para su investigación (Matikainen y Laine, 2005).

1.3.2.- Células madre germinales

Las células madre germinales derivan de la capa germinal primaria del embrión (Sagar *et al.*, 2007). En los estadios tempranos de la embriogénesis, se localizan en las crestas germinales, las cuales migran hacia las gónadas primitivas, diferenciándose en células germinales masculinas o femeninas. Estudios iniciados en 1970 con trasplante de células germinales demostraron su pluripotencia y tumorigenicidad. Stevens (1970) trasplantó células de las crestas germinales de ratones con veintidós días de vida fetal en testículos de ratones singénicos adultos, produciendo teratocarcinomas, es decir, cánceres con múltiples linajes celulares, pudiendo contener todos los elementos celulares de un tejido adulto, como placenta y saco vitelino. Durante un desarrollo normal, el blastocisto es capaz de controlar completamente la diferenciación de estas células mediante mensajeros intra y extracelulares (Lechner, 2007).

1.3.3.- Células madre somáticas

Las células madre somáticas o adultas son células con una menor capacidad replicativa que las células madre embrionarias (Sagar *et al.*, 2007). Se cree que están presentes en todos los tejidos y que son las responsables de su conservación (Serakinci y Keith,

2006; Matikainen y Laine, 2005). Se trata de células poco frecuentes ($1:10^7 - 10^8$ de la totalidad de células del organismo), siendo su uso en investigación menos controvertido que el de las células madre embrionarias, ya que se pueden conseguir a partir de donaciones voluntarias (Matikainen y Laine., 2005).

Conocer el fenotipo de la célula madre adulta es uno de los objetivos primordiales de las investigaciones actuales, ya que el porcentaje de estas células en los tejidos es muy pequeño. Se habla de una de cada diez mil células en la médula ósea y un cinco por ciento en el músculo esquelético (Garrido, 2003). Hennessy *et al.* (2004) clasifican las células madre adultas caracterizadas fenotípicamente en: mesenquimales, neuronales, hepáticas, pancreáticas, del músculo esquelético, de la epidermis, del pulmón y del epitelio intestinal y hematopoyéticas.

1.3.3.1.- Células progenitoras mesenquimales

Son un tipo de células fibroblásticas sumamente proliferativas y adherentes. Se encuentran principalmente en la médula ósea aunque pueden ser aisladas de otros tejidos conectivos y de la sangre periférica (Hong *et al.*, 2005). Representan una fuente atractiva de células madre para aplicaciones clínicas ya que se emplean en la regeneración de tejidos dañados debido a su caracterización como células no diferenciadas con posibilidad de autorrenovación, alto poder de proliferación y con capacidad de diferenciación mesodérmica (Kern *et al.*, 2006).

Aunque la médula ósea ha sido la principal fuente para el aislamiento de células madre mesenquimales multipotentes, su extracción se lleva a cabo mediante un procedimiento muy invasivo y el potencial de diferenciación y periodo de vida máxima disminuye con la edad. Se ha elegido como fuente alternativa la sangre de cordón umbilical, ya que su obtención se realiza a través de un procedimiento que no supone daño alguno para la madre ni para el recién nacido. Otra opción es el tejido adiposo ya que se ha

demostrado que contiene células madre similares a las procedentes de la médula. Estas células pueden obtenerse en gran cantidad de las liposucciones cosméticas y además crecen fácilmente bajo condiciones de cultivo estándares (Kern *et al.*, 2006).

1.3.3.2.- Células madre neuronales

Son células madre capaces de diferenciarse en neuronas, astrocitos u oligodendrocitos en el sistema nervioso central. Debido a su plasticidad y multipotencia intrínseca generan una gran expectativa ante la posibilidad de trasplantes y sus consiguientes beneficios en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Niles *et al.*, 2004).

1.3.3.3.- Células madre hepáticas (células ovas)

Las células ovas hepáticas son consideradas el depósito intrínseco de células madre del hígado (Körbling *et al.*, 2005). Se ha visto que después de un daño hepático grave en roedores y humanos, se activa un compartimento de células madre potenciales localizadas dentro de una rama del árbol biliar intrahepático. Esta respuesta incrementa la población de un tipo de células biliares que son, bipotenciales (capaces de diferenciarse en hepatocitos o colangiocitos). Estas células se denominan ovas o progenitoras hepatogénicas y proliferan ampliamente bajo ciertas condiciones, siendo además clonogénicas (Herr *et al.*, 2007).

Las células ovas tienen la capacidad de reemplazar células dañadas del hígado como se evidencia cuando, después de trasplantarlas en hígados de ratas, repueblan el hígado dañado y funcionan como hepatocitos maduros en su regeneración. Sin embargo, esto sólo ocurre bajo ciertas condiciones, como pueden ser una combinación de lesiones en el hígado o ante un determinado daño hepático. La mayoría de los estudios concuerdan en la localización del nicho de células madre del hígado, situándolas en el

canal de Hering, zona de transición entre los hepatocitos periportales y las células biliares (Herr *et al.*, 2007; Cantz *et al.*, 2007).

1.3.3.4.- Células progenitoras pancreáticas

Durante las últimas décadas, diversos estudios han indicado que el páncreas contiene un depósito de células progenitoras con potencial para diferenciarse en líneas restringidas y capaces de desarrollar el fenotipo pancreático. Además, los datos sugieren que las células de los ductulos de humanos y de roedores, las células derivadas de islotes y tejido exocrino tienen un precursor común que puede diferenciarse hasta células β (Soria *et al.*, 2005).

1.3.3.5.- Células madre del músculo esquelético o células satélite

Formando parte de la superficie de las fibras musculares, bajo su lámina basal, se encuentran las células satélite, que son la principal, si no la única, célula madre de tipo muscular. Las células satélite son quiescentes en un músculo adulto normal, pero ante una lesión se activan y proliferan hasta conseguir un acopio de células precursoras musculares que reemplazan o reparan las fibras dañadas (Ehrhardt *et al.*, 2007).

1.3.3.6.- Células progenitoras de la epidermis

La epidermis se mantiene a través de la división de pequeñas células madre no diferenciadas con capacidad de proliferar, que se encuentran en la capa base, y que reemplazan células del estrato córneo al perderse éstas por acción del ambiente. Dichas células se dividen con escasa frecuencia, pero cuando avanza el ciclo celular dan lugar a otro tipo de células no diferenciadas y a una progenie llamada células amplificadas transitorias. Las células se dividen

rápidamente y en último término se diferencian a corneocitos o células corneas (Jiao *et al.*, 2004).

1.3.3.7.- Células madre del pulmón

La intrínseca complejidad del pulmón, junto con varios aspectos únicos de su estructura y biología, hacen complicado el estudio e identificación de sus células madre. A pesar de las limitaciones, se han identificado varios tipos de células progenitoras en el pulmón proximal y distal. Existe muy poca información concerniente a las relaciones de linaje, propiedades de autorrenovación y sobre la clonación de las células progenitoras del pulmón identificadas en la actualidad. Se ha descrito que en el conducto proximal de las vías aéreas, las células basales, las células Clara y las células que residen en las glándulas submucosales habían mostrado funciones atribuibles a células progenitoras. Más recientemente, se ha descrito la contribución de una variante celular de las de tipo Clara residente en el interior de los cuerpos neuroepiteliales o en uniones de los conductos broncoalveolares en la reparación del epitelio de las vías aéreas después de sufrir una lesión provocada por naftaleno. Se piensa, también, que las células cuboidales tipo II funcionan como progenitoras del epitelio alveolar (Kotton *et al.*, 2004).

1.3.3.8.- Células madre del epitelio intestinal

Se cree que la amplia proliferación que presenta el epitelio intestinal depende en última instancia de las células madre localizadas en las criptas de Lieberkuhn. Comparativamente, se sabe poco sobre el nicho de las células madre del epitelio intestinal, aunque se ha postulado su definición como células mesenquimales de la lámina *propria* subyacente y de la zona inferior de la membrana intermedia (Radford y Lobachevsky, 2006).

1.3.3.9.- Células madre hematopoyéticas

Las células madre mejor caracterizadas en humanos son las hematopoyéticas, que se distribuyen entre la médula ósea y la sangre periférica y dan lugar a las células sanguíneas (Hennessy *et al.*, 2004).

El descubrimiento de las células madre hematopoyéticas por parte de Becker y colaboradores se produjo en el año 1963 en médula ósea de ratón. Se abrió así el camino para las actuales investigaciones científicas.

El compartimento de células madre hematopoyéticas se compone de células con distintos potenciales. Se trata de una población poco común de células precursoras e inmaduras cuya frecuencia oscila entre una de cada 10^4 o una de cada 10^5 células postnatales. Su heterogeneidad genética y fenotípica reside en su diferente capacidad de proliferación y diferenciación, así como en su activación y en el estado del ciclo celular. Son multipotentes, capaces de comprometerse en uno de cada diez u once linajes funcionales hematopoyéticos. Tienen capacidad de autorrenovación, para mantener así su condición de célula madre, además de un alto potencial de proliferación.

La célula madre hematopoyética humana surge a partir de una célula precursora común del linaje hematopoyético y del endotelial denominada hemangioblasto. Más tarde, las células madre hematopoyéticas migran a través de la circulación hasta colonizar el hígado fetal, el timo, el tracto gastrointestinal y la médula ósea, pero pueden también desarrollarse *in situ* a partir del endotelio hemogénico en tejidos fetales y la médula ósea adulta.

Estas células, gracias a su capacidad de repoblación multipotente a largo plazo, son capaces de colonizar el sistema hematopoyético por completo en el periodo de vida de un individuo (Watt y Contreras, 2005). El número de células progenitoras hematopoyéticas en proceso de proliferación se estima en un 0,05% del total celular de la médula ósea.

Un segundo compartimiento menos primitivo, más maduro, está conformado por progenitores uni o bipotenciales con capacidad de diferenciación restringida a líneas celulares individuales y bien definidas y con limitada capacidad de autorrenovación.

Finalmente, existe un compartimiento, cuantitativamente predominante, constituido por células precursoras ya diferenciadas, sin capacidad de autorrenovación, y por su progenie en proceso de maduración final o de almacenamiento en la médula ósea, antes de salir a la circulación (Lechner, 2007).

1.3.3.9.1.- Marcadores de células madre hematopoyéticas

El enriquecimiento de células madre hematopoyéticas se basa en la expresión de antígenos de superficie o en la ausencia de expresión de antígenos específicos del linaje. El más común es la glicoproteína transmembrana CD34, usada para cuantificar células madre de cordón umbilical. Además, la mayoría, si no todas las células CD34+ expresan CD133 en la superficie (Kekarainen *et al.*, 2006).

Otro marcador ya conocido de células hematopoyéticas es c-kit. Avances recientes en el conocimiento de estas células describen nuevos marcadores como el factor de crecimiento vascular (KDR). La importancia de este marcador radica en que la población CD34+, KDR+ está muy enriquecida en progenitores hematopoyéticos con gran capacidad de autorrenovarse, mientras que esta capacidad es menor en la población CD34+, KDR- (Thomas *et al.*, 1999).

Otro hallazgo de interés es el llevado a cabo por Zanjani *et al.* (1999). Durante años se había asumido que sólo las células que expresaban antígeno CD34 tenían actividad de células madre. Pero se ha puesto en evidencia en evidencia que poblaciones celulares Lin- (marcador de diferenciación de linaje celular), CD34- contienen células madre capaces de repoblar a largo plazo y diferenciarse a diferentes tejidos *in vivo*. Algunos experimentos realizados sugieren que las células CD34- podrían ser más primitivas que las CD34+. Las células CD34- encontradas entre la fracción de células Lin-, CD34-,

CD38- representan una nueva población de células madre y confirman que el comportamiento de la célula madre hematopoyética es más complejo de lo que se creía previamente. Sin embargo, por el momento se desconoce el papel de esta célula madre CD34-.

1.3.3.9.2.- Fuentes de células madre hematopoyéticas

La principal fuente de este tipo de células es el tejido hematopoyético debido a su fácil accesibilidad y a que, aquí, su número es mayor en comparación con otros órganos. El tejido hematopoyético incluye la médula ósea, la sangre periférica y la sangre de cordón umbilical (Körbling *et al.*, 2005) aunque otros autores incluyen también a la placenta como fuente alternativa (Matikainen y Laine, 2005).

Muchos estudios apoyan la capacidad de la células madre hematopoyéticas para diferenciarse a otros tejidos tanto *in vitro* como *in vivo* y algunos resultados recientes las definen como una atractiva fuente celular en medicina regenerativa y representando una alternativa a las células madre de médula ósea (Sáez-Lara *et al.*, 2006).

Sangre de cordón umbilical

En los últimos tiempos, la investigación de la sangre de cordón ha aumentado mucho debido a su accesibilidad. Estudios recientes sugieren que el cordón umbilical es también una fuente de células madre no hematopoyéticas o células progenitoras, como mesenquimales o precursoras endoteliales (Kekarainen *et al.*, 2006). Aunque el contenido celular del cordón es limitado, posee mayor cantidad de células progenitoras, si comparamos con la médula ósea o la sangre periférica. (Körbling *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2005; Kekarainen *et al.*, 2006). Se ha demostrado, también, que las células CD34+ derivadas del cordón proliferan con mayor rapidez que sus homólogas procedentes de la médula (Kekarainen *et al.*, 2006).

Además, las células madre hematopoyéticas derivadas del cordón poseen un elevado potencial para colonizar frente a, por ejemplo, las células provenientes de la sangre periférica o de la médula (Körbling *et al.*, 2005; Kekarainen *et al.*, 2006). Otro punto a favor es que las incompatibilidades del antígeno leucocitario humano (HLA) se toleran mejor, produciéndose un descenso en el riesgo de rechazo cuando se usan células madre hematopoyéticas derivadas del cordón umbilical y no otras fuentes (Kekarainen *et al.*, 2006). Las células madre hematopoyéticas procedentes de sangre de cordón umbilical se expanden más en cultivo, producen mayor número de clones *in vitro* y tienen telómeros más largos.

El cordón umbilical también contiene células progenitoras mesenquimales capaces de diferenciarse en el estroma medular, hueso, músculo y, gracias a su inmadurez, las células neonatales poseen una mayor plasticidad comparada con las adultas. Además, las células de sangre de cordón normalmente no están infectadas con citomegalovirus o virus Epstein-Barr como a menudo ocurre con las procedentes de médula ósea (Ma *et al.*, 2005).

En general, se puede afirmar que las células madre de sangre de cordón ofrecen numerosas ventajas frente a las células madre adultas derivadas de la médula ósea en trasplantes celulares debido a su mayor proliferación, repoblación, diferenciación, capacidad de expansión y por su facilidad a la hora de su manipulación genética (Sáez-Lara *et al.*, 2006).

2.- EL HÍGADO

El hígado es el órgano interno más grande del cuerpo. Es de color marrón rojizo, pesa aproximadamente 1,3 Kg en los varones adultos y tiene el tamaño de una pelota de fútbol americano. Está situado bajo las costillas, en la parte superior derecha del abdomen. Consta de dos lóbulos principales, el derecho y el izquierdo, los cuales se encuentran divididos por los ligamentos, falciforme y redondo. El lóbulo izquierdo, además, tiene otros dos pequeños lóbulos: el cuadrado y el caudado. Los lóbulos hepáticos se encuentran formados por miles de lobulillos, que se conectan con pequeños conductos que, a su vez, están conectados a conductos más grandes y que finalmente forman el conducto hepático, el cual transporta la bilis producida por las células del hígado hacia la vesícula biliar y el duodeno. El hígado cuenta con un extenso suministro sanguíneo. Recibe sangre rica en oxígeno a través de la arteria hepática. La vena porta le suministra sangre que transporta nutrientes, toxinas y otras sustancias absorbidas desde el intestino. El hígado filtra esta sangre y después la envía al corazón mediante la vena hepática.

2.1.- Funciones del hígado

El hígado se encarga de cerca de 500 funciones orgánicas. Tiene un papel importante en la digestión, en el metabolismo de los azúcares y las grasas, e incluso en el sistema inmunitario (Highleyman y Franciscus, 2003). Recibe toda la circulación procedente del intestino delgado y la mayoría del grueso, así como del páncreas y bazo a través de la vena porta. Su localización estratégica le permite su función como defensor bioquímico contra tóxicos químicos que penetran a través de la comida y como procesador de los ingredientes de la comida absorbida (Michalopoulos, 2007).

Las células hepáticas producen la bilis, cuya misión es facilitar la digestión y absorción de nutrientes liposolubles; también

catabolizan el grupo hemo hasta bilirrubina (Highleyman y Franciscus, 2003).

El hígado es esencial para la función óptima del cerebro. La pérdida de la función del hígado conduce a una encefalopatía hepática crónica y finalmente al coma (Michalopoulos, 2007).

El hígado almacena varios nutrientes, entre ellos las vitaminas A, D, B9 (folato) y B12. Asimismo, almacena hierro y participa en la síntesis del hemo. Sintetiza varias proteínas esenciales (enzimas, hormonas, factores de coagulación y factores inmunitarios). Entre ellas, destacan ciertas proteínas de fijación (que adhieren y transportan vitaminas, minerales, hormonas y grasas) y la albúmina (que ayuda a mantener el volumen sanguíneo adecuado). Los factores de coagulación producidos por el hígado son el fibrinógeno, la protrombina (Factor II) y el Factor VII. Otras proteínas sintetizadas por el hígado son la alcalina-fosfatasa, la gamma-glutamil transferasa (GGT) y el factor de crecimiento insulínico (Highleyman y Franciscus, 2003). El hígado posee función excretora a través de la producción de la bilis, que es el vehículo para eliminar el colesterol, la bilirrubina y otros productos y además produce sales biliares que promueven la digestión y absorción de las grasas en el intestino. Tiene función detoxificante tanto de fármacos como de otro tipo de xenobióticos, incluido el amoníaco procedente del metabolismo proteico y que transforma en urea para poder ser eliminado. Es el órgano central que controla el metabolismo de hidratos de carbono, grasas y proteínas (Michalopoulos, 2007).

2.2.- Enfermedades hepáticas

Las enfermedades hepáticas suponen un alto coste para la sociedad, ya que afectan aproximadamente al 17% de la población. Los daños hepáticos avanzados pueden manifestarse como esteatosis, fibrosis y cirrosis. Estas lesiones pueden tener un origen alcohólico, vírico, metabólico y genético, fundamentalmente.

La consecuencia de un daño hepático prolongado en el tiempo es la cirrosis, siendo sus principales causas las hepatitis B y C y el abuso del alcohol. Además, el incremento de la incidencia de la obesidad y la diabetes, están haciendo que la esteatohepatitis no alcohólica continúe aumentando (Levicar *et al.*, 2007).

Aunque muchas personas con hepatitis crónica presentan pocos o ningún síntoma y experimentan una progresión mínima a enfermedades hepáticas, otras sufren serios daños en el hígado. Este proceso requiere varios años o décadas. Se calcula que el 10-25% de las personas con hepatitis C crónica desarrollarán cirrosis después de 20-30 años; para las personas con infección crónica por el virus de la hepatitis B, el índice estimado es del 20-30%. Los virus de la hepatitis C y B (VHB y VHC) atacan a las células hepáticas (o hepatocitos), y desde allí se multiplican o reproducen. Estos virus pueden causar inflamación del hígado y destruir sus células (necrosis). La inflamación es una respuesta del sistema inmunitario ante la infección o las lesiones y se caracteriza por la infiltración de glóbulos blancos (Highleyman y Franciscus, 2004).

2.2.1.- Esteatosis y esteatohepatitis no alcohólica

La esteatosis consiste en la acumulación de grasa dentro de las células del hígado. A menudo está asociada al abuso del alcohol, pero también aparece en personas que beben poco o nada (esteatosis no alcohólica). Los estudios han mostrado que la esteatosis se produce en el 30-70% de las personas con hepatitis C crónica, aunque todavía no se sabe si la propia infección por el VHC es la causante directa. No se comprende bien la relación entre la esteatosis hepática y otras enfermedades como la obesidad, el exceso de grasa en la sangre (hiperlipidemia), la resistencia insulínica y la diabetes. Las investigaciones recientes indican que las personas con esteatosis corren riesgo de sufrir un desarrollo más rápido de fibrosis y cirrosis. Entre los factores que influyen en el índice de progresión a enfermedades hepáticas se incluye el consumo de alcohol (que

acelera la progresión), el género (los hombres experimentan lesiones en el hígado con más rapidez que las mujeres, quizás porque el estrógeno ejerce un efecto protector en estas últimas), la edad (las personas mayores progresan con más rapidez que las jóvenes, en especial a partir de los 50 años), la duración de la infección, y posiblemente el genotipo del VHC según los resultados de algunos estudios clínicos (Highleyman y Franciscus, 2004). La esteatohepatitis no alcohólica se caracteriza desde un punto de vista anatomopatológico por esteatosis, necrosis hepatocitaria y fibrosis. Se asocia con frecuencia a obesidad grave o mórbida y a la diabetes *mellitus*. Sólo es diagnosticada como tal cuando no existen antecedentes de consumo de alcohol o el consumo es muy leve. Esta enfermedad es más frecuente en países desarrollados y su incidencia ha aumentado mucho en los últimos años. En ocasiones puede evolucionar a carcinoma hepatocelular (Van Domanus *et al.*, 2005).

2.2.2.- Fibrosis

La fibrosis hepática es un proceso patológico característico de la cirrosis y constituye una respuesta común a diversos estímulos con capacidad de lesión hepática (tóxicos, virus, alcohol, etc.). Aunque el proceso fibrogénico es del mismo tipo, puede afectar, sin embargo, a distintos territorios hepáticos dependiendo del estímulo. Así, en la cirrosis post-hepatítica, la fibrosis es fundamentalmente periportal mientras que en la cirrosis alcohólica es principalmente perivenosa. Por otra parte, la fibrosis exige siempre una lesión crónica, por eso no se encuentra nunca fibrosis en las hepatitis fulminantes (Quiroga *et al.*, 1992).

Básicamente, la fibrogénesis es un mecanismo de reparación tisular, como el que se instaura en la curación de una herida, con la particularidad de que su cronicidad supone un exceso de carácter patológico. Los cambios se inician en el espacio subendotelial de Disse, territorio situado entre los hepatocitos y las células endoteliales. En condiciones fisiológicas, este espacio contiene células

estelares hepáticas en cantidad poco importante. Existe muy poca matriz extracelular y no hay membrana basal. La fibrogénesis se caracteriza por el incremento de la matriz extracelular, constituida por colágeno (I, III y IV principalmente), proteoglicanos y glicoproteínas (fundamentalmente fibronectina y tenascina). La fibronectina se sintetiza sobre todo en los hepatocitos y la tenascina en las células estelares hepáticas. El colágeno y los proteoglicanos se sintetizan en los hepatocitos y en las células estelares hepáticas. Las células endoteliales también contribuyen a la constitución de la matriz extracelular (cicatriz o escara hepática) mediante la producción de proteoglicanos y colágeno de tipo IV (Martínez-Hernández y Amenta, 1993a, 1993b, 1995). Además del aumento de la matriz extracelular, se pierden los poros o fenestraciones entre las células endoteliales, lo que dificulta los intercambios de solutos entre el espacio sinusoidal y los hepatocitos. Hasta este momento, el proceso es reversible. Con el tiempo, se establecen enlaces cruzados entre las moléculas de colágeno y aparecen nódulos regenerativos, lo que conduce a la irreversibilidad de los daños tisulares (Friedman, 1993). Cuando se producen las lesiones repetidas, los hepatocitos dañados responden sintetizando fibronectina que se deposita en el espacio subsinusoidal, constituyendo junto al colágeno de tipo I y la fibrina una especie de matriz provisional que facilita la posterior atracción y proliferación de las células inflamatorias (Neubauer *et al.*, 1995). En esta fase preinflamatoria, los hepatocitos dañados inducen la proliferación de las células estelares hepáticas. Entre los mediadores de este efecto mitógeno parecen estar los peróxidos lipídicos, el acetaldehído, el lactato y factores de crecimiento tales como el TGF- α y el IGF-1. Al mismo tiempo, dejan de sintetizarse factores inhibidores de dicha proliferación, como la arginasa de membrana (Border y Noble, 1994; Gressner, 1995, 1996a, 1996b; Nguyen *et al.*, 1994).

La etapa siguiente (fase inflamatoria) se caracteriza por la activación de las células estelares hepáticas (también llamadas células de Ito o células perisinusoidales). En el hígado normal, estas células son de tipo citoesquelético y contienen mucha vitamina A. En

las lesiones crónicas del hígado, las células estelares hepáticas proliferan y se transforman en células de transición, pobres en vitamina A, de mayor tamaño y más retículo endoplásmico rugoso. Esta transformación está promovida por la actividad de las células de Kupffer y las plaquetas que son atraídas al foco de la lesión. Las células de Kupffer activadas liberan numerosas citoquinas y factores de crecimiento entre los que destacan TGF- α , TGF- β 1, TNF- α , PDGF e IL-1. El TGF- α es un factor de proliferación, mientras que el principal responsable de la transformación de las células estelares hepáticas es el TGF- β 1. Las plaquetas liberan principalmente PDGF, que es también un importante factor de proliferación. Las células de Kupffer no sólo estimulan la activación y proliferación de las células estelares hepáticas sino que causan un daño adicional a los hepatocitos por la liberación de proteasas y radicales libres de oxígeno (Gressner, 1995; 1996a y 1996b).

Las células de transición se transforman finalmente en miofibroblastos por la actividad del TGF- β 1 y PDGF en lo que se puede denominar fase postinflamatoria. Estas células juegan un papel crucial en la fibrogénesis ya que son capaces de formar las moléculas que constituyen la matriz extracelular. También sintetizan factores quimiotácticos como el MCP-1 (proteína quimiostática de monocitos-1) y se estimulan de manera autocrina mediante la síntesis de TGF- α , TGF- β 1 y FGF. Por otra parte, influyen negativamente sobre los hepatocitos vecinos, en los que se demuestra un descenso de sus actividades sintéticas (Koda *et al.*, 1996).

Las células estelares hepáticas activadas (miofibroblastos) son las principales responsables de la síntesis de colágeno de los tipos I, III y IV, proteoglicanos y glicoproteínas (fibronectina, laminina, entactina, tenascina y undulina), aunque también contribuyen a esta síntesis los hepatocitos y las células endoteliales (Eghbali-Fatourehchi *et al.*, 1996; Geerts *et al.*, 1993; Knittel *et al.*, 1992; Neubauer *et al.*, 1995; Ramadori *et al.*, 1992; Schwoegler *et al.*, 1994). La laminina, la entactina, el colágeno tipo I y los proteoglicanos constituyen una membrana basal completa que origina la "capilarización sinusoidal".

Se trata de una etapa fundamental en la fibrosis hepática, ya que esta capilarización afecta negativamente al intercambio de macromoléculas entre los hepatocitos y la sangre sinusoidal (Neubauer *et al.*, 1995).

El incremento en la cantidad de colágeno durante la fibrogénesis no depende sólo del aumento en su síntesis sino que es también el resultado de la disminución de su degradación. Aunque el proceso no transcurre de forma similar para los distintos tipos de colágeno ni en los diversos territorios hepáticos, se puede esquematizar globalmente como un aumento en la síntesis de colágeno, una disminución de las metaloproteasas que lo degradan (colagenasas) y un aumento en la síntesis de los inhibidores de dichas metaloproteasas (Brecher *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1994; Milani *et al.*, 1994; Murawaki *et al.*, 1993; Muzzillo *et al.*, 1993; Takahara *et al.*, 1995). De todo lo que se acaba de exponer se deduce que el principal mediador implicado en la fibrogénesis hepática es el TGF- β 1, cuya actividad es muy diversa. Por una parte, estimula la formación de fibronectina, colágeno y proteoglicanos. Por otra parte, inhibe la actividad de las metaloproteasas que habitualmente actúan sobre estas proteínas y proteoglicanos. Además, induce la síntesis de los inhibidores de las metaloproteasas. Por último, aumenta la expresión de las integrinas, proteínas de superficie que facilitan la adhesión celular a la matriz extracelular. El TGF- β 1 desempeña también un papel importante en la reparación tisular normal pero deja de formarse al completarse el proceso de curación, mientras que esto no ocurre cuando las lesiones son crónicas (Border y Noble, 1994; Nguyen *et al.*, 1994).

Además del TGF- β 1 y de los demás factores de crecimiento implicados en la proliferación y transformación de las células estelares hepáticas, merece la pena destacar el papel que desempeñan en estos procesos algunos mediadores químicos de naturaleza no peptídica. Entre estos mediadores se puede citar al lactato, que se acumula en el hígado alcohólico como consecuencia de las alteraciones en el estado redox. El lactato estimula la síntesis

de colágeno en las células estelares hepáticas (Cerbón-Ambriz *et al.*, 1991; Green y Goldberg, 1964; Savolainen *et al.*, 1984), probablemente a través de la activación de la prolil hidroxilasa (Cardinale y Udenfriend, 1974). También parecen intervenir como mediadores de la fibrogénesis el acetaldehído, los radicales libres derivados del oxígeno y los productos químicos originados en la peroxidación lipídica. Ya se ha comentado anteriormente que estos compuestos estimulan la proliferación de las células estelares hepáticas cuando se liberan de los hepatocitos dañados (Gressner, 1995; 1996a y 1996b). El malondialdehído y aldehídos relacionados inducen también la síntesis de colágeno por las células estelares hepáticas activadas y estimulan a las células de Kupffer (Poli y Parola, 1997; Tsukamoto *et al.*, 1995). Se ha sugerido que estos compuestos podrían influir en los sistemas de transducción de señales de membrana (Paradisi *et al.*, 1985; Rossi *et al.*, 1988) o que actúan sobre factores de transcripción (Cajone *et al.*, 1989). Se ha demostrado que estos compuestos modulan la expresión de genes de citoquinas inflamatorias a nivel de traducción (Poli y Parola, 1997). Es evidente, por tanto, que el estrés oxidativo tiene un papel patogénico claro en la fibrosis hepática. De hecho, el β -caroteno protege de este proceso en ratas intoxicadas con CCl_4 (Seifert *et al.*, 1995).

2.2.2.2.1.- Marcadores de la fibrosis hepática

El conocimiento de la existencia de fibrosis es muy importante tanto para el diagnóstico como para el seguimiento terapéutico. Dadas las serias limitaciones que tienen los estudios histológicos en biopsias, se han hecho muchos esfuerzos en los últimos años para obtener información del proceso fibrogénico mediante el estudio de marcadores biológicos en sangre. Entre ellos se encuentran fundamentalmente las enzimas implicadas en el metabolismo del colágeno, algunos productos de su metabolismo, el propio colágeno, el ácido hialurónico y diversas glicoproteínas (Niemelä, 1994; Tanikawa, 1994; Tsutsumi *et al.*, 1993, 1996). La enzima más

estudiada ha sido la prolil hidroxilasa, cuya actividad refleja eficazmente la intensidad de la síntesis de colágeno (Murawaki *et al.*, 1996; Yoshida *et al.*, 1986). Otras enzimas estudiadas en relación al metabolismo del colágeno son la galactosil hidroxilisil glucosil transferasa, lisil oxidasa y colagenasas (Müller *et al.*, 1991; Tanikawa, 1994). También se ha preconizado como marcador de fibrogénesis la actividad de la ATPasa de eritrocito, ya que esta enzima se deteriora como resultado de la falta de glutatión reducido y de las alteraciones lipídicas de membrana, consecuentes a los disturbios de la función hepática (Kuralay *et al.*, 1996).

En relación al metabolismo del colágeno se han determinado también los aminoácidos prolina e hidroxiprolina, el colágeno tipo I completo o los propéptidos de los tipos I y III (Hirayama *et al.*, 1996; Hong *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1995; Matsumoto *et al.*, 1989; Müller *et al.*, 1991; Murawaki *et al.*, 1996; Rojkind *et al.*, 1979; Schuppan, 1991; Tanikawa, 1994; Tsutsumi *et al.*, 1993, 1996; Ueno *et al.*, 1992; Yamada *et al.*, 1992). También se han estudiado los niveles de los inhibidores de metaloproteasas (Murawaki *et al.*, 1996; Tsutsumi *et al.*, 1996).

Las glicoproteínas más estudiadas han sido la laminina, la fibronectina (Brocks *et al.*, 1986; Fujimoto *et al.*, 1990; Schuppan, 1991; Tanikawa, 1994) y la undulina (Schuppan, 1991), ya consideradas anteriormente. También se suele medir la desmina, cuya expresión aumenta en las células estelares hepáticas activadas (Ballardini *et al.*, 1994; Murakami *et al.*, 1995; Win *et al.*, 1993) y la vitronectina, que se sintetiza en los hepatocitos y disminuye en plasma durante la cirrosis (Yamada *et al.*, 1996).

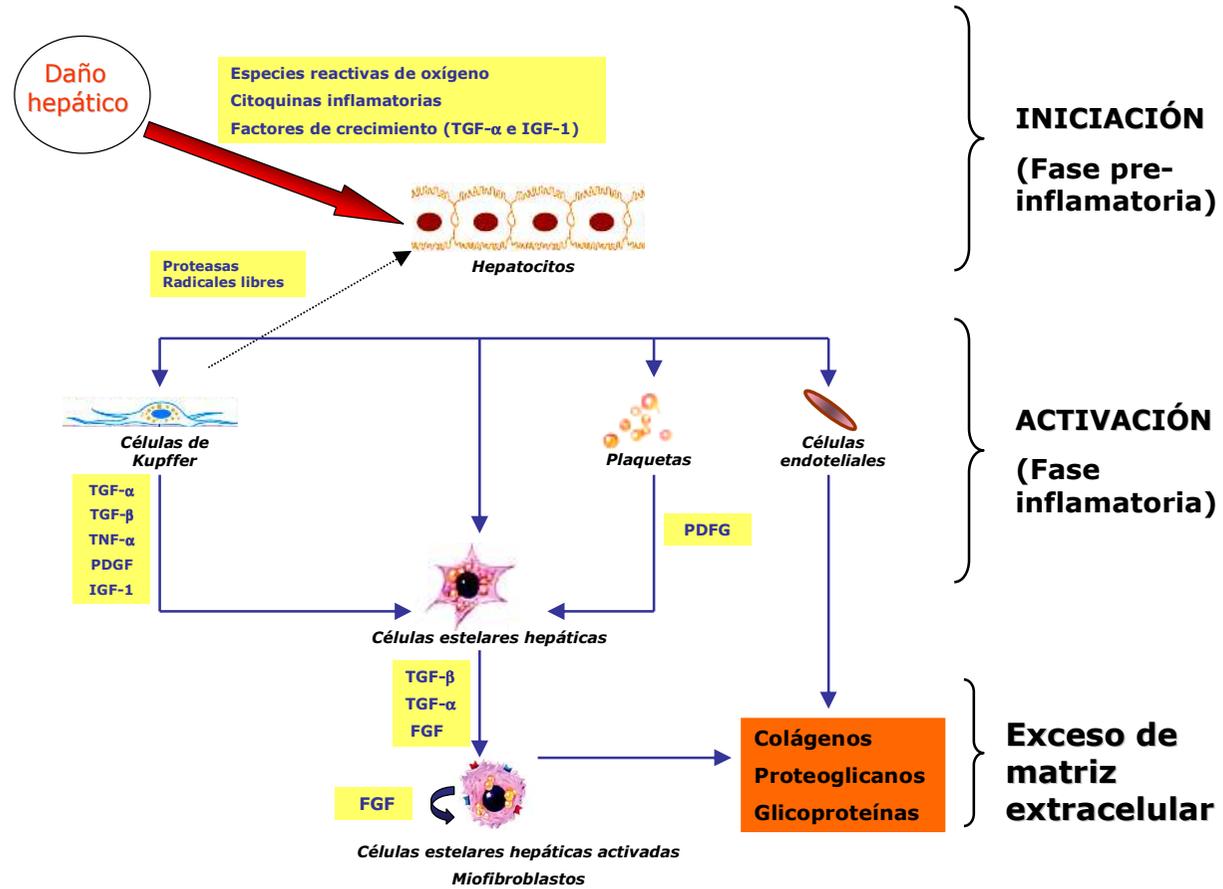


Fig. 2. Mecanismo del proceso fibrogénico

2.2.3.- Cirrosis hepática

La cirrosis hepática es una etapa avanzada de la fibrosis progresiva debida al curso de una lesión hepática crónica que se asocia con dos importantes procesos celulares: la pérdida continua de los hepatocitos y la activación de células estelares hepáticas (Kumar *et al.*, 2006). Se trata de una enfermedad crónica, difusa e irreversible cuya característica fundamental es la desaparición de la arquitectura normal del hígado (Halliday *et al.*, 1991). Sin embargo, el mecanismo patogénico parece ser común en algunos aspectos en los diferentes tipos de cirrosis (Castilla-Cortázar, 1993). La prevalencia exacta de la cirrosis es desconocida. Se calcula que por su causa se produjeron más de 25.000 muertes y 373.000 hospitalizaciones en Estados Unidos en 1998. Estos datos, sin embargo, podrían ser una estimación a la baja si tenemos en cuenta la alta prevalencia de la cirrosis no diagnosticada. Se manejan cifras similares en Europa y aún mayores en Asia y África donde son comunes las hepatitis virales crónicas B y C (Shuppan y Afdhal, 2008).

La cirrosis es una enfermedad insidiosa que puede instaurarse sin que aparezcan signos clínicos característicos (cirrosis compensada). Los grandes bebedores de alcohol suelen desarrollar hígado graso, pero la esteatosis hepática suele pasar desapercibida. Por otra parte, la cirrosis puede aparecer sin que se produzcan anteriormente episodios de hepatitis alcohólica (Halliday *et al.*, 1991; Quiroga *et al.*, 1992). De este modo, es razonable estimar que más del 1% de la población pudiera presentar cirrosis histológica (Shuppan y Afdhal, 2008).

La causa principal de la cirrosis es la ingestión excesiva de alcohol. Otros factores desencadenantes son la hepatitis crónica, problemas de autoinmunidad (cirrosis biliar primaria) y alteraciones genéticas (por almacenamiento de hierro o cobre, deficiencia de α_1 -antitripsina, etc). Algunos casos de cirrosis no tienen etiología definida (cirrosis criptogenéticas). En los últimos años se ha avanzado

en el conocimiento del proceso que conduce a la cirrosis, tanto en modelos experimentales como en patología humana.

El espacio de Disse está ocupado por un tipo especial de matriz extracelular tipo membrana basal que tiene una baja densidad. Cuando se induce el proceso fibrótico aumenta mucho la cantidad de matriz extracelular hepática, especialmente la de tipo fibrilar. En consecuencia, las estructuras tubulares de los espacios porta son constreñidas por haces fibrosos no elásticos y las células endoteliales adquieren una membrana basal típica (Castilla-Cortázar, 1993; Shuppan y Afdhal, 2008).

La disposición ordenada de los elementos del hígado sano no existe en el hígado cirrótico. En su lugar, las células hepáticas se disponen en forma de nódulos de regeneración que aparecen rodeados y separados entre sí por bandas de tejido conjuntivo que contienen los elementos vasculares (Sánchez-Tapias, 1982). Como consecuencia de las cicatrizaciones, hay una reorganización de la circulación con formación de anastomosis arteriovenosas anormales. Las consecuencias clínicas de la cirrosis se deben a la pérdida de funcionalidad hepática por falta de tejido parenquimatoso y a los obstáculos que origina la fibrosis para la circulación sinusoidal (Quiroga *et al.*, 1992). La disposición anómala de los hepatocitos y de los vasos suscita la aparición de insuficiencia hepatocelular y de hipertensión portal (Sánchez-Tapias, 1982; Kumar *et al.*, 2006), así como hepatocarcinoma (Cruz *et al.*, 2005; Schuppan y Afdhal, 2008). Las anomalías circulatorias en la cirrosis (vasodilatación esplácnica, vasoconstricción e hipoperfusión de los riñones, retención de agua y sales y aumento del rendimiento cardíaco) están íntimamente relacionadas con las alteraciones vasculares (Shuppan y Afdhal, 2008). Los cambios observados en la matriz extracelular del hígado cirrótico representan la acumulación de cantidades anormales de proteínas normales (de forma especial colágeno) que pudiera deberse a un incremento de su síntesis o a una disminución de su degradación (Castilla-Cortázar, 1993).

3.- FALLO HEPÁTICO FULMINANTE

El fallo hepático fulminante (FHF) es un grave síndrome clínico que resulta de la necrosis hepática masiva (Newsome *et al.*, 2000). Se caracteriza por un rápido deterioro de la función hepática, con desarrollo de encefalopatía hepática en pacientes sin historia previa de enfermedad hepática o con alteraciones hepáticas crónicas, que producen un desequilibrio en el que se ven involucradas una gran cantidad de señales de citoquinas y de muerte celular en el contexto del daño hepatocelular (Tuñón *et al.*, 2007).

La etiología del fallo hepático fulminante es muy diversa incluyendo: hepatitis víricas, hepatotóxicos, lesiones vasculares, hepatitis autoinmune, alteraciones metabólicas y deformidades anatómicas hepáticas. En una gran proporción de pacientes la etiología es desconocida (Tuñón *et al.*, 2007). Desafortunadamente, la mortalidad del FHF sigue siendo alta a pesar de los considerables progresos en el campo del manejo de los cuidados intensivos y los trasplantes (Newsome *et al.*, 2000; Tuñón *et al.*, 2007).

Han sido muchos los intentos para desarrollar un modelo adecuado de FHF entre los que se incluyen los modelos quirúrgicos, tales como la hepatectomía y desvascularización total y/o parcial; la utilización de sustancias químicas con toxicidad hepática, tales como el acetaminofeno, azoximetano, galactosamina, tioacetamida, entre otras. Sin embargo, la mayor parte de estos modelos no reflejan de modo idóneo el patrón de la enfermedad humana de fallo hepático fulminante y todos ellos presentan importantes limitaciones. A pesar de que la hepatitis vírica es una de las etiologías más frecuentes de fallo hepático fulminante, el uso de agentes víricos para desarrollar modelos animales ha sido escaso y desafortunado (Tuñón *et al.*, 2007). Se necesita un modelo animal adecuado para evaluar los diferentes tratamientos en términos de seguridad viabilidad y funcionalidad.

Terblanche y Hickman postularon criterios para que un modelo de fallo hepático fulminante sea considerado clínicamente relevante:

- Reversibilidad, es decir, que algunos animales puedan sobrevivir al proceso si se utiliza un tratamiento adecuado.
- Reproducibilidad, es decir, los resultados obtenidos deben conducir a la muerte en un intervalo de tiempo determinado, así como que la extensión del daño hepático se pueda medir y estandarizar.
- Muerte por fallo hepático: los acontecimientos producidos tras el daño tienen que reflejar el patrón clínico típico del hombre y la muerte debe ser el resultado directo del daño producido al hígado. Por consiguiente, los animales que no reciben el tratamiento indicado deberían morir con signos de fallo hepático progresivo en un período de tiempo conocido.
- Ventana terapéutica adecuada: debería ser lo suficientemente amplia después de provocar el fallo para permitir que se inicie el tratamiento y que sus efectos sean valorados.
- Que sea aplicable a un extenso número de animales, así como que el tamaño del animal sea suficiente como para permitir una adecuada toma seriada de muestras sanguíneas y de diversos tejidos mientras se llevan a cabo los tratamientos.
- Un mínimo riesgo para el personal: todos los métodos utilizados deben presentar el menor riesgo para las personas involucradas en los estudios (Tuñón *et al.*, 2007; Kerkove *et al.*, 2004).

Aunque razonablemente exhaustiva, hay algunas omisiones en esta lista. Cuando se intentan recrear las condiciones vistas en humanos es importante elegir especies con propiedades metabólicas y fisiológicas parecidas. Específicamente, la respuesta a la cirugía o daños causados por los tóxicos administrados deberían ser similares (Tuñón *et al.*, 2007).

3.1.- Modelo de fallo hepático fulminante/hepatitis inducido por D-galactosamina

La D-(+)-galactosamina hidrocloreto es un polvo de color blanco de fórmula $C_6H_{13}NO_5ClH$. Su solubilidad en agua es de 50 mg/mL y su dosis letal 50 en ratones (DL50) es de 2660 mg/kg. Se trata de un compuesto no peligroso para el hombre ni el medioambiente según la directiva 67/548/EC. Es estable, aunque se debe evitar su contacto con agentes extremadamente oxidantes. Los productos de descomposición peligrosos que puede generar son el monóxido de carbono (CO), el dióxido de carbono (CO₂), gas clorhídrico (HCl) y óxidos de nitrógeno (ficha de seguridad facilitada por Sigma-Aldrich según la directiva europea 91/155/CEE y actualizada en febrero de 2006). La D-galactosamina es un monosacárido metabolizado en la ruta de la galactosa en el hígado. Conduce a la depleción de la uridina intracelular, lo que provoca alteraciones en el metabolismo del ARN de los hepatocitos, derivando finalmente en necrosis (Van de Kerkhove *et al.*, 2004).

En 1968, Keppler *et al.* describieron un modelo experimental inducido por D-galactosamina, descubriendo semejanzas entre los hígados con hepatitis producida por este fármaco y los hígados humanos afectados de hepatitis vírica. Los cambios histológicos incluyen necrosis e infiltración inflamatoria de las áreas periportales, mitosis y proliferación celular, aparición de los cuerpos de Councilman y un incremento del número de células de Kuppfer. Los niveles en suero de las transaminasas, glutamato-deshidrogenasa y otras enzimas aumentan considerablemente mientras que las proteínas totales en suero, incluyendo la prototrombina, se reducen (Keppler *et al.*, 1968). Otro modelo animal, esta vez en conejos, en el que se usó D-galactosamina para provocar un daño hepático fue el desarrollado por Blitzler *et al.* en 1978 en dicho modelo se produjo la muerte entre las 21 y las 44 horas, precedida por un periodo de coma de entre 2 y 6 horas de media y con hallazgos bioquímicos e histológicos compatibles con el fallo hepático fulminante. Se pudo comprobar,

también en conejos, que el hepatóxico no atravesaba la barrera hematoencefálica.

Más recientemente, se ha utilizado la D-galactosamina en perros anestesiados, modelo en el que también se ponen de manifiesto los efectos característicos del fallo hepático humano como son el aumento en las enzimas marcadoras de daño hepático, bilirrubina, amonio, lactato y la coagulopatía asociada, hipoglucemia, coma y aumento de la presión intracraneal (Tuñón *et al.*, 2007). La mayoría de los protocolos indican la administración de una dosis de entre 1,0 y 1,5 g/kg de D-galactosamina disuelta en agua y con un pH de 6,8 (Van de Kerkhove *et al.*, 2004).

4.- MODELO DE CIRROSIS HEPÁTICA EXPERIMENTAL PRODUCIDA POR TIOACETAMIDA

4.1.- Generalidades

La tioacetamida es un polvo de color blanco, cristalino, con un ligero olor y fácilmente soluble en agua y en alcohol absoluto; la solución acuosa es estable varios meses (Gupta, 1956a). Responde a la fórmula química $\text{CH}_3\text{-CSNH}_2$ y su dosis letal 50 (DL50) es de 200mg/Kg de peso (Zimmermann *et al.*, 1986).

Comenzó utilizándose como fungicida de los naranjos y cobró importancia en 1943 cuando se detectó su presencia en el zumo con el consiguiente riesgo para la salud. La tioacetamida ha sido muy utilizada en investigación desde 1948, fecha en la Fitzhugh y Nelson afirmaron que su administración crónica producía cirrosis hepática (Fitzhugh y Nelson, 1948).

Se han desarrollado numerosos modelos animales para estudiar los cambios que tienen lugar en la lesión hepática, ya sea aguda o crónica (Gallagher *et al.*, 1956). La cirrosis producida por TAA ha sido muy estudiada en ratas y en otras especies animales (Shakoori y Zahir, 1975; ShaKoori y Drakhshan, 1975; Li *et al.*, 2002; Laleman *et al.*, 2006), utilizando diferentes dosis, tiempos y vías de administración. Las principales son las que se enumeran a continuación:

- Oral, en la bebida (Zimmermann *et al.*, 1986; Kretzschmar *et al.*, 1989).
- Oral, en la dieta (Fitzhugz y Nelson, 1948; Gupta, 1955; Gupta, 1956b).
- Oral, por sonda gástrica (Ashworth *et al.*, 1965; Trennery y Ril, 1983).
- En inyección intraperitoneal (Cascales *et al.*, 1979; Cerdán *et al.*, 1981; Shathish *et al.*, 2006).

- En inyección subcutánea (Gupta, 1956a; Gallagher *et al.*, 1956).

La mayoría de los estudios aceptan que la cirrosis producida por TAA es similar a la enfermedad humana. Obviamente, esta aceptación no incluye el agente etiológico pero existe bastante similitud en los cambios histológicos y bioquímicos entre ambos tipos de cirrosis (Zimmermann *et al.*, 1987).

4.2.- Alteraciones histológicas producidas por la TAA

Entre las alteraciones más frecuentes debidas a la TAA se encuentran la necrosis centrilobulillar (Gupta, 1956a; Gupta, 1955; Cerdán *et al.*, 1981; Anghileri *et al.*, 1977), cirrosis (Zimmermann *et al.*, 1986; Fitzhugh y Nelson, 1948; Gupta, 1956b; Zimmermann *et al.*, 1987; Becker, 1983; Praet y Roels, 1984; Klimek *et al.*, 1988; Kretschmar *et al.*, 1991) y hepatocarcinoma (Gupta, 1955; Anghileri *et al.*, 1977; Becker, 1983; Praet y Roels, 1984; Klimek *et al.*, 1988; Dasgupta *et al.*, 1981; Cascales *et al.*, 1986; Martín- Sanz *et al.*, 1987; Kuroda *et al.*, 1987).

Durante la fase más temprana de la administración de la TAA se produce un aumento del tamaño del hepatocito, se agranda el núcleo, la cromatina abandona su disposición periférica para pasar a formar un acúmulo único y el nucleolo se hincha dando la impresión de estar suspendido dentro del núcleo (ShaKoori y Drakhshan, 1975; Gupta, 1956b; Cerdán *et al.*, 1981; Zimmermann *et al.*, 1987; Dasgupta *et al.*, 1981; Malvaldi y Pollera, 1979; Clawson *et al.*, 1981; Franke *et al.*, 1983). El marcado aumento de tamaño del núcleo y del nucleolo se considera un estadio preneocrótico. También aparecen modificaciones en el citoplasma. Así, hay desorganización del retículo endoplasmático y alteraciones en el aparato de Golgi y en las mitocondrias; estas se hipertrofian y sitúan alrededor del núcleo. Aparecen, además, vacuolas que contienen lípidos. Si la administración de TAA continúa durante un periodo más prolongado,

el nucleolo pierde nitidez y deja de ser distinguible (Gupta, 1956b; Ashworth *et al.*, 1965; Cerdán *et al.*, 1981; Franke *et al.*, 1983; Cascales *et al.*, 1982; Franke *et al.*, 1985; Zimmermann *et al.*, 1985).

En una fase crónica aparecen en el hígado nódulos de regeneración (al principio pequeños, después aumentan de tamaño) y colangiofibrosis. Este proceso se caracteriza por una proliferación de los canalículos biliares que se rodean de abundantes fibras de colágeno y se considera un estado precanceroso. La propagación de nuevos canlículos biliares y áreas de fibrosis dividen el hígado en pseudolóbulos (Gupta, 1956b; Cerdán *et al.*, 1981; Zimmermann *et al.*, 1987; Anghileri *et al.*, 1977; Klimek *et al.*, 1988; Dasgupta *et al.*, 1981; Fleck *et al.*, 1988).

4.3.- Alteraciones bioquímicas producidas por la TAA

Las modificaciones bioquímicas debidas a la administración de TAA han sido extensamente recogidas en la literatura científica. Dentro del metabolismo nitrogenado, se han descrito descensos de la concentración total de proteínas hepáticas (Cerdán *et al.*, 1981; Cascales *et al.*, 1986), de las proteínas de los microsomas hepáticos (Pap y Barró, 1981) y de la albúmina sérica (Ashworth *et al.*, 1965), así como de un aumento *in vitro* de la albúmina (Chakrabarty *et al.*, 1982).

Trennery y Waring (1983) encontraron una disminución de la arginina en el suero de ratas tratadas con TAA, que atribuyeron a la alteración del ciclo de la urea y elevaciones de otros muchos aminoácidos como la alanina, cisteína, valina, metionina, leucina, fenilalanina, histidina y lisina.

Cascales *et al.* (1979) observaron que el ciclo de la urea se ve severamente afectado por la TAA. Así, se producen disminuciones de las actividades arginasa, ornitín transcarbarmilasa y carbamil fosfato sintetasa hepáticas que se traducen en un descenso de la urea y en un aumento del amonio, ambos en el hígado; paralelamente, el

glutamato y la actividad glutamato deshidrogenasa (GDH) aumentan. Posiblemente la célula responde induciendo la GDH para intentar eliminar el exceso de amonio vía glutamato-glutamina. Sin embargo, este mecanismo compensador resulta insuficiente debido a que, a su vez, la formación de glutamato está limitada por la baja concentración de α -cetoglutarato.

Zimmermann *et al.* (1987) describieron un incremento de la hidroxiprolina hepática, que se relaciona con el contenido de colágeno, y alteraciones del proteinograma (descenso de las alfa-globulinas y aumento de las beta). En trabajos posteriores, el grupo de Zimmermann estudió la síntesis y la concentración de glutatión. Mientras que la primera no se modifica por la TAA (Kretzschmar *et al.*, 1989; Cascales *et al.*, 1981), los niveles plasmáticos de glutatión disminuyen como ocurre en la cirrosis hepática humana (Kretzschmar *et al.*, 1989), concluyendo, por lo tanto, que es la exportación de glutatión la que se afecta. Las transaminasas se elevan en el suero de los animales que reciben la TAA de una forma aguda (Trennery y Waring, 1983; Fleck *et al.*, 1988; Osada *et al.*, 1986; Osada *et al.*, 1988). Sin embargo, si la administración es crónica, estas actividades no sufren modificación (Zimmermann *et al.*, 1987; Martín-Sanz *et al.*, 1987; Fleck *et al.*, 1988). En hígado, las transaminasas aumentan en la fracción mitocondrial y disminuyen en la fracción soluble (Cascales *et al.*, 1982).

Dentro del metabolismo glucídico se pueden citar la pérdida del contenido de glucógeno hepático (Gupta, 1956a; Gupta, 1956b; Zimmermann *et al.*, 1987) y disminuciones de la glucosa (Zimmermann *et al.*, 1987), insulina y glucagón plasmáticos (Martín-Sanz *et al.*, 1989). El grupo de Cascales encontró que la vía de las pentosas fosfato está muy alterada como consecuencia de la administración de TAA (Cerdán *et al.*, 1981).

Se han descrito aumentos de las actividades glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 6-fosfo-gluconato deshidrogenasa, transaldolasa y malato deshidrogenasa, así como de la relación $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, ésta última en la fracción mitocondrial. Relacionan el aumento de ese

cociente con el aumento de los niveles de glutamato mencionada anteriormente; es decir, los animales tratados con TAA usarían más NADPH para sintetizar el glutamato.

Las modificaciones del metabolismo lipídico han sido intensamente investigadas por Zimmermann *et al.* (Zimmermann *et al.*, 1986; Franke *et al.*, 1983; Franke *et al.*, 1985; Zimmermann *et al.*, 1985) en modelos de administración de TAA, tanto aguda como crónica. Estos autores observaron que se produce una disminución de la producción hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) como consecuencia de la alteración del aparato de Golgi. Esta menor síntesis de VLDL conduce a un descenso de la secreción hepática de las mismas y consecuentemente, hace que disminuyan los triglicéridos en el suero. Éstas serían para ellos, junto con la menor oxidación y la mayor síntesis de ácidos grasos, las razones del hígado graso. Además, describen: aumento de las LDL (lipoproteínas de baja densidad) y disminución de las HDL (lipoproteínas de alta densidad); aumentos de los lípidos totales en las VDL y en las LDL, y disminución en las HDL; descensos del colesterol en las HDL y en las LDL; aumento de los triglicéridos en las HDL. Todas estas alteraciones lipídicas concuerdan con las que se observan en la cirrosis humana (Papadopoulos y Charles, 1970).

Las enzimas que intervienen en la síntesis de ácidos grasos y glicerolípidos han sido estudiadas por Cascales *et al.* (1986). Este grupo de investigación observó menores actividades ATP-citrato liasa, acetil-CoA carboxilasa y ácido graso sintetasa en ratas intoxicadas con TAA, además de mayores actividades ornitina descarboxilasa y fosfatidato fosfohidrolasa (enzimas que aumentan en casos de estrés metabólico y toxicidad), y de una mayor síntesis hepática de triglicéridos. En un trabajo posterior (Martín- Sanz *et al.*, 1989), observaron que en la fase aguda del tratamiento se estimula la síntesis de los ácidos grasos (debido al incremento de las principales enzimas implicadas en la lipogénesis). Osada *et al.* (1988), encontraron elevaciones de la lisofosfatidilcolina hepática y de la fosfolipasa A mitocondrial. Palacios *et al.* (1982) describieron

aumentos de las esfingomielinas y disminución de la fosfatidilcolina hepáticas. Estudios realizados por Nozu *et al.* (1992) demostraron que las mitocondrias de ratas tratadas crónicamente con TAA muestran una mayor capacidad de oxidación de acil-CoA de cadena larga en comparación con controles. Estos resultados se apoyan en la elevación de carnitina y de la actividad carnitina palmitoil transferasa I, y en el descenso de malonil-CoA. Moreira (1993), encontró que la administración de TAA a ratas en una dosis de 300 mg/L de agua de bebida durante cuatro meses conduce a una disminución de todos los ácidos grasos plasmáticos, especialmente de los poliinsaturados de cadena larga; tal descenso es, también, evidentemente en los fosfolípidos de los hematíes y de los microsomas hepáticos. En un trabajo realizado con cultivos de hepatocitos de ratas tratadas con TAA, se apreció una mayor producción de compuestos cetónicos (sobre todo hidroxiburato) e incorporación de ácidos grasos en los fosfolípidos, así como menor síntesis de colesterol y excreción celular de ácidos grasos esterificados (Zimmermann *et al.*, 1992).

Otras alteraciones de tipo enzimático son los aumentos de las actividades de la fosfatasa alcalina (Zimmermann *et al.*, 1987; Martín-Sanz *et al.*, 1987; Osada *et al.*, 1986) y leucín aminopeptidasa (Martín-Sanz *et al.*, 1987), y la disminución de la actividad colinesterasa (Zimmermann *et al.*, 1987), todas ellas en el suero (Kretzschmar *et al.*, 1991; Martín-Sanz *et al.*, 1987; Cascales *et al.*, 1991; Dwivedi *et al.*, 1991). La piruvato quinasa hepática disminuye (Klimek *et al.*, 1988). Se ha descrito también incrementos de la bilirrubina en el plasma y en la orina, sugiriendo colestasis, así como una disminución del aclaramiento de la creatinina, indicativa de la afección renal (Martín-Sanz *et al.*, 1987). Igualmente, existe una menor excreción hepática del colorante rojo fenol (Fleck *et al.*, 1988).

Existe bastante controversia sobre los contenidos de ADN y ARN hepáticos. Según Gupta (Gupta, 1956a), el ARN disminuye en el citoplasma de la célula hepática. En cambio, Shakoori no encontró variación del ARN en la fracción citoplasmática y sí una elevación del mismo en la fracción nuclear; tampoco el ADN cambió en ninguna de

las dos fracciones (ShaKoori y Drakhshan, 1975). Morley *et al.* apreciaron un incremento del ADN hepático (Morley y boyer, 1977) cuando la TAA se administró de forma aguda, mientras que Cascales *et al.* (1986). observaron descensos del mismo en la intoxicación crónica.

Algunos trabajos recogen variaciones en los niveles de iones. El calcio y el sodio aumentan en el hígado como consecuencia de la intoxicación con TAA; el magnesio y el potasio, en cambio, disminuyen, (Gallagher *et al.*, 1956; Anghileri *et al.*, 1977).

4.4.- Mecanismo de acción de la TAA

A pesar de que ha sido objeto de estudio desde hace muchos años, el mecanismo de acción de la tioacetamida sigue siendo desconocido.

La forma reactiva de la TAA es un compuesto con una vida media lo suficientemente larga como para permitir su difusión a todas partes de la célula hepática, sin embargo es biotransformada en los microsomas, donde se une mayoritariamente a restos de lisina formándose el complejo N-ε-acetil lisina (Dyroff y Neal, 1971).

Se ha demostrado que son varios los productos resultantes de la metabolización de la TAA: acetamida, sulfato y sulfóxido. El primero de ellos no produce lesiones hepáticas ni siquiera en dosis muy altas; el sulfóxido, en cambio, posee una elevada capacidad para originar la necrosis. Éste último resulta de la acción sobre la TAA de una mono-oxigenasa microsomal ligada al citocromo P450. Algunos autores indican que aún es posible la activación de la TAA-sulfóxido hasta TAA-sulfona por medio del mismo equipo enzimático, y que ambos serían los responsables de los efectos tóxicos (Castro *et al.*, 1974; Hunter *et al.*, 1977; Chieli y Malvaldi, 1984). Precisamente, los niveles microsomales de citocromo P450 descienden como consecuencia de la administración de TAA (Pap y Barró, 1981; Hunter *et al.*, 1977; Chieli y Malvaldi, 1984).

Cascales *et al.* (1991) también encontraron disminuciones del citocromo P450 además de la disminución de la NADPH-citocromo P450 reductasa y de la NADH-citocromo b₅ reductasa. Todo ello indica un descenso en el sistema oxidativo microsomal. Por otro lado, la administración crónica de la TAA causó descensos de la catalasa y de la glutatión peroxidasa (la superóxido dismutasa no varió). En conclusión, la defensa celular contra el oxígeno se ve reducida. Esto, unido a que la concentración de glutatión hepático tampoco cambia, sugiere que la generación microsomal de especies de oxígeno producida por la TAA no estaría protegida suficientemente.

Kretzschmar *et al.* (1989) en cambio, describieron que la TAA provoca un aumento de glutatión reducido hepático cuando se administra al 0,03 % durante 6 meses y por vía oral.

Otros autores (Gupta, 1956a; Gallagher *et al.*, 1956; Anghileri *et al.*, 1977) han sugerido que la causa de la necrosis está relacionada con la homeostasis del calcio. Según estos trabajos, la TAA produce una alteración de la membrana plasmática que permitiría la entrada de calcio en la célula y, particularmente, en la mitocondria. Ello se traduciría en una modificación del transporte electrónico y, consecuentemente, en la inhibición de la respiración celular.

4.5.- Semejanzas y diferencias del modelo de TAA con la cirrosis humana

En general se puede afirmar que la cirrosis producida por TAA reproduce las alteraciones morfológicas y bioquímicas de la cirrosis humana: la hipertensión portal, las disminuciones en el flujo sanguíneo portal, en la excreción hepática y los contenidos del citocromo P450 y de glucógeno hepáticos, la elevación de la fosfatasa alcalina sérica, así como las alteraciones histológicas y del metabolismo lipídico producidas por la administración de TAA y descritas en apartados anteriores.

Sin embargo, no se puede dejar de señalar que, por supuesto, existen diferencias con la enfermedad humana. Entre ellas destacan dos: el agente etiológico y la reversibilidad de las lesiones. En efecto, las alteraciones debidas a la TAA acaban desapareciendo, algunas en cuestión de días o semanas y otras al cabo de varios meses.

5.- TRATAMIENTO ACTUAL DE LA FIBROSIS HEPÁTICA

El arsenal farmacológico utilizado para tratar la fibrosis hepática no es muy amplio. De hecho, a día de hoy no existen ningún tratamiento específico y los pacientes sólo reciben terapia para las complicaciones presentadas (Sáez-Lara *et al.*, 2006). El mayor obstáculo que presenta el desarrollo de fármacos antifibróticos es la dificultad para definir el punto final adecuado en los ensayos clínicos, combinado todo ello con el lento desarrollo de la enfermedad, que puede llevar de años a décadas. Otro de los impedimentos, a la hora de diseñar los estudios son la variabilidad y sensibilidad limitada entre las muestras de biopsias hepáticas. La mayoría de fármacos antifibróticos actúan evitando directamente la activación de las células estelares hepáticas; otros, previenen el daño o pérdida de los hepatocitos, o detienen la proliferación de las células del conducto epitelial, a través del cual se liberan los factores profibrogenéticos que conducen a la fibrosis. Los efectos conseguidos son variables según se trate de fibrosis lobular o biliar, lo que obliga a realizar ensayos preclínicos en modelos animales con ambos tipos de fibrosis (Shuppan y Afdhal, 2008). Algunos fármacos se enumeran a continuación:

5.1- Colchicina y los corticoesteroides

Ampliamente estudiados tanto en humanos como en animales (Muriel y Rivera-Espinoza, 2008); ambos actúan inhibiendo la síntesis de colágeno. Los corticoesteroides, además, presentan propiedades antiinflamatorias reduciendo la síntesis de citoquinas y evitando la formación de aductos del acetaldehído (Tome y Lucey, 2003). Sin embargo, la mayoría de los estudios sugieren poca utilidad en el tratamiento de enfermedades hepáticas.

5.2.- Glicirrizina

Principio activo del regaliz, es una hierba medicinal que viene despertando gran interés debido a sus propiedades protectoras hepáticas, pero son necesarios más estudios en este sentido (Muriel y Rivera-Espinoza, 2008).

5.3- Interferón- α

También se ha visto que el interferón- α posee propiedades antifibróticas tanto en humanos como en animales, sin bien es necesario conocer más sobre su actividad antifibrótica/fibrolítica (Muriel y Rivera-Espinoza, 2008).

5.4.- Curcumina, resveratrol y talidomida

Son otros de los compuestos que han demostrado tener propiedades protectoras y curativas por lo que han despertado últimamente interés por su posible uso en desórdenes hepáticos. Estos compuestos actúan modulando la actividad de NF-KB, disminuyendo el daño de las citoquinas pronecróticas y profibróticas (Muriel y Rivera-Espinoza, 2008).

5.5.- Liv52

Se trata de una mezcla de plantas que procede de la India, comercializada desde hace cincuenta años, se la considera un protector hepático (Muriel y Rivera-Espinoza, 2008).

5.6.- Óxido nítrico (NO)

Puede representar una herramienta farmacológica muy valiosa en el futuro gracias a su capacidad para mantener la integridad microvascular, como inhibidor de la agregación plaquetaria y de la

infiltración de neutrófilos, y por su actuación a la hora de prevenir la apoptosis (Muriel y Rivera-Espinoza, 2008).

5.7.- Otros

Se han ensayado tratamientos con productos para intentar reducir el estrés oxidativo, que es una constante en el paciente cirrótico, con el fin de disminuir los fenómenos inflamatorios, fibróticos, y hacer que cada hepatocito mejore su capacidad defensiva ante dicha agresión (Mato *et al.*, 1999). Como ejemplo, podemos citar al agente antioxidante silimarina, con el que se han llevado a cabo varios ensayos clínicos llegando a conclusiones contrarias. Así, se vieron beneficios en un ensayo aleatorio, controlado y ciego con 191 pacientes de los cuales 91 padecían cirrosis alcohólica. En cambio, Parés *et al.* no observaron dichos beneficios en otro estudio realizado por su grupo en el que se administró silimarina durante cinco años a los pacientes enfermos de cirrosis alcohólica (Tome y Lucey, 2003).

Otros posibles tratamientos de la enfermedad hepática son la terapia génica y celular; ambas se exponen a continuación.

5.8.- Terapia génica

La inyección a ratones deficientes en telomerasa de un adenovirus modificado para transportar el gen, restauró la actividad telomerasa y la función de los telómeros, y mejoró la cirrosis y la función hepática (Rudolph *et al.*, 2000). La terapia génica con vectores víricos, no obstante, presenta algunos inconvenientes en humanos. En la mayoría de los casos, el número de células infectadas por el vector es muy bajo. Por otro lado, la muerte de un enfermo participante en un experimento de terapia génica a finales de 1999 detuvo temporalmente todos los estudios de este tipo en EE. UU. (Marshall, 2000).

5.9.-Terapia celular

El objetivo de la medicina regenerativa es el reemplazo o reparación de los órganos y tejidos dañados. Existe una gran diversidad de trastornos susceptibles de ser tratados desde este enfoque, incluidos los hematopoyéticos, neurológicos y cardiovasculares, así como defectos óseos y la diabetes (Serakinci y Keith, 2006). En lo referente a la enfermedad hepática, el desarrollo de métodos alternativos representa un objetivo fundamental de la investigación para mejorar su tratamiento, sean o no de origen genético (Grossman *et al.*, 1995). Dentro de estas alternativas se encuadra la terapia celular.

5.9.1.-Trasplante de hepatocitos

Se han llevado a cabo experimentos de trasplante de hepatocitos tanto en animales como en pacientes, en ambos casos con resultados muy alentadores. A continuación, se destacan algunos trabajos.

5.9.1.1.- *Estudios en animales*

Laconi *et al.* (1998) consiguieron una repoblación permanente del hígado del 40-60% en ratas hembra y del 98-99% en machos utilizando una cepa de ratas Fischer que presenta una mutación, de tal modo que los animales no expresan la enzima dipeptidil peptidasa IV (ratas DPP IV⁻). A estas ratas DPP IV⁻ se les trasplantaron hepatocitos aislados de ratas Fischer normales (DPP IV⁺) para reemplazar la masa hepática. La proliferación, expansión e integración de los hepatocitos DPP IV⁺ trasplantados en el parénquima hepático de las ratas DPP IV⁻ se determinó mediante análisis morfológicos e histoquímicos, y la funcionalidad de los mismos se analizó en cortes histológicos mediante la determinación de albúmina, contenido y síntesis de glucógeno y actividades glucosa-

6-fosfatasa y DPP IV. Los hepatocitos trasplantados fueron capaces de proliferar sin sufrir desdiferenciación, tal como se demostró por la ausencia de expresión de α -fetoproteína (Dabeva *et al.*, 1998).

Este grupo también ha investigado la misma estrategia en ratas analbuminémicas, ratas que tienen unos valores extremadamente bajos de albúmina sérica debido a una mutación que afecta a la maduración del correspondiente ARNm (Esumi *et al.*, 1982). Después del trasplante de hepatocitos sanos (albúmina +) se detectó albúmina (ARNm y proteína) en el hígado de las ratas analbuminémicas mediante hibridación *in situ* e inmunohistoquímica respectivamente, y albúmina sérica mediante *western blot* y ensayo inmunoenzimático. Dos meses después del trasplante, el 77% de los hepatocitos expresaban ARNm de albúmina, y el 81% expresaba la proteína. Los animales presentaban valores normales de albúmina sérica y estos se mantuvieron durante los dos meses que duró el experimento (Oren *et al.*, 1999).

Gupta *et al.* (1995) han demostrado que los hepatocitos trasplantados superan las barreras mecánicas que suponen los sinusoides hepáticos y que entran en el parénquima integrándose y uniéndose a los hepatocitos residentes.

El principio básico de este tipo de experimentos es la utilización de células donantes que posean un marcador que no exista en las células del receptor (localización positiva), o bien la utilización de células donantes a las que les falte un marcador que existe en las células del receptor (localización negativa). Como ejemplos de marcadores se han usado HbsAg, β -galactosidasa, cromosomas sexuales y DPP IV. La repoblación hepática se sigue mediante técnicas de inmunohistoquímica o hibridación *in situ* (Gupta *et al.*, 1999a).

En un estudio realizado por Kobayashi *et al.* (2000) se ha conseguido mejorar la funcionalidad hepática y la supervivencia de ratas con cirrosis producida por inyección de CCl_4 mediante el trasplante de hepatocitos.

5.9.1.2.- Estudios en humanos

Desde hace algunos años se vienen llevando a cabo experimentos de trasplante de hepatocitos en enfermos humanos con resultados positivos en diversos países (Fox *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 2006; Cantz *et al.*, 2007). Así, en 1998 Fox y colaboradores trataron a una paciente con síndrome de Crigler-Najjar tipo I administrándole vía porta $7,5 \times 10^9$ hepatocitos. Se consiguió una corrección parcial del defecto metabólico hasta el posterior trasplante de órgano completo. También Scheider y colaboradores (2006) documentaron un trasplante de hepatocitos a través de la vena porta a una paciente intoxicada por la ingestión accidental de *Amanita phalloides*. La paciente se negó a recibir un trasplante de órgano completo mientras mantuvo la consciencia. Tras entrar en coma, los familiares aprobaron el trasplante de hepatocitos. Se le trasplantaron 8×10^9 células presentando, tras 8 semanas, una arquitectura hepática y flujo sanguíneo portal normales. A las 12 semanas del trasplante, se le retiró la inmunosupresión sin presentar signos de rechazo. A día de hoy sigue viva.

5.9.2.- Trasplante de células madre

Una alternativa para los pacientes con dolencias severas de hígado es la medicina regenerativa mediante el uso de células madre (Sakaida *et al.*, 2005). Las células madre de muchos órganos y tejidos son las responsables de su mantenimiento y reparación. El objetivo de la medicina regenerativa es explotar el potencial de estas células trasplantándolas desde una fuente exógena o a través de su activación endógena mediante fármacos (Daley y Scadden, 2008).

Los avances en técnicas relacionadas con las células madre adultas han ampliado las oportunidades terapéuticas y sus consiguientes aplicaciones clínicas (Serakinci y Keith, 2006). Desde este punto de vista, se utilizan preferentemente las células madre hematopoyéticas gracias a su anidamiento directo en el tejido diana (Daley y Scadden, 2008). Algunos investigadores han argumentado

que las células madre hematopoyéticas de origen humano procedentes de médula ósea o sangre de cordón umbilical exhiben una mayor plasticidad que las respectivas de rata o ratón (Di Campli *et al.*, 2004; Ishikawa *et al.*, 2003; Kakinuma *et al.*, 2003; Newsome *et al.*, 2003; Tanabe *et al.*, 2004; Turrini *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2003). Es más, varios grupos han detectado altos rangos de formación de hepatocitos humanos sin signos de fusión en modelos de xenotrasplante a roedores (Cantz *et al.*, 2007).

En un daño hepático inducido químicamente mediante la administración intraperitoneal de alcohol alílico, se inyectaron células madre humanas provenientes del cordón umbilical intraperitonealmente a ratones NOD/SCID (ratón inmunodeficiente diabético no obeso/inmunodeficiencia severa combinada), generando hepatocitos, mejorando la regeneración del tejido hepático dañado y disminuyendo el índice de mortalidad (Di Campli *et al.*, 2004).

Lagasse *et al.* (2000) demostraron que las células madre hematopoyéticas de médula ósea dan lugar a hepatocitos funcionales en el hígado de ratones con tirosinemia, mientras que Nonome *et al.* (2005) consiguieron resultados similares trasplantando células madre de cordón umbilical humano a ratones con daño hepático por sobreexpresión de ligando Fas.

Asimismo, se han llevado a cabo estudios clínicos de fase I no controlados y no randomizados con células madre de médula ósea, consiguiendo mejorar la función hepática en algunos pacientes (Terai *et al.*, 2006; Gordon *et al.*, 2006). En el primero de los estudios, a 9 pacientes enfermos de cirrosis hepática, de edades comprendidas entre 18 y 75 años, se les practicó una infusión autóloga de 5×10^9 células. Tras 24 semanas, se detectó una mejora en los niveles tanto de albúmina como de proteínas totales en todos ellos, así como en la ascitis en 5 de los 9. En el estudio realizado por Gordon *et al.* (2006), a 5 pacientes con insuficiencia hepática crónica se le inyectaron entre 1×10^6 y 2×10^8 células CD34+ (a 3 vía porta y a 2 en la arteria hepática). Se produjo una mejora en los niveles de bilirrubina en 3 de

los 5 pacientes; y en los de albúmina, en 4, confirmando así una mejora de la función hepática.

III. Material y métodos

1. Material

1.1.-Animales de experimentación

Todos los experimentos llevados a cabo con ratas fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad de Granada y realizados conforme a las regulaciones sobre cuidado animal de la Unión Europea.

Se emplearon ratas Wistar macho suministradas por la empresa Harlan Ibérica S.L. (Barcelona, España). Los animales se mantuvieron en jaulas que permitían libre acceso al agua y a la comida. El animalario consistió en una habitación termostaticada entre 22 y 25º C, dotada de sistemas automáticos de iluminación y ventilación. La iluminación estaba programada de forma que seguía un ciclo de encendido y apagado de 12 horas, coincidente aproximadamente con el natural.

1.2.-Reactivos y material utilizado

Los reactivos generales utilizados procedían de las casas comerciales que a continuación se enumeran:

- Merck (V.W.R. Internacional Eurolab S.L., Barcelona, España).
- Sigma Aldrich Química S.A. (Madrid, España).
- Invitrogen S.A. (Paisley, Reino Unido).
- Amersham Bioescience (Barcelona, España).
- Panreac Química S.A. (Barcelona, España).
- New England Biolab y Qiagen (Barcelona, España).

- Redox (Málaga, España).
- Labortecnic (Granada, España).
- Applied Biosystem (Foster City, California, EE. UU.).
- Boehringer (Mannheim, Alemania).
- BioRad Laboratorios (San José, California, EE. UU.).
- Labor Systems (Helsinki, Finlandia).
- Roche Molecular Biochemicals (Indiana, Indianápolis, EE. UU.).
- Becton Dickinson (Massachussets, EE. UU.).
- Supelco (Bellefonte, Pennsylvania, EE. UU.).
- Perkin Elmer Hispania S.A. (Madrid, España).
- Beckan Instruments S.A. (Madrid, España).
- Material de plástico, vidrio y papel de filtro: suministrado por Labortecnic y Redox.
- Medios de cultivo, suplementos y suero: proporcionados por la empresa Invitrogen (Londres, Reino Unido).
- Oligonucleótidos: provistos por Sigma Aldrich Química S.A. (Missouri, EE. UU.).
- Anticuerpos: provenientes de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, EE. UU.), Sigma Aldrich (Madrid, España), Abcam (Cambridge, Reino Unido) y Serotec FL (Oxford, Reino Unido).
- Placas de cultivo recubiertas de gelatina (BioCoat, Pensilvania, EE. UU.).

1.3.-Aparatos

- Microfuga Amicon, Heraus Instruments (Witten, Alemania).
- Pipetas automáticas Gilson (Limburg-Offehim, Alemania).
- pHmetro Crisom MicropH 2002 (Barcelona, España).
- Homogeneizador Polytron Kinematic AG (Luzern, Suiza).
- Fuente de alimentación modelo 200/2.0 BioRad (San José, California, EE. UU.).
- Espectrofotómetro Beckman DU-70 (Fullerton, California, EE. UU.).
- Cubeta horizontal de electroforesis Horizon 58 Invitrogen (Carlsbad, California, EE. UU.).
- Sistema de electroforesis horizontal Mini-Sub Cell GT, Bio Rad (San José, California, EE. UU.).
- Cubeta de transferencia semiseca Semi-Phor™, Hoefer Scientific Instruments (San Francisco, California, EE. UU.).
- Centrífuga refrigerada J2-21, Beckman con rotor JA-20 de la misma marca (EE. UU.).
- Congelador -80° C Forma Scientific Inc. S.A. (Ohio, EE. UU.).
- Centrífuga refrigerada GPR Beckman (Fullerton, California, EE. UU.).
- Baño de agua termostatzado Selecta Unitronic 320 OR (Barcelona, España).
- Balanza Precisa 600 C (Dietikon, Suiza).
- Balanza monoplato de precisión Precisa 80 A (Dietikon, Suiza).
- Agitador mecánico Heidolph Reax 2000 (Darmstadt, Alemania).
- Agitador orbital Minishaker MS1 IKA de GmbH & Co (Staufen, Alemania).
- Termociclador 9700 Applied Biosystems (Warrington, Reino Unido).
- Cámara fotográfica Kodac DC 120 (Rochester, Nueva York, EE. UU.).

- Transiluminador UV New Brunswick Scientific (Edison, New Jersey, EE. UU.).
- Equipo de análisis fluorescente ABIPRISMTM 310 Genetic Analyzer Applied Biosystems (Weiterstadt, Alemania).
- Biosystems (Barcelona, España).
- Citómetro de flujo FACS Vantage Becton Dickinson Immunocytometry System (San José, California, EE. UU.).
- Microscopio de contraste de fases Olympus CK2 (Hamburgo, Alemania).
- Microscopio Olympus Invertido de fluorescencia IX71S8F-3 (Hamburgo, Alemania).
- Sonicador Dr. Hielscher GmbH (Staufen, Alemania).
- Lector de placas iEMS Reader MF Labsystems (Helsinki, Finlandia).
- Equipo Mini Protean BioRad (San José, California, EE. UU.).
- Microscopio Leitz DMRB equipado con un sistema de escaneo de imagen láser confocal Leica TCS-SP5 (Wetzlar, Alemania).
- Vibratomo Leica VT 1000S (Wetzlar, Alemania).
- Ultramicrotomo Leica Ultracut R (Wetzlar, Alemania).

2.-MÉTODOS

2.1.-Obtención de la sangre del cordón umbilical

Reactivos y material utilizado

- Jeringas de 10 mL de capacidad.
- EDTA 90 mg/mL (Sigma Aldrich).
- Agujas del número 20G.

Procedimiento

Todas las muestras de sangre se extrajeron con el consentimiento informado de la madre (anexo I) y de acuerdo con el procedimiento aprobado por el hospital Virgen de las Nieves (Granada).

Las muestras de sangre humana procedente del cordón se extrajeron mediante punción en la vena umbilical con jeringas tratadas con anticoagulante y agujas del número 20G, tras lo cual fueron trasladadas en frío al laboratorio.

2.2.-Aislamiento de células mononucleares humanas de sangre de cordón umbilical (CMCUH)

Reactivos

- Medio Dulbecco´s Modified Eagle´s (DMEM, Invitrogen).
- Suero bovino fetal (FBS, Invitrogen).
- Histopaque-1077 (Sigma Aldrich Aldrich).
- Tampón de lisis de eritrocitos (NH_4Cl 150 mM, KHCO_3 1 mM, Na-EDTA 0,1 mM pH 7,4).
- Tampón fosfato salino (PBS) 1 X pH 7,4 (Sigma Aldrich).

Procedimiento

Se siguió la metodología descrita por Boyum (1968). En condiciones de esterilidad, se diluyó la sangre en proporción 1:1 con medio Dulbecco's Modified Eagle's suplementado con un 10% de suero bovino fetal.

En tubos Falcon de 50 mL, a los que previamente se les había añadido 15 mL de Histopaque-1077, se añadieron con sumo cuidado y según instrucciones del fabricante, 15 mL de sangre diluida para formar un gradiente y separar por densidad las células hematopoyéticas mononucleares del resto de componentes sanguíneos. A continuación se centrifugó a 800 x g y 22° C de temperatura durante 20 minutos y sin freno. De las 4 fases obtenidas (véase figura 3), se recogió la intermedia y se lavó dos veces con PBS 1 X estéril, centrifugando a 300 x g y 4° C durante 6 minutos con freno. El sedimento obtenido se resuspendió en 1 mL de tampón de lisis de eritrocitos, e incubó a 4° C durante 5 minutos, tras los cuales se procedió a lavar de nuevo con PBS 1 X estéril. Por último, se centrifugó a 300 x g durante 6 minutos con freno, y se resuspendió el sedimento en el plasma obtenido de la primera centrifugación (fase superior).

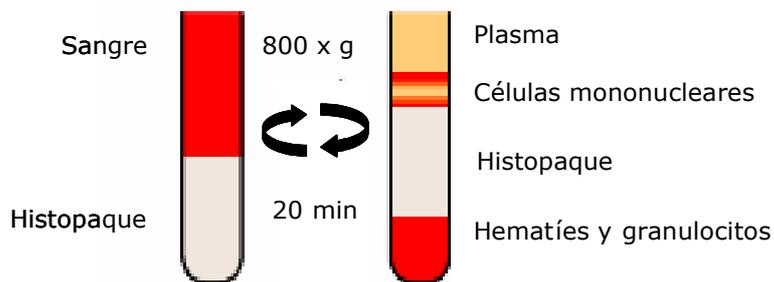


Fig.3. Aislamiento de células mononucleares de sangre de cordón umbilical.

2.3.-Determinación del número y viabilidad de las células aisladas

La viabilidad de las células aisladas se determinó por el método de exclusión del azul tripán (Freshney, 1987). Dicho método se basa en la impermeabilidad que presentan las células viables a gran número de colorantes (azul tripán, naftaleno, eritrosina...).

Reactivos y material utilizado

- Cámara de Neubauer.
- Solución de azul tripán (Sigma Aldrich) al 0,4% (v/v) en PBS 1 X.

Procedimiento

Se preparó por triplicado una solución 1:1 de suspensión celular y azul tripán. Se pusieron en la cámara de Neubauer 20 µL y se realizó el recuento celular (objetivo 20 X, sobre las cuatro cuadrículas periféricas).

Las células no viables presentaban una coloración azul. La viabilidad se calculó como resultado de la siguiente operación:

$$\mathbf{Viabilidad = [(Ct-Cm) \times 100] / Ct}$$

$$\text{Donde } \left\{ \begin{array}{l} Ct = \text{células totales contadas} \\ Cm = \text{células muertas contadas} \end{array} \right.$$

El cálculo para determinar el número de células viables por mililitro fue:

$$(1) + (2) + (3) + (4) = X$$

$$X/4 = Y$$

$$Y \times 10^4 = Z \text{ millones de células por mililitro}$$

$$Z \times S = H \text{ millones de células}$$

Donde (1), (2), (3), (4) corresponden al resultado del recuento de cada una de las cuatro cuadrículas periféricas y S son los mililitros de suspensión celular de los que se dispone.

2.4.-Cultivo celular

Reactivos y material utilizado

- Medio Dulbecco´s Modified Eagle´s 1 X libre de L-Glutamina (Invitrogen).
- Monotioglicerol (Sigma Aldrich).
- Tampón ácido N-(2-hidroxiethyl)-piperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) 1 M (Sigma Aldrich).
- L-Glutamina 200 mM (Invitrogen).
- Penicilina/Estreptomicina (1:1) (Invitrogen).
- Anfotericina B 250 µg/mL líquida (Invitrogen).
- Factor de crecimiento fibroblástico ácido humano (FGFa) (Invitrogen).
- Factor de crecimiento fibroblástico básico humano (FGFb) (Invitrogen).
- Factor inhibidor de leucemia humano (LIF) (Sigma Aldrich).
- Factor de células madre humano (SCF) (Sigma Aldrich).
- Factor de crecimiento de hepatocitos humano (HGF) (Sigma Aldrich).
- Histopaque-1077 (Sigma Aldrich).

- Placas de cultivo de 100 mm y recubiertas de gelatina (BioCoat).

Procedimiento

Se siguió la metodología descrita por Kakinuma *et al.*, (2003).

Las células mononucleares de cordón umbilical humanas (CMCUH) aisladas se cultivaron en placas durante 7, 14 y 21 días en DMEM suplementado (véase composición en tabla 1) y se incubaron a 37° C. En cada placa se cultivaron 100×10^6 células.

Tabla 1: Composición del medio de cultivo

Componente	Concentración final en el medio
FBS	15%
L-Glutamina 200 mM	2 mM
HEPES 1 M	25 mM
Penicilina/Estreptomicina 10000U	100 U
Anfotericina B 250 µg/mL	0,25 µg/mL
Monothioglicerol 9 M	300 µM
FGF-a 100 µg/mL	20 ng/mL
FGF-b 100 µg/mL	10 ng/mL
LIF 10 µg/mL	10 ng/mL
SCF 1 µg/mL	10 ng/mL
HGF 0,5 mg/mL	10 ng/mL

2.5.-Cambio de medio

Para reponer factores de crecimiento, eliminar productos de deshecho y aportar nuevos nutrientes al cultivo, se renovó el medio con una periodicidad de 7 días (Kakinuma *et al.*, 2003).

Procedimiento

Se retiró el medio y se centrifugó a 300 x g durante 6 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en PBS, centrifugando de nuevo en las mismas condiciones. Se resuspendió el sedimento y se añadió a la placa junto con 10 mL de DMEM suplementado (véase la tabla 1) y se incubó a 37° C.

2.6.-Extracción y purificación de ARN total

Para la extracción del ARN total, se siguió una modificación del protocolo descrito por Chomczynsky y Sacchi (1987). Para ello se utilizó el reactivo Trizol, solución monofásica formada por una mezcla de fenol e isotiocianato de guanidina, que mantiene la integridad del ARN, si bien provoca la ruptura celular y disuelve todos los componentes celulares.

Reactivos

- H₂O DEPC al 1% (v/v): 1 mL de dietil pirocarbonato en 1L de agua desionizada.
- Reactivo Trizol (Invitrogen).
- Cloroformo (Sigma Aldrich).
- Isopropanol (Panreac Química S.A.).
- Etanol 75% (v/v) a partir de etanol absoluto (Panreac Química S.A.).

- Kit para extracción de ARN de sangre Ribo Pure™- Blood (1928, Ambion).
- EDTA 90mg/mL (sigma Aldrich).

Procedimiento

Para células frescas recién aisladas: se partió de una suspensión de 100×10^6 células.

Para células en cultivo: se partió de un cultivo celular de 100×10^6 células/placa. Las células se recogieron con la ayuda de un rascador para separar las adheridas a la base de la placa.

Para muestras de hígado: se partió de una cantidad de tejido de entre 50-100 mg de peso.

Para muestras de sangre: la sangre fue recogida en tubos con anticoagulante, EDTA 90mg/mL. Para la extracción del ARN se siguieron las instrucciones facilitadas por el fabricante del kit.

a) Aislamiento

Tanto para las muestras de tejido como para las células, fue necesaria una homegeneización previa.

Células: se lavaron con 15 mL de PBS 1 X y se centrifugaron a $300 \times g$ y $4^\circ C$ durante 6 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1 mL de Trizol.

Muestras de hígado: Se añadió 1 mL de Trizol por cada 50- 100 mg de tejido y se homogeneizó en un potter manual.

A continuación se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir la disociación completa del

complejo núcleoproteico y se añadió cloroformo (200 μ L de cloroformo/mL de trizol). Se agitó con vortex hasta que se consiguió un aspecto lechoso, tras lo cual, se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente, centrifugándose después a 12.000 x g a 4° C durante 15 minutos. Se obtuvieron 3 fases: inferior u orgánica que contiene el ADN, la interfase donde quedan las proteínas y la fase superior o acuosa, donde está el ARN.

b) Precipitación del ARN

Se recogió la fase acuosa en un nuevo tubo para microcentrífuga tratado previamente con DEPC, se adicionó isopropanol (1/2 del volumen de trizol utilizado), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Por último, se centrifugó a 12.000 x g a 4C° durante 10 minutos, consiguiendo que el ARN precipitara en el fondo del tubo.

c) Lavado

Se eliminó el sobrenadante y se lavó el sedimento mezclando por inversión con etanol al 75% (v/v) (en el mismo volumen de trizol utilizado inicialmente) y se centrifugó a 7.500 x g y 4° C durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y secó el sedimento al aire. Se resuspendió en agua bidestilada estéril tratada con DEPC y se congeló a -80° C.

d) Cuantificación

El ARN obtenido se cuantificó midiendo la densidad óptica (DO) a 260 nm (1 unidad de DO equivale a 40 μ g/mL de ARN).

La pureza del ARN se comprobó a través de la relación DO 260/280, debiendo encontrarse dicho valor dentro del intervalo $1,7 < DO < 2,0$. Un valor menor indica contaminación con proteínas.

2.7.- Electroforesis en gel de agarosa

Se comprobó la calidad del ARN mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0,8%.

Reactivos y material utilizado

- Gel de agarosa al 0,8 %.
- Tampón de carga: formamida 500 µL; formaldehído 150 µL; tampón borato 10 X, 100 µL; glicerol 130 µL; azul de bromofenol 2% (p/v); 100 µL de agua estéril.
- Tampón borato 10 X: ácido bórico 0,5 M, borato sódico 50 mM, sulfato sódico 100 mM, EDTA 10 mM.
- TAE 1 X compuesto por: Tris acetato 40 mM (Sigma Aldrich), ácido etilen diamino tetraacético 2 mM (EDTA) (Sigma Aldrich)
- Cubeta horizontal Horizon 58 (Gibco BRL, EE. UU.).
- Bromuro de etidio 2 µg /mL.
- Turbo DNasa (Ambion, EE. UU.).

Procedimiento

Las muestras de ARN se trataron con turbo DNasa para eliminar la posible contaminación por ADN (1 µg de turbo DNasa por cada 5 µg de ARN) durante una hora a 37° C e inactivando la enzima posteriormente, según el protocolo facilitado por el fabricante. A las muestras de ARN se les adicionó tampón de carga y se cargaron en un gel de agarosa del 0,8 %.

La electroforesis se realizó durante una hora a 80 V utilizando como tampón TAE 1 X en una cubeta horizontal Horizon 58. Finalmente se tiñó el gel con bromuro de etidio y se visualizó el ARN en un transiluminador UV.

Se observaron las dos bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 18 y 28S.

2.8.- Reacción de la transcriptasa inversa

Reactivos

Se utilizó el sistema RETROscrip (First Strand Síntesis Kit), Kit de síntesis de primera cadena para PCR (Ambion) que se compone de:

- Mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTP) 2,5 mM.
- Iniciadores de la primera cadena (mezcla de nucleótidos) 50 mM.
- Tampón RT-PCR 10 X: Tris-HCl 100mM; KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM; pH 8,3.
- Inhibidor placentario de ARNasas 10U/μL.
- Transcriptasa inversa M-MLV 100U/μL.
- Agua tratada con DEPC.

Procedimiento

Desnaturalización: se incubó 1 μg de ARN a 85° C durante 5 minutos. A continuación se añadieron los siguientes reactivos:

- 4μL de la mezcla de dNTP.
- 2μL de iniciadores de la primera cadena.
- 1μL de inhibidor placentario de ARNasas.
- 1μL de transcriptasa inversa.

La mezcla de reacción se completó con agua tratada con DEPC hasta un volumen final de 20 μL, manteniéndose a temperatura ambiente durante 15 minutos e incubándose posteriormente a 42° C durante 90 minutos. Finalmente y con objetivo de inactivar la enzima, la mezcla se incubó a 92° C durante 10 minutos.

Con el ADNc obtenido se procedió al paso de amplificación o bien se congeló a -80° C hasta el momento de su utilización.

2.9.- Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR)

Se determinó por qPCR la presencia de los siguientes marcadores humanos:

Para células frescas y en cultivo

- Albúmina
- α -fetoproteína.
- Citoqueratina-18 (Ck-18)
- Glutamina sintetasa.
- CD45.
- Citocromo P-450 3A4 (CYP3A4).
- Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH).

Para detectar células humanas en muestras de sangre e hígado

- CD45.
- Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH).

Reactivos

- Taqman Universal PCR master mix (2 X) (Applied Biosystems, Weiterstadt, Alemania).
- Agua libre de nucleasas (Ambion).
- Iniciador sonda.

Los iniciadores sonda para cada uno fueron:

- Albúmina (Hs00609411_m1), TaqMan® GeneExpression Assays (Applied Biosystems).
- α -fetoproteína (Hs00173490_m1), TaqMan® GeneExpression Assays (Applied Biosystems).

- Citoqueratina-18 (Hs01920599_gH), TaqMan® GeneExpression Assays (Applied Biosystems).
- Glutamina sintetasa (Hs00374213_m1), TaqMan® GeneExpression Assays (Applied Biosystems).
- CD45 (Hs00236304_m1), TaqMan® GeneExpression Assays (Applied Biosystems).
- CYP3A4 (Hs00604506_m1), TaqMan® GeneExpression Assays (Applied Biosystems).
- GAPDH (Hs99999905_m1), TaqMan® GeneExpression Assays (Applied Biosystems).

Procedimiento

En una placa de 96 pocillos se preparó la siguiente mezcla de reacción con un volumen final de 25 µL:

- 1,25 µL de la mezcla iniciadores sonda.
- 10,25 µL de agua libre de nucleasas (Ambion).
- 1 µL de ADNc.
- 12,25 µL de Taqman Universal PCR master mix (Applied Biosystems).

Las condiciones del termociclador fueron las siguientes:

- Etapa inicial de 2 minutos a 50° C.
- Etapa inicial de 10 minutos a 95° C.
- Etapa de desnaturalización de 15 segundos a 95° C.
- Etapa de anillamiento y elongación de 1 minuto a 60° C.

Las etapas 2 y 3 se repitieron a lo largo de 45 ciclos. Como patrón interno para normalizar la señal entre las diferentes muestras, se amplificó un fragmento específico del gen GAPDH humana (Applied Biosystems) de cada una de ellas. Además, cada experimento incluyó un control negativo de cada una de las muestras de ARN que no

fueron sometidas a la transcripción inversa. Dicha muestra no dio lugar a producto de PCR alguno, confirmándose la ausencia de ADN genómico extraño o producto de PCR que contaminase previamente la muestra. La amplificación se llevó a cabo en el termociclador ABI 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Los cambios relativos de la expresión génica se determinaron mediante cálculo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

2.10.- Western Blot

La detección de proteínas mediante *western blot* se realizó siguiendo el protocolo de Laemmli (1970).

Reactivos

- Tampón de lisis: NaCl 140 mM; EDTA 15 mM; glicerol 10%; Tris 20 mM; pH 8,0.
- Cóctel inhibidor de proteasas: 1 comprimido/10 mL de extracto celular (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, EE. UU.).
- Solución de ebullición: Tris-HCl 2 M; glicerol 60%; SDS 10%; pironina 0,5%.

a) Preparación de las muestras

Para muestras de hígado:

Las muestras de tejido fueron previamente homogeneizadas con un potter. Se tomaron 200 mg de tejido por mL de tampón y a continuación se añadió el cóctel inhibidor de proteasas.

Para células:

Se añadió por cada de 8×10^6 células el cóctel inhibidor de proteasas y 200 μL de tampón de lisis.

b) homogeneizado celular

A continuación se homogeneizó mediante sonicación (dos ciclos de 20 segundos a 208 μm de amplitud cada 0,5 segundos). Se centrifugó a 12.000 x g y 4° C durante 30 minutos.

c) Determinación del contenido total de proteínas totales

El contenido de proteínas totales se determinó siguiendo el método de Bradford (1976).

Reactivos

- Reactivo de Bradford 5 X (BioRad).
- Placas Microtiter de 96 pocillos y fondo plano (Falcon).
- Patrón de albúmina de suero bovino fetal (BSA) (Sigma Aldrich).

Procedimiento

La determinación se realizó por triplicado. A distintas diluciones de muestra se le añadió la cantidad suficiente de agua y la solución de azul Coomassie G-250 1 X, tras lo cual se incubó en oscuridad 10 minutos y se procedió a la lectura de la absorbancia a 595 nm.

Se tomó una cantidad de muestra equivalente a 100 μg de proteína a la que se añadió solución de ebullición y se incubó durante 2 minutos a 100° C.

d) Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

Los reactivos utilizados fueron los que a continuación se detallan:

- Agua destilada.
- Solución de acrilamida/bisacrilamida 40% (p/v) (BioRad).
- Tris - HCl 1,5 M pH 8,8 (Sigma Aldrich).
- Solución de sodio dodecil sulfato (SDS) 20% (p/v) (Sigma Aldrich).
- N,N,N',N'-tetrametilenetilendamina (TEMED) (Sigma Aldrich)
- Solución de persulfato amónico (APS) 10% (p/v) (Sigma Aldrich)
- Tris - HCl 0,5 M pH 6,8 (Sigma Aldrich).
- Tampón de electroforesis: Tris 0,025 M (pH 8,8), glicina 0,192 M, SDS 10% (p/v).
- Patrón de peso molecular (BioRad).

Gel de carga o concentrador (4,5 % de acrilamida):

- Agua destilada: 1,225 mL.
- Solución de acrilamida/bisacrilamida 40%: 0,140 mL.
- Tris - HCl 0, 5 M pH 6, 8: 0,475 mL.
- SDS 20% (p/v): 9,380 μ L.
- TEMED: 1,875 μ L.
- APS10% (p/v): 18,75 μ L.

Gel de separación o de electroforesis (9% de acrilamida):

- Agua destilada: 1,894 mL.
- Solución de acrilamida/bisacrilamida 40% (p/v): 0,844 mL.
- Tris - HCl 1, 5 M pH 8, 8: 0,938 mL.
- SDS 20% (p/v): 18,75 μ L.
- TEMED: 3,750 μ L.

- APS 10% (p/v): 37,5 µL (Sigma Aldrich).

Sobre una superficie plana se procedió a preparar los cristales. El cristal grande (que incorpora separadores de 0,75 mm) se colocó tras el cristal pequeño y el conjunto de ambos se situó en el soporte.

Se comprobó que el sistema estaba perfectamente cerrado. Se añadió el gel inferior (separador) dejando unos 3 cm de espacio para el gel de carga. Se cubrió el espacio remanente con agua destilada y se esperó a que polimerizara. A continuación, se eliminó el agua y se adicionó el gel superior (concentrador), tras lo cual se colocó el peine que define los pocillos.

Los geles fueron colocados en el soporte para electrodos de la cubeta de electroforesis y se llenó totalmente el espacio interno entre los dos geles con tampón de electroforesis (1 X), así como también la mitad de la cubeta de electroforesis. Se tapó la cubeta de electroforesis y se conectó a la fuente de alimentación. Se aplicó un voltaje de 150 V dejando transcurrir la electroforesis hasta que el frente llegó aproximadamente a 1 cm del final del gel.

d) Transferencia de proteínas

Se decidió llevar a cabo una transferencia semiseca, indicada cuando las proteínas objeto de estudio son de bajo peso molecular. Los reactivos y el material utilizados fueron:

- Membrana de nitrocelulosa 0,2 µm (BioRad).
- Tampón de transferencia semiseca: Tris 25 mM; glicina 0,2 M; metanol 20%.
- Tampón fosfato salino: NaCl 0,14 M; KH₂PO₄ 1,4 mM; NaHPO₄ 8mM; KCl 2,7 mM.
- Rojo Ponceau: Ponceau-S al 0,5% (p/v) (Sigma Aldrich) en ácido acético al 1% (v/v).
- Solución de teñido del gel: Solución azul de Coomassie G-250 Dye Reagent Concentrate 5 X (BioRad).

- Papel Whatman 4 mm (Redox).
- Solución de bloqueo y de incubación de anticuerpos: 2% (p/v) de leche en polvo desnatada en PBS-Tween.

Las proteínas separadas se transfirieron desde el gel a una membrana de nitrocelulosa para permitir su exposición a los anticuerpos. Para dicha transferencia, una vez extraído el gel, éste se equilibró en tampón de transferencia. La transferencia se realizó a 13 V durante 20 minutos. Para comprobar que la transferencia fue realizada con éxito se introdujo la membrana de nitrocelulosa en una solución de rojo Ponceau para visualizar las proteínas totales. La membrana se lavó en agitación con PBS. Posteriormente se sometió a la solución de bloqueo durante 30 minutos a 37° C.

e) Detección inmunológica

Reactivos y material utilizado

- Solución de lavado: PBS-Tween 0,05%.
- Anticuerpos primarios frente a proteínas humanas: anti- α -fetoproteína monoclonal obtenido en conejo (ab45147; 1:50.000), anti-glutamina sintetasa policlonal obtenido en conejo (ab16802; 1:2.000; 1 mg/mL), anti-albúmina monoclonal obtenido en ratón (ab10241; 1:1.500; 2 mg/mL), anti-citoqueratina-18 monoclonal obtenido en ratón (ab7797; 1:1.000), anti-CD45 monoclonal obtenido en conejo (ab40763; 1:1.500; 1 mg/mL), anti-citocromo P450 3A4 policlonal obtenido obtenido conejo (1:1500) (todos ellos de Abcam, Cambridge, Reino Unido). Se usó también un anticuerpo primario policlonal obtenido en conejo anti- β -actina (1:2.000). (Sigma Aldrich).
- Anticuerpos secundarios: anticuerpo policlonal anti-ratón obtenido en conejo conjugado con peroxidasa de rábano (P0260; 1:5.000) y anticuerpo policlonal obtenido en cerdo

anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (P0217; 1:5000). Ambos de DakoCytomation (Dinamarca).

- Controles positivos: lisado de células de hígado humano procedente de tejido normal adulto (Abcam) y lisado de células mononucleares procedentes de sangre periférica humana (Abcam).
- Solución de revelado: ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Reino Unido).
- Películas para autorradiografía (Amersham Hyperfilm, Reino Unido).
- Líquido revelador dilución 1:10 (Tetenal, Norderstedt, Alemania).
- Líquido fijador dilución 1:10 (Tetenal, Alemania).
- Cámara oscura.

La detección inmunológica constó de los siguientes pasos:

- a) Anticuerpo primario: Se eliminó la solución de bloqueo y se incubó la membrana con el anticuerpo primario. La incubación se mantuvo durante toda la noche en agitación suave, a 4º C.
- b) Lavado: La membrana se lavó cuatro veces con solución de lavado para eliminar el anticuerpo no unido. Cada lavado duró 10 minutos y se realizó con agitación. Posteriormente se hizo un lavado adicional de cinco minutos con PBS.
- c) Anticuerpo secundario: La membrana se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente en cada caso durante una hora en agitación suave y a temperatura ambiente.
- d) Lavado: Se volvió a lavar 4 veces con solución de lavado para eliminar el anticuerpo no unido. Cada lavado duró 10 minutos y se realizó en agitación. Posteriormente se realizó un lavado adicional de cinco minutos con PBS.
- e) Revelado: La detección de la proteína se realizó por quimioluminiscencia utilizando el kit comercial ECL (Amersham Pharmacia, Uppsala, Suecia), exponiendo la membrana

durante 1 minuto a la mezcla reactiva comercial. Posteriormente, se introdujo en un cassette junto con una película (Amersham Hyperfilm ECL, Suecia) durante aproximadamente 5 minutos.

Con el fin de normalizar la concentración de proteína de las distintas muestras se incubaron las membranas de nitrocelulosa con un anticuerpo primario anti- β -actina (Sigma Aldrich) y su anticuerpo secundario correspondiente.

2.11.-Citometría de flujo

Se investigó la presencia de células humanas CD45+ en el hígado y en la sangre de las ratas mediante citometría de flujo.

Reactivos

Para muestras de hígado:

Los hígados se digirieron previamente en una solución de colagenasa siguiendo una modificación del protocolo descrito por Berry and Friend (1969).

- Solución G.
- Albúmina bovina fetal (Sigma Aldrich).
- Colagenasa IV (Sigma Aldrich).
- Anticuerpo anti-CD45 humano monoclonal obtenido en ratón conjugado con fluoresceína de 0,1mg de IgG1/1 mL (SFL87F, Serotec FL, Oxford, Reino Unido).

La solución G se compone de los siguientes reactivos:

- Glucosa 1,1 g/L (Sigma Aldrich).
- NaCl 8 g/L (Sigma Aldrich).
- KCl 0,4 g/L (Sigma Aldrich).

- Na_2HPO_4 0,156 g/L (Sigma Aldrich).
- KH_2PO_4 0,15 g/L (Sigma Aldrich).
- MgSO_4 0,076 g/L (Sigma Aldrich).
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,018 g/L (Sigma Aldrich).
- H_2O libre de endotoxinas.

Una vez preparada la solución G, se añadieron 20 g/L de albúmina y 0,4 U/L de colagenasa.

Para muestras de sangre:

- EDTA 90 mg/mL (Sigma Aldrich).
- PBS (Sigma Aldrich).
- Solución de lisis (Tampón de lisis de eritrocitos (NH_4Cl 150 mM, KHCO_3 1 mM, Na-EDTA 0,1 mM pH 7,4).
- Anticuerpo anti-CD45 humano monoclonal obtenido en ratón conjugado con fluoresceína, de 0,1mg de IgG1/1 mL (SFL87F, Serotec FL, Oxford, Reino Unido).

Procedimiento

Para muestras de hígado:

Se pesaron 100 mg de hígado y se trituraron con ayuda de un potter. Se añadieron 5 mL de la solución de colagenasa, se traspasó la suspensión a una placa petri y se incubó con agitación durante 2 horas a 37° C en una estufa. Pasado este tiempo, se filtró a través de una malla de 100 μm . Se tomó 1 mL de filtrado y se añadieron 20 μL de anticuerpo. Finalmente se incubó en oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente y se procedió a su medida en el citómetro.

Para muestras de sangre:

La sangre se recogió en un tubo al que previamente se le había añadido anticoagulante (EDTA). En un tubo de centrifuga se pusieron 100 µL de sangre y 10µL de anticuerpo anti-CD45. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación, se le añadió solución de lisis y se centrifugó a 400 x g y temperatura ambiente durante 5 minutos. Se lavaron las células con PBS y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Por último, se resuspendieron las células en PBS y se procedió a su medida en el citómetro.

Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACS Vantage (Becton Dickinson Immunocytometry System, San José, California, EE. UU.) equipado con un láser Coherent Enterprise (150 mW a 488 nm, 60 mW a UV). El láser se reguló a 488 nm y 59 mW, adquiriendo la muestra en el detector FL1 regulado a una ganancia de 511 (escala Log) con un filtro interpuesto BP530/30. Se analizaron 10.000 células (1.000 células/segundo).

2.12.- Modelo experimental de hepatitis aguda provocada por D-galactosamina

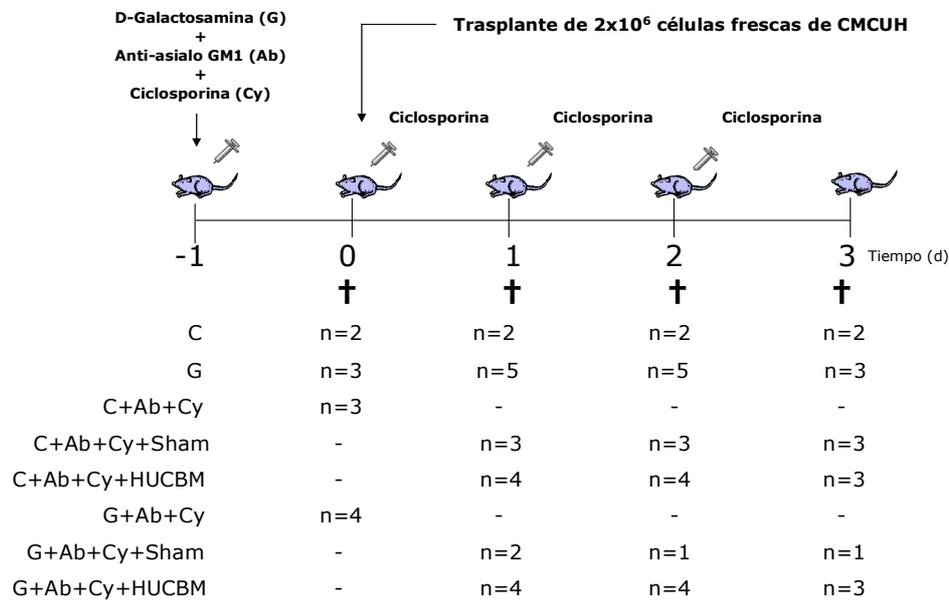
Reactivos

- D- (+)-Galactosamina-HCl (Sigma Aldrich, Missouri, EE. UU.).

Procedimiento

Se partió de ratas con un peso comprendido entre 200-250 g. Para producir el daño hepático se les administró a los animales una dosis de D-galactosamina-HCl de 250 mg/kg vía intraperitoneal.

2.12.1.- Diseño experimental del trasplante de CMCUH a ratas con hepatitis experimental provocada por D-Gal



Los animales se dividieron en los siguientes grupos:

- Grupo C: grupo control que no recibió ningún tratamiento.
- Grupo G: recibió D-galactosamina.
- Grupo C+Ab+Cy: recibieron tratamiento de inmunosupresión (ciclosporina A y anticuerpo anti-asialo GM1).
- Grupo C+Ab+Cy+Sham: recibió inmunosupresión y laparotomía, pero no trasplante celular.
- Grupo C+Ab+Cy+HUCBM: recibió inmunosupresión y una inyección intraportal de 2×10^6 células mononucleares frescas.
- Grupo G+Ab+Cy: recibió D-galactosamina e inmunosupresión.
- Grupo G+Ab+Cy+Sham: recibió D-galactosamina, inmunosupresión y laparotomía, pero no trasplante celular.
- Grupo G+Ab+Cy+HUCBM recibió D-galactosamina, inmunosupresión y una inyección intraportal de 2×10^6 células mononucleares frescas.

2.13.-Modelo experimental de cirrosis hepática provocada por tioacetamida.

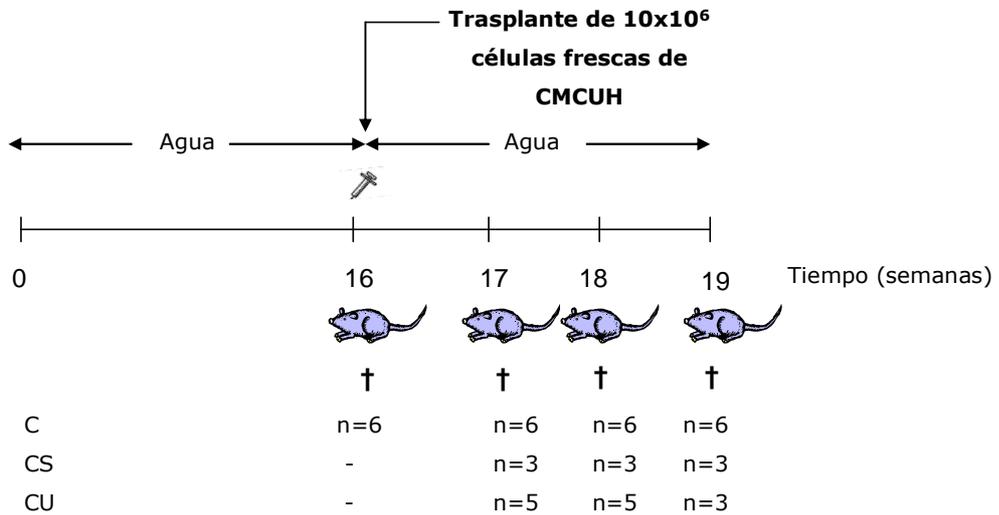
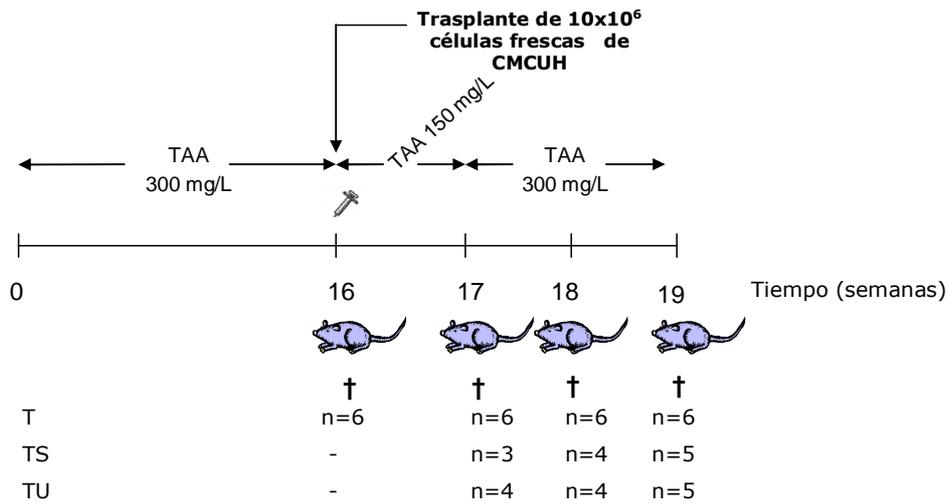
Reactivos

- Tioacetamida (Merck Farma y Química, S.L., Mollet del Vallés, España).

Procedimiento

Se partió de ratas con un peso comprendido entre 100-130 g. Durante cuatro meses se les administraron 300 mg de tioacetamida por litro de agua de bebida con el objeto de producir la cirrosis hepática, transcurridos los cuales se sometieron al trasplante de CMCUH. Durante la semana posterior a éste, se mantuvo la ingesta de TAA en el agua de bebida aunque la dosis se redujo a la mitad (150 mg/L) tras la cual se volvió a la dosis inicial (300mg/L) hasta el día de su sacrificio.

2.13.1.- Diseño experimental del trasplante de CMCUH a ratas con cirrosis hepática provocada por la administración de TAA.



Los animales se dividieron en los siguientes grupos:

- Grupo C: bebió sólo agua durante 4 meses y no fue sometido a ningún tratamiento.
- Grupo T: recibió TAA durante 4 meses en el agua de bebida.
- Grupo CS: bebió agua durante 4 meses, recibió inmunosupresión y se sometió a laparotomía, pero no recibió trasplante celular.
- Grupo CU: bebió agua durante 4 meses, recibió inmunosupresión y una inyección intraportal de 10×10^6 células mononucleares frescas.
- Grupo TS: ingirió TAA durante 4 meses en el agua de bebida, recibió inmunosupresión, se sometió a laparotomía, pero no recibió trasplante celular.
- Grupo TU: ingirió TAA durante 4 meses en el agua de bebida, recibió inmunosupresión y una inyección intraportal de 10×10^6 células mononucleares frescas.

2.14-Metodología del trasplante celular

Reactivos

- Ciclosporina A (Fluka).
- Anticuerpo anti-asialo GM1 obtenido en conejo 1mg/mL (986-10001, Wako Chemicals, Japón).
- Pentobarbital Sódico 0,5 g/ 100 mL (Sigma Aldrich).
- Tampón fosfato salino 1 X pH 7,4 (Sigma Aldrich).

Procedimiento

Se utilizaron como receptores ratas Wistar macho. Los animales recibieron una inyección intraperitoneal de anticuerpo anti-asialo GM1 (100 μ L/rata) y otra intramuscular de ciclosporina A (15 mg/Kg) la víspera del trasplante. El día del trasplante se anestesiaron las ratas

con una inyección intraperitoneal de pentobarbital a la dosis 5 mg/100 g de peso y se colocaron en posición *decubito supino*. Previo afeitado del abdomen se realizó una incisión a lo largo de la línea alba que interesó piel, músculo y peritoneo, dejando al descubierto la vena porta. Con ayuda de una jeringuilla de insulina se inyectaron en esta vena las células de cordón umbilical humano en un volumen de 100 µL de medio DMEM suplementado con suero. Tras la inyección se retiró la jeringuilla e, inmediatamente, se hizo hemostasia bajo presión en el sitio de la punción con una gasa durante aproximadamente un minuto tras el cual se procedió a suturar. Después de la cirugía, se colocó una única rata en cada jaula.

2.15.- Sacrificio y toma de muestras

Reactivos

- Paraformaldehído (Sigma Aldrich) 4 % (p/v) en PBS 0,5 X.
- Azida sódica 0,01 % (p/v) en PBS 0,5 X (Sigma).
- Kit para extracción de ARN de sangre Ribo Pure™- Blood (1928, Ambion).
- Kit para extracción de ADN de sangre (NA2010, Sigma Aldrich).

Procedimiento

Se mantuvo la inmunosupresión diaria con ciclosporina administrando además, una dosis de recuerdo de anticuerpo antiasialo a los 11 días después del trasplante (véanse los diseños experimentales 2.12.1 y 2.13.1). Los animales se sacrificaron con guillotina. Se extrajo la sangre, el hígado, el bazo y los riñones tras lo cual se lavaron con solución salina, se trocearon y se dividieron en varios trozos. El primero de ellos se fijó durante 6 horas a temperatura ambiente en paraformaldehído al 4% en PBS, tras lo cual se transfirieron a PBS 0,5 X conteniendo un 0,01% de azida

sódica y conservó a 4°C hasta su observación microscópica. La segunda se congeló a -80 °C en una solución al 5% de dimetil sulfóxido (DMSO) para posteriores determinaciones en el citómetro de flujo.

Una alícuota de sangre sirvió para la obtención de ARN y ADN con kits comerciales y según los protocolos facilitados por el fabricante. El resto se centrifugó a 1.610 x g, a 4° C y 10 minutos para separar el plasma de las células.

2.16.-Determinación en plasma de marcadores bioquímicos de daño hepático y renal

Para valorar el daño hepático se determinaron las actividades en plasma de las enzimas alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), γ -glutamilttransferasa (γ -GT), fosfatasa alcalina (ALP) y lactato deshidrogenasa (LDH) así como las concentraciones albúmina, bilirrubina total y directa, urea y creatinina. Se determinaron usando kits comerciales y un autoanalizador Cobas Integra 400 (Roche Diagnostics, Basel, Suecia).

Procedimiento

El plasma se obtuvo mediante centrifugación de la sangre a 1.610 x g y 4° C durante 10 minutos. A continuación se siguió el protocolo facilitado por el fabricante en cada caso midiendo la absorbancia a la longitud de onda indicada en cada método.

2.17.-Inmunofluorescencia

Reactivos y material utilizado

- Paraformaldehído 2% (p/v) (Sigma Aldrich) en PBS 0,5 X.
- PBS 0,5 X (Sigma Aldrich).
- Tritón X-100/PBS 0,1% (p/v) (Sigma Aldrich).

- Anticuerpo anti- α -fetoproteína humana, policlonal obtenido en cabra y conjugado con rodamina, dilución 1/100 de 200 μ g de IgG/1 mL, Santa Cruz Biotechnology (sc-8108, Santa Cruz, California, EE. UU.).
- Anticuerpo anti-citoqueratina-18 humana, monoclonal obtenido en ratón y conjugado con fluoresceína, dilución 1/10 de 100 μ g de IgG/1 mL, (ab7798, Abcam, Cambridge, Reino Unido).
- Anticuerpo anti-albúmina humana, policlonal obtenido en conejo, dilución 1/100 de 200 μ g de IgG/1 mL (F 0117, Dako Cytomation, Dinamarca).
- Anticuerpo anti-CD45 humano, monoclonal de ratón, dilución 1/100 de 200 μ g de IgG/1 mL, (sc-1187, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EE. UU.).
- Fluoromount-G 0100-01 (SouthernBiotech, Birmingham, EE. UU.).
- Microscopio Olympus Invertido de fluorescencia IX71S8F-3 (Hamburgo, Alemania).

Procedimiento

Se cultivaron las células sobre cubreobjetos impregnados con gelatina 1% (p/v) en medio DMEM suplementado (véase tabla I). Se siguió el siguiente protocolo:

- 1) Se extrajo el medio de cultivo a la placa y se lavó durante 5 minutos con PBS 0,5 X.
- 2) Se añadió paraformaldehído 2 % (p/v) para fijarlas, dejando actuar durante 20 minutos.
- 3) Se realizó a continuación un segundo lavado de 5 minutos con PBS 0,5 X.
- 4) Para facilitar la penetración del anticuerpo, se permeabilizó la membrana celular añadiendo Tritón X-100/PBS 0,1% (5 minutos), lavando después con PBS 0,5 X (5 minutos).

- 5) A continuación, los cubreobjetos se colocaron individualmente en placas añadiendo 1 mL del anticuerpo correspondiente, diluido convenientemente, manteniéndolos dos horas a temperatura ambiente y toda la noche a 4° C, con agitación suave y en oscuridad. Se retiraron los anticuerpos y se lavaron con PBS 0,5 X (3 X 5 minutos cada lavado).
- 6) Antes del montaje con Fluoromount-G se llevó a cabo una tinción con Hoechst 33342 para la tinción de núcleos celulares (10 µg/mL durante 3 minutos, Sigma Aldrich, Missouri, EE. UU.) y posterior lavado con PBS 0,5 X durante 5 minutos).
- 7) Por último, se montaron los cubreobjetos con Fluoromount-G (SouthernBiotech, 0100-01) para su observación en el microscopio de fluorescencia.

2.18.-Histología

La preparación de los tejidos para su estudio en microscopía óptica se realizó en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Reactivos y material utilizado

- Paraformaldehído 4 % (p/v) (Sigma Aldrich) en PBS 0,5 X.
- Resina epoxi (Electron Microscopy Sciences, EMBED 812).
- Ultramicrotomo Ultracut R (Leica).
- Microscopio Olympus Invertido de fluorescencia IX71S8F-3 (Hamburgo, Alemania).
- Azul de toluidina (1% de azul de toluidina en borax al 1%, en placa caliente).

Procedimiento

Tras su extracción, los hígados y los riñones se lavaron en solución salina, se trocearon en bloques más pequeños y se fijaron

durante 6 horas a temperatura ambiente con paraformaldehído al 4 %, tras lo cual se pasaron a PBS 0,5 X conteniendo un 0,01% de azida sódica para su conservación en frío. Los trozos se incluyeron en resina epoxi (EMbed 812) y se realizaron secciones semifinas de 1 μ m de grosor con microtomo para su tinción con azul de toluidina y posterior evaluación morfológica.

2.19. - Microscopía confocal

Reactivos y material utilizado

- Paraformaldehído 2% (p/v) (Sigma Aldrich) en PBS 0,5 X
- PBS 0,5 X (Sigma Aldrich).
- Azida sódica 0,01% (p/v) (Sigma Aldrich) en PBS 0,5 X.
- Tritón X-100/PBS 0,2% (p/v) (Sigma Aldrich).
- Anticuerpo anti-citocromo P450 3A4, dilución 1:500 (Abcam, Cambridge, Reino Unido).
- Anticuerpo anti-hepatocitos humanos monoclonal obtenido en ratón, dilución 1/50 de 165 mg de IgG/1L (M-7158, Dako Cytomation, Dinamarca).
- Anticuerpo secundario anti-IgG obtenido en conejo y conjugado con rodamina, dilución 1/1000 (rabbit IgG CyTM3-linked, Amersham, Tokio, Japón).
- Hoechst 33342 0,01% (v/v) en PBS 0,5 X (Sigma Aldrich).
- Fluoromount-G 0100-01 (SouthernBiotech, Birmingham, EEUU).
- Microscopio Leitz DMRB equipado con un sistema de escaneado de imagen láser confocal TCS-SP5 (Leica).
- Vibratomo VT 1000S (Leica).

Procedimiento

Los hígados se lavaron en solución salina, se trocearon en bloques más pequeños y se fijaron durante 6 horas a temperatura

ambiente con paraformaldehído 4 %, tras lo cual se dejaron en una solución de azida sódica al 0,01 % (p/v) en PBS 0,5 X para su conservación en frío. Se realizaron cortes de 50 μ m de sección y se permeabilizó la membrana celular añadiendo Tritón X-100/PBS 0,1% durante 30 minutos, lavando después con PBS 0,5 X tres veces (5 minutos/lavado). A continuación, se añadió el anticuerpo anti-CYP 3A4, dejando actuar durante toda la noche a 4° C. Se volvió a lavar con PBS 0,5 X tres veces (5 minutos/lavado) tras lo cual se procedió a la tinción de los núcleos celulares con Hoechst durante 3 minutos. Tras volver a lavar tres veces más con PBS 0,5 X se añadió el anticuerpo secundario, se dejó actuar durante dos horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente y tras proceder a un último lavado con PBS 0,5 X se montaron los cubres con Fluoromount-G 0100-01 (SouthernBiotech,) para su observación en el microscopio Confocal.

2.20.-Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (SEM).

Para el modelo experimental de hepatitis aguda provocada por D-Gal, el análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 14.0 (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL). Se realizó un tratamiento estadístico no paramétrico para la comparación de las diferentes fuentes de variación. Mediante el test de H Kruskal Wallis se comparó la fluorescencia a los distintos tiempos, y con el test de Mann-Whitney U, se comparó la fluorescencia entre dos grupos diferentes del mismo tiempo. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $P < 0.05$.

En el caso del modelo experimental de cirrosis experimental provocada por TAA, para todas las variables consideradas, se realizó un análisis estadístico descriptivo y de distribución de normalidad de los datos mediante el test de Shapiro Will. Todas las variables analizadas siguieron los criterios de normalidad por lo que para la

comparación de medias entre diferentes tratamientos se utilizaron test estadísticos de tipo paramétrico. Los efectos de diferentes tratamientos x tiempo y de sus interacciones se analizaron mediante ANOVAs de doble vía y las comparaciones entre medias para tratamientos concretos y tiempos específicos se llevaron a cabo mediante tests *a posteriori* de Bonferroni. Los efectos del tiempo para un tratamiento específicos se llevaron a cabo mediante ANOVAs de una vía y comparaciones entre medias *a posteriori* con el test de Bonferroni, si existía igualdad de varianzas, y con el test de Tamhane, si las varianzas eran desiguales. La igualdad de varianzas se determinó mediante el test de Levene.

Se consideró estadísticamente significativo un valor de $P < 0.05$. Para los análisis estadísticos se usó el programa SPSS versión 15.0 (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL).

IV. Resultados

1.- ESTUDIO *in vitro*

Las células de la fracción mononuclear de la sangre de cordón (CMCUH) se aislaron y cultivaron en placas recubiertas de gelatina en presencia o ausencia de los siguientes factores de crecimiento y diferenciación humanos: HGF, FGF-a, FGF-b, SCF y LIF. Las células cultivadas en ausencia de estos factores no se fijaron correctamente a la placa. Después de varios días en cultivo, las células incubadas en presencia de los factores de crecimiento/diferenciación presentaron dos morfologías diferentes, redondeadas y fibroblásticas (Fig. 4).

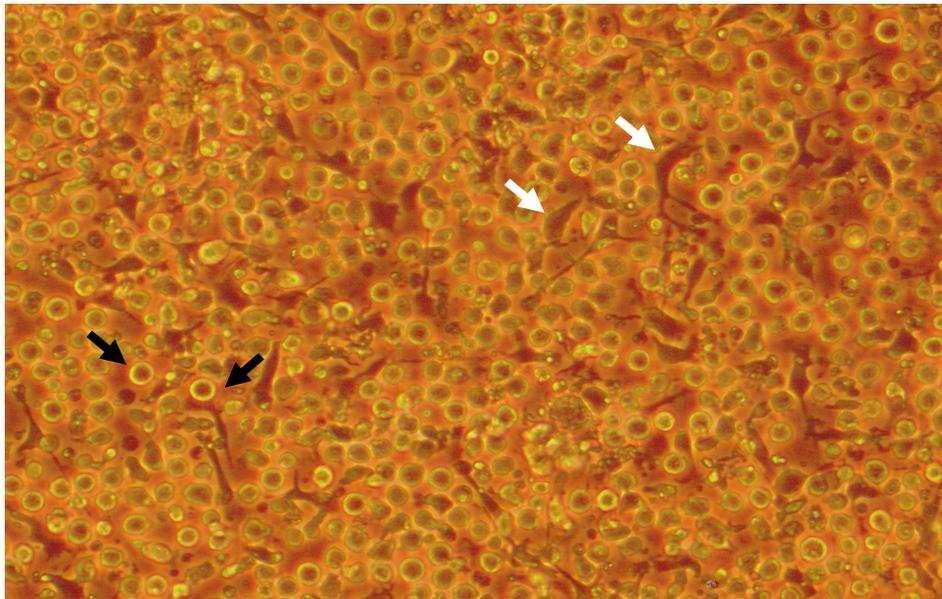


Fig. 4. Observación al microscopio óptico de las CMCUH en cultivo. Después de 4 días en cultivo, las células cultivadas en presencia de los factores de crecimiento/diferenciación presentaron dos morfologías diferentes, redondeadas (flechas negras) y fibroblásticas (flechas blancas).

Para su caracterización se investigaron los niveles de ARNm y proteínas de varios marcadores de hepatocitos (albúmina, CK-18 y glutamina sintetasa), de células progenitoras hepáticas (α -fetoproteína), de metabolismo hepático (citocromo P450 3A4) y de leucocitos (CD45) tras 7, 14, y 21 días de cultivo. Los niveles de ARN mensajero se analizaron mediante RT-PCR a tiempo real, mientras que los niveles proteicos se determinaron por inmunofluorescencia y *western blot*.

1.1.- RT-qPCR

Los resultados obtenidos por RT-PCR a tiempo real demostraron que las células expresaron α -fetoproteína, CK-18, glutamina sintetasa y albúmina cuando se incubaron en presencia de factores de crecimiento/diferenciación humanos. Así, todos los marcadores se detectaron a los 7 días de cultivo (Fig. 5A-D). La máxima expresión del ARNm de albúmina y CK-18 se detectó a los 14 días, mientras que la máxima expresión de la α -fetoproteína y de glutamina sintetasa se produjo tras 21 de incubación. Las células aisladas frescas no expresaron ninguno de estos marcadores.

Además, se observó que la expresión de CD45 humano (marcador leucocitario) disminuyó de manera dependiente del tiempo en el cultivo (Fig. 5E).

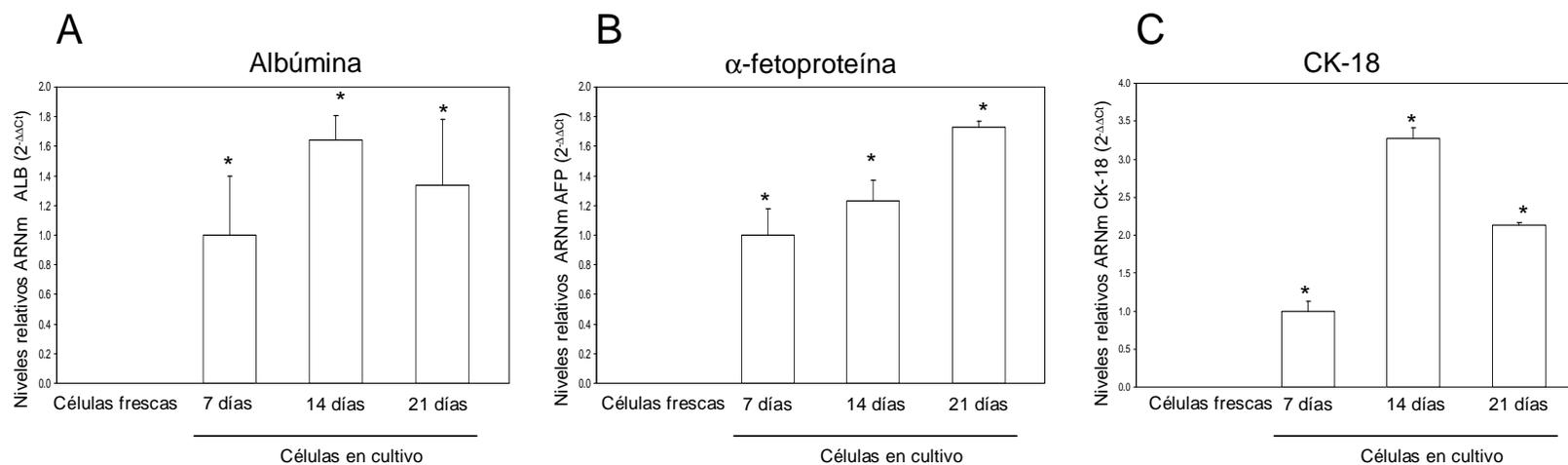


Fig. 5. Expresión de ARNm de albúmina, α -fetoproteína y CK-18. Mediante RT-qPCR se estudió la evolución en el tiempo que siguieron los niveles humanos de albúmina (A), α -fetoproteína (B), CK-18 (C) procedentes de CMCUH. * $p < 0,05$ vs. células frescas.

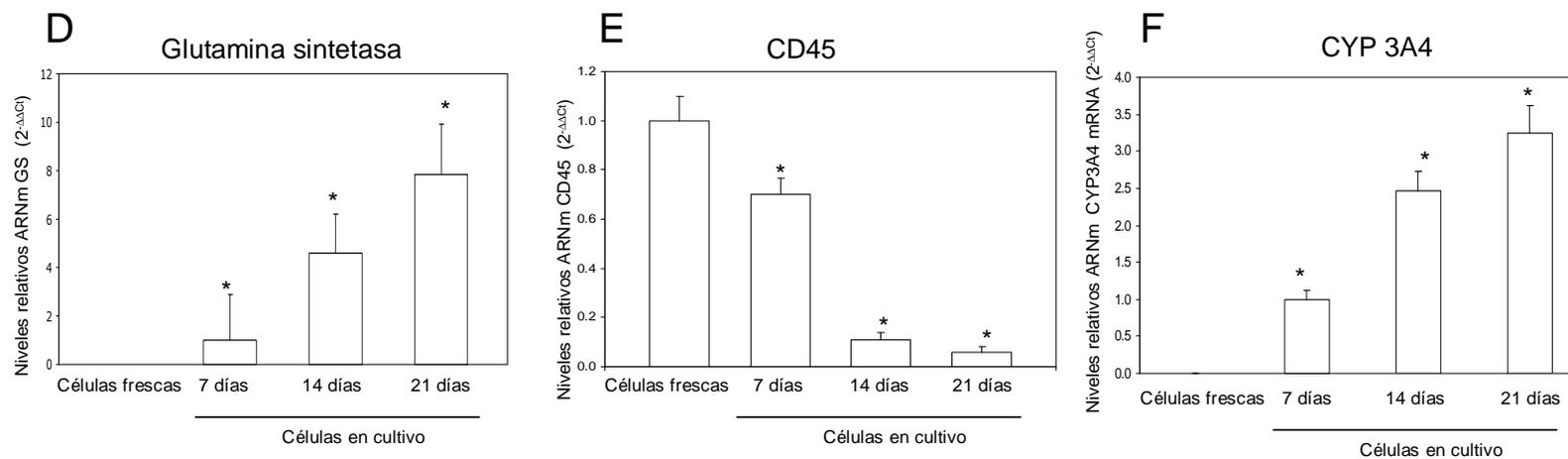


Fig. 5. Expresión de ARNm de glutamina sintetasa, CD45 y citocromo P450 3A4. Mediante RT-qPCR se estudió la evolución en el tiempo que siguieron los niveles humanos glutamina sintetasa (D), CD45 (E) y citocromo P450 3A4 (F) procedentes de CMCUH. * $p < 0,05$ vs. células frescas.

1.2.- Inmunofluorescencia

El análisis por inmunofluorescencia reveló que las CMCUH cultivadas en presencia de factores humanos expresaban albúmina, CK-18, y α -fetoproteína (Fig. 6A-C). Tanto las células redondeadas como las fibroblásticas fueron positivas para albúmina y α -fetoproteína (Fig. 6A y B). Las células incubadas en ausencia de factores de crecimiento/diferenciación se utilizaron como controles negativos para los experimentos de inmunofluorescencia, no encontrándose células positivas para ninguno de los marcadores seleccionados.

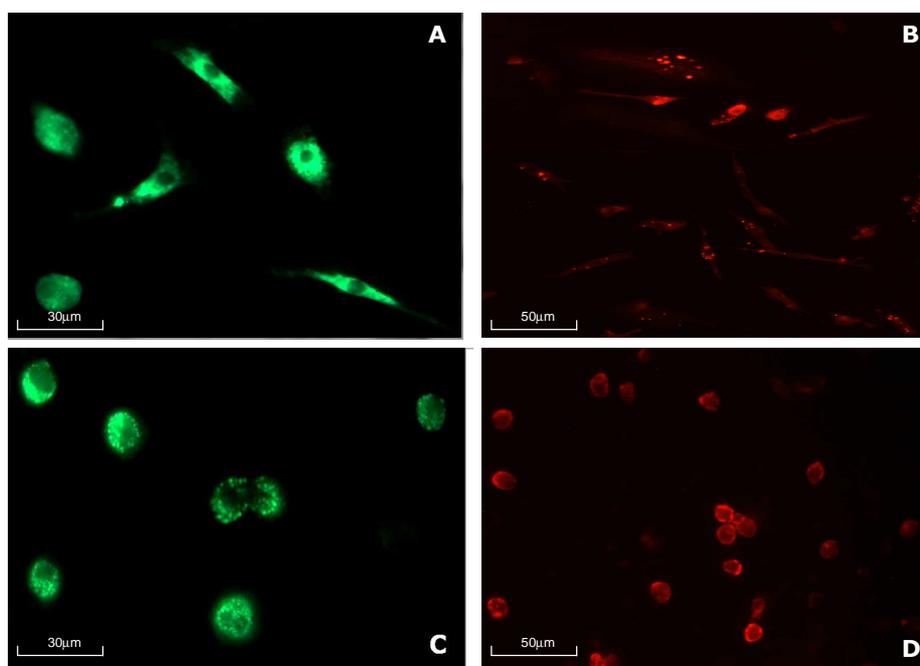


Fig. 6. Inmunofluorescencia de las CMCUH en cultivo. Las CMCUH cultivadas expresaron las siguientes proteínas: albúmina (A), α -fetoproteína (B), CK-18 (C), y CD45 (D) tras su incubación con los correspondientes anticuerpos específicos humanos conjugados con fluoresceína (verde) o rodamina (rojo). El ensayo de inmunofluorescencia se llevó a cabo tras 3 (CD45), 14 (CK-18) o 21 (albúmina y α -fetoproteína) días en cultivo. Los experimentos se repitieron en 5 ocasiones. Se muestran imágenes representativas de cada uno de ellos.

1.3.- Western blot

Mediante *western blot* se detectó la presencia de albúmina, α -fetoproteína, CK-18, y glutamina sintetasa en las células cultivadas pero no en las células aisladas frescas (Fig. 7A-C), apoyando los resultados de inmunofluorescencia.

Los niveles proteicos de CYP 3A4 (marcador del metabolismo hepático) aumentaron de manera dependiente del tiempo en el cultivo de CMCUH (Fig. 7D), lo que sugiere que la función metabólica mejoró en presencia de los factores de crecimiento/diferenciación. En cambio, la expresión de CD45 humano (marcador leucocitario) disminuyó de manera dependiente del tiempo en el cultivo de (Fig. 7E).

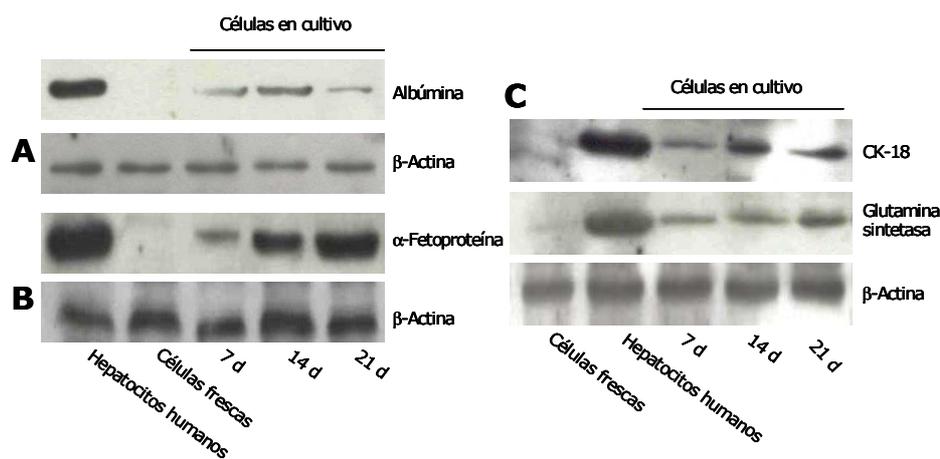


Fig. 7. (A, B, C). Perfil proteico de las CMCUH en cultivo mediante *western blot*. Evolución en el tiempo que siguieron los niveles proteicos de Albúmina (A), α -fetoproteína (B) y CK-18 (C), todas ellas humanas, tanto en las CMCUH frescas aisladas como en las cultivadas. Se usó como control positivo un lisado de hepatocitos humanos. Experimentos realizados por triplicado. Se muestran imágenes representativas de cada uno de ellos.

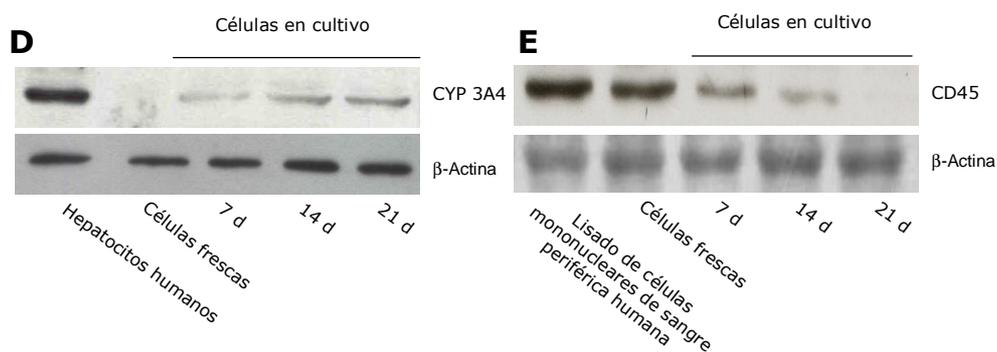


Fig. 7. (D, E). Perfil proteico de las CMCUH en cultivo mediante *western blot*. Evolución en el tiempo que siguieron los niveles proteicos de CYP 3A4 (D) y CD45 (E), ambas humanas, tanto en las CMCUH frescas aisladas como en las cultivadas. Se usó como control positivo un lisado de hepatocitos humanos o un lisado de células mononucleares procedentes de sangre periférica humana. Experimentos realizados por triplicado. Se muestran imágenes representativas de cada uno de ellos.

2.- ESTUDIOS *in vivo*

2.1.-MODELO EXPERIMENTAL DE HEPATITIS AGUDA/FALLO HEPÁTICO FULMINANTE PROVOCADA POR D-GALACTOSAMINA (D-Gal)

Para el modelo de hepatitis aguda se utilizaron ratas con un peso inicial comprendido entre 300-350 g. A los animales, a los que previamente se les había inducido hepatitis mediante la administración D-galactosamina se les realizó un trasplante de 2×10^6 de CMCUH. Para evitar el rechazo, las ratas fueron inmunosuprimidas con ciclosporina A y un anticuerpo que elimina las células natural killer. El anidamiento de las células se analizó a las 24, 48 y 72 horas después del trasplante.

2.1.1.- Relación peso hígado/peso corporal

Los resultados de la relación peso hígado/peso corporal se recogen en la figura 8.

El dato más relevante fue la disminución de este parámetro en el grupo tratado con D-Gal (grupo G) en comparación con los controles (grupo C) a tiempo cero.

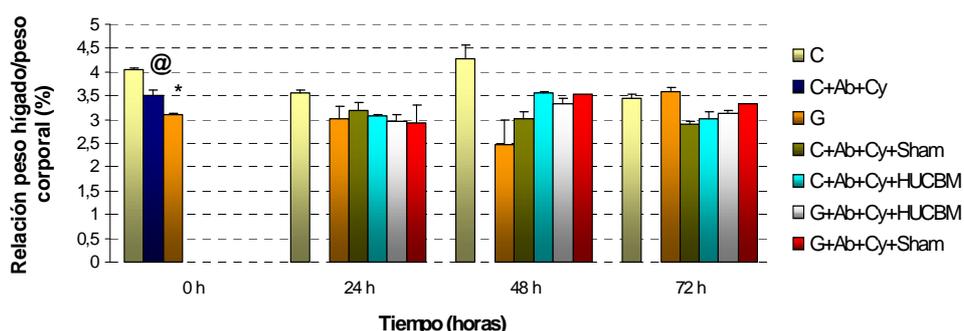


Fig. 8. Relación peso del hígado/peso corporal (%). C: grupo control sin tratamiento. G: grupo al que se le inyectó D-Gal. C+Ab+Cy: grupo control inmunosuprimido. C+Ab+Cy+HUCBM: grupo control sometido a inmunosupresión y a trasplante celular. G+Ab+Cy+Sham: grupo que recibió D-Gal, inmunosupresión y sometido a laparotomía. C+Ab+Cy+Sham: grupo control sometido inmunosupresión y a laparotomía. G+Ab+Cy+HUCBM: grupo que recibió D-Gal, inmunosupresión y sometido a trasplante celular. Los resultados son la media \pm SEM. * $p < 0.05$, grupo C vs. grupo G. @ $p < 0.05$, grupo C vs. C+Ab+Cy.

a. Efecto de la D-galactosamina

Aspecto macroscópico del hígado

Macroscópicamente, los hígados de las ratas a las que se les inyectó D-galactosamina (grupo G) presentaban una tonalidad amarillenta, indicativa de esteatosis (Fig. 9B).

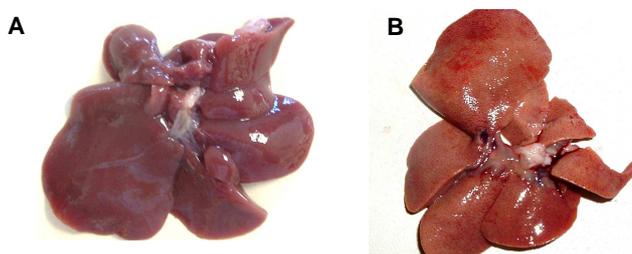


Fig. 9. (A) Hígado de una rata que no recibió ningún tratamiento (grupo C). **(B)** Hígado de una rata a la que se le inyectó D-Gal (grupo G).

Estudio histológico

Se hicieron cortes semifinos de 1 μm de grosor, de distintos bloques de inclusión para cada hígado a los distintos tiempos de sacrificio. Las secciones se tiñeron con azul de toluidina para su estudio histológico y observación microscópica. El aspecto del parénquima hepático de las ratas control y las tratadas con D-Gal se muestra en la figura 9. Se observó un daño hepático severo en los hígados de las ratas tratadas con D-Gal, en comparación con los controles, siendo los hallazgos histológicos más importantes la presencia de esteatosis, desorganización de los hepatocitos e infiltración leucocitaria. El daño fue mayor en las áreas periportales (Fig. 10).

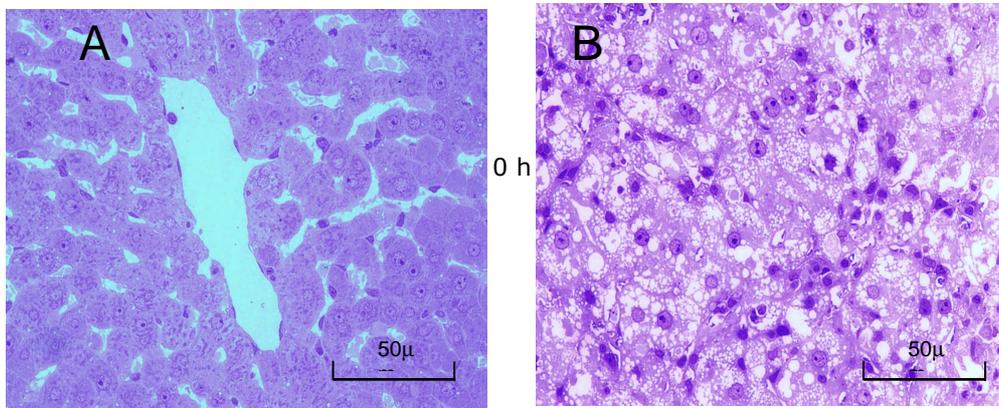


Fig. 10. (A) Sección semifina teñida con azul de toluidina del parénquima hepático de una rata control sana (grupo C) y (B) otra tratada con D-Gal (grupo G). En el parénquima de la rata con hepatitis experimental se aprecia infiltración leucocitaria, desorganización de los hepatocitos y una abundante acumulación de grasa tras 24 horas de la inyección de D-Gal. Ampliación total 640 X.

b. Detección de células humanas en los animales trasplantados

Para la detectar la presencia de células humanas tanto en la sangre como en el hígado de las ratas trasplantadas, se utilizaron las siguientes técnicas:

- RT-qPCR
- Citometría de flujo
- Microscopía confocal
- *Western blot*

2.1.2.- RT-qPCR

Mediante RT-qPCR se investigó la presencia de células CD45+ humanas en la sangre y el hígado de las ratas. Si bien no se detectó este marcador humano ni en sangre ni en hígado, sí se detectó ARNm

de otro marcador humano mucho más abundante como el GADPH (resultados no mostrados).

2.1.3.- Citometría de flujo

Los datos de fluorescencia obtenidos por citometría de flujo aparecen en la figura 11. La citometría reveló la presencia del marcador humano CD45 en los hígados de las ratas control y las ratas con hepatitis que recibieron trasplante celular (grupos C+Ab+Cy+HUCBM y G+Ab+Cy+HUCBM). El porcentaje de células positivas encontradas fue mayor en el grupo G+Ab+Cy+HUCBM que en el grupo C+Ab+Cy+HUCBM. El valor máximo de fluorescencia obtenido corresponde al grupo G+Ab+Cy+HUCBM y fue de 2,91% a las 72 horas.

Es de destacar que la fluorescencia aumentó a lo largo del tiempo en estos dos grupos.

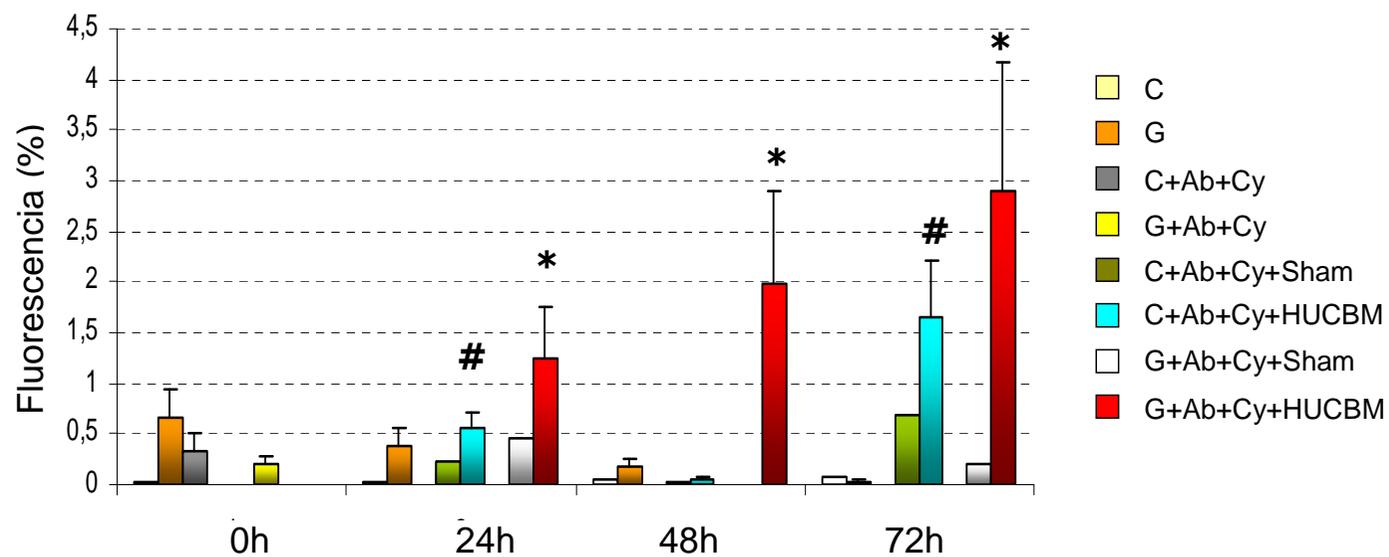


Fig.11. Detección de células CD45+ humanas por citometría de flujo. Los hígados de las ratas receptoras se digirieron con collagenasa, se incubaron con anticuerpo anti-CD45 humano conjugado con fluoresceína y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados se expresan en porcentaje (media \pm SEM). * $p < 0.05$, G+Ab+Cy+HUCBM vs. G+Ab+Cy+Sham. # $p < 0.05$, C+Ab+Cy+HUCBM vs. C+Ab+Cy+Sham.

2.1.4.- Microscopía confocal

Mediante microscopía confocal se observaron células que expresaban CYP 3A4 humano (Fig. 12) en el hígado de ratas control y ratas con hepatitis que habían recibido trasplante celular.

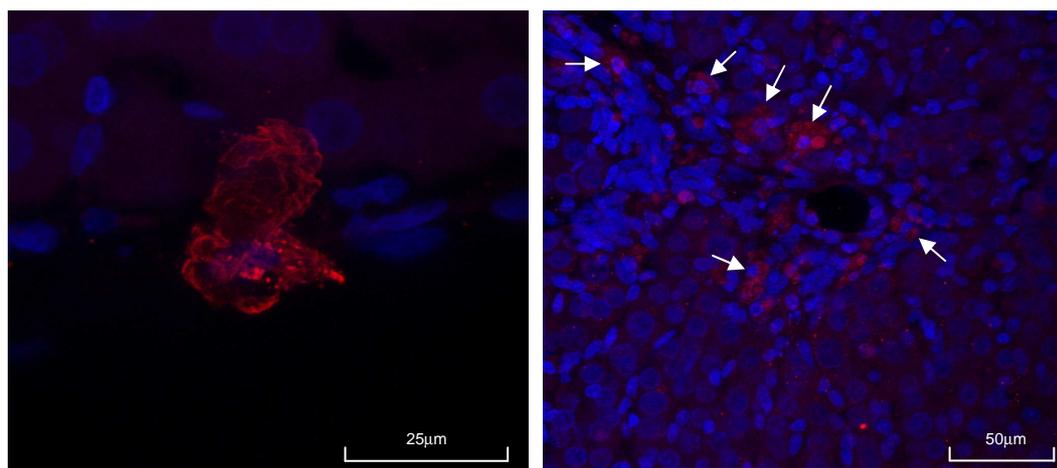


Fig.12. Presencia de células humanas en el hígado de las ratas con hepatitis experimental a los 3 días del trasplante mediante microscopía confocal. Una proyección total de 25 secciones confocales se tomaron cada 0,33 µm a lo largo del eje z de dos células positivas humanas (en rojo) para el anticuerpo anti-CYP 3A4 localizadas en el parénquima hepático. El núcleo de los hepatocitos se tiñó con hoechst 33342 (en azul).

2.1.5.- Western blot

Se detectó CYP 3A4 humano en las ratas tratadas con D-Gal y sujetas a trasplante de CMCUH y también, aunque en niveles más bajos, en las ratas control sometidas a trasplante celular (Fig. 13), apoyando estos resultados los datos obtenidos en citometría y descritos en el apartado anterior.

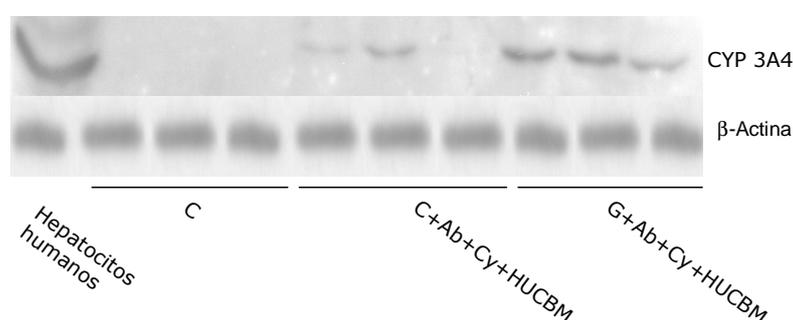


Fig. 13. Detección de CYP 3A4 humano en los hígados de las ratas receptoras. Detección mediante *western blot* de CYP 3A4 humano en el hígado de las ratas control sanas (C), control trasplantadas (C+Ab+Cy+HUCBM) y tratadas con D-Gal sometidas a trasplante celular (G+Ab+Cy+HUCBM). Se usó como control positivo un lisado de hepatocitos humanos. Experimento realizado por triplicado. Se muestra una imagen representativa.

2.1.6.- Efecto de las CMCUH

El análisis histológico reveló una progresiva normalización del parénquima hepático en las ratas con hepatitis que habían sido sometidas a trasplante celular (grupo G+Ab+Cy+HUCBM), normalización que fue prácticamente completa a las 72 horas del trasplante. En cambio, se siguió apreciando esteatosis y desorganización de hepatocitos en el parénquima hepático de las ratas que no recibieron células (grupo G+Ab+Cy+Sham) (Fig. 14).

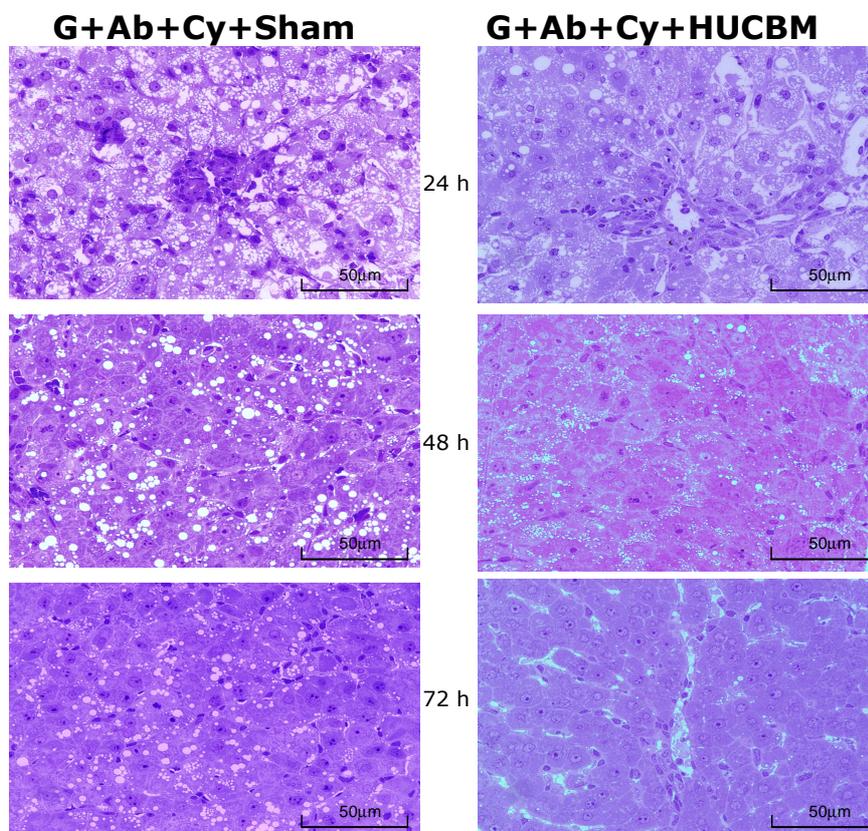


Fig.14. Secciones semifinas teñidas con azul de toluidina del parénquima hepático de 3 ratas control que recibieron inmunosupresión y se sometieron a laparotomía (grupo C+Ab+Cy+Sham) y de 3 ratas con hepatitis experimental que recibieron inmunosupresión y trasplante celular (grupo G+Ab+Cy+HUCBM). En el parénquima de las ratas con hepatitis experimental se aprecia infiltración leucocitaria, desorganización de los hepatocitos y una abundante acumulación de grasa tras 24 horas de la inyección de D-Gal.). Se observó una normalización progresiva del parénquima hepático en las ratas con hepatitis experimental que recibieron trasplante celular (G+Ab+Cy+HUCBM). En cambio, el daño hepático siguió siendo apreciable en las ratas con hepatitis experimental que no recibieron trasplante celular (G+Ab+Cy+Sham) Ampliación total 640 X.

2.1.7.- Marcadores bioquímicos de daño hepático

Para la valoración de la función hepática, se determinaron las actividades plasmáticas de la aspartato y alanina aminotransferasas (AST y ALT), fosfatasa alcalina (AP), γ -glutamyl transferasa (γ -GT) y

lactato deshidrogenasa (LDH), además de las concentraciones en plasma de albúmina, bilirrubina total y directa (TB y DB) (Tabla 2). Los valores de AST, ALT, AP, γ -GT, LDH, TB y DB presentaron valores estadísticamente significativos más altos en el grupo de ratas con hepatitis (Grupo G) en comparación con los controles (grupo C), confirmando que una única inyección de D-Gal indujo daño hepático severo y colestasis.

Todos los parámetros presentaron siempre valores más cercanos a los obtenidos en las ratas sanas (C) en el grupo de animales con hepatitis que recibieron CMCUH (G+Ab+Cy+HUCBM) (Tabla 2), en comparación con los que no recibieron terapia celular (G+Ab+Cy+Sham). La actividad de la AP presentó valores incluso menores que los de las ratas sanas. El trasplante celular produjo la restauración completa de los valores de TB, DB, γ -GT y LDH. La TB también disminuyó en las ratas controles que recibieron células (C+Ab+Cy+HUCBM). No se observaron valores estadísticamente significativos de mejora en las ratas enfermas y que no recibieron terapia (G+Ab+Cy+Sham) frente a los valores obtenidos en las ratas del grupo G (ratas con hepatitis), lo que sugiere un claro efecto beneficioso debido a las CMCUH.

Tabla 2. Marcadores bioquímicos de daño hepático en el plasma de las ratas controles y tratadas D-Galactosamina

Grupo	Albúmina	AST	ALT	AP	BD	BT	γ -GT	LDH
C	3.80±0.19	292.40±37.39	68.59±8.49	200.04±17.88	0.01±0.00	1.28±0.38	1.25±1.15	1151.17±297.31
C+Ab+Cy+Sham	3.05±0.25	291.68±34.53	51.76±10.04	120.46±15.99	0.05±0.02	1.07±0.28	0.27±0.20	927.80±176.30
C+Ab+Cy+HUCBM	2.94±0.23	279.77±61.99	60.90±12.62	120.33±19.51	0.07±0.03	0.54±0.07	1.60±0.46	860.67±260.41
G	3.08±0.52	415.38±81.42#	150.13±44.71#	308.26±58.03#	4.08±1.00#	5.82±1.90#	4.78±1.65#	2715.43±869.92#
G+Ab+Cy+Sham	2.58±0.27	301.13±82.36	108.75±53.05	266.60±39.80	1.24±0.54	2.82±0.99	5.20±1.20	2623.67±562.30
G+Ab+Cy+HUCBM	2.69±0.12	338.58±76.02	84.63±29.18@	89.05±11.94@*	0.06±0.03@*	0.52±0.02@*	1.47±0.21@*	1392.00±55.88@*

AST: Aspartato aminotransferasa; ALT: Alanina aminotransferasa; AP: Fosfatasa alcalina; BD: Bilirubina directa; BT: Bilirrubina total; γ -GT: γ -glutamyl transferasa; LDH: Lactato deshidrogenasa. Los resultados son la media \pm SEM. Los valores de AST, ALT, AP, γ -GT y LDH están expresados en U/L. Los valores de Albúmina, TB y DB están expresados en mg/dL.

$p < 0.05$, grupo C vs. grupo G. * $p < 0.05$, grupo G+Ab+Cy+HUCBM vs. grupo G+Ab+Cy+Sham. @ $p < 0.05$, grupo G+Ab+Cy+HUCBM vs. grupo G.

2.2.- MODELO EXPERIMENTAL DE CIRROSIS HEPÁTICA PROVOCADA POR TIOACETAMIDA

Para el modelo de cirrosis hepática se utilizaron ratas con un peso inicial comprendido entre los 100-130 g. A los animales, a los que previamente se les había provocado una cirrosis mediante la administración de 0,3 g/L de TAA en el agua de bebida se les realizó un trasplante de 10×10^6 CMCUH. Para evitar el rechazo, las ratas fueron inmunosuprimidas con ciclosporina A y un anticuerpo que elimina las células natural killer. El anidamiento de las CMCUH se analizó a los 7, 14 y 21 días después del trasplante.

2.2.1.- Relación peso hígado/peso corporal

Los valores obtenidos para la relación peso hígado/peso corporal de los distintos grupos de estudio aparecen en la figura 15. Estos valores aumentaron significativamente en el grupo T en comparación con los animales controles (grupo C) en todos los puntos de estudio. Se encontraron también diferencias con significación estadística en todos los tiempos entre los grupos TU (grupo de ratas cirróticas, inmunosuprimidas y sometidas a trasplante celular) y CU (grupo de ratas sanas, inmunosuprimidas y sometidas a trasplante celular). El trasplante celular no tuvo ningún efecto sobre estos parámetros ni en las ratas sanas ni en las cirróticas.

2.2.2.- Relación peso bazo/peso corporal

Los valores de la relación peso bazo/peso corporal de los distintos grupos de estudio se encuentran reflejados en la figura 16. Estos valores aumentaron significativamente en el grupo T en comparación con los animales controles (grupo C) a los 7 y 21 días del estudio. Se encontraron también diferencias con significación estadística en estos mismos tiempos entre los grupos TU (grupo de ratas cirróticas, inmunosuprimidas y sometidas a trasplante celular) y

CU (grupo de ratas sanas, inmunosuprimidas y sometidas a trasplante celular). El trasplante celular no tuvo ningún efecto sobre estos parámetros ni en las ratas sanas ni en las cirróticas.

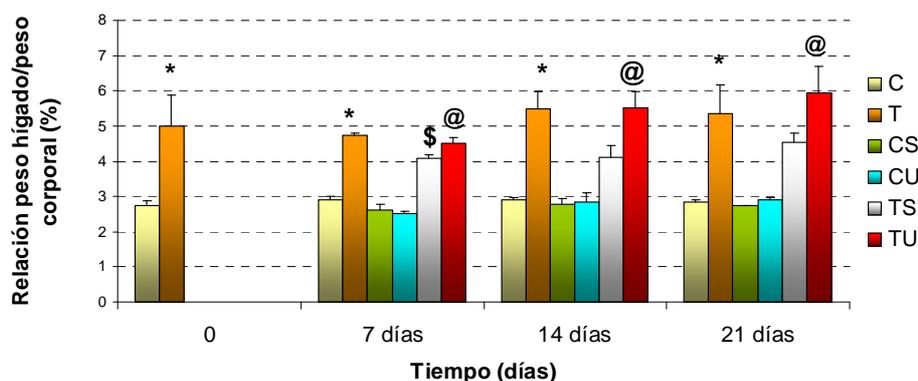


Fig. 15. Relación peso hígado/peso corporal (%): C: grupo control sin tratamiento. T: grupo que ingirió TAA durante 4 meses. CS: grupo control sometido a inmunosupresión y a laparotomía. CU: grupo control sometido a inmunosupresión y a trasplante celular. TS: grupo que ingirió TAA durante 4 meses y sometido a inmunosupresión y a laparotomía. TU: grupo que ingirió TAA durante 4 meses y se sometió a inmunosupresión y a trasplante celular. Los resultados son la media \pm SEM. * $p < 0.05$, grupo C vs. grupo T. @ $p < 0.05$, grupo TU vs. grupo CU. \$ $p < 0.05$, grupo TS vs. CS.

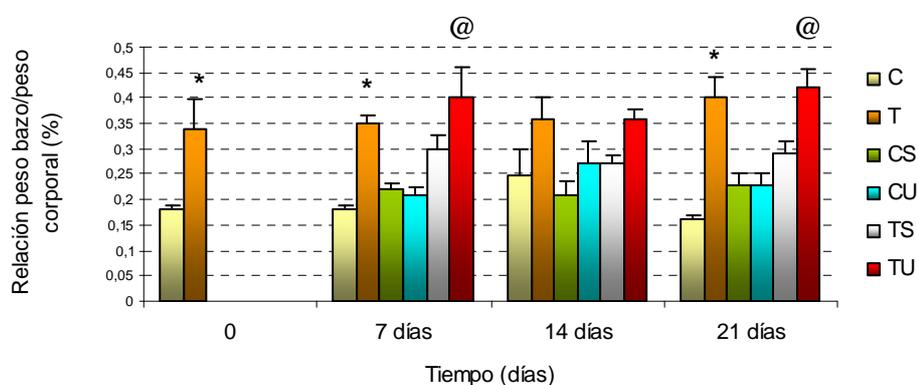


Fig. 16. Relación peso bazo/peso corporal (%). C: grupo control sin tratamiento. T: grupo que ingirió TAA 4 durante meses. CS: grupo control sometido a inmunosupresión y a laparotomía. CU: grupo control sometido a inmunosupresión y a trasplante celular. TS: grupo que ingirió TAA durante 4 meses y sometido a inmunosupresión y a laparotomía. TU: grupo que ingirió TAA durante 4 meses y se sometió a inmunosupresión y a trasplante celular. Los resultados son la media \pm SEM. * $p < 0.05$, grupo C vs. grupo T. @ $p < 0.05$, grupo TU vs. grupo CU.

a. Efecto de la TAA

El peso corporal de las ratas control aumentó progresivamente durante los cuatro meses de experimentación, llegando a alcanzar al final del experimento un peso medio de $400,00 \pm 33,52$ g. En cambio, el peso de las ratas que ingirieron TAA durante cuatro meses en el agua de bebida alcanzó un valor medio de $208,71 \pm 36,08$ g.

Aspecto macroscópico del hígado

Macroscópicamente, los hígados de las ratas a las que se administró TAA durante cuatro meses (grupo T) presentaban una superficie nodular, tonalidad amarillenta y eran duros al tacto, en comparación con los hígados controles (grupo C) (Fig. 17B).

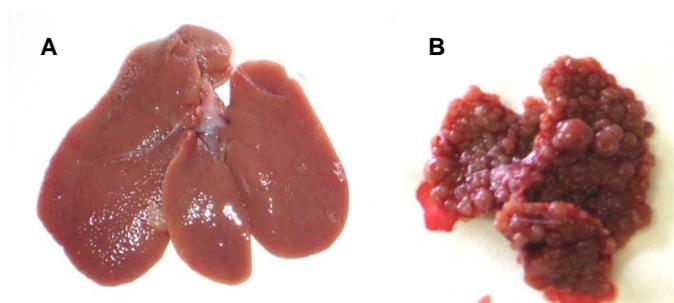


Fig. 17. (A) Hígado de una rata que bebió agua durante 4 meses (grupo C). **(B)** Hígado de una rata que bebió TAA durante 4 meses (grupo T).

Estudio histológico

Se hicieron cortes semifinos de $1 \mu\text{m}$ de grosor, de distintos bloques de inclusión para cada hígado y en más de un hígado en cada uno de los grupos de estudio. Las secciones se tiñeron con azul de toluidina para su estudio histológico y observación microscópica. El estudio histológico reveló que los animales con cirrosis experimental sufrían un daño hepático severo. En este caso, las alteraciones más destacables que se encontraron en el parénquima hepático de las

ratas tratadas con TAA durante cuatro meses (grupo T) fueron: abundantes septos fibrosos y nódulos de hepatocarcinoma, necrosis de los hepatocitos, aumento del tamaño de los nucleolos, signo indicativo de regeneración, así como una evidente alteración de la arquitectura hepática (Fig. 18B).

Los hígados de las ratas controles (grupo C) no presentaban ningún tipo de alteración morfológica (Fig. 18A).

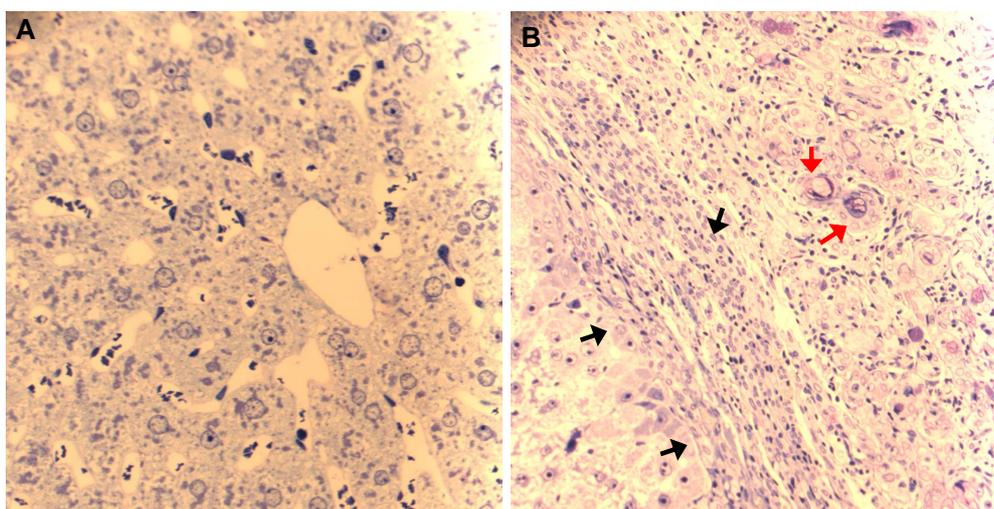


Fig. 18. (A) Sección semifina teñida con azul de toluidina del parénquima hepático de una rata control sana que bebió agua durante 4 meses (grupo C), y (B) de una rata a la que se administró TAA durante 4 meses (grupo T). Las flechas negras indican los septos fibrosos en la rata y las rojas, los nódulos cancerosos. Ampliación 250 X.

b. Detección de células humanas en los animales trasplantados

La presencia de células humanas, tanto en la sangre como en el hígado de las ratas trasplantadas, se detectó mediante las siguientes técnicas:

- RT-qPCR
- Citometría de flujo
- Microscopía confocal
- *Western blot*

2.2.3.- RT-qPCR

Mediante RT-qPCR se investigó la presencia de células CD45+ humanas en la sangre y el hígado de las ratas. Si bien no se detectó este marcador humano ni en sangre ni en hígado, sí se detectó ARNm de otro marcador humano mucho más abundante como el GADPH.

2.2.4.-Citometría de flujo

Los datos de fluorescencia obtenidos por citometría de flujo aparecen en la figura 19. Se detectó la presencia del marcador humano CD45 en los hígados de las ratas control y cirróticas que recibieron trasplante celular (grupos CU y TU). El porcentaje de células positivas encontradas fue mayor en el grupo TU que en el grupo CU. El valor máximo de fluorescencia obtenido corresponde al grupo TU a los 21 días y fue de 4,62%.

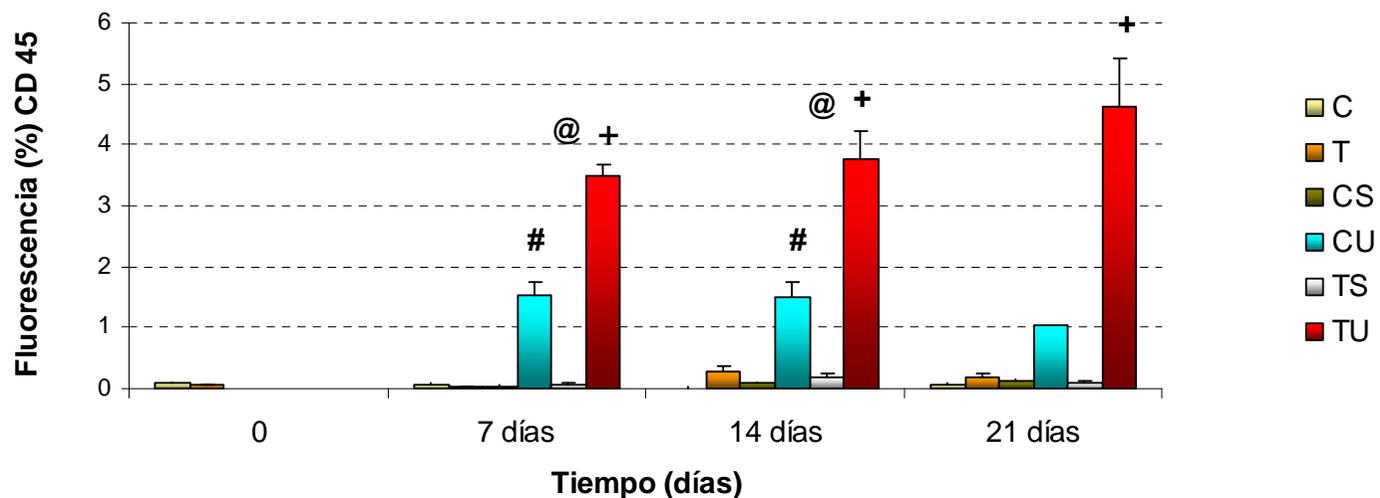


Fig. 19. Detección de células CD45+ humanas por citometría de flujo. Los hígados de las ratas receptoras se digirieron con colagenasa, se incubaron con anticuerpo anti-CD45 humano conjugado con fluoresceína y se analizaron por citometría de flujo. C: grupo control sin tratamiento. T: grupo que ingirió TAA durante 4 meses. CS: grupo control sometido a laparotomía. CU: grupo control sometido a trasplante celular. TS: grupo que ingirió TAA y sometido a laparotomía. TU: grupo que ingirió TAA durante 4 meses y se sometió a trasplante celular. Los resultados se expresan en porcentaje (media \pm SEM). # $p < 0.05$, CU vs. CS. + $p < 0.05$, grupo TU vs. TS. @ $p < 0.05$ grupo TU vs. CU.

2.2.5.-Microscopía confocal

Se observaron células que expresaban CYP 3A4 humano mediante microscopía confocal (Fig. 20) en el hígado de ratas control y ratas cirróticas que habían recibido trasplante celular.

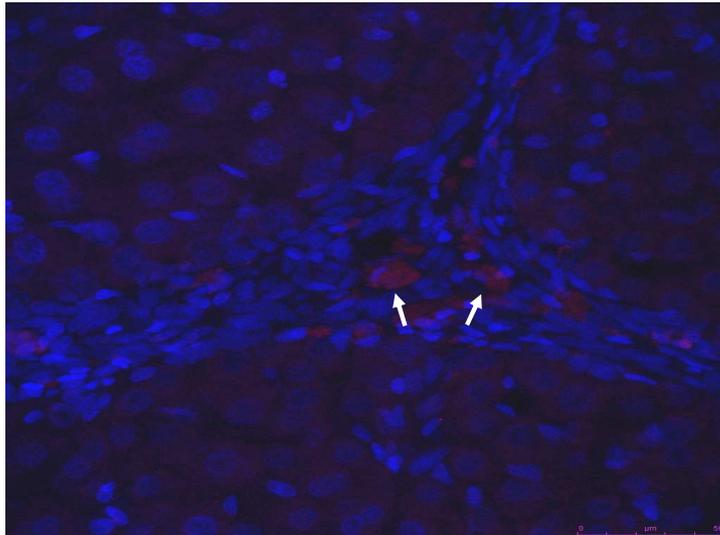


Fig. 20. Presencia de células humanas en el hígado de una rata con cirrosis experimental a los 7 días del trasplante mediante microscopía confocal. Una proyección total de 25 secciones confocales se tomaron cada $0,33 \mu\text{m}$ a lo largo del eje z de dos células positivas humanas (en rojo) para el anticuerpo anti-CYP 3A4 localizadas en el parénquima hepático. El núcleo de los hepatocitos se tiñó con hoechst 33342 (en azul).

2.2.6.- Western blot

Se detectó la presencia de los marcadores humanos CYP 3A4 en los hígados de las ratas que ingirieron TAA en el agua de bebida durante 4 meses y sujetos a trasplante de CMCUH. La expresión de CYP 3A4 aumentó de manera dependiente del tiempo (Fig. 21).

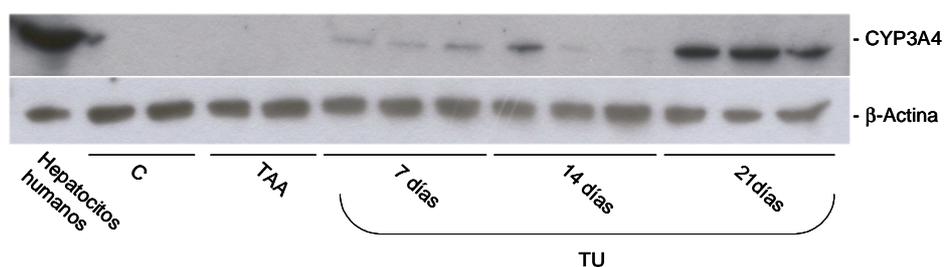


Fig. 21. Detección de CYP 3A4 humano en los hígados de las ratas receptoras. Detección mediante *western blot* de CYP 3A4 humano en el hígado de ratas tratadas durante 4 meses con TAA y, posteriormente, inmunosuprimidas y sometidas a trasplante celular. Se usó como control positivo un lisado de hepatocitos humanos. Experimento realizado por triplicado. Se muestra una imagen representativa.

2.2.7.- Efecto de las CMCUH

Histológicamente no se apreció efecto alguno en los hígados de las ratas, controles o cirróticas, sometidas a trasplante de CMCUH en comparación con animales a los que no se les inyectaron células. Así, el parénquima de las ratas controles sometidas a terapia celular (grupo CU) presentaba un aspecto totalmente normal, idéntico al de los animales controles que no recibieron células (grupo CS) (Fig. 22).

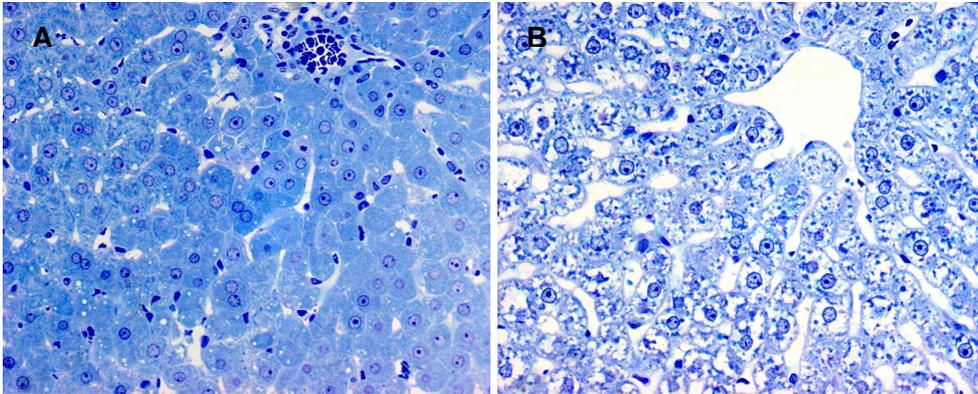


Fig. 22. Sección semifina teñida con azul de toluidina del parénquima hepático de dos ratas controles. **(A)** Rata que bebió agua durante 4 meses y, posteriormente, se le inyectaron 10×10^6 CMCUH a través de la vena porta (grupo CU). **(B)** Rata que bebió agua durante 4 meses y se sometió a cirugía pero no recibió trasplante celular (grupo CS). Ampliación 500 X.

Por lo que se refiere a las ratas con cirrosis experimental, las CMCUH no fueron capaces de normalizar o, al menos, disminuir las alteraciones provocadas por la TAA. En los hígados de las ratas cirróticas que recibieron inyección intraportal de CMCUH (grupo TU), se apreciaron las mismas alteraciones que poseían las ratas cirróticas que no recibieron células (grupo TS): fibrosis intensa, desorganización de la arquitectura hepática, necrosis de los hepatocitos, aumento del tamaño de los nucleolos y nódulos cancerosos (Fig. 23).

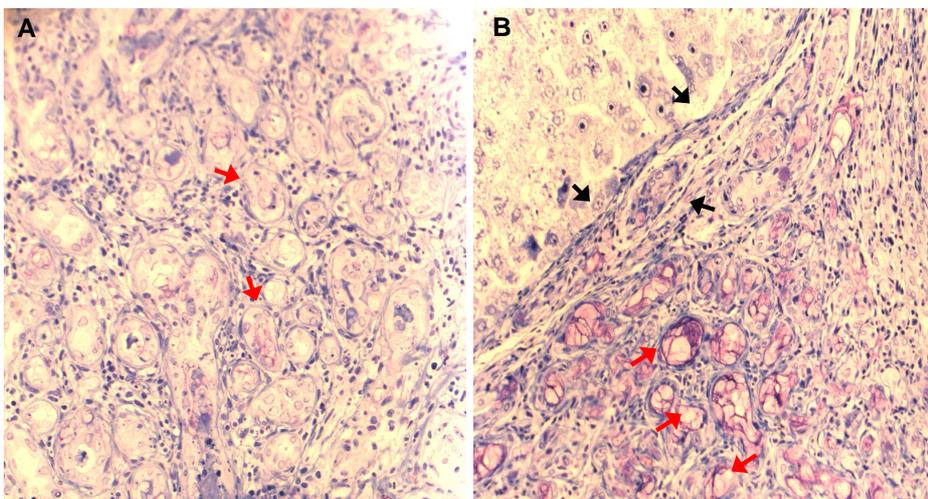


Fig. 23. Secciones semifinas teñidas con azul de toluidina del parénquima hepático de dos ratas con cirrosis experimental. **(A)** Rata a la que se administró TAA durante 4 meses y, posteriormente, se le inyectaron 10×10^6 CMCU humanas a través de la vena porta (grupo TU). **(B)** Rata que ingirió TAA durante 4 meses y se sometió a cirugía pero no recibió trasplante celular (grupo TS). Ambos animales se sacrificaron 21 días después del trasplante. Las flechas negras indican los septos fibrosos y las rojas, los nódulos cancerosos. En ambos casos se aprecia desorganización de la arquitectura hepática. Ampliación 250 X.

2.2.8.- Marcadores bioquímicos

Para la valoración de la función hepática, se determinaron las actividades plasmáticas de la aspartato y alanina aminotransferasas (AST y ALT), fosfatasa alcalina (AP), γ -glutamyl transferasa (γ -GT) y lactato deshidrogenasa (LDH), además de las concentraciones en plasma de albúmina, bilirrubina total y directa (TB y DB), urea y creatinina. Los valores obtenidos fueron los siguientes:

Albúmina

La concentración plasmática de albúmina correspondiente a los distintos grupos de estudio aparece reflejada en la figura 24.

El tratamiento con TAA durante 4 meses (tiempo cero) produjo una disminución significativa de la concentración de albúmina

plasmática, si bien estos hallazgos bioquímicos no se observaron en el resto de puntos de estudio (7, 14 y 21 días). También presentaron concentraciones más bajas de albúmina, significativas desde un punto de vista estadístico, las ratas cirróticas que recibieron inyección portal de CMCUH 14 y 21 días después del trasplante, en comparación con los animales cirróticos sin terapia celular.

Aspartato aminotransferasa

Los valores de la actividad aspartato aminotransferasa (AST) aparecen en la figura 25. Cabe destacar que el tratamiento con TAA durante 4 meses produjo un aumento estadísticamente significativo de esta actividad enzimática. No se encontraron diferencias entre grupos en los puntos 7, 14 y 21 días.

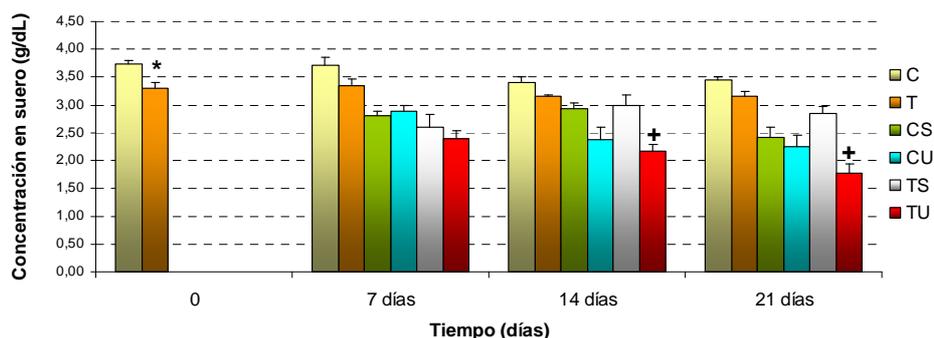


Fig. 24. Concentración plasmática de albúmina (g/dL). C: grupo control sin tratamiento. T: grupo que ingirió TAA durante 4 meses. CS: grupo control sometido a inmunosupresión y a laparotomía. CU: grupo control sometido a inmunosupresión y a trasplante celular. TS: grupo que ingirió TAA durante 4 meses y sometido a inmunosupresión y a laparotomía. TU: grupo que ingirió TAA durante 4 meses y se sometió a inmunosupresión y a trasplante celular. Los resultados son la media \pm SEM. * $p < 0.05$, grupo C vs. grupo T. + $p < 0.05$, grupo TU vs. grupo TS.

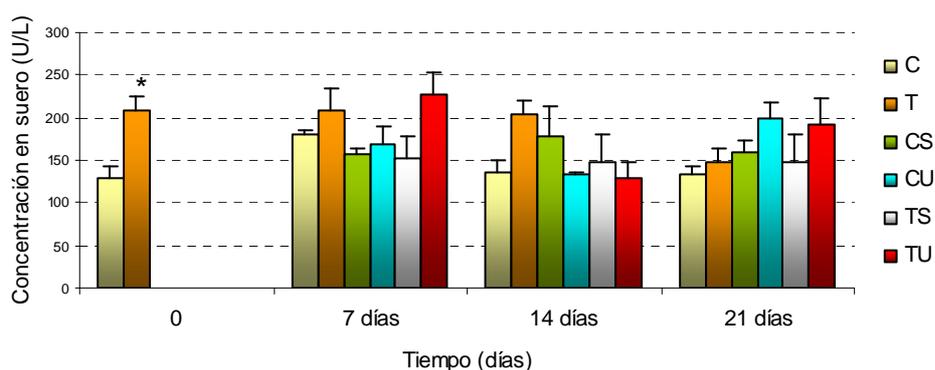


Fig. 25. Actividad plasmática de aspartato aminotransferasa (U/L). C: grupo control sin tratamiento. T: grupo que ingirió TAA durante 4 meses. CS: grupo control sometido inmunosupresión y a laparotomía. CU: grupo control sometido a inmunosupresión y a trasplante celular. TS: grupo que ingirió TAA durante 4 meses y sometido a trasplante y a laparotomía. TU: grupo que ingirió TAA durante 4 meses y se sometió inmunosupresión y a trasplante celular. Los resultados son la media \pm SEM.* $p < 0.05$, grupo C vs. grupo T.

Alanina aminotrasferasa

Los valores de la actividad de la alanina aminotransferasa (ALT) se encuentran recogidos en la figura 26. El tratamiento con TAA durante 4 meses produjo un aumento significativo de esta actividad enzimática. No se encontraron diferencias entre grupos en los puntos 7, 14 y 21 días.

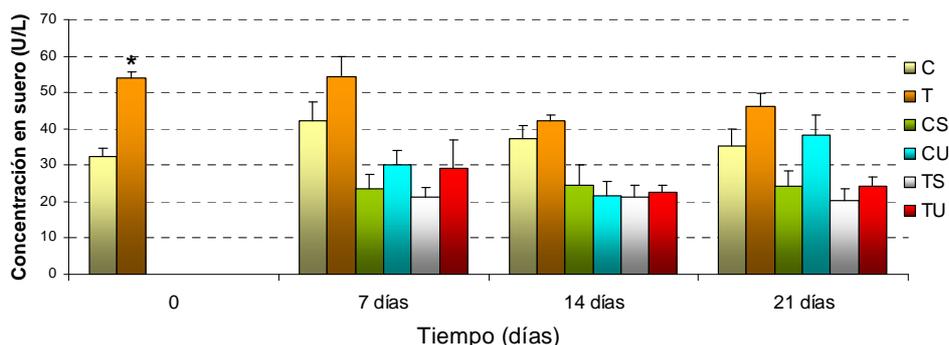


Fig. 26. Actividad plasmática de alanina aminotransferasa (U/L). C: grupo control sin tratamiento. T: grupo que ingirió TAA durante 4 meses. CS: grupo control sometido a inmunosupresión y a laparotomía. CU: grupo control sometido a inmunosupresión y a trasplante celular. TS: grupo que ingirió TAA durante 4 meses y sometido a inmunosupresión y a laparotomía. TU: grupo que ingirió TAA durante 4 meses y se sometió a inmunosupresión y a trasplante celular. Los resultados son la media \pm SEM.* $p < 0.05$, grupo C vs. grupo T.

Bilirrubina total

Los valores plasmáticos de la bilirrubina total aparecen en la figura 27.

La concentración plasmática de la bilirrubina total aumentó significativamente en el grupo con cirrosis experimental (grupo T) respecto al grupo control (grupo C) a tiempo cero. Además el grupo de ratas cirróticas que recibió trasplante de CMCUH (grupo TU) presentó valores significativamente superiores a los del grupo de animales controles sometidos a terapia celular (grupo CU) a los 7, 14 y 21 días post trasplante.

La concentración de este metabolito también se encontró elevada significativamente en el grupo TU, en comparación con el grupo TS a los 7 días después del trasplante, si bien este aumento no se observó a los 14 ni a los 21 días.

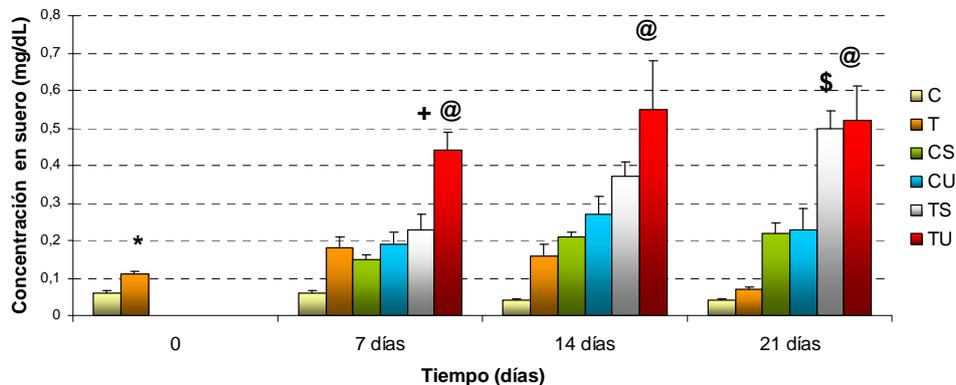


Fig. 27. Concentración plasmática de bilirrubina total (mg/dL). C: grupo control sin tratamiento. T: grupo que ingirió TAA durante 4 meses. CS: grupo control sometido inmunosupresión y a laparotomía. CU: grupo control sometido a inmunosupresión y a trasplante celular. TS: grupo que ingirió TAA durante 4 meses y sometido inmunosupresión y a laparotomía. TU: grupo que ingirió TAA durante 4 meses y se sometió inmunosupresión y a trasplante celular. Los resultados son la media \pm SEM. * $p < 0.05$, grupo C vs. grupo T. + $p < 0.05$, grupo TU vs. grupo TS. @ $p < 0.05$ grupo TU vs. CU, \$ $p < 0.05$ grupo TS vs. CS.

Bilirrubina directa

Las concentraciones plasmáticas de la bilirrubina directa están representadas en la figura 28.

Los cambios más destacables fueron un aumento en el grupo TS (grupo de ratas cirróticas, inmunosuprimidas y sometidas a laparotomía) en comparación con el grupo CS (grupo de ratas sanas, inmunosuprimidas y sometidas a laparotomía) a los 21 días después del trasplante, así como en el grupo TU (grupo de ratas cirróticas, inmunosuprimidas y sometidas a trasplante celular) en comparación con CU (grupo de ratas sanas, inmunosuprimidas y sometidas a trasplante celular) a los 7 días. Así mismo se apreció una disminución de la bilirrubina directa a los 21 días en el grupo TU comparado con TS.

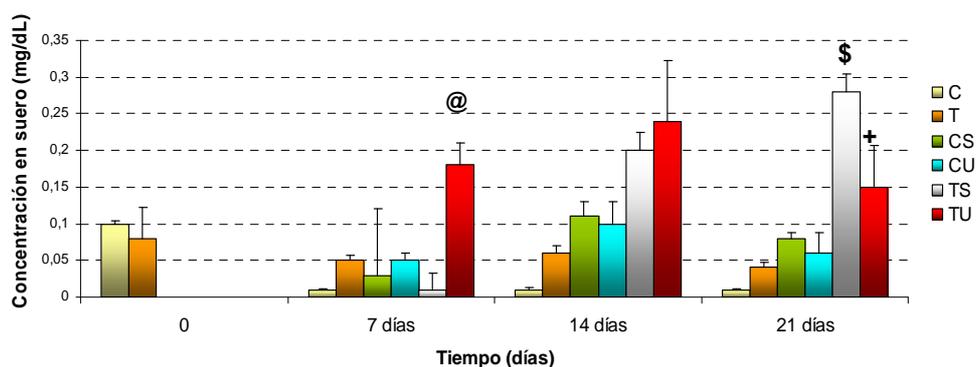


Fig. 28. Concentración plasmática de bilirrubina directa (mg/dL). C: grupo control sin tratamiento. T: grupo que ingirió TAA durante 4 meses. CS: grupo control sometido inmunosupresión y a laparotomía. CU: grupo control sometido a inmunosupresión y a trasplante celular. TS: grupo que ingirió TAA durante 4 meses y sometido a inmunosupresión y a laparotomía. TU: grupo que ingirió TAA durante 4 meses y se sometió a inmunosupresión y a trasplante celular. Los resultados son la media \pm SEM. @ $p < 0.05$, grupo TU vs. grupo CU. + $p < 0.05$, grupo TU vs. TS. \$ $p < 0.05$ grupo TS vs. CS.

Lactato deshidrogenasa

Los resultados de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) se muestran en la figura 29.

No se encontraron diferencias significativas entre los diversos grupos ni ninguno de los tiempos estudiados.

Gamma-glutamil transferasa

Los resultados obtenidos de la actividad de la gamma-glutamil transferasa (γ -GT) se muestran en la figura 30.

Se encontraron valores más altos de esta actividad en el grupo de animales con cirrosis experimental (grupo T) frente a los controles (grupo C) a los 14 y 21 días post trasplante.

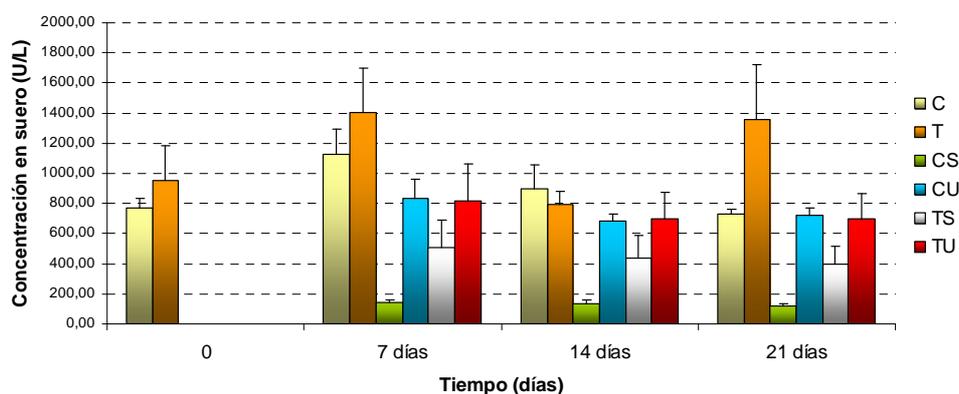


Fig. 29. Actividad plasmática de lactato deshidrogenasa (U/L). C: grupo control sin tratamiento. T: grupo que ingirió TAA durante 4 meses. CS: grupo control sometido a inmunosupresión y a laparotomía. CU: grupo control sometido a inmunosupresión y a trasplante celular. TS: grupo que ingirió TAA durante 4 meses y sometido a inmunosupresión y a laparotomía. TU: grupo que ingirió TAA durante 4 meses y se sometió a inmunosupresión y a trasplante celular. Los resultados son la media \pm SEM.

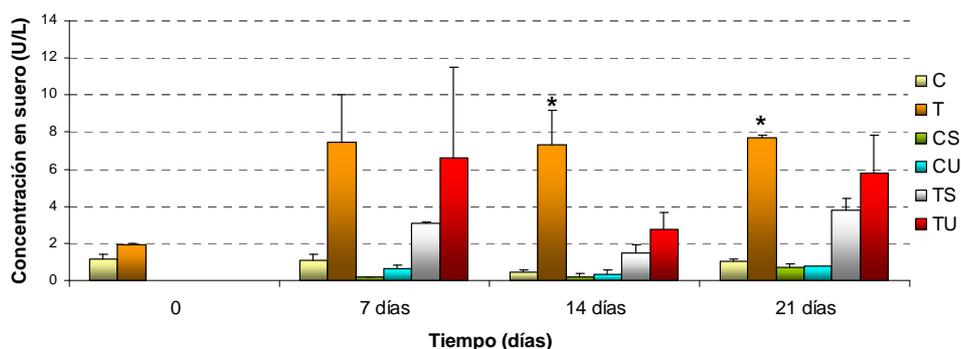


Fig. 30. Actividad plasmática de γ -glutamyl transferasa (U/L). C: grupo control sin tratamiento. T: grupo que ingirió TAA durante 4 meses. CS: grupo control sometido a inmunosupresión y a laparotomía. CU: grupo control sometido a inmunosupresión y a trasplante celular. TS: grupo que ingirió TAA durante 4 meses y sometido a inmunosupresión y a laparotomía. TU: grupo que ingirió TAA durante 4 meses y se sometió a inmunosupresión y a trasplante celular. Los resultados son la media \pm SEM.* $p < 0.05$, grupo C vs. grupo T.

Urea

Los valores de la concentración plasmática de urea obtenidos se reflejan en la figura 31.

Se encontraron aumentos significativos, desde el punto de vista estadístico, en los animales controles que recibieron trasplante celular (grupo CU) en comparación con los animales controles que no recibieron CMCUH a los 14 y 21 días. La concentración de urea también aumentó a los 21 días en los animales cirróticos sometidos a trasplante celular (grupo TU) en comparación con el grupo que no recibió trasplante (TS).

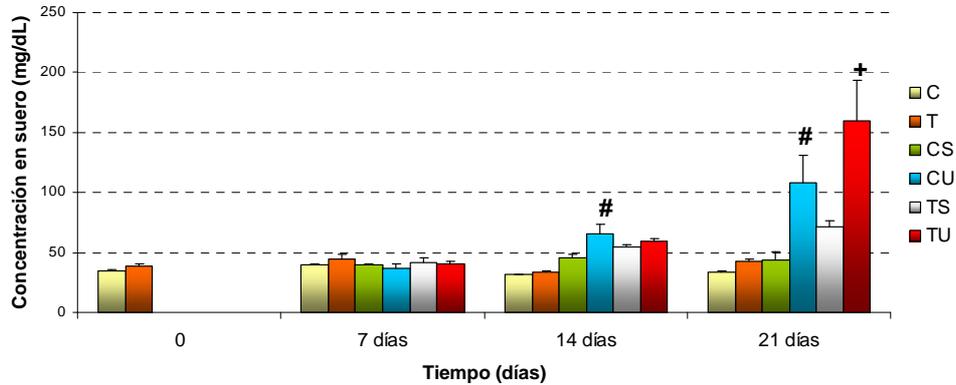


Fig. 31. Concentración plasmática de urea (mg/dL). C: grupo control sin tratamiento. T: grupo que ingirió TAA durante 4 meses. CS: grupo control sometido a inmunosupresión y a laparotomía. CU: grupo control sometido a inmunosupresión y a trasplante celular. TS: grupo que ingirió TAA durante 4 meses y sometido a inmunosupresión y a laparotomía. TU: grupo que ingirió TAA durante 4 meses y se sometió a inmunosupresión y a trasplante celular. Los resultados son la media \pm SEM. # $p < 0.05$, grupo CU vs. grupo CS. + $p < 0.05$, grupo TU vs. grupo TS.

Creatinina

La concentración plasmática de creatinina obtenida para los distintos grupos y a los diferentes grupos se muestra en la figura 32. No se encontraron diferencias significativas entre grupos en ninguno de los tiempos.

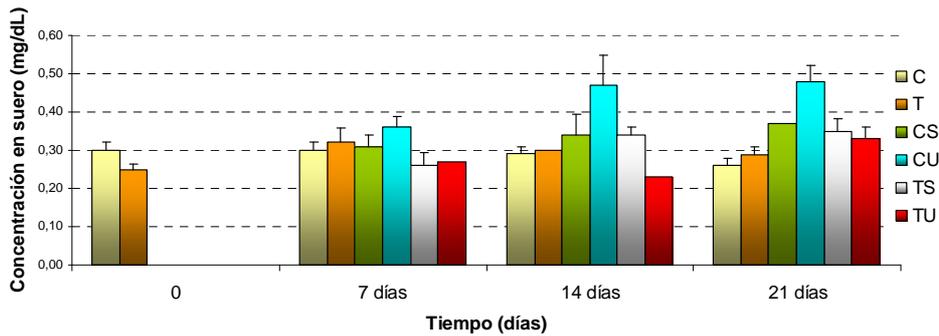


Fig. 32. Concentración plasmática de creatinina (mg/dL). C: grupo control sin tratamiento. T: grupo que ingirió TAA durante 4 meses. CS: grupo control sometido a inmunosupresión y a laparotomía. CU: grupo control sometido a inmunosupresión y a trasplante celular. TS: grupo que ingirió TAA durante 4 meses y sometido a inmunosupresión y a laparotomía. TU: grupo que ingirió TAA durante 4 meses y se sometió a inmunosupresión y a trasplante celular. Los resultados son la media \pm SEM.

2.2.9.- Efecto de las CMCUH y de la inmunosupresión sobre el riñón

El estudio histológico de los riñones de los distintos grupos experimentales aparece recogido en las figuras 33-35. Este estudio reveló que los animales controles (grupo C) y los tratados con TAA (grupo T) presentaron una histología renal normal. Las estructuras glomerular y tubular estaban inalteradas (Fig. 33). Los grupos CS (control sometido a inmunosupresión que no recibió trasplante celular), TS (cirrosis experimental sometido a inmunosupresión que no recibió trasplante celular) y CU (control sometido a inmunosupresión y a trasplante celular) presentaron glomérulos intactos, pero en las células tubulares se apreció una vacuolización asimétrica periférica (Fig. 34). Por último, en el grupo TU (cirrosis experimental sometido a inmunosupresión y a trasplante celular) se encontró afectación tanto glomerular como tubular (Fig. 35). Hubo desaparición de la arquitectura renal. Así, los glomérulos aparecían isquémicos, como puede apreciarse por la ausencia de hematíes en los capilares. En los túbulos, además de la vacuolización asimétrica periférica antes comentada, hubo desaparición de la luz tubular.

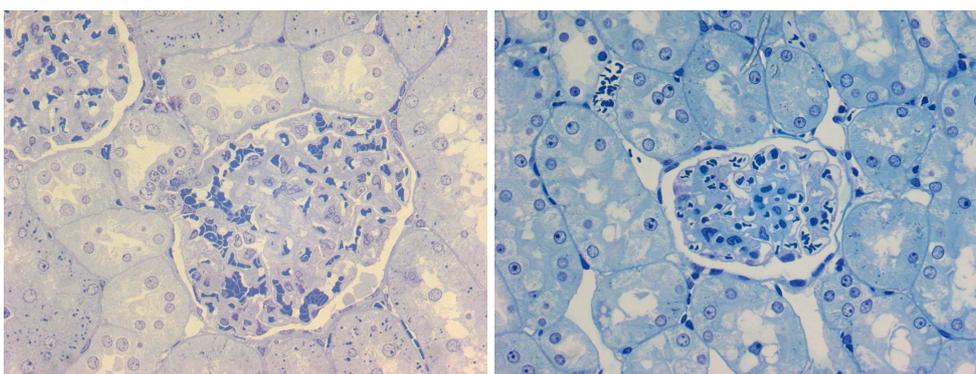


Fig. 33. (A) Sección semifina teñida con azul de toluidina del riñón de una rata control sana que bebió agua durante 4 meses (grupo C), y (B) de una rata a la que se administró TAA durante 4 meses (grupo T). Las estructuras glomerular y tubular son normales en ambos casos. El tratamiento con TAA no produjo daño renal. Ampliación total 640 X

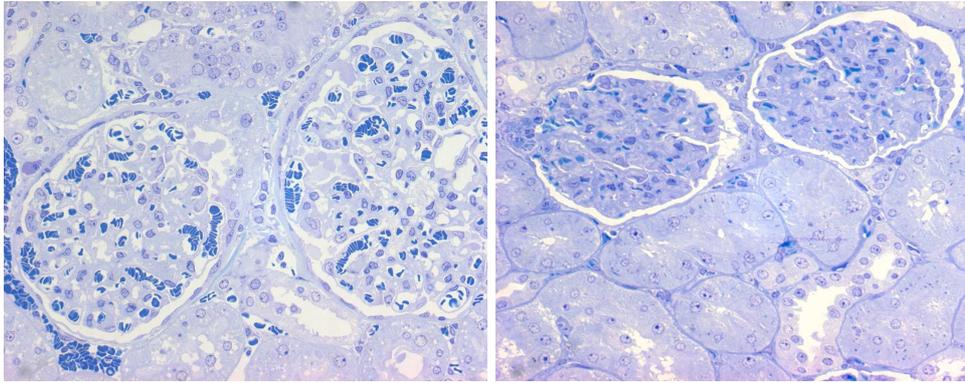


Fig. 34. (A) Sección semifina teñida con azul de toluidina del riñón de una rata que bebió agua durante 4 meses y se sometió a inmunosupresión y a cirugía pero no recibió trasplante celular (grupo CS), y (B) rata que ingirió TAA durante 4 meses y se sometió a inmunosupresión y cirugía pero no recibió trasplante celular (grupo TS). En ambos casos se aprecia que el glomérulo está intacto pero en las células tubulares se observa una vacuolización asimétrica periférica. Ampliación total 500 X.

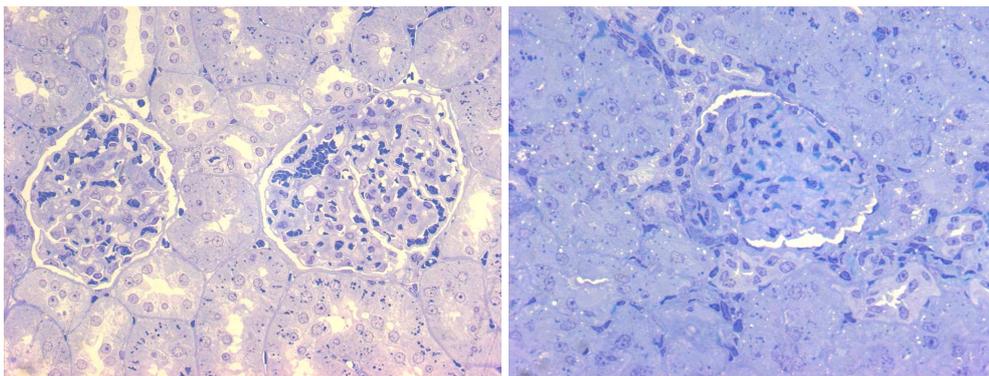


Fig. 35. Sección semifina teñida con azul de toluidina del riñón de dos ratas. (A) Rata que bebió agua durante 4 meses y, posteriormente se sometió a inmunosupresión y se le inyectaron 10×10^6 CMCUH a través de la vena porta (grupo CU). Se observa una vacuolización asimétrica periférica en las células tubulares (ampliación total 500 X). (B) Rata a la que se administró TAA durante 4 meses y, posteriormente, se sometió a inmunosupresión y se le inyectaron 10×10^6 CMCU humanas a través de la vena porta (grupo TU). Se aprecia afectación tanto glomerular como tubular. Hay desaparición de la arquitectura renal. Así, los glomérulos aparecen isquémicos, como puede apreciarse por la ausencia de hematíes en los capilares. En los túbulos, además de la vacuolización antes comentada, hay desaparición de la luz tubular (Ampliación total 640 X).

V. Discusión

En las enfermedades hepáticas crónicas, independientemente de su etiología (alcohol, virus, fármacos, patología biliar, etc), se desarrolla fibrosis debido a una acumulación de componentes de matriz extracelular, como colágenos I y III, fibronectina, laminina y glucosaminoglucanos (Guo y Friedman, 2007). Aunque trabajos recientes sugieren que, al menos cuando no está muy avanzada, la fibrosis puede ser reversible (Fallowfield et al. 2006), no existe hoy día ninguna terapia específica, de modo que los enfermos reciben tratamiento dirigido a eliminar el agente etiológico y a paliar las complicaciones de la enfermedad. Esto hace que en la actualidad exista un gran interés en el desarrollo de sustancias con actividad antifibrogénica y, de hecho, se esté investigando con numerosos compuestos. Sin embargo, lo cierto es que todavía no se ha aprobado ningún fármaco antifibrogénico para su uso en humanos (Albanis y Friedman, 2006).

Por otro lado, el tratamiento de elección de la enfermedad hepática terminal sigue siendo el trasplante de hígado completo, pero éste se ve limitado por la escasez de órganos donantes (Verdonk *et al.*, 2007). Debido a ello, se han buscado otras posibilidades, como son el trasplante de hígado parcial procedente de donante vivo, que está realizándose de forma común en EE. UU., Holanda y algunos países asiáticos (Verdonk *et al.*, 2007), y algunas que se encuentran en fase experimental, como el trasplante de hepatocitos (Fisher y Strom, 2006).

De acuerdo con esto, el objetivo a largo plazo en el que trabaja nuestro grupo de investigación es el desarrollo de terapias alternativas que puedan ser utilizadas en medicina regenerativa del hígado.

La terapia que estamos investigando se basa en el empleo de células humanas de sangre de cordón umbilical. En el trabajo que se recoge en esta memoria hemos estudiado si el trasplante de células mononucleares aisladas de sangre humana de cordón (CMCUH) es eficaz en el tratamiento de dos modelos de enfermedad hepática en rata. Se han utilizado dos modelos, uno de enfermedad aguda o hepatitis, lograda por inyección intraperitoneal de D-galactosamina (D-Gal), y otro de enfermedad crónica o cirrosis, mediante ingesta oral de tioacetamida

(TAA). Ambos tóxicos se eligieron porque las alteraciones histológicas y bioquímicas que producen son muy similares a las de las correspondientes enfermedades humanas (Keppler *et al.*, 1968; Moreira *et al.*, 1995; Fontana *et al.*, 1996; Zimmermann *et al.*, 1987).

Además, y como paso previo a los experimentos de trasplante celular, decidimos comprobar la capacidad de diferenciación *in vitro* de las CMCUH en hepatocitos.

Diferenciación de CMCUH *in vitro*

Las células mononucleares humanas aisladas a partir de sangre de cordón se cultivaron en placas recubiertas de gelatina y en presencia de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factores de crecimiento de fibroblastos a y b (FGF-a y FGF-b), factor de crecimiento de células madre (SCF) y factor inhibidor de leucemia (LIF), todos ellos humanos, durante periodos de 7, 14 y 21 días, tal como han descrito Kakinuma *et al.*, (2003). La función de cada uno de estos factores es diferente: SCF y LIF son necesarios para el mantenimiento de las células madre contenidas en la sangre de cordón; HGF es necesario para la diferenciación de esas células madre en hepatocitos; y FGF-a y -b son necesarios para su proliferación (Teramoto *et al.*, 2005). Para estos experimentos se emplearon células frescas, esto es, recién aisladas, como controles a tiempo cero.

Desde los primeros días en cultivo se apreciaron dos poblaciones celulares distintas: una población adherente y otra en suspensión. En la población que se adhería a la placa se distinguían, a su vez, células con dos morfologías diferentes, unas redondas y otras fusiformes o fibroblásticas. Estas últimas podrían ser células mesenquimales, las cuales se ha descrito que existen en la sangre de cordón (Musina *et al.*, 2007; Yoshida *et al.*, 2007).

Los resultados de los experimentos de RT-qPCR, *western blot* e inmunofluorescencia indicaron que el cultivo en las condiciones comentadas favoreció la transdiferenciación de las CMCUH en células con características de hepatocitos, puesto que expresaron ARNms y

proteínas correspondientes a albúmina, α -fetoproteína, citoqueratina-18 (CK-18) y glutamina sintetasa. Nuestros datos coinciden con los obtenidos previamente por otros autores (Kakinuma *et al.*, 2003; Nonome *et al.*, 2005). Del mismo modo, el análisis de la población celular no adherente reveló que expresaban albúmina, pero no CK-18, por lo que decidimos mantenerlas siempre en el cultivo.

La expresión de albúmina, α -fetoproteína, CK-18 y glutamina sintetasa se detectó ya a los 7 días de cultivo, aunque fue máxima a los 14 y 21 días. Nuestros resultados revelaron que no sólo las células redondas sino también las fusiformes expresaban albúmina y α -fetoproteína, algo que no se ha descrito previamente (Kakinuma *et al.*, 2003). Además, las células incubadas en presencia de factores humanos también expresaron citocromo P450 3A4 (CYP 3A4), expresión que aumentó en forma dependiente del tiempo y que sugiere que son metabólicamente activas. No se detectó ninguno de los marcadores mencionados en las células frescas.

Un dato interesante que encontramos fue que simultáneamente a la adquisición de un fenotipo típico de hepatocitos, las CMCUH perdieron de forma progresiva su fenotipo hematopoyético. Así, mientras las células recién aisladas expresaban el marcador leucocitario CD45, los niveles de esta proteína de superficie disminuyó a medida que avanzaba el tiempo de incubación.

Experimentos de terapia celular en dos modelos experimentales de enfermedad hepática

Con idea de evaluar la utilidad de la sangre de cordón como fuente celular en medicina regenerativa del hígado realizamos experimentos de trasplante de células en dos modelos experimentales de enfermedad hepática.

La mayoría de experimentos de trasplante celular se llevan a cabo con ratones atímicos (ratones desnudos) (Flanagan, 1966) o ratones SCID, que padecen una inmunodeficiencia aún más severa (Bosma *et al.*, 1983). Más recientemente, algunos grupos están realizando

trasplantes *in utero* en diversas especies (rata, oveja y cabra), los cuales se basan en el ambiente permisivo del feto en desarrollo (Porada *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2007; Zeng *et al.*, 2006). Sin embargo, son necesarios modelos de terapia celular que se aproximen lo más posible a la situación real en humanos.

Como animal de experimentación para el presente trabajo se eligieron ratas de la raza Wistar, a las que se les produjo bien una cirrosis hepática mediante la administración oral y durante cuatro meses de un hepatotóxico denominado tioacetamida (TAA), o bien un fallo hepático fulminante mediante la inyección intraperitoneal de una dosis única de D-galactosamina (D-Gal). Dado que los receptores de los trasplantes (ratas con enfermedad hepática) y las células donantes (humanas) fueron de especies distintas, es decir, se trató de un xenotrasplante, nos vimos obligados a someter a los receptores a inmunosupresión.

El tratamiento inmunosupresor se realizó mediante la administración de ciclosporina A y de un anticuerpo anti-asialo GM1. Este último destruye a los linfocitos natural killer (Habu *et al.*, 1981; Kasai *et al.*, 1980), implicados en la inmunidad innata. La razón de emplear este anticuerpo además de la ciclosporina es que realizamos un experimento preliminar de trasplante de células madre humanas CD34+ de sangre de cordón a ratas con cirrosis hepática por administración de TAA e inmunosuprimidas únicamente con ciclosporina A (Sáez-Lara *et al.*, 2006). Los resultados sugirieron que las células exógenas fueron rechazadas, puesto que se detectaron células humanas en la sangre de las ratas 15 días después del trasplante pero no 60 días después, mientras que en el hígado nunca se detectaron (Sáez-Lara *et al.*, 2006).

Trasplante de CMCUH a ratas con hepatitis experimental por inyección de D-Gal

La administración de una sola inyección intraperitoneal de D-Gal en una dosis de 250 mg/Kg de peso produjo un daño hepático severo. El análisis histológico de los hígados reveló que el parénquima hepático estaba muy dañado, siendo la alteración más importante una intensa esteatosis y, en menor medida, infiltración leucocitaria e hinchazón de los hepatocitos. El tratamiento con D-Gal también produjo una disminución del tamaño relativo del hígado, algo descrito por el grupo que desarrolló el modelo (Keppler *et al.*, 1968).

El daño hepático severo se confirmó mediante el análisis de marcadores plasmáticos (transaminasas, fosfatasa alcalina, γ -glutamyl transferasa, bilirrubina total y directa y lactato deshidrogenasa), cuyos valores estuvieron significativamente elevados en comparación con animales sanos.

A los animales con hepatitis se les inyectaron 2×10^6 de CMCUH a través de la vena porta. Se sacrificaron ratas 24, 48 y 72 h después del trasplante.

Nuestro primer objetivo fue detectar la presencia de células humanas en el parénquima de las ratas. Para ello, realizamos medidas de citometría de flujo, RT-qPCR, *western blot* y microscopía confocal.

La citometría reveló la presencia de células humanas CD45+ en el hígado de animales pertenecientes a aquellos grupos que recibieron CMCUH. El porcentaje de células humanas CD45+ fue mayor en el grupo de animales que recibió D-Gal en comparación con controles. Este detalle no es sorprendente dado que se ha propuesto la necesidad de un daño hepático previo que sirva como estímulo regenerativo para el anclaje de las células en el parénquima (Grompe *et al.*, 1995; Theise *et al.*, 2000).

Seguidamente, recurrimos a RT-qPCR para amplificar el ARNm de CD45. Sin embargo, la detección de este marcador leucocitario resultó negativa, si bien dio positiva la detección de otro ARNm humano más

abundante como el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

La detección de células humanas en el hígado de rata se confirmó por *western blot* y microscopía confocal, en ambos casos utilizando un anticuerpo anti-citocromo P450 3A4. Aunque el número de células humanas observadas al microscopio confocal fue pequeño, nuestros resultados son similares a los descritos por otros investigadores. Así, Kakinuma *et al.* (2005) trasplantaron 10×10^6 CMCUH a ratones inmunodeficientes (SCID) tratados con el hepatotóxico 2-acetilaminofluoreno y sometidos a hepatectomía parcial, estimando que el total de hepatocitos derivados de CMCUH oscilaba sólo entre un 0,1 y 1%. Estos autores discuten como posible explicación de tal porcentaje la naturaleza xenogénica del trasplante, es decir, que hubiera ocurrido rechazo de las células humanas incluso aunque los receptores de los trasplantes fueran ratones SCID. Resultados parecidos obtuvieron Nonome *et al.* (2005) en ratones SCID con daño hepático por inyección de ligando Fas a los que trasplantaron CMCUH.

Una vez demostrado que las células humanas se habían implantado en el hígado de los animales, pasamos a evaluar la eficacia de la terapia celular. El análisis de los marcadores plasmáticos de daño hepático reveló varios datos:

- La terapia inmunosupresora con ciclosporina A y anticuerpo anti-asialo GM1 no tuvo efecto en ninguno de los parámetros analizados. Ahora bien, sí es necesario comentar que la suma del efecto inmunosupresor al del efecto hepatotóxico hizo que se disparara la mortalidad de los animales. Así, mientras la mortalidad alcanzó el 48,5% en aquellos grupos que recibieron D-Gal, ciclosporina y anti-asialo GM1, ésta fue nula en el resto de grupos.

- De los tres grupos con fallo hepático, aquel que presentó valores de actividades alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (AP), γ -glutamil transferasa (γ -GT) y lactato deshidrogenasa (LDH), así

como de concentraciones de bilirrubina total (BT) y directa (BD) significativamente menores fue el que recibió trasplante celular.

- Los valores de ALT, BT, BD, γ -GT y LDH del grupo de animales con fallo hepático que recibió trasplante de células fueron más cercanos a los de animales sanos (grupo control, C) que los de animales con fallo hepático que no recibieron CMCUH.

- Aunque no existieron diferencias estadísticamente significativas, se apreció una tendencia a la disminución en los marcadores plasmáticos del grupo con hepatitis que no recibió trasplante celular.

Este último dato podría explicarse por la reversibilidad del modelo de D-Gal. Debe recordarse que se administró una sola inyección del tóxico. Como cualquier otro modelo de daño hepático producido por sustancias químicas, las alteraciones debidas a la D-Gal son reversibles y tienden a normalizarse de forma espontánea con el tiempo (Rahman y Hodgson, 2000; Tuñón *et al.*, 2007).

Los datos bioquímicos se confirmaron con un estudio histológico. Así, se apreció una normalización prácticamente completa de las alteraciones del parénquima en los animales con hepatitis que recibieron inyección intraportal de CMCUH a las 72 horas después del trasplante. Aunque también se apreció cierta mejoría en los animales que recibieron D-Gal pero no CMCUH (y que podría atribuirse nuevamente al efecto del tiempo sobre la reversibilidad de las lesiones), las alteraciones del parénquima fueron menores en cada uno de los tiempos analizados en el grupo que sí recibió CMCUH.

En su conjunto, los resultados histológicos y bioquímicos apuntan a un claro efecto reparador de la patología hepática que es atribuible a las CMCUH.

Una cuestión sobre la que existe bastante controversia en la literatura científica y que no pudo ser investigada en este experimento fue averiguar si las células humanas trasplantadas se diferenciaron a hepatocitos en el hígado de las ratas o si se fusionaron con hepatocitos

de los receptores. Los resultados de expresión de CYP 3A4 humano apuntan a la primera posibilidad. La segunda, aún siendo indeseable, no es descartable. Como, además, el modelo experimental de D-Gal no desarrolla fibrosis y evaluó el efecto de la terapia celular en tiempos cortos después del trasplante, decidimos abordar un experimento similar de trasplante con CMCUH en un modelo de enfermedad hepática crónica.

Trasplante de CMCUH a ratas con cirrosis hepática por administración crónica de TAA

La administración de 300 mg de TAA/L de agua de bebida durante cuatro meses produjo una cirrosis nodular en las ratas. Macroscópicamente y en comparación con los controles, el hígado de los animales cirróticos presentaba una superficie nodular, era de color amarillento (lo cual sugiere la existencia de esteatosis) y duro al tacto. Estos animales presentaban hepatomegalia y esplenomegalia.

La tinción con azul de toluidina de cortes hepáticos semifinos reveló que los animales con cirrosis experimental habían perdido la arquitectura normal del hígado, la cual presentaba un grado elevado de fibrosis, necrosis trabecular y nódulos de hepatocarcinoma.

El daño histológico severo se confirmó mediante el análisis de marcadores plasmáticos de función hepática (albúmina, aspartato y alanina aminotransferasas, γ -glutamil transferasa y bilirrubina total), cuyos valores estuvieron significativamente elevados en comparación con animales sanos.

A los animales con cirrosis hepática se les trasplantaron 10×10^6 de CMCUH a través de la vena porta y se sacrificaron ratas 7, 14 y 21 días después del trasplante.

Al igual que en el modelo de daño hepático agudo, nuestro primer objetivo fue detectar la presencia de células humanas en el parénquima de las ratas, utilizando las técnicas ya comentadas. Así, la citometría de flujo detectó fluorescencia atribuible al marcador CD45 humano en el hígado de animales pertenecientes a aquellos grupos (control y cirrótico)

que recibieron CMCUH, y confirmó que el porcentaje de células humanas CD45+ fue mayor en el grupo de animales que recibieron TAA en comparación con los controles. Es asimismo importante señalar que el valor máximo de fluorescencia observado en este experimento alcanzó el 4,62%, mientras que en el modelo agudo el valor máximo fue del 2,91%, hecho que seguramente se debe a la cantidad de células trasplantadas en cada uno de los experimentos, cinco veces superior en el modelo crónico.

La detección de células humanas en el hígado de rata se confirmó por *western blot* y microscopía confocal, en ambos casos utilizando un anticuerpo anti-citocromo P450 3A4.

Seguidamente, recurrimos a RT-qPCR para amplificar el ARNm de CD45 humano en las muestras de hígado. Si bien la detección de este marcador leucocitario fue negativa, sí resultó positiva la detección de otro ARN humano mucho más abundante como el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Una vez demostrado que las células humanas se habían implantado en el hígado de los animales, pasamos a evaluar la eficacia de la terapia celular. Por lo que se refiere a la histología hepática, el trasplante de CMCUH no tuvo ningún efecto en los animales cirróticos en ninguno de los puntos de estudio (7, 14 y 21 días post-trasplante), de tal modo que seguían apreciándose necrosis trabecular, fibrosis intensa, desorganización de la arquitectura hepática y nódulos cancerosos que presentaban los animales que habían bebido TAA durante cuatro meses (grupo T) y los que no habían recibido trasplante celular (grupo TS).

En cambio, el análisis de los parámetros bioquímicos del plasma reveló que el trasplante de CMCUH resultó perjudicial como tratamiento de la cirrosis hepática. Ello pudo comprobarse en concreto con las concentraciones de albúmina y bilirrubina total. Los valores de albúmina se encontraron muy reducidos en el grupo cirrótico sometido a terapia celular (grupo TU) en tiempos largos (14 y 21 días), y fueron menores desde un punto de vista estadístico en comparación con los animales cirróticos que no recibieron células (grupo TS). Por lo que se refiere a la bilirrubina total, las ratas con cirrosis que recibieron CMCUH (TU)

presentaron valores muy elevados, también distintos significativamente a los 7 días del grupo con cirrosis que no fue sometido a trasplante celular (TS). Las alteraciones de estos dos parámetros sugieren que los animales presentaban una afectación de la función hepática.

Otro de los parámetros que sugiere que el trasplante celular fue dañino es la urea, que sirve como marcador de la función renal. En tiempos largos, encontramos que la concentración de urea aumentó significativamente en el grupo de animales cirróticos que recibió CMCUH (TU) en comparación con el que no recibió trasplante (TS). Es más, este mismo efecto se apreció en los animales controles. Los que recibieron trasplante celular (grupo CU) tuvieron valores de urea significativamente superiores a los que no recibieron trasplante (grupo CS). Estos resultados apuntan claramente a un deterioro de la función renal causado por las CMCUH.

Para corroborarlo, se realizaron cortes semifinos de riñones de los distintos grupos experimentales y se tiñeron con azul de toluidina. El estudio histológico reveló una ligera lesión (vacuolización) de las células epiteliales tubulares en los cuatro grupos que recibieron ciclosporina A y anticuerpo anti-asialo GM1. Sin embargo, más importante fue el hallazgo de que el grupo con cirrosis hepática experimental sometido a terapia celular (TU) padecía no sólo afectación tubular, sino también glomerular. Así, los glomérulos aparecían isquémicos y en los túbulos, además de la vacuolización asimétrica periférica de sus células epiteliales, hubo desaparición de la luz tubular.

Los resultados de la histología renal correspondientes a los grupos inmunosuprimidos reflejan el conocido efecto nefrotóxico de la ciclosporina A (Lee *et al.*, 2004), a pesar de que en nuestros experimentos administramos la misma dosis de ciclosporina (15 mg/kg/día) y durante un periodo de tiempo similar al descrito por otros autores (Oren *et al.*, 1999).

Dos son los principales efectos nefrotóxicos de este inmunosupresor (Lee *et al.*, 2004):

- a) Una vasoconstricción aguda y reversible de los capilares glomerulares que origina una disminución del flujo sanguíneo renal y, en consecuencia, de la tasa de filtración. Puede acabar produciendo necrosis tubular aguda.

- b) Fibrosis tubulointerstitial crónica e irreversible que conduce a un fracaso renal crónico.

En nuestros experimentos correspondientes al modelo crónico de enfermedad hepática sólo encontramos el primer tipo de lesión (tubular) y no el segundo (fibrosis), por lo que pensamos que la nefrotoxicidad fue incipiente. En cualquier caso, las alteraciones renales más graves tanto histológicas como funcionales se encontraron en el grupo cirrótico sometido a trasplante de células mononucleares procedentes de sangre de cordón umbilical (TU). Las alteraciones observadas en estos animales son compatibles con una necrosis tubular aguda que acabó originando insuficiencia renal. Fue también en este grupo experimental en el que se encontraron alteraciones de la función hepática. Todos los resultados sugieren, por lo tanto, que en este modelo las CMCUH no sólo no fueron útiles en el tratamiento de la cirrosis, sino que ejercieron un efecto perjudicial.

Comentario final

Los distintos resultados obtenidos en los dos modelos, agudo y crónico, sugieren la necesidad de continuar profundizando en la investigación relacionada con las células madre hematopoyéticas. Pensamos que los principales inconvenientes de los modelos experimentales utilizados son dos: En primer lugar, la reversibilidad de los modelos químicos de enfermedad, tal como se apuntó con anterioridad. En segundo lugar, la interferencia del tratamiento inmunosupresor.

Nuestras investigaciones de los próximos años van encaminadas a salvar los dos escollos mencionados. Para solventar el primero de ellos recurriremos a un modelo transgénico, no químico, de daño hepático. Se trata de un ratón que sobreexpresa TGF- β 1 y desarrolla fibrosis hepática (Kanzler *et al.*, 1999). El transgén que expresa el ratón consiste en la parte estructural del gen que codifica TGF- β 1 de mono dirigido por el promotor de la proteína C reactiva (PCR) humana. Las concentraciones plasmáticas de TGF- β 1 que expresa el animal son normales pero pueden inducirse hasta 100 veces cuando se le provoca una reacción de fase aguda mediante el tratamiento con LPS (Kanzler *et al.*, 1999). Una ventaja muy importante de este animal es que únicamente desarrolla lesiones en el hígado.

Para resolver el segundo inconveniente, llevaremos a cabo experimentos de trasplante en ratas singénicas, en vez de xenotrasplantes humano-rata. Emplearemos dos cepas de ratas Fischer (Rajvanshi *et al.*, 1996):

- Ratas Fischer 344/DchcHsd. Se trata de ratas que no expresan la enzima dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) debido a una deficiencia genética.
- Ratas Fischer 344/NHsd. Son el tipo salvaje o silvestre. Son, por tanto, DPPIV+.

Con estas ratas DPPIV- desarrollaremos dos modelos de tipo químico de enfermedad hepática. Los modelos serán uno agudo (hepatitis) por administración de D-galactosamina y otro crónico (cirrosis) por administración de tioacetamida, ambos similares a los utilizados y descritos en esta memoria. Las ratas DPPIV- con cirrosis o hepatitis serán los receptores de los trasplantes, mientras que las células donantes serán de animales DPPIV+, lo que permitirá detectar a las células exógenas. Al tratarse de cepas singénicas no será necesaria la inmunosupresión (Rajvanshi *et al.*, 1996).

VI. Conclusiones

De los experimentos de diferenciación *in vitro* de las células mononucleares humanas aisladas de sangre de cordón, concluimos:

1. En la fracción mononuclear presente en la sangre humana de cordón umbilical existen células de naturaleza hematopoyética que no expresan niveles detectables de albúmina, α -fetoproteína, citoqueratina-18 ni glutamina sintetasa, pero que pueden ser forzadas *in vitro* mediante su cultivo en presencia de factores específicos a diferenciarse en células capaces de expresar esos marcadores típicos de hepatocitos.
2. La adquisición *in vitro* de un fenotipo típico de hepatocitos por parte de las células mononucleares humanas de sangre de cordón tiene lugar de forma dependiente del tiempo y simultánea a la pérdida del fenotipo hematopoyético.

De los experimentos de terapia celular concluimos:

3. La inmunosupresión con ciclosporina A y un anticuerpo que destruye los linfocitos natural killer permite el injerto de células mononucleares humanas hematopoyéticas en el hígado de rata, lo que nos ha posibilitado investigar la utilidad de estas células en medicina regenerativa hepática mediante experimentos de xenotrasplante humano-rata.
4. El trasplante de células mononucleares humanas procedentes de sangre de cordón fue capaz de revertir las alteraciones histológicas y funcionales del hígado de ratas con hepatitis experimental producida por D-galactosamina.
5. La terapia con células mononucleares humanas procedentes de sangre de cordón no fue eficaz en el tratamiento de la cirrosis hepática experimental producida por la administración crónica de

tioacetamida. Al contrario, los hallazgos bioquímicos e histológicos apuntan a que el trasplante celular provocó un síndrome hepato-renal.

6. Los resultados contradictorios obtenidos en los experimentos de trasplante en los modelos experimentales agudo y crónico de enfermedad hepática sugieren la necesidad de continuar profundizando en la investigación sobre utilización de células madre hematopoyéticas en medicina regenerativa hepática.

VII. Bibliografía

- Albanis E, Friedman SL. Antifibrogenic agents for liver disease. *Am J Transplant* 2006;6:12-19.
- Alison MR, Poulson R, Forbes S, Wright NA. An introduction to stem cells. *J Pathol* 2002;197:419-423.
- Anghileri LJ, Heidbreder M, Weiler G, Dermietzel R. Hepatocarcinogenesis by thioacetamide: Correlations of histological and biochemical changes, and possible role of cell injury. *Exp Cell Biol* 1977;45:34-47.
- Ashworth CT, Werner JD, Wrightsman FJ. Effect of thioacetamide-induced sublethal hepatic cell injury on protein synthesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1965;119:495-501.
- Ballardini G, Groff P, Badiali de Giorgi L, Schuppan D, Bianchi FB. Ito cell heterogeneity: desmin-negative Ito cells in normal rat liver. *Hepatology* 1994;19:440-446.
- Banas A, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T. Stem Cell Plasticity: Learning From. *Dev Dyn* 2007;236:3228-3241.
- Becker FF. Thioacetamide hepatocarcinogenesis. *JNCL* 1983;71:553-558.
- Berry, M.N., Friend, D.S. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 1969;43:506-520.
- Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function. *Cell* 2001;105 (7):829-841.
- Border WA, Noble NA. Transforming growth factor β in tissue fibrosis, *N Engl J Med* 1994; 331:1286-1292.

- Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 1983;301:527-530.
- Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;21(Suppl 97):77.
- Brecher AS, Hinko A, Twining SS. A proposed sequence of reactions leading to collagen biosynthesis, fibrosis and hypertension in alcoholics. *J Invest Med* 1996;44: 36-41.
- Brocks DG, Strcker H, NeuBuer HP, Timpl R. Radioimmunoassay of laminin in serum and its application to cancer patients. *Clin Chem* 1986; 32: 787-791.
- Brunstein, CG, Setubal DC, Wagner JE. Expanding the role of umbilical cord blood transplantation. *Br. J. Haematol* 2007;13:20-35.
- Cajone F, Salina M, Bemelli-Zazzera A. 4-hydroxynonenal induces a DNA-binding protein similar to the heat-shock factor. *Biochem J* 1989;262:977-979.
- Cantz T, Manns MP, Ott M. Stem cells in liver regeneration and therapy. *Cell Tissue Res* 2007;331(1):271-282.
- Cascales M, Feijóo B, Cerdán S, Cascales C, Santos-Ruiz A. The effect of thioacetamide on urea cycle enzymes of rat liver. *J Clin Chem Clin Biochem*, 1979;17:129-132.
- Cascales M, Robles-Chillida E M, Feijóo B, Cerdán S, Martín-Sanz P, Santos-Ruiz A. Alteraciones producidas por la tioacetamida sobre las aminotransferasas GOT y GPT y la glutamato deshidrogenasa en hígado de rata. Estudio ultraestructural. *Rev Esp Fisiol* 1982;38(Supl):105-112.

- Cascales C, Martín-Sanz P, Pittner RA, Hopewell R, Brindley DN, Cascales M. Effects of an antitumoral rhodium complex on thioacetamide-induced liver tumour in rats. *Biochem Pharmacol* 1986;35:2655-2661.
- Cascales M, Martín-Sanz P, Craciunescu DG, Mayo I, Aguilar A, Robles-Chillida EM, Cascales C. Alterations in hepatic peroxidation mechanisms in thioacetamide-induced tumors in rats. Effect of a rhodium (III) complex. *Carcinogenesis* 1991;12:233-240.
- Castilla Cortázar A. Factores de crecimiento en la patogenia de la cirrosis hepática *Med Clin (Barc)*1993;100:702-704.
- Castro JA, D'acosta N, De Ferreyra EC, De Castro CR, Díaz Gómez MI, De Fenos M. Studies on thioacetamide induced liver necrosis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1974;30:79-86.
- Cardinale GJ, Udenfriend S. Prolyl hydroxylase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1974;41(0):245-300.
- Cerbón-Ambriz J, Cerbón-Solórzano J, Rojkind M. Regulation of collagen production in freshly isolated ceti populations from normal and cirrhotic rat liver: effect of lactate. *Hepatology* 1991;13:551-556.
- Cerdán S, Cascales M, Santos-Ruiz A. Effect of thioacetamide on the pentose phosphate pathway and other NADP-linked enzymes of rat liver cytosol. *Mol Pharmacol* 1981;19:451-455.
- Clawson G, Moody D, James J, Smuckler E. Nuclear envelope alterations accompanying thioacetamide-related enlargement of the nucleus. *Cancer Res* 1981;41:519-526.

- Cruz A, Padillo FJ, Torres E, Navarrete CM, Muñoz-Castañeda JR, Caballero FJ, Briceño J, Marchal T, Tuñez I, Montilla P, Pera C, Muntané J. Melatonin prevents experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in rats. *J Pineal Res* 2005;39:143–150.
- Chakrabartty PK, Chattopadhyay SK, Schneider WC. Molecular basis for increased synthesis of albumin in rat liver after thioacetamide administration. *Cancer Res* 1982;42:421-428.
- Chieli E, Malvaldi G. Role of the microsomal FAD-containing monooxygenase in the liver toxicity of thioacetamide S-oxide. *Toxicology* 1984;31:41-52.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidion.Thiocyanate-phenil chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-159.
- Dabeva MD, Laconi E, Oren R, Petkov PM, Hurston E, Shafritz DA. Liver regeneration and alpha-fetoprotein messenger RNA expression in the retrorsine model for hepatocyte transplantation. *Cancer Res* 1998;58(24):5825-5834.
- Daley GQ, Scadden DT. Prospects for stem cell-based therapy. *Cell* 2008;132(4):544-8.
- Dasgupta A, Chatterjee R, Chowdhury JR. Thioacetamide-induced hepatocarcinoma in rat. *Oncology* 1981;38:249-253.
- DeFerreyra FC, DeFenos OM, Castro JA. Effect of different chemicals on thioacetamide-induced liver necrosis. *Toxicology* 1980;16:205-214.

- Di Campli C, Piscaglia AC, Pierelli L, Rutella S, Bonanno G, Alison MR, Mariotti A, Vecchio FM, Nestola M, Monego G, Michetti F, Mancuso S, Pola P, Leone G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. A human umbilical cord stem cell rescue therapy in a murine model of toxic liver injury. *Dig Liver Dis.* 2004;36(9):603-613.

- Dwivedi Y, Rastogi R, Sharma SK, Garg NK, Dhawan BN. Picroliv affords protection against thioacetamide-induced hepatic damage in rats. *Plants Med* 1991;5:25-28.

- Dyroff MC, Neal RA. Identification of the major protein adduct formed in rat liver after thioacetamide administration. *Cancer Res* 1981;41:3430-3435.

- Eghbali-Fatourehchi G, Sieck GC, Prakash YS, Maercklein P, Gores GJ, Fitzpatrick LA. Type procollagen I production and cell proliferation is mediated by transforming growth factor- β in a model of hepatic fibrosis. *Endocrinology* 1996;137:1894-1903.

- Ehrhardt J, Brimah K, Adkin C, Partridge T, Morgan J. Human muscle precursor cells give rise to functional satellite cells in vivo. *Neuromuscul Disord* 2007;17(8):631-638.

- Esumi H, Takahashi Y, Sekiya T, Sato S, Nagase S, Sugimura T. Presence of albumin mRNA precursors in nuclei of analbuminemic rat liver lacking cytoplasmic albumin mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79(3):734-738.

- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154-156.

- Fallowfield JA, Kendall TJ, Iredale JP. Reversal of fibrosis: No longer a pipe dream? *Clin Liver Dis* 2006; 10:481-497.

- Fevery J, Nevens F. A stable model of cirrhotic portal hypertension in the rat: thioacetamide revisited. *Eur J Clin Invest* 2006;36 (4):242–249.
- Fischbach GD, Fischbach RL. Stem cells: science, policy, and ethics. *J Clin Invest* 2004;114:1364–1370.
- Fisher RA, Strom SC. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation* 2006;82:441-449.
- Fitzhugh OG, Nelson AA. Liver tumors in rats fed thiourea or thioacetamide *Science* 1948;108:626-628.
- Flanagan SP. "Nude", a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res* 1966;8:295-309.
- Fleck C, Zimmermann T, Franke H, Braunlich H, Dargel R. Relation between renal and hepatic excretion of drugs: VII. Hepatic and renal excretion of phenol red in thioacetamide-induced acute and chronic liver damage. *Exp Pathol* 1988; 33:47-54.
- Fontana L, Moreira E, Torres MI, Fernández MI, Ríos A, Sánchez de Medina F, Gil A. Serum amino acid changes in thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. *Toxicology* 1996; 106:197-206.
- Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, Dorko K, Sauter BV, Strom SC. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Eng J Med* 1998;338:1422-1426.
- Franke II, Zimmermann T, Dargel R. Qualitative and quantitative changes in hepatic lipoprotein particles following acute injury of the rat liver induced by thioacetamide. *Virchows Arch [Pathol]* 1983;44:99-113.

- Franke B, Zimmermann T, Dargel R. Changes in intra- and extrahepatic VLDL in the rat following acute injury by thioacetamide. A morphometric and biochemical study. *Virchows Arch [Cell Pathol]* 1985;48:277-88.
- Freshney, R. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, p.117, Alan R. Liss, Inc., New York. 1987.
- Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis. *N Engl J Med* 1993;328:1828-1835.
- Friedman SL. Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury. *The journal of biological chemistry* 2000; 275 (4):2247-2250.
- Friedman SL, Bansal MB. Reversal of hepatic fibrosis- Fact or fantasy? *Hepatology* 2006;46 (2) (Suppl 1):S82-S88.
- Fujimoto N, Sejima H, Kyotani M, Iwata K, Ichida T, Ooshuma A. One-step sandwich enzyme immunoassay for human laminin using monoclonal antibodies. *Clin Chim Acta* Friedman SL. The cellular basis of hepatic fibrosis. *N Engl J Med* 1993; 328:1828-1835.
- Gage FH. Mammalian Neural Stem Cells. Review. *Science* 2000;287:1433-1438.
- Gallagher CH, Gupta DN, Judah JD, Rees KR. Biochemical changes in liver in acute. thioacetamide intoxication. *J Pathol Bacteriol* 1956;72:193-201.
- Garrido Colino C. Estado actual de la investigación con células madre. *An Pediatr (Barc)* 2003;59:(6)52-558.

- Geerts A, Greenwel P, Cunningham M, De Bleser P, Rogiers y, Wisse E, Rojkind M. Identification of connective tissue gene transcripts in freshly isolated parenchymal, endothelial, Kupffer and fat-storing cells by Northern hybridization analysis. *J Hepatol* 1993;19:148-158.
- Gordon MY, Levcicar N, Pai M, Bachellier P, Dimarakis I, Al-Allaf F, M'Hamdi H, Thalji T, Welsh JP, Marley SB, Davies J, Dazzi F, Marelli-Berg F, Tait P, Playford R, Jiao L, Jensen S, Nicholls JP, Ayav A, Nohandani M, Farzaneh F, Gaken J, Dodge R, Alison M, Apperley JF, Lechler R, Habib NA. Characterization and clinical application of human CD34+ stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony-stimulating factor. *Stem Cells* 2006;24:1822-1830.
- Green H, Goldberg B. Collagen cell protein synthesis by an established mammalian fibroblast line. *Nature* 1964;204:347-349.
- Gressner AM. Cytokines and cellular crosstalk involved in the act of fat-storing cells. *J Hepatol* 1995;22:28-36.
- Gressner AM. Mediators of hepatic fibrogenesis. *Hepatogastroenterology* 1996a;43:91-103.
- Gressner AM. Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: A key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int Suppl* 1996b;49:S39-S45.
- Grompe M, Lindstedt S, al-Dhalimy M, Kennaway NG, Papaconstantinou J, Torres-Ramos CA, Ou CN, Finegold M. Pharmacological correction of neonatal lethal hepatic dysfunction in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nat Genet* 1995;10:453-60.

- Grossman M, Rader DJ, Muller DW, Kolansky DM, Kozarsky K, Clark BJ 3rd, Stein EA, Lupien PJ, Brewer HB Jr, Raper SE, *et al.* A pilot study in vivo gene therapy for homozygous familial hypercholestoremia. *Nature Med* 1995;1:1148-1154.
- Guengerich, FP. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999;39:1-17.
- Guo J, Friedman SL. Hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2007;27:413-426.
- Gupta DN. Production of cancer of the bile ducts with thioacetamide. *Nature* 1955;4449:257.
- Gupta DN. Acute changes in the liver after administration of thioacetamide. *J Path Bact* 1956a;72:183-192.
- Gupta DN. Nodular cirrhosis and metastasising tumours produced in the liver of rats by prolonged feeding with thioacetamide. *J Path Bact* 1956b; 72:415-426.
- Habu S, Fukui H, Shimamura K, Kasai M, Nagai Y, Okumura K, Tamaoki N. In vivo effects of anti-asialo GM1. I. Reduction of NK activity and enhancement of transplanted tumor growth in nude mice. *J Immunol* 1981;127:34-38.
- Halliday ML, Coates RA, Rankin JG. Changing trends of cirrhosis mortality in Ontario. Canada, 1911-1986. *Int J Epidemiol* 1991;20:199-208.
- Hennessy B, Körbling M, Estrov Z. Circulating stem cells and tissue repair. *Panminervamed* 2004;46:1-11.

- Herr I, Groth A, Schemmer P, Büchler MW. Mini review. Adult stem cells in progression and therapy of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2007;121:1875–1882.
- Highleyman L, Franciscus A. Introducción sobre el hígado. Hepatitis c support project [on line]. 2003, versión 1.0. Disponible en www.hcvadvocate.org.
- Highleyman L, Franciscus A. What is fibrosis? Hcsp FACT sheet. Hepatitis c support project [on line]. 2004, versión 1.0. Disponible en www.hcvadvocate.org.
- Hirayama C, Suzuki H, Takada A, Fujisawa K, Tanikawa K, Igarashi S. Serum type IV collagen in various liver diseases in companson with serum 7S collagen, laminin and type III procrocollagen peptide. *J Gastroenterol* 1996;31:242-248.
- Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, Park HK, Han H, Kim H. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 May 20;330(4):1153-1161.
- Hong WS, Hong SI, Park SY, Son Y, Lee YS, Chung YH, Yang SK, Suh DJ, Min YI. Elevation of serum type IV collagen in liver cancer as well as liver cirrhosis. *Anticancer Res* 1995;15:2777-2780.
- Hunter AJ Holscher MA, Neal RA. Thioacetamide-induced hepatic necrosis I. Involvement of the mixed-function oxidase enzyme system. *J Pharmacol Exp Ther* 1977; 200:439-48.

- Ishikawa F, Drake CJ, Yang S, Fleming P, Minamiguchi H, Visconti RP, Crosby CV, Argraves WS, Harada M, Key LL Jr, Livingston AG, Wingard JR, Ogawa M. Transplanted human cord blood cells give rise to hepatocytes in engrafted mice. *Ann NY Acad Sci* 2003;996:174-185.
- Jiao C, Bronner S, Mercer KLN, Sheriff DD, Schatteman GC, Dunnwald M. Epidermal cells accelerate the restoration of the blood flow in diabetic ischemic limbs. *Journal of Cell Science* 2004;117:1055-1063.
- Jochheim A, Hillemann T, Kania G, Scharf J, Attaran M, Manns MP, Wobus AM, Ott M. Quantitative gene expression profiling reveals a fetal hepatic phenotype of murine ES-derived hepatocytes. *Int J Dev Biol* 2004;48:23-29.
- Kakinuma S, Tanaka Y, Chinzei R, Watanabe M, Shimizu-Saito K, Hara Y, Teramoto K, Arai S, Sato C, Takase K, Yasuzumu T, Teraoka H. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells* 2003;21:217-227.
- Kanzler S, Lohse AW, Keil A, Henninger J, Dienes HP, Schirmacher P, Rose-John S, Meyer KH, zum Buschenfelde KHM, Blessing M. TGF- β 1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. *Am J Physiol* 1999;276 (4 Pt1):G1059-G1068.
- Kasai M, Iwamori M, Nagai Y, Okumura K, Tada T. A glycolipid on the surface of mouse natural killer cells. *Eur J Immunol* 1980;10:175-180.
- Kekkarainen T, Mannelin S, Laine J, Jaatinen T. Optimization of immunomagnetic separation for cord blood-derived hematopoietic stem cells. *BMC Cell Biol* 2006;7:30.

- Keppler D, Lesch R, Reutter W, Decker K. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp Mol Pathol* 1968;9:279-290.
- Kern S, Eichler H, Stoeve J , Klüter, BH, Bieback K. Comparative Analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006;24:1294–1301.
- Klimek F, Moore MA, Schneider E., Bannasch P. Histochemical and microbiological demonstration of reduced pyruvate kinase activity in thioacetamide-induced neoplastic nodules of rat liver. *Histochemistry* 1988; 90:37-42.
- Knittel T, Schuppan D, Meyer zum Büschenfelde KH, Ramadan G. Differential expression of collagen types I, III, IV by fat-storing (Ito) cells in vitro. *Gastroenterology* 1992;102:1724-1735.
- Kobayashi N, Ito M, Nakamura J, Cai J, Gao C, Hammel JM, Fox IJ. Hepatocyte transplantation in rats with decompensated cirrhosis *Hepatology* 2000 Apr;31(4):851-857.
- Koda H, Okuno M, Imai S, Moriwaki H, Muto Y, Kawada N, Kojima S. Retinoic acid-stimulated liver stellate cells suppress the production of albumin from parenchymal cells via TGF- β . *Biochem Biophys Res Commun* 1996;221:565-569.
- Körbling M, Robinson S, Estrov Z, Champlin R, Shpall E. Umbilical cord blood-derived cells for tissue repair. *Cytotherapy* 2005;7 (3):258-261.
- Kotton DN, Summer R, Fine A. Lung stem cells: New paradigms. *Experimental Hematology* 2004;32:340–343.

- Kretzschmar M, Franke H, Zimmermann T, Dargel R, Klinger W. Glutathione synthesis and export in experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide: relations to ultrastructural changes. *Exp Pathol*. 1989; 36(2):113-22.

- Kretzschmar M, Machnik G, Oesterle D, Zimmermann T, Klinger W. Gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) in experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide: a biochemical and enzyme histochemical study. *Exp Pathol* 1991;43(3-4):195-203.

- Kuralay F, Tanyalcin T, Kutay F, Yuce O, Ersoz O, Batur Y. Erythrocyte membrane Na⁺, K⁺ ATP ASE activity can be a marker of liver histopathology. *Biochem Mol Biol Int* 1996; 40:769-777.

- Kuroda K, Terao K, Akao M. Inhibitory effects of fumaric acid on hepatocarcinogenesis by thioacetamide in rats. *JNCL* 1987;79:1047-1051.

- Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK, Hurston E, Laconi S, Pani P, Daveba M, Shafritz. Long-term, near total replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 1998;153:319-329.

- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of de head bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:6900-6962.

- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000;6:1229-1234.

- Laleman W, Vander Elst I, Zeegers M, Servaes R, Libbrecht L, Roskams T, Lapis K, Jeney A, Divald A, Vajta G, Zalatnai A, Schaff Z. Experimental studies on the effect of hepatoprotective compounds. Tokai J Exp Clin Med 1986;1(Suppl):135-145.
- Lechner V. Stem Cells: Proyecciones en Ingeniería en Tejido. Rev Ped Elec [on line] 2007;4 (1).
- Lee SY, Jo SK, Cho WY, Kim HK, Won NH. The effect of α -melanocyte-stimulating hormone on renal tubular cell apoptosis and tubulointerstitial fibrosis in cyclosporin A nephrotoxicity. Exp Transplant 2004;78:1756-1764.
- Levicar N, Dimarakis I, Flores C, Tracey J, Gordon MY, Habib NA. Stem cells as a treatment for chronic liver disease and diabetes. Hep 2007;180:243-262.
- Li J, Rosman AS, Leo MA, Nagal Y, Lieber CS. Tissue inhibitor of metalloproteinase is increased in the serum of precirrhotic and cirrbotic alcoholic patients and can serve as a marker of fibrosis. Hepatology 1994; 19:1418-1423.
- Li X, Benjamin IS, Alexander B. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. Journal of Hepatology 2002;36:488-493.
- Lin DY, Chu CM, Sheen IS, Liaw YF. Serum carboxy terminal propeptide of type I procollagen to amino terminal propeptide of type III procollagen ratio is a better indicator than each single propeptide and 7S domain type IV collagen for progressive fibrogenesis in chronic viral liver diseases. Dig Dis Sci 1995;40:21-27.

- Livak KJ, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 2001; 25:402-408.
- Ma N, Stamm C, Kaminski A, Wenzhong L, Kleine HD, Müller-Hilke B, Zhang L, Egger D, Steinhoff G. Human cord blood cells induce angiogenesis following myocardial infarction in NOD/SCID mice. *Cardiovascular Research* 2005;66:45-54.
- Malvaldi G, Pollera M. Increase in the preneoplastic liver lesions by thioacetamide followed by repeated partial hepatectomy. *Bou Soc It Biol Sper* 1979;55:986-989.
- Mariotti A, Vecchio FM, Nestola M, Monego G, Michetti F, Mancuso S, Pola P, Leone G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. A human umbilical cord stem cell rescue therapy in a murine model of toxic liver injury. *Dig Liver Dis* 2004;36: 603-613.
- Marshall E. Gene therapy on trial. *Science* 2000;288(5468):951-957.
- Martínez-Hernández A, Amenta PS. The hepatic extracellular matrix I. Components and distribution in normal liver. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1993a; 423:1-11.
- Martínez-Hernández A, Amenta PS. The hepatic extracellular matrix II. Ontogenesis, regeneration and cirrhosis. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1993b;423:77-84.
- Martínez-Hernández A, Amenta PS. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J* 1995;9:401-410.

- Martín-Sanz P, Cascales C, Gómez A, Brindley DN, Cascales M. Effect of a rhodium complex on alterations of hepatic function in thioacetamide-induced hyperplastic noduligenesis in rats. *Carcinogenesis* 1987;8:1685-1690.

- Martín-Sanz P, Cascales C, Cascales M. Lipogenesis and cholesterogenesis o in liver and adípose tissue. Alterations of lipid metabolism by the effect of short- and long-term thioacetamide administration to rats. *Carcinogénesis* 1989;10:477-81.

- Matikainen T, Laine J. Placenta, an alternative source of stem cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 207:S544-S549.

- Mato JM, Camara J, Fernandez de Paz J, et al. S-adenosylmethionine in alcoholic liver cirrhosis: a randomized, placebocontrolled, double-blind, multicenter clinical trial. *J Hepatol* 1999;30: 1081–1089.

- Matsumoto E, Muragaki Y, Ooshima A. Increased serum type IV collagen peptide in carbon tetrachloride-treated rats. *Acta Pathol Jpn* 1989;39:23-29.

- Mayani H, Lansdorp P M. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells* 1998;16:153-165.

- Michalopoulos GK. Liver Regeneration. Mini review. *J Celll Physiol* 2007;213: 286–300.

- Milani S, Herbst H, Schuppan D, Grappone C, Pellegrini G, Pinzani M, Casini A, Calabró A, Ciancio G, Stefanini F, Burroughs AK, Surrenti C. Differential expression of mattix-metalloproteinase-1 and-2 genes in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol* 1994;144:528-537.

- Moore KL, Persaud TVN. *Embriología Clínica*. Elsevier España 2004; 7ª edición:pp 37-38.

- Moreira E. Contribución de los ácidos grasos poliinsaturados de la dieta al tratamiento de la cirrosis hepática. Tesis doctoral, Universidad de Granada, 1993.
- Moreira E, Fontana L, Periago JL, Sánchez de Medina F, Gil A. Changes in fatty acid composition of plasma, liver microsomes and erythrocytes in liver cirrhosis induced by oral intake of thioacetamide in rats. *Hepatology* 1995;21:199.
- Morley CGD, Boyer JL. Stimulation of hepatocellular proliferation by a serum factor from thioacetamide-treated rats. *Biochim Biophys Acta* 1977;477: 165-176.
- Müller A. Krombholz B, Pott G, Machnik, Vollandt R, Reinhardt M, Jorke D. Collagen peptidase and type III procollagen peptide serum levels in chronic liver diseases. *Clin Chim Acta* 1991;197:59-66.
- Murakami K, Abe T, Miyazawa M, Yamaguchi M, Masuda T, Matsuura T, Nagamori S, Takeuchi K, Abe K, Kyogoku M. Establishment of a new human cell line, LI90, exhibiting characteristics of hepatic Ito (fat-storing) cells. *Lab Invest* 1995;72:731-739.
- Murawaki Y, Yamamoto H, Kawasaki H, Shima H. Serum tissue inhibitor of metalloproteinases in patients with chronic liver disease and with hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 1993;218:47-58.
- Murawaki Y, Ikuta Y, Nishimura Y, Koda M, Kawasaki H. Serum markers for fibrosis and plasma transforming growth factor- β_1 in patients with hepatocellular carcinoma in comparison with hepatocellular carcinoma in comparison with patients with liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11:443-450.

- Muriel P, Rivera-Espinoza Y. Review. Beneficial drugs for liver diseases. *J. Appl. Toxicol.* 2008;28:93-103.

- Musina RA, Bekchanova ES, Belyavskii AV, Grinenko TS, Sukhikh GT. Umbilical cord blood mesenchymal stem cells. *Bull Exp Biol Med* 2007; 143:127-131.

- Muzzillo DA, Imoto M, Fukuda Y, Koyama S, Saga S, Nagai Y, Hayakawa T. Clinical evaluation of serum tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in patients with liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 1993;8:437-441.

- Natarajan SK, Thomas S, Ramamoorthy P, Basivireddy J, Pulimood AB, Ramachandran A, Balasubramanian KA. Oxidative stress in the development of liver cirrhosis: comparison of two different experimental models. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21: 947-957.

- Neubauer K, Knittel T, Armbrust T, Ramadori G. Accumulation and cellular localization of fibrinogen/fibrin during short-term and long-term rat liver injury. *Gastroenterology* 1995;108:1124-1135.

- Newcomb JD, Sanberg PR, Klasko SK, Willing AE. Umbilical cord blood research: current and future perspectives. *Cell Transplant* 2007;16:151-158.

- Newsome PH, Plevris JN, Nelson LJ, Hayes PC. Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation. *Liver Transplantation* 2000;6 (1): 21-31.

- Newsome PN, Johannessen I, Boyle S, Dalakas E, McAulay KA, Samuel K, Rae F, Forrester L, Turner ML, Hayes PC, Harrison DJ, Bickmore WA, Plevris JN. Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroenterology* 2003; 124:1891-900.

- Nguyen MT, Herrine SK, Zem MA. Cytokine involvement in the liver, *Curr Op Gastroenterol* 1994; 10: 277-284.

- Niemelä O. Collagen breakdown products as markers of fibrosis and cirrhosis. *Alcohol Suppl* 1994; 2: 345-352.

- Niles LP, Armstrong KJ, Rincón Castro LM, Dao CV, Sharma R, McMillan CR, Doering LC, Kirkham DL. Neural stem cells express melatonin receptors and neurotrophic factors: colocalization of the MT1 receptor with neuronal and glial markers. *BMC Neurosci* 2004;5:41.

- Nonome K, Li X-K, Takahara T, Kitazawa Y, Funeshima N, Yata Y, Xue F, Kanayama M, Shinno E, Kuwae C, Saito S, Watanabe A, Sugiyama T. Human umbilical cord blood-derived cells differentiate in the Fas, mediated liver injury model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289:G1091-G1099.

- Noort WA, Willemze R, Falkenburg JH. Comparison of repopulating ability of hematopoietic progenitor cells isolated from human umbilical cord blood or bone marrow cells in NOD/SCID mice. *Bone Marrow Transplant* 1998;22 Suppl 1:S58-60.

- Noort WA, Wilpshaar J, Hertogh CD, Rad M, Lurvink EG, van Luxemburg-Heijs S A, Zwinderman K, Verwey RA, Willemze R, Falkenburg JH. Similar myeloid recovery despite superior overall engraftment in NOD/SCID mice after transplantation of human CD34 (+) cells from umbilical cord blood as compared to adult sources. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28:163-171.

- Nozu F, Takeyama N, Tanaka T. Changes of hepatic fatty acid metabolism produce by chronic thioacetamide administration in rats. *Hepatology*, 1992; 15:1099-1106.

- Oertel M, Shafritz DA. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochim Biophys Acta* 2007;1782:61-74.
- Oren R, Daveba M, Petkov P, Hurston E, Laconi E, Shafritz D. Restoration of serum albumin levels in Nagase analbuminemic rats by hepatocyte transplantation. *Hepatology* 1999; 29:75-81.
- Osada J, Aylagas H, Mirò-Obradors MJ, Palacios-Alaiz E. Lyso-phosphatidylcholine is implicated in thioacetamide-induced liver necrosis. *Biochem Biophys Res Comm* 1988;154:803-808.
- Osada J, Aylagas H, Sanchez-Vegazo I, Gea T, Millán I, Palacios-Alaiz E. Effect of S-Adenosyl-L methionine on thioacetamide-induced liver damage in rats. *Toxicology Letters* 1986;32:97-106.
- Osada J, Aylagas H, Palacios-Alaiz E. Effects of S-Adenosyl-L-methionine on phospholipids methyltransferase activity changes induced by thioacetamide. *Biochem Pharmacol* 1990;40:648-651.
- Osada J, Aylagas H, Miró-Obradors MJ, Palacios-Alaiz E. Alterations in lipid characteristics of lysosomes are involved in liver necrosis induced by thioacetamide. *Biol Chem* 1993;374:129-132.
- Paine CJ, Eichner ER, Dickson y. Concordance of radioassay and microbiological assay in the study of ethanol-induced fall in serum folate level. *Am J Med Sci* 1973;266:135-138.
- Palacios E, Osada J, Cascales M, Santos Ruiz A. Alteraciones en el metabolismo lipídico que acompañan a la cirrosis inducida por tioacetamida. *Rev Esp Oncol* 1982;29:505-510.

- Palombo JD, Bowers JL, Clouse ME, McCullough A. Hepatic utilization of exogenous nucleotide precursor for restoration of ATP after cold ischemia in rats. *Am J Clin Nutr* 1993;57:420-427.

- Pap A, Varró Y. The mixed function oxidase system in thioacetamide-induced cirrhosis of the liver in rats. *Acta Med Acad Sci Hung* 1981; 38:381-384.

- Papadopoulos NM, Charles MA. Serum lipoprotein patterns in liver disease. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1970; 134:797-799.

- Paradisi L, Panagini C, Parola M, Barrera G, Dianzani MU. Effect of 4-hydroxynonenal on adenylate cyclase and 5'-nucleotidase activities in rat liver plasma membranes. *Chem BioI Interact* 1985;53:209-217.

- Perret O. Nucleotides, nucleosides and bases. En: Holman RB, Cross AJ, Joseph MH eds. *High Performance Liquid Chromatography in Neuroscience Research*. John Wiley & Sons Publishers 1993; pp 165-93.

- Peters TJ. Proposal for standardization of total protein assays. *Clin Chem* 1968;14:1147-1159.

- Phang JM, Downing SJ, Yeh GC, Smith RJ, Wililams JA. Stimulation of the hexose monophosphate pentose pathway by delta 1-pyrroline-5-carboxylic acid in human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1979;87:363-370.

- Pihajaniemi T, Myllyla R, Kivirikko KI Prolyl-4-hydroxylase and its role in collagen synthesis. *JHepatol* 1991;13:S2-S7.

- Plagemann PGW, Wohlhueter RW, Woffendin C. Nucleoside and nucleobase transport in animal cells. *Biochim Biophys Acta* 1988;947:405-443.

- Plebani M, Burlina A. Biochemical markers of hepatic fibrosis. *Clin Biochem* 1991;24:219-39.
- Poli G, Parola M. Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radic Biol Med* 1997;22:287-305.
- Porada GA, Porada C, Zanjani ED. The fetal sheep: a unique model system for assessing the full differentiative potential of human stem cells. *Yonsei Med J* 2004;45 Suppl:7-14.
- Poulsom R, Alison MR, Forbes SJ, Wright NA. Adult stem cell plasticity. Review Article. *J Pathol* 2002;197:441-456.
- Praet MM, Roels HJ. Histogenesis of cholangiomas and cholangiocarcinomas in thioacetamide fed rats. *Exp Pathol* 1984; 26:3-14.
- Prósper F, Pérez A, Cosín J, Panizo A, Rifón J, Hernández M, Pérez-Calvo J, Rábago G, Inogés S, Rocha E, Herreros J. Utilización de células madre en terapia regenerativa cardíaca. *Rev Med Univ Navarra* 2002;42 (2):24-28.
- Puppi A, Dely M. Tissue redox-state potential (E'O)--as regulator of physiological processes. *Acta Bici Hung* 1983;34:323-350.
- Quiroga J, Beloqui O, Castilla A. Cirrhosis. En: Prieto J, Rodés J, Shafritz, eds. *Hepatobiliary diseases*. Springer-Verlag, Alemania 1992; pp 323-415.
- Radford IR, Lobachevsky PN. An enteroendocrine cell-based model for a quiescent intestinal stem cell niche. *Cell Prolif* 2006;39:403-414.

- Rahman TM, Hodgson HJF. Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Pathol* 2000;81:145-157.
- Rajvanshi P, Kerr Rajvanshi P, Kerr A, Bhargava KK, Burk RD, Gupta S. Studies of liver repopulation using dipeptidyl peptidase IV-deficient rat and other rodent recipients: Cell size and structure relationships regulate capacity for increased transplanted hepatocyte mass in the liver lobe. *Hepatology* 1996;23:482-496.
- Ramadori G, Kniftel T, Odenthal M, Schwogler S, Neubauer K, Meyer zum Büschenfelde KH. Synthesis of cellular fibronectin by rat liver fat-storing (Ito) cells: regulation by cytokines. *Gastroenterology* 1992;103:1313-1321.
- Rathbone MP, Middlemiss PJ, Gysbers JW, DeForge S, Costello P, Del Maestro RF. Purine nucleosides and nucleotides stimulate proliferation of a wide of cell types. *In Vitro Cell Dev Biol* 1992; 28A:7-8.
- Reif S, Lu RB, Tano M, Terranova V, Young C, Fisher J, PetelI J, Lebenthal E. Perinatal food restriction in rats reduces the content but not concentration of liver extracellular matrix proteins. *J Nutr* 1993;123:811-816.
- Rímola A, Ginés P, Cusó E, Camps J, Gaya J, Arroyo V, Rodés J. Prostaglandin precursor fatty acids in cirrhosis with ascites: effect of linoleic acid infusion in functional renal failure. *Clin Sci* 1988;74:613-619.
- Ringe J, Kaps C, GR Burmester, Sittinger M. Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Naturwissenschaften* 2002;89:338-351.

- Rojas M, Venegas F, Server JL, Guillomot M. Clonación, producción de quimeras y células pluripotenciales. *Int J Morphol* 2004;22(4):343-350.
- Rojkind M, Giambrone MA, Biempica L. Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology* 1979;76:710-719.
- Ross G, Dunn D, Jones ME. Ornithine synthesis from glutamate in rat intestinal mucosa homogenates: evidence for the reduction of glutamate to gamma-glutamyl semialdehyde. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;85: 140-147.
- Rossi MA, Garramone A, Dianzani MU. Stimulation of phospholipase O activity by 4-hydroxynonenal: Influence of GTP and calcium concentration. *Int J Tissue React* 1988;10:321-325.
- Rudman D, DiFulco TJ, Galambos JT, Smith RB, Salam AA, Warren WD. Maximum rates of excretion and synthesis of urea in normal and cirrhotic subjects. *J Clin Invest* 1973; 52: 2241-2249.
- Rudolph FB, Kulkarni AD, Schandle VB, Van Buren CT. Involvement of dietary nucleotides in T-lymphocyte function. *Exp Med Biol* 1984;165:175-178.
- Rudolph KL, Chang S, Millard M, Schreiber-Agus N, DePinho RA. Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase. *Science* 2000;287(5456):1253-1258.
- Russell RM. Vitamin A and zinc metabolism in alcoholism. *Am J Clin Nutr* 1980; 33:2741-2749.

- Saez-Lara MJ, Frecha C, Martin F, Abadia F, Toscano M, Gil A, Fontana L. Transplantation of human CD34+ stem cells from umbilical cord blood to rats with thioacetamide-induced liver cirrhosis. *Xenotransplantation* 2006; 13:529-535.

- Sáez Lara MJ, Santisteban Bailón R, García Mediavilla MV, Sánchez Campos S, Gil A, González Gallego J, Fontana L. Diferenciación *in vitro* de células procedentes de sangre de cordón umbilical humano en células productoras de albúmina. *Rev Esp Enferm Dig* 2006a;98 (Supl I):9.

- Sagar J, Chaib B, Sales K , Winslet M, Seifalian A. Role of stem cells in cancer therapy and cancer stem cells: a review. *Cancer Cell Int* 2007;7:9.

- Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004;40:1304-1311.

- Sakaida I, Terai S, Nishina H, Okita K. Development of cell therapy using autologous bone marrow cells for liver cirrhosis *Med Mol Morphol* 2005;38(4):197-202.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Detection and analysis of proteins expressed from cloned genes. En: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Nolan, ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press N.Y. 1989a;3:pp 18.3-18.86.

- Sambrook J, Fritsch EM, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 1989b; pp 8.11-8.13.

- Sánchez-Tapias JM. Cirrosis hepática. En: Rodés J, Bruguera M, Sánchez-Tapias JM, eds. Manual de las enfermedades del hígado y vías biliares. Editorial Científico-Médica, Barcelona 1982; pp 261-276.

- Sanz N, Díez-Fernández C, Fernández-Simón L, Alvarez A, Cascales M. Relationship between antioxidant systems, intracellular thiols and DNA ploidy in liver of rats during experimental cirrhogenesis. *Carcinogenesis* 1995;16:1585-1593.

- Sanz N, Díez-Fernández C, Valverde AM, Lorenzo M, Benito M, Cascales M. Malic enzyme and glucose 6-phosphate dehydrogenase gene expression increases in rat liver cirrhogenesis. *BrJ Cancer* 1997;75:487-492.

- Savaiano DA, Ho CY, Chu Y, Clifford. Metabolism of orally and intravenously administered purines in rats. *J Nutr* 1980;110:1793-1804.

- Savaiano DA, Clifford AJ. Absorption, tissue incorporation and excretion of free-purine bases in rat. *Nutr Report Inter* 1978;17:551-556.

- Savaiano DA, Clifford AJ. Adenosine, the precursor of nucleic acids in intestinal cells unable to synthesize purines de novo. *J Nutr* 1981;111:1816-1822.

- Savolainen ER, Leo MN, Timpi R, Lieber CS. Acetaldehyde and lactate stimulate collagen synthesis of cultured baboon liver myofibroblasts. *Gastroenterology* 1984; 87:777-787.

- Schaffner JA, Schaffner F. Valoración del estado del hígado. En: Henry JB (ed). Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio (9 edición). Ediciones Científicas y Técnicas, S.A. 1993; pp 237-256.
- Scheffler B, Horn M, Blumcke I, Laywell ED, Coomes D, Kukekov VG, Steindler DA. Marrow-mindedness: a perspective on neuropoiesis. Review. Trends Neurosci 1999;22:348-357.
- Schmidt E. Glutamate Dehydrogenase. UV-Analysis. En: Bergmeyer HU, ed. 1990; 191: 211-220.
- Schneider A, Attaran M, Meier PN, Strassburg C, Manns MP, Ott M, Barthold M, Arseniev L, Becker T, Panning B. Hepatocyte transplantation in an acute liver failure due to mushroom poisoning. Transplantation 2006;82:1115-1116.
- Scholze T. Determination of phenylthiocarbamil amino acids by reversed-phase high performance liquid chromatography. J Chromatography 1985; 350:453-460.
- Schuppan D. Connective tissue polypeptides in serum as parameters to monitor antifibrotic treatment in hepatic fibrogenesis. J Hepatol 1991;13: S17-S25.
- Schuppan D, Schmid M, Somasundaram R, Ackermann R, Ruehi M, Nakamura T, Riecken E. Collagens in the liver extracellular matrix bind hepatocyte growth factor. Gastroenterology 1998;114:139-152.
- Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. Lancet 2008; 371:838-851.
- Schwoegler S, Neubauer K, Kniftel T, Chung AE, Ramadori G. Entactin expression in normal and fibrotic rat liver and in rat liver cells. Lab Invest 1994;70:525-536.

- Seegmiller JE, Watanabe T, Schreier MH. The effect of adenosine on lymphoid proliferation and antibody formation. *Ciba Found Symp* 1977;48: 249-276.
- Seifert WF, Bosma A, Hendnks HFJ, van Leeuwen REW, van ThieldeRuitter GCF, Seifert-Bock I, Knook DL, Brouwer A. Beta-carotene (provitamin A) decreases the severity of CCl hepatic inflammation and fibrosis in rats. *Liver* 1995; 15:1-8.
- Senkal M, Mumme A, Eickhoff U, Geier B, Spath O, Wulfert D, Joosten U, Frei A, Kemen M. C, it Care Med 1997; 25:1489-1496.
- Serakinci N, Keith WN. Therapeutic potential of adult stem cells. *Eur J Cancer* 2006;42:1243-1246.
- Shakoori AR, Drakhshan M. Effect of thioacetamide on the body weight, liver weight, histological structure and the total nucleic acids content of mouse liver. *Pakistan J Zool* 1975a;7:117-133.
- Shakoori AR, Zahir SA. The effect of thioacetamide on electrophoretic pattern of blood plasma proteins of rabbit. *Pakistan J Zool* 1975b;7:207-208.
- Shostak S. (Re) defining stem cells. *Bio Essays* 2006;28:301-308.
- Simon JB, Kepkay DL, Poon R. Serum cholesterol esterification in human liver disease, role of lecithin-cholesterol acyltransferase and cholesterol ester hydrolase. *Gastroenterology* 1974;66: 539-547.
- Smith FR, Goodman DS. The effects of diseases of the liver, thyroid and kidneys on the transport of vitamin A in human plasma. *J Clin Invest* 1971;50:2426-2436.

- Snykers S, Vanhaecke T, Papeleu P, Luttun A, Jiang Y, Vander Heyden Y, Verfaillie C, Rogiers V. Sequential exposure to cytokines reflecting embryogenesis: the key for in vitro differentiation of adult bone marrow stem cells into functional hepatocyte-like cells. *Toxicol Sci* 2006;94:330-341.
- Sonoda T, Tatibana M. Metabolic fate pyrimidines and purines in dietary nucleic acids ingested by mice. *Biochim Biophys Acta* 1978;521:55-66.
- Soria B, Bedoya FJ, Martin F. Gastrointestinal Stem Cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289: G177–G180.
- Stevens LC. The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre-and postimplantation mouse embryos. *Dev Biol* 1970;21, 364–382.
- Stramentinoli G, Gualano M, Ideo G. Protective role of S-Adenosyl-L-methionine on liver injury induced by D-galactosamine in rats. *Biochem Pharmacol* 1978;27:1431-33.
- Sun Y, Xiao D, Zhang RS, Cui GH, Wang XH, Chen XG. Formation of human hepatocyte-like cells with different cellular phenotypes by human umbilical cord blood-derived cells in the human-rat chimeras. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;324:711-718.
- Szasz y Persijn JP. Determination of gamma-glutamyl transferase. *Z Klin Chem u Klin Biochem* 1974;12:228.
- Takahara T, Furul K, Funaki J, Nakayama Y, Itoh H, Miyabayashi C, Sato H, Seiki M, Ooshima A, Watanabe A. Increased expression of matrix metalloproteinase-II in experimental liver fibrosis in rats. *Hepatology* 1995; 21:787-795.

- Takase S, Enyama K, Takada A. Collagen by cultured rat liver celis isolated from chronically alcohol-treated rats. *J Gastroenterol Hepatol* 1990;5:411-19.
- Tanabe Y, Tajima F, Nakamura Y, Shibasaki E, Wakejima M, Shimomura T, Murai R, Murawaki Y, Hashiguchi K, Kanbe T, Saeki T, Ichiba M, Yoshida Y, Mitsunari M, Yoshida S, Miake J, Yamamoto Y, Nagata N, Harada T, Kurimasa A, Hisatome I, Terakawa N, Murawaki Y, Shiota G. Analyses to clarify rich fractions in hepatic progenitor cells from human umbilical cord blood and cell fusion. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;324:711-718.
- Tanikawa K. Serum marker for hepatic fibrosis and related liver pathology. *Pathol Res Pract* 1994;190:960-968.
- Tasman-Jones C, Kay RG, Lee SP. Zinc and copper deficiency with particular reference to parenteral nutrition. *Surg Annual* 1978;10:23-52.
- Terai S, Ishikawa T, Omori K, Aoyama K, Marumoto Y, Urata Y, Yokoyama Y, Uchida K, Yamasaki T, Fujii Y, Okita K, Sakaida I. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 2006;24:2292-2298.
- Teramoto K, Asahina K, Kumashiro Y, Kakinuma S, Chinzei R, Shimizu-Saito K, Tanaka Y, Teraoka H, Arii S. Hepatocyte differentiation from embryonic stem cells and umbilical cord blood cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005;12:196-202.
- Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;32:11-16.

- Thomas TE, Miller CL, Eaves CJ. Purification of hematopoietic stem cells for further biological study. *Methods* 1999;17:202-218.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones J. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145-1147.
- Thorgeirsson SS, Grisham JW. Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence. *Hepatology* 2006;43:2-8.
- Tome S, Lucey MR. Review article: current management of alcoholic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:707-714.
- Torres MI, Fernández MI, Gil A, Ríos A. Effect of dietary nucleotides on degree of fibrosis and steatosis induced by oral intake of thioacetamide. *Dig Dis Sci* 1997;42:1322-1328.
- Torres MI, Fernández MI, Gil A, Ríos A. Dietary nucleotides have cytoprotective properties in rat liver damaged by thioacetamide. *Life Sci* 1998; 62:13-22.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4354.
- Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding-current status and outlook. *J Immunol Meth* 1984;72:313-340.
- Trenner PN, Waring RL. Early changes in thioacetamide-induced liver damage. *Toxicology Letters* 1983;19:299-307.

- Tsukamoto H, Rippe R, Niemela O, Lin M. Roles of oxidative stress in activation of Kupffer and Ito cells in liver fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 1995;10:S50-S53.
- Tsutsumi M, Urashima S, Matsuda Y, Takase S, Takada A. Changes in type collagen content in livers of patients with alcoholic liver disease. *Hepatology* 1993;17:820-827.
- Tsutsumi M, Takase S, Urashima S, Ueshima Y, Kawahara H, Takada A. Serum markers for hepatic fibrosis in alcoholic liver disease: which is the best marker, type III procollagen, type IV collagen, laminin, tissue inhibitor of metalloproteinase or prolyl hydroxylase?. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20: 1512-1516.
- Tuñón MJ, Sanchez-Campos S, Gutierrez B, Culebras JM, Gonzalez-Gallego, J. Effects of FK506 and rapamycin on generation of reactive oxygen species, nitric oxide production and nuclear factor kappa B activation in rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 2003; 66:439-445.
- Tuñón MJ, Álvarez M, Culebras JM, González-Gallego J. Modelos animales de fallo hepático fulminante. *Nutr Hosp* 2007;22:199-209.
- Turrini P, Monego G, Gonzalez J, Cicuzza S, Bonanno G, Zelano G, Rosenthal N, Paonessa G, Laufer R, Padron J. Human hepatocytes in mice receiving pre-immune injection with human cord blood cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;326(1):66-73.
- Uauy R, Stringel G, Thomas R, Quan R. Effect of dietary nucleosides on growth and maturation of the developing gut in the rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990;10:497-503.

- Ueno T, Inuzuka S, Torimura T, Oohira H, Ko H, Sata M, Yoshida H, Tanikawa K. Significance of serum type-IV collagen levels in various liver diseases. Measurement with a one-step sandwich enzyme immunoassay using monoclonal antibodies with specificity for pepsin-solubilized type-IV collagen. *ScandJ Gastroenterol* 1992;27:513-520.

- Ueno T, Inuzuka S, Torimura T, Oohira H, Ko H, Sata M, Yoshida H, Tanikawa K, Tsutsumi M, Takase S, Urashima S, Ueshima Y, Kawahara H, Takada A. Serum markers for hepatic fibrosis in alcoholic liver disease: which is the best marker, type III procollagen, type IV collagen, laminin, tissue inhibitor of metalloproteinase or prolyl hydrolase? *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20:1512-1516.

- Usami M, Iso A, Kasahara H, Kotani O, Haji S, Kanamaru T, Saitoh Y. Effect of parenteral nucleoside-nucleotide mixture on hepatic metabolism in partially hepatectomized cirrhotic rats. *Nutrition* 1996;12:436-439.

- Van de Bovenkamp M, Groothuis GM, Meijer DK, Olinga P. Liver fibrosis in vitro: cell culture models and precision-cut liver slices. *Toxicol in Vitro* 2007;21(4):545-557

- Van de Kerkhove MP, Hoekstra R, van Gulik, Chamuleau RAFM. Large animal models of fulminant hepatic failure in artificial and bioartificial liver support research. *Biomaterials* 2004;25:1613-1625.

- Verdonk RC, van den Berg AP, Slooff MJH, Porte RJ, Haagsma EB. Liver transplantation: an update. *Neth J Med* 2007;65:372-380.

- Walker C, Peterson W, Unqar R. Blood ammonia levels in advanced cirrhosis during therapeutic elevation of insulin-glucagon ratio. *N Engl J Med* 1974; 291:168-171.

- Walsh MJ, Sánchez-Pozo A, LeLeiko NS. A regulatory element is characterized by purine-mediated and cell-type-specific gene transcription. *Mol Cell Biol* 1990;10: 4356-4364.
- Walsh MJ, Tsao KL, LeLeiko NS. Characterization of DNA-protein interactions within a distal regulatory element upstream of a mammalian housekeeping gene promoter. *J Biol Chem* 1992;267:7026-7035.
- Wang X, Ge S, McNamara G, Hao QL, Crooks GM, Nolte JA. Albumin expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice transmitted with highly purified human hematopoietic stem cells. *Blood* 2003;101:4201-4208.
- Watanabe A, Yamauchi Y, Kobayashi M, Nagashima H. Rapid elevation of liver hydroxyproline content following a single administration of various chemical carcinogens to rats. *Res Exp Med (Berl)* 1989;189:43-46.
- Watt SM, Contreras M. Stem cell medicine: Umbilical cord blood and its stem potential. *Seminars in fetal and neonatal medicine* 2005;10:209-220.
- Weber-Nordt RM, Schott E, Finke J, Henschler R, Schulz G, Mertelsmann, R. Umbilical cord blood: an alternative to the transplantation of bone marrow stem cells. *Cancer Treat Rev* 1996;22:381-391.
- Wilcox HG, Dunn GD, Schencher S. Plasma long chain fatty acids and esterified lipids in cirrhosis and hepatic encephalopathy. *Am J Med Sci* 1978; 276: 293-303.
- Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic stem-cell niches. Review. *Nat Rev Immunol* 2006;6:93-106.

- Win KM, Charlotte F, MaUat A, Cherqui D, Martin N, Mavier P, Preaux AM, Dhumeaux D, Rosenbaum J. Mitogenic effect of transforming growth factor- β 1 on human Ito cells in culture: evidence for mediation by endogenous platelet-derived growth factor. *Hepatology* 1993;18:137-145.

- Yamada S, Kobayashi J, Murawaki Y, Suou T, Kawasaki H. Collagen-binding activity of plasma vitronectin in chronic liver disease. *Clin Chim Acta* 1996; 252: 95-103.

- Yamada S, Suou T, Kawasaki H, Yoshikawa N. Clinical significance of serum 7S collagen in various liver diseases. *Clin Biochem* 1992;25:467-470.

- Yoshida S, Bai Y, Muragaki Y, Ooshima A, Inada K, Nagai Y, Obata K, Iwata K, Hashida S, Ishikawa E. A sandwich immunoassay for human prolyl-4-hydroxylase using monoclonal antibody. *Clin Chim Acta* 1986;160:37-46.

- Yoshida Y, Shimomura T, Sakabe T, Ishii K, Gonda K, Matsuoka S, Watanabe Y, Takubo K, Tsuchiya H, Hoshikawa Y, Kurimasa A, Hisatome I, Uyama T, Terai M, Umezawa A, Shiota G. A role of Wnt/beta-catenin signals in hepatic fate specification of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 293:G1089-1098.

- Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Porada CD, Ogawa M. Engraftment and multilineage expression of human bone marrow CD34- cells in vivo. *Ann N Y Acad Sci* 1999;872:220-31.

- Zeng F, Chen MJ, Baldwin DA, Gong ZJ, Yan JB, Qian H, Wang J, Jiang X, Ren ZR, Sun D, Huang SZ. Multiorgan engraftment and differentiation of human cord blood CD34+ Lin- cells in goats assessed by gene expression profiling. Proc Natl Acad Sci USA 2006;3:7801-7806.

- Zimmermann T, Franke H, Dargel R. Biochemical and substructural studies on hepatic and serum lipoprotein metabolism after acute liver injury induced by thioacetamide in rats. Exp Path 1985; 28:225-233.

- Zimmermann T, Franke H, Dargel R. Studies on lipid and lipoprotein metabolism in rat liver cirrhosis induced by different regimens of thioacetamide administration. Exp Pathol 1986;30:109-17.

- Zimmermann T, Franke H, Peuker M, Dargel R. Quantitative studies on fatty acid metabolism in isolated parenchymal cells from normal and cirrhotic livers in rats. J Hepatol 1992;15:10-16.

- Zimmermann T, Müller A, Machnik G, Franke H, Schubert H, Dargel R. Biochemical and morphological studies on production and regression of experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in Uje: WIST rats. Z Versuchstierkd 1987;30:165-180.

VIII. Glosario

Célula madre: Aquella célula dotada simultáneamente de la capacidad de generar uno o más tipos de células diferenciadas y de autorrenovarse, es decir, producir más células madre. (Fischbach y Fischbach, 2004).

División asimétrica: Una célula se divide de manera asimétrica si una de las hijas mantiene sus propiedades de célula madre, mientras la otra comienza el proceso de diferenciación (Serakinci y Keith, 2006).

División simétrica: Cuando la célula se divide simétricamente, cada célula hija es idéntica y mantiene el potencial de la célula de la que procede.

Nicho: Microambiente específico que rodea a una célula madre (Wilson y Trumpp, 2006). El nicho controla muchas facetas de las células madre adultas, como son su división, orientación y el tipo de división (simétrica o asimétrica) (Alison *et al.*, 2002).

Plasticidad: Cualidad de las células madre para producir progenie capaz de expresar varios fenotipos maduros distintos (Serakinci y Keith, 2006). Se asocia a las células madre adultas, ya que poseen la capacidad de ampliar su potencialidad y generar células adecuadas a las características del nuevo microambiente en respuesta a una demanda fisiológica o lesión (Poulsom *et al.*, 2002). Este concepto es equivalente al de transdiferenciación descrito a continuación.

Potencia o potencialidad: Grado de la capacidad de una célula madre para diferenciarse (Shostak, 2006). De acuerdo a su potencialidad, las células madre pueden ser:

Célula totipotente: Célula capaz de convertirse en todos los tipos de células diferenciadas y tejidos, incluyendo los extraembrionarios (Fischbach y Fischbach, 2004). Puede ser implantada en el útero de un animal vivo y generar el organismo completo, incluidos los sistemas nerviosos central y periférico (Cage, 2000). Ej.: El cigoto.

Célula pluripotente: Célula que puede diferenciarse en todos los tipos de células y tejidos con la excepción de los tejidos extraembrionarios (placenta y membrana corioamniótica) (Fischbach y Fischbach, 2004). Deriva del embrión temprano antes de la formación de las capas germinales, concretamente en el estadio de blastocisto. Ej.: células madre embrionarias.

Célula multipotente: Célula progenitora que puede convertirse en múltiples linajes que constituirán un tejido o varios como respuesta a estímulos y con las condiciones ambientales adecuadas, pero siempre dentro de la misma capa embrionaria de la que procede (Prósper *et al.*, 2002;Fischbach y Fischbach, 2004). Ej.: células madre hematopoyéticas.

Célula oligopotente: Célula progenitora que puede generar uno o más fenotipos maduros (Shostak, 2006). Ej.: células ovas, capaces de diferenciarse en hepatocitos o colangiocitos.

Célula unipotente: Célula madre comprometida para diferenciarse en un único tipo de célula madura (Shostak, 2006). Ej.: células madre espermatogénicas.

Célula progenitora: Célula con mayor limitación en cuanto a los tipos celulares en que puede diferenciarse. (Scheffler *et al.*, 1999). Las células progenitoras no poseen la capacidad de autorrenovación.

Transdiferenciación: Capacidad de una célula madre de un tejido perteneciente a una capa embrionaria determinada para transformarse en células de una capa embrionaria diferente. (English, 2005). Ej.: células madre sanguíneas.

IX. Anexos

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Se solicita el consentimiento de la paciente para obtener una muestra de sangre procedente del cordón umbilical inmediatamente después del parto y antes de su eliminación como residuo biológico no útil. La muestra se recogerá una vez que el niño/a haya nacido y se extraerá de la parte del cordón que permanece unido a la placenta; en ningún caso de la que permanece unido al bebé.

La toma de sangre del cordón no comporta ningún riesgo para la salud ni del recién nacido ni de la madre, puesto que se obtiene de un tejido que no está en contacto con ninguno de los dos. El único requisito es que la madre y el recién nacido estén completamente sanos.

La finalidad de la muestra es obtener células madre (células progenitoras hematopoyéticas multipotenciales) que se encuentran en la sangre del cordón umbilical para su uso exclusivo en investigación médica. La sangre de cordón representa el segundo reservorio de células progenitoras hematopoyéticas mayor de todo el cuerpo. El primero es la médula ósea y el tercero, la sangre periférica, en la cual el porcentaje de células progenitoras, así como su capacidad de multipotencialidad, es diez veces menor que las encontradas en la sangre de cordón. Dada la dificultad de obtener muestras de médula ósea, el cordón se convierte en la mejor y más accesible fuente de células progenitoras hematopoyéticas multipotenciales.

El estudio con células progenitoras es una línea de investigación en la que se está trabajando de forma muy activa en los últimos años dado el amplio abanico de posibilidades terapéuticas que ofrecen. En medicina se están consiguiendo grandes avances y se espera que estas células puedan ser utilizadas en un futuro próximo en la terapia de muchas enfermedades hoy día incurables.

El investigador principal se hace responsable de la estricta confidencialidad de los datos personales de la paciente. Todas las investigaciones se llevarán a cabo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia (Campus de Cartuja) y en el Centro de Investigación Biomédica (Parque Tecnológico Campus de la Salud), ambos de la Universidad de Granada, así como en el Instituto de Biomedicina de la Universidad de León.

La paciente entiende lo que se expone en este documento y está de acuerdo con que se pueda tomar una muestra de sangre del cordón umbilical que queda unido a la placenta tras el parto.

Granada, a _____ de _____ de 20__.

Luis Fontana Gallego

La paciente

