

**Facultad de Medicina**  
Universidad de Zaragoza



**“EXPRESIÓN DE SCF Y C-KIT EN HEPATOPATÍA AGUDA Y CRÓNICA”**

**“SCF AND C-KIT EXPRESSION IN ACUTE AND CHRONIC HEPATIC DISEASE”**

Autora:

Sara Celaya Burrel

Directora:

Estela Solanas Villacampa

2016

## **RESUMEN**

En estudios previos con modelos de regeneración hepática por resección hepática parcial, se ha observado que las células progenitoras hepáticas juegan un papel importante en la remodelación del tejido dañado, cuando éste es muy intenso. SCF (Stem cell factor) es uno de los factores secretado en hígado que promueve la activación y proliferación de esta población celular. Sin embargo, el papel y contribución de estas células y SCF a la regeneración hepática en modelos de enfermedad hepática se desconoce.

El objetivo de este trabajo de fin de grado ha sido estudiar la expresión en tejido hepático de c-kit y de SCF tanto en la enfermedad hepática aguda como en enfermedad hepática crónica descompensada. La expresión de c-kit y SCF se determinó mediante tinción inmunohistoquímica de cortes histológicos de biopsias hepáticas de pacientes con hepatopatía aguda (Grupo Agudos) y de pacientes con hepatopatía crónica (Grupo Crónicos), comparándola con la expresión de tejido hepático de individuos sanos (Grupo Control).

Los resultados obtenidos fueron que los pacientes con hepatopatía crónica presentaron una expresión de c-kit significativamente mayor ( $p > 0,05$ ) que el grupo control y que el grupo de pacientes agudos. Sin embargo el nivel de expresión de SCF no difirió ( $p > 0,05$ ) entre los distintos grupos a estudio. Los resultados encontrados parecen indicar que la cronicidad de la enfermedad hepática conlleva la proliferación o migración de células progenitoras en el hígado, tal vez por la continuidad del daño en el tiempo y por tanto por un agotamiento de la capacidad proliferativa de los hepatocitos, sin que dicha activación del compartimento progenitor parezca estar asociado al aumento de SCF.

## **PALABRAS CLAVE**

Hígado, hepatopatía aguda, cirrosis, regeneración hepática, células madre, c-kit, SCF

## **ABSTRACT**

In previous studies with models of liver regeneration by partial liver resection, it has been observed that liver progenitor cells play an important role in the remodeling of the damaged tissue, when it is very intense. SCF (Stem cell factor) is one of the factors secreted in liver that promotes activation and proliferation of this cell population. However, their role and contribution of both to liver regeneration in models of liver disease is unknown.

The aim of this work was to study the level of expression in liver tissue of c-kit and SCF in both acute and decompensated liver disease and chronic liver disease. The expression of c-kit and SCF was determined by immunohistochemical staining of histological sections of liver biopsies from patients with acute liver disease (Acute Group) and patients with chronic liver disease (Chronic Group), comparing the expression in liver tissue from healthy individuals (Control Group).

The results showed that patients with chronic liver disease had an expression of c-kit significantly higher ( $p > 0.05$ ) than the control group and the group of acute patients. Nevertheless, SCF levels did not differ ( $p > 0.05$ ) between the studied groups. The results suggest that chronicity of liver disease involves the proliferation or migration of progenitor cells to the liver, perhaps because of the continuity of damage over time and therefore a depletion of the proliferative capacity of hepatocytes, but apparently without connection between the activation of the stem cell compartment and an increase of SCF.

## **KEY WORDS**

Liver, acute liver disease, cirrhosis, liver regeneration, stem cells, c-kit, SCF

# ÍNDICE

RESUMEN .....	2
PALABRAS CLAVE.....	2
ABSTRACT .....	3
KEY WORDS .....	3
1. INTRODUCCIÓN .....	2
1.1 REGENERACIÓN HEPÁTICA.....	2
1.2 CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS.....	3
1.3 ESTADO ACTUAL DEL TEMA .....	3
1.4 SCF.....	9
1.5 CKIT.....	9
2. HIPÓTESIS.....	11
3. OBJETIVOS.....	11
4. MATERIAL Y MÉTODOS .....	12
4.2 ESTUDIO DE CKIT Y SCF POR INMUNOHISTOQUÍMICA.....	12
4.3 ESTADÍSTICA.....	13
5. RESULTADOS .....	14
6. DISCUSIÓN.....	21
7. CONCLUSIONES .....	26
8. BIBLIOGRAFÍA.....	27
9. ANEXOS .....	30
9.1 RECUENTO DE CÉLULAS TEÑIDAS.....	30

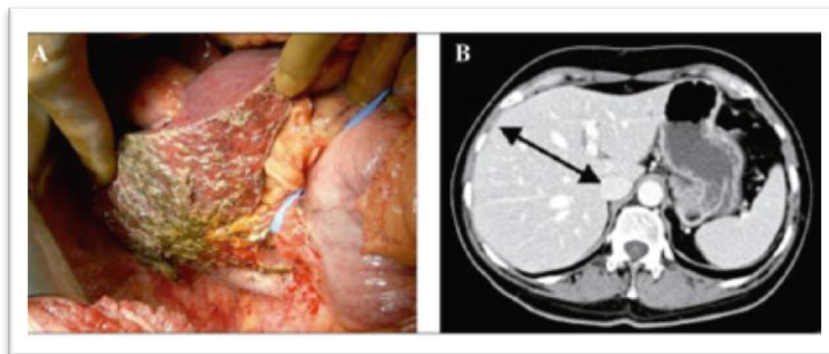
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 REGENERACIÓN HEPÁTICA

El hígado adulto es un órgano esencialmente quiescente, es decir, que los hepatocitos salen del ciclo celular y se mantienen en fase G<sub>0</sub>. Cuando hay necesidad de regeneración tisular, ya bien porque el hígado ha sido dañado o tras una resección quirúrgica, las células pueden volver a entrar en el ciclo celular con resultado mitótico. El proceso comienza con la activación de la proliferación de hepatocitos maduros (quiescentes hasta ese momento) en primer término, y más tardíamente, de otros tipos celulares, como las células del epitelio biliar, y las células endoteliales sinusoidales <sup>1,2,3,4</sup> (Figura 1).

Sin embargo, estudios en modelos de regeneración hepática parecen indicar que si el daño hepático es severo y crónico ya sea causado por drogas, virus o toxinas, la proliferación de los hepatocitos se dificulta. Si se inhibe la entrada de los hepatocitos maduros en el ciclo celular por carcinógenos o toxinas, la regeneración hepática se produce a través de la activación de células progenitoras hepáticas, las llamadas células ovas. Éstas son una subpoblación de células hepáticas que, en un hígado adulto normal, están quiescentes, existiendo en un número reducido alrededor de la región periportal, más concretamente en el canal de Hering. A medida que el daño hepático progresa, infiltran en el parénquima a lo largo del canalículo biliar entre los cordones hepáticos. Finalmente, estas células progenitoras hepáticas se diferencian en hepatocitos maduros <sup>5,6,7,8</sup>.

Estudios extensos de la hepatocarcinogénesis y otros modelos de daño hepático no carcinogénico en roedores sugieren que las células ovas pueden representar una célula progenitora o célula madre <sup>9,10</sup>.



**Figura 1.** A. Visión del hígado izquierdo remanente (segmentos I, II, III y IV) en donante vivo de hígado tras hepatectomía derecha. B. Imagen radiológica de la regeneración del lóbulo izquierdo remanente (segmentos I, II, III y IV) 1'5 meses post hepatectomía derecha en un donante vivo de hígado. (Imagen obtenida del Servicio de Radiología. Clínica Universidad de Navarra)

## 1.2 CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS

Las células madre hematopoyéticas (CMH) se definen como células inmaduras que se pueden transformar en todos los tipos de células sanguíneas, como glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas. Las células madre hematopoyéticas se encuentran en la sangre periférica y en la médula ósea. También se pueden llamar células madre sanguíneas.

En la médula ósea, las CMH se localizan en unas zonas llamadas nichos, que juegan un papel muy importante en su regulación. Estos nichos hematopoyéticos están divididos en tres partes: una zona osteoblástica, que está cercana a los osteoblastos; una zona medular que alberga CMH quiescentes y proliferativas; y una zona vascular, cerca de los sinusoides, que permite que salgan las células maduras a la circulación <sup>11, 12, 13, 14</sup>.

Cuando son trasplantadas a receptores sometidos a un tratamiento mieloablativo que permita su injerto, son capaces de repoblar a largo plazo todos los linajes hematopoyéticos. En humanos adultos, las CMH se encuentran fundamentalmente en la médula ósea, con una frecuencia relativa de 1 entre 104 a 1 entre 105 células nucleadas.

En los últimos diez años diversos estudios <sup>13</sup> han descrito aparente transdiferenciación a diversos tejidos como músculo, hígado, miocardio, o sistema nervioso.

Algunos de los marcadores de las células madre hematopoyéticas humanas son CD34+, CD59+, Thy-1, CD38<sup>low</sup>, c-kit y lin <sup>15, 16, 17</sup>.

El hallazgo de que las células ovas también expresen genes de las células madre hematopoyéticas, como c-kit, CD34, Sca-1 y Thy-1, ha sugerido que se originan de CMH.

De todas formas, estudios recientes en ratones y ratas han mostrado que la transdiferenciación de CMH en células ovas es un evento muy poco usual, con lo que probablemente no tenga importancia fisiológica <sup>18</sup>.

## 1.3 ESTADO ACTUAL DEL TEMA

Durante varias décadas se dudó de la existencia de las células progenitoras hepáticas. Por qué debería pensarse en la existencia de tales células, si las células maduras diferenciadas del hígado, naturalmente quiescentes, retenían la capacidad de entrar nuevamente en el ciclo celular, dividirse y diferenciarse nuevamente, en respuesta a un daño tóxico o quirúrgico. Es decir, la masa normal del hígado puede ser completamente restaurada sin que sea necesaria la

contribución de células progenitoras (Figura 2). Sin embargo, se ha comprobado que en situaciones de eliminación extremadamente significativa de hepatocitos, o si por alguna razón su crecimiento es inhibido, aparecen las células ovas, producto de la activación del compartimiento de células progenitoras.

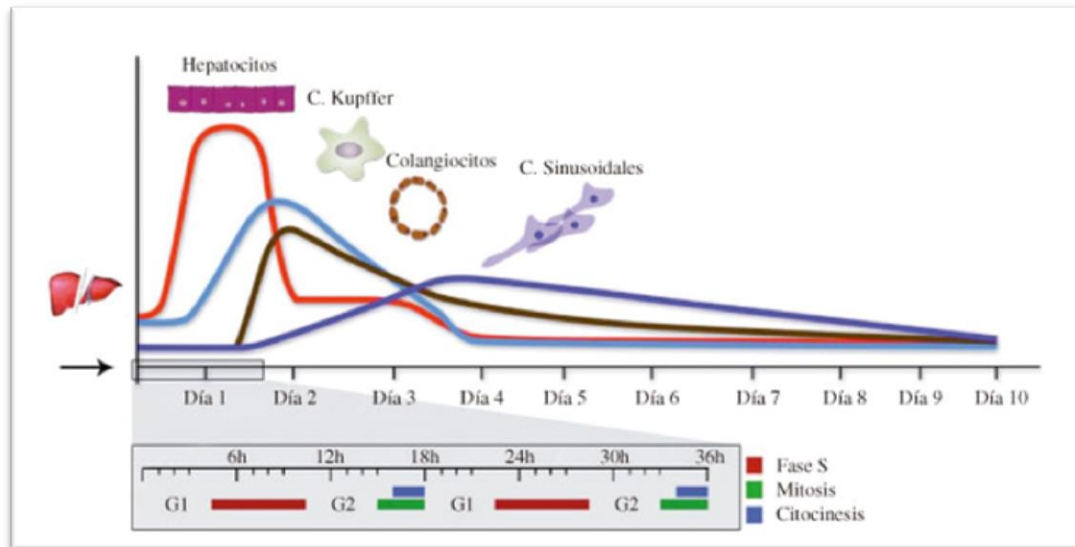


Figura 2. Representación esquemática de las secuencias replicativas de las células epiteliales – hepatocitos, colangiocitos – y mesenquimales tras una hepatectomía. En el eje de abscisas se muestra la correlación con las fases del ciclo celular de los hepatocitos. Adaptado de Nevzorova YA y Morgan DO.<sup>19</sup>

A partir de 1999 se agrega una nueva dimensión a esta teoría de las células progenitoras hepáticas, tras la obtención de células ovas a partir de células progenitoras hemopoéticas parecen migrar a hígado dando origen a dichas células ovas, hepatocitos y células epiteliales biliares<sup>20</sup>.

Petersen y colaboradores<sup>20</sup> en 1999 estudiaron el origen de las células que repoblaron el hígado de animales que recibieron trasplante de hígado ortotópico o de médula ósea. La hipótesis planteada fue que las células ovas y otras células hepáticas pueden surgir en la médula ósea, o asociadas a ella. Esta hipótesis fue ensayada a través de tres modelos: 1- trasplante de médula ósea en ratas hembras letalmente irradiadas, a partir de donantes macho, y detección del cromosoma Y; 2- trasplante de médula ósea de donantes positivos para dipeptidil-peptidasa IV, una enzima presente en los espacios de los canalículos biliares entre hepatocitos, en animales receptores hembra negativos para esa enzima; 3- trasplante de hígado en ratas receptoras que expresan el antígeno L21-6, a partir de donantes alogénicos que no expresan ese antígeno. En cada modelo, se demostró la posibilidad de que células asociadas a la médula ósea puedan actuar, bajo condiciones fisiopatológicas, como

progenitoras de diversos tipos de células hepáticas. Los autores documentaron la aparición de células ovales y de hepatocitos derivados del donante en los animales receptores.

Un trabajo similar fue realizado en ratones <sup>21</sup>. Los autores realizaron dos tipos de experiencias: 1- ratones hembra, letalmente irradiados, que recibieron trasplante de médula ósea completa, a partir de donantes macho, y fueron sacrificados a los días 1, 3, 5 y 7, y 2, 4 y 6 meses tras el trasplante; 2- ratones hembra que recibieron trasplante de células de médula ósea de donantes macho, pero previamente purificadas, y fueron sacrificadas a los 8 meses. En ambos casos (médula ósea completa y purificada), fueron encontradas células compatibles con hepatocitos, en los hígados de los animales receptores, positivos para cromosoma Y y para mRNA de albúmina, a partir del día 7 post-trasplante, en aproximadamente el 2.2% del total de hepatocitos.

En otro trabajo <sup>22</sup>, se inyectaron intravenosamente, células de médula ósea de ratón adulto, altamente purificadas por técnicas de selección (cell sorter), y transgénicas para el gen lacZ de Escherichia coli, en ratones deficientes en la enzima fumarilacetoacetato-hidrolasa (FAH), un modelo animal de tirosinemia fatal hereditaria tipo I. Tres semanas después del trasplante, 4 de 9 animales sobrevivieron, observándose la restauración de la función bioquímica del hígado enfermo. A los 7 meses, esos animales fueron sacrificados, y en los hígados de todos ellos se encontraron nódulos de crecimiento con tinción positiva para beta-galactosidasa, en un 30-50% de la masa total del hígado, demostrándose que esas células provenían de la médula ósea del donante. Los nódulos de crecimiento consistían en pequeñas colonias de alrededor de 50 hepatocitos, o colonias grandes de más de  $1 \times 10^5$  células, en ambos casos morfológicamente normales, que expresaban la enzima FAH. Los autores no pudieron demostrar si esas células eran las originalmente injertadas, o su progenie.

Dos estudios publicados hechos en humanos confirman los resultados obtenidos en roedores. En uno de ellos <sup>23</sup>, se obtuvieron especímenes de hígado de dos pacientes femeninas, receptoras de médula ósea de donantes masculinos, y de 4 pacientes masculinos, receptores de trasplante ortotópico de hígado, a partir de donantes femeninos, los cuales fueron analizados usando técnicas de hibridización por fluorescencia in situ (FISH) para el cromosoma Y, e inmunohistoquímica para citoqueratinas 8, 18 y 19. En el caso de las pacientes trasplantadas con médula ósea, si bien no tenían historia previa de enfermedad hepática, el examen post-mortem indicó la presencia en sus hígados, de hepatocitos y células ductulares biliares provenientes de los donantes. Esto indicaría que, aún en ausencia de injuria severa, las



células podrían mobilizarse a un nivel basal, a modo de fenómeno fisiológico. En los pacientes masculinos que recibieron trasplante de hígado de donantes femeninos, fueron identificados en el hígado, acúmulos de hepatocitos conteniendo el cromosoma Y, un tiempo después del trasplante. Los autores plantean dos explicaciones a estos fenómenos: por un lado, que las células progenitoras hepáticas pasan a través de la circulación y se intercalan en los cordones preexistentes, directamente como hepatocitos, sin un estadio intermedio de células tipo ovals, y por otro lado, que las células progenitoras extrahepáticas entran como intermediarias tipo ovals, quizás a través de los canales de Hering. La subsiguiente expansión y diferenciación produciría la formación de los acúmulos de hepatocitos ya mencionados. (Figura 3)

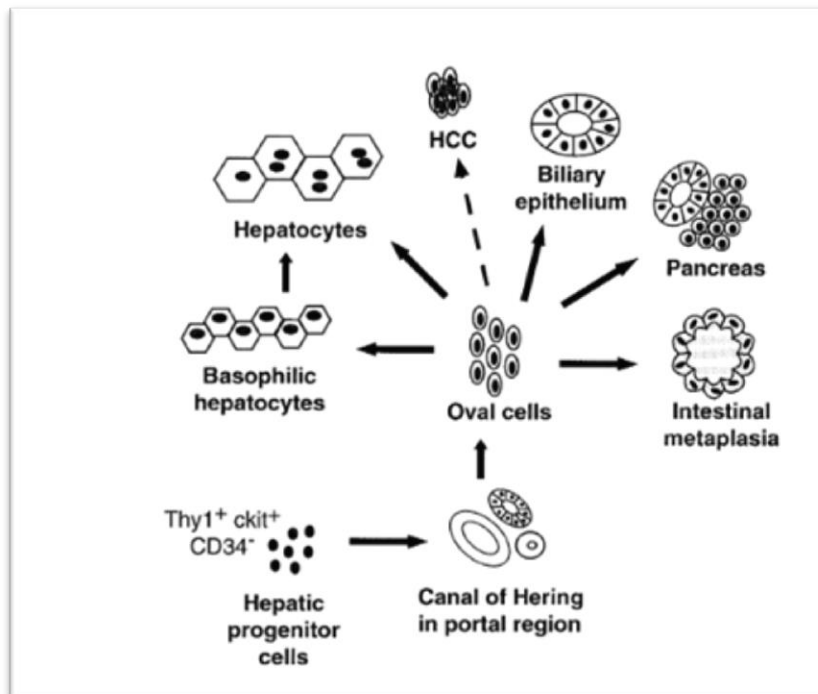


Figura 3. Origen y destino de células ovals. Las células progenitoras hepáticas originadas en médula ósea migran a hígado e infiltran la región portal a través de los canales de Hering. Estas células madre podrían dar lugar a las células ovals, las cuales pueden diferenciarse en hepatocitos maduros. Imagen obtenida de Petersen *et al.*<sup>20</sup>

La identidad de las células extrahepáticas capaces de desarrollarse en células hepáticas no es aún conocida, pero el injerto de células a partir de médula ósea CD34 positiva, sugeriría que las células progenitoras hematopoyéticas podrían presentar este potencial.

En otro trabajo<sup>24</sup>, se analizó también la posibilidad de usar células progenitoras hematopoyéticas humanas para generar hepatocitos de reemplazo en un tejido dañado. El daño crónico en el hígado de pacientes tratados con trasplante de médula ósea promovería la

colonización y amplificación de células progenitoras hematopoyéticas exógenas. Los autores postulan además, que, en casos de daño crónico del hígado, éste podría ser colonizado por células hematopoyéticas tanto endógenas como exógenas.

Estos hallazgos, así como otros referidos a células de médula ósea que derivaron en músculo esquelético o cardíaco <sup>25, 26</sup> o en células mesenquimáticas <sup>27</sup>, indicarían que algunas células progenitoras hemopoyéticas podrían ser células itinerantes capaces de sufrir una diferenciación específica de tejido.

Recientemente y a raíz de datos que apoyan la existencia de una gran plasticidad en células de médula ósea (MO) adultas, se han iniciado estudios que exploran las posibilidades terapéuticas de células madre o “stem” (CS) adultas de MO en las enfermedades hepáticas crónicas. Trabajos recientes indican que tras una lesión en un órgano o tejido, CS de MO se movilizan y migran a la zona dañada para mantener una hemostasis fisiológica, jugando un papel importante en el proceso de inflamación y remodelación tisular. El potencial de las CS hematopoyéticas de migrar al hígado, respondiendo al estrés generado por diferentes mecanismos de lesión, para reparar tejido no hematopoyético, se ha puesto de manifiesto en diversos modelos animales.

Todos estos trabajos experimentales han suscitado un gran interés y prueba de ello es que en los últimos años se están realizando estudios clínicos que intentan valorar la eficacia de una infusión de CS hematopoyéticas, a través de la arteria hepática o la vena porta, en pacientes con enfermedad hepática. También se está estudiando el efecto de la movilización de precursores de MO mediante G-CSF en distintas enfermedades hepáticas. La mayoría de estos estudios son no controlados y constan de un número de pacientes muy reducido. Además muchos de ellos, se han realizado en grupos de enfermos heterogéneos, haciendo muy difícil extraer conclusiones. A pesar de todo esto los resultados son esperanzadores, ya que algunos de los estudios encuentran mejoría en determinados parámetros clínicos y además, demuestran la seguridad de este tipo de tratamiento.

El mecanismo por el que estas células migran y se alojan en el parénquima hepático (“homing”), no es bien conocido. Se sabe que el hígado dañado expresa citoquinas y factores que presumiblemente participan en este proceso de captación de células “stem” que provienen de fuentes extrahepáticas. Parece cada vez más claro que la lesión hepática induce la expresión y secreción de factores como interleuquina-8, metaloproteasas, SCF y factor de

crecimiento de hepatocitos (HGF, del inglés *Hepatocyte growth factor*), los cuales facilitan los fenómenos de “homing” y enjertación de CS en el hígado dañado. Así mismo, el factor derivado de la célula estromal-1 (SDF-1 o también conocido como CXCL12) expresado en el tejido dañado y su receptor de células humanas progenitoras al hígado.

Los mecanismos mediante los cuales estas células podrían favorecer la regeneración hepática tampoco están claros. En un principio se pensó que la plasticidad de las CS de MO, (tanto hematopoyéticas como mesenquimales) y su diferenciación a hepatocitos era su principal mecanismo de acción. Posteriormente muchos autores sugirieron que los nuevos hepatocitos se producen mediante fenómenos de fusión de estas células con hepatocitos endógenos. Sin embargo en los últimos años, han aparecido datos que apuntan a que las células “stem” ejercen un efecto proliferativo paracrino sobre los hepatocitos endógenos, mediante la liberación de citoquinas que estimulan la proliferación celular o promueven la angiogénesis. Son capaces también de regular al alza el gen BCL-2 y por tanto inhibir la apoptosis y de suprimir el proceso inflamatorio actuando en la vía de la IL-6. Las CS hematopoyéticas pueden contribuir a la reparación de la lesión tisular, facilitando la liberación de factor de crecimiento del endotelio vascular (VEFG) que a su vez incrementa el aporte sanguíneo a la zona lesionada. Todos estos fenómenos pueden ayudar a la regeneración celular en el órgano dañado.

En el momento actual, y antes de proseguir con ensayos clínicos, urge conocer con más profundidad el papel de las células “stem” de MO en la regeneración y reparación del tejido hepático en los diferentes tipos de enfermedad hepática humana, así como sus posibles mecanismos de acción. Teniendo en cuenta todo lo anteriormente descrito, sería importante estudiar si existe movilización de células madre desde médula ósea a sangre periférica cuando se produce enfermedad hepática grave, aguda y crónica, así como caracterizar el tipo de células que son movilizadas. También es fundamental conocer las diferentes citoquinas y factores relacionados con dicha movilización y el efecto que puedan tener en la regeneración hepática. De esta forma se podrían encontrar nuevas terapias para este tipo de enfermedades basadas en favorecer la movilización de células madre desde médula ósea a sangre periférica o bien en administrar o activar la secreción de ciertos factores a nivel sanguíneo que favoreciesen la llegada de células progenitoras al hígado o activasen la replicación de los hepatocitos del parénquima hepático.

El futuro de estas investigaciones sería encontrar nuevas terapias para enfermedades hepáticas basadas en favorecer la movilización de células madre desde médula ósea a sangre

periférica o bien en administrar o activar la secreción de ciertos factores a nivel sanguíneo que favoreciesen la llegada de células progenitoras al hígado o activasen la replicación de los hepatocitos del parénquima hepático.

#### 1.4 SCF

La SCF es el ligando para el receptor tirosin kinasa transmembrana del receptor de protooncogenes c-kit, es decir, es precursor de c-kit. También se conoce como KL (ckit ligand), MGF (mast cell growth factor) y SLF (steel factor).

Es una citoquina pleiotrópica dividida en dos cadenas de 248 y 220 aminoácidos en humanos y ratones, respectivamente. El ligando SCF es esencial para el desarrollo de células germinales, células progenitoras hematopoyéticas y precursores melanocíticos. SCF puede estimular la proliferación de mastocitos maduros, así como la maduración y proliferación de mastocitos inmaduros.

Es una proteína que regula el ciclo celular. Actúa mediante la vía del receptor c-kit y se le han atribuido funciones tales como la promoción de la supervivencia de células y la proliferación y diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas. La expresión de SCF aumenta en fallo agudo tras hepatectomía parcial. Su receptor, c-kit, es un marcador de célula hepática progenitora.

Una investigación utilizando receptores disfuncionales de c-kit sugiere que la SCF es proproliferativa a células ovas en ratas. La activación de gp130 y c-kit es el requerimiento mínimo para que se produzca la expansión de progenitores hematopoyéticos. Así pues, la SCF es una pieza clave en la activación de células hepáticas progenitoras.

#### 1.5 CKIT

El protooncogen c-kit, localizado en el cromosoma humano 4 (4q12), codifica un receptor transmembranal, CD117/c-kit, que pertenece a la familia de receptores clase III de la tirosinquinasa, entre los que se incluyen al receptor del factor 1 estimulante de las colonias y a los receptores tipo A y tipo B del factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

Por lo general, se ha demostrado que la vía del receptor c-kit de la tirosinquinasa es importante para el crecimiento tumoral y la progresión de varios cánceres. Las mutaciones en

el gen c-kit que conducen a la fosforilación del ligando (activación) del gen c-kit de la tirosinquinasa, se cree que tienen un papel patogenético central en, por ejemplo, los tumores del estroma gastrointestinal.

Es una glicoproteína transmembrana que forma parte de receptor celular KIT. Se encuentra en condiciones normales en numerosos tipos de células del organismo, entre ellas las células pluripotenciales de la médula ósea, los melanocitos de la piel, las células del epitelio mamario, células madre hematopoyéticas, mastocitos, células de Cajal y células germinales. El CD117 se sobreexpresa en ciertos tipos de cáncer, particularmente en el tumor del estroma gastrointestinal.

El CD117 forma parte del receptor KIT. Este receptor transmembrana tiene como ligando al factor SFC. La activación del receptor KIT cuando se le une el factor SFC provoca una serie de cambios estructurales en el receptor que activan la enzima tirosina quinasa. La tirosin quinasa es una enzima que cataliza la fosforilación de la tirosina, causando fosforilización de numerosas proteínas, generando diferentes señales que actúan sobre importantes procesos celulares, incluyendo proliferación celular, apoptosis y diferenciación.

## **2. HIPÓTESIS**

Nuestra hipótesis es que las CSMO juegan un papel importante en la regeneración de lesiones hepáticas y que este efecto está mediado por la producción de distintas citoquinas y factores de crecimiento (SCF) que estimulan la activación y proliferación de células progenitoras hepáticas o el reclutamiento de las CSMO (células c-kit) a nivel hepático.

## **3. OBJETIVOS**

El objetivo principal de este estudio es estudiar la expresión de proteínas relacionadas con el proceso de migración y “homing” de las CSMO (c-kit y SCF) en tejido hepático en distintos tipos de enfermedad hepática: hepatopatía aguda y hepatopatía crónica, comparándola con la expresión de individuos sanos.

Este estudio se encuadra dentro de un estudio más amplio del grupo de Patología Digestiva del IIS Aragón que pretende conocer con más profundidad el papel de las células “stem” de MO en la regeneración y reparación del tejido hepático en los diferentes tipos de enfermedad hepática humana, así como sus posibles mecanismos de acción.

La consecución de los objetivos mencionados permitiría conocer el papel regenerador de las células “stem” en el hígado. Estos estudios se podrían continuar con ensayos clínicos, encaminados a favorecer la movilización de CSMO a sangre periférica en determinados casos de enfermedad hepática a fin de conseguir la regeneración del tejido afectado, o bien a elevar los niveles séricos a nivel periférico o hepático de determinadas citoquinas o factores de crecimiento que favoreciesen una mayor regeneración hepática.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 PACIENTES

Se tomaron biopsias hepáticas por vía trasugular de un total de 21 pacientes del servicio de Patología Digestiva del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa previo consentimiento informado y autorización por el Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA). 8 de los individuos presentaban en el momento de la biopsia hepatopatía aguda (Enfermos agudos) y 7 hepatopatía crónica descompensada (Enfermos crónicos). Las muestras del grupo control correspondieron a bloques parafinados de muestras de tejido hepático sano recogido de hígados donados para trasplante (n=6) y pertenecientes al archivo del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.

### 4.2 ESTUDIO DE CKIT Y SCF POR INMUNOHISTOQUÍMICA

Sobre las biopsias de tejido hepático se determinó la expresión de SCF y c-kit mediante tinción inmunohistoquímica. Para ello, de las muestras embebidas en parafina se realizaron cortes de 4- $\mu$ m de grosor mediante micrótopo. Los cortes sobre portaobjetos fueron desparafinados mediante aplicación de calor durante 30 minutos a 60 °C, seguido de dos lavados de 5 minutos en un baño de xileno, e hidratados mediante inmersión en soluciones de concentraciones decrecientes de etanol.

Para la recuperación del antígeno se llevó a cabo la incubación de los cortes en buffer citrato (10 mM Tris-citrato de sodio, 1,9 mM ácido cítrico, pH 6.0) calentándolos a media potencia en microondas durante 15 minutos. A continuación, la peroxidasa endógena fue inactivada incubando las secciones 3 minutos en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con metanol al 3% (suministrado en el kit de DAKO EnVision+System-HRP (DAB)), seguido del bloqueo de las reacciones inespecíficas durante 1 hora a temperatura ambiente en TBS (Trizma base 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.6) con BSA al 5%.

Para la determinación de SCF la tinción inmunohistoquímica se realizó mediante incubación con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-SCF humano (sc-13126, Santa Cruz Biotechnology, Inc., diluido 1/50 en TBS) durante 60 min. a 4 °C y en el caso de c-kit, la incubación se realizó con el anticuerpo policlonal de conejo anti-CD117 humano (A4502, Dako Corporation, diluido 1/400) durante 40 min. también a 4°C.

Para la detección de la señal peroxidada se usó un kit comercial de DAKO (DAKO Corporation, CA, USA), EnVision+SystemHRP (DAB) generado para su uso con anticuerpos primarios de ratón y conejo, respectivamente. Finalmente las secciones fueron contrastadas con hematoxilina durante 2 minutos. Para evaluar la especificidad de la técnica, se llevaron a cabo controles negativos incubando los cortes de tejido hepático en TBS sin anticuerpo primario.

Para cada preparación se tomaron imágenes de los 10 campos que presentaban un mayor marcaje del anticuerpo mediante microscopio invertido Olympus (IX81) en campo claro con objetivo de 10X y acoplado a una cámara digital de color refrigerada Olympus (XC50-Cell^D). Todo el procesamiento de las muestras y toma de imágenes fueron llevados a cabo por el grupo de Patología Digestiva y el servicio de Anatomía Patológica del IIS Aragón.

Una vez obtenidas las imágenes para cada muestra se procedió a cuantificar el porcentaje del área teñida para SCF o c-kit. Para ello se utilizó el software libre ImageJ siguiendo la guía de uso para cuantificación de áreas. Para ello se sustrajo el fondo de la imagen, se seleccionaron las áreas teñidas mediante ajuste de los valores umbrales de color, contraste y luminosidad y se cuantificaron las áreas seleccionadas. (Ver anexos).

#### 4.3 ESTADÍSTICA

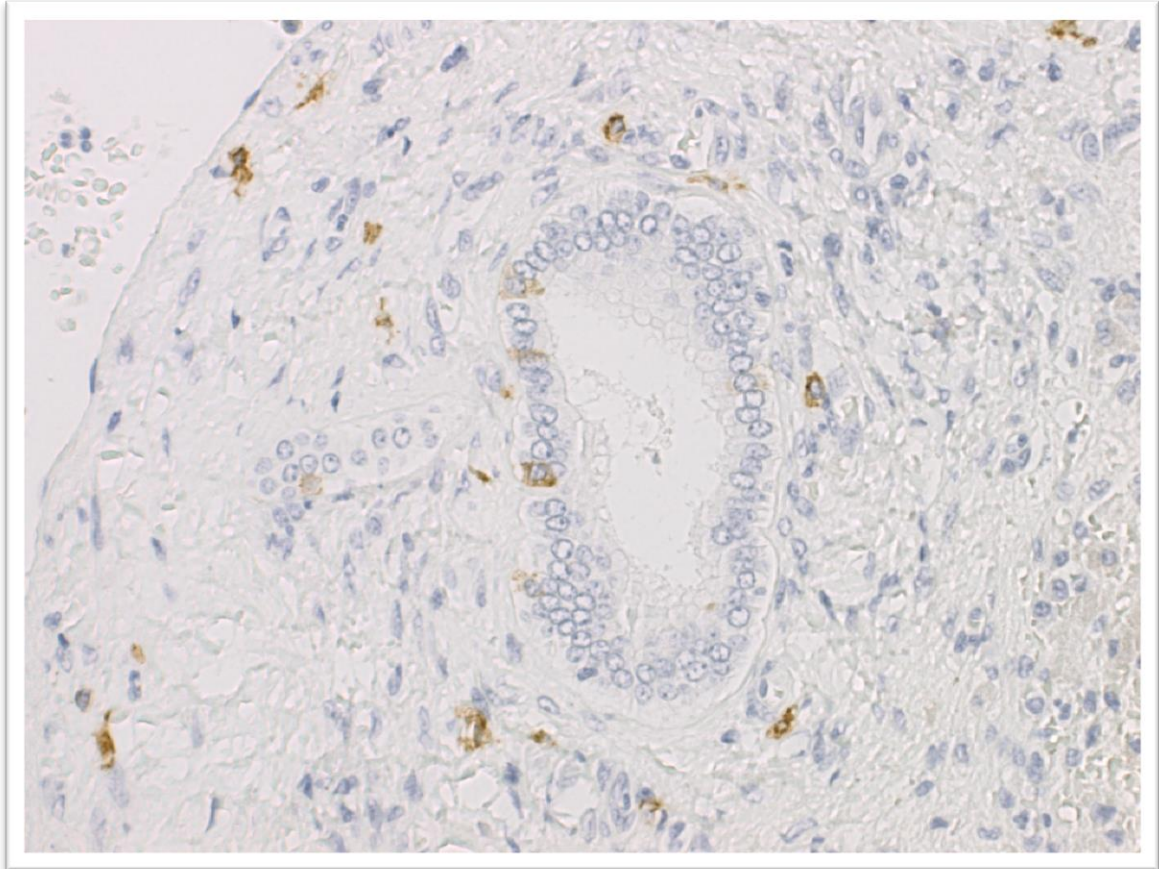
Los datos recogidos del ImageJ se recogieron en dos tablas de Excel, en las que se incluían el nombre que identifica las muestras, el grupo al que pertenecían, el porcentaje de área teñida para c-kit y SCF, en cada tabla. En el propio Excel se calculó la media de los porcentajes de área teñida en las imágenes para c-kit y SCF para cada paciente.

Para el análisis estadístico de los datos primeramente se realizó un análisis descriptivo para cada variable a estudio. Posteriormente se analizó la normalidad de las variables mediante el Test de Komolgorov-Smirnov. La comparación de medias entre grupos independientes se realizó, en los casos para dos grupos con el test de Kruskal Wallis. Para las variables que siguieron distribución normal se usó el test ANOVA, con contrastes a posteriori (post hoc) y test de t. El nivel de significación estadística se estableció para un p valor menor a 0,05. Todos los análisis se llevaron a cabo mediante el paquete estadístico SPSS.



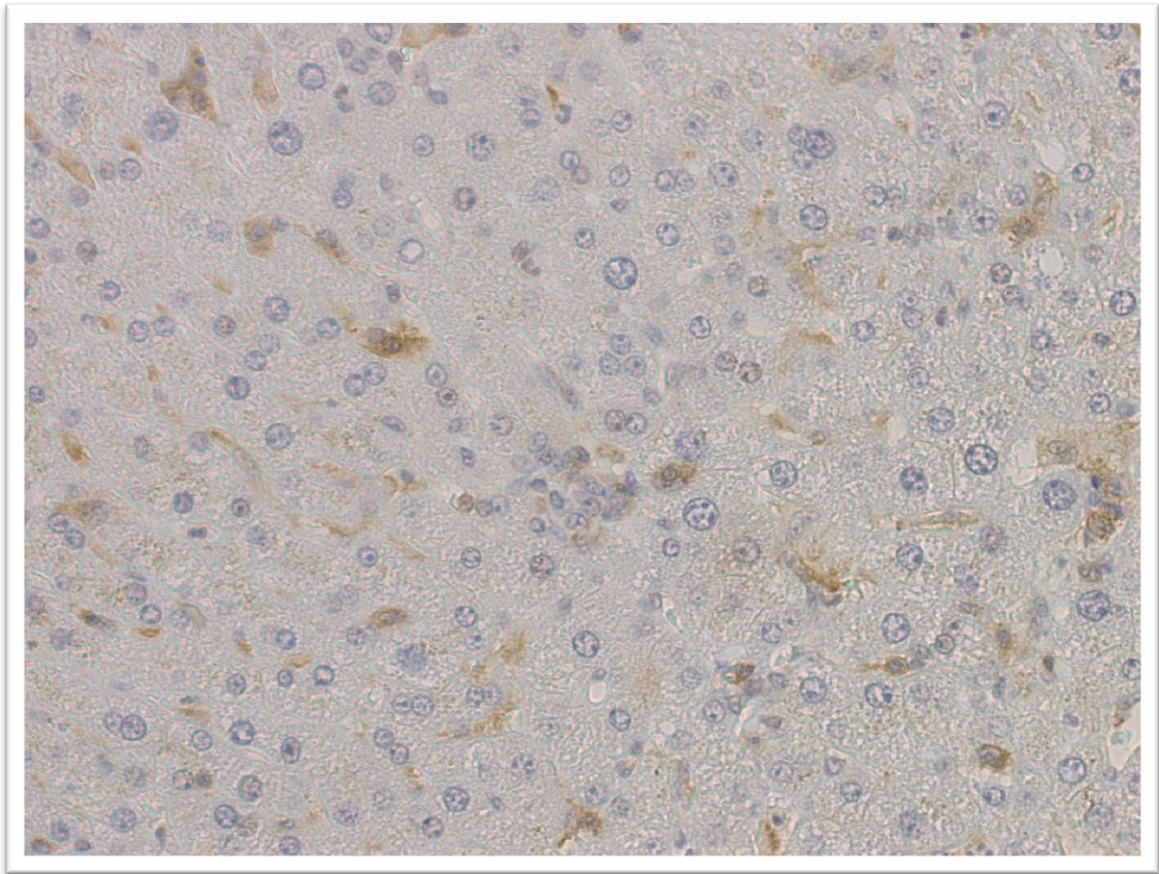
## 5. RESULTADOS

El patrón de tinción celular del anticuerpo contra el CD117, c-kit fue membranal y citoplasmático. Podemos verlo en la siguiente imagen (Figura 4) donde aparecen diferentes células teñidas a nivel de membrana y citoplasma.



**Figura 4. Corte histológico de hígado de paciente con hepatopatía crónica. Tinción celular del anticuerpo contra el CD117 o c-kit (marrón), x20.**

El patrón de tinción celular del anticuerpo contra SCF, es citoplasmático. Se puede comprobar en la siguiente imagen (Figura 5).



**Figura 5. Corte histológico de hígado de paciente con hepatopatía aguda. Tinción celular del anticuerpo contra SCF (marrón). Visión en x20 aumentos. Imagen obtenida de del grupo de Patología Digestiva del IIS Aragón.**

En la siguiente tabla (Tabla 1) aparecen los datos descriptivos de cada variable que se estudió. El número de pacientes estudiados para c-kit fue un total de 21 que se dividieron en agudos (8), crónicos (7) y controles (6). En el caso del estudio de SCF el número de pacientes totales fueron 17 que se dividieron también en agudos (5), crónicos (6) y controles (6).

El porcentaje de área que marcaba para c-kit fue mayor en pacientes con enfermedad hepática crónica frente a pacientes con hepatopatía aguda (Figura 6), siendo en pacientes con enfermedad hepática crónica (Figura 9) de  $0,29 \pm 0,065$  % y para pacientes con hepatopatía aguda (Figura 8) de  $0,13 \pm 0,018$  %. Presentaron diferencias significativas entre sí ( $p < 0,05$ ).

También el porcentaje de área que marcaba para c-kit fue mayor en pacientes con enfermedad hepática crónica frente a individuos sanos (Figura 6), siendo en pacientes con enfermedad hepática crónica (Figura 9) de  $0,29 \pm 0,065$  % y para individuos sanos (Figura 10) de  $0,12 \pm 0,036$  %. Estos grupos presentaron también diferencias significativas entre sí ( $p < 0,05$ ).

Por otra parte, el área teñida por c-kit no difirió significativamente entre las muestras procedente de pacientes con hepatopatía aguda y aquellas procedentes de individuos sanos (grupo control) (Figura6), siendo en pacientes con hepatopatía aguda (Figura 8) de  $0,13 \pm 0,018$  % y para individuos sanos (Figura 10) de  $0,12 \pm 0,036$  % ( $p>0,05$ ). Con estos datos podemos decir que el grupo que presentó más superficie teñida fue el de pacientes con enfermedad hepática crónica, con una media superior a más del doble que la media de pacientes con hepatopatía aguda y la de los individuos sanos.

**Tabla 1. N, media y error estándar (e.e.) de c-kit y SCF para cada grupo a estudio.**

<b>Grupo</b>	<b>Medición (% área)</b>	<b>c-kit</b>	<b>SCF</b>
<b>Agudo</b>	Media $\pm$ e.e.	<b><math>0,13 \pm 0,018</math></b>	<b><math>0,22 \pm 0,068</math></b>
	N	<b>8</b>	<b>5</b>
<b>Crónico</b>	Media $\pm$ e.e.	<b><math>0,29 \pm 0,065</math></b>	<b><math>0,26 \pm 0,030</math></b>
	N	<b>7</b>	<b>6</b>
<b>Control</b>	Media $\pm$ e.e.	<b><math>0,11 \pm 0,035</math></b>	<b><math>0,28 \pm 0,054</math></b>
	N	<b>6</b>	<b>6</b>

El porcentaje del área teñida por SCF no fue significativamente ( $p>0,05$ ) diferente en los pacientes con enfermedad hepática crónica frente a los pacientes con hepatopatía aguda (Figura 7), siendo en los pacientes con enfermedad hepática crónica (Figura 12) de  $0,26 \pm 0,031$  % y para los pacientes con hepatopatía aguda (Figura 11) de  $0,22 \pm 0,068$  %.

El área teñida por SCF no fue significativamente ( $p>0,05$ ) diferente en los pacientes con enfermedad hepática crónica frente a los individuos sanos (Figura 7), siendo en pacientes con enfermedad hepática crónica (Figura 12) de  $0,26 \pm 0,03$  % y para individuos sanos (Figura 13) de  $0,28 \pm 0,054$  %. Su nivel de significación es 0,782 ( $p\geq 0,05$ ), se interpreta como que no hay diferencias significativas entre pacientes con enfermedad hepática crónica e individuos sanos para SCF.

El área teñida por SCF no fue significativamente diferente en los pacientes con hepatopatía aguda frente a individuos sanos (Figura 7), siendo en pacientes con hepatopatía aguda (Figura 11) de  $0,22 \pm 0,068$  % y para individuos sanos (Figura 13) de  $0,28 \pm 0,054$  %. Su nivel de significación es 0,532 ( $p\geq 0,05$ ), este dato se interpreta como que no hay diferencias significativas entre pacientes con hepatopatía aguda e individuos sanos para SCF.

A continuación y a partir de los datos obtenidos y estudiados en SPSS, se muestran dos gráficos, uno para c-kit (Figura 6) y otro para SCF (Figura 7). Ambos muestran en el eje de ordenadas el porcentaje de área teñida y en el eje de abscisas los tres grupos estudiados (Grupo Agudos, Grupo Crónicos y Grupo Control). También se ha representado el error estándar de cada variable.

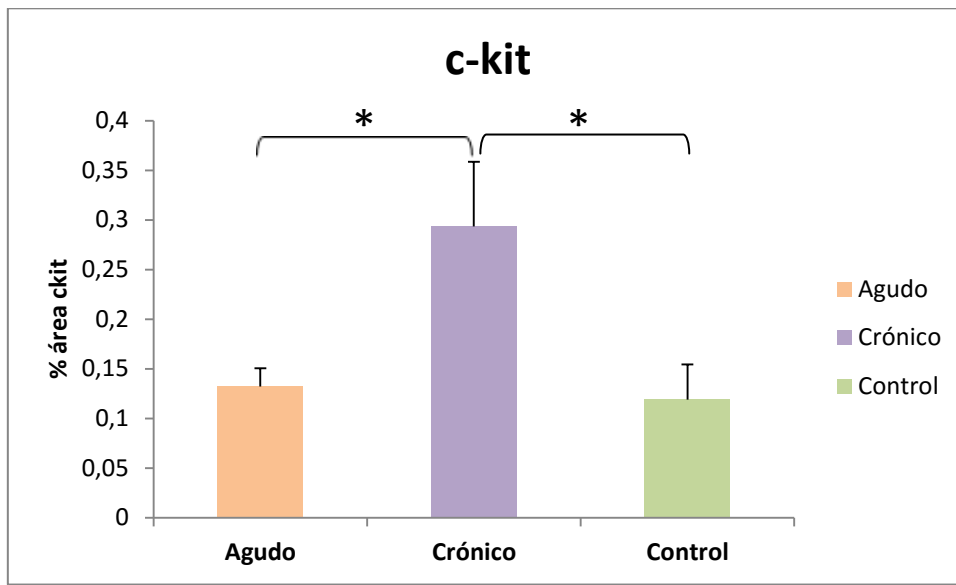


Figura 6. Porcentajes de áreas marcadas de c-kit en los distintos grupos a estudio y error típico.

\* ( $p < 0,05$ )

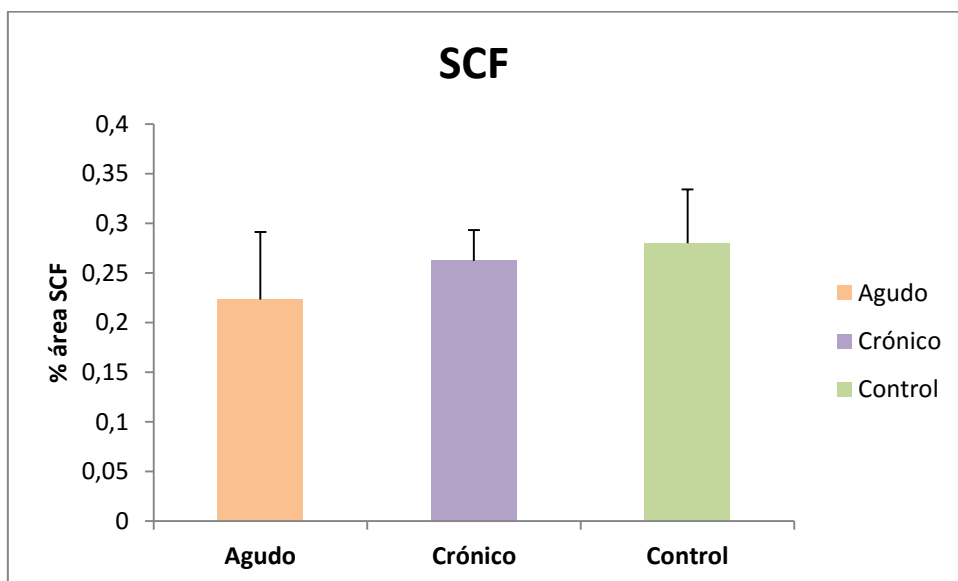
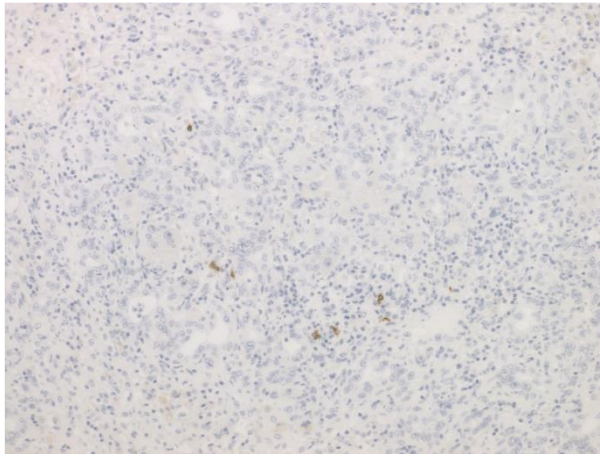
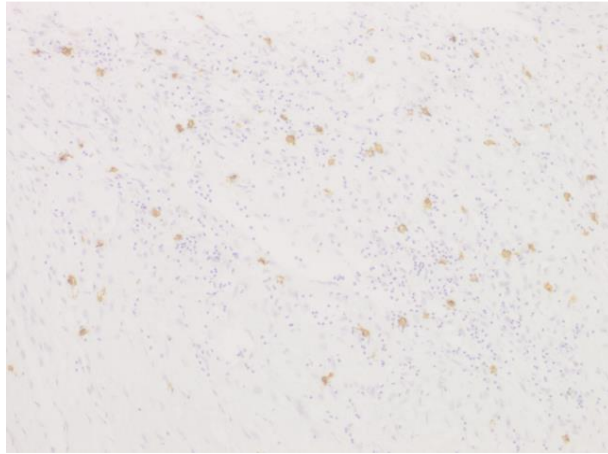


Figura 7. Porcentajes de áreas marcadas de SCF en los distintos grupos a estudio y error típico.

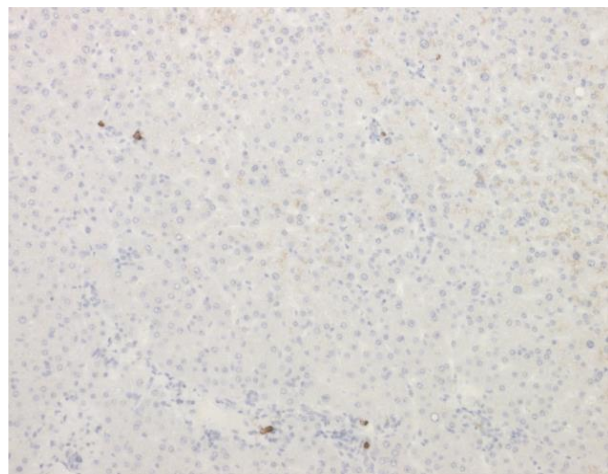




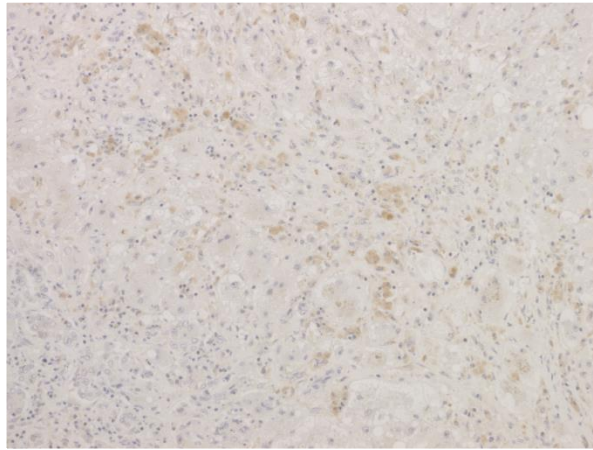
**Figura 8. Corte histológico de hígado de paciente del Grupo Agudos con tinción para c-kit, x10.**



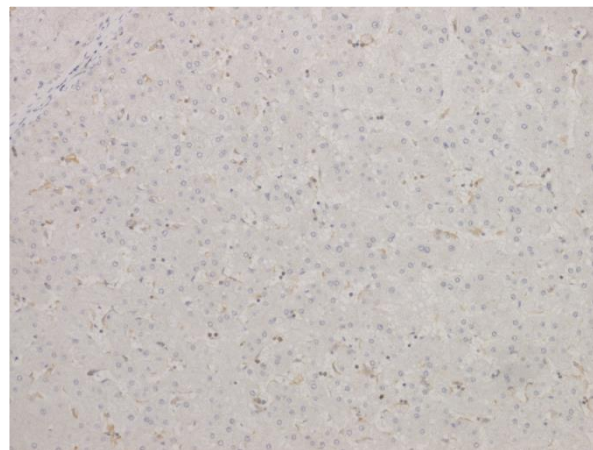
**Figura 9. Corte histológico de hígado de paciente con enfermedad hepática crónica. Tinción para c-kit, x10.**



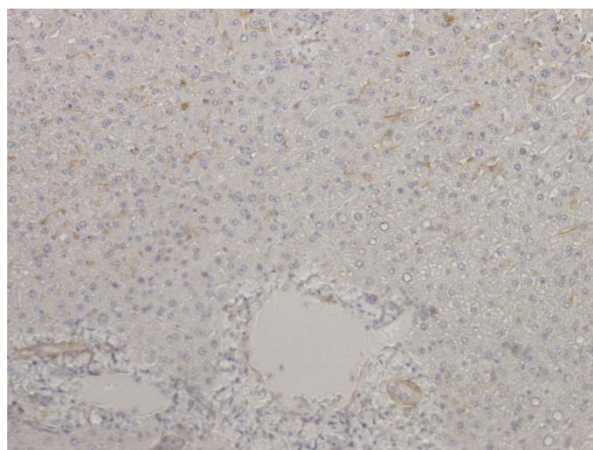
**Figura 10. Corte histológico de hígado de individuo sano con tinción para c-kit, x10.**



**Figura 11. Corte histológico de hígado de paciente con enfermedad hepática aguda con tinción para SCF, x10.**



**Figura 12. Corte histológico de hígado de paciente con enfermedad hepática crónica con tinción para SCF, x10.**



**Figura 13. Corte histológico de hígado de individuo sano con tinción para SCF, x10.**

En los cortes teñidos para c-kit, observamos que en las imágenes de pacientes con enfermedad hepática crónica (Figura 8) hay más superficie teñida que en las imágenes de pacientes con hepatopatía aguda (Figura 9) y en imágenes de individuos sanos (Figura 10). También vemos la similitud de superficie teñida para pacientes con hepatopatía aguda e individuos sanos.

En los cortes teñidos para SCF, vemos en las imágenes que tanto para pacientes con enfermedad hepática crónica (Figura 11), pacientes con hepatopatía aguda (Figura 12) e individuos sanos (Figura 13) la superficie teñida es similar.

## 6. DISCUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos podemos decir que no se encontraron diferencias significativas para SCF entre los diferentes grupos de pacientes (crónicos, agudos y sanos).

En cambio, para c-kit, sí se obtuvieron datos significativamente diferentes comparando agudos con crónicos, y crónicos frente a controles. De los resultados obtenidos se deduce por tanto, que c-kit se expresa más en hígado con enfermedad crónica que en hepatopatía aguda y que en individuos sanos.

En estudios previos en los que se estudió la función de SCF y c-kit<sup>28</sup>, observaban su rol en la respuesta celular en enfermedad aguda o crónica hepática. Se vio que la expresión de mRNA de c-kit se encontraba elevada en fallo hepático agudo, aunque los niveles variaban entre los diferentes pacientes. En la enfermedad crónica, la expresión de mRNA de c-kit era similar a la encontrada en hígados sanos de donantes. Mientras que en ambos grupos (agudos y crónicos) se encontraron células positivas para c-kit en áreas portales y septos fibróticos. Estos hallazgos sugirieron que c-kit puede estar involucrado en la respuesta celular regenerativa en daño hepático en humanos.

Los resultados de *Pereira et al.*, en contraposición a los obtenidos en este estudio, encontraban la expresión de mRNA de c-kit más elevado en pacientes con fallo hepático agudo, y nosotros hemos observado que c-kit se expresa más en pacientes con enfermedad hepática crónica. . Estas diferencias entre estudios, pueden deberse en parte a que el estudio de *Pereira et al.* analiza la expresión de c-kit a nivel de mRNA y no de la proteína expresada como en nuestro caso, lo que implica que un aumento de mRNA no tienen por qué traducirse directamente en una mayor expresión a nivel de la proteína

Un estudio previo demostró que SCF es inducido en la activación temprana de las células ovas. Los precursores de células ovas expresan tanto SCF como c-kit, sugiriendo que pueden intervenir en un mecanismo autocrino, aunque el rol preciso de este sistema receptor-ligando en la regeneración hepática no es del todo claro<sup>29</sup> (Figura 14).



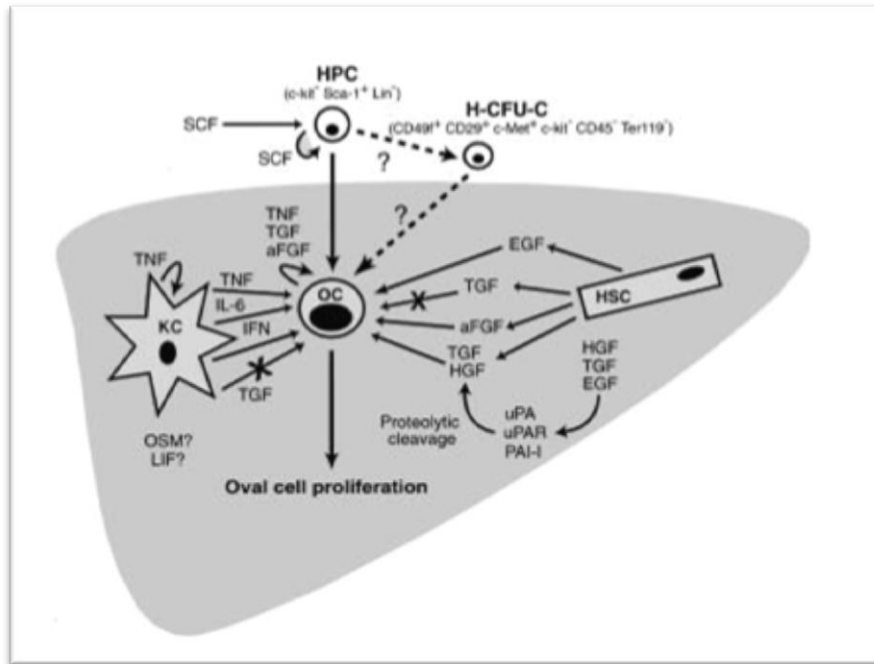


Figura 14. El daño hepatocelular inicia una respuesta inmune en hígado, que da lugar a la secreción de una mezcla compleja de citoquinas y quimioquinas. Estas señales promueven la infiltración y/o expansión de las células de Kupffer y las células hepáticas estrelladas. Cuando la regeneración hepática se encuentra bloqueada, las células progenitoras hepáticas son reclutadas de médula ósea a través de quimioatrayentes, como el SCF.

SCF y su receptor, c-kit, juegan un rol fundamental en supervivencia, proliferación, diferenciación y migración de células madre y pueden afectar similarmente a las células ovas. En un estudio <sup>30</sup> con modelos de inducción de células ovas en roedores, se encontraron los siguientes resultados. SCF es inducido tempranamente en la activación de células ovas en ratones a los que se les suministró 2-acetilaminofluoreno y se les realizó hepatectomía parcial (2-AAF/PH), pero esto no es observado en ratones a los que se les realizó hepatectomía parcial únicamente <sup>31</sup>.

En este estudio no se han encontrado resultados significativamente diferentes entre los grupos de pacientes para SCF pero en el estudio de Tatematsu *et al.* <sup>30</sup> se encontró que SCF se inducía tempranamente en los ratones 2-AAF/PH, a los que se inducía una hepatopatía crónica. En cambio en los que solamente se realizó hepatectomía parcial, causando un fallo hepático fulminante, SDF no aumentó. Las diferencias entre los dos estudios radican en que el de Tatematsu *et al.* <sup>30</sup> se realizó con ratones. También hay que resaltar que al realizar una hepatectomía parcial se provoca un fallo hepático fulminante y en este estudio el grupo de agudos presentaba una hepatopatía aguda.

La inducción de células ovals en ratas Ws/Ws (White spotting on the skin) es significativamente suprimida, en las cuales la señalización de c-kit está severamente afectada<sup>32</sup>.

Una vez las células ovals aparecieron en las ratas Ws/Ws, la expresión de las proteínas marcadoras específicas y la respuesta proliferativa de estas células fue similar a los controles. Esto implicó que la señal de transducción mediada por c-kit no es esencial para el fenotipo o proliferación de células ovals. Resultó que el sistema SCF/c-kit juega un papel crucial en la aparición de células ovals, bien regulando el número de células progenitoras hepáticas en hígado o induciendo a éstas la diferenciación en células ovals.

Con los resultados del estudio de Matsuka *et al.*<sup>30</sup>, se concluye que hay más factores que intervienen en la proliferación de células ovals y migración de CSMO, tales como VGF, SDF-1, HGF.

El modelo de regeneración hepática mediada por células ovals propuesto por estudios previos<sup>31</sup> es el siguiente. Después de que el daño hepático sea producido, el hígado inicia una respuesta inmune, secretando una cascada de citoquinas. Estas señales promueven la infiltración de células de Kupffer y células estrelladas al área dañada, y en situaciones donde la regeneración hepática está bloqueada, las células progenitoras hepáticas pueden ser reclutadas de médula ósea mediante la liberación de quimioatrayentes como SCF. Las células hepáticas progenitoras migran a hígado e infiltran los lóbulos a través de los canales de Hering. Estas células hepáticas progenitoras dan lugar a las células ovals, que responden a las diferentes citoquinas liberadas por las células de Kupffer y las células estrelladas.

En este trabajo se ve como c-kit se expresa más en enfermedad hepática crónica que en aguda o hígado sano. Se podría decir, basado en otros estudios, que c-kit, al ser receptor de SCF, promueve la regeneración hepática a través del reclutamiento de células madre de médula ósea, aumentando la población de células ovals y diferenciándose a hepatocitos.

Teniendo en cuenta que c-kit es marcador tanto de célula progenitora hepática como de célula hematopoyética, se podría decir que una mayor expresión de c-kit en los enfermos crónicos supondría una mayor presencia o proliferación de uno u otro tipo de célula en este tipo de enfermedad. Un daño continuado en el tiempo llevaría al agotamiento de la capacidad regenerativa de los hepatocitos, bien porque ya no pueden proliferar más o bien porque el daño celular es tal que no pueden llegar a cabo dicha función.

Llegados a este punto, en el que la capacidad regenerativa de los hepatocitos es insuficiente, el aumento de la presencia de c-kit en hígado significaría la activación y proliferación de células ovasales o bien el reclutamiento o "homing" de células madre hematopoyéticas de médula ósea.

Existe una relación entre el sistema hematopoyético y el hígado que apoyaría el origen extrahepático de células progenitoras hepáticas. Los marcadores clásicos hematopoyéticos (Thy-1, c-kit y CD34) se expresan en la superficie de células ovasales. Adicionalmente, el trasplante de médula ósea de células madre hematopoyéticas purificadas (c-kit+, Lin- y Sca-1+) salvó a ratones con deficiencia de fumarilacetoacetato, un modelo animal con tirosinemia fatal hereditaria tipo 1. Los trasplantes de médula ósea e hígado entre géneros o entre razas de ratones han identificado células de médula ósea capaces de repoblar el hígado.

Estos resultados han sido respaldados por estudios humanos, obteniendo biopsias de hígado de receptores trasplantes terapéuticos de médula ósea de género cruzado, quienes más tarde desarrollaron daño hepático crónico debido a enfermedad recurrente.

El análisis para la presencia del cromosoma Y en células de hepáticas mostraron que las células derivadas de médula ósea daban lugar a hepatocitos solamente, o bien hepatocitos y colangiocitos.

Alison *et al.*<sup>25</sup> encontró una frecuencia relativamente baja de hepatocitos positivos para el cromosoma Y (0,5-2%), mientras que Theise *et al.* encontró que, incluso en mild condiciones, había un engraftment significativo (5-21% para hepatocitos y 4-18% para colangiocitos).

Por otra parte, en casos de daño severo, Theise *et al.*<sup>24</sup> encontró que hasta el 64% de hepatocitos periportales y el 38% de colangiocitos, eran derivados de donante. Así, las células hematopoyéticas son capaces de migrar a hígado y diferenciarse en hepatocitos tanto en ratones como en humanos; aun así el rol concreto de estas células permanece desconocido.

El origen de las células ovasales sigue siendo un tema controvertido y serían necesarios más estudios para discernir si el marcaje de c-kit es de célula oval o de célula hematopoyética.

Sell *et al.*<sup>32</sup> planteó una hipótesis en la que hay tres niveles de células proliferativas en hígado. Éstas son: el hepatocito maduro; una célula madre determinada del tejido, originada endógenamente en el hígado adulto en los ductos biliares terminales; y una célula madre multipotente, que puede ser derivada exógenamente de células madre de médula ósea circulantes. La relación directa que une células madre hepáticas derivadas de médula ósea y/o

“hepatic colony-forming unit in culture” (H-CFU-C’s) y células ovales no ha sido definitivamente probada.

Al no encontrarse diferencias en SCF para los diferentes grupos, y no coincidir con las variaciones en c-kit, podemos decir que no están asociadas a la expresión de dicho factor y que otros mecanismos podrían estar implicados.

También convendría estudiar qué otras vías intervienen en las variaciones de SCF, ya que no varían junto con c-kit.

Recientemente se han publicado estudios preliminares mediante la infusión de factores de crecimiento de médula ósea (factor estimulante de granulocitos; G-CSF) en pacientes con el síndrome de insuficiencia aguda sobre crónica, y con la infusión de células progenitoras de médula ósea (CD133) en hepatopatías crónicas con fines regenerativos (96-99). Los resultados clínicos, al igual que ha ocurrido en otros órganos sólidos (corazón, páncreas, intestino), sugieren que la regeneración tisular es un proceso más complejo y dependiente de la cooperación específica entre diferentes estirpes celulares<sup>33, 34, 35, 36</sup>.

## 7. CONCLUSIONES

1- La expresión de c-kit en el grupo de crónicos es significativamente más elevada que en el grupo de pacientes con hepatopatía aguda y el de individuos sanos. Esto sugiere que en las hepatopatías crónicas tienen lugar procesos de reclutamiento de células hematopoyéticas u activación de células ovas.

2- La diferencia no significativa entre el grupo de agudos y controles nos lleva a pensar que en el caso de los agudos, el daño puede suplirse con la replicación de los hepatocitos y no se lleva a cabo activación y proliferación de células ovas o migración de células madre de médula ósea.

3- La expresión de SCF no presentó diferencias significativas entre ninguno de los tres grupos. Esto sugiere que la variación de la expresión de c-kit es independiente de SCF y que deben intervenir otras vías que convendría estudiar.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Morgan DO. The cell cycle. En: Morgan DO, editor. The cell cycle: Principles of control. London: *New Science Press*; 2007. p. 1-9.
2. Satyanarayana A, Geffers R, Manns MP, Buer J, Rudolph KL. Gene expression profile at the G1/S transition of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Cell Cycle* 2004;3:1405-17.
3. Chauhan A, Lorenzen S, Herzel H, Bernard S. Regulation of mammalian cell cycle progression in the regenerating liver. *J Theor Biol* 2011;283:103-12.
4. Duncan AW. Aneuploidy, polyploidy and ploidy reversal in the liver. *Semin Cell Dev Biol* 2013;24:347-56.
5. Fausto N. Lessons from genetically engineered animal models. V. Knocking out genes to study liver regeneration: present and future. *Am J Physiol* 1999;277:G917-21.
6. Mitchell C, Gilgenkrantz H. Transcriptional profiling of liver regeneration: New approaches to an old trick! *J Hepatol* 2003;38:847-9.
7. Fukuhara Y, Hirasawa A, Li XK, Kawasaki M, Fujino M, Funeshima N, *et al.* Gene expression profile in the regenerating rat liver after partial hepatectomy. *J Hepatol* 2003;38:784-92.
8. Kurinna S, Barton MC. Hierarchies of transcriptional regulation during liver regeneration. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2010;97:201-27.
9. Locker J, Tian J, Carver R, Concas D, Cossu C, Ledda-Columbano GM, *et al.* A common set of immediate-early response genes in liver regeneration and hyperplasia. *Hepatology* 2003;38:314-25.
10. Akhurst, B., E.J.Croager, C.A.Farley-Roche, J.K.Ong, M.L.Dumble, B.Knight, and G.C.Yeoh. 2001. A modified choline-deficient, thionine-supplemented diet protocol effectively induces oval cells in mouse liver. *Hepatology* 34:519-522.
11. Alison, M.R., and M.J.Lovell. 2005. Liver cancer: the role of stem cells. *Cell Prolif.*38:407-421.
12. Petersen BE, Goff JP, Greenberger JS, Michalopoulos GK. Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. *Hepatology.* 1998;27:433–445.
13. Crosby HA, Kelly DA, Strain AJ. Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium. *Gastroenterology.* 2001;120:534–544.
14. Petersen B, Grossbard B, Hatch H, Pi L, Deng J, Scott EW. Mouse A6 positive hepatic oval cells also express several hematopoietic stem cell markers. *Hepatology.* 2003;37:632–640.

15. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 1999;284:1168–1170.
16. Wang X, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:11881–11888.
17. Menthena A, Deb N, Oertel M, Grozdanov PN, Sandhu J, Shah S, Guha C, Shafritz DA, Dabeva MD. Bone marrow progenitors are not the source of expanding oval cells in injured liver. *Stem Cells*. 2004;22:1049–1061.
18. Thorgeirsson S, Grisham J. Hematopoietic cells as liver epithelial stem cells: a critical review of all the evidence. *Hepatology*. 2006;43:2–11.
19. Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:836-47.
20. Adams GB, and Scadden DT (2006) The hematopoietic stem cell in its place. *Nat Immunol* 7, 333-337.
21. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, *et al*. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-70.
22. Theisse ND, Badve S, Saxena R, *et al*. Derivation of hepatocytes from bone-marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000; 31: 235-40.
23. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, *et al*. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Med* 2000; 6: 1229-34.
24. Theisse ND, Nimmakayalu M, Gardner R, *et al*. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-6.,
25. Alison MR, Poulson R, Jeffery R, *et al*. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406: 257
26. Ferrari G, Cusella G, Angelis D, *et al*. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-30.
27. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; 401: 390-4.
28. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, *et al*. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4857-61.
29. Baumann U, Crosby HA, Ramani P, Kelly DA, Strain AJ. Expression of the Stem Cell Factor Receptor c-kit y Normal and Diseased Pediatric Liver: Identification of a Human Hepatic Progenitor Cell? *Hepatology*, 1999.

- 30.** Tatematsu M, Kaku T, Medline A, Farber E. Intestinal metaplasia is a common option of oval cells in relation to cholangiofibrosis in liver of rats exposed to 2-acetylaminofluorene. *Lab. Invest.* 1985; 143: 1606-20.
- 31.** Fuijo K, Evarts RP, Hu Z, Marsden ER, Thorgeirsson SS. Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, during liver regeneration from putative stem cells in adult rat. *Lab. Invest.* 1994; 70: 511-16.
- 32.** Matsuka S, Tsujimura T, Toyosaka A *et al.* Role of c-kit receptor tyrosine kinase in development of oval cells in the rat 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy model. *Hepatology* 1999; 29: 670-6.
- 31.** Lowes KN, Croager EJ, Olynyk JK, Abraham LJ, Yeoh GCT. Oval cell-mediated liver regeneration: Role of cytokines and growth factors. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2003.
- 32.** Sell S. Is there a liver stem cell? *Cancer Res.* 1990 Jul 1;50(13):3811–3815.
- 33.** Van der Flier LG, Clevers H. stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 2009;71:241-60.
- 34.** Mertsching H, schanz J, steger V, schandar M, schenk M, Hansmann J, et al. Generation and transplantation of an autologous vascularized bioartificial human tissue. *Transplantation* 2009;88:203-10.
- 35:** Orlando G, Wood KJ, stratta RJ, Yoo JJ, Atala A, soker s. Regenerative medicine and organ transplantation: Past, present, and future. *Transplantation* 2011;91:1310-7.
- 36.** Zaret Ks, Grompe M. Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *Science* 2008;322:1490-4.



## 9. ANEXOS

### 9.1 RECUENTO DE CÉLULAS TEÑIDAS

Una vez se seleccionaron las imágenes más teñidas de cada paciente se procedió al recuento de células teñidas. Para ello se utilizó un programa informático llamado ImageJ.

Se abrieron las imágenes con el programa ImageJ

El primer paso era sustraer el fondo de la imagen para hacer el contraste de la tinción más evidente.

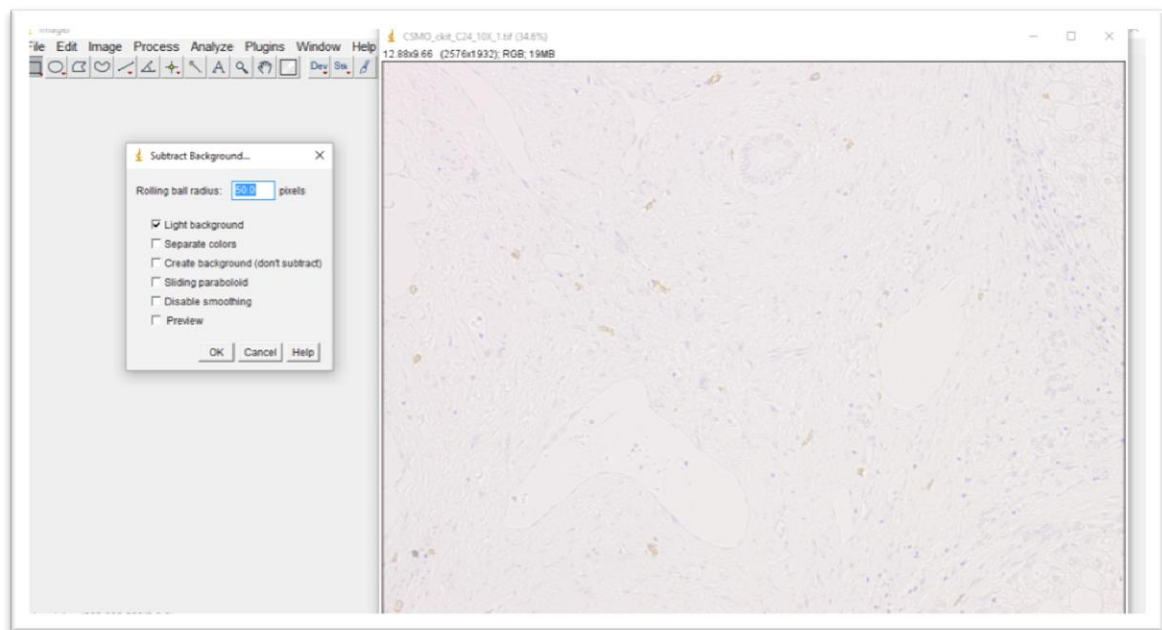


Figura 15. Programa ImageJ. Paso: Sustraer el fondo de la imagen.

El siguiente paso era añadir un filtro y ajustar los límites de la imagen: matiz, contraste y luminosidad para seleccionar las zonas teñidas.

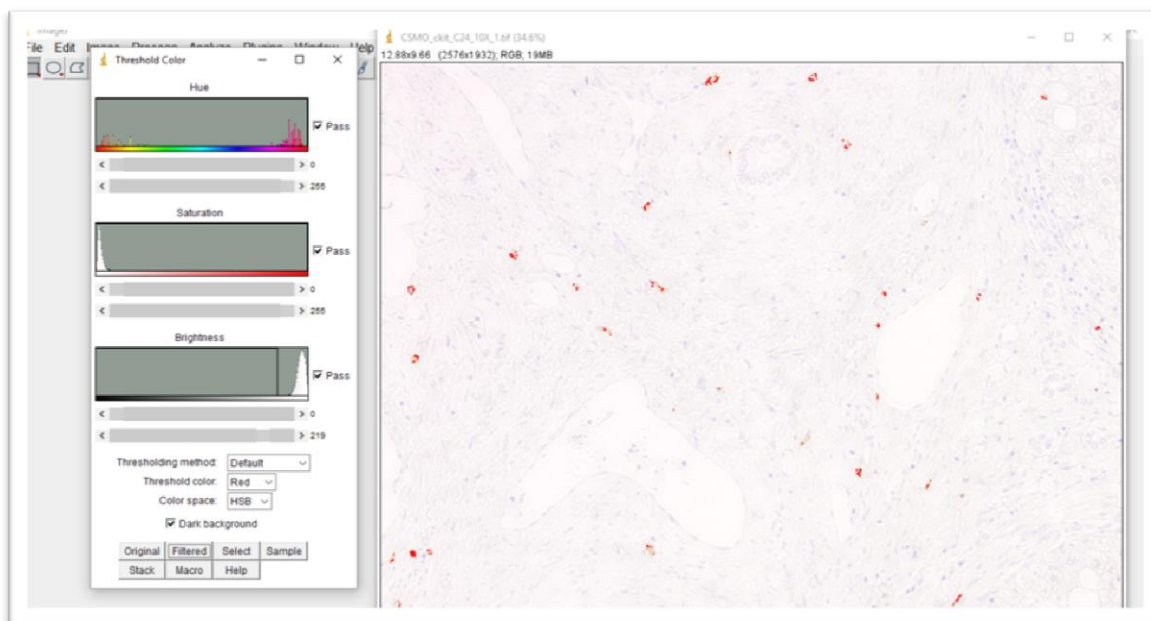


Figura 16. Programa ImageJ. Paso: Añadir filtro y ajustar matiz, contraste y luminosidad.

Después de la selección se midió el área seleccionada y se pasaron los datos a un documento Excel.

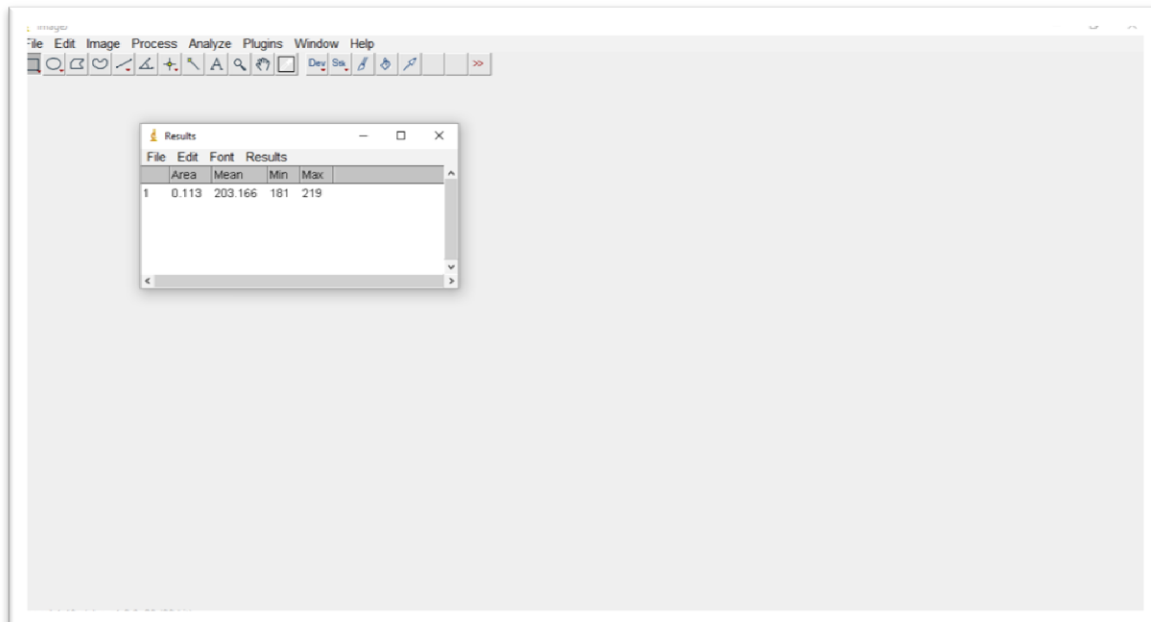


Figura 17. Programa ImageJ. Paso: medición del área seleccionada.