

Francisco Javier Aranguren García

Papel de progenitores de médula ósea en la regeneración hepática

Departamento
Medicina, Psiquiatría y Dermatología

Director/es
Serrano Aullo, Trinidad
Solanas Villacampa, Estela María

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

**PAPEL DE PROGENITORES DE MÉDULA ÓSEA EN
LA REGENERACIÓN HEPÁTICA**

Autor

Francisco Javier Aranguren García

Director/es

Serrano Aullo, Trinidad
Solanas Villacampa, Estela María

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Medicina, Psiquiatría y Dermatología

2019



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

Papel de progenitores de médula ósea en la
regeneración hepática

Autor

Francisco Javier Aranguren García

Directoras

María Trinidad Serrano Aulló
María Estela Solanas Villacampa

Facultad de Medicina
Año 2019

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	3
RESUMEN.....	5
PALABRAS CLAVE.....	6
ABSTRACT.....	7
KEY WORDS.....	8
1. MARCO TEÓRICO	9
1.1 ENFERMEDAD HEPÁTICA AGUDA	10
1.2 CIRROSIS HEPÁTICA.....	11
1.3 FALLO HEPÁTICO AGUDO SOBRE CRÓNICO (ACLF)	13
1.4 PROCESO DE REGENRACIÓN HEPÁTICA	14
1.5 CÉLULAS PROGENITORAS HEPÁTICAS.....	17
1.6 CÉLULAS STEM VS CÉLULAS PROGENITORAS	18
1.7 CÉLULAS STEM HEMATOPOYÉTICAS.....	18
1.8 CÉLULAS MESENQUIMALES.....	21
1.9 MOVILIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE DE MÉDULA ÓSEA HACIA EL HÍGADO.....	22
1.10 MIGRACIÓN Y ANIDACIÓN DE CÉLULAS STEM	24
1.10.1 HEPATOCYTE GROWTH FACTOR.....	25
1.10.2 EJE SDF1-CXCR4	25
1.10.3 SISTEMA SCF-CKIT	26
1.10.4 IL-6.....	27
1.10.5 ANGIOGÉNESIS.....	27
1.10.6 MATRIZ EXTRACELULAR	28
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	30
3. OBJETIVOS GENERALES	30
4. MATERIAL Y MÉTODOS	31
4.1 DISEÑO DEL ESTUDIO.....	31
4.2 VARIABLES CLÍNICAS	33
4.3 CITOMETRÍA DE FLUJO	33
4.4 INMUNOHISTOQUÍMICA.....	34
4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
5. RESULTADOS.....	37
6. DISCUSIÓN	54
7. CONCLUSIONES.....	64

8. BIBLIOGRAFÍA	65
9. ANEXOS	77

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Figura 1. Proceso de regeneración hepática.	16
Figura 2. Proceso de movilización de CSMO.....	24
Figura 3. Diseño del estudio	32
Figura 4. Citómetro de flujo.....	34
Figura 5. Causas de hepatitis aguda.....	37
Figura 6. Citometría de flujo. Porcentaje de células marcadas para cada anticuerpo. Comparación entre grupo de hepatitis aguda y grupo control	42
Figura 7. Niveles medios y error estándar de la media de HGF, SDF1, SCF y PDGF en sangre periférica en pacientes con hepatitis aguda (pg/ml)	43
Figura 8. Niveles medios y error estándar de la media de VEGF, IL-8 y MMP9 en sangre periférica en pacientes con hepatitis aguda (pg/ml)	44
Figura 9. Valores medios y error estándar de la media de HGF y VEGF en sangre periférica y de venas suprahepáticas en pacientes con afectación hepática aguda	44
Figura 10. Tinción frente a CD 34. A: Hepatitis aguda. B: Cirrosis. C: Control	45
Figura 11. Tinción frente a ckit. A: Hepatitis aguda. B: Cirrosis. C: Control.....	45
Figura 12. Tinción frente a SCF. A: Hepatitis aguda. B: Cirrosis. C: Control.....	46
Figura 13. Porcentaje de células marcadas para cada anticuerpo (media \pm error estándar de la media). Comparación entre grupo de cirrosis y grupo control	46
Figura 14. Niveles medios y error estándar de la media de HGF, SDF1, SCF y PDGF en sangre periférica en pacientes con cirrosis hepática	47
Figura 15. Niveles medios y error estándar de la media de VEGF, IL8 , IL6 y MMP9 en sangre periférica en pacientes con cirrosis hepática	48
Figura 16. Valores medios y error estándar de la media de HGF, SCF y SDF1 en sangre periférica y de venas suprahepáticas en pacientes con cirrosis hepática	49
Figura 17. Valores medios y error estándar de la media de VEGF, IL-6 e IL-8 en sangre periférica y de venas suprahepáticas en pacientes con cirrosis hepática	49
Figura 18. Porcentajes de áreas marcadas de c-kit en los distintos grupos a estudio y error típico.....	50
Figura 19. Porcentajes de áreas marcadas de SCF en los distintos grupos a estudio y error típico.....	51
Tabla 1. Características clínicas de los pacientes incluidos en el grupo de hepatitis aguda	38
Tabla 2. Características clínicas de los pacientes incluidos en el grupo de cirrosis hepática descompensada	39

Tabla 3. Características clínicas de los pacientes con ACLF	40
Tabla 4. Variables clínicas medias.....	40
Tabla 5. Características demográficas de los individuos incluidos en el grupo control	41
Tabla 6. Inmunohistoquímica. N, media y desviación estándar (e.e) de c-kit y SCF para cada grupo a estudio	51
Tabla 7. Niveles medios de citoquinas en sangre periférica (pg/ml) ± EEM	53

ABREVIATURAS

- AA: Ali-alcohol.
- AAF: Acetil-aminofluoreno.
- ACLF: *Acute on Chronic Liver Failure*.
- α FP: α -fetoproteína.
- ALT: Alanina aminotransferasa.
- AST: Aspartato aminotransferase.
- CCl4: tetracloruro de carbono.
- CK19: Citoqueratina-19.
- CPH: Células progenitoras hepáticas.
- CS: Célula *stem*.
- CSH: Célula *stem* hematopoyéticas.
- CSM: Célula *stem* mesenquimales.
- CSMO: Células *stem* de médula ósea.
- CXCR4: Receptor de quimoquinas tipo 4.
- DILI: *Drug-induced liver injury*.
- DNA: Ácido DesoxirriboNucleico.
- EASL: *European Association for the Study of the Liver*.
- EEM: Error estándar de la media.
- EGF: Receptor del factor de crecimiento epidérmico.
- EGFR: Factor de crecimiento epidérmico.
- F: Femenino.
- FA: Fosfatasa alcalina.
- FAH: Fumarilacetoacetato hidrolasa.
- FCR: Reactivo bloqueante del receptor de Fc.
- FHO: Fallo hepático agudo.
- G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos.
- GGT: Gamma glutamil transpeptidasa.

- HAI: Hepatitis autoinmune.
- HCC: Hepatocarcinoma.
- HGF: Factor de crecimiento hepatocitario.
- HP: Hepatectomía parcial.
- IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo I.
- IHAG: Insuficiencia hepática aguda grave.
- KDR: *Kinase Insert Domain Receptor*.
- IL: Interleuquina.
- INR: *International Normalized Ratio*.
- M: Masculino.
- MARS: *molecular adsorbent recirculating system*.
- MELD: *Model of End-Stage Liver Disease*.
- MMP-9: Metaloproteasa de la matriz 9.
- MO: Médula ósea.
- LPS: Lipopolisacárido.
- PBS: *Phosphate buffer solution*.
- PCR: Proteína C reactiva.
- PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.
- RM: Resonancia magnética.
- ROS: especies reactivas de oxígeno.
- SCF: Factor de células *stem*.
- SDF1: Factor de célula estromal 1.
- TAA: Tioacetamida.
- TC: Tomografía computerizada.
- TIPS: shunt porto-cava transyugular.
- TOH: Trasplante Ortotópico de Hígado.
- TNF- α : Factor de necrosis tumoral α .
- VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.
- VEGFR: Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular.
- VHA: Virus de la hepatitis A.
- VHB: Virus de la hepatitis B.

RESUMEN

En los últimos años se ha demostrado la participación tanto de células progenitoras hepáticas (CPH) como de células *stem* de médula ósea (CSMO) en los procesos de regeneración hepática. Sin embargo, se desconoce el papel de cada tipo celular en la respuesta ante el daño hepático.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la proporción de CSH (células *stem* hematopoyética) y CPH a nivel hepático y en sangre periférica tanto en enfermedad hepática aguda como en crónica y determinar los niveles séricos y la expresión en tejido hepático de los factores de crecimiento que parecen implicados en su activación y migración. Prospectivamente, se recogió sangre periférica de 22 pacientes con hepatitis aguda, 25 con cirrosis hepática, 8 pacientes con fallo agudo sobre crónico (ACLF) y 16 individuos sanos y se determinó mediante citometría de flujo el porcentaje de células positivas para los marcadores CD34, CD133, VEGFR, CXCR4 y cKit. Sobre muestras de suero de los mismos pacientes se determinaron mediante ELISA los niveles de HGF (*hepatocyte growth factor*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*), IL6, IL8, SDF1 (*stromal derived factor*), SCF (*stem cell factor*), MMP9 (metaloproteinasa de la matriz) y PDGF (*platelet derived growth factor*). Sobre muestras de tejido hepático de 8 pacientes con hepatitis aguda grave, de 7 con cirrosis hepática y de 6 individuos sanos, se realizaron tinciones inmunohistoquímicas con anticuerpos específicos anti-CD34, anti-cKit y anti-SCF.

Los pacientes con hepatitis aguda presentaron un mayor porcentaje ($p<0,05$) de precursores hematopoyéticos (CD34+) y endoteliales (VEGFR+) en sangre periférica que los individuos sanos, mientras que en los pacientes con cirrosis hepática y con fallo agudo sobre crónico no se objetivaron diferencias significativas respecto al grupo control. En cuanto a los factores implicados, los niveles séricos de HGF, VEGF, SDF1, IL-6 e IL-8 fueron significativamente superiores ($p<0,05$) en los pacientes con hepatitis aguda y con ACLF frente a los individuos control. En los pacientes con cirrosis, los resultados fueron similares, a excepción de los niveles de VEGF y PDGF que fueron inferiores ($p<0,05$) al de los controles. En el estudio realizado en tejido se detectó un marcado incremento de células CD34+ localizado en los sinusoides hepáticos en los pacientes con hepatitis aguda, que no se detectó en los pacientes con hepatopatía crónica ni en individuos sanos. Los pacientes cirróticos presentaron una mayor expresión ($p<0,05$) de cKit (CPH) en hígado (región periportal) con respecto a los individuos sanos. A nivel de tejido hepático la expresión de SCF fue similar en los 3 grupos.

Los resultados obtenidos sugieren que la implicación de células precursoras en la lesión hepática es distinta según el tipo de lesión. La hepatitis aguda induce, a través de la secreción de una serie de citoquinas, la movilización de precursores hematopoyéticos que parecen participar en la reparación tisular, sobre todo a nivel sinusoidal, mientras que en la hepatopatía crónica se produce un incremento de progenitores hepáticos.

PALABRAS CLAVE

Célula *stem*; hepatitis aguda; cirrosis hepática; regeneración hepática; precursor hematopoyético; precursor endotelial; células progenitoras hepáticas.

ABSTRACT

Last years, it has been demonstrated the participation of both liver progenitor cells (CPH) and bone marrow stem cells (CSMO) in the processes of liver regeneration. However, the role of each cell type in response to liver damage is unknown. The aim of this work was to study the proportion of hematopoietic stem cells (CSH) and CPH in liver tissue and peripheric blood, both in acute and chronic liver disease, and determine the serum levels and the expression in liver tissue of the growth factors implicated in their activation and migration.

Prospectively, peripheric blood was collected from 22 patients with acute hepatitis, 25 with liver cirrhosis, 8 with acute on chronic liver failure (ACLF) and 16 healthy controls, and it was determined with flow citometry the percentage of CD34, CD133, VEGFR, CXCR4, and ckit positive cells. In serum of the same patients it was determined by means of ELISA the levels of HGF (hepatocyte growth factor), VEGF (vascular endotelial growth factor), IL6, IL8, SDF1 (stromal derived factor), SCF (stem cell factor), MMP9 (matrix metalloproteinase) and PDGF (platelet derived growth factor). The expression of SCF, CD34 and ckit was determined by immunohistochemical staining of histological sections of liver biopsies of 8 patients with acute hepatitis, 7 with liver cirrhosis and 6 healthy controls.

The patients with acute hepatitis showed a higher percentage ($p<0,05$) of hematopoietic (CD34+) and endotelial (VEGFR+) precursors in peripheral blood than healthy controls, while in patients with liver cirrhosis and ACLF no significative differences with control group were seen. Regarding to the implicated factors, serum levels of HGF, VEGF, SDF1, IL-6 and IL-8 were significantly higher ($p<0,05$) in patients with acute hepatitis and ACLF than in healthy controls. In patients with liver cirrhosis, the results were similar, except for the levels of VEGF and PDGF that were lower ($p<0,05$) than in controls. In liver tissue, the results showed a higher expression of CD34+ cells in liver sinusoids of patients with acute hepatitis, which was not seen in the other groups. Patients with liver cirrhosis showed, however, a higher expression ($p<0,05$) of ckit (marker of CPH) in periportal area, in comparison with the controls. SCF expression in liver tissue was similar in the three groups.

Our results suggest that the implication of progenitor cells in liver damage is different depending on the type of injury. Acute hepatitis induces, through the secretion of several cytokines, the mobilization of hematopoietic precursors that seem to contribute to tissue repair, overall at sinusoidal level, while in liver cirrhosis there is an increase in liver progenitor cells.

KEY WORDS

Stem cell; acute hepatitis; liver cirrhosis; liver regeneration; hematopoietic precursor; endotelial precursor; liver progenitor cells.

MARCO TEÓRICO

El hígado tiene una amplia gama de funciones, que incluyen la síntesis, el metabolismo, el almacenamiento y la redistribución de aminoácidos, proteínas, carbohidratos, grasas y vitaminas. También desempeña un papel importante en la detoxificación: a través de la eliminación de residuos y de xenobióticos, mediante la fragmentación de sustancias tóxicas, hemoglobina, insulina y otras hormonas, y de los metabolitos de los fármacos; mediante la conversión del amonio en urea; y mediante la producción y excreción de bilis. La mayoría de estas funciones son llevadas a cabo por los hepatocitos, que representan el 70-80 % de las células hepáticas. El resto lo forman las células no parenquimatosas, que incluyen a las células de Küpfer, las células estrelladas, las células endoteliales sinusoidales, las células biliares epiteliales, linfocitos y las células ovals¹.

El hígado es el único órgano que puede regenerarse de forma completa después de una lesión en mamíferos. Su notable capacidad para auto-repararse y regenerarse después del daño tisular ha sido reconocida desde el mito de Prometeo, en la antigua Grecia. La regeneración hepática es un proceso complicado, que se acompaña de una complicada red de comunicación de señales intercelulares y extracelulares altamente reguladas entre sí. Cuando el hígado es sometido a cirugía, a sustancias tóxicas o a una infección vírica, él mismo tiene una extraordinaria habilidad regenerativa para restaurar la masa hepática funcional. La lesión hepática induce la activación de una serie de mecanismos de reparación que conlleva importantes cambios, como son la activación de células no parenquimatosas, y la producción y activación de múltiples citoquinas y factores de crecimiento. Estos factores activan la proliferación de hepatocitos y de células no parenquimatosas, y también favorecen la recuperación y el restablecimiento de su arquitectura tisular. La respuesta regeneradora finaliza cuando el hígado recupera su volumen y función habitual. Así pues, la regeneración hepática es en realidad una hiperplasia compensadora, mediada por la proliferación de los hepatocitos supervivientes. Sin embargo, cuando la proliferación de estos hepatocitos es atenuada o resulta insuficiente, el hígado es repoblado gracias a la inducción, proliferación y diferenciación del compartimento de células progenitoras². Los estudios de regeneración hepática se basan en su mayor parte en el modelo animal de lesión hepática tras hepatectomía.

En el ser humano, la enfermedad hepática es frecuente y aunque los agentes causales pueden ser múltiples, desde el punto de vista sindrómico se puede dividir en enfermedad hepática

aguda, enfermedad hepática crónica y fallo agudo sobre crónico (ACLF, *acute on chronic liver failure*).

FALLO HEPÁTICO AGUDO (FHA)

El término fallo hepático agudo se aplica en la práctica hepatológica a un síndrome raro y altamente específico, caracterizado por una alteración aguda de las pruebas de laboratorio de un individuo sin ninguna hepatopatía crónica de base. Este proceso está asociado al desarrollo de una coagulopatía de origen hepático, y clínicamente a una alteración de la consciencia secundaria a encefalopatía hepática³.

Las causas más comunes de FHA en Europa y EEUU son la intoxicación por paracetamol, la infección por el virus de la hepatitis B (VHB) y la lesión inducida por fármacos (DILI)⁴. Por el contrario, en Asia, África y la zona mediterránea, la hepatitis viral es la principal causa de FHO. Con la pérdida progresiva de la función hepática, el FHA evoluciona a encefalopatía hepática, coagulopatía y fallo multiorgánico en un período corto de tiempo. Independientemente del tipo inicial de lesión hepática y de su etiología, el FHA propulsa una serie de eventos que inducen la necrosis hepatocelular y la apoptosis, reduciendo la capacidad regenerativa del hígado. La pérdida masiva de hepatocitos reduce la capacidad funcional del hígado para el metabolismo de la glucosa, lípidos y proteínas, y la síntesis de factores de la coagulación, que llevan a la aparición de encefalopatía, coagulopatía, infecciones y fallo renal y multiorgánico. De hecho, el patrón de muerte celular puede ser relevante, ya que la necrosis o la apoptosis parecen ser específicas para las distintas causas y estar asociadas con el pronóstico clínico⁵. Ante una lesión celular masiva, la depleción de ATP lleva a necrosis, la cual típicamente conlleva inflamación local, inducción de la expresión de citoquinas y migración de células inflamatorias. La capacidad regenerativa del hígado depende del sexo, de la edad, del peso y de la historia previa de enfermedades hepáticas.

El diagnóstico de FHA suele establecerse por criterios clínicos basándose en la anamnesis y en las alteraciones analíticas, sobre todo el inicio agudo y la elevación de transaminasas. Pocas veces es necesaria la realización de una biopsia hepática para confirmar el cuadro.

La insuficiencia hepática aguda grave (IHAG) es un síndrome poco frecuente, expresión máxima del fracaso de las funciones del hígado, que se presenta de forma aguda en un individuo previamente sano. Por tanto, excluye los cuadros de insuficiencia hepática terminal que aparecen de forma relativamente brusca en un paciente portador de hepatopatía previa tras un proceso sobreañadido (ACLF), o las manifestaciones terminales espontáneas de un paciente con cirrosis⁶. Histológicamente, es una entidad que se caracteriza por la inflamación aguda con necrosis del parénquima hepático. Su etiología es variada: infecciosa, alcohólica,

por fármacos y tóxicos, metabólica y autoinmune. El cuadro clínico de esta entidad puede ser muy variado, y depende sobre todo del intervalo ictericia-encefalopatía.

En el caso de la hepatitis vírica, el pronóstico suele ser bueno en la mayoría de los casos. El riesgo de evolución a cronicidad es distinto para cada tipo. Para las hepatitis A y E es nulo, siendo cercano al 5 % en el caso de la hepatitis B en individuos inmunocompetentes, y superior al 70 % en la hepatitis C⁷. Antes de la introducción del trasplante hepático, la mortalidad de la IHAG alcanzaba en algunas series el 80-90%³. Por tanto, una precisa predicción del curso clínico es clave para el manejo del paciente y la toma de decisiones. El trasplante hepático es el último tratamiento en pacientes con FHA, cuando el tratamiento conservador falla y el desenlace letal es inminente. Es por ello que la evaluación de las probabilidades de un paciente para tener un curso clínico fatal es importante de cara a su inclusión en la lista. La encefalopatía hepática ha sido considerado tradicionalmente un importante indicador pronóstico. Hoy en día, el uso de escalas pronósticas estandarizadas es clave en tiempos de escasez de donantes y para evitar el trasplante en pacientes que podrían recuperarse completamente sin necesidad de TOH⁸. El MELD (*Model for End Stage Liver Disease*) fue diseñado inicialmente para predecir la supervivencia después de la colocación de un TIPS (shunt porto-cava transyugular) en pacientes cirróticos; en los últimos años ha demostrado en algunos estudios ser superior a otros modelos más usados como los de King's College o los de Clichy para la predicción de FHA⁹.

CIRROSIS HEPÁTICA

La cirrosis hepática es un diagnóstico patológico caracterizado por la presencia de fibrosis difusa, disrupción grave del flujo arterial venoso y arterial, hipertensión portal y, por último, fallo hepático¹⁰. El diagnóstico de cirrosis hepática puede llevarse a cabo por distintas circunstancias: el hallazgo de estigmas característicos (hepatomegalia o esplenomegalia palpable, arañas vasculares, telangiectasias, ictericia, asterixis, etc...), por anomalías de laboratorio (aumento de transaminasas, trombopenia, anemia, hipoalbuminemia, alteraciones de la coagulación...), o por signos de descompensación (ascitis, encefalopatía, hemorragia digestiva alta).

La historia natural de la cirrosis se caracteriza por una fase asintomática, denominada cirrosis hepática compensada, seguida por una fase sintomática y rápidamente progresiva, en la que se manifiestan complicaciones derivadas de la hipertensión portal y de la insuficiencia hepática. Esta última fase se conoce como cirrosis hepática descompensada¹⁰. Durante el primer período el enfermo permanece asintomático; de hecho, esta fase puede permanecer oculta durante años. La transición de una fase compensada a otra descompensada sucede

cuando uno de los siguientes fenómenos ocurre: presencia de ascitis, hemorragia por varices y/o encefalopatía hepática. La progresión de esta enfermedad va a depender directamente de la causa y de su posible tratamiento.

La fibrogénesis hepática es un proceso complejo de reparación tisular del hígado ante un daño hepatocelular mantenido, en el que intervienen diversos tipos celulares y citoquinas profibrogénicas. Tras producirse el daño agudo, los hepatocitos se regeneran y sustituyen el tejido necrótico restableciendo la arquitectura hepática normal. Durante este proceso, se depositan una serie de proteínas en la matriz extracelular, sobre todo colágeno. Además se produce una respuesta inflamatoria. Este colágeno sirve de sostén para los hepatocitos regenerados¹¹. Sin embargo, si el daño se mantiene en el tiempo, el proceso reparativo continúa, lo que conduce a una disminución de la capacidad de regeneración hepática. Además, la producción de matriz aumenta, depositándose de forma desorganizada, y sustituyendo a la población de hepatocitos. En fases avanzadas, las bandas de colágeno dan lugar a los conocidos como “puentes de fibrosis”, cuya aparición precede a la formación de nódulos de regeneración y al desarrollo último de fibrosis. Inicialmente, la fibrogénesis es contrarrestada por la eliminación del exceso de matriz por enzimas porteolíticas como son las metaloproteinasas de la matriz¹².

Las principales consecuencias clínicas de la cirrosis son el deterioro de la función hepática, el aumento de las resistencias intrahepáticas (hipertensión portal) y el desarrollo de carcinoma hepatocelular (HCC). Tradicionalmente, la cirrosis y la distorsión vascular que le acompaña eran consideradas irreversibles, pero datos recientes sugieren que su regresión es posible¹³.

Debido a su bajo nivel de complejidad y a su relativamente buen valor predictivo positivo, la clasificación de Child-Pugh-Turcotte ha sido ampliamente usada, de cara a caracterizar el grado de daño hepático y a predecir el pronóstico de pacientes con cirrosis, basándose en parámetros clínicos y bioquímicos¹⁴. Más recientemente, y debido a la presión en la asignación de los escasos donantes de hígado, el MELD (*Model of End Stage Liver Disease*) se desarrolló para evaluar de una forma más precisa la mortalidad a corto plazo¹⁵. Está basado en una fórmula matemática que incluye la creatinina, la bilirrubina y el INR.

La transición de la fase compensada a la descompensada se asocia con un aumento en la mortalidad a corto plazo (3-5 años), y se recomienda llevar a cabo una evaluación para la realización de un trasplante ortotópico hepático (TOH)¹⁶. En caso de que la cirrosis esté originada por una causa tratable (alcohol, hepatitis vírica crónica, obesidad, etc.), los pacientes pueden tener una regresión de una fase descompensada a otra compensada. Las tasas de supervivencia al año para pacientes con cirrosis Child A, B y C son 100, 80 y 45 %, respectivamente.

respectivamente¹⁷. Una vez que tiene lugar la descompensación, la mortalidad sin trasplante puede llegar al 85% a los 5 años.

FALLO HEPÁTICO AGUDO SOBRE CRONICO (ACLF)

Este heterogéneo síndrome está caracterizado por una serie de anomalías hepáticas agudas y graves, que puede estar causado por distintas causas, en pacientes con enfermedad hepática crónica subyacente o cirrosis. En 2009, la Asociación Asio-Pacífica para el Estudio del Hígado (APASL) definió esta entidad como un insulto hepático agudo manifestado en forma de ictericia y coagulopatía, complicado en 4 semanas por ascitis y/o encefalopatía¹⁸. Desde 2014 esta definición se completó para incluir “con una alta tasa de mortalidad a los 28 días”¹⁸. Recientemente la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (EASL), propuso definirlo como una descompensación hepática aguda que resulta en fallo hepático (ictericia y prolongación del *International Normalized Ratio* (INR)) acompañado de uno o más fallos orgánicos extrahepáticos⁸. Esta variedad de definiciones dificulta predecir qué proporción de pacientes con cirrosis cumple los criterios para ser incluido en esta entidad tan heterogénea. Cabe destacar que ACLF puede ocurrir tanto en pacientes con cirrosis compensada como descompensada, y también en pacientes con enfermedad hepática crónica subyacente sin cirrosis.

La prevalencia de los posibles causantes varía en función del área geográfica. Las principales causas objetivadas en el estudio CANONIC fueron las infecciones bacterianas y el alcoholismo, mientras que en China fue el virus de la hepatitis B (VHB)¹⁹. Sin embargo, y a pesar de una búsqueda exhaustiva, en el 20-45 % de los casos no se establece la causa.

La inflamación sistémica es el principal mecanismo fisiopatológico del ACLF; el recuento de leucocitos y los niveles de proteína C reactiva (PCR) y de moléculas pro-inflamatorias como la interleuquina (IL)-6, IL-1 β y la IL-8 están elevados en estos pacientes²⁰. En la actualidad no existen modelos animales de ACLF, motivo por el cual los resultados obtenidos en estudios translacionales son importantes para considerar. Recientemente se ha demostrado que en estos pacientes, además de una marcada inflamación sistémica, se desarrolla en paralelo una inmunosupresión de los monocitos/macrófagos, lo cual explicaría en parte el alto riesgo de infecciones nosocomiales que poseen los pacientes con ACLF²¹.

El score SOFA fue el modelo usado para el diagnóstico de fallo orgánico, ya que ha sido usado ampliamente en pacientes en estado crítico y es superior al MELD a la hora de predecir el pronóstico en pacientes con cirrosis descompensada con fallo orgánico¹⁹. La presencia y el número de fallos orgánicos se han asociado a la mortalidad a los 28 y a los 90 días. Además,

alguna disfunción orgánica como el fallo renal y la encefalopatía hepática moderada, cuando se asocian a un fallo orgánico, también son factores de mal pronóstico. En este contexto, los criterios diagnósticos de ACLF se establecieron en función de la presencia, tipo y número de fallos orgánicos. La gravedad se dividió en distintos grados, en función del número de fallos orgánicos, en ACLF grado 1, 2 y 3, y la mortalidad se correlaciona con la gravedad¹⁹.

En contraste con la cirrosis hepática descompensada, el ACLF tiene una alta tasa de mortalidad a corto plazo, simulando el pronóstico del fallo hepático agudo. Según el previamente mencionado estudio CANONIC la mortalidad global a los 28 días fue del 33%, llegando en el caso del estadio más avanzado, el estadio 3, al 73 %¹⁹. Por tanto es de vital importancia estratificar a los pacientes de acuerdo a su pronóstico, de cara a monitorizar la respuesta al tratamiento, determinar la urgencia para el trasplante, decidir su traslado a una unidad de cuidados intensivos y también para disponer de una base racional para decidir su futilidad.

El trasplante hepático (TOH) es el tratamiento definitivo para pacientes con ACLF. Por tanto, si no existe contraindicación, todos los pacientes con ACLF deberían ser evaluados para TOH. Sin embargo, el uso del TOH en este contexto está condicionado por la escasez de órganos y por la alta frecuencia de contraindicaciones que estos pacientes presentan. Como puente al TOH, se han propuesto como nuevas opciones terapéuticas una serie de sistemas de soporte hepático extracorpóreos, sobre todo diálisis con albúmina y/o intercambiadores de plasma (sistema MARS). Sin embargo, la gran heterogeneidad de los pacientes incluidos hace difícil evaluar la utilidad de estos dispositivos en pacientes con ACLF. Recientemente se han propuesto terapias innovadoras basadas en los efectos regenerativos e inmunomoduladores del hígado, incluyendo la administración de factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y el trasplante de células *stem* (CS). Ambas terapias han mostrado resultados esperanzadores, pero el escaso número de participantes hace que el optimismo al respecto sea por el momento limitado.

PROCESO DE REGENERACIÓN HEPÁTICA

La lesión hepática causa una serie de cambios significativos en la expresión y en la actividad de una lista de mediadores de señal producidos por las células hepáticas, por las glándulas endocrinas y por las plaquetas por distintas vías: autocrina, paracrina, yuxtacrina y endocrina.

La mayoría de estas moléculas de señal son precursores inactivos que deben ser procesados posteriormente a una forma madura mediante proteasas activadas en la matriz extracelular o en la membrana de las células vecinas. La progresión de la regeneración del tejido dañado es coordinada por la intercomunicación entre hepatocitos y células no parenquimatosas,

influenciada también por glándulas endocrinas, por la inervación simpática y por la circulación sanguínea. Esta regeneración puede dividirse en varias fases.

En la fase inicial, la lesión induce la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y lipopolisacárido (LPS) que inducen la activación del complemento, el cual a su vez estimula la producción de citoquinas como factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interleuquina-6 (IL-6). Éstas son responsables, entre otros, de introducir a los hepatocitos quiescentes en el ciclo celular (paso de G0 a G1), de iniciar la transcripción de los genes tempranos y de sensibilizar a los hepatocitos para los efectos proliferativos de los factores de crecimiento^{22,23} (Figura 1).

La siguiente fase sería la fase proliferativa. La mayoría de los factores de crecimiento suelen ser sintetizados como precursores inactivos unidos a la matriz extracelular o integrados en la membrana. La activación de las proteasas extracelulares y la degradación de la matriz ocurren en las primeras horas previas a la síntesis y división del DNA de los hepatocitos; estos factores de crecimiento son liberados y activados desde la vecina matriz o desde la membrana celular por la proteasa extracelular²⁴. Estos factores activados unidos a sus correspondientes receptores guían a las células hepáticas a la replicación del DNA y a la mitosis.

Entre los factores implicados se incluyen al factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-1), sintetizado principalmente por los hepatocitos; el factor de crecimiento hepatocitario (HGF), sintetizado en su mayoría por las células *stem* de médula ósea (CSMO) pero también por los hepatocitos, realiza sus funciones mediante su receptor c-met; y la familia de los factores de crecimiento epidérmico (EGF). La unión de HGF a su receptor c-met induce la activación de la fosforilación de la β -catenina y su traslocación al núcleo. EFGR, el receptor de EFG, también es un importante potenciador de la señalización Wnt/ β -catenina, vía molecular clave en la regeneración hepática, prolongando además sus efectos mitogénicos²⁵.

Durante la fase remodeladora, después de la división celular, los hepatocitos se unen en racimos que ya no se asocian con los sinusoides. Las recién nacidas células endoteliales viajan a lo largo de estos racimos para formar los nuevos sinusoides que más tarde se alinearán con los hepatocitos. Se cree que en este proceso tienen gran importancia el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y su receptor, VEGFR²⁶. Mientras tanto, las células biliares epiteliales reconstruyen el árbol biliar en los espacios porta. La síntesis de la nueva vascularización, de la matriz extracelular y del árbol biliar posteriormente restablece la arquitectura tisular.

La fase final comienza cuando la masa hepática recupera su volumen normal. El aumento en la señal de la activina A, la apoptosis y la disminución de la expresión y de la activación de los factores promotores de la proliferación debido a las restablecidas matriz extracelular y arquitectura tisular provocan la finalización de la regeneración hepática²⁷.

El hígado tiene una especial capacidad regeneradora para restablecer la masa funcional hepática después de que se produzca una lesión en el mismo; sin embargo, bajo determinadas condiciones patológicas, la regeneración del hígado no es autónoma, por lo que el estudio de la patogenia del hígado enfermo es clave de cara a proveer de nuevos métodos de curación de pacientes con enfermedades hepáticas.

Una vez el tejido hepático ha sido dañado, se ha visto que la respuesta proliferativa tiene lugar a tres niveles: en primer lugar, a través de la ya vista proliferación de hepatocitos maduros; posteriormente, mediante la activación de células progenitoras de los canalículos biliares (células ovas en el modelo murino); y finalmente, mediante la acción de células *stem* circulantes originadas en la médula ósea (CSMO)^{28,2}.

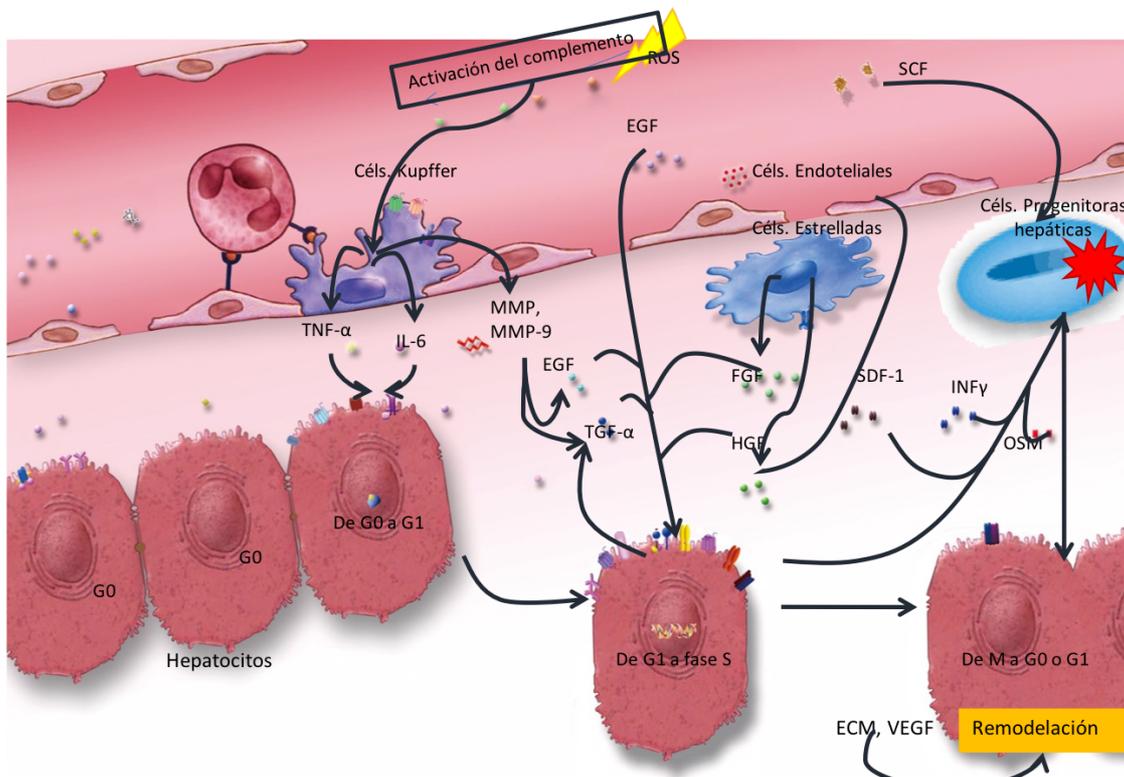


Figura 1. Proceso de regeneración hepática.

En la mayoría de los distintos tipos de lesión hepática, el hepatocito maduro es la mayor fuente de células hepáticas encargada de la regeneración y reparación del hígado. Por ejemplo, después de una hepatectomía parcial, el hepatocito es el encargado de restaurar la masa celular hepática mediante el ciclo celular y la mitosis²⁹. Sin embargo, en otros tipos de lesión, como son las hepatitis crónicas virales, poblaciones de células progenitoras intrahepáticas son movilizadas y contribuyen activamente en las respuestas regenerativas³⁰.

Este compartimento celular intrahepático parece surgir de las llamadas células progenitoras hepáticas (CPH) (llamadas células ovas en el modelo murino), localizadas en el canal de Hering³¹.

Además de estas poblaciones intrahepáticas, existe otra fuente de células con potencial hepático, que se encuentra en la médula ósea. Esta población celular ha demostrado ser capaz de diferenciarse a hepatocitos maduros tanto *in-vitro*³² como *in vivo*³³. Sin embargo, la verdadera naturaleza de los tipos celulares y de las señales implicadas en la iniciación de la respuesta, en el mecanismo de anidación y, más importante, el papel fisiológico y la relevancia de este fenómeno siguen sin ser aclarados.

CÉLULAS PROGENITORAS HEPÁTICAS (CPH)

Durante muchos años, han existido dudas acerca de la existencia de un compartimento de células progenitoras hepáticas^{34,35}. La capacidad del hígado para regenerarse ha sido reconocida desde hace tiempo. Los hepatocitos, que normalmente en el adulto se encuentran en fase quiescente, entran en su ciclo de crecimiento siguiendo una respuesta bien coordinada. Durante este proceso regenerativo normal, las células progenitoras no contribuyen al reemplazo de células hepáticas. Sin embargo, tras producirse una necrosis hepática masiva en respuesta a una variedad de tratamientos tóxicos³⁶, o cuando los hepatocitos son incapaces de proliferar, surge una población de células progenitoras intrahepáticas. En ausencia de proliferación por parte de las células propias, la regeneración del órgano dañado requiere la presencia de una población de células progenitoras, caracterizada por la capacidad para proliferar, autorenovarse y diferenciarse en las células fenotípicas del órgano en cuestión. Entre estas células progenitoras, se encuentra una población localizada en el propio parénquima hepático. Se conocen como células ovas en modelos murinos y como células progenitoras intrahepáticas en humanos. Estas células participan en la regeneración hepática bajo determinadas condiciones, y además están implicadas en la carcinogénesis hepática³⁷. Se cree que tienen la habilidad para expandirse clonalmente y se caracterizan por ser bipotenciales, lo que les permite diferenciarse tanto en hepatocitos como en colangiocitos. En condiciones normales permanecen en estado quiescente, pero ante una lesión aguda grave o un daño crónico pueden activarse y multiplicarse rápidamente originando hepatocitos y colangiocitos.

Inicialmente se pensó que el origen de estas células se encontraba en el propio hígado, concretamente en los canales de Hering³⁸. Sin embargo, en los últimos años, ha comenzado a aflorar la controvertida posibilidad de que su origen estuviera en una fuente extrahepática.

Petersen et al³⁹ sugirieron que las CSMO eran una fuente potencial de CPH. Entre otros, se ha descrito en hígados humanos la presencia de marcadores característicos de CSMO como son CD34+, CD117 (ckit) y CD90³⁹, lo cual ha hecho que algunos autores se planteen que el origen de estas células progenitoras hepáticas esté en la médula ósea. En este estudio, Crosby et al⁴⁰ investigaron la presencia de marcadores de célula *stem* (CS) como c-kit y CD34, así como de CK19, en tejido hepático humano enfermo y sano *in vitro*. Estos autores identificaron poblaciones de células CD34+ y ckit+ con características de CS en los espacios portales de hígados cirróticos humanos.

CÉLULAS *STEM* VS CÉLULAS PROGENITORAS

La terminología “células *stem*” y “células progenitoras” puede ser en algún contexto ambigua, confusa e incluso contradictoria. Las células *stem* (CS) se definen como células que se dividen de forma asimétrica, produciendo una célula hija que sigue siendo una CS, y otra célula hija que puede ser o bien una célula progenitora o bien una célula especializada. Por definición, las CS pueden autorenovarse y dar lugar indefinidamente a células de diferentes tipos o estirpes celulares. Son lo que se conoce como células madre. Son células con capacidad de autoregeneración, y como tales, son poblaciones de células escasas en el organismo adulto. Las células progenitoras, también conocidas como “células amplificadoras transitorias”, son poblaciones de células parcialmente diferenciadas con compromiso de linaje. Dan lugar a células especializadas, y solo se pueden replicar un número limitado de veces.

Como hemos dicho, la CS es un elemento celular que tiene dos propiedades que la distinguen: primero, está dotada de una larga supervivencia gracias a su capacidad de autoregeneración en el tiempo; segundo, es capaz de diferenciarse en elementos celulares con distintas funciones específicas. Además, las CS son escasas en número y pueden reponer a otras células dañadas o patológicas en distintos tejidos. De todos es sabido que su plasticidad, su capacidad de transdiferenciación y de fusión son procesos fisiológicos claves para el desarrollo, la regeneración y la reparación de los tejidos dañados. No está claro qué tipo de población de CS es capaz de anidar en el hígado actuando como célula epitelial funcional. Tradicionalmente, en la médula ósea existen principalmente dos tipos de CS: las hematopoyéticas (CSH) y las mesenquimales (CSM).

CÉLULAS *STEM* HEMATOPOYÉTICAS

La CSH es el elemento celular del que todas las células sanguíneas derivan. 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. Tienen un inmunofenotipo característico de antígenos de superficie. En humanos, son CD34+, CD133 +-, CD38-, CD117+, CD45+y Lin⁻⁴¹. Las células CD133+ constituyen el estadio más inmaduro de las CSH y se postulan como las CSH con mayor potencialidad⁴². En la médula ósea, las CSH 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 CSH quiescentes y proliferativas; y una zona vascular, cerca de los sinusoides, que permite que salgan las células maduras a la circulación⁴³.

La plasticidad celular describe la conversión de una célula de un linaje celular a otro completamente diferente, con la consiguiente pérdida de sus marcadores específicos y de su funcionalidad previa en el tejido original, y con la adquisición de los marcadores y de las funciones relacionadas con el nuevo linaje^{44,45}. Las células procedentes de médula ósea (MO) han demostrado ampliamente esta capacidad. Esto ha sido ampliamente estudiado en animales irradiados letalmente y trasplantados cuyos tejidos diana fueron dañados. La incidencia de la plasticidad ha demostrado ser muy variable, desde casos extremadamente raros, a otros con rangos entre el 20 y el 40 %. En el caso del hígado, se han aplicado distintos modelos de daño hepático para demostrar la plasticidad de las células hematopoyéticas a hepatocitos, con resultados heterogéneos.

Estudios de CS hematopoyéticas y mesenquimales, revelaron que éstas son capaces de generar diferentes tipos celulares^{46,47,48}, lo cual es conocido como transdiferenciación. Además, se piensa que estas células pueden elegir múltiples vías de diferenciación, propiedad conocida como plasticidad. La comprensión de los mecanismos que llevan a la transdiferenciación es clave en el campo de la biología de las CS y debería dar información relevante de cara al uso de CS en el campo de la regeneración celular.

Múltiples estudios han demostrado que estas células pueden activarse mediante determinados estímulos y diferenciarse en células maduras de diferentes tejidos, entre otras en hepatocitos, células ovas, neuronas o células del epitelio biliar. De hecho, es probablemente la CS mejor estudiada y conocida del ser humano⁴⁹.

Cuando son trasplantadas a receptores sometidos a un tratamiento mieloablativo que permite su injerto, son capaces de repoblar a largo plazo todos los linajes hematopoyéticos. En humanos adultos, las CSH 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 han descrito su aparente transdiferenciación a diversos tejidos como músculo, hígado, miocardio, o sistema nervioso^{33,49,50,51}.

En el campo de la regeneración hepática, la gran atención recibida por este tipo de células, es debida en gran parte a varios estudios innovadores que mostraban la capacidad de estas células para, después del trasplante, diferenciarse en células “*hepatocyte-like*” *in vivo*, y para repoblar completamente el hígado de ratones deficientes en fumarilacetoacetato hidrolasa (FAH), corrigiendo su enfermedad previa^{52,53}. En este modelo, la cinética de repoblación mediante CSH demostró ser lenta e ineficiente comparada con la obtenida mediante el trasplante de hepatocitos, aunque sí se objetivó una repoblación significativa. Los primeros hepatocitos generados de CSH aparecieron alrededor de 7 semanas después del trasplante. Por contra el trasplante de hepatocitos reconstituye más del 50 % del hígado en unas 4 semanas, lo cual llevó a los autores a concluir que el reemplazo de hepatocitos por parte de CSMO es un evento raro y lento. En cualquier caso, a las 22 semanas del trasplante la repoblación de las CSH constituía aproximadamente el 30 % del hígado.

El grado de contribución de las CSH parece estar relacionado con la gravedad del daño hepático, y podría llevarse a cabo a través de dos mecanismos: la transdiferenciación en hepatocitos, y la fusión celular de las CSH con hepatocitos “inadecuados” o “insubstanciales”. Las CSH localizadas en el hígado adulto probablemente sean CS pluripotentes presentes en el tejido hepático, capaces de generar diferentes líneas celulares, incluyendo hepatocitos. Si esta visión es correcta, las CSH localizadas en el hígado (quizás en los espacios periductulares) podrían diferenciarse de forma progresiva⁵⁴, primero en CPH y finalmente en hepatocitos, bajo estímulos que producen una respuesta en la CPH.

Otros estudios han hipotetizado con que el papel de este tipo de células en la regeneración hepática está sobre todo asociado a la producción de factores humorales necesarios para una adecuada recuperación de la función hepática^{33,55}.

Recientemente, está recibiendo apoyo el concepto de que algunas células hematopoyéticas tengan la capacidad para diferenciarse en epitelio hepático. En dos estudios diferentes, mujeres trasplantadas de médula ósea de donante varón, así como varones con enfermedad hepática sometidos a trasplante de hígado de donante femenino fueron examinados. En ambos estudios, se observaron hepatocitos expresando el marcador de cromosoma Y^{56,57}. En el primero de ellos, las células trasplantadas también dieron lugar a células epiteliales biliares (colangiocitos).

CÉLULAS MESENQUIMALES (CSM)

Las CSM de médula ósea han sido pobremente descritas y solo han sido definidas funcionalmente. Estas células se pueden diferenciar en múltiples líneas celulares, incluyendo hepatocitos, osteoblastos, condroblastos, y adipocitos⁵⁸, dependiendo del microambiente en el que residen. Suponen el soporte sobre el que asientan las CSH, proporcionándoles el microambiente necesario para que tenga lugar la hematopoyesis. Desgraciadamente, la ausencia de marcadores de superficie específicos hace que los distintos estudios sean muy heterogéneos, y que por tanto las comparaciones entre ellos difíciles. Además de la médula ósea, CSM también han sido aisladas en otros múltiples tejidos, como son cerebro, hígado, pulmón, sangre fetal, sangre del cordón umbilical, riñón y tejido adiposo. Por otra parte, CSM procedentes de MO o del cordón umbilical han podido ser diferenciadas al linaje hepático^{59,60}; sin embargo, siguen existiendo dudas acerca de si estas células pueden ser una buena fuente de CS de cara a la regeneración hepática. Las CSM pueden ser fácilmente recogidas de la MO, expandidas *ex vivo*, y diferenciadas en otras múltiples líneas celulares.

Sato et al⁵⁹ analizaron la capacidad de distintos componentes de CSMO humana (CSM, células CD 34+, células no MSC-CD34-) de diferenciarse en hepatocitos mediante su inoculación directa en hígados de ratón con lesión crónica inducida por alcohol (AA), sin alojarse previamente en MO. Los resultados obtenidos indicaban que las CSM eran claramente superiores a los otros tipos de células.

Jang et al⁶¹ investigaron el efecto de la administración de CSM humanas en la fibrosis hepática en un modelo de ratas cirróticas, y los mecanismos subyacentes por los cuales estas células mejoraban la fibrosis hepática. Se demostró que la administración de dichas células a una concentración de 2×10^6 mediante inyección directa provocaba una mejoría histológica significativa de la fibrosis, en comparación con el grupo de ratas no tratadas. Además, se obtuvo una mejoría clínica (disminución de los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) y aumento de los niveles de albúmina) en las ratas tratadas. También se realizó estudio con inmunofluorescencia y marcaje con anticuerpos anti-albúmina. Sus resultados sugerían que las CSM se habían transdiferenciado a hepatocitos tras la inyección.

En Corea del Sur se llevó a cabo un ensayo clínico piloto en el que se realizó trasplante autólogo de CSM a 11 pacientes con cirrosis hepática por alcohol. Se comprobó que dicho tratamiento inducía una mejoría histológica y cuantitativa en la fibrosis hepática en 6 pacientes⁶². Posteriormente, este mismo grupo amplió el ensayo a 55 pacientes con cirrosis hepática por alcohol, que fueron randomizados a 3 grupos: administración de una dosis de CSM, dos dosis de CSM y grupo control (abstinencia alcohólica). Inicialmente se comprobó por

citometría de flujo que las células aisladas eran positivas para marcadores de CSM (CD73, CD105), y negativos para marcadores de CSH (CD34, CD45, CD14). Se realizaron biopsias hepáticas al inicio del estudio y a los 6 meses, y se evaluó la función hepática, calculándose las escalas de Child-Pugh y de MELD (*Model of End-Stage Liver Disease*). En los grupos en los que se administraron CSM se evidenció una mejoría significativa de la fibrosis a los 6 meses, sin apreciarse mejoría en el grupo control. Esto fue seguido posteriormente de una mejoría significativa de la función hepática y de las escalas de Child-Pugh y MELD en los grupos que recibieron tratamiento. No se evidenciaron eventos adversos secundarios a la administración de las CSM⁶³. Así pues, existe evidencia que sugiere que el tratamiento con CSM provenientes de MO podría ser un potencial tratamiento suplementario para mejorar la función hepática de los pacientes con cirrosis.

MOVILIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE DE MÉDULA ÓSEA HACIA EL HÍGADO

El potencial de las CSMO 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^{64,65}. En ratones con fibrosis provocada por tetracloruro de carbono (CCl₄), el trasplante autólogo de CSMO demostró ser un tratamiento efectivo en la lesión hepática, disminuyendo el grado de fibrosis y mejorando la supervivencia^{66,67}. De forma similar, en un estudio de Yannaki et al⁶⁸, se comprobó que la administración de G-CSF, también en ratones con lesión hepática inducida con CCl₄, mejoró el daño histológico y aceleró el proceso de regeneración, mejorando la supervivencia tanto en lesión hepática aguda como en la crónica, activando procesos de reparación endógenos, mediante la movilización de CSMO.

Los resultados positivos obtenidos en estos primeros ensayos con terapia celular en modelos animales animaron a evaluar la posibilidad de realizar terapia celular con CSMO en pacientes con hepatopatía crónica. Así, Gaia et al⁶⁹, realizaron un estudio en el que se administró G-CSF a 8 pacientes con cirrosis hepática descompensada (Child-Pugh B-C), confirmándose, aparte de la seguridad de dicho tratamiento, la movilización de CS (CD34+) en todos los pacientes. En este mismo estudio, además, se objetivó una mejoría en la puntuación MELD y no se encontró un aumento en el desarrollo de hepatocarcinoma (HCC) ni aumento de los niveles de alfafetoproteína a los 8 meses de la administración de G-CSF. En otro estudio en pacientes con esteatohepatitis alcohólica, se demostró que la administración de G-CSF favorecía la movilización de células CD34+, aumentaba los niveles de HGF e inducía la proliferación de las células progenitoras hepáticas a los 7 días⁷⁰. Posteriormente, Garg et al⁷¹ llevaron a cabo el primer ensayo clínico en humanos, en el que randomizaron a 47 pacientes con fallo agudo

sobre crónico a recibir tratamiento con G-CSF de forma prolongada (durante 30 días) o placebo. En los pacientes que recibieron G-CSF se observó una mejoría significativa de la supervivencia a los 60 días y en el grado de Child-Pugh y el MELD. Además, se observó una disminución en las tasas de encefalopatía hepática, síndrome hepatorenal y sepsis. En estos pacientes también se constató un aumento de significativo de la población de células CD34+ a nivel del tejido hepático a las 4 semanas, lo cual daba crédito al importante papel que, en opinión de los autores, juega el reclutamiento de CSMO en la mejoría de estos pacientes tras la administración de G-CSF. Sin embargo, el porcentaje de células CD34+ en sangre periférica había disminuido, sugiriendo los autores que era debido a la migración y anidamiento de estas células en el hígado.

En los últimos años se han publicado múltiples ensayos clínicos sobre terapia con CSMO en pacientes con cirrosis hepática. Estos estudios varían en el diseño, el tipo de paciente, los criterios de inclusión/exclusión, el tipo de vía de administración y los objetivos finales. En ellos se han usado distintos tipos celulares, incluyendo CS mononucleares “sin clasificar”, CSH y CSM, variando también el número de células infundidas. La mayoría de los ensayos demostraron la seguridad del proceso^{69,70,71,72}. En la mayoría de los casos las células eran recolectadas directamente por aspiración de MO, aunque en algunos casos se realizó leucoaféresis tras la administración de G-CSF. En la mayoría de los estudios, se objetivó una mejoría en los datos de laboratorio y en los índices de Child-Pugh y MELD a los 3, a los 6 y a los 12 meses. Además, se constató una mejoría histológica y un aumento del recuento de células progenitoras hepáticas, así como un descenso en los marcadores de fibrosis⁶⁷⁻⁷². Sin embargo, en la mayoría de los casos, esta mejoría fue transitoria, lo que llevó a los autores a pensar en la hipótesis de que las CSMO actúan mediante la liberación de citoquinas y de factores de crecimiento, más que mediante procesos de transdiferenciación o de fusión⁷².

Sin embargo, quedan muchas preguntas abiertas. Lo primero, es crucial entender los procesos de migración y anidamiento de las CSMO en el hígado dañado, así como dilucidar las relaciones existentes entre estas células y los hepatocitos y los mecanismos de regeneración hepática. Además, es esencial clarificar los mecanismos por los que las diferentes CSMO actúan en el hígado, de cara a que nos permita guiar la terapia con CS de forma individualizada a cada paciente.

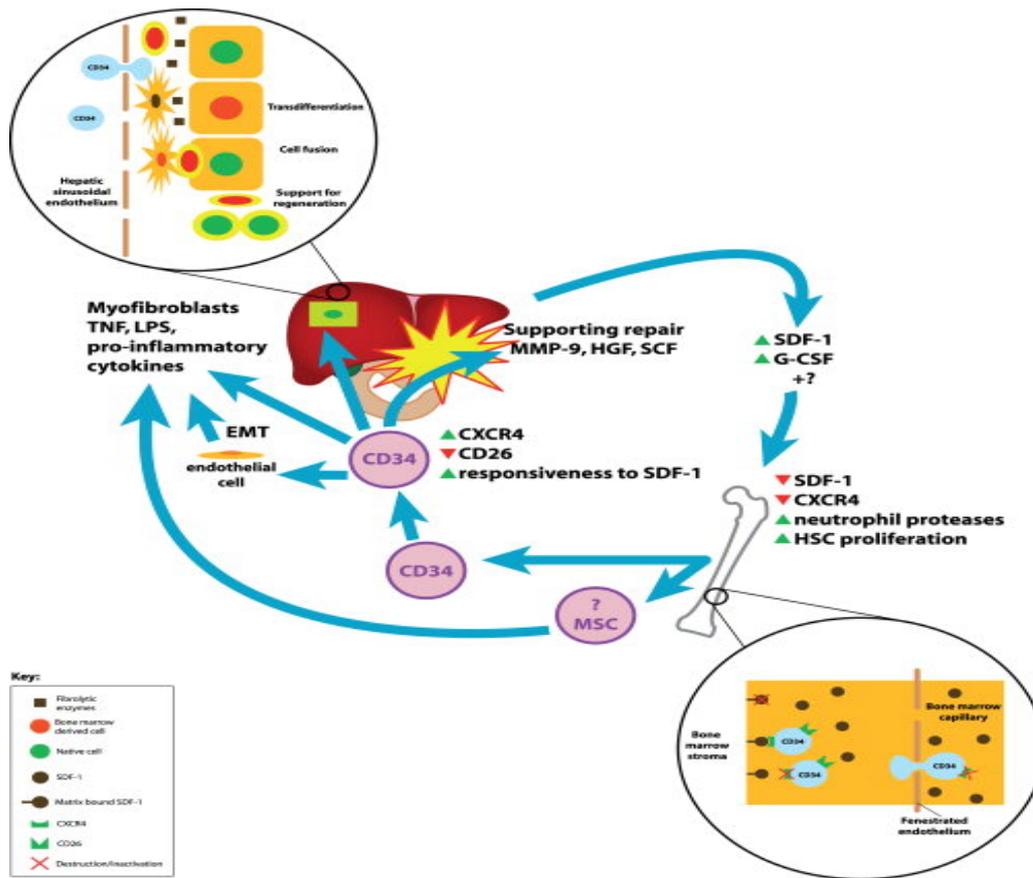


Figura 2. Proceso de movilización de CS desde MO. Factores y citoquinas implicados en el proceso.

MIGRACIÓN Y ANIDACIÓN DE CELULAS STEM

Dada toda esta evidencia que sugiere la existencia de un eje médula ósea-hígado, es importante establecer qué es lo que regula la migración de progenitores de médula ósea al hígado, y qué factores influyen y dirigen su anidamiento. El mecanismo por el que estas células migran y se alojan en el parénquima hepático (*homing*), no es bien conocido (Figura 2). Se sabe que el hígado dañado expresa citoquinas y factores que presumiblemente participan en este proceso de captación de CS que provienen de fuentes extrahepáticas⁷³. Parece cada vez más claro que la lesión hepática induce la expresión y secreción de factores como interleuquina-8 (IL-8), metaloproteasas, factor de células *stem* (SCF) y factor de crecimiento hepatocitario (HGF), los cuales facilitan los fenómenos de “homing” y anidación de CS en el hígado dañado. Tang et al⁷⁴ investigaron el potencial efecto terapéutico de CSM (derivadas de cordón umbilical) que sobreexpresaban HGF en ratones con fallo hepático agudo inducido por acetaminofeno. Descubrieron que dicha terapia protegía a los animales del fallo hepático

reduciendo el daño hepático y aumentando su supervivencia. En otro estudio, la infusión de HGF humano en la vena porta de ratones se tradujo en la proliferación de hepatocitos y en un aumento en la masa de hígado relativa⁷⁵.

- Hepatocyte growth factor (HGF)

HGF es un factor de crecimiento multipotente que está involucrado en múltiples acciones: la regeneración tisular, la cicatrización de las heridas, el crecimiento tisular fisiológico, la progresión tumoral, la embriogénesis y la invasión tumoral⁷⁶. El papel que este factor juega en la estimulación de la proliferación hepatocitaria en el hígado enfermo ha sido bien descrito²².

Después de producirse la lesión hepática, los niveles de HGF en plasma aumentan muy rápidamente hasta por 10 a 20 veces. Este aumento se debe fundamentalmente al HGF almacenado en la matriz extracelular y a la liberación del HGF sintetizado por los macrófagos, estimulado sobre todo por IL-6 y TNF- α . Además, el HGF aumenta su transcripción en las células mesenquimales de otros órganos (Figura 1). Como hemos mencionado previamente, HGF se une al receptor de tirosín-kinasa, c-met, presente en células epiteliales y mesenquimales. Esta unión ligando-receptor conlleva la activación de la cascada de las kinasas, que estimula la transcripción de factores relacionados con la proliferación y la supervivencia celular⁷⁷. Como se ha mencionado previamente, la unión de HGF a c-met activa también la fosforilación de la vía de la beta-catenina, responsable de la transición G0-G1 del ciclo celular⁷⁸.

Se ha comprobado que la expresión de HGF aumenta tras la hepatectomía parcial en ratones con lesión hepática^{79,80}. También se ha comprobado que sus niveles aumentan en pacientes sometidos a hepatectomía, y en el suero de pacientes con hepatopatía crónica y con lesión hepática aguda, comparado con controles sanos^{81,82}. El HGF ha demostrado tener una potente actividad mitogénica en hepatocitos diferenciados. Además, promueve la diferenciación de células ovas *in vivo*^{83,84}. Estos estudios mostraron que HGF es un factor crítico para la proliferación de CS. Además de esto, Suzuki et al⁸⁵ sugieren que la interacción entre HGF y c-met, además de ser crucial en el proceso de maduración de los hepatocitos en el hígado post-natal y en la división de los hepatocitos maduros en la regeneración hepática, también está involucrada, a través de otro mecanismo, en el crecimiento y en la diferenciación de las CS.

- Eje factor de célula estromal 1- Receptor de quimoquinas tipo 4 (SDF1-CXCR4)

Asimismo, el factor derivado de células estromales-1 (SDF-1) expresado en el tejido dañado y su receptor CXCR-4, juegan un papel clave en la migración de células humanas progenitoras al hígado. Las CSH expresan el receptor CXCR4, cuyo ligando natural es el factor

derivado de células estromales 1 (SDF-1). Tras producirse un daño en el hígado o ante condiciones de estrés, los niveles de SDF-1 se ha visto que se reducen bruscamente en la MO y a su vez se elevan tanto en la sangre periférica como en el propio hígado, siendo este aumento máximo en el tejido hepático. Por tanto, se puede establecer que un gradiente de SDF-1 permite a las CSMO alcanzar desde su reservorio medular y alojarse en el parénquima hepático^{86,87} (Figura 1). Se ha demostrado que estímulos nocivos como la irradiación y la inflamación aumentan la producción de SDF-1 hepática^{88,89}. Xiao Ling et al⁸⁸ han demostrado recientemente que la administración de SDF-1 *in vitro* induce la migración de CSMO. Además, en dicho estudio se constató que los niveles de SDF-1 aumentaban de forma gradual en un modelo murino de lesión hepática, inducida mediante tioacetamida (TAA), y que el eje SDF1/CXCR4 es clave en la migración de CSMO al hígado dañado *in vivo* e *in vitro*. En otro estudio previo, Kollet et al⁸⁹ concluyeron que un incremento local de los niveles de SDF-1 facilitaba, también en ratones, su migración al hígado, mientras que el bloqueo del eje SDF-1/CXCR4 impedía tanto la migración como la anidación, en este órgano, de células humanas CD34+. En este mismo estudio, también en ratones, se detectó un aumento de la secreción y de la activación de MMP-2 y MMP-9 en tejido hepático; se demostró que la migración de estas células al hígado se veía reducida por un inhibidor específico de estas metaloproteasas. MMP-2 y MMP-9 también pueden aumentar el reclutamiento de células CD34+ por otras vías, como son el desprendimiento (*shedding*) del receptor de membrana para SCF y la secreción autocrina de estas enzimas por los precursores CD34+ en respuesta a la estimulación de SDF-1. Además, estos mismos autores, comprobaron que HGF también induce el reordenamiento del citoesqueleto e incrementa la movilidad de las células CD34+ inmaduras, potenciando su respuesta a la señal de SDF1, induciendo la regulación positiva de CXCR4 y actuando de forma sinérgica con SCF.

- Sistema SCF-ckit

Este sistema ligando-receptor, que se descubrió a principios de los años 90, parece que solo participa en las fases más precoces de la activación de las CS⁹⁰. Se cree que este sistema de transducción de señales juega un papel fundamental en la supervivencia, proliferación y migración de CS en la hematopoyesis, melanogénesis y gametogénesis. En el caso del sistema de CSH se ha demostrado también que SCF en combinación con otros factores estimulantes de colonias específicos puede influir en la frecuencia relativa de células progenitoras que se implican en distintos linajes celulares^{91,92}. Se ha comprobado que la expresión de SCF aumenta en el modelo murino AAF/HP (acetil-aminofluoreno/hepatectomía parcial), pero no cuando sólo se ha realizado hepatectomía. La activación de ckit y de gp130 es considerada como uno

de los requisitos mínimos necesarios para la expansión de los progenitores hematopoyéticos; así pues, SCF parece jugar un papel clave en la activación de las CSH⁹³. El patrón de expresión hepática y la localización celular del sistema CSF-ckit, indican que este sistema de transducción de señales solo es requerido durante la activación precoz y durante la fase transicional de la diferenciación de las CPH. Una vez que estas células se han diferenciado en hepatocitos, la expresión de SCF y ckit es abolida⁹⁴.

- Interleuquina 6 (IL-6)

El receptor gp-130 ha demostrado ser un elemento clave en la activación y expansión de las células progenitoras hepáticas⁹⁵. De hecho, es una de las pocas señales que ha demostrado ser capaz de iniciar la respuesta de las células ovals por sí sola⁹⁶. La IL6, una citoquina pro-inflamatoria, es el activador de gp-130 mejor estudiado. Es producida por una variedad de células incluyendo macrófagos, fibroblastos y células endoteliales. Estudios recientes han demostrado que IL-6, además de participar en la respuesta de fase aguda, es también un potente estímulo de la regeneración hepática⁹⁷. Solo 2 horas después de una hepatectomía o de que ocurra la lesión hepática, factores como el LPS activan a las células de Küpfer, estimulan la secreción de IL-6 dependiente de TNF- α (Figura 1). Estos dos factores (TNF- α e IL-6) a su vez estimulan la liberación de HGF. En un modelo animal de ratones deficientes en IL-6 sometidos a una hepatectomía, se observó un deterioro en la capacidad de regeneración hepática de los ratones, sufriendo fallo hepático tras la intervención quirúrgica, mientras que aquellos que recibieron tratamiento sustitutivo con IL-6 previo mostraron una proliferación de hepatocitos cercana a lo normal, previniendo el daño hepático^{98,99}. Por tanto, IL-6 es una señal clave en la proliferación hepatocitaria. Se cree que la fuente de IL-6 durante la lesión hepática son los leucocitos activados, incluyendo las células de Küpfer y los linfocitos; sin embargo, también podría estar producida directamente desde las propias células progenitoras, reforzando la posibilidad de su estimulación autocrina¹⁰⁰.

- Angiogénesis

El mecanismo mediante el cual las CS favorecen la regeneración hepática tampoco parece claro. En los últimos años, han aparecido datos que apuntan a que las CS ejercen un efecto proliferativo paracrino sobre los hepatocitos endógenos, mediante la liberación de citoquinas que estimulan la proliferación celular o promueven la angiogénesis, como es el caso del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)^{101,102,103}. Es bien conocido que la angiogénesis juega un papel clave durante la progresión de las condiciones inflamación crónicas. VEGF es el principal factor regulador de la angiogénesis. Ha demostrado ser un mitógeno altamente

específico para células endoteliales *in vitro*, además de tener propiedades angiogénicas *in vivo*¹⁰⁴. Puede ser producido por una gran variedad de células humanas. VEGF parece no estimular la proliferación de los hepatocitos *in vitro*, sin embargo, estudios *in vivo* y de cocultivos de hepatocitos con células endoteliales han demostrado que VEGF estimula la proliferación de hepatocitos a través de la vía de VEGFR1¹⁰⁵. Estos estudios además sugieren que VEGF promueve la proliferación de hepatocitos mediante la secreción de HGF por parte de las células endoteliales, mediada por VEGFR1.

Estudios recientes sugieren que VEGF puede ser un importante factor angiogénico durante la lesión hepática y su reparación¹⁰⁶. En respuesta a la lesión hepática, se cree que este factor podría aumentar el potencial regenerativo de los hepatocitos residuales y el de las células no parenquimatosas. Assy et al¹⁰⁷ demostraron que la inyección de VEGF en ratas estimulaba la actividad proliferativa de los hepatocitos. En otro estudio realizado en ratas, se constató que la concentración de VEGF, así como su expresión proteica era superior en hígados cirróticos respecto a hígados sanos, lo cual, según los autores, podría deberse a que la reducción del flujo sanguíneo en el hígado cirrótico y la consiguiente disminución en la presión de oxígeno, estimulan la transcripción de VEGF, que, a su vez, ayudaría a reestablecer la integridad vascular del hígado lesionado¹⁰⁸. Se ha comprobado que VEGF aumenta a nivel hepático en numerosas formas de lesión hepática y tras la hepatectomía parcial¹⁰⁹⁻¹¹². En ambos casos, el VEGF hepático ha demostrado regular cada paso del reclutamiento de las CSMO al hígado dañado: su proliferación, la movilización a la circulación periférica, su enjertación en el hígado, y la diferenciación de éstas a células endoteliales sinusoidales¹¹³. Por tanto, VEGF parece constituir un regulador central del reclutamiento de CSMO y ser clave para la regeneración hepática.

- Matriz extracelular

El daño hepático crónico promueve el desarrollo de fibrosis hepática, que se caracteriza por el hiperacúmulo de proteínas de matriz extracelular incluyendo el colágeno, produciendo una cicatriz fibrosa que distorsiona la arquitectura hepática y causa la disfunción de las células hepáticas. El factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) tiene un rol esencial en la fibrogénesis hepática, actuando como un potente mitógeno. La inducción de PDGF y de su receptor PDGFR- β ha sido documentada en modelos murinos de lesión hepática aguda (CCl₄). Además, la expresión de las distintas isoformas de PDFG en modelos murinos ha demostrado estar relacionada con la inducción fibrosis hepática¹¹⁴.

HGF, sin embargo, es una citoquina antifibrótica bien conocida, y su liberación ha demostrado atenuar la fibrosis hepática en numerosos modelos *in vivo*. Se cree que su efecto antifibrótico

está mediado por la inhibición de la expresión de determinadas citoquinas fibrogénicas, como son el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) y PDGF. En un estudio llevado a cabo por Kim et al¹¹⁵ se comparó la infusión directa de CSM en el bazo de ratas con fibrosis hepática, con la infusión de CSM junto con HGF. Se comprobó que, aunque el tratamiento con CSM reducía el grado de fibrosis hepática, el tratamiento con CSMs/HGF producía una reducción más significativa, y que ésta estaba asociada con niveles elevados de HGF en la vena porta. Los niveles de PDGF se encontraban significativamente disminuidos.

Además, en este segundo grupo la reducción del grado de fibrosis se acompañaba de una mejoría en la función de los hepatocitos. Esta disminución de los niveles de colágeno, se acompañaba en el grupo del tratamiento combinado de un aumento de la expresión de MMP9, MMP13 y MMP14.

Hipótesis de trabajo

Hay datos experimentales y clínicos que indican que las células *stem* derivadas de la médula ósea (CSMO) pueden contribuir de manera decisiva en los fenómenos de reparación tisular producidos en las enfermedades hepáticas. Sin embargo, la mayoría de los datos provienen de modelos animales de enfermedad hepática y no se conoce bien el papel de estas células en los distintos tipos de enfermedades hepáticas en el humano. Nuestra hipótesis es que las CSMO juegan un papel importante sobre todo en los procesos agudos o de reagudización de la lesión hepática y que este efecto, como ya ha sido descrito, está mediado por la producción de distintas citoquinas y factores de crecimiento que estimulan el reclutamiento de la CSMO a nivel hepático.

Objetivos generales

Estudiar el papel de las CSMO en la regeneración hepática en pacientes con distintos tipos de enfermedad hepática: Hepatitis aguda, enfermedad hepática crónica reagudizada (ACLF) y hepatopatía crónica descompensada. Para ello nos proponemos:

1. Estudiar la movilización de las CS de médula ósea en los tres grupos de pacientes.
2. Estudiar la presencia de citoquinas relacionadas con el proceso de migración y "*homing*" de las CSMO, en sangre periférica.
3. Ver si la concentración de estas citoquinas y factores es mayor a nivel local y por lo tanto están relacionadas con la presencia de lesión hepática.
4. Estudiar la expresión de proteínas relacionadas con el proceso de migración y "*homing*" de las CSMO en tejido hepático en los tres grupos de pacientes.
5. Estudio del efecto del cultivo in vitro conjunto de hepatocitos humanos con CSMO en presencia o ausencia de los factores y citoquinas movilizados ante enfermedad hepática, sobre la función específica de hepatocitos, la proliferación celular, la diferenciación a distintos tipos celulares y los mecanismos implicados.

La consecución de los objetivos mencionados permitiría conocer el papel regenerador de la médula ósea 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.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO:

Con el fin de alcanzar los objetivos propuestos se diseñó un estudio transversal, observacional y con recogida de datos prospectiva.

En él se incluyeron 55 pacientes mayores de 18 años ingresados en el Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Clínico Lozano Blesa (Zaragoza, España), previa firma del consentimiento informado (Anexo 1) aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA).

Los pacientes fueron incluidos en el estudio en base a una serie de criterios clínicos, criterios de inclusión y divididos en tres grupos:

- Hepatitis aguda grave: definida por valores de ALT mayores de 500, ictericia y un INR mayor de 1,5.
- Cirrosis hepática descompensada según criterios clínico-biológicos, radiológicos o histológicos: presencia de hipertensión portal (ascitis o varices esofágicas, circulación colateral), concentración de plaquetas en sangre mayor de 150000/mm³ y encefalopatía hepática.
- Fallo hepático agudo sobre crónico (ACLF): esta entidad fue redefinida según los criterios de la Asociación Asio-Pacífica para el Estudio del Hígado como: ictericia (bilirrubina sérica mayor de 5 mg/dl) y coagulopatía (INR mayor de 1,5), complicada en el plazo de 4 semanas por ascitis y/o encefalopatía en un paciente diagnosticado previamente o no diagnosticado de enfermedad crónica hepática.

Los criterios de exclusión aplicados en la selección de pacientes para el estudio fueron los siguientes:

- Mayores de 65 años.
- Infección activa, excluyéndose aquellos pacientes con aumento de reactantes de fase aguda (leucocitosis +/- neutrofilia, elevación proteína C reactiva (PCR) por encima de 0,5 mg/dl y hemocultivos, urocultivo o cultivo de líquido ascítico positivos).
- Hepatocarcinoma diagnosticado mediante tomografía computerizada (TC), resonancia magnética hepática (RM) o biopsia hepática, siguiendo los criterios de la EASL (*European Association for the Study of the Liver*)¹¹⁶.
- Hemorragia grave (descenso de la hemoglobina mayor de 2 g/dl) en los 30 días previos al ingreso.

- Enfermedad grave extrahepática (cáncer, insuficiencia cardíaca o respiratoria, insuficiencia renal).
- Ausencia de consentimiento informado.

Una vez aplicados estos criterios, los pacientes incluidos en el estudio se distribuyeron de la siguiente manera (Figura 3):

- Grupo de hepatitis aguda grave: fueron incluidos 22 pacientes.
- Grupo de cirrosis hepática descompensada: fueron incluidos 25 pacientes.
- Grupo de ACLF: fueron incluidos 8 pacientes.

Además, se incluyeron 16 controles sanos ajustados por sexo y edad, a los que se les extrajeron muestras de sangre periférica.

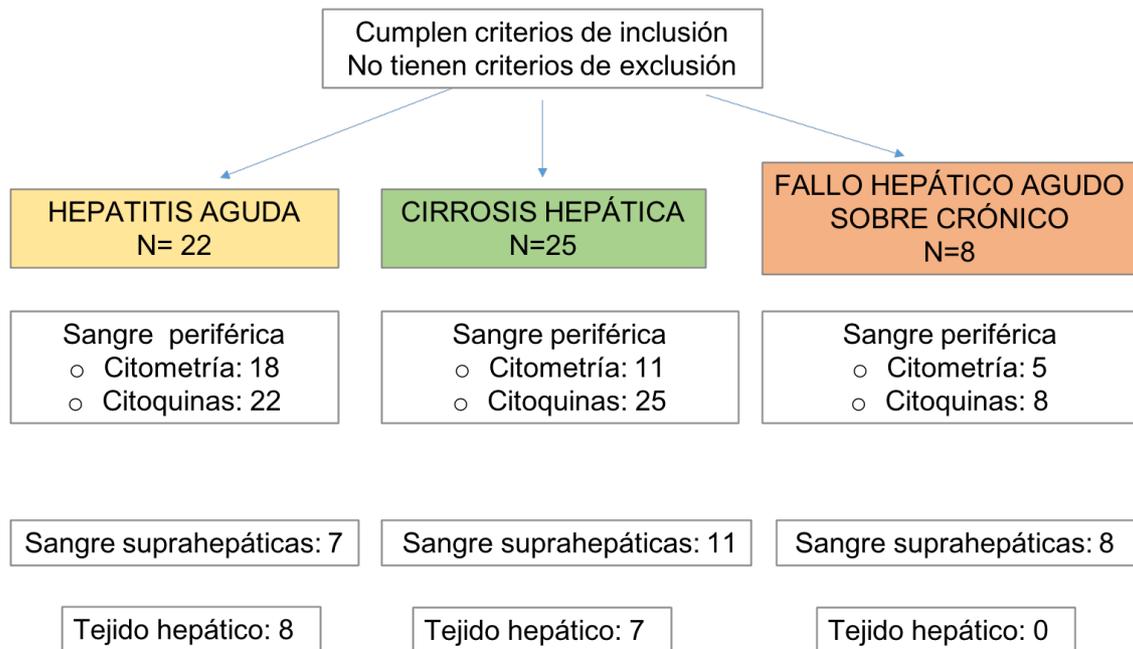


Figura 3. Diseño del estudio. Pacientes incluidos en cada grupo.

De los pacientes seleccionados para el estudio, en los que se realizó biopsia hepática transyugular o Trasplante Hepático (TH) por indicación médica, se obtuvieron muestras de sangre de venas suprahepáticas y biopsia de tejido hepático. En el caso de los pacientes sometidos a TH, la muestra de sangre se obtuvo previamente a la realización del clampaje de la vena porta.

Por otra parte, durante la realización de los TH se tomaron muestras de tejido de 6 de los donantes para ser estudiadas como muestras de tejido hepático sano, una vez descartada la presencia de enfermedad hepática por el estudio anatomopatológico.

Variables clínicas:

De todos los pacientes se recogieron las siguientes variables:

- Edad
- Sexo
- Etiología de la enfermedad hepática
- Evolución de la enfermedad hepática: alta; TOH; fallecimiento;
- Valores bioquímicos de: bilirrubina, ALT, AST, GGT, FA, INR, actividad protrombina, creatinina, albúmina, leucocitos y fórmula leucocitaria
- Presencia y grado de encefalopatía
- Presencia de ascitis
- Puntuación de Child-Pugh
- Puntuación MELD

Citometría de flujo

Las poblaciones de CSMO en sangre periférica se estudiaron mediante la técnica de citometría de flujo. Para ello se utilizó un citómetro FACSARIA de BD (Figura 4) perteneciente a la Unidad de Separación Celular y Citometría del Hospital Clínico Lozano Blesa.

Previamente al marcaje con anticuerpos específicos, se realizó separación de las células mononucleares mediante centrifugación en Ficoll (Sigma-Aldrich). Para ello se mezclaron la misma cantidad de sangre y de Ficoll, y se centrifugó a 1400 rpm durante 30 minutos, recogiendo la interfase y lavándose dos veces con PBS (*phosphate buffer solution*). Después se bloquearon los receptores Fc con el reactivo bloqueante del receptor de Fc (FCR) humano (Miltenyi), añadiendo por cada 90 μ l de solución de células 10 μ l del reactivo. La muestra se incubó 10 minutos a 4°C. Una vez realizados estos pasos se procedió al marcaje. Para ello se añadieron 10 μ l de cada anticuerpo a 100 μ l de la suspensión celular, excepto en el caso del CD34 en el que se añadían 20 μ l. Se incubó la muestra durante 15 min a 4°C, se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C y finalmente, se lavó con 500 μ l de PBS.

Se realizaron marcajes para los siguientes anticuerpo: anti-CD34 conjugado con Proteína Clorofila Peridinina 5.5 (Percp-Cy) (BD), anti-CD133 conjugado con Ficoeritrina (PE) (Miltenyi

Biotech), anti-cKit conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) (Cytognos) y anti-KDR (Kinase Insert Domain Receptor, sinónimo de VEGFR2) conjugado con Aloficocianina (APC) (R&D systems) y negativas al marcaje con anticuerpos anti-CD45 conjugado con APC-Cy7 (BD). Tras los marcajes con los anticuerpos correspondientes se cuantificó el porcentaje de células positivas para cada uno de ellos. El análisis por citometría de flujo fue realizado en colaboración con la Unidad de separación celular y citometría del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa y del Instituto de Investigación Sanitaria de Aragón (IIS Aragón).

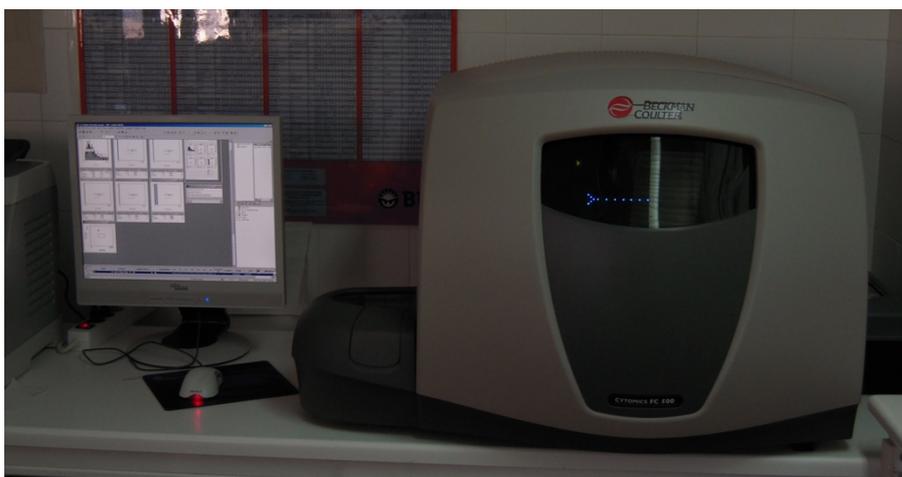


Figura 4. Citómetro de flujo FACSARIA de BD. Unidad de separación celular y citometría. Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.

Factores de crecimiento y citoquinas

Las muestras sanguíneas se centrifugaron durante 5 min a 4°C. La parte de la muestra que no se utilizó para análisis bioquímico fue almacenada a -80°C para el estudio posterior de citoquinas.

Se determinaron mediante ELISA los niveles de distintos factores de crecimiento y citoquinas relacionados con la movilización de CSMO. Estos factores fueron HGF, VEGF, IL-6, IL8, SDF1, SCF, PDGF y MMP9. Todos los kits de ELISA fueron adquiridos a R&D systems y se realizaron siguiendo el protocolo propuesto por la casa comercial en cada kit.

Inmunohistoquímica

Se obtuvieron muestras de tejido hepático en 8 pacientes con cirrosis hepática y en 7 pacientes con hepatitis aguda. Además, se incluyeron 6 muestras control de tejido hepático sano, obtenidas de hígados injertados durante trasplante hepático.

En estas muestras de tejido hepático se estudió mediante tinción inmunohistoquímica con anticuerpos específicos la expresión de VEGF (*Monoclonal Mouse Anti-Human Vascular Endothelial Growth Factor Clone VG1*; dilución 1/75; Dako), CD34 (*Polyclonal Rabbit Anti-Human CD34*; dilución 1/400; Dako), C-kit/CD117 (*Polyclonal Rabbit Anti-Human CD117*; dilución 1/400; Dako), SCF (*mouse monoclonal anti-human SCF antibody*, dilución 1/50; Santa Cruz Biotechnology) y SDF1 (*rabbit polyclonal anti-human SDF1 antibody*; dilución 1/500; Santa Cruz Biotechnology).

Para ello, de las muestras embebidas en parafina se realizaron cortes de 4- μ 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 H₂O₂ 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 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). El procesamiento de las muestras se realizó en el servicio de Anatomía Patológica del ISS Aragón. Una vez obtenidas las imágenes para cada muestra se procedió a cuantificar el porcentaje del área teñida para cada anticuerpo. 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 con respecto al área total.

Análisis estadístico

En primer lugar, se analizó la normalidad de las variables mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Para aquellas variables con distribución normal se realizó análisis de varianza (ANOVA) y las medias entre grupos se compararon mediante análisis post-hoc de Bonferroni y test de t. Para aquellas variables no paramétricas se realizó el test de U de Mann-Whitney U.

Los datos se presentan como valores de la media más menos el error estándar. El nivel de significancia estadística se estableció como p menor de 0.05.

Para el análisis de los datos obtenidos en la inmunohistoquímica, inicialmente 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 realizaron mediante el software SPSS v15.0 para Windows (SPSS Ibérica, Madrid, Spain).

RESULTADOS

VARIABLES CLÍNICAS

Hepatitis aguda

En este grupo se incluyeron 22 pacientes con hepatitis aguda. La edad media fue de $42,6 \pm 17,4$ años, siendo el sexo femenino el predominante (60%). En el 50% de los casos (n:11) la causa fue tóxica, de las cuales el 18% (n:2) fueron por paracetamol; en el 18% (n:4) la causa fue vírica, correspondiendo el 75% (n:3) al VHA (virus de la hepatitis A) y el 25% al VHB (virus de la hepatitis B); el 13,6% (n:3) fue diagnosticado de hepatitis autoinmune (HAI) en fase aguda inicial; en el resto de pacientes (n:4) no se objetivó causa.

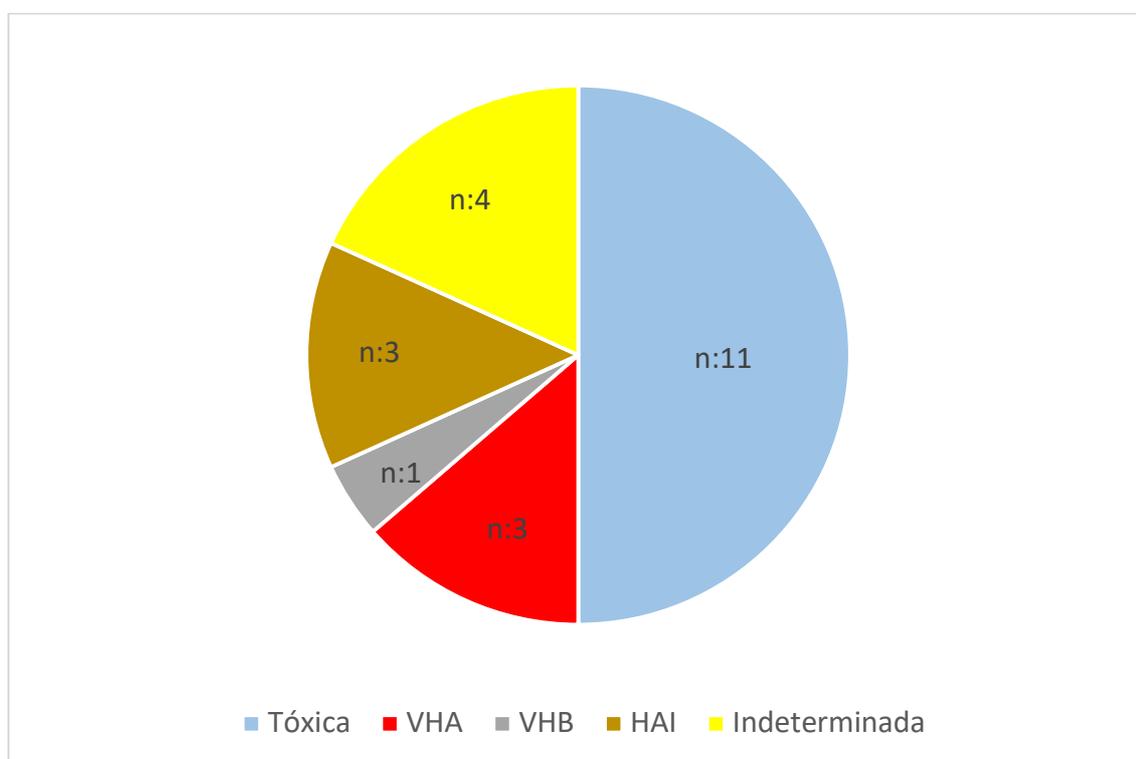


Figura 5. Causas de hepatitis aguda en los pacientes del estudio.

En cuanto a la gravedad de la enfermedad hepática, el MELD medio fue de 19,1, siendo el valor medio de bilirrubina total de 11,1 mg/dl y el INR de 1,87. El 21,7 % (n:5) de los pacientes presentaron encefalopatía durante el ingreso hospitalario, precisando todos ellos trasplante hepático. Ninguno de los pacientes falleció durante el ingreso, es decir, que en el 78,3 % (n: 17) la hepatitis aguda se resolvió de forma espontánea (Tabla 1).

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes incluidos en el grupo de hepatitis aguda.

ALT: alanina aminotransferasa; VHA: virus hepatitis A; VHB: virus hepatitis B; M: masculino; F: femenino; Encef: encefalopatía, TOH: trasplante ortotópico de hígado.

Paciente	Edad	Sexo	MELD	Bilirrubina (mg/dl)	Protrombina (%)	Encef.	Etiología	ALT (UI)	Evolución
1	48	M	19	19	68	No	Autoinmune	2131	Curación
2	50	F	24	20,95	31	Sí	Autoinmune	781	TOH
3	27	M	22	16,23	31	No	VHB	2358	Curación
4	61	F	24	12,35	36	No	Tóxica	2150	Curación
5	46	M	8	1,64	101	No	Indeterminada	1399	Curación
6	38	F	6	0,47	104	No	Paracetamol	1443	Curación
7	38	M	17	8,09	71	No	VHA	3676	Curación
8	21	F	21	10,77	52	No	VHB	1967	Curación
9	33	F	24	13,27	38	No	Tóxica	684	Curación
10	20	M	18	15,26	84	No	VHA	1373	Curación
11	68	M	8	1,6	104	No	Tóxica	1076	Curación
12	81	M	20	17,84	73	No	Tóxica	458	Curación
13	33	F	22	20	61	No	Tóxica	2897	Curación
14	50	M	11	2,98	138	No	Tóxica	1218	Curación
15	66	F	16	13,95	114	No	Autoinmune	1718	Curación
16	45	F	17	0,71	132	No	Indeterminada	1881	Curación
17	69	F	6	0,93	137	No	Tóxica	235	Curación
18	20	F	25	3,9	23	No	Tóxica	4045	Curación
19	32	F	30	16,29	11	Sí	Indeterminada	2122	TOH
20	26	M	29	11	32	Sí	Paracetamol	3010	TOH
21	35	F	34	25,8	19	Sí	Indeterminada	1115	TOH
22	31	F	29	10	26	Sí	Indeterminada	3800	TOH

- Cirrosis hepática:

En este grupo se incluyeron 25 pacientes diagnosticados previamente de cirrosis hepática, que ingresaron en el hospital por descompensación edematoascítica (76%), encefalopatía hepática (16%) o ambas (8%). La edad media fue de $58,7 \pm 9,2$ años, siendo el sexo predominante el masculino (72%). La causa de hepatopatía más frecuente fue el alcohol (36%), seguida por el VHC (32%). En un paciente (4%) la hepatopatía fue mixta (alcohol más VHC (virus de la hepatitis C)). Otras causas de hepatopatía fueron el VHB (8%) y la de origen criptogénico (20%). En cuanto a la gravedad de los pacientes al ingreso, el MELD medio fue de 16, mientras que el CHILD-PUGH fue de 9,04 (Tabla 2). El 32,1% de estos pacientes precisó de trasplante hepático, mientras que 2 pacientes (8%) fallecieron durante el ingreso.

Tabla 2. Características clínicas de los pacientes incluidos en el grupo de cirrosis hepática descompensada.

VHC: virus hepatitis C; OH: alcohol; ALT: alanina aminotransferasa; M: masculino; F: femenino.

Paciente	Edad	Sexo	MELD	Child-Pugh	Bilirrubina (mg/dl)	Protrombina (%)	Etiología	ALT (UI)
1	55	F	27	11	8,28	27	Alcohol	22
2	50	F	9	10	2,68	54	Alcohol	27
3	49	M	21	8	9,33	46	Alcohol	15
4	66	M	10	7	1,31	70	Alcohol	23
5	54	M	12	9	1,74	65	OH, VHC	44
6	75	M	17	10	3,35	47	Criptogenética	14
7	68	M	8	5	1,23	87	Alcohol	13
8	81	M	8	5	0,84	96	Criptogenética	20
9	46	M	22	11	7,84	40	VHC	130
10	61	F	16	7	1,72	59	VHC	57
11	49	M	21	11	7,6	43	VHC	40
12	76	M	12	9	2,44	78	Alcohol	16
13	53	M	20	12	5,4	53	VHC	62
14	55	M	20	10	4,8	48	Alcohol	27
15	61	M	29	9	39	53	VHB	38
16	59	F	7	7	0,39	87	VHC	34
17	54	F	21	11	5,94	42	VHB	77
18	54	F	11	8	2,87	86	Criptogenética	32
19	65	M	13	9	2	65	Criptogenética	26
20	52	M	17	9	7,5	64	Criptogenética	77
21	58	M	18	9	8,7	62	VHC	65
22	60	F	14	10	3,4	65	VHC	41
23	59	M	18	9	8,2	64	VHC	65
24	45	M	14	9	3,1	65	Alcohol	60
25	63	M	15	11	5	66	Alcohol	20

- Fallo agudo sobre crónico:

Se incluyeron 8 pacientes con ACLF. La edad media de los pacientes fue de $49,8 \pm 14,8$ años de edad, siendo el porcentaje de sexo masculino y femenino el mismo. La causa más frecuente de la enfermedad hepática de base fue la autoinmune (62,5 %), seguida por el alcohol (25 %), y el VHB (12,5 %). En cuanto a los índices de gravedad de la enfermedad hepática, el MELD medio fue de 23,8, siendo el CHILD-PUGH medio de 10,75 (Tabla 3). 2 de los pacientes (25 %) fallecieron durante el ingreso hospitalario, mientras que otro precisó de la

realización de un trasplante hepático. En 7 de ellos fue precisa la realización de una biopsia hepática por vía transyugular.

Tabla 3. Características clínicas de los pacientes con ACLF.

ALT: alanina aminotransferasa; VHB: virus hepatitis B; M: masculino; F: femenino.

Paciente	Edad	Sexo	MELD	Child-Pugh	Bilirrubina (mg/dl)	Protrombina (%)	Etiología	ALT (UI)
1	47	F	28	14	9,44	17	Alcohol	20
2	41	M	26	12	20,96	38	Autoinmune	449
3	52	F	20	13	4,9	40	Autoinmune	272
4	36	M	23	8	16,3	50	Autoinmune	1984
5	47	M	28	12	16,13	32	Alcohol	2390
6	55	F	23	8	15,26	49	VHB	1039
7	64	F	23	10	27,33	56	Autoinmune	1241
8	57	M	20	9	12,93	62	Autoinmune	541

Tabla 4. Variables clínicas medias de los grupos a estudio.

M: masculino; F: femenino; MELD: *Model of end stage liver disease*; INR: *international normalized ratio*; ALT: alanina aminotransferasa; AST: aspartato aminotransferasa; ACLF: *acute on chronic liver failure*.

	Edad	Sexo (%)	MELD	Child	Bilirrubina (mg/dl)	INR	Creatinina (mg/dl)	Albúmina (g/dL)	ALT (UI)	AST (UI)
Aguda (n:22)	42,6	M: 40 F: 60	19		11	1,89	0,8	3,3	2292	2153
Crónica (n:25)	58,7	M: 72 F: 28	16	9,04	5,7	1,50	0,8	3,2	41,8	74,12
ACLF (n:8)	49,9	M:50 F: 50	23,9	10,7	15,4	2,04	0,83	2,85	992	1123

- Grupo control

En este grupo se incluyeron 16 individuos sanos. La edad media de este grupo control fue de $48,2 \pm 9,01$ años, siendo el porcentaje de sexo femenino y masculino el mismo (50%) (Tabla 6).

Tabla 5. Características demográficas de los individuos incluidos en el grupo control.

F: femenino; M: masculino.

Individuo	Edad	Sexo
1	55	F
2	52	F
3	56	F
4	56	M
5	45	M
6	65	F
7	49	F
8	36	F
9	30	F
10	30	M
11	51	M
12	55	M
13	47	M
14	28	M
15	57	F
16	60	M

CITOMETRÍA, CITOQUINAS, INMUNOHISTOQUÍMICA

- Hepatitis aguda

○ Citometría:

En este grupo de pacientes se visualizó en sangre periférica un mayor porcentaje de células marcadas con CD34+ es decir, una mayor movilización de CSMO, con respecto al grupo control ($0,091 \pm 0,02$ vs $0,046 \pm 0,01$; $p < 0,01$). También se constató un mayor porcentaje de células VEGFR2+ en este grupo con respecto al grupo control ($0,062 \pm 0,018$ vs $0,021 \pm 0,003$; $p < 0,05$). El resto de los parámetros estudiados (ckit, CXCR-4, CD-133) no presentaron diferencias significativas (Figura 6).

Destacar que el porcentaje de células CD34+ en este grupo de pacientes se correlacionó positivamente de forma significativa con parámetros clínicos de gravedad como son la bilirrubina ($r=0,388$, $p < 0,05$) y el INR ($r=0,561$, $p < 0,001$).

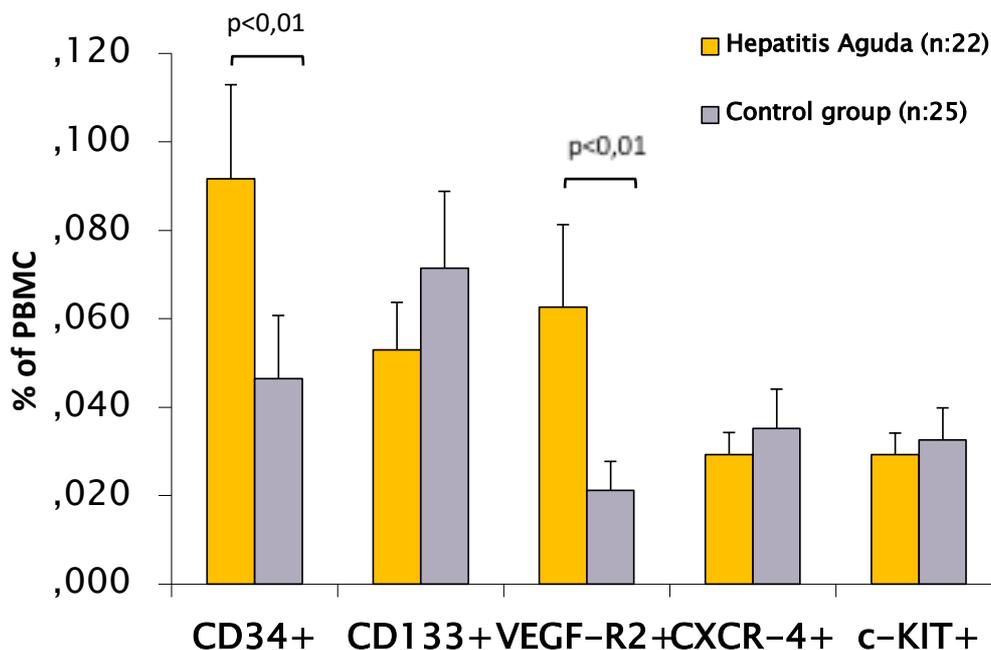


Figura 6. Citometría de flujo. Porcentaje de células marcadas para cada anticuerpo (media \pm error estándar de la media). Comparación entre grupo de hepatitis aguda y grupo control.

○ Factores de crecimiento y citoquinas:

Estas alteraciones citométricas se acompañaron de un aumento de los niveles séricos de HGF, que fueron significativamente superiores en los pacientes con hepatitis aguda frente a los individuos sanos ($6224,7 \pm 1188,1$ pg/ml vs $816,6 \pm 47,7$ pg/ml; $p < 0,05$). Resultados similares se obtuvieron en el caso de IL-8 ($143,5 \pm 29,9$ pg/ml vs $20,7 \pm 4,9$ pg/ml; $p < 0,05$), VEGF ($478,2 \pm 93,3$ pg/ml vs $227 \pm 39,4$ pg/ml; $p < 0,05$), IL-6 ($19,7 \pm 11,3$ pg/ml vs $1,1 \pm 0,31$ pg/ml; $p < 0,001$) y SDF-1 ($2817,4 \pm 119,4$ pg/ml vs $2458,9 \pm 71,5$ pg/ml; $p < 0,05$) (Figura 7). Sin embargo, no se objetivaron diferencias entre este grupo y el grupo control en el caso de otros factores como SCF, PDGF y MMP9. En el caso de los factores humorales, se constató una correlación positiva significativa entre los niveles de HGF y los niveles de AST ($r = 0,492$, $p < 0,01$) y ALT ($r = 0,402$, $p < 0,05$). Los niveles de HGF también se correlacionaron con el MELD ($r = 0,316$, $p < 0,05$) y con la actividad de protrombina ($r = 0,302$, $p = 0,074$), aunque esta última correlación no alcanzó significación estadística. Sin embargo, sí que se halló correlación estadísticamente significativa entre el porcentaje de células CD34+ y los niveles de HGF ($r = 0,346$, $p < 0,05$) y los de VEGF ($r = 0,596$, $p < 0,001$).

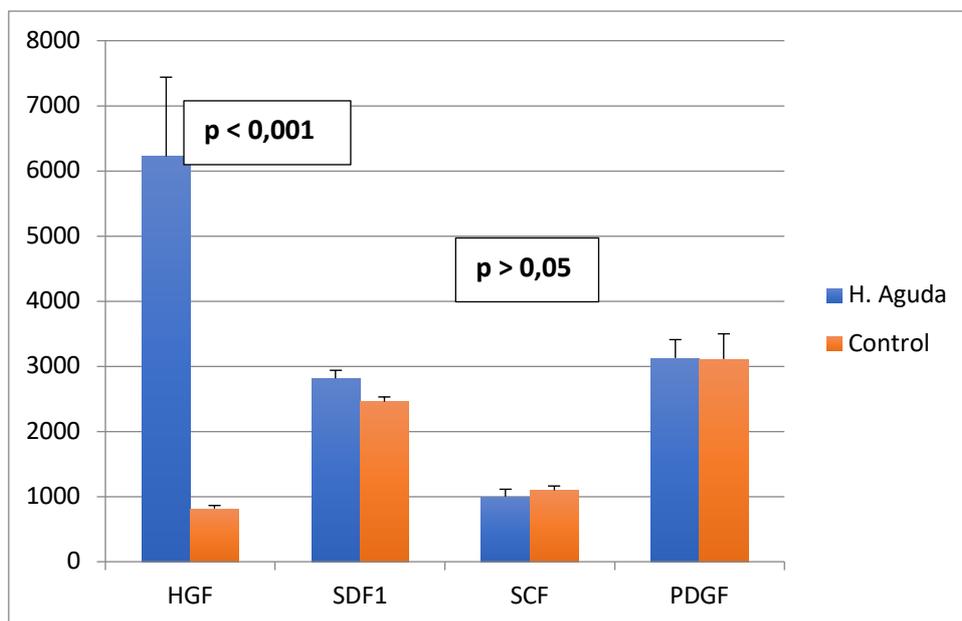


Figura 7. Niveles medios y error estándar de la media de HGF, SDF1, SCF y PDGF en sangre periférica en pacientes con hepatitis aguda (pg/ml).

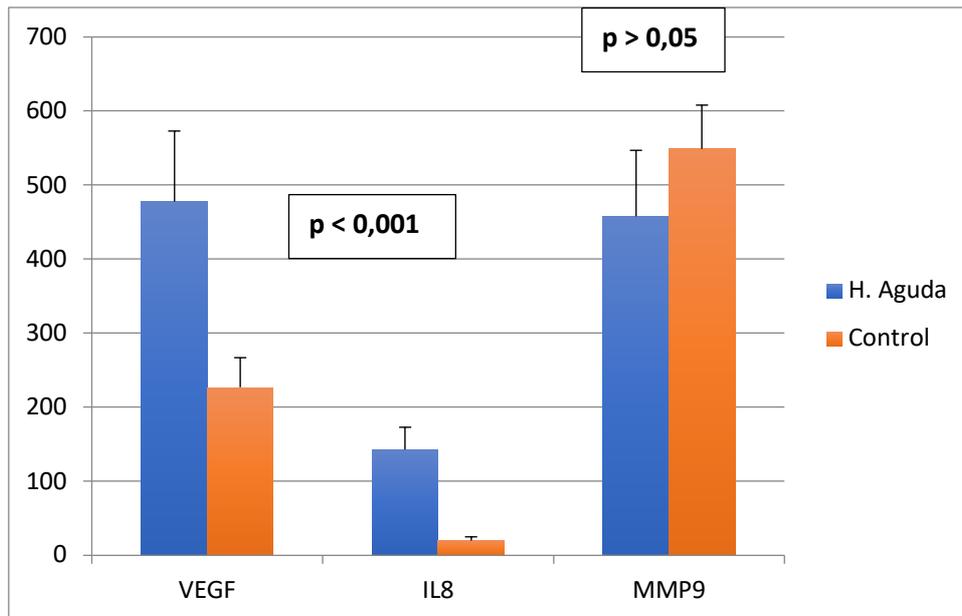


Figura 8. Niveles medios y error estándar de la media de VEGF, IL-8 y MMP9 en sangre periférica en pacientes con hepatitis aguda (pg/ml).

Además, en este grupo de pacientes se objetivó una mayor presencia de HGF en venas suprahepáticas respecto a sangre periférica, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($26683 \pm 7563,9$ pg/ml vs $8724 \pm 1439,1$ pg/ml, $p < 0,05$). Al contrario que en el caso de HGF, los valores de VEGF fueron superiores en sangre periférica respecto a los visualizados en venas suprahepáticas en este mismo grupo ($229,3 \pm 60,6$ pg/ml vs $143,6 \pm 56,2$ pg/ml; $p < 0,05$) (Figura 8). Para el resto de los factores y citoquinas estudiadas (IL6 e IL8) no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

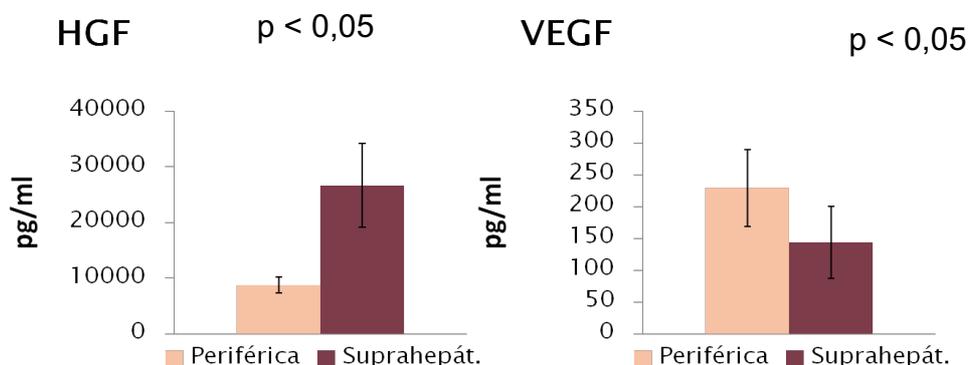


Figura 9. Valores medios y error estándar de la media de HGF y VEGF en sangre periférica y de venas suprahepáticas en pacientes con afectación hepática aguda.

○ Inmunohistoquímica

Se analizaron muestras de tejido hepático de 8 pacientes incluidos en el grupo de hepatitis aguda. Para estos pacientes, en el estudio realizado en tejido se detectó un marcado incremento de células CD34+, localizado principalmente en los sinusoides hepáticos, apreciándose diferencias significativas con respecto al grupo control (Figura 10. A, C).

El porcentaje de área teñida por c-kit no difirió significativamente entre las muestras procedentes de pacientes con hepatopatía aguda y aquellas procedentes de individuos sanos (grupo control) siendo en pacientes con hepatopatía aguda de $0,13 \pm 0,018 \%$ y para individuos sanos de $0,12 \pm 0,036 \%$ ($p > 0,05$).

El porcentaje de área teñida por SCF no fue significativamente diferente en los pacientes con hepatopatía aguda frente a individuos sanos, siendo en pacientes con hepatopatía aguda de $0,22 \pm 0,068 \%$ y para individuos sanos de $0,28 \pm 0,054 \%$ (Figura 11). Su nivel de significación fue de 0,532 ($p > 0,05$). Este dato se interpreta como que no hay diferencias significativas entre pacientes con hepatopatía aguda e individuos sanos para SCF (Figura 12).

También se estudiaron muestras marcadas con VEGF, pero debido a que existen pocos datos, no se pudo llevar a cabo un análisis estadístico de los mismos.

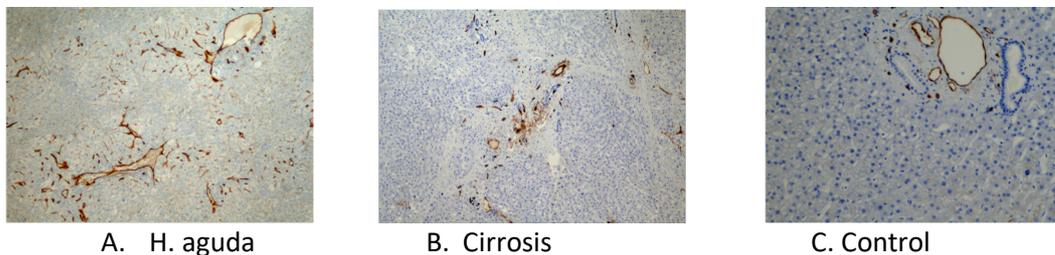


Figura 10. Tinción frente a CD 34 (X10)

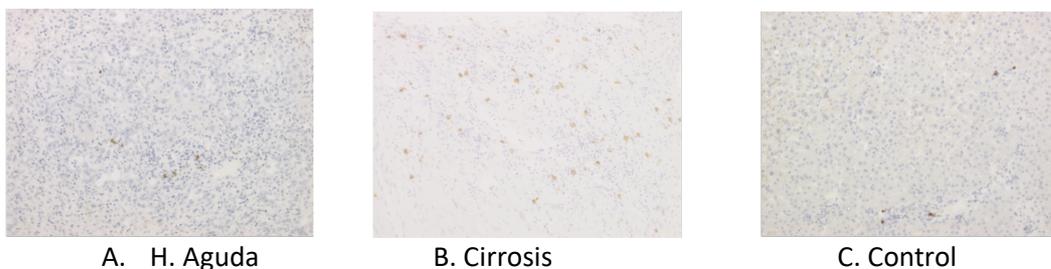


Figura 11. Tinción frente a ckit (X10)

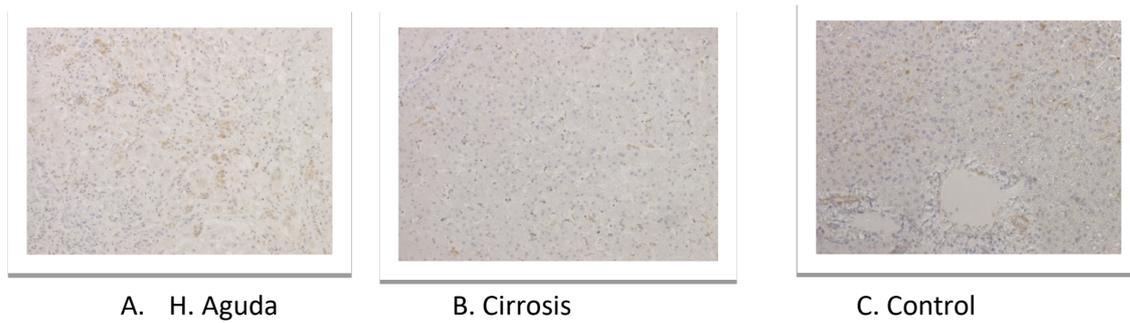


Figura 12. Tinción frente a SCF (X10)

- Cirrosis hepática

○ Citometría

En este grupo de pacientes el porcentaje de células CD34+ en sangre periférica fue similar al obtenido en el grupo control ($0,042 \pm 0,006$ vs $0,046 \pm 0,01$; $p > 0,05$) (Figura 12). Tampoco se visualizaron diferencias entre ambos grupos en cuanto al porcentaje de células VEGFR+ ni en el porcentaje de células ckit+, CD133 o CXCR4 entre los grupos a estudio.

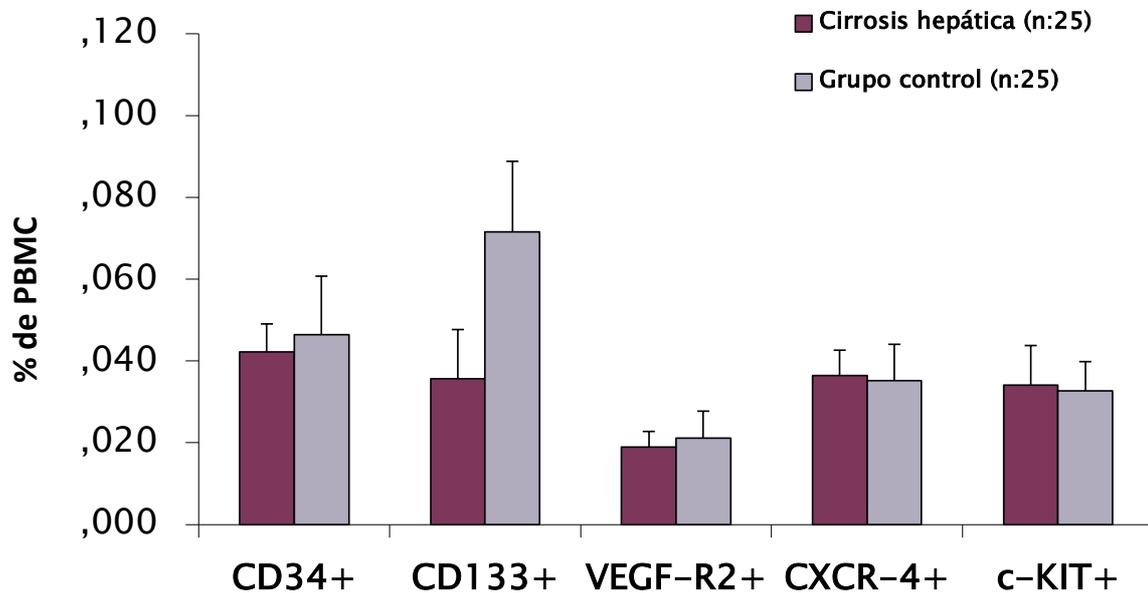


Figura 13. Porcentaje de células marcadas para cada anticuerpo (media \pm error estándar de la media). Comparación entre grupo de cirrosis y grupo control.

○ Factores de crecimiento y citoquinas

En cuanto a los factores de crecimiento y citoquinas cuantificados en sangre periférica, se objetivó, al igual que en el grupo de hepatitis agudas, un incremento significativo con respecto al grupo control de HGF ($2657,4 \pm 316,5$ pg/ml vs $816,5 \pm 47,7$ pg/ml; $p < 0,001$), IL-8 ($61,9 \pm 8,4$ pg/ml vs $20,7 \pm 4,9$ pg/ml; $p < 0,001$), IL-6 ($39,5 \pm 17,3$ pg/ml vs $1,1 \pm 0,31$ pg/ml; $p < 0,001$) y SDF-1 ($3297,2 \pm 126,6$ pg/ml vs $2458,9 \pm 71,5$ pg/ml; $p < 0,001$). Se obtuvieron similares resultados con SCF, aunque en este caso las diferencias no alcanzaron significación estadística ($p = 0,08$). Sin embargo, y al contrario de lo que ocurría en el grupo anterior, las cifras de VEGF fueron significativamente menores en el grupo de pacientes cirróticos con respecto al grupo control ($126,4 \pm 20,7$ pg/ml vs $227 \pm 39,4$ pg/ml; $p < 0,05$) (Figuras 13 y 14). El mismo resultado se obtuvo para PDGF ($1244,2 \pm 187,6$ pg/ml vs $3112,8 \pm 380$ pg/ml; $p < 0,001$) y MMP9 ($283,3 \pm 45,8$ pg/ml vs $549,7 \pm 59,1$ pg/ml; $p < 0,001$).

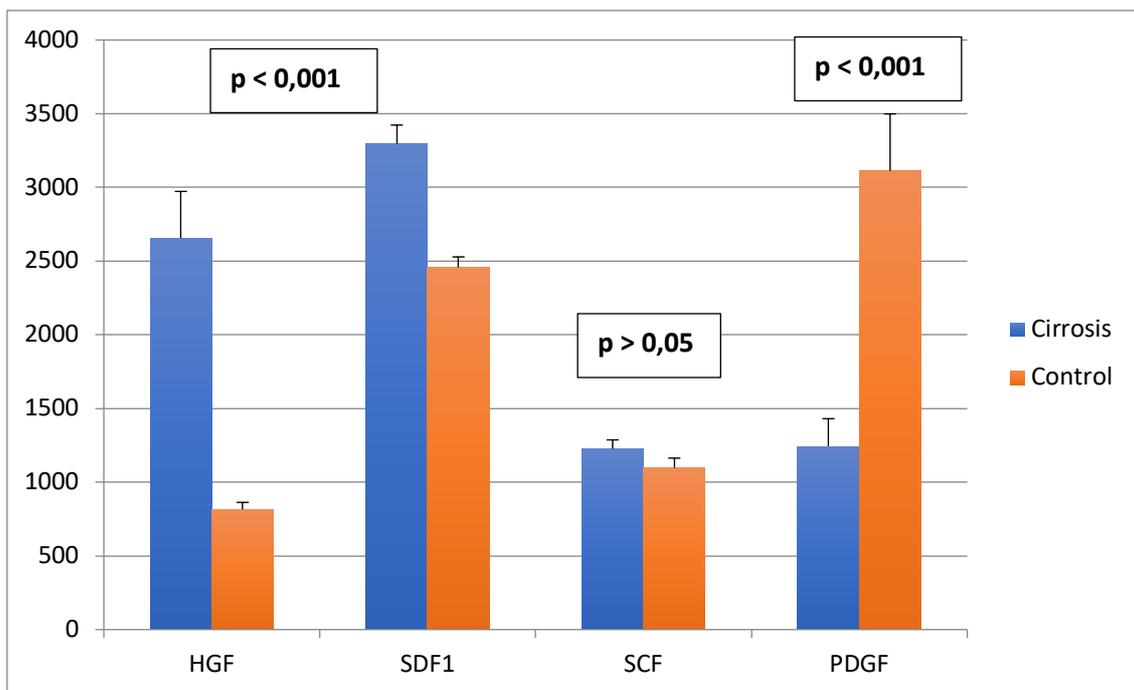


Figura 14. Niveles medios y error estándar de la media de HGF, SDF1, SCF y PDGF en sangre periférica. Comparación entre grupo de cirrosis hepática y grupo control (pg/ml).

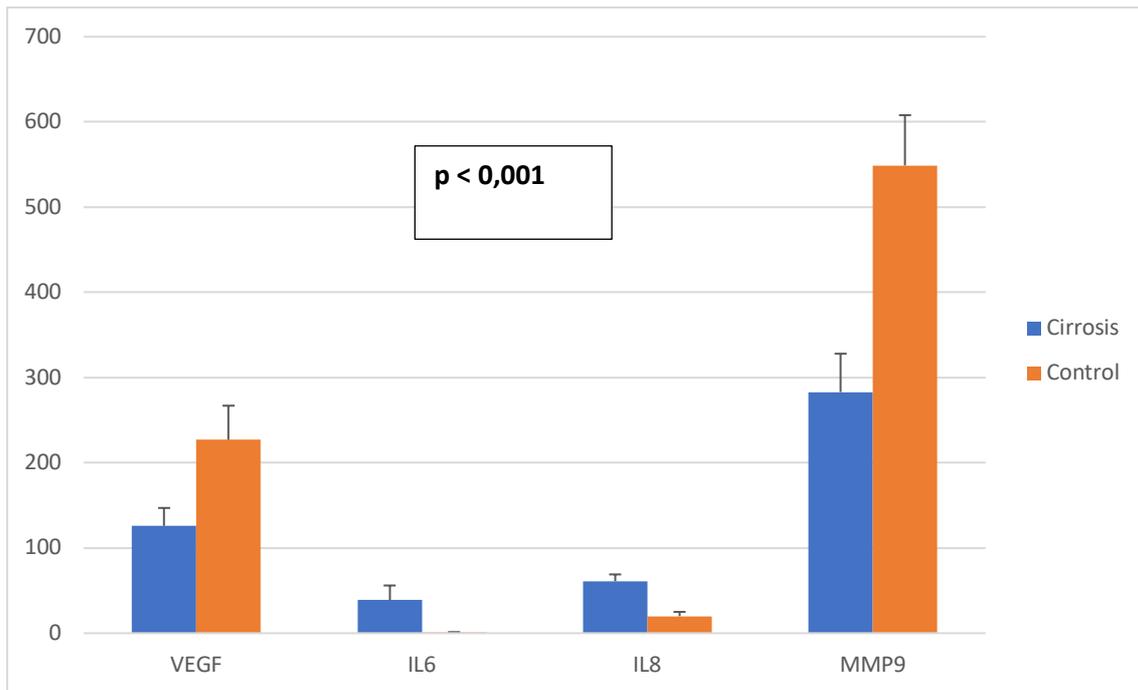


Figura 15. Niveles medios y error estándar de la media de VEGF, IL6, IL8 y MMP9 en sangre periférica. Comparación entre grupo de cirrosis hepática y grupo control (pg/ml)

En el caso de los pacientes con cirrosis hepática, se constató un aumento significativo de IL-8 en sangre de venas suprahepáticas, en comparación con la cuantificada en sangre periférica ($77,05 \pm 25,68$ pg/ml vs $57,68 \pm 19,23$ pg/ml; $p < 0,05$) (Figuras 15 y 16). Para el resto de los factores y citoquinas estudiadas no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para los distintos grupos. Se objetivó una tendencia a que existiera una mayor presencia de HGF en venas suprahepáticas con respecto a sangre periférica ($3603,5 \pm 1086,49$ pg/ml vs $2923,6 \pm 881,5$ pg/ml), sin constatarse significación estadística ($p > 0,05$). Lo mismo ocurrió en el caso de VEGF, en el que existía una tendencia similar al caso de los pacientes con afectación aguda, sin alcanzarse diferencias significativas ($85,9 \pm 25,9$ pg/ml en sangre periférica vs $58,6 \pm 17,68$ pg/ml en suprahepáticas; $p > 0,05$).

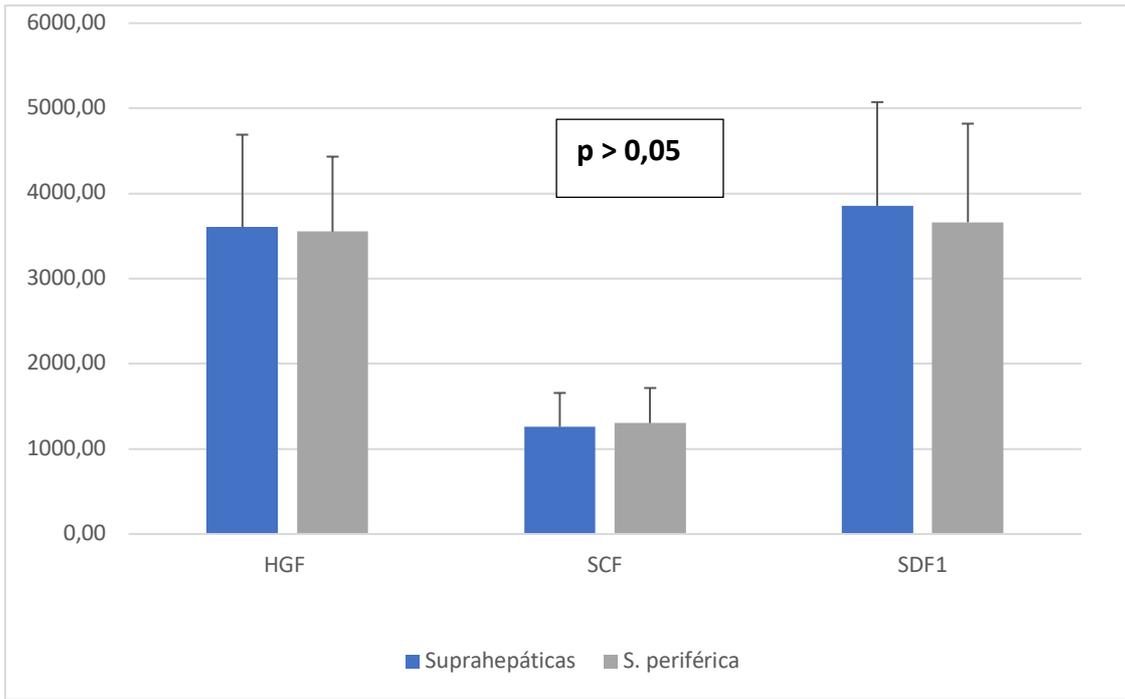


Figura 16. Niveles medios y error estándar de la media de HGF, SCF y SDF1 en sangre periférica y de venas suprahepáticas en pacientes con cirrosis hepática (pg/ml).

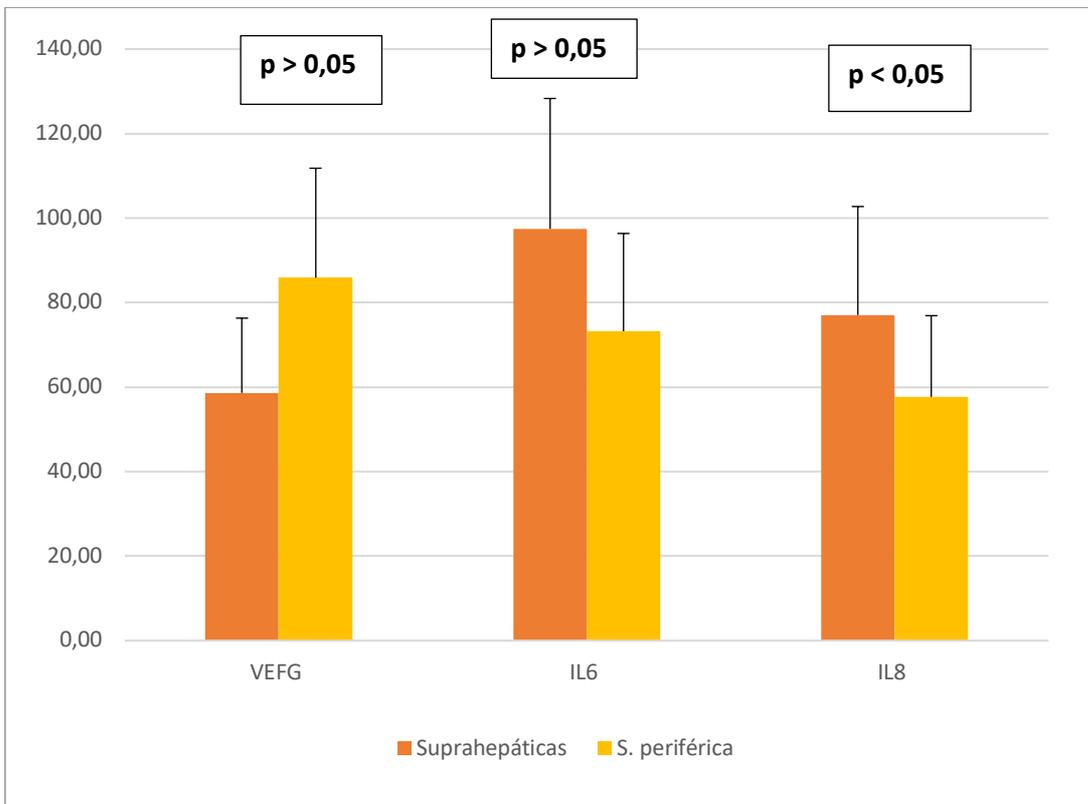


Figura 17. Niveles medios y error estándar de la media de VEGF, IL-6 e IL-8 en sangre periférica y de venas suprahepáticas en pacientes con cirrosis hepática (pg/ml).

○ Inmunohistoquímica

Se analizaron muestras de tejido hepático de 7 pacientes incluidos en el grupo de cirrosis hepática.

En el estudio realizado en tejido no se objetivó tinción sinusoidal de CD34, al contrario de lo que ocurría en el grupo de hepatitis agudas (Figura 10B). Sin embargo, estos pacientes presentaron una mayor expresión ($p < 0,05$) de c-kit en tejido hepático con respecto a los pacientes agudos y los individuos sanos, localizado principalmente a nivel periportal. El porcentaje de área que marcaba para c-kit fue mayor en pacientes con enfermedad hepática crónica frente a individuos sanos, siendo en pacientes con enfermedad hepática crónica de $0,29 \pm 0,065$ % y para individuos sanos de $0,12 \pm 0,036$ %. Estos grupos presentaron también diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$).

El porcentaje de área que marcaba para c-kit fue mayor en pacientes con enfermedad hepática crónica frente a pacientes con hepatopatía aguda, objetivándose diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$) (Figura 16).

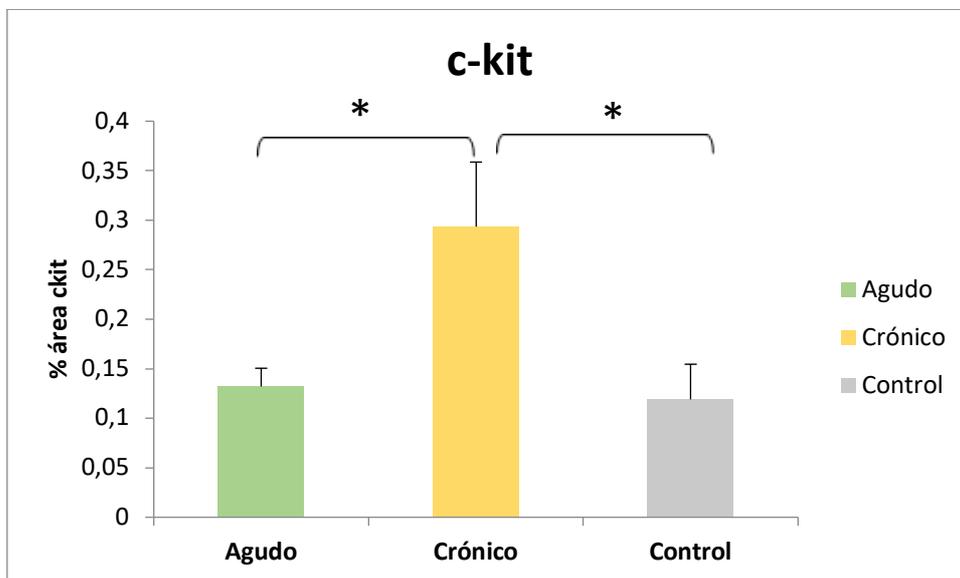


Figura 18. Porcentajes de áreas marcadas de c-kit en los distintos grupos a estudio y error típico. * ($p < 0,05$)

El área teñida por SCF no fue significativamente ($p > 0,05$) diferente en los pacientes con enfermedad hepática crónica frente a los individuos sanos, siendo en pacientes con enfermedad hepática crónica de $0,26 \pm 0,03 \%$ y para individuos sanos de $0,28 \pm 0,054 \%$ (Tabla 7). Sí que se cuantificó un porcentaje del área teñida por SCF algo superior en los pacientes con enfermedad hepática crónica frente a los pacientes con hepatopatía aguda ($0,26 \pm 0,03 \%$ vs $0,22 \pm 0,068 \%$), aunque sin alcanzar significación estadística ($p > 0,05$) (Figura 17).

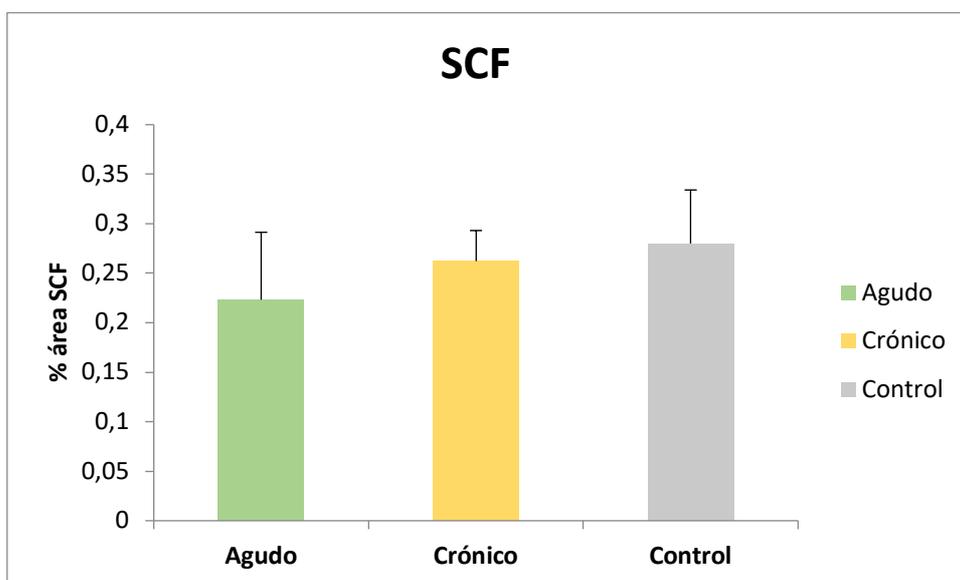


Figura 19. Porcentajes de áreas marcadas de SCF en los distintos grupos a estudio y error típico.

Tabla 6. Inmunohistoquímica. N, media y error estándar (e.e) de c-kit y SCF para cada grupo a estudio.

Grupo	Medición (% área)	c-kit	SCF
Agudo	Media ± e.e.	0,13 ± 0,018	0,22 ± 0,068
	N	8	5
Crónico	Media ± e.e.	0,29 ± 0,065	0,26 ± 0,030
	N	7	6
Control	Media ± e.e.	0,11 ± 0,035	0,28 ± 0,054
	N	6	6

- Fallo agudo sobre crónico

○ Citometría:

En este grupo hubo problemas técnicos con varias de las muestras incluidas, motivo por el cual solo se pudieron analizar seis muestras. No se encontraron diferencias significativas con respecto al grupo control ($0,057 \pm 0,01$ % vs $0,046 \pm 0,008$ %; $p: 0,401$). Tampoco se encontraron diferencias significativas para el resto de marcadores citométricos analizados.

○ Factores de crecimiento y citoquinas:

En este grupo, al igual que en el grupo de hepatitis aguda, se visualizó un aumento significativo de HGF en sangre periférica con respecto al grupo control ($6348,6$ pg/ml \pm $1060,4$ vs $816,6 \pm 47,7$ pg/ml; $p < 0,01$). También se constató un aumento significativo de IL6 e IL8 en este grupo respecto al control ($48,4 \pm 21,7$ pg/ml vs $1,1 \pm 0,3$ pg/ml; $p < 0,01$). Para el resto de citoquinas estudiadas no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre este grupo y los individuos sanos.

Comparando este grupo de pacientes con el de pacientes con cirrosis hepática, destacar que se obtuvieron mayores niveles de HGF en el grupo de pacientes con ACLF ($6348,6 \pm 1060,4$ pg/ml vs $2657,4 \pm 316,5$ pg/ml) y PDGF ($2718,9 \pm 732,5$ pg/ml vs $1244,2 \pm 187,6$ pg/ml) alcanzándose en ambos casos la significación estadística ($p < 0,01$). Por el contrario, los niveles de SDF1 en sangre periférica fueron superiores en el grupo de pacientes cirróticos con respecto a aquellos con ACLF ($3297,2 \pm 126,6$ pg/ml vs $2520,8 \pm 208,1$ pg/ml; $p < 0,01$). Para el resto de factores no se obtuvieron diferencias significativas.

○ Inmunohistoquímica

No se han analizado datos en este grupo de pacientes.

Tabla 7. Niveles medios de citoquinas en sangre periférica (pg/ml) ± EEM.

	Grupo Control	Hepatitis aguda	Cirrosis	ACLF
HGF	816,6 ± 4 7,7	6224,7 ± 1188,1 ^{..}	2657,6 ± 316,5 [*]	6348,6 ± 1060,4
VEGF	227 ± 47,7 ^{^^}	478,2 ± 93,3 ^{..}	126,4 ± 20,7	165,5 ± 58,5
SDF1	2458,9 ± 71,5	2817,4 ± 119,4 ^{**}	3297,2 ± 126,6 [*]	2520,8 ± 208,1
SCF	1098,3 ± 65,9	1000,9 ± 110,9	1228,9 ± 59,5 [^]	1102,2 ± 117,5
IL8	20,7 ± 4,9	143,5 ± 29,9 ^{..}	61,9 ± 8,4 [*]	132,5 ± 36,5
IL6	1,1 ± 0,3	19,8 ± 11,3 [*]	39,4 ± 17,3 ^{^*}	48,4 ± 21,7
PDGF	3112,8 ± 380 ^{^^}	3128,7 ± 275,4 ^{^^}	1244,2 ± 187,6	2718,9 ± 732,5
MMP9	549,7 ± 59,1 ^{^^}	458,1 ± 87,2 ^{^^}	283,3 ± 45,9	337,7 ± 48

Leyenda.

- * p<0,001 vs control
- ^ p<0,001 vs aguda
- .. p<0,001 vs cirrosis y control
- ** p<0,05 vs control
- ^^ p<0,05 vs cirrosis

DISCUSIÓN

En condiciones fisiológicas, tan solo uno de cada 2000-3000 hepatocitos se divide para mantener la masa hepática funcional¹¹⁷. Sin embargo, después de que ocurra la lesión el hígado tiene la capacidad de auto-regenerarse y restaurar su tejido parenquimatoso. El daño hepático o la pérdida de masa hepática puede estimular su capacidad regenerativa de forma extensa hasta que el tejido hepático se recupera mediante la proliferación de células parenquimatosas hepáticas (hepatocitos y colangiocitos). Estas células suponen por tanto la primera y más importante fuente para la reparación del tejido dañado. Sin embargo, en caso de que el daño celular parenquimatoso sea extenso, grave o prolongado en el tiempo, los hepatocitos pueden perder esta capacidad autorenovadora. En este caso, se activa un compartimento de células progenitoras hepáticas (CPH), localizado en los conductillos del árbol biliar intrahepático, que tomaría el relevo^{36,37}. Por otro lado, algunos autores han propuesto que también las CSMO podrían participar en la regeneración hepática, dando lugar a nuevos hepatocitos o a CPH mediante procesos de transdiferenciación o de fusión^{52,53,54}. Si bien, todavía existe controversia a este respecto. Los mecanismos por los cuales estas células migran de MO y son reclutadas por el hígado dañado no han sido del todo aclarados.

Es por esto que el objetivo de nuestro estudio fue investigar la hipótesis de que las células progenitoras procedentes de médula ósea juegan un papel importante en los procesos de regeneración hepática celular cuando se produce daño hepático agudo, agudo sobre crónico o crónico en seres humanos, además de investigar los procesos de migración y anidamiento de estos precursores en el hígado dañado. Para ello analizamos la presencia de determinadas citoquinas y factores de crecimiento, así como de marcadores celulares, tanto a nivel periférico (sangre) como a nivel local (sangre de venas suprahepáticas y tejido hepático). Los resultados obtenidos en los distintos grupos de pacientes fueron comparados con muestras provenientes de controles sanos, tanto de sangre periférica como de tejido hepático.

HEPATITIS AGUDA

Nuestros resultados muestran que en pacientes que han sufrido daño hepático agudo grave se produce una mayor movilización de precursores hematopoyéticos (CD34+) de MO a sangre periférica, en comparación con la apreciada en individuos sanos, siendo las diferencias estadísticamente significativas. Resaltar que dicha movilización se correlaciona positivamente de forma significativa ($p < 0,01$) con parámetros analíticos que muestran gravedad, como son la bilirrubina y el INR. Este aumento de células CD34+ en sangre periférica se acompañó de un

aumento significativo del porcentaje de células VEGFR2+ ($p < 0,01$). Conviene recordar que VEGFR2 también ha sido descrito como marcador de célula precursora endotelial¹¹⁸. Asociada a la significativa movilización de células CD34+ a sangre periférica, observamos una expresión de células CD34+ significativamente incrementada en las muestras de tejido hepático procedentes de pacientes con hepatitis aguda, con respecto al grupo control. Además, se debe destacar que su tinción fue más llamativa en torno a los sinusoides hepáticos. Este hecho podría indicar que las CS procedentes de MO, tras provocarse el daño hepático agudo, migran a sangre periférica, y desde ahí al hígado, donde anidan en torno a los sinusoides. Este hallazgo, unido al aumento en sangre periférica de células VEGFR2+ y al aumento, también significativo ($p < 0,05$), de VEGF en sangre periférica, nos sugiere que VEGF, su receptor VEGFR2 y por tanto la angiogénesis, podrían ser importantes en el inicio de los procesos de regeneración hepática. La vía VEGF/VEGFR ha demostrado ser esencial en la regeneración hepática¹¹⁹. Wang et al¹¹³ demostraron en un modelo de lesión tóxica hepática aguda en ratas que VEGF es responsable de regular el reclutamiento de las CSMO al hígado, así como de su diferenciación a células endoteliales sinusoidales.

En cuanto al resto de marcadores analizados por citometría, no se encontraron en el grupo de pacientes con hepatitis aguda diferencias significativas en el porcentaje de células c-kit+, y CD133+. El hecho de que la movilización de células CD34+ no se acompañe de un porcentaje más elevado de células CD133+, nos sugiere que las células precursoras movilizadas en los procesos de regeneración hepática no sean tan primitivas como se pensaba. Es decir, que cuando son movilizadas a sangre periférica desde MO, las células precursoras se encuentran en un estadio más diferenciado. A pesar de que los niveles cuantificados de SDF-1 en sangre periférica en este grupo de pacientes se encontraba incrementado con respecto al grupo control ($p < 0,05$), no se acompañó de un aumento en el porcentaje de células CXCR4+. Existen pocos estudios a este respecto en humanos. La mayoría de los datos recogidos vienen de estudios en animales. En respuesta a la lesión producida por CCl4 y a la hepatectomía parcial en ratas, se objetivó un aumento en los niveles de SDF-1 y del reclutamiento de progenitores hematopoyéticos CXCR4+, lo cual demostró ser un mecanismo de reparación del tejido hepático importante⁸⁹. Contrariamente, en otro modelo animal de isquemia-reperfusión, la administración de un antagonista de SDF-1 resultó en un aumento de la proliferación hepatocitaria y en la reducción de la necrosis¹²⁰. Tomados en conjunto, los hallazgos indican un papel protector del eje SDF-1/CXCR4 tras la lesión hepática aguda tóxica o isquémica. Sin embargo, cuando se reduce temporalmente el flujo de oxígeno al hígado, la inhibición de esta vía mejoró la regeneración tisular, indicando por tanto un papel perjudicial. Aparte de participar en la movilización de las células hematopoyéticas, CXCR4 también ha demostrado

ser un marcador de actividad inflamatoria, jugando un papel importante en el reclutamiento y activación de leucocitos y células inflamatorias¹²¹. Nuestros resultados podrían indicar que CXCR4, al actuar en la activación de células más maduras, como los leucocitos, tendría un papel más importante en procesos inflamatorios crónicos o relacionados con la cancerogénesis, mientras que tendría un papel menos relevante en los procesos de movilización de precursores hematopoyéticos. No así SDF-1, cuyos niveles séricos elevados tanto en enfermedad hepática aguda como crónica, nos orientan a pensar en un rol importante para esta citoquina en los mecanismos regenerativos hepáticos.

Lemoli et al¹²² investigaron la movilización de CSMO en pacientes a los que se realizaba hepatectomía parcial y en pacientes con cirrosis hepática tras la realización de TOH, cuantificando el porcentaje de células marcadas con distintos anticuerpos (CD34, CD133, VEGFR, CD90 y CD38), además de la concentración de varias citoquinas y factores relacionados con la movilización de estas células (SCF, G-CSF, HGF, SDF-1, VEGF y TNF- α) en sangre periférica previa y posteriormente a la realización de la intervención quirúrgica. En el grupo de pacientes sometidos a hepatectomía parcial, modelo de lesión hepática aguda en el que se basa gran parte de la literatura sobre este tema, la movilización basal, es decir previa a la hepatectomía, de células CD34+ y CD133+ se encontraba reducida con respecto al grupo control. Tras la realización de la hepatectomía, se objetivó un aumento significativo ($p < 0,05$) del porcentaje de células CD34+ con respecto al grupo control, mientras que la movilización de células CD133+ fue similar a la del grupo control, lo cual viene a corroborar los resultados obtenidos por nuestro grupo. Sin embargo, al contrario que en nuestro caso, tampoco se observó una movilización de células precursoras endoteliales (VEGFR+). En otro trabajo previo también se obtuvieron resultados similares, apreciándose tras el daño hepático causado por una hepatectomía parcial una movilización de células CD34+, capaces de diferenciarse en hepatocitos y de iniciar la regeneración hepática¹²³. Sin embargo, en otro estudio llevado a cabo por Di Campli et al¹²⁴, no se observó movilización de CSMO tras la hepatectomía parcial ni en pacientes con ACLF.

Como se ha mencionado previamente, en el trabajo de Lemoli¹²² también se llevó a cabo la cuantificación de citoquinas en sangre periférica. La movilización de células CD34+ se acompañó, tras la realización de la resección hepática, de un aumento significativo ($p < 0,05$) de los niveles séricos de todas las citoquinas cuantificadas (SCF, G-CSF, HGF, SDF-1, VEGF y TNF- α). Estos resultados van en consonancia con los de nuestra tesis. Además de lo ya mencionado sobre VEGF, en el grupo de pacientes con hepatitis aguda se constató, con respecto al grupo control, un aumento significativo ($p < 0,05$, $p < 0,001$) en sangre periférica de HGF, IL-6 y SDF-1. Al contrario de lo que ocurriría en el estudio de Lemoli, los niveles de SCF fueron similares a los

cuantificados en el grupo control. Tampoco se objetivó en estos pacientes una movilización significativa de células c-kit+, ni un aumento en la expresión en tejido hepático del mismo receptor. Así pues, nuestros resultados orientan a un papel menor del eje SCF-c-kit en el reclutamiento de progenitores hematopoyéticos tras el daño hepático agudo.

Los niveles en sangre periférica de HGF, el principal factor involucrado en los procesos de regeneración hepática, estaban significativamente incrementados en este grupo de pacientes con respecto al grupo control ($p < 0,05$). Además, dichos niveles se encontraban más incrementados de forma significativa en sangre de venas suprahepáticas con respecto a los niveles hallados en sangre periférica. Es decir, que la presencia de HGF era superior a nivel local. En un estudio llevado a cabo por Shiota et al¹²⁵, se cuantificaron los niveles de HGF en sangre periférica de pacientes con distintos tipos de hepatopatía. Los niveles séricos de HGF fueron significativamente superiores en todos los grupos de hepatopatías (hepatitis aguda, cirrosis, fallo hepático fulminante, HCC) con respecto al grupo control. Además, dichos niveles, al igual que en nuestro estudio, exhibieron una correlación positiva con parámetros séricos de gravedad, como son los niveles de bilirrubina sérica. Si bien estos autores encontraron una correlación negativa con otros parámetros de gravedad como los niveles séricos de albúmina y con el tiempo de protrombina, mientras que nosotros vimos una correlación positiva con el INR. Como ocurría en el estudio de Shiota, los niveles de HGF cuantificados por nuestra parte en los otros dos grupos a estudio, los pacientes con cirrosis y con ACLF, también fueron significativamente superiores ($p < 0,001$) a los del grupo control.

Al igual que en el caso de HGF, en nuestro estudio observamos niveles superiores de VEGF en sangre periférica respecto a los obtenidos en individuos sanos. Sin embargo, al contrario de lo que ocurría con HGF, los niveles de VEGF resultaron superiores en sangre periférica con respecto a sangre de venas suprahepáticas, Estos resultados con respecto a VEGF coinciden con los de la literatura^{126,127}. En un estudio, además, se evaluaron los niveles séricos de VEGF en distintas fases de pacientes con hepatitis aguda, hallándose niveles superiores de este factor en la fase aguda, que posteriormente retornaban en la fase de convalecencia a cifras cercanas a la normalidad¹²⁶. Estos hallazgos podrían ser una explicación al hecho de que en nuestro estudio no existieran diferencias significativas entre el grupo de pacientes con ACLF y el grupo control, y en el caso del grupo de cirrosis hepática, los niveles de VEGF fueran inferiores significativamente ($p < 0,05$) a los del grupo control. Por otra parte, niveles bajos de PDGF y de VEGF también se han asociado a la gravedad y a mal pronóstico en la hepatitis aguda, cuantificándose niveles inferiores ($p < 0,001$) en hepatitis fulminante en comparación con hepatitis agudas y con controles¹²⁸. Al igual que en nuestro caso, no se obtuvieron en dicho estudio diferencias significativas en los niveles de PDGF entre hepatitis agudas y

controles. Los niveles de PDGF se correlacionaron con el recuento de plaquetas, responsables de su síntesis, por lo que los autores sugerían que el descenso en los niveles de trombopoyetina y plaquetas en los pacientes con hepatitis fulminante, podría llevar al descenso en los niveles de PDGF.

En el grupo de pacientes con daño agudo, no se apreció una mayor expresión de SCF y c-kit en tejido hepático con respecto al grupo control. En un estudio que analizaba muestras de tejido hepático de pacientes pediátricos (entre 1 y 13 años de edad), sin embargo, se observó que la expresión de mRNA de c-kit era más elevada en el grupo de pacientes con hepatopatía aguda con respecto al grupo control, mientras que dicha expresión era similar en pacientes con cirrosis que en los individuos sanos¹²⁹. Aunque en ambos grupos, la tinción observada en los espacios porta y en los septos fibrosos era discreta, en pacientes con fallo hepático fulminante existía un pequeño número de células integradas en conductos biliares intactos que presentaba una tinción muy intensa para c-kit, lo cual sugería a los autores que este receptor podría estar involucrado en los procesos de regeneración celular tras el daño hepático. Fujio et al⁹⁰, como ya hemos mencionado previamente, mostraron en un modelo de rata AAF, que la expresión de c-kit era inducida durante la activación de las células ovas. Conviene recordar que en este modelo murino, la expresión de c-kit se incrementa desde las primeras 24 horas, y permanece elevada durante 2 semanas antes de volver a los niveles de control. Por tanto, si la expresión de c-kit es transitoria, y solo está presente en un número pequeño de células en cualquier momento, podría ser fácilmente omitida. También explicaría la diferencia en la expresión entre los pacientes con fallo agudo y aquellos con cirrosis, porque en este último grupo, la evolución en el tiempo y por tanto la respuesta celular está comparativamente atenuada.

CIRROSIS

En el grupo de pacientes con cirrosis hepática, al contrario de lo que ocurría en grupo de daño agudo, no se objetivó un aumento significativo del porcentaje de células CD34+ ni CD133+. Tampoco se observó una movilización de células precursoras endoteliales VEGFR+. A este respecto, la literatura muestra resultados contradictorios. En dos estudios diseñados para evaluar la seguridad de la administración de G-CSF, no se objetivaron diferencias en cuanto al porcentaje de células CD34+ en sangre periférica, ni tampoco de células CD133+, en un grupo de pacientes con cirrosis respecto al grupo control^{130,131}. En el estudio comentado previamente que llevaron a cabo Lemoli et al¹²², previamente al TOH, el grupo de pacientes cirróticos mostró una movilización basal de CSMO reducida, demostrada por la baja concentración de células CD34+ y CD133+, con respecto a las obtenidas en el grupo de donantes sanos. A los 3 y

a los 7 días tras la realización del TOH, se objetivó un aumento significativo del porcentaje de células CD34+ circulantes, así como del porcentaje de células CD133+ y VEGFR+. Además, tras la realización del TOH también se objetivó un aumento de VEGF en sangre periférica. La movilización de progenitores endoteliales podría ser debida al aumento de los niveles séricos de VEGF, secundario al daño vascular causado por el trasplante. De hecho, en modelos animales se ha comprobado que células circulantes CD133+ y CD34+/VEGFR+ contribuyen a la neo-angiogénesis tras la isquemia tisular provocada por el trasplante, y a la regeneración del órgano dañado^{132,133}.

Respecto al estudio inmunohistoquímico de las muestras de tejido provenientes de los pacientes con cirrosis hepática, y al contrario que en el grupo de pacientes con hepatitis aguda, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de CD34 y SCF. En cambio, en este mismo grupo de pacientes cirróticos, se obtuvo una mayor expresión de c-kit en tejido hepático, en comparación con el grupo control, localizado principalmente a nivel periportal. CD34 es un marcador de células progenitoras más primitivas que c-kit. Además de ser un marcador de mastocitos y de células precursoras hematopoyéticas, se ha descrito en estudios previos la presencia de CPH que expresan c-kit en su superficie^{129,134}. En un estudio llevado a cabo por Crosby et al⁴⁰, se identificaron poblaciones de células c-kit+ o CD34+ con características de CS en los espacios porta de muestras de tejido hepático de pacientes con cirrosis hepática. Aunque también se halló ese tipo de células en tejido de hígados sanos, la expresión fue mayor en el hígado cirrótico. Además, esas células CD34+ o c-kit+ aisladas mostraron *in vitro* potencial para dar lugar a células epiteliales biliares, aparte de a hepatocitos. Llegaron a la conclusión de que ambos tipos celulares (células c-kit+ o CD34+) podrían representar distintas fases progresivas en la vía de diferenciación del linaje celular. Nuestros resultados apoyarían esta hipótesis, ya que las células que expresan c-kit localizadas en los espacios porta podrían corresponder a CPH. Algunos estudios han mostrado un aumento de la expresión de c-kit en pacientes con HCC¹³⁵, por lo que en pacientes cirróticos, el proceso regenerativo podría derivar en la aparición de células tumorales, y por consiguiente de HCC a lo largo del tiempo.

Al igual que ocurría en el grupo de pacientes con hepatitis aguda, en nuestro estudio, los niveles de HGF e IL-6 en sangre periférica, se encontraban elevados en el grupo de pacientes cirróticos con respecto al grupo control. Similares resultados se obtuvieron en otros dos estudios que analizaban los niveles de HGF e IL6 en pacientes con distintos grados de cirrosis por alcohol (atendiendo a la clasificación de Child-Pugh), en pacientes alcohólicos sin cirrosis y en individuos sanos^{136,137}. En ambos los niveles de HGF eran superiores significativamente en el grupo de pacientes con cirrosis respecto a los otros 2 grupos, siendo los niveles más altos los

encontrados en los pacientes en estadio más avanzado de cirrosis (Child C). Además, se encontró correlación positiva entre dichos niveles y parámetros analíticos como son AST, ALT, bilirrubina y el tiempo de protrombina, en consonancia también con nuestro estudio. Similares resultados se obtenían en el caso de IL6. En otro estudio en el que se analizaba el papel de HGF e IL6 en pacientes con cirrosis hepática, se comparaban la concentración de estas citoquinas en sangre periférica, en la vena porta, y en la vena y la arteria hepáticas de pacientes con cirrosis y en individuos sanos¹³⁸. Al igual que en nuestro estudio, los niveles de HGF y de IL6 en sangre periférica fueron superiores en el grupo de pacientes con cirrosis con respecto al grupo control. Sin embargo, los niveles de HGF a nivel local (vena hepática) fueron inferiores significativamente respecto a los hallados en sangre periférica. En nuestro caso no se encontraron diferencias estadísticamente significativas respecto a la cuantificación de IL-6 y HGF en sangre de venas suprahepáticas y periféricas. En el caso de IL-8 sí que se objetivó una mayor presencia de esta citoquina en venas suprahepáticas, siendo las diferencias significativas ($p < 0,05$).

IL-8 es una citoquina responsable de la atracción de células polimorfonucleares a las zonas donde ha existido daño tisular e inflamación. Algunas observaciones sugerían que las vías de IL-8 también podían estar involucradas en la patogénesis de la enfermedad hepática crónica. Por ejemplo, se ha comprobado que los niveles de IL-8 en sangre periférica estaban elevados en pacientes con hepatitis alcohólica^{139,140}. Dichos niveles se correlacionaron con la gravedad y el mal pronóstico de la enfermedad. Además, la actividad de esta citoquina se ha asociado a la progresión de la fibrosis en pacientes con cirrosis hepática¹⁴¹. En este estudio, tanto los niveles de IL-8 en sangre periférica como su expresión a nivel intrahepático variaban en función de la etiología de la cirrosis, y se asociaron a un acúmulo de macrófagos a nivel intrahepático, que además demostraron secretar a su vez IL-8. Además, los autores objetivaron una mayor expresión de IL-8 a nivel intrahepático en pacientes cirróticos, comparándola con los resultados obtenidos en otro estudio realizado en pacientes con lesión aguda¹⁴². En nuestra tesis, en concordancia con lo mencionado previamente, los niveles plasmáticos de IL-8 en sangre periférica del grupo de pacientes con cirrosis hepática se encontraban incrementados significativamente con respecto al grupo control ($p < 0,01$). Estos resultados reflejan el importante papel que podría jugar IL-8 en la atracción y activación de polimorfonucleares y macrófagos, tanto en la fase aguda, como en fases avanzadas de la cirrosis hepática. En este mismo grupo, los niveles cuantificados en venas suprahepáticas estaban incrementados con respecto a los de sangre periférica ($p < 0,05$), de acuerdo con el estudio de Zimmerman. En los otros dos grupos de pacientes los niveles de IL-8 en sangre periférica también estaban incrementados ($p < 0,001$), sin que se objetivaran diferencias entre

los niveles a nivel periférico y hepático. Además de en otros tumores, se ha observado un aumento de los niveles plasmáticos y de la expresión de IL-8 en tejido hepático de pacientes con hepatocarcinoma¹⁴³. El hallazgo de la mayor presencia de IL-8 a nivel hepático podría ser importante, ya que encajaría con la idea de que el mismo proceso de regeneración hepática en pacientes con cirrosis podría llevar a un proceso defectuoso que sigue la vía de la fibrogénesis y de la cancerogénesis.

Otro de los factores analizados en nuestro estudio fue MMP-9. En los pacientes con cirrosis hepática los niveles séricos de MMP-9 se encontraban disminuidos con respecto al grupo control ($p < 0,001$), mientras que en los otros grupos no se encontraron diferencias significativas con respecto a los controles. En la literatura existe controversia en este sentido. En un estudio en el que se analizó la actividad de esta enzima (además de MMP-2 y MMP-8) en pacientes con cirrosis hepática por alcohol, se evidenció que los niveles en sangre periférica de MMP-9 eran superiores en los pacientes con cirrosis con respecto al grupo control, pero únicamente se hallaron diferencias significativas en el grupo de pacientes con cirrosis avanzada (Child C)¹⁴⁴. Sin embargo, en otro estudio japonés¹⁴⁵, no se hallaron diferencias significativas entre el grupo de cirrosis y el grupo de individuos sanos. En nuestro caso, se decidió no estratificar a los pacientes en función del estadio de Child-Pugh, lo cual ha podido enmascarar los resultados obtenidos.

Como hemos mencionado previamente, los niveles de VEGF en sangre periférica de los pacientes con cirrosis hepática resultaron inferiores al grupo control, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Similares resultados se han publicado en la literatura^{146,147}. Los niveles séricos de VEGF descendieron asociados a la progresión de la enfermedad, en relación a la clasificación de Child-Pugh. Es decir que la secreción y/o producción de VEGF se encuentra alterada en pacientes con daño hepático crónico, y disminuye conforme avanza el grado de disfunción hepática.

Las plaquetas también juegan un papel importante en la regeneración hepática, ya que son responsables de la secreción de estimuladores de la angiogénesis como VEGF y PDGF¹⁴⁸. Los niveles de PDGF en nuestros pacientes con cirrosis hepática, al igual que lo de VEGF y los de MMP-9, se encontraban disminuidos con respecto a los controles ($p < 0,001$). La trombopenia asociada a la cirrosis hepática podría explicar en parte la disminución de estas citoquinas en sangre periférica. A su vez, los niveles bajos de VEGF, inductor de la expresión de proteasas como la colagenasa y las metaloproteinasas de la matriz, podrían ser los responsables de la disminución de la síntesis y secreción de MMP-9 en los pacientes cirróticos.

Durante la lesión crónica hepática, el eje SDF-1/CXCR4 ha demostrado estar activado e involucrado en la progresión de la fibrosis. Tanto los niveles de SDF-1 como la expresión de

CXCR4 estaba aumentada en pacientes con cirrosis hepática y hepatitis crónica B y C¹⁴⁹. En nuestro estudio, al igual que en el grupo de pacientes con hepatitis aguda, los niveles de SDF-1 en sangre periférica se encontraban incrementados con respecto a los controles. Sin embargo, el porcentaje de células CXCR4+ en sangre periférica no difirió con respecto al grupo control.

FALLO AGUDO SOBRE CRÓNICO

Los pacientes con ACLF son un grupo heterogéneo de pacientes. De hecho, en los últimos años, y como ha sido comentado previamente, han sido publicadas numerosas definiciones y criterios clínicos para intentar agruparlos^{7,8}. Son pacientes portadores de una enfermedad hepática crónica, que en algún momento, y debido a múltiples causas, sufren una agudización de su enfermedad. Respecto a los parámetros estudiados en esta tesis, este grupo también ha presentado resultados heterogéneos. En algunos casos los resultados se asemejan al grupo de hepatitis agudas, mientras que en otros su comportamiento es similar al de la hepatopatía crónica. La literatura acerca de la regeneración hepática en estos pacientes es escasa, y tampoco existen modelos animales como en el caso de los otros dos grupos. Wan et al¹³⁰ analizaron la movilización de células CD34+ en pacientes con ACLF. Hallaron que en estos pacientes se producía un aumento de la expresión de estas células en sangre periférica, en comparación con un grupo de controles sanos, demostrando además que dichas células expresaban marcadores específicos de hepatocitos como son la citoqueratina 19 (CK-19) y alfafetoproteína. El mismo grupo obtuvo resultados similares más recientemente, también en pacientes con ACLF¹⁵⁰.

En nuestros pacientes con ACLF los resultados probablemente estén influenciados por el escaso número de pacientes incluido. La movilización de células CD34+ al torrente circulatorio no difirió significativamente respecto a la obtenida en el grupo control. En cuanto al porcentaje de células marcadas para el resto de anticuerpos (CXCR4, c-kit, CD133, VEGFR), tampoco se encontraron diferencias respecto al grupo control.

En el estudio comentado previamente también se objetivó un aumento significativo de HGF, IL-6, SCF y MMP-9 en sangre periférica con respecto al grupo control. Nuestros resultados en este grupo de pacientes fueron similares para HGF e IL-6, así como para IL-8, cuyos niveles en sangre periférica estaban incrementados con respecto al grupo control ($p < 0,01$). Sin embargo, los niveles de MMP-9 y de SCF, de forma similar a lo que ocurría en la hepatitis aguda y en la cirrosis, no difirieron de los hallados en el grupo control. Tampoco hallamos diferencias para otros factores como PDGF y SDF-1. La expresión de VEGF, aumentada en el grupo de hepatitis agudas, en este grupo sin embargo se asemejaba más a la detectada en el grupo de cirróticos, en el que estaba disminuida con respecto a los controles.

En resumen, nuestros resultados indican que en pacientes con daño hepático agudo existe una movilización importante de células progenitoras hematopoyéticas CD34+ a sangre periférica, que se acompaña de un aumento de una serie de citoquinas y de factores de crecimiento, como son HGF, SDF-1, IL-6 e IL-8, que podrían estar involucradas en la movilización de dichas células y en su reclutamiento por parte del hígado dañado. Además, en estos pacientes también se constató una movilización de células precursoras endoteliales VEGFR+ a sangre periférica, acompañado de un aumento significativo de VEGF, lo cual nos sugiere la importancia de los procesos de angiogénesis en la regeneración del tejido hepático.

En pacientes con cirrosis hepática, por el contrario, los procesos de regeneración en respuesta a un estímulo lesivo crónico y continuado no parece que precisen de la movilización y actuación de este tipo de células progenitoras. Sí están involucradas parte de las citoquinas que también participan en procesos agudos (HGF, IL-6, IL-8 y SDF-1). Sin embargo, no parece tan clara la implicación de VEGF y su receptor VEGFR en este grupo de pacientes. Es posible que el equilibrio entre los procesos de angiogénesis y fibrogénesis se decante a favor de estas últimas, favoreciéndose la síntesis de colágeno y por tanto aumentando la fibrosis. Los bajos niveles de MMP-9 cuantificados en estos pacientes también nos orientan en esa dirección. El aumento de la expresión de c-kit en el tejido hepático de pacientes cirróticos, que no se acompaña de un aumento en los niveles de SCF, por una parte podría sugerir la presencia de CPH en tejido periportal, lo que confirmaría su importante papel regenerativo en caso de que la reserva de hepatocitos no sea suficiente para compensar la pérdida de masa hepática funcional. Por otra parte, la asociación de esta molécula con el HCC y con otros tipos tumorales, podría guardar relación con el elevado riesgo de este tumor en la cirrosis hepática.

Respecto a los pacientes con ACLF, se trata de un grupo heterogéneo en el que influyen multitud de variables clínicas. Debido al bajo número de pacientes incluidos por diversas razones (infecciones concomitantes, dificultad para incluir pacientes) los datos obtenidos en el estudio no nos permiten extraer conclusiones acerca de los procesos de regeneración hepática en este grupo de pacientes.

CONCLUSIONES

1. Los precursores hematopoyéticos están claramente aumentados en pacientes con hepatitis aguda tanto a nivel de sangre periférica como en tejido, por lo que parecen jugar un papel en la regeneración hepática de estos pacientes.
2. La presencia de precursores hematopoyéticos en sangre periférica se correlaciona con la gravedad de la lesión hepática aguda.
3. Los precursores endoteliales (VEGFR+), dependientes de los niveles séricos de VEGF, también parecen ser importantes en los procesos de regeneración en los pacientes con hepatitis aguda.
4. Esta movilización de precursores hematopoyéticos, se relaciona con el incremento de los niveles séricos de una serie de citoquinas y factores de crecimiento claves en los procesos de regeneración (HGF, SDF-1, IL-6, IL-8).
5. En pacientes con cirrosis hepática el papel de estos precursores hematopoyéticos y endoteliales, no parece ser importante.
6. En los pacientes con cirrosis hepática se produce un aumento de células precursoras ckit+ en tejido hepático, que podrían jugar un papel en los procesos de regeneración.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 836-847.
- 2) Vessey CJ, de la Hall P (2001) Hepatic stem cells: a review. *Pathology* 33:130–141.
- 3) European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practical Guidelines on the management of acute (fulminant) liver failure. *Journal of Hepatology* 2017 vol. 66 1047–1081.
- 4) Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, Wendon J. Acute liver failure. *Lancet* 2010;376:190-201.
- 5) Bechmann LP, Marquitan G, Jochum C, Saner F, Gerken G, Canbay A. Apoptosis versus necrosis rate as a predictor in acute liver failure following acetaminophen intoxication compared with acute-on-chronic liver failure. *Liver Int* 2008;28:713-6.
- 6) Mas A. Insuficiencia hepática aguda grave (hepatitis fulminante). Libro de Gastroenterología y Hepatología. Problemas comunes en la práctica clínica. 2ª Edición. *Jarpyo Editores*. 2012. 759-768.
- 7) Miguel Bruguera. Hepatitis vírica aguda. Libro de Gastroenterología y Hepatología. Problemas comunes en la práctica clínica. 2ª Edición. *Jarpyo Editores*. 2012. 759-768.
- 8) Canbay A, Tacke F, Hadem J, Trautwein C, Gerken G, Manns MP. Acute Liver Failure – a Life-Threatening Disease. *Dtsch Arztebl International* 2011;108:714-20.
- 9) Schmidt LE, Larsen FS. MELD score as a predictor of liver failure and death in patients with acetaminophen-induced liver injury. *Hepatology* 2007;45:789-96
- 10) Bernal V, Bosch J. Cirrosis hepática. Libro de Gastroenterología y Hepatología. Problemas comunes en la práctica clínica. 2ª Edición. *Jarpyo Editores*. 2012. 867-892.
- 11) Pinzani M. Liver fibrosis. *Springer Semin Immunopathol*. 1999; 21:475-90
- 12) Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. Benyon RC, Arthur MJ. *Semin Liver Dis*. 2001 Aug; 21(3):373-84.
- 13) Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth. Desmet VJ, Roskams T. *J Hepatol*. 2004 May; 40(5):860-7.
- 14) Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. *Br J Surg*. 1973 Aug; 60(8):646-9.
- 15) Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, Kremers W, Lake J, Howard T,

- Merion RM, Wolfe RA, Krom R, United Network for Organ Sharing Liver Disease Severity Score Committee. *Gastroenterology*. 2003 Jan; 124(1):91-6
- 16) Ginés P, Quintero E, Arroyo V, et al. Compensated cirrhosis: natural history and prognostic factors. *Hepatology* 1987;7:122–8.
 - 17) Infante-Rivard C, Esnaola S, Villeneuve JP. Clinical and statistical validity of conventional prognostic factors in predicting short-term survival among cirrhotics.. *Hepatology*. 1987 Jul-Aug; 7(4):660-4.
 - 18) Sarin SK, Kedarisetty CK, Abbas Z, et al. Acute-on-chronic liver failure: consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) 2014. *Hepatol Int* 2014;8:453–71.
 - 19) Moreau R, Jalan R, Gines P, et al. Acute-on-chronic liver failure is a distinct syndrome that develops in patients with acute decompensation of cirrhosis. *Gastroenterology* 2013;144: 1426–37, 1437.e1–9.
 - 20) Sole C, Sola E, Morales-Ruiz M, et al. Systemic inflammatory response profile in acute-on-chronic liver failure and its relationship with prognosis. *Sci Rep* 2016;6:32341.
 - 21) Bernsmeier C, Pop OT, Singanayagam A, et al. Patients with acute-on-chronic liver failure have increased numbers of regulatory immune cells expressing the receptor tyrosine kinase MERTK. *Gastroenterology* 2015;148: 603–615.e14.
 - 22) Beyer TA, Xu W, Teupser D, auf dem Keller U, Bugnon P, Hildt E, Thiery J, Kan YW, Werner S. Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance. *EMBO J* 2008; 27: 212-223.
 - 23) Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006; 43: S45-S53.
 - 24) Mohammed FF, Khokha R. Thinking outside the cell: proteases regulate hepatocyte division. *Trends Cell Biol* 2005; 15: 555-563.
 - 25) Nejak-Bowen KN, Monga SP: Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: sorting the good from the bad. *Semin Cancer Biol* 2011, 21:44e58.
 - 26) Zhen-Yu Zheng, Shun-Yan Weng, Yan Yu. Signal molecule-mediated hepatic cell communication during liver regeneration. *World J Gastroenterol* 2009; 15(46): 5776-5783.
 - 27) Sell S (2001) Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* 33:738–50.
 - 28) Vessey CJ, de la Hall P (2001) Hepatic stem cells: a review. *Pathology* 33:130–141
 - 29) Stocker E, Heine WD. Regeneration of liver parenchyma under normal and pathological conditions. *Beitr. Pathol.* 1971; 144: 400–8.

- 30) Dan YY, Yeoh GC. Liver stem cells: a scientific and clinical perspective. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2008; **23**: 687–98.
- 31) Paku S, Schnur J, Nagy P, Thorgeirsson SS. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver. *Am. J. Pathol.* 2001; **158**: 1313–23.
- 32) Schwartz RE, Reyes M, Koodie L *et al.* Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest.* 2002; **109**: 1291–302.
- 33) Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M *et al.* Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.* 2000; **6**: 1229–34.
- 34) Sell S. Is there a liver stem cell? *Cancer Res* 1990;50:3811– 3815. 8. Thorgeirsson S. Hepatic stem cells. *Am J Pathol* 1993;142: 1331–1333.
- 35) Farber E. Similarities in the sequence of early histological change induced in the liver of the rat by ethionine, 2-actylamino-fluorene, and 3-methyl-4 dimethyl-aminoazobenzene. *Cancer Res* 1956; 16:142–151. 18.
- 36) Germain L, Noel M, Gourdeau H, Marceau N. Promotion of growth and differentiation of rat ductular oval cells in primary culture. *Cancer Res* 1988;48:368 –378.
- 37) Evarts RP, Nagy P, Marsden E, Thorgeirsson SS. A precursor product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat-liver. *Carcinogenesis* 1987;8:1737–1740.
- 38) Farber E. Similarities in the sequence of early histological change induced in the liver of the rat by ethionine, 2-actylamino-fluorene, and 3=-methyl-4 dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res* 1956; 16:142–151.
- 39) 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.
- 40) Crosby, H. A., Kelly, D. A. & Strain, A. J. Human hepatic stem- like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium. *Gastroenterology* 120, 534–544 (2001).
- 41) Potten CS, Loeffler M (1990) Stem cells: attributes, cycles, spiral pitfalls and uncertainties. Lesson for and from the crypt. *Development* 110:1101–1120
- 42) Holtzer H (1978) Cell lineages, stem cells and the “quantal” cell cycle. In: Lord BI, Potten CS, Cole RJ (eds) Stem cells and tissue homeostasis. Cambridge University Press, Cambridge, pp 1–28
- 43) Wilson, A. & Trumpp, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 93–106 (2006).

- 44) Handgretinger, R. et al. Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1996, 141–151 (2003).
- 45) Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther* 2002;9: 754-758.
- 46) Wagers AJ, Weissman IL Plasticity of adult stem cells. *Cell.* 2004 Mar 5; 116(5):639-48
- 47) Theise ND, Wilmot I. Cell plasticity: flexible arrangement. *Nature* 2003; 425:21.
- 48) Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 1998 Mar 6; 279(5356):1528-30.
- 49) 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.
- 50) Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest.* 2001 Jun; 107(11):1395-402.
- 51) Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell.* 2001 May 4; 105(3):369-77.
- 52) Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol.* 2006;169:338–346.
- 53) Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature.* 2003;422:901–904.
- 54) Sell S. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* 2001;33:738–750.
- 55) Grompe M (2003) The role of bone marrow stem cells in liver regeneration. *Semin Liver Dis* 23:363–371.
- 56) 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. 4.
- 57) Alison M, Poulson R, Jeffery R, Dhillon A, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright N. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000;406:257.
- 58) Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002;109:1291-1302.
- 59) Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, Kawano Y, Kobune M, et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 2005;106:756-763.

- 60) Ong SY, Dai H, Leong KW. Inducing hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet culture. *Biomaterials* 2006;27:4087-4097.
- 61) Jang YO, Kim MY, Cho MY, Baik SK, Cho YZ, Kwon SO. Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic fibrosis in a thioacetamide-induced cirrhotic rat model. *BMC Gastroenterology* 2014, 14:198.
- 62) Jang YO, Kim YJ, Baik SK, Kim MY, Eom YW, Cho MY, et al. Histological improvement following administration of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: a pilot study. *Liver Int* 2014;34:33-41
- 63) Suk KT, Yoon JH, Kim MY, Kim CW, Kim JK, Park H, Hwang SG, Kim DJ, Lee BS, Lee SH, Kim HS, Jang JY, Lee CH, Kim BS, Jang YO, Cho MY, Jung ES, Kim YM, Bae SH, Baik SK. Transplantation with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: Phase 2 trial. *Hepatology*. 2016 Dec;64(6):2185-2197
- 64) Bird, T. G., Lorenzini, S. & Forbes, S. J. Activation of stem cells in hepatic diseases. *Cell Tissue Res*. 331, 283–300 (2008).
- 65) Hatch HM et al. SDF-1 alpha/CXCR4: a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats. *Cloning Stem Cells* 2002; 4: 339-351.
- 66) Sakaida et al. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2004; 78: 83-88.
- 67) Piscaglia AC et al. Granulocyte-colony stimulating factor promotes liver repair and induces oval cell migration and proliferation in rats. *Gastroenterology*. 2007;133:619-31.
- 68) Yannaki E et al. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp Hematol*. 2005; 33: 108-19.
- 69) Gaia S, Smedile A, Omedè P, Olivero A, Sanavio F, Balzola F, Ottobrelli A, Abate ML, Marzano A, Rizzetto M, Tarella C. Feasibility and safety of G-CSF administration to induce bone marrow-derived cells mobilization in patients with end stage liver disease. *J Hepatol* 2006; 45: 13-19.
- 70) Spahr L, Lambert JF, Brandt LR, et al. Granulocyte-colony stimulating factor induces proliferation of hepatic progenitors in alcoholic steatohepatitis: a randomized trial. *Hepatology* 2008;48:221–229.
- 71) Garg V, Garg H, Khan A, Trehanpati N, Kumar A, Sharma BC, Sakhuja P, Sarin SK. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes CD34(+) cells and improves survival of patients with acute-on-chronic liver failure. *Gastroenterology* 2012; 142: 505-512.e1

- 72) Margini C, Vukotic R, Brodosi L, Bernardi M, Andreone P. Bone marrow derived stem cells for the treatment of end-stage liver disease. *World J Gastroenterol* 2014; 20(27): 9098-9105.
- 73) Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *J Hepatol* 2012;57:692-4.
- 74) Tang Y, Li Q, Meng F, Huang X, Li C, Zhou X, Zeng X, He Y, Liu J, Hu X, Hu JF, Li T. Therapeutic Potential of HGF-Expressing Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Mice with Acute Liver Failure. *Int J Hepatol.* 2016;2016:5452487.
- 75) Michalopoulos GK. Principles of liver regeneration and growth homeostasis. *Compr Physiol* 2013;3:485-513.
- 76) Nohuchi O, Enomoto N, Ikeda T, Kobayashi F, Marumo F, Sato C. Gene expressions of c-met and hepatocyte growth factor in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 1996; 24:286–292
- 77) Comoglio PM. Pathway specificity for Met signalling. *Nat Cell Biol* 2001;3:E161-2.
- 78) Stolz DB, Mars WM, Petersen BE, Kim TH, Michalopoulos GK. Growth factor signal transduction immediately after two-thirds partial hepatectomy in the rat. *Cancer Res* 1999;59:3954-60.
- 79) Javier A.-Cienfuegos, Fernando Rotellar, Jorge Baixauli, Fernando Martínez-Regueira, Fernando Pardo and José Luis Hernández-Lizoáin. Liver regeneration – The best kept secret. A model of tissue injury response. *Rev esp enferm dig* Vol. 106, N.o 3, pp. 171-194, 2014
- 80) Evarts RP, Hu Z, Fujio K, Marsden ER, Thorgeirsson SS (1993) Activation of hepatic stem cell compartment in the rat: role of transforming growth factor alpha, hepatocyte growth factor, and acidic fibroblast growth factor in early proliferation. *Cell Growth Differ* 4:555–561
- 81) Hu Z, Evarts RP, Fujio K, Marsden ER, Thorgeirsson SS (1995) Expression of fibroblast growth factor receptors flg and bek during hepatic ontogenesis and regeneration in the rat. *Cell Growth Differ* 6:1019–1025
- 82) Shiota G, Okano J, Kawasaki H, Kawamoto T, Nakamura T (1995) Serum hepatocyte growth factor levels in liver diseases: clinical implications. *Hepatology* 21:106–112
- 83) Banu Bilezikçi, Beyhan Demirhan, Nurhan Özdemir & Rengin Elsürer (2006) Expression of Hepatocyte Growth Factor in Chronic Hepatitis: Effect of Hemodialysis. *Renal Failure*, 28:7, 557-560
- 84) Hasuike S, Ido A, Uto H, Moriuchi A, Tahara Y, Numata M, Nagata K, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H (2005) Hepatocyte growth factor accelerates the proliferation of hepatic

- oval cells and possibly promotes the differentiation in a 2-acetylaminofluorene/ partial hepatectomy model in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 20:1753–1761
- 85) Suzuki A, Iwama A, Miyashita H, Nakauchi H, Taniguchi H (2003) Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development* 130:2513–2524
 - 86) Kim CU, Broxmeyer HE. In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment. *Blood* 1998;91:100–10.
 - 87) Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol.* 2002;3: 687–94, Epub 2002 Jun 17.
 - 88) Xiao Ling et al. Stromal Derived Factor-1/CXCR4 Axis Involved in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Recruitment to Injured Liver. *Stem Cells Int.* 2016; 2016: 8906945
 - 89) Kollet O et al. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD 34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 2003; 112: 160-169
 - 90) Fujio, K., Evarts, H. P., Hu,Z., Marsden, E. R., Thorgeirsson,S. 5. (1994) Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, during liver regeneration from putative stem cells in adult rat. *Lab. Invest.* 70,511-516
 - 91) Morrison-Graham, K., and Takahashi, Y. (1993) Steel factor and c-kit receptor from mutants to a growth factor system. *BioEssays* 15,77-84
 - 92) Metcalf, D. (1991) Lineage commitment of hemopoietic progenitor cells in developing blast cell colonies: influence of colony-stimulating factors. *Proc Nat. Aced Sci. USA* 88, 11310-1 1314
 - 93) Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, Brakenhoff JP, Kallen KJ, Wollmer A, Grotzinger J, Rose-John S (1997) A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Biotechnol* 15:142–145
 - 94) Fujio K, Hu,Z, Evans, R.P, Marsden, E. H.,Niu,C.-H, Thorgeirsson S. (1996) Coexpression of stem cell factor and c-kit in embryonic and adult liver. *Exp. Cell Ret.* 224,243-250
 - 95) Yeoh GC, Ernst M, Rose-John S, Akhurst B, Payne C, Long S, Alexander W, Croker B, Grail D, Matthews VB. Opposing roles of gp130-mediated STAT-3 and ERK-1/ 2 signaling in liver progenitor cell migration and proliferation. *Hepatology* 2007; 45: 486-494.
 - 96) Subrata LS, Lowes KN, Olynyk JK, Yeoh GC, Quail EA, Abraham LJ (2005) Hepatic expression of the tumor necrosis factor family member lymphotoxin-beta is regulated

- by interleukin (IL)-6 and IL-1beta: transcriptional control mechanisms in oval cells and hepatoma cell lines. *Liver Int* 25:633–646
- 97) Schmidt-Arras, D., Rose-John, S., IL-6 pathway in the liver: from physiopathology to therapy. *J Hepatol*. 2016 Jun;64(6):1403-15
- 98) Streetz KL, Tacke F, Leifeld L, Wustefeld T, Graw A, Klein C, Kamino K, Spengler U, Kreipe H, Kubicka S, Muller W, Manns MP, Trautwein C (2003) Interleukin 6/gp130-dependent pathways are protective during chronic liver diseases. *Hepatology* 38:218–229
- 99) Akhurst B, Matthews V, Husk K, Smyth MJ, Abraham LJ, Yeoh GC (2005) Differential lymphotoxin-beta and interferon gamma signaling during mouse liver regeneration induced by chronic and acute injury. *Hepatology* 41:327–335
- 100) Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, et al. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science* 1996;274:1379–1383.
- 101) Reheman et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004; 109: 1292-8.
- 102) Wang M et al. Pretreatment with adult progenitor cells improves recovery and decreases native myocardial proinflammatory signaling after ischemia. *Shock*. 2006; 25: 454-9.
- 103) Tang YL, et al. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *Ann Thorac Surg*. 2005; 80: 229–237.
- 104) Ferrara N, Davis-Smyth T: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997; 18(1):4-25.
- 105) LeCouter J, et al. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science*. 2003;299(5608):890–893.
- 106) Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246(4935):1306-1309.
- 107) Assy N, Spira G, Paizi M, et al.: Effect of vascular endothelial growth factor on hepatic regenerative activity following partial hepatectomy in rats. *J Hepatol* 1999; 30(5):911-915.
- 108) Mochida S, Ishikawa K, Inao M, Shibuya M, Fujiwara K: Increased expressions of vascular endothelial growth factor and its receptors, flt-1 and KDR/flk-1, in regenerating rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226(1):176-179.

- 109) Donahower B, et al. Vascular endothelial growth factor and hepatocyte regeneration in acetaminophen toxicity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;291(1):G102–G109.
- 110) Ishikawa K, et al. Expressions of vascular endothelial growth factor in nonparenchymal as well as parenchymal cells in rat liver after necrosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;254(3):587–593.
- 111) Mochida S, Ishikawa K, Inao M, Shibuya M, Fujiwara K. Increased expressions of vascular endothelial growth factor and its receptors, flt-1 and KDR/flk-1, in regenerating rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;226(1):176–179.
- 112) Papastefanou VP, et al. VEGF isoforms and receptors expression throughout acute acetaminophen-induced liver injury and regeneration. *Arch Toxicol*. 2007;81(10):729–741.
- 113) Wang L, et al. Hepatic vascular endothelial growth factor regulates recruitment of rat liver sinusoidal endothelial cell progenitor cells. *Gastroenterology*. 2012;143(6):1555–1563.
- 114) Erawan Borkham-Kamphorst, Evgenia Kovalenko, Claudia RC van Roeyen, Nikolaus Gassler, Michael Bomble, Tammo Ostendorf, Jürgen Floege, Axel M Gressner and Ralf Weiskirchen. Platelet-derived growth factor isoform expression in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury. *Laboratory Investigation* (2008) 88, 1090–1100
- 115) Myung-Deok Kim, Sung-Soo Kim, Hyun-Young Cha¹, Seung-Hun Jang, Da-Young Chang, Wookhwan Kim, Haeyoung Suh-Kim and Jae-Ho Lee. Therapeutic effect of hepatocyte growth factor-secreting mesenchymal stem cells in a rat model of liver fibrosis. *Experimental & Molecular Medicine* (2014) 46, e110.
- 116) European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology* 2018 vol. 69 j 182–236.
- 117) Tobias Cantz, Michael P. Manns,² and Michael Ott. Stem cells in liver regeneration and therapy. *Cell Tissue Res*. 2008 Jan; 331(1): 271–28.
- 118) H.-B. Liu, Y.-F. Gong, C.-J. Yu Endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases: From biomarker to therapeutic agent. *Regen Med Res*. 1 (2013), pp. 9.
- 119) Laurie D. DeLeve Liver sinusoidal endothelial cells and liver regeneration *J Clin Invest*. 2013;123(5):1861–1866).
- 120) Wilson GC, Freeman CM, Kuethe JW, Quillin RC 3rd, Nojima H, Schuster R, Blanchard J, Edwards MJ, Caldwell CC, Lentsch AB. CXCR4 chemokine receptor-4 signaling limits

- hepatocyte proliferation after hepatic ischemia-reperfusion in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 308: G702–G709, 2015.
- 121) Nanki T, Hayashida K, El-Gabalawy HS, Suson S, Shi K, Girschick HJ, Yavuz S, Lipsky PE. Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol.* 2000 Dec 1; 165(11):6590-8.
- 122) Lemoli RM¹, Catani L, Talarico S, Loggi E, Gramenzi A, Baccarani U, Fogli M, Grazi GL, Aluigi M, Marzocchi G, Bernardi M, Pinna A, Bresadola F, Baccarani M, Andreone P. Mobilization of bone marrow-derived hematopoietic and endothelial stem cells after orthotopic liver transplantation and liver resection. *Stem Cells.* 2006 Dec;24(12):2817-25.
- 123) De Silvestro G, Vicarioto M, Donadel C, Menegazzo M, Marson P, Corsini A. Mobilization of peripheral blood hematopoietic stem cells following liver resection surgery. *Hepatogastroenterology.* 2004 May-Jun;51(57):805-10.
- 124) C. Di Campi A. C. Piscaglia F. Giuliani S. Rutella G. Bonanno M. A. Zocco F. Ardito G. Nuzzo S. Mancuso G. Leone G. Gasbarrini P. Pola A. Gasbarrini. No evidence of hematopoietic stem cell mobilization in patients submitted to hepatectomy or in patients with acute on chronic liver failure. *Transplant Proc.* 2005 Jul-Aug;37(6):2563-6.
- 125) Shiota G, Okano J, Kawasaki H, Kawamoto T, Nakamura T. Serum hepatocyte growth factor levels in liver diseases: clinical implications. *Hepatology.* 1995 Jan;21(1):106-12.
- 126) Akiyoshi, F., Sata, M., Suzuki, H. et al. Serum Vascular Endothelial Growth Factor Levels in Various Liver Diseases *Dig Dis Sci* (1998) 43: 41.
- 127) Salcedo, X. , Medina, J. , Sanz-Cameno, P. , García-Buey, L. , Martín-Vilchez, S. and Moreno-Otero, R. (2005), Review article: angiogenesis soluble factors as liver disease markers. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 22: 23-30.
- 128) Takayama H, Miyake Y, Nouse K, Ikeda F, Shiraha H, Takaki A, Kobashi H, Yamamoto K. Serum levels of platelet-derived growth factor-BB and vascular endothelial growth factor as prognostic factors for patients with fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011 Jan;26(1):116-21.
- 129) Baumann U, Crosby HA, Ramani P, Kelly DA, Strain AJ. Expression of the Stem Cell Factor Receptor c-kit in Normal and Diseased Pediatric Liver: Identification of a Human Hepatic Progenitor Cell? *Hepatology*, 1999.
- 130) Wan Z, You S, Rong Y, Zhu B, Zhang A, Zang H, Xiao L, Xie G, Xin S. CD34+ hematopoietic stem cells mobilization, paralleled with multiple cytokines elevated in

- patients with HBV-related acute-on-chronic liver failure. *Dig Dis Sci*. 2013 Feb;58(2):448-57.
- 131) Lorenzini, S. et al. Stem cell mobilization and collection in patients with liver cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*. 27, 932– 939 (2008).
- 132) Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001;7:430–436.
- 133) Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000;95:952–958.
- 134) Dan YY, Riehle KJ, Lazaro C, et al. Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103(26):9912–7.
- 135) Lee ES, Han EM, Kim YS, Shin BK, Kim CH, Kim HK, Won NH, Yeom BW, Kim I, Leong AS. Occurrence of c-kit+ tumor cells in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2005 Jul; 124(1):31-6.
- 136) Antoljak, Natasa & Topic, Elizabeta & Duvnjak, M & Vrkić, Nada & Žuntar, Irena. (2001). Hepatocyte growth factor levels in Croatian healthy and alcoholic liver cirrhosis patients. *Collegium antropologicum*. 25. 341-8.
- 137) Andrzej Prystupa, Paweł Kiciński, Jarosław Sak, Anna Boguszevska-Czubara, Anna Toruńska-Jurkowska, and Wojciech ZaBuska. Proinflammatory Cytokines (IL-1 α , IL-6) and Hepatocyte Growth Factor in Patients with Alcoholic Liver Cirrhosis. *Gastroenterology Research and Practice*, vol. 2015
- 138) Dawid Porowski, Agnieszka Wirkowska, Ewa Hryniewiecka, Janusz Wyzgał, Marek Pacholczyk, and Leszek Pączek. Liver Failure Impairs the Intrahepatic Elimination of Interleukin-6, Tumor Necrosis Factor-Alpha, Hepatocyte Growth Factor, and Transforming Growth Factor-Beta. *BioMed Research International*, vol. 2015.
- 139) Huang YS, Chan CY, Wu JC, Pai CH, Chao Y, et al. (1996) Serum levels of interleukin-8 in alcoholic liver disease: relationship with disease stage, biochemical parameters and survival. *J Hepatol* 24: 377–384. 25.
- 140) Hill DB, Marsano LS, McClain CJ (1993) Increased plasma interleukin-8 concentrations in alcoholic hepatitis. *Hepatology* 18: 576–580.

- 141) Zimmermann HW, Seidler S, Gassler N, Nattermann J, Luedde T, et al. (2011) Interleukin-8 Is Activated in Patients with Chronic Liver Diseases and Associated with Hepatic Macrophage Accumulation in Human Liver Fibrosis. *PLoS ONE* 6(6): e21381.
- 142) Jaeschke H, Hasegawa T (2006) Role of neutrophils in acute inflammatory liver injury. *Liver Int* 26: 912–919.
- 143) Yi Ren, RonnieTungPing Poon, HongTeng Tsui, WenHong Chen, Zhi Li, Cecilia Lau, Wun-Ching Yu and Sheung-Tat Fan. Interleukin-8 Serum Levels in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2003 Vol. 9, 5996–6001.
- 144) Prystupa A, Boguszewska-Czubara A, Bojarska-Junak A, Toruń-Jurkowska A, Roliński J, Załuska W. Activity of MMP-2, MMP-8 and MMP-9 in serum as a marker of progression of alcoholic liver disease in people from Lublin Region, eastern Poland. *Ann Agric Environ Med*. 2015; 22(2): 325–328.
- 145) Hayasaka, A. , Suzuki, N. , Fujimoto, N. , Iwama, S. , Fukuyama, E. , Kanda, Y. and Saisho, H. (1996), Elevated plasma levels of matrix metalloproteinase-9 (92-kd type IV collagenase/gelatinase B) in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 24: 1058-1062.
- 146) Akiyoshi, F., Sata, M., Suzuki, H. et al. (1998) Serum vascular endothelial growth factor levels in various liver diseases. *Digest Dis. Sci.* 43, 41–45.
- 147) Desideri G, Ferri C. Circulating vascular endothelial growth factor levels are decreased in patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis depending on the degree of hepatic damage. *Clinical Science* (2000) 99, 159–160.
- 148) Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, et al. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science* 2006;312:104–107.
- 149) Hong F, Tuyama A, Lee TF, Loke J, Agarwal R, Cheng X, Garg A, Fiel MI, Schwartz M, Walewski J, Branch A, Schecter AD, Bansal MB. Hepatic stellate cells express functional CXCR4: role in stromal cell-derived factor-1alpha-mediated stellate cell activation. *Hepatology* 49: 2055–2067, 2009.
- 150) Yi-Chen Wu, Zhi-Hong Wan, Yi-Hui Rong, Bing Zhu, Qi-Yu Jiang, Hong-Ling Liu, Dong-Ze Li, Jun Zhao, Han-Qian Xing, Hai-Bin Su, Jin-Hua Hu, Shao-Jie Xin, Hong Zang, Shao-Li You. Bioactivity of CD34+ cells in patients with acute-on-chronic liver failure. *Int J Clin Exp Pathol* 2017;10(11):10781-10791

Anexo 1. Hoja de Información y consentimiento informado.



HOJA DE INFORMACION AL PACIENTE

El Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza, está llevando un proyecto de investigación que tiene como finalidad conocer como las células madre que se encuentran en la sangre circulante, pueden influir en la regeneración hepática. Poder conocer esto, es muy importante para saber si en un futuro próximo estas células madre adultas, que se producen en la médula ósea, pueden ser un tratamiento en algunas enfermedades hepáticas. Para ello se estudiará en sangre periférica, en sangre de venas suprahepáticas y en tejido hepático la presencia de unas células y proteínas específicas de este proceso de regeneración. El título de este estudio es "PAPEL DE PROGENITORES DE MEDULA OSEA EN LA REGENERACION HEPÁTICA" (REG-HEP/2010) y está financiado principalmente por el PAMER (Proyecto Aragonés de Medicina Regenerativa) del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (I+CS).

Este estudio va a ser realizado en pacientes que hayan ingresado en nuestro servicio por enfermedad hepática aguda grave, enfermedad crónica reagudizada o enfermedad crónica descompensada y que precisen la realización de hemodinámica hepática y biopsia hepática transyugular. Si usted acepta la inclusión en este estudio, será sometido a las mismas pruebas diagnósticas que serían precisas en caso de no participar, pero se tomarán muestras sanguíneas de sangre periférica y durante el estudio hemodinámico que serán utilizadas para el estudio. Así mismo, de la biopsia obtenida para el diagnóstico o estadiaje de su enfermedad, se utilizarán algunos cortes histológicos específicamente para este estudio. La obtención de estas muestras no supondrá en ningún caso la modificación de las técnicas diagnósticas ni el incremento del riesgo de las mismas. Las muestras de sangre se analizarán en el laboratorio de biología molecular del I+CS y en la Unidad de Citometría, y las muestras de tejido en la Unidad de Anatomía Patológica del I+CS.

La persona encargada de dicho estudio es la Dra. Trinidad Serrano, hepatóloga del Servicio de Digestivo. La colaboración con este estudio es absolutamente voluntaria, por lo que puede negarse sin que de ello se derive ninguna repercusión sobre su atención sanitaria. Los datos obtenidos en el análisis del material sanguíneo y tisular así como los datos clínicos que se manejen, serán mantenidos en absoluta confidencialidad. Cada muestra obtenida será codificada sin que en ningún momento figure el código junto con los datos que identifican al paciente. Las muestras que sobren tras la realización del estudio serán guardadas por nuestro equipo y podrán ser empleadas en futuras investigaciones relacionadas con ésta. Le animamos a que si usted no está seguro, consulte esta información y la aceptación en la participación del estudio, con sus familiares o con su médico habitual.

Zaragoza ade.....20....

Consentimiento informado estudio.....REG-HEP/2010

Fecha.....Diciembre/2009

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo,(nombre y apellidos)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido información suficiente sobre el estudio.

He hablado con:.....(nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1) cuando quiera
- 2) sin tener que dar explicaciones
- 3) sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Deseo ser informado sobre los resultados del estudio: sí no (marque lo que proceda)

Acepto que las muestras derivadas de este estudio puedan ser utilizadas en futuras investigaciones (relacionadas con ésta), excluyendo análisis genéticos: sí no (marque lo que proceda)

Doy mi conformidad para que mis datos clínicos sean revisados por personal ajeno al centro, para los fines del estudio, y soy consciente de que este consentimiento es revocable.

Firma del participante o familiar:

Fecha:

He explicado la naturaleza y el propósito del estudio al paciente mencionado.

Firma del investigador:

Fecha:

Revocación del consentimiento informado:

Firma del participante o familiar

Fecha:

Consentimiento informado estudio.....**REG-HEP/2010**

Versión.....primera....., fecha.....Diciembre/2009