

Tesis Doctoral

Biología molecular y celular de las células troncales hepáticas

Torres Fuenzalida, José Hugo

2014-08-19

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Torres Fuenzalida, José Hugo. (2014-08-19). Biología molecular y celular de las células troncales hepáticas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Torres Fuenzalida, José Hugo. "Biología molecular y celular de las células troncales hepáticas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-08-19.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

Biología molecular y celular de las células troncales hepáticas

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área biología

José Hugo Torres Fuenzalida

Director de tesis:	Dr. Luis Antonio Parada
Director Asistente:	Dra. Alicia Lorenti
Consejero de Estudios:	Dra. Lilia Lauría de Cidre
Lugar de trabajo:	Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental del Hospital Italiano de Buenos Aires (ICBME).

Buenos Aires, 2014

Biología molecular y celular de las células troncales hepáticas

Las células troncales se definen por su capacidad de automantenimiento y por la potencialidad de generar tipos celulares diferenciados. El hígado posee una notable capacidad regenerativa; frente a un daño extenso o reiterado la regeneración se produce por la activación de las células troncales hepáticas. Estas células se originan durante la embriogénesis hepática y se mantienen latentes durante toda la vida adulta del individuo. La historia del estudio de las células troncales hepáticas ha estado marcada por diversas controversias en torno a su existencia, su origen e identificación. Objetivo: aislar, identificar y caracterizar células troncales hepáticas y evaluar la potencialidad de la utilización de éstas como herramienta en el tratamiento de enfermedades degenerativas del hígado. Resultados: las células troncales/progenitoras hepáticas (LSPC) de rata expresaron OC2, OC3 y Thy-1, y fueron capaces de proliferar (dando origen a las células tipo ovas) cuando se cultivaron in vitro en presencia del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). La expresión de EpCAM de las LSPC de ratón se utilizó como criterio de selección para su aislamiento. La subpoblación EpCAM (+) presentó (por PCR en tiempo real) una expresión significativamente superior de citoqueratina 19, Claudina3, alfa-fetoproteína y Dlk-1. La subpoblación EpCAM (+) mostró una distribución espacial característica de secuencias repetitivas pericentroméricas y un patrón homogéneo de acetilación (K14, K23) y metilación (K9) de la histona H3. Las células EpCAM (+) fueron capaces de anidar en el bazo y migrar hacia el hígado luego del trasplante intraesplénico en ratones. Conclusión: las células EpCAM (+) presentan un patrón de expresión de genes característico y una organización nuclear particular que se correlaciona con el carácter troncal que se les atribuye a las LSCP. En este trabajo se presenta un método sencillo y eficiente para aislar LSPC de ratón.

Palabras clave: Células troncales, EpCAM, Células troncales hepáticas, Células ovaes, Trasplante celular, carácter troncal.

Molecular and cellular biology of liver stem cells

Stem cells are defined by their capacity of self-renewal and by the potential to give rise to differentiated cell types. The liver has a remarkable regenerative capacity; when the damage is extended or repeated the regeneration is carried out by the activation of the liver stem cells. These cells are originated during the hepatic embryogenesis and they stay latent during the whole life of the individual. The history of the study of liver stem cells was characterized by controversies around their existence, their origin and identification. Objective: to isolate, identify and characterize liver stem cells and to evaluate their potential use as tools for the treatment of degenerative disorders of the liver. Results: the liver stem/progenitor cells (LSPC) from rat expressed OC2, OC3 and Thy-1, and they were capable of proliferate (giving rise to oval-like cells) when they were cultured in vitro in presence of hepatocyte grow factor (HGF). The expression of EpCAM by the LSPC was used as selection criteria for the isolation. The sub-population EpCAM (+) showed (by Real-time PCR) a significantly superior expression of citoqueratin 19, claudin3, alpha-fetoprotein and Dlk-1. The sub-population of EpCAM (+) cells presented a characteristic spatial distribution of the repetitive sequences peri-centromeric and a homogeneous pattern of acetylation (K14, K23) and methylation (K9) of the histone H3. The EpCAM (+) cells were able to home in the spleen and migrate to the liver after the intra-splenic transplant in mice. Conclusion: EpCAM (+) cells exhibit a characteristic pattern of gene expression and a distinctive nuclear organization that correlate with the stemness attributed to LSPC. In this thesis, I present a simple and efficient method to isolate mouse LSPC.

Key words: Stem cells, EpCAM, Liver stem cells, oval cells, cell transplant, Stemness.

Agradecimientos

A Pao, por tanto amor, sin vos no lo podría haber hecho.

A mis hijas: Anita, Sofi, ... y los que vendrán, a quienes les quité tiempo de juegos para realizar esta tesis.

A Nico, incondicional.

A mi mamá, un ejemplo de vida.

A toda mi familia (Santi, Vani, Lito, Rosi, Lita, Eduardo, Carlos, Silvia, Juan, Kari, Mauro, Tiago, Indi, Tomy, José C, Jaime, José Manuel, Andrea F, Matías, Ale, Luis, el Pum, Lucia, Martita, Juliana, Andrea B, Javier, Josefina, Duhilio, Facundo, Laurita, Miky, Adi, Inés, Beto, Cristina, Totito, Bore, Fer, Carlitos, Ferdi, Mariano B, Fede L, Lucas, Fede dM, Mariana G, Mariana Von, Pato, Juan Manuel, Sergio, Mariano K, Vale) por el apoyo constante.

A Alicia, por tus enseñanzas tanto en lo profesional y en lo personal.

A Luis, por tu empuje, tu sinceridad y tu compromiso.

A Mariana B por tus consejos y tus palabras de aliento.

A mis compañeros del ICBME (Pablo, Marcelo, Adrián, Gloria, Edu, Gra, Emi, Irina, Vale B, Ale, Maxi, Sabri, Joha, Adri, Lali, Sung Ho, Candela, Rina) con quienes pasé 9 años de mesada, por su ayuda para realizar este trabajo.

A mis compañeros del CIC BioGUNE (Luis, Luciano, Nerea, Amaia, Félix) por haberme tratado como uno más y hacer mi estadía muy placentera.

Al Cóndor

No le pidas peros al alma

Índice

Abreviaturas.....	8
Introducción.....	11
1. Células troncales.....	11
2. Nicho de las células troncales.....	16
3. Desarrollo embriológico del hígado	18
4. El hígado y el sistema hemopoyético	24
5. Células troncales hepáticas.....	25
Hipótesis	37
Objetivos.....	39
Materiales y Métodos	40
Animales de experimentación	40
Aislamiento de células.....	40
Lisis de glóbulos rojos	41
Recuento de células & viabilidad celular	41
Separación de células.....	42
Gradiente de Percoll	42
Separación de células mediante el sistema MACS (Magnetic Assisted Cell Separation).....	42
Cultivo de células	43
Pre-tratamiento de las superficies de cultivo celular	43
Cultivo de células fetales de hígado de rata	44
Células troncales de hígado de ratón	44
Cultivo en medio semi-sólido.....	45
Inmunofluorescencia indirecta	46
Citometría de flujo.....	47
Estudios sobre la organización del núcleo.....	49
Fijación de las células.....	49
Hibridación in situ fluorescente.....	49
ADN-FISH para satélite mayor y menor	51
Hibridación in situ fluorescente de ARN (ARN-FISH)	53
Adquisición y análisis de imágenes.....	54
RT-PCR semi-cuantitativa.....	55
Extracción de ARN.....	55
PCR en tiempo real.....	57
Análisis de los datos	59

Trasplante de células troncales	61
Preparación de la suspensión celular	61
Trasplante esplénico de células troncales	62
Determinación de la capacidad de anidación	62
Resultados.....	64
1. Aislamiento y caracterización de células troncales de hígado de rata.....	64
2. Aislamiento y caracterización de células troncales de hígado de ratón	70
3. Aislamiento y caracterización de células troncales EpCAM (+).....	77
Expresión de genes asociados al carácter hepato-específicos en células troncales	78
Expresión de genes asociados con el carácter troncal	82
Expresión in situ de genes asociados al carácter hepático en células troncales	84
4. Organización del genoma	86
5. Purificación y cultivo de células troncales EpCAM (+).....	88
6. Trasplante de células EpCAM (+)	90
Discusión	93
Células troncales hepáticas de ratas.....	93
Células troncales hepáticas de ratón.....	96
Expresión génica en células troncales hepáticas de ratón	106
Cultivo de células troncales EpCAM (+)	113
Trasplante de células EpCAM (+).....	115
Conclusiones finales	117
Bibliografía.....	119

Abreviaturas

2-AAF: 2-acetilaminofluorano.

ADN-FISH: Hibridación fluorescente in situ de ADN.

AFP: alfa-fetoproteína.

ALB: albúmina.

ARN-FISH: Hibridación fluorescente in situ de ARN.

ARNi: ARN de interferencia.

BFU-E: unidades formadoras de brotes eritroides.

BMP: proteínas morfogenéticas del hueso.

CCL4: tetracloruro de carbono.

CFSE: carboxifluoresceína-diacetato-succinimidil-ester.

CK19 o K19: citoqueratina 19.

Cldn3: Claudina3.

CNS: sistema nervioso central.

Cp: punto de cruce.

CSC: células troncales cancerosas (Cancer Stem Cells)

Dlk-1: Delta-like leucine zipper kinase-1.

Dpc: días post coitum.

DPPIV: di-peptidil-peptidasa IV.

EC: criptorquidia inducido experimentalmente.

EGF: factor de crecimiento epidérmico.

EMT: transición epitelial-mesenquimal (Epithelial-to-Mesenchymal Transition)

EpCAM: Molécula de adhesión celular epitelial (Epithelial Cellular Adhesion Molecule).

ESC: células troncales embrionarias (Embryonic Stem Cells).

FACS: separación de células activada por fluorescencia.

FHM: fracción hemopoyética.

FHP: fracción hepática.

FISH: Hibridación fluorescente in situ (Fluorescent in situ hybridization).

FT: factores de transcripción.

G6P: glucosa-6-fosfatasa.

GAPDH: gliceral-dehído-3-fosfatodeshidrogenasa.

GPI: glicosil-fosfatidil-inositol.

HBSS: solución tampón salina de Hank (Hank's buffer saline solution).

HCC: carcinoma hepatocelular.

Hem: células progenitoras hemopoyéticas.

Hep: hepatocitos maduros.

HEPES: solución tampón de ácido hidroxietil-piperazina-etanosulfónico.

HGF: factor de crecimiento de hepatocitos.

HSC: células troncales hemopoyéticas.

ICM: macizo celular interno del blastocisto.

INCUCAI: Instituto Nacional Central Único Coordinador de Ablación e Implante.

iPS: células troncales pluripotentes inducidas (induced Pluripotent Stem).

LSPC: Células troncales\progenitoras hepáticas (Liver stem/progenitor cells).

MACS: Separación de células asistida magnéticamente (Magnetic Assisted Cell Separation).

MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos (Mitogen Activated Protein Kinases).

miR: micro ARN.

NCAM: Molécula de adhesión celular neuronal.

PBS: solución tampón fosfato salino.

PFA: Para-formaldehído.

Real Time-PCR: PCR en tiempo real.

RT-PCR: PCR con transcriptasa reversa.

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta.

UFC: unidades formadoras de colonias.

UFC-GM: unidades formadoras de colonias granulocíticas-macrofágicas.

UFC-ME: unidades formadoras de colonias megacariocíticas.

α 1-aa: α 1-antitripsina.

Introducción

1. Células troncales

Las células troncales, Stem Cells en inglés, se definen como aquellas células con capacidad de automantenimiento y con la potencialidad de generar tipos celulares diferenciados ⁴.

El término célula troncal apareció por primera vez en la literatura en 1868, fue introducido por el eminente biólogo Alemán Ernest Haeckel para describir al antecesor unicelular de los organismos pluricelulares ⁵. Haeckel fue uno de los principales impulsores de la teoría de la recapitulación, la cual sostiene que el desarrollo embrionario de cada especie (ontogenia) repite completamente la historia evolutiva de dicha especie (filogenia). Si bien esta teoría ha quedado desacreditada en la actualidad, permitió que en el año 1877 Haeckel, basándose en esta teoría, propusiera que el oocito fertilizado o cigota (que da origen a todas las células del organismo también a los tejidos extraembrionarios) también sea llamado célula troncal ⁶.

Hacia fines del siglo XIX el término célula troncal fue ganando mayor aceptación en el contexto de las discusiones fundamentales para la embriología, como lo fue la discusión sobre la continuidad del germoplasma (para describir lo que hoy conocemos como células troncales de la línea germinal) o aquellas sobre el origen del sistema hemopoyético ⁶. Los trabajos de Till y McCulloch en la segunda mitad del siglo XX permitieron identificar por primera vez a las células troncales hemopoyéticas ⁷ (HSC, por sus siglas en inglés). Estos autores introdujeron por primera vez el método de inyección intra-esplénica de células de la médula ósea para identificar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) presente en una suspensión de células de la

médula ósea. A partir de los experimentos realizados, estos autores concluyeron que una pequeña proporción de las células totales de la médula ósea son células primitivas capaces de anidar en el bazo, proliferar, diferenciarse y dar origen dentro de una misma colonia a todos los linajes hemopoyéticos⁷.

En el final del siglo XX y comienzos del XXI, nuestros conocimientos sobre células troncales ha progresado substancialmente, y se han identificado en casi todos los tejidos adultos ⁵. Por ejemplo, han sido descritas células troncales somáticas en la piel ⁸, el sistema nervioso central ^{9,10}, la médula ósea ¹¹, el hígado ^{12,13}, el intestino ¹⁴, el músculo esquelético ^{15,16} y el corazón ¹⁷.

Las células troncales poseen potencialidad variable, y sólo la cigota y los descendientes de sus primeras dos divisiones son totipotentes, es decir capaces de dar origen al embrión y al trofoblasto de la placenta ¹⁸. A partir de las divisiones subsiguientes, las células comienzan a especializarse. En ratones, a los 3,5 días de gestación las divisiones asimétricas de células polarizadas de la mórula dan origen a las células pluripotenciales que forman el macizo celular interno del blastocisto (ICM) ¹⁹. Estas células son pluripotentes, dado que son capaces de dar origen a todas las células del organismo pero incapaces de producir un embrión ya que no pueden de formar la placenta y los tejidos de soporte ¹⁸. A partir de las células del ICM se produce la diferenciación en los distintos linajes (ectodermo, mesodermo, endodermo) y por ende todos los tipos celulares de los órganos y tejidos fetales y adultos del individuo; incluyendo a las células progenitoras tejido-específicas y a las células primitivas de la línea germinal ²⁰. Durante el desarrollo embrionario, las células originadas en el ICM del blastocisto proliferan, migran, anidan, proliferan nuevamente y se diferencian para generar los tejidos de los distintos órganos que constituirán al individuo adulto ²¹. Las células troncales y progenitoras tejido específicas embrionarias dan origen en el adulto a las

células troncales del adulto o somáticas. Es muy poco lo que se sabe sobre las características de las células en estadios intermedios de diferenciación, es decir entre la etapa de blastocisto y la de células troncales somáticas tejido/órgano específicas, que ocurre aproximadamente en la etapa de neurula ¹¹.

Las células troncales somáticas se caracterizan por ser multipotentes. Estas células son capaces de producir un rango limitado de linajes diferenciados, apropiados para su localización ^{18,22,23}. Las células troncales del intestino delgado, por ejemplo, pueden producir los cuatro linajes celulares locales (Paneth, caliciformes, enterocitos y enteroendocrinas)²⁴, mientras que las células troncales del sistema nervioso central (CNS) son capaces de generar neuronas, oligodendrocitos y astrocitos ²⁵. En el hígado se encuentran células troncales bipotenciales, que dan origen a colangiocitos y hepatocitos ²⁶. Las células troncales de cada órgano han evolucionado en paralelo y, en todos los casos, la presión de selección ha favorecido la formación, el establecimiento y el mantenimiento de compartimientos de células cuya función primordial es la regeneración de tejidos tanto en condiciones normales (homeostasis) como en respuesta a daños externos. Es decir, todos los tipos de células troncales poseen características funcionales diferentes. Por esto, cuando estudiamos una población de células troncales, es importante siempre tener en cuenta las características fisiológicas y evolutivas propias además de sus atributos generales de célula troncal. Así es que hoy en día, el término célula troncal es utilizado para describir distintas poblaciones celulares que se caracterizan por sus atributos funcionales ²⁷. Está ampliamente aceptado que los atributos funcionales que caracterizan a las células troncales deben estar apoyados por programas moleculares que permitan llevar a cabo sus funciones ^{28,29}, pero es importante mantener presente que no se ha encontrado un único programa genético común que controla las propiedades de células troncales diferentes ^{27,30}.

Las células troncales de un tejido particular son una población (potencialmente heterogénea) de células que se caracterizan por:

- Ser funcionalmente indiferenciadas. Son células que no expresan marcadores específicos de un tejido, por lo cual no son las células funcionales de dicho tejido.
- Son capaces de anidar en un ambiente de crecimiento apropiado.
- Son capaces de proliferar. Las células troncales mantienen su capacidad de proliferación a lo largo de toda la vida del individuo. Sin embargo, estas células están generalmente en estado quiescente y sólo proliferan cuando son activadas, reingresando al ciclo de división celular.
- Automantener la población. Las células troncales son capaces de dividirse simétricamente originando dos células hijas iguales, como así también asimétricamente dando lugar a una célula idéntica a sí misma y otra que sufre un proceso de diferenciación. Como resultado del proceso de división asimétrica, el tamaño de la población de células troncales se mantiene estable a lo largo del tiempo²³.
- Producir progenies indiferenciadas. Las células troncales pueden dar origen a las células progenitoras, también conocidas como células proliferativas transitorias o progenitoras comprometidas. Son células altamente proliferativas e indiferenciadas, que van adquiriendo marcadores de diferenciación a medida que proliferan y dan origen a las células funcionales de órganos/tejidos. A diferencia de las células troncales, estas células no son capaces de automantener la población.

- Participar en la homeostasis y en la regeneración de tejidos. Las células troncales pueden ser activadas luego de un daño, participando en el proceso de reparación ^{4,31}.

Idealmente, para que una célula sea considerada troncal debería satisfacer todos estos criterios, sin embargo la flexibilidad y reversibilidad en el uso de las mencionadas características es un requerimiento adicional. En la práctica una célula o población celular es categorizada como troncal cuando posee sólo algunas de estas características, si bien no todas tienen la misma significación. Así, por ejemplo, no podría categorizarse a una célula como troncal solamente porque tiene capacidad de proliferar, o solamente porque es indiferenciada. Las células troncales embrionarias (ESC) (Embrionic Stem Cells, en inglés), son células pluripotentes derivadas de las células del ICM del blastocito. Las ESC se pueden expandir indefinidamente en cultivo, al mismo tiempo que mantienen su pluripotencialidad ³²⁻³⁴. Bajo condiciones de cultivo específicas, estas células son capaces de diferenciarse en diferentes tipos celulares ³⁵. Los factores de transcripción ³⁶ Oct4, Sox2 y Nanog son claves para el mantenimiento de la pluripotencialidad de las ESC, los cuales funcionan en un circuito regulatorio que silencia la expresión de FT claves requeridos para la diferenciación y activan la expresión de genes que son importantes para el mantenimiento de la pluripotencia ³⁷⁻⁴⁰. El trabajo pionero del grupo de Yamanaka, introduciendo Oct3/4, Sox2 (sorprendentemente sin la necesidad de Nanog) más c-Myc y Klf4 mediante vectores virales en fibroblastos de ratón, produjo una revolución en el campo de las células troncales con la creación de las células iPS (las siglas en inglés de induced Pluripotent Stem)⁴¹. El potencial de esta tecnología es muy grande y día a día se encuentran nuevas aplicaciones que van desde terapias celulares hasta el estudio de nuevos fármacos ⁴². Pero más allá que los FT en sí mismos, ciertas proteínas que están implicadas en la

remodelación de la estructura de la cromatina también cumplen una función importante determinando la accesibilidad de los FT al ADN ^{29,43}. En efecto, los mecanismos epigenéticos son un factor clave en el mantenimiento de la pluripotencia y en la diferenciación a distintos linajes ⁴⁴. La cromatina de las ESC posee diferentes características específicas, que la distinguen de aquella en células somáticas y en células diferenciadas ⁴⁵.

2. Nicho de las células troncales

Como se mencionó anteriormente, las células troncales se caracterizan por su capacidad de anidar en un ambiente apropiado, esto implica que debe haber un lugar de residencia o nicho de las células troncales. Si bien esta definición de nicho podría satisfacer el concepto arquitectónico del mismo ⁴⁶, esta descripción es exigua puesto que la simple ubicación espacial de las células troncales no es suficiente para definir al nicho. Es necesario considerar además el conjunto de interacciones de las células entre sí y con los demás componentes del ambiente donde se alojan ⁴⁷. Es así que el concepto de nicho hace referencia a un conjunto de características espaciales y funcionales; el nicho de células troncales es una entidad y una función ^{46,48}. El nicho modula el número y el destino de las células troncales, soporta su automantenimiento, inhibe o activa la diferenciación en las situaciones fisiológicas normales, patológicas y en respuesta a una injuria ⁴⁹. A pesar de las diferencias particulares, la arquitectura global del nicho parece tener componentes básicos que son distintivos en todos los tipos de nichos. Esta “lista de partes” hipotética incluye a la célula troncal en sí misma, que varía según el tipo de nicho; las células estromales de soporte, que también son variables e interaccionan directamente con la célula troncal y entre ellas mismas; moléculas solubles producidas local o sistémicamente (factores de crecimiento, hormonas, citoquinas); proteínas de la matriz extracelular, que proveen estructura, organización y transmiten diversas señales

externas (como mecánicas y eléctricas) al nicho; vasos sanguíneos, que permiten el reclutamiento de células inflamatorias y otras células circulantes al nicho; y entradas nerviosas que comunican señales fisiológicas distantes al microambiente de las células troncales ²².

Los principales atributos que definen a las células troncales se refieren a su comportamiento potencial; este carácter troncal no es una cualidad “presente o ausente” en una célula dada, sino más bien una sucesión de comportamientos potenciales ^{50,51}. Mientras más atributos de los ya citados tenga una célula, más probable será que se comporte como una célula troncal ⁵². Como ya mencionamos, las células troncales cultivadas in vitro se encuentran en un estado bivalente, caracterizado por una dinámica de activación/represión de genes vinculados con diferenciación y pluripotencialidad, aún en estado quiescente⁵³⁻⁵⁵. La respuesta de las células troncales al conjunto de señales de diferenciación, automantenimiento, proliferación y muerte que reciben permanentemente y de manera conjunta depende del estado específico (tanto intrínseco como extrínseco) en el que se encuentra cada célula troncal en cada momento⁵³.

El estado intrínseco de las células troncales está regulado en gran medida por componentes epigenéticos, algunos ya mencionados, y otros como los micro ARN (miRs), cuya relevancia en la regulación de la expresión génica de las células troncales cobra cada día mayor relevancia. O’Connell y colaboradores aislaron células Lin- (linaje-, es decir que carecían de la expresión de 14 proteínas de superficie que son marcadores de los diferentes linajes de células sanguíneas maduras), c-Kit+ (también llamado CD117), Sca1+ (siglas en inglés de stem cell antigen-1); y a partir de éstas, identificaron miRs específicos de HSC. Luego transfectaron células de la médula ósea CD45.1+ con vectores retrovirales con las secuencias de cada uno de los 11 miRs identificados como propios de las HSC. Finalmente, realizaron experimentos de

repopulación competitiva, en ratones CD45.2+ irradiados, utilizando como control células CD45.1+ transfectadas con vectores vacíos. Cuatro meses después de la inyección de células, analizaron muestras de sangre periférica y observaron que las células transfectadas con 3 de los miRs aislados (miR-125b-5p, miR-126-3p, miR-155) tenían una ventaja adaptativa para injertarse y repoblar en la médula ósea receptora ⁵⁶. Este experimento, entre muchos otros ^{50,51,57,58} que muestran la modulación de la respuesta ante los estímulos ambientales por parte del estado interno sustenta un concepto muy interesante por el cual el carácter troncal de una célula sería un estado más que un tipo celular en sí mismo. Es decir, un estado modulado por la interacción de las señales locales del microambiente (proteínas, moléculas de unión, poblaciones celulares vecinas, presión de fluidos, etc.) y el estado intrínseco (receptores de membrana, componentes del citoesqueleto que permiten realizar divisiones asimétricas, factores de transcripción, patrón epigenético, etc.) en el que se encuentran las células. De todo esto se desprende el concepto de que una célula troncal no es una entidad totalmente autónoma, sino mas bien que se "convierte" en célula en estado troncal por el equilibrio entre su estado interno y la interacción con su ambiente, su nicho ⁴⁸.

3. Desarrollo embriológico del hígado

El hígado de los vertebrados se desarrolla a partir del endodermo del intestino anterior. El llamado endodermo intestinal definitivo se alinea inicialmente en la superficie ventral del embrión. El dominio anterior-ventral del endodermo del intestino anterior es un tejido multipotente que da origen al hígado, pulmones, tiroides y la parte ventral del páncreas ^{2,59}.

Estudios de rastreo de destino celular, utilizando tinciones vitales en distintos estadios del desarrollo, mostraron que la región pre-hepática existe en dos dominios laterales separados del endodermo ventral y en el endodermo ventral medial. Estas células

progenitoras hepáticas migran hacia la región medial ventral y se unen durante el desarrollo ⁶⁰.

La organogénesis del hígado es inducida en el endodermo por las señales convergentes del factor de crecimiento para fibroblastos (FGF) y la proteína morfogénica del hueso (BMP). Estas señales provienen de, al menos, tres orígenes mesodérmicos diferentes: el mesodermo cardíaco, el septo transvers mesenquimático y células endoteliales (Figura I.1). La primera señal inductiva se origina a partir del mesodermo cardíaco y provoca la activación de genes específicos del hígado (Albúmina y Gata4, que codifica para un

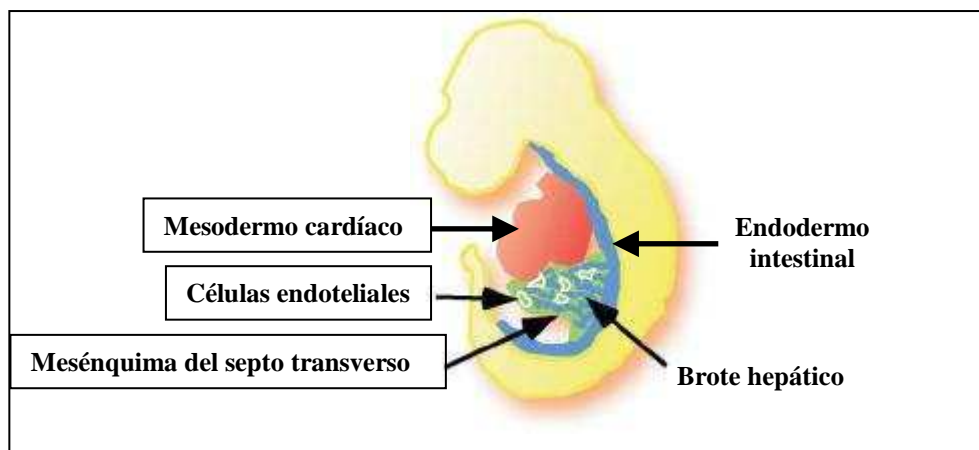


Figura I.1: La organogénesis y el desarrollo del brote hepático esta inducido por las señales convergentes de, al menos, tres tejidos de origen mesodérmico (recuadros). Extraído y modificado de Zhao ¹.

factor de transcripción) y la proliferación del endodermo hepático naciente ⁶¹. Un experimento clásico realizado por Le Douarin, utilizando embriones de pollo, mostró que el mesodermo cardíaco, que está transitoriamente superpuesto con el que será posteriormente el endodermo hepático, provee señales que son cruciales para inducir a los progenitores hepáticos en el endodermo ⁶². Para profundizar estos experimentos y conocer a fondo los mecanismos subyacentes, aislaron el endodermo ventral del intestino anterior y el mesodermo cardíaco de embriones de ratón, y lo cultivaron in vitro bajo condiciones que permiten la inducción hepática ⁶³. Estos experimentos mostraron que entre ambos tejidos existen señales que por un lado favorecen la

hepatogénesis y por otro inhiben la activación de genes hepáticos en regiones del endodermo que darán origen a otros tejidos. Más tarde, estudios más detallados usando este mismo sistema permitieron demostrar que los inhibidores de la señalización de FGF bloquean la inducción hepática mediada por el mesodermo cardíaco ⁶⁴. También se mostró que, a bajas concentraciones, el tratamiento con FGF induce la expresión temprana de genes hepáticos en explantos de endodermo que fueron cultivados en ausencia de mesodermo cardíaco ⁶⁴.

Los genes de albúmina ⁶⁵ y alfa-fetoproteína (AFP) están entre los primeros que se expresan durante la diferenciación hepática en mamíferos ⁶⁵. Estos genes comienzan a expresarse en el estadio de 7 somitas, el equivalente a 8,25 días post coitum (dpc) en ratones ⁶⁴. Durante el desarrollo hepático, los progenitores bipotenciales que co-expresan ALB/AFP son llamados hepatoblastos y son capaces de diferenciar en hepatocitos y células de los conductos biliares ⁶⁶⁻⁶⁸. AFP fue descubierta en los años 60 por Garri Abelev ^{69,70}, tiene una estructura similar a la ALB y el gen que la codifica mapea en tándem con el de ésta en el cromosoma 5 de ratón y el cromosoma 4 humano ⁷¹. La AFP se expresa primero en el saco vitelino y luego en los hepatoblastos fetales. Su expresión decrece a medida que aumenta la expresión de ALB hacia el final de la gestación ^{72,73} y se apaga casi completamente luego del nacimiento. En situaciones patológicas como la carcinogénesis suele frecuentemente volver a expresarse ^{74,75}.

Antes de la inducción hepática, el mesodermo cardíaco secreta FGF-8 y al iniciar la inducción, secreta bajas concentraciones de FGF-1 y FGF-2 ^{64,76} lo que permite la diferenciación hepática, a través de un programa en el que participa la vía de señalización de MAPK ⁷⁷ (de las siglas en inglés Mitogen Activated Protein Kinases). Estas señales son necesarias y suficientes para inducir el destino hepático dentro del endodermo, pero no son suficientes para inducir la morfogénesis de las nuevas células

hepáticas⁶⁴. Luego de la inducción hepática, se produce la segunda etapa de inducción a partir del mesénquima del septo transversal, que es un tejido derivado del mesodermo lateral. En este momento, las células mesenquimáticas del septo transversal se desarrollan rodeando el mesodermo cardíaco e interceden entre éste y el endodermo del intestino anterior. Por un lado, actúan como barrera sobre el hígado primitivo contra la señalización directa del mesodermo cardíaco, que a esta altura del desarrollo secreta altas concentraciones de FGFs que contribuyen a la formación de los pulmones⁷⁸. Por otro lado, también contribuyen al epicardio y al diafragma, y producen tempranamente proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs)⁷⁹, especialmente BMP2, BMP4, BMP5 y BMP7, que parecen ser críticas para la aparición del divertículo hepático^{61,80}.

La señal temprana de las BMPs desde el mesénquima del septo transversal puede ser considerada un promotor para que el endodermo sea competente para responder la señal de FGF proveniente del mesodermo cardíaco^{81,82}. De hecho, ha sido demostrado que la inhibición de las BMPs impide la inducción hepática por el mesodermo cardíaco o por los FGFs^{21,61}. Las interacciones con células endoteliales, el tercer derivado mesodérmico en esta secuencia inductiva, son cruciales para esta fase temprana del brote hepático⁸³. Células endoteliales embrionarias rodean el endodermo hepático recién diferenciado y delimitan el dominio mesenquimático dentro del cual crece el divertículo hepático. En experimentos con embriones mutantes carentes de células endoteliales, la especificación hepática ocurre, pero la morfogénesis se detiene antes de la invasión mesenquimal⁸⁴. Muy pronto después de la inducción del endodermo hepático, ocurre un evento morfogénico fundamental en el hepatoblasto: cambia desde una forma cuboidal a una columnar generando un epitelio pseudoestratificado, controlado por el factor de transcripción Hex⁸⁵. Esto le permite al hepatoblasto romper la lámina basal y emerger dentro del estroma que lo rodea y proliferar, para continuar

con su desarrollo ⁸⁵. Los hepatoblastos en el estroma reciben señales desde las células endoteliales para proseguir en su maduración ⁸⁴.

Como se mencionó anteriormente, el endodermo ventral del intestino anterior es capaz de dar origen a distintos órganos además del hígado. Estudios detallados realizados con explantos de tejido embrionario del endodermo ventral del intestino anterior mostraron que, en ausencia del mesodermo cardíaco o de la señalización de los FGFs, el dominio del endodermo ventral del intestino anterior, que normalmente se diferencia en hígado, adopta rápidamente un destino pancreático ⁸⁶. Por el contrario, si dichos explantos se sitúan próximos al mesodermo cardíaco, o se someten a un tratamiento con FGF, se inhibe la expresión de genes pancreáticos al mismo tiempo que se inducen genes hepáticos. Por otro lado, la señalización de las BMPs a partir del mesénquima del septo transversal promueve la inducción de genes hepáticos, a expensas de los del páncreas ⁶¹. Sin embargo, la señalización de las BMPs no sería inhibitoria para el desarrollo del páncreas ventral, sino que otorga al endodermo competencia para cualquiera de los dos destinos. Todo indicaría que el endodermo ventral del intestino anterior contiene células bipotenciales precursoras del hígado y el páncreas, y que la señalización de FGF desvía al endodermo hacia un destino hepático, cuando por omisión sería pancreático (Figura I.2)^{21,87}.

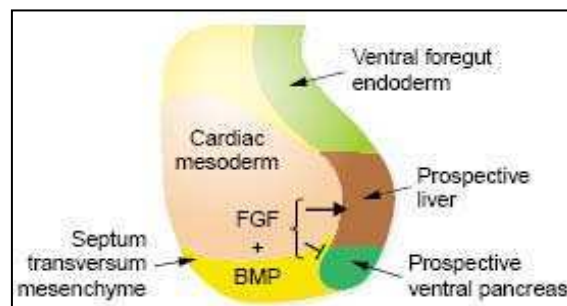


Figura I.2: La señalización de BMPs a partir del mesénquima del septo transversal otorga al endodermo competencia para cualquiera de los dos destinos. La señalización de FGFs del mesodermo cardíaco desvía al endodermo hacia un destino hepático, cuando por omisión sería pancreático. Figura modificada de Zaret ².

Por otra parte, a partir de experimentos en los que células progenitoras provenientes de páncreas de rata adulta fueron aisladas y trasplantadas en el hígado, se demostró que el vínculo entre el hígado y el páncreas se mantiene aún en la vida adulta. Los autores probaron que las células trasplantadas diferenciaron en hepatocitos, expresaban proteínas específicas del hígado, y se integraban completamente en la estructura del parénquima hepático. Además del origen embriológico común entre ambos órganos, los autores de este trabajo concluyen que células multipotentes de origen epitelial, estarían presentes en el páncreas e hígado, aún en el individuo adulto ⁸⁸. Cuando el endodermo hepático está diferenciado y el brote hepático comienza a crecer, sus células son denominadas hepatoblastos. Inmediatamente después que el brote hepático surge del endodermo intestinal, el hepatoblasto puede diferenciarse en hepatocito o en célula del conducto biliar. En muchos tejidos, incluido el hígado, el camino de señalización del receptor/ligando Notch/Jagged parece ser importante para marcar el destino celular, la diferenciación y la proliferación. El receptor de transmembrana Notch se expresa en hepatocitos, células ductales biliares y células endoteliales. En cambio, su ligando Jagged-1 se expresa sólo en hepatocitos y células ductales biliares. Ambas proteínas, el receptor y su ligando, se activan después de una hepatectomía parcial ^{89,90}. Otros factores transcripcionales, como factor de crecimiento transformante (TGF- β) y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) también se mencionan como potenciales reguladores de la diferenciación de las células epiteliales hepáticas, integrando un sistema de regulación que controla la bipotencialidad. Distintos experimentos indicarían que la vía por omisión del hepatoblasto sería el convertirse en una célula del conducto biliar, y que las distintas señales morfogénicas serían las encargadas de desviar esta vía y permitir que el hepatoblasto adopte el camino de diferenciación a hepatocito ⁹¹⁻⁹⁵. Por otro lado, durante el desarrollo, las mismas células troncales que dan origen a los hepatoblastos (o

algún tipo celular derivado de ellas) se incorporarían en la zona de transición entre el epitelio hepático y el epitelio biliar, en los llamados conductos de Hering (Figura I.3), constituyendo el nicho de células progenitoras hepáticas adultas ^{96,97}.

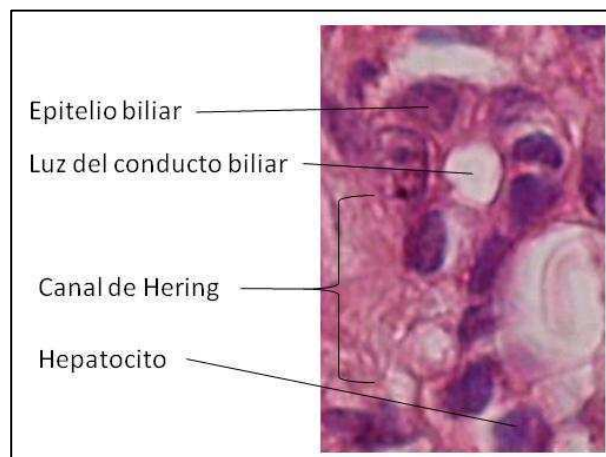


Figura I.3: Canal de Hering es la región que conecta el ducto biliar (con células ductales epiteliales) con los canalículos y el fin de la placa de hepatocitos del parénquima.

4. El hígado y el sistema hemopoyético

El hígado es el principal órgano hemopoyético durante el período embrionario; eritroide primero y granulocítico y megacariocítico después. Una vez que el divertículo hepático emerge a partir del tubo intestinal en desarrollo, las células hemopoyéticas migran allí desde el saco vitelino y proliferan formando islotes sanguíneos, constituyendo el comienzo de la segunda etapa o fase hepática de la hemopoyesis, que en la rata se extiende aproximadamente desde la mitad del periodo gestacional comenzando a decaer a partir del día 17 de gestación ^{98,99}. La función de las células hemopoyéticas durante esa etapa sería no sólo expandirse y diferenciar en los distintos linajes hemopoyéticos, sino también contribuir a la maduración de los compartimientos epiteliales del hígado, emitiendo señales específicas en este sentido ¹⁰⁰. Durante la mayor parte del período ontogénico del hígado de los mamíferos, una gran fracción del hígado fetal contiene células hemopoyéticas activamente proliferativas y también en diferenciación,

íntimamente ligadas a las células epiteliales también en proliferación o diferenciación⁹⁶. Cerca del nacimiento, las células hepáticas alcanzan su madurez y adquieren un estado quiescente, mientras que la hemopoyesis es exportada a la médula ósea y otros órganos linfoides, agotando los nichos hemopoyéticos hepáticos¹⁰¹.

5. Células troncales hepáticas

La notable capacidad regenerativa del hígado se conoce desde la Antigua Grecia. En efecto, en los relatos mitológicos Prometeo es castigado a que su hígado sea devorado por un águila por robar el fuego del Olimpo, y a pesar que el águila infringía esta acción, su hígado volvía a crecer cada noche, constituyendo esto un castigo sin fin. La regeneración hepática ha sido extensamente estudiada en varios modelos experimentales, siendo el más utilizado es el de hepatectomía de dos tercios del hígado en ratas, introducido por Higgins y Anderson^{3,102}. A diferencia de otros tejidos que se regeneran, como la piel, el hueso o la médula ósea, la regeneración hepática, normal o luego de un daño leve o moderado está a cargo de los hepatocitos y no depende de un grupo de células progenitoras o células troncales¹⁰³. Luego de la hepatectomía parcial, los hepatocitos salen de la quiescencia sincrónicamente, reingresan en el ciclo celular y sufren una o dos rondas de replicación antes de volver al estado quiescente^{3,104,105}. En una segunda oleada mitótica, proliferan el resto de las poblaciones celulares (células del epitelio biliar, células endoteliales, células de Kupffer y células de Ito) y se restaura el número correspondiente a cada población, así como la arquitectura hepática (Figura I.4). Cuando el hígado ha alcanzado su tamaño original, la replicación cesa y los hepatocitos reingresan a G_0 ¹⁰⁶. Sin embargo, si el daño hepático es extenso y el número de hepatocitos maduros residuales no es suficiente como para llevar a cabo la regeneración, o bien su proliferación está inhibida (como ocurre por carcinógenos, hepatotoxinas e

infecciones virales), se produce entonces una regeneración que es dependiente de la activación de células troncales hepáticas.

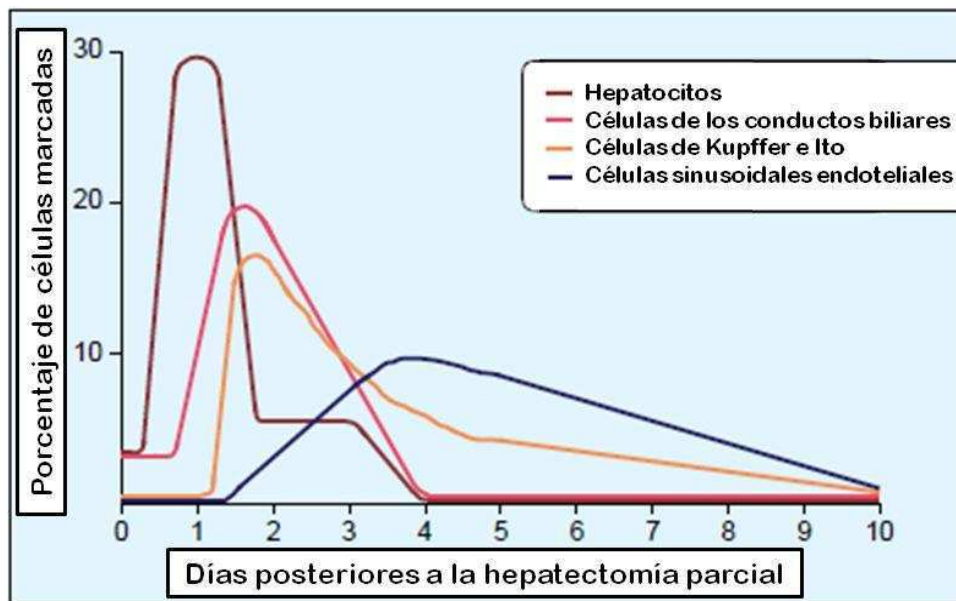


Figura I.4. Cinética temporal de la síntesis de DNA durante la regeneración hepática luego de una hepatectomía parcial. La incorporación de marcas radioactivas durante la síntesis de DNA se utilizó para medir la cinética de ingreso al ciclo celular de las diferentes poblaciones hepáticas. En los hepatocitos el pico de síntesis de DNA se observa a las 24 hs, mientras que las células de los conductos biliares y las células de Kupffer e Ito tienen su pico a las 48 hs posteriores a la hepatectomía parcial. Imagen modificada de Michalopoulos ³.

Los estudios de las células troncales hepáticas se iniciaron hace más de 60 años. Farber y Sell investigaron sobre el rol de las células productoras de AFP durante la hepatocarcinogénesis inducida experimentalmente en ratas, estos estudios se concentraron principalmente en una serie de lesiones llamadas focos o nódulos las cuales se consideraban características de la primera etapa de la tumorigénesis o premaligna. Estos autores encontraron que los niveles séricos de AFP no correlacionaban con el desarrollo de nódulos, sino más bien con el aumento en el número de células ovals (llamadas así por la morfología ovoide de su núcleo) que se encontraban entre los nódulos. Luego, y a medida que progresaba la enfermedad, los niveles de AFP descendían hasta el momento del desarrollo del carcinoma hepatocelular (HCC) donde aumentaban nuevamente. Estudiando la localización celular de AFP por

inmunofluorescencia encontraron que AFP estaba presente en células ovales pero no en las células de los nódulos displásicos o hiperplásticos^{107,108}.

A finales de la década de 1980, Evarts y colaboradores presentaron las primeras evidencias de que entre las células ovales y los hepatocitos existía una relación precursor-producto¹⁰⁹. Utilizaron un modelo experimental desarrollado por su grupo, liderados por Thorgeirsson, que consiste en inducir daño hepático mediante hepatectomía parcial y simultáneamente arrestar los hepatocitos diferenciados en G₀ mediante un tratamiento con 2-acetilaminofluorano (2-AAF), seguido de inyección intraperitoneal de timidina tritiada. Estos autores observaron que al cabo de 9 días posteriores a la hepatectomía, la marca radioactiva estaba presente sólo en las células ovales, mientras que en el día 13 dicha marca fue detectada también en pequeños hepatocitos basófilos^{109,110}. Además, estos autores demostraron que estos pequeños hepatocitos tenían expresión residual de AFP, la cual es característica de las células ovales^{110,111}. En la actualidad existen varios modelos que permiten obtener células ovales en forma reproducible a partir de hígado de ratas. Todos ellos se basan en el anteriormente descrito, es decir arrestar a los hepatocitos diferenciados en G₀ y generar un daño hepático (Figura I.5). El daño hepático puede ser inducido por hepatectomías parciales o por agentes químicos, tal como tetracloruro de carbono (CCL₄), mientras que para bloquear químicamente la capacidad regenerativa de los hepatocitos, previo a la hepatectomía parcial, se puede utilizar además del ya mencionado 2-AAF, dietilnitrosamina¹¹², D-galactosamina¹¹³, lasiocarpina¹¹⁴ o retrorsina¹¹⁵. Lemire, con un diseño experimental similar al de Evarts y utilizando D-galactosamina, demostró que las células ovales surgían a partir de células ubicadas en los conductos biliares¹¹³, más precisamente en la zona de transición entre el epitelio hepático y el epitelio biliar, en los

llamados conductos de Hering. Estas células ubicadas en el canal Hering, son las células troncales hepáticas^{116,117}.

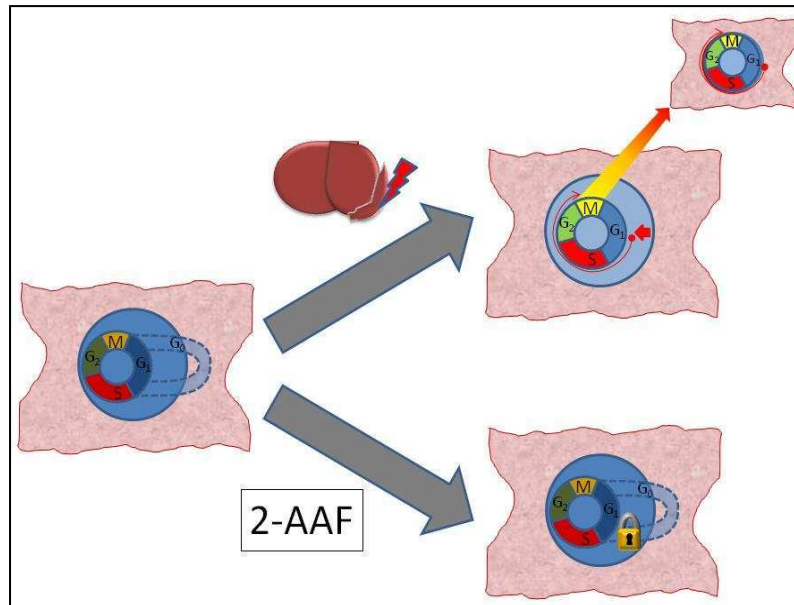


Figura I.5. Reingreso de los hepatocitos al ciclo celular. Esquema del modelo experimental utilizado para activar a las células troncales hepáticas: luego de un daño hepático, ya sea producido por una hepatectomía parcial o por CCl₄, los hepatocitos salen de G₀ y reingresan en el ciclo celular. El tratamiento con 2-AAF impide el reingreso de los hepatocitos al ciclo celular.

Las células ovales son descendientes directas de las células troncales hepáticas. Son células pequeñas (7-10µm), con citoplasma escaso y basófilo, con nucléolo visible, y alta relación núcleo/citoplasma. Semejantes a las células del epitelio biliar, comparten muchas propiedades con los hepatocitos fetales, como ser la expresión de las proteínas ALB y AFP, así como otras isoformas de enzimas fetales^{118,119}. Tienen alta capacidad de proliferación y son bipotenciales, es decir pueden diferenciarse en células de linajes del epitelio hepático y biliar¹²⁰⁻¹²³. Las células ovales en proliferación comprenden una población heterogénea de células que incluyen células en tránsito o progenitoras que tienen distintos grados de diferenciación. Las células ovales expresan una variedad de marcadores, muchos de ellos compartidos con las células progenitoras hemopoyéticas como por ejemplo Thy-1, c-kit y CD34. Thy-1 ha sido ampliamente utilizada como

marcador de células ovals. Es una proteína que se encuentra anclada a la membrana celular de distintos tipos celulares como fibroblastos, neuronas, células endoteliales y hemopoyéticas, unión que es mediada por glicosil-fosfatidil-inositol (GPI). Está involucrada en la activación de células T, apoptosis, supresión de tumores, cicatrización y fibrosis¹²⁴.

Las células ovals también expresan citoqueratina 19 (CK19 o K19) que es una proteína de los filamentos intermedios, responsables de la integridad estructural de las células epiteliales; expresada principalmente por colangiocitos^{125,126}. También expresan dipeptidil-peptidasa IV (DPPIV), ALB, glucosa-6-fosfatasa (G6P) y α 1-antitripsina (α 1-aa). Por otra parte, las células ovals se pueden identificar también por la expresión de antígenos específicos, tales como los llamados antígenos de células ovals OC2, OC3, OV6, OV1 y A6, aunque son marcadores que también lo expresan las células ductales. Cabe destacar que las células ovals no expresan la totalidad de estos marcadores simultáneamente, sino que dicha expresión está relacionada con la especie animal de donde provengan las células¹²⁷⁻¹²⁹ y con el estado de diferenciación de las mismas. Debido a esto, las células ovals se definen como un compartimento celular que comparte marcadores fenotípicos con los hepatocitos, las células de los conductos biliares y las células troncales hemopoyéticas, más que una población específica¹²⁷(Figura I.6). Según Potten, este concepto se aplica si se considera una población en la que coexiste un número variable de tipos celulares, y donde sólo el comportamiento promedio es el foco de interés, no siendo relevantes ni la variabilidad individual ni las fluctuaciones menores⁴. Así es como el “compartimento de células ovals” comprende las células ovals propiamente dichas y otras células en transición con diferentes grados de diferenciación y características morfológicas intermedias entre células ovals y hepatocitos. Es importante mencionar también que el término célula oval se utiliza

exclusivamente para describir a las células de roedores, mientras que este compartimiento de células en humanos se denominó células hepatobiliares intermedias, pequeños hepatocitos o hepatocitos de los conductos biliares ¹³⁰.

Los modelos mencionados previamente, de los cuales el desarrollado por Thorgeirsson y colaboradores es el más ampliamente utilizado, permitieron sustentar la hipótesis sobre la existencia de las células troncales hepáticas y su importancia durante la regeneración hepática ^{103,122,131-135}. Aunque es importante recalcar en este punto que estos modelos, que consisten en la activación del compartimiento de células ovaes inhibiendo la proliferación de los hepatocitos maduros e induciendo un daño hepático, son una estrategia que permite obtener células ovaes en una situación de desafío fisiológico.

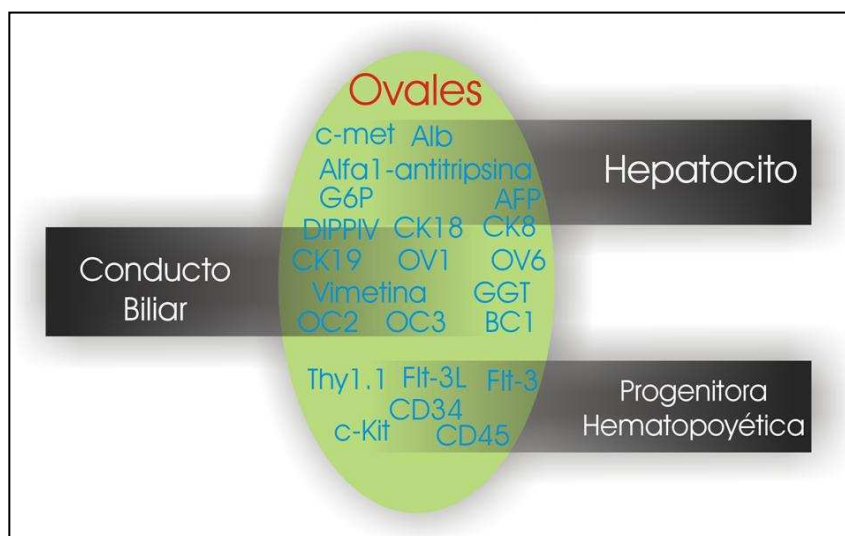


Figura I.6. Compartimiento de células ovaes. Las células ovaes expresan marcadores compartidos con los hepatocitos, las células del conducto biliar y las células progenitoras hematopoyéticas.

Los esfuerzos para obtener marcadores moleculares que caractericen específicamente a las células troncales hepáticas de ratones dieron sus primeros frutos recién a principios de este siglo. Mediante citometría de flujo de células de hígado fetal de ratones de 11 dpc, se identificó una población celular con baja expresión de la proteína c-kit (c-kit^{bajo})

y negativa para los marcadores de linaje eritroide Ter-119 y de linaje linfocitario CD45¹³⁶ (Ter-119/CD45)⁻. c-kit es el receptor de transmembrana del factor de células madre (stem cell factor), codificado por el proto-oncogén del mismo nombre y que se encuentra expresado en células troncales hemopoyéticas y mesenquimales⁶⁵, aunque también se lo encuentra sobre expresado en células derivadas de diferentes tipos de tumores^{137,138}. Las células de esta subpoblación c-kit^{bajo} pueden ser mantenidas en cultivo in vitro, diferenciarse a células de los conductos biliares y a hepatocitos^{101,139} y también migrar al hígado y diferenciarse, luego de ser trasplantadas en el bazo¹⁴⁰. Otros autores proponen en el uso de (Ter-119/CD45)⁻ para identificar células troncales hepáticas, pero en este caso la subpoblación no expresa c-kit ni Thy-1¹⁴¹.

Más tarde, se descubrieron otras moléculas relacionadas con el carácter troncal. Por ejemplo, el grupo de Miyajima, utilizando una librería de cDNA confeccionada a partir de la subpoblación (Ter-119/CD45)⁻, logró identificar a la proteína Delta-like leucine zipper kinase-1 (Dlk-1), en las células troncales hepáticas¹²⁵. Más tarde, se identificaron a E-cadherina^{142,143} y a CD24a¹⁴⁴ como marcadores de estos precursores celulares. Esta última (CD24a) es una proteína glicosilada anclada por GPI a la superficie de la membrana celular, que fue detectada estudiando el perfil transcripcional de células hepáticas embrionarias¹⁴⁴. También se encuentra expresada en células hemopoyéticas, células de la glándula mamaria y en células de colangiocarcinoma, siendo usada inclusive como marcador pronóstico en el manejo de los pacientes con este tipo de cáncer^{145,146}.

A finales de 2006, se demostró que en el hígado fetal, pediátrico y del adulto humano, las células precursoras expresan la molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM, CAM por sus siglas en inglés Cellular Adhesion Molecule)¹⁴⁷. EpCAM, identificada originalmente como un antígeno en células de cáncer de colon en humanos, es una molécula que forma uniones célula-célula homofílicas independientes de Ca²⁺^{148,149}. En

células epiteliales normales se expresa en los espacios intercelulares, mientras que en las células cancerígenas se expresa homogéneamente en toda su superficie^{150, 75, 149}. Además de su función como molécula de adhesión, EpCAM está directamente relacionada con la proliferación, la migración y la transducción de señales mitogénicas en las células que la expresan¹⁵¹⁻¹⁵³. Sin embargo, el papel de esta molécula en la determinación del carácter troncal, está aún poco estudiado.

Dado los avances en lo referente a la caracterización de nuevas moléculas para identificar a las células troncales hepáticas, se comenzó a abandonar la denominación de compartimiento de células ovals y definirlas como células bipotentes capaces de diferenciarse en hepatocitos y en células de los conductos biliares, capaces de mantener la población por periodos prolongados y de llevar a cabo la regeneración hepática en respuesta a injurias graves o reiteradas. En la actualidad se reconocen dos tipos de células troncales hepáticas:

- Células troncales hepáticas propiamente dichas. Estas poseen todos los atributos funcionales de las células troncales descritos previamente y se caracterizan por expresar CK19, la proteína de adhesión celular neuronal (NCAM), EpCAM, ALB y ausencia de expresión de AFP. Si bien tienen un alto potencial proliferativo en el hígado adulto, en condiciones normales se encuentran en estado quiescente en el canal de Hering y se activan ante estímulos de daño hepático grave o reiterado²⁶.
- Hepatoblastos. Este tipo de células expresan altos niveles de AFP, ALB, EpCAM y CK19, mientras que no expresan NCAM. Proviene de las células troncales hepáticas, predominan en el hígado fetal y su número se reduce luego del nacimiento²⁶. La proteína NCAM fue la primera molécula de adhesión celular en ser caracterizada. Junto con LCAM conforman las llamadas CAMs primarias debido a que aparecen temprano en el desarrollo de tejidos de todas las líneas germinales, a pesar de que

también se encuentran más tarde durante la histogénesis¹⁵⁴. Al igual que EpCAM, NCAM media uniones homofílicas, independientes de Ca^{2+} ¹⁵⁵. NCAM presenta tres isoformas principales¹⁵⁶ como resultado del splicing alternativo de un único gen^{157, 158}. Las propiedades adhesivas de NCAM son moduladas durante el desarrollo embriológico¹⁵⁹ y más tarde, durante el desarrollo y plasticidad neuronal, por la presencia de ácido polisiálico¹⁶⁰.

Durante el desarrollo embrionario, como ya mencionamos, las células troncales hepáticas dan origen a los hepatoblastos, los cuales tienen una limitada capacidad de automantener su población pero mantienen intacta la bipotencialidad. Los hepatoblastos proliferan y se diferencian permitiendo el establecimiento de la arquitectura hepática. La población de células troncales hepáticas se mantiene relativamente constante en cuanto a su número, durante toda la vida del individuo, mientras que los hepatoblastos prevalecen durante el desarrollo hepático y su número decae luego del nacimiento¹⁴⁷. Otro tipo celular presente durante el desarrollo embrionario es la población de células proliferativas transitorias¹³, que también se origina de células troncales hepáticas cuando son activadas ante un daño hepático severo o reiterado en el adulto y/o de los hepatoblastos durante el desarrollo fetal del hígado (Figura I.7). Estas células poseen alta capacidad proliferativa y son también bipotenciales pero carecen de la capacidad de automantener la población por lo que se consideran células progenitoras y no células troncales. Dentro de esta subpoblación de células proliferativas transitorias es en la que se encontrarían las antiguamente llamadas células ovales. Muchas veces en la literatura, cuando se trabaja con células troncales hepáticas, se recurre al término LSPC (acrónimo de su nombre en inglés Liver stem/progenitor cells). Esta denominación se utiliza debido a la dificultad práctica que existe para delimitar las poblaciones cuando se aíslan

y cultivan células primarias con características de células troncales y/o progenitoras hepáticas (Figura I.7).

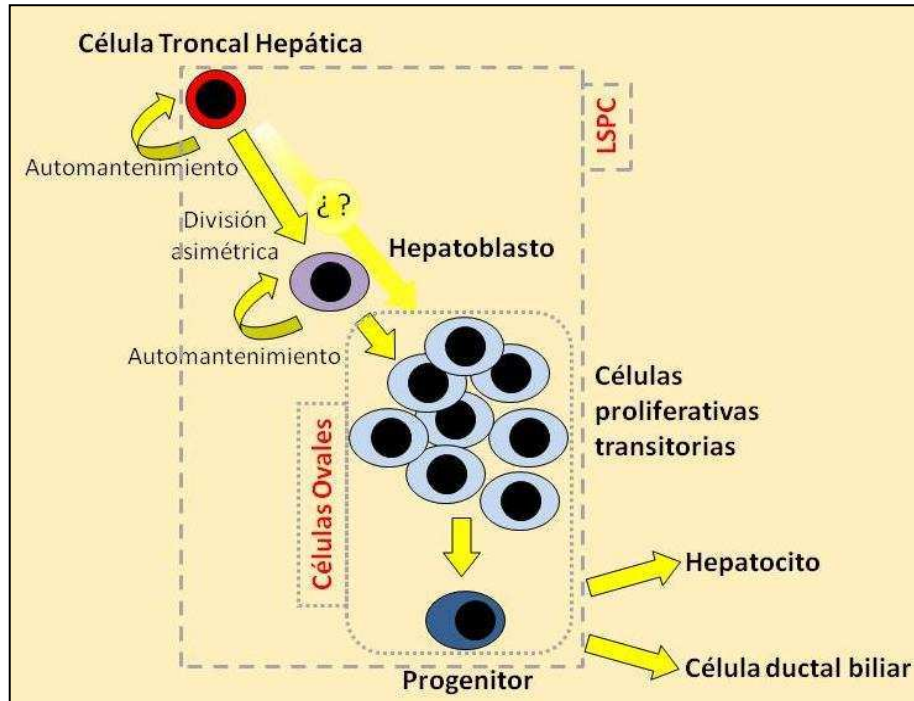


Figura I.7. Linajes de las células troncales hepáticas.

6. Células troncales hepáticas en medicina regenerativa.

Las enfermedades autoinmunes y metabólicas del hígado, como así también los carcinomas hepáticos representan un problema de gran importancia para la medicina moderna. La mayoría de estas enfermedades producen falla hepática aguda o crónica que pueden derivar en la muerte del paciente si no son tratadas diligentemente. Actualmente, la única terapéutica para la falla hepática fulminante es el trasplante hepático ortotópico alogénico. Sin embargo, la enorme diferencia existente entre el número de órganos disponibles para trasplante y el número de pacientes receptores es la mayor limitación a nivel mundial para la aplicación de esta terapéutica y esto ocasiona que muchos de dichos pacientes mueran en lista de espera para el trasplante, o bien que sus condiciones clínicas se deterioren notablemente antes de recibir el trasplante.

Debido a esto, es necesario establecer o encontrar alternativas terapéuticas para el tratamiento de las disfunciones hepáticas.

El trasplante de células ha sido la estrategia más estudiada durante la última década, ya sea como terapia puente para mantener al paciente estable hasta que el trasplante pueda ser llevado a cabo, o directamente como alternativa al trasplante de órganos¹⁶¹⁻¹⁶⁴. Mito y Kusano publicaron en 1992 el primer trabajo sobre trasplante de hepatocitos en humanos¹⁶⁵. En 1994, Habibullah publicó los resultados de sus investigaciones en 5 casos de pacientes afectados por una falla hepática aguda, en los que se usó trasplante intraperitoneal de células fetales humanas, concluyendo que dicho trasplante habría sido responsable de la mejoría observada en la supervivencia de los pacientes¹⁶⁶. Un año más tarde, Grossman publica un estudio de terapia génica ex-vivo tratando pacientes afectados de hipercolesterolemia familiar, a través del autotrasplante de células hepáticas previamente manipuladas genéticamente. Si bien logró una modesta reducción de los niveles de colesterol, demostró la factibilidad del autotrasplante¹⁶⁷. Además de estos trabajos pioneros, tal vez la publicación más importante llegó recién en 1998 cuando Ira Fox comunica el tratamiento de una niña de 10 años portadora del síndrome de Crigler-Najjar Tipo I¹⁶⁸, a quien se infundieron $7,5 \cdot 10^6$ células, por vía portal, a través de la colocación de un catéter trans-parieto-hepático. El seguimiento clínico de la paciente demostró que presentaba una marcada reducción de las concentraciones séricas de bilirrubina y, en consecuencia, una disminución de los requerimientos de horas de fototerapia diaria. Con un poco más de 80 casos clínicos realizados en 13 centros^{169,170}, el trasplante de hepatocitos en humanos ha demostrado ser un procedimiento seguro y efectivo en el corto término tanto para enfermedades metabólicas del hígado como para falla hepática aguda¹⁶⁸⁻¹⁷². La seguridad de los hepatocitos humanos trasplantados está documentada por la supervivencia de los pacientes libres de morbilidad maligna e

infecciosa, no solo por meses, sino por años ¹⁷³. A pesar del avance en las técnicas de aislamiento trasplante y seguimiento de las células trasplantadas, el factor limitante más importante que enfrenta este procedimiento es la fuente de hepatocitos para realizar el trasplante. En general, los hepatocitos son aislados de hígados donados marginales, o sea que no son aptos para el trasplante de órganos. En particular estos son hígados grasos (esteatosis hepática) provenientes de donaciones posteriores a la muerte cardiaca, con largos tiempos de isquemia en frío o bien órganos marginales ¹⁷⁴. Al mismo tiempo, los cultivos primarios de hepatocitos son difíciles de mantener durante un largo período in vitro, debido a la pérdida de sus funciones específicas. Es por esto que actualmente la investigación científica en este campo apunta al desarrollo de nuevas fuentes de células para trasplantes, que no dependan exclusivamente de la donación de órganos. En este contexto, el estudio de las células troncales hepáticas se presenta como un campo de gran potencial para el desarrollo de terapias alternativas al trasplante de órganos, ya sea por la posibilidad de trasplantar células aisladas o bien ser usadas en técnicas de ingeniería de tejidos que permitan generar órganos trasplantables in vitro.

Hipótesis

Las células troncales representan un campo de la ciencia que ha generado enormes expectativas tanto a nivel científico como público, por la enorme potencialidad atribuida a ellas, así como también por todos los aspectos éticos, religiosos y legales asociados. Son fascinantes desde el punto de vista teórico, por la posibilidad de adentrarse en los complejos procesos involucrados en el desarrollo de un organismo, y también desde un punto de vista práctico, por las posibilidades de su uso en el campo de la medicina regenerativa, con el objetivo final de reemplazar órganos o tejidos dañados o enfermos^{50,175}.

Durante muchos años, se puso en duda primero la existencia de células troncales hepáticas^{107,108}, y luego su origen¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. En la actualidad, si bien esas dos primeras controversias han alcanzado un consenso^{179,180}, las discusiones giran en torno a la identificación certera de las células troncales hepáticas^{142,147,181,182}. Ante la imposibilidad de contar con herramientas para el aislamiento de células troncales hepáticas, los primeros estudios sobre estas células se basaron en aumentar su proporción en el hígado recurriendo a protocolos de daño hepático severo^{103,122,131-135}. Si bien estos trabajos permitieron demostrar la existencia y el origen hepático de las células troncales hepáticas, para profundizar en su caracterización, son necesarias poblaciones puras de células troncales hepáticas. El uso de moléculas “marcadoras” para identificar poblaciones celulares representa una gran ventaja debido a que permite no sólo la identificación sino también el aislamiento de estas poblaciones. El concepto de estado troncal²⁷ ha sido de gran ayuda para el desarrollo de un marco teórico para el análisis de las características dinámicas y funcionales de las células troncales. Sin embargo, con la finalidad de buscar aplicaciones terapéuticas de las células troncales es

necesario llenar de contenido este marco teórico. Es por esto que planteamos la siguiente hipótesis:

- El carácter troncal de las células troncales hepáticas está caracterizado por múltiples rasgos fenotípicos y estructurales.

Estudiando estos rasgos fenotípicos, será posible identificar “marcadores” de células troncales hepáticas que nos permitan aislarlas y caracterizarlas. Debido a que EpCAM es una molécula cuyas características estructurales y biológicas la convierten en más que una simple molécula de adhesión ^{153,183} ya que se ha encontrado EpCAM en una variedad de células indiferenciadas así como también en células troncales humanas ¹⁵⁰, especulamos que:

- EpCAM es un indicador del estado troncal de las células troncales hepáticas murinas.

Utilizando herramientas que nos permitan aislar células troncales podremos probar que los atributos funcionales de las células troncales están relacionados con características estructurales y biológicas particulares.

Objetivos

Objetivo general:

Aislar, identificar y caracterizar células troncales hepáticas y evaluar la potencialidad de la utilización de éstas como herramienta en el tratamiento de enfermedades degenerativas del hígado.

Los objetivos específicos del proyecto son:

1. Caracterizar cuantitativa y cualitativamente las poblaciones de células troncales hepáticas en rata y ratón.
2. Identificar marcadores del estado troncal que permitan definir la población de células troncales hepáticas.
3. Caracterizar el grado de organización del genoma de las células troncales hepáticas.
4. Evaluar la capacidad de anidación, proliferación y diferenciación de las células troncales hepáticas con posterioridad al implante en ratones sanos.

Materiales y Métodos

Animales de experimentación

Para el aislamiento de células hepáticas fetales de rata se utilizaron 18 ratas Wistar preñadas con fetos de entre 18 y 21 dpc.

Para estudiar la evolución de la fase hepática de la hemopoyesis, se utilizaron fetos de 20 ratones hembras C57BL/6 preñadas en distintos tiempos de gestación (entre 12,5 y 20,5 dpc) y neonatos de un día.

Para el aislamiento de células hepáticas fetales se utilizaron embriones de 14,5 dpc de 27 ratones hembra C57BL/6.

Para estudiar el comportamiento in vivo de las células aisladas se utilizaron 24 ratones macho C57BL/6 adultos en los experimentos de trasplante celular.

Todos los animales utilizados para el proyecto de investigación se alojaron en un bioterio de temperatura controlada con un ciclo de luz oscuridad 12:12, inicio del ciclo de luz a las 07:30 hs, con condiciones de bioterio estándar y comida y agua ad libitum.

Los protocolos utilizados en este trabajo fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital Italiano de Buenos Aires. Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo a los estándares internacionales y las normas institucionales para el manejo de animales de laboratorio.

Aislamiento de células

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de xilacina y ketamina (ratón: 20mg/Kg/50mg/Kg; rata: 7mg/Kg/60mg/Kg) bajo campana. Luego de limpiar con alcohol 70° y desinfectar la zona con una solución de povidona-iodo al 10% (Laboratorio Phoenix, Argentina) se realizó una sección de la pared abdominal y se

extrajeron los fetos. Dentro del flujo laminar y bajo lupa, se abrió la pared abdominal de cada feto, se extrajo el hígado y se lo colocó en un tubo cónico (Greiner Bio-one, Bélgica) conteniendo 15-20 ml de HBSS (Hank's buffer saline solution) sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (Gibco, USA). Los hígados de todos los fetos de una misma rata o ratón (según el caso) se procesaron en forma conjunta. El tubo conteniendo los hígados fetales se dejó reposar durante 3 minutos para que estos decanten y se extrajo el medio de transporte. Los hígados fetales fueron digeridos agregando una solución de colagenasa I 0,05% (Gibco, USA) e incubándolos durante 1 hora con agitación, a 37°C. Finalmente, los acúmulos celulares restantes se disgregaron mecánicamente con la repetida succión y liberación utilizando una jeringa con una aguja de 25 G de diámetro, de esta forma se obtuvo una suspensión homogénea de células totales hepáticas.

Lisis de glóbulos rojos

La suspensión de células obtenida de hígados fetales de ratas se trató con una dilución 1/10 de una solución de ácido acético 4% y posterior centrifugación a 1500 rpm durante 10 min.

Se descartó el sobrenadante y la suspensión de células obtenida de hígados fetales de ratones fue tratada con una solución tamponada de cloruro de amonio (0,15M) y posterior centrifugación a 1500 rpm durante 10 min.

El pellet obtenido conteniendo las células se resuspendió en buffer HBSS, obteniéndose una suspensión celular libre de glóbulos rojos.

Recuento de células & viabilidad celular

El número total de células y su viabilidad se cuantificaron mediante el método de exclusión con azul tripan (Sigma, USA) y posterior recuento en una cámara

hemocitométrica, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para más detalles:

<http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/articles/protocols/biology/volume12-cell-quantification/cell-quantification.pdf>

Separación de células

Gradiente de Percoll

La suspensión de células hepáticas fetales de rata se ajustó a una concentración de $1,2 \cdot 10^8$ células/ml. Se depositó 1 ml de esta suspensión sobre un gradiente discontinuo de Percoll (50 y 60%) (Amersham Biosciences AB, Suecia), y se centrifugaron a 2000 rpm durante 30 min. Las distintas fracciones obtenidas se recuperaron en tubos separados y se utilizaron para su cuantificación, caracterización inmunofenotípica y/o cultivo in vitro.

Separación de células mediante el sistema MACS (Magnetic Assisted Cell Separation)

Para el aislamiento propiamente dicho se siguió el protocolo recomendado por los fabricantes del sistema MACS (Miltenyi Biotec, Alemania). Brevemente, $1,0 \cdot 10^7$ células totales de la suspensión celular libre de glóbulos rojos obtenida de los hígados fetales de ratón se incubaron con el anticuerpo primario EpCAM (Clon G8.8, Santa Cruz Biotechnologies, USA) a 4°C durante 20 min. Posteriormente se lavó con una solución de tampón fosfato salino (PBS) y se incubó con la suspensión de perlas magnéticas recubiertas con el anticuerpo secundario anti cadenas kappa de rata (Miltenyi Biotec, Alemania) durante 15 min a 4°C, seguido de un lavado con PBS y transferencia inmediata de la suspensión celular a la columna de separación, la cual se encuentra en el soporte magnético proporcionado con el kit. Se dejó percolar la solución, recogiendo la fracción EpCAM (-). Finalmente, se retiró la columna del

soporte magnético, se agregó PBS y mediante el accionamiento del émbolo proporcionado junto con la columna, se recogió la fracción EpCAM (+) retenida en la misma. Las dos fracciones obtenidas se resuspendieron en medio HBSS y se cuantificó el número de células obtenidas. En la Figura M.1 se detalla el sistema MACS utilizado.

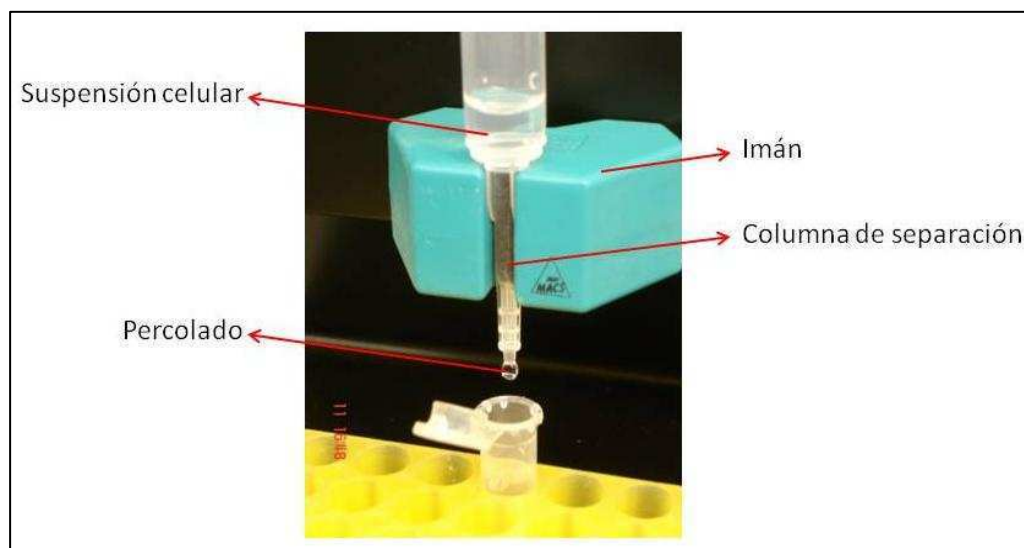


Figura M.1. Sistema MACS.

Cultivo de células

Pre-tratamiento de las superficies de cultivo celular

Las superficies de cultivo, ya sea placas de cultivo o cubreobjetos de 15x15 mm (desengrasados en etanol 70%), se cubrieron con una solución de Colágeno tipo IV (0,5 mg/ml en PBS/0,25% de ácido acético) (Sigma, USA) y Carbodiimida (N-Cyclohexil-N'-(β-[N-metilmorfolino]etil)carbodiimidap-toluenesulfonato, 0,14μg/ml) (Sigma, USA) y se incubó durante 3 horas a 25°C, luego se lavó 3 veces con agua destilada y se dejó secar la superficie a temperatura ambiente durante 1 hora y bajo luz UV, para esterilizar la superficie. El material se conservó hasta un máximo de 6 meses en condiciones de esterilidad, protegido de la luz y refrigerado a 4°C.

Cultivo de células fetales de hígado de rata

La suspensión de células totales recién aisladas y la fracción inferior del pellet del gradiente de Percoll se sembraron a razón de $1,5 \cdot 10^5$ células/cm² en placas de cultivo de 35mm fueron cultivadas en medio E de Williams (Gibco, USA) suplementado con:

- 25mM buffer de ácido hidroxietil-piperazina-etanosulfónico (HEPES) (Gibco, USA),
- 20% suero fetal bovino (Gibco, USA),
- 1% antibiótico-antimicótico (100U/ml penicilina / 100 µg/ml estreptomicina / 0,25µg/ml anfotericina B) (Gibco, USA),
- 50mg/ml L-glutamina (Gibco, USA),
- 1mM piruvato de sodio (Gibco, USA),
- 5µg/ml insulina (Gibco, USA),
- 0,4µg/ml hidrocortisona (Sigma, USA),
- 5µg/ml transferrina (Gibco, USA),
- 5mg/ml selenito de sodio (Gibco, USA) y
- 5ng/ml EGF (Gibco, USA).

Los cultivos de células de la fracción inferior del gradiente de Percoll fueron suplementados con 2,5ng/ml de HGF (Abcam, USA). Eventualmente, las colonias celulares fueron subcultivadas individualmente utilizando cilindros de clonado (Sigma, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Células troncales de hígado de ratón

Las poblaciones obtenidas luego de la separación con perlas magnéticas fueron cultivadas sobre cubreobjetos tratados con colágeno en medio RPMI (Gibco, USA) suplementado con:

- 20 ng/ml EGF (Gibco, USA),
- 5 ug/ml insulina (Gibco, USA),
- 10 ug/ml, transferrina (Gibco, USA)
- 5 mg/ml selenito de sodio (Gibco, USA),
- 10^{-7} M dexametasona (Laboratorio FADA, Argentina),
- $4,4 \cdot 10^{-3}$ M nicotidamida (Sigma, USA),
- $5 \cdot 10^{-5}$ M β -Me (Sigma, USA),
- 50 mg/ml L-glutamina (Gibco, USA),
- 1% antibiótico-antimicótico (100U/ml penicilina / 100 μ g/ml estreptomicina / 0,25 μ g/ml anfotericina B) (Gibco, USA), y
- 0,20% suero fetal bovino (Gibco, USA).

Cultivo en medio semi-sólido

Para estudiar la evolución de la hemopoyesis en el hígado fetal, se aislaron células totales de hígados de fetos de ratón de tiempos de gestación comprendidos entre 12,5 dpc y 19,5 dpc, y células de hígado de ratones de 1 día de vida. La suspensión se sembró, a razón de 50.000 células/cm², en placas de cultivo de 35mm en medio de cultivo semi-sólido IMDM (Gibco, USA), suplementado con:

- 30% Suero Fetal Bovino (Gibco, USA),
- 5 ng/ml PIXY (proteína de fusión de GM-CSF, IL-3, gentilmente donado por el Dr. Messner, Toronto, Canadá),
- 1 U/ml de eritropoyetina (Sidus, Argentina) y
- 0,3% de Bacto agar (Difco Laboratories, USA).

A los 10 días de cultivo, se observaron las células bajo un microscopio invertido y se clasificaron y cuantificaron los agregados celulares con más de 40 células (colonias).

Para cada tiempo gestacional se cuantificó el número de colonias Eritroides, Granulocíticas-Macrofágicas y Megacariocíticas.

En todos los casos, las placas se incubaron a 37°C, en atmósfera saturada de humedad y 5% de CO₂ y el medio de cultivo se cambió cada 48hs, excepto para los cultivos en medio semi-sólido.

Inmunofluorescencia indirecta

Las células se cultivaron directamente sobre cubreobjetos de 22 mm² y las preparaciones celulares se procesaron de acuerdo al protocolo descrito por Vellón et al.¹⁸⁴. Brevemente, las células se lavaron en PBS y se fijaron con para-formaldehído (PFA) 4% en PBS. Posteriormente se permeabilizaron mediante una incubación en 0,1% Tritón X-100 en PBS durante 10 minutos y se incubaron con la solución del anticuerpo primario durante 1 hora en cámara húmeda a 37°C. Transcurrido este período las preparaciones se lavaron con PBS, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente y se revelaron colorimétricamente con DAB (Dako, USA) o mediante la incubación con anticuerpos conjugados con FITC o Texas Red disueltos en PBS durante 60 minutos en cámara húmeda a 37°C. Finalmente se lavaron en PBS durante 5 minutos y se montaron con Vectashield (Vector Laboratories Inc., USA). La observación de las preparaciones y la obtención de imágenes se realizaron con un microscopio Nikon eclipse E400 (Nikon, Japón) equipado con los filtros de fluorescencia correspondientes y el programa informático Image J¹⁸⁵ para el análisis y edición de imágenes. En todos los casos se realizaron 3 tipos de controles en paralelo: control de técnica realizando el mismo protocolo pero reemplazando el anticuerpo primario por PBS, así como también controles positivos y negativos con células o tejidos dependiendo de cada anticuerpo. Para identificar los núcleos celulares se utilizó

hematoxilina, colorante de Hoechst (Sigma, USA) disuelto en PBS o DAPI (Sigma, USA).

Se utilizaron los siguientes anticuerpos:

- 1- Pool de anticuerpos anti-células progenitoras hemopoyéticas (Hem), compuesto por anticuerpos contra CD5, CD45R, CD11b, Myeloid Differentiation Antigen Gr-1, TER 119 y TER 7/4) (Stem Cell Technologies Inc., Canadá, dilución 1/50).
- 2- Marcador citoplasmático específico para hepatocitos maduros (Hep) (Clon OCH1E5, Dako, USA, dilución 1/25).
- 3- Anticuerpos OC2 y OC3 (donación del Dr. Ronald Faris, Rhode Island, USA, dilución 1/100).
- 4- EpCAM (Clon G8.8, Santa Cruz Biotechnology, USA, dilución 1/100).
- 5- Thy-1 (Clon H-110, Santa Cruz Biotechnology, USA, dilución 1/10).
- 6- E-cadherina (Clon H-108, Santa Cruz Biotechnology, USA, dilución 1/100).
- 7- CK19 (Clon N-13, Santa Cruz Biotechnology, USA, dilución 1/50).
- 8- Histona H3 acetilada en lisinas 14 y 23 (Santa Cruz Biotechnology, USA, dilución 1/100).
- 9- Histona H3 metilada en lisina 9 (Santa Cruz Biotechnology, USA, dilución 1/100).

La cuantificación de las células se realizó contando células (positivas y negativas) en el microscopio, tomando campos al azar hasta totalizar 100 células.

Citometría de flujo

Para estudiar cómo la composición de la población en estudio, se caracterizó el perfil de expresión de proteínas mediante citometría de flujo. Para ello, $1 \cdot 10^6$ células de la

suspensión de células hepáticas totales de ratón fueron incubadas con el anticuerpo primario contra EpCAM CD326 (clon G8.8, BD Biosciences, Alemania) (dilución 1/100) durante 30 minutos a 4°C. Las reacciones inespecíficas del anticuerpo se eliminaron mediante lavado con PBS y luego se incubó con el anticuerpo secundario anti cadena kappa de rata-biotinilado (BD Biosciences, Alemania, dilución 1/100) durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente se lavó con PBS y se incubó con streptavidina APC (BD Biosciences, Alemania, dilución 1/100), CD-45-PerCP (BD Biosciences, Alemania, dilución 1/100) y E-Cadherina-FITC (BD Biosciences, Alemania, dilución 1/100) durante 15 minutos a 4°C. Se lavó con PBS y se trató con FACS-lysing solution (BD Biosciences, Alemania) para lisar los glóbulos rojos y fijar las células. Se guardó a 4°C en oscuridad hasta el momento de la adquisición en el citómetro de flujo. En la Tabla M.1 detallamos los controles de técnica utilizados.

Tubo	Detalle	Células	CD325 (EpCAM)	Ac-Biotinilado	SAV-APC	E-Cadherina-FITC	CD45-PerCP
A	Triple LSPC	LSPC	✓	✓	✓	✓	✓
B	Control negativo PerCP	LSPC	✓	✓	✓	✓	✗
C	Control negativo FITC	LSPC	✓	✓	✓	✗	✓
D	Control negativo APC	LSPC	✓	✓	✗	✓	✓
E	Control negativo EpCAM	LSPC	✗	✓	✓	✓	✓
F	Blanco	LSPC	✗	✗	✗	✗	✗
G	Control positivo E-Cadherina	MLP29	✗	✗	✗	✓	✗
H	Control positivo EpCAM	MLP29	✓	✓	✓	✗	✗
I	Control positivo CD45	Linfocitos de ratón	✗	✗	✗	✗	✓
J	Triple MLP29	MLP29	✓	✓	✓	✓	✓
K	Blanco MLP29	MLP29	✗	✗	✗	✗	✗
L	Blanco Linfocitos	Linfocitos de ratón	✗	✗	✗	✗	✗

Tabla M.1: Muestras y controles utilizados para estudiar las poblaciones celulares mediante citometría de flujo.

Los tubos con blanco se utilizaron para eliminar el componente de auto-fluorescencia de las distintas muestras (tubos F, K, L). Los tubos con un solo fluoróforo (tubos G, H, I) se utilizaron para definir el umbral a partir del cual consideramos una marca positiva. Los tubos que contenían 2 de los 3 fluoróforos (tubos B, C, D) se utilizaron para eliminar el componente de señal inespecífica de fluorescencia que era detectado por dado canal. Por ejemplo, el tubo D que contenía las células marcadas con FITC y PerCP nos

permitió cuantificar cuanto de la lectura del canal de APC era debida a la fluorescencia de FITC y PerCP detectada inespecíficamente en este canal.

Se utilizó un citómetro FACS Aria (BD Biosciences, Alemania) para la adquisición de datos; el análisis de los mismos se realizó con el programa Cyflogic (CyFloLtd, Finlandia).

Cabe recalcar que el clon utilizado para la citometría de flujo del anticuerpo anti EpCAM es el mismo que se utilizó para realizar la inmunofluorescencia indirecta y el aislamiento con MACS.

Estudios sobre la organización del núcleo

Fijación de las células

Con el objeto de preservar la estructura tridimensional (3D) de los núcleos, las preparaciones celulares se lavaron brevemente (40-60 segundos) con PBS y se fijaron con una solución de PFA 4% en PBS pH 7,0 (sin $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$) durante 10 minutos. Posteriormente se lavaron 3 veces, durante 5 min cada vez, con PBS/Tritón X-100 0,05%, se permeabilizaron con Tritón X-100 0,5% en PBS durante 20 minutos y se incubaron las células en Glicerol 20% en PBS toda la noche a 4°C. Se realizó después una segunda permeabilización mediante 4 rondas de congelación y descongelación de las preparaciones celulares en nitrógeno líquido (unos 30 segundos de congelación cada vez). Después de este procedimiento se lavaron 3 veces con PBS/Tritón X-100 0,05%, HCl 0,1 N, 2 veces con solución NaCl 300 mM y citrato de sodio 30 mM (2xSSC) y finalmente se incubó en formamida 50%/2xSSC durante 30 min.

Hibridación in situ fluorescente

FISH (Fluorescent in situ hybridization) es una tecnología que utiliza sondas de ADN marcadas con nucleótidos modificados con digoxigenina o biotina que a su vez se

pueden detectar mediante anticuerpos o haptenos marcados con fluorescencia. Este procedimiento conlleva la desnaturalización del ADN de la muestra (cromosomas metafásicos o en interfase) y del ADN de la sonda marcada, lo que induce la separación de las hebras complementarias de la doble hélice.

La incubación de la muestra con la sonda de interés conduce a la formación de un híbrido de doble hélice en el sitio diana que estará marcado con fluorescencia y que se puede detectar por medio de microscopía de fluorescencia. El ensayo FISH puede usarse sobre células en metafase para detectar deleciones, para identificar material extra de origen desconocido o para detectar reordenamientos estructurales como los que se observan en ciertos cánceres. También se aplica a células en interfase, como por ejemplo en la detección de aneuploidías en células del fluido amniótico o en los estudios de organización espacial del genoma en el núcleo interfásico (Figura M.2).

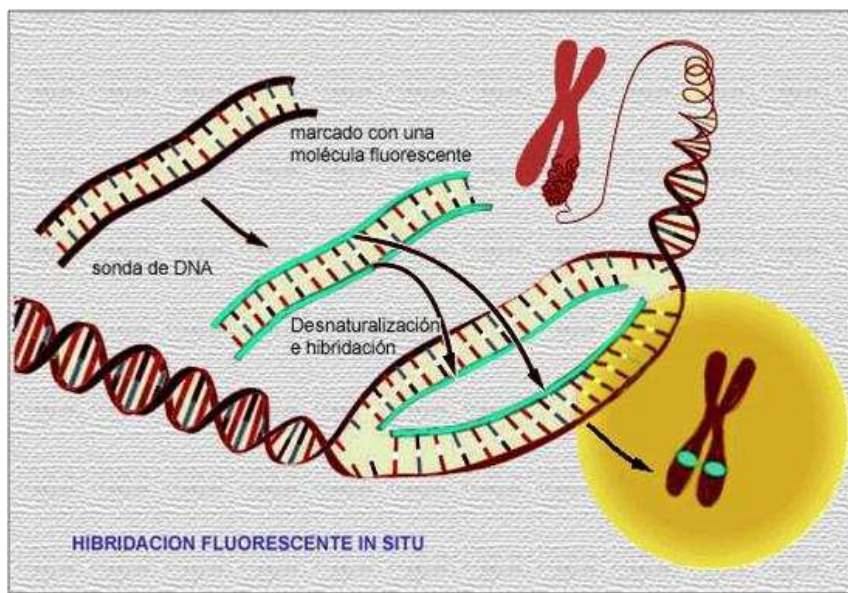


Figura M.2. Esquema del fundamento de la técnica FISH específico de locus.

ADN-FISH para satélite mayor y menor

Las sondas para hibridar específicamente ADN satélite mayor y menor, presente en la región pericentromérica de todos los cromosomas de ratón, fueron preparadas con los clones pCR4-Min5-1 y pCR4-Maj9-1, respectivamente. Las bacterias, con los plásmidos que contenían los correspondientes insertos se cultivaron de acuerdo a métodos convencionales en medio LB con 12 µg/ml de ampicilina, durante 16 horas, a 37°C y con agitación continua (220 rpm). La extracción del ADN del plásmido se realizó de acuerdo a protocolos rutinarios (mi-Plasmid Miniprep Kit; Metabion international AG, Alemania). Se centrifugaron 5 ml del cultivo bacteriano a 12.000g a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en 250 µl de tampón Tris-ClH pH 7,0. Las bacterias se rompieron con 250 µl de una solución de lisis compuesta por NaOH/SDS y se centrifugaron 10 min a 12.000g a temperatura ambiente. Finalmente el ADN del plásmido se purificó por filtración en columna y se recuperó con 50 µl de agua destilada.

El marcaje del ADN del plásmido se realizó de manera individual para cada clon mediante Nick Translation, un procedimiento enzimático que infringe muescas en la molécula de ADN que simultáneamente son rellenadas con nucleótido modificados. Se marcaron 1-2 µg de ADN en una mezcla de reacción que contenía: tampón TRIS-ClH 0,5M pH 8, MgCl₂ 0,050M, albúmina bovina 0,5 mg/ml, β-mercaptoetanol 0,1 M, d-ATP 0,05 mM, d-CTP 0,05 mM, d-GTP 0,05 mM, d-TTP 0,005 mM, d-TTP modificado con biotina o digoxigenina 0,025 mM, DNAsa 0,0001 mg/ml y 10U de ADN polimerasa I en un volumen final de 100 µl. La reacción se efectuó en un termociclador a 15°C durante 2 horas y se detuvo agregando 1 µl de EDTA 0,5M y posteriormente incubando 10 minutos a 65°C. Los productos de la reacción

normalmente tuvieron entre 200-500 pb, lo que se comprobó electroforéticamente en geles de agarosa 1%. Los productos (sonda marcada) se almacenaron a -20°C.

El protocolo de hibridación se dividió en cuatro pasos:

1. Preparación de la sonda de hibridación: se mezcló en un tubo de microcentrífuga 50-100 ng ADN satélite mayor marcado con Digoxigenina e igual cantidad de ADN satélite menor marcado con Biotina, 4 µg de ARNt y 40 µg de ADN de esperma de salmón (Sigma, USA). Se añadió 0,1 parte/volumen de acetato de sodio 3M pH 5,2 y 3 partes/volumen de etanol 100%, se incubó a -80°C 1 hora y se centrifugó 12000g durante 30 min a 4°C. El precipitado se resuspendió en una mezcla compuesta por 6 µl de formamida 50% y 6 µl de sulfato de dextrano 10% en 2xSSC.
2. Preparación de las células: Con el objeto de facilitar la penetración de las sondas, las preparaciones celulares recibieron un pre-tratamiento para eliminar restos de citoplasma que consistió en incubar con una solución de pepsina 0,001%-0,005% (P/V) en HCl 0,01 M a 37°C durante 2-10 minutos, controlando periódicamente el procedimiento bajo el microscopio de contraste de fase. Luego de esta digestión enzimática de membranas, las preparaciones se lavaron sucesivamente con PBS (sin CaCl₂/MgCl₂), PBS (con MgCl₂) a temperatura ambiente durante 5 min cada vez. Posteriormente se fijaron con formaldehído 1% en PBS durante 10 min, se lavaron nuevamente con PBS (con MgCl₂).
3. Hibridación: El ADN diana (células) se desnaturalizó por calentamiento a 72°C durante 3 minutos en una solución de formamida 70%/2xSSC de pH 7,0. Por otro lado, la sonda se desnaturalizó por calentamiento a 85°C durante 10 minutos y se depositó sobre un portaobjetos limpio y sobre ésta se colocó el cubreobjetos con las células haciendo contacto con la sonda. Se sellaron los bordes y se

incubó a 37°C en una cámara de hibridación húmeda herméticamente cerrada y protegida de la luz durante 24 horas.

4. Revelado: Para la detección de las sondas hibridadas, la preparación se lavó sucesivamente en formamida 50%/2xSSC, 1xSSC y 4xSSC/Tween-20 0,1% a 47°C por espacio de 5 minutos cada vez. Después de los lavados, se incubó la preparación con la solución de bloqueo compuesta por 4xSSC/Tween-20 0,1%/Albumina bovina 3% a 37°C durante 30 min y posteriormente con una solución del anticuerpo anti-Digoxigenina conjugado con FITC y de Avidina conjugada con Texas-Red a una dilución 1:200 en 4xSSC/Tween-20 0,1%/Albúmina 4% (4A) durante 1 hora a 37°C protegido de la luz. Finalmente las preparaciones se lavaron en 4xSSC/Tween-20 0,1% durante 5 minutos, se contracoloraron los núcleos con DAPI (1 μ g/ml en PBS) y se montaron con Vectashield (Vector Laboratories Inc., USA).

Hibridación in situ fluorescente de ARN (ARN-FISH)

Para hibridar los transcritos primarios de los genes AFP y Dlk-1 en sus respectivos sitios de transcripción se utilizaron sondas preparadas con clones que contenían la secuencia específica para esos ARNm marcados mediante Nick Translation.

El protocolo de hibridación se dividió en tres pasos:

1. Preparación de la sonda de hibridación: se mezcló en un tubo de microcentrífuga 50-100 μ g de ADN marcado con Digoxigenina o con Biotina ¹⁸⁶, 4 μ g de ARNt y 40 μ g de ADN de esperma de salmón. Se añadió 0,1parte/volumen de acetato de sodio 3M pH 5,2 y 3 partes/volumen de etanol 100%, se incubó a -80°C 1 hora y se centrifugó 12000g durante 30 min a 4°C. El precipitado se resuspendió

en una mezcla compuesta por 6 μ l de formamida 50% y 6 μ l de sulfato de dextrano 10% en 2xSSC. Para la hibridación de un cubreobjetos de 22 mm², se utilizaron 10 μ l de sonda, la que se desnaturalizó mediante calentamiento a 80°C durante 7 min y posteriormente se incubó a 37°C durante 1 hora para favorecer el bloqueo de las secuencias repetitivas.

2. Hibridación: Se realizó sobre muestras sin desnaturalizar para permitir que la sonda reaccione sólo con ARN (monocatenario). Para ello, ésta se depositó sobre un portaobjetos limpio y sobre ella se colocó el cubreobjetos con las células haciendo contacto con la sonda. Se sellaron los bordes y se incubó a 37°C en una cámara de hibridación húmeda herméticamente cerrada y protegida de la luz durante 24 horas.
3. Revelado: para la detección de la sonda hibridada al ARN se realizó mediante un protocolo similar al descrito anteriormente para el ADN-FISH.

Adquisición y análisis de imágenes

Para el estudio de la organización del genoma en el núcleo interfásico de células hepáticas de ratón se obtuvieron imágenes de ADN-FISH satélite mayor y satélite menor se observaron bajo un microscopio confocal Leica DMIRE-2 (Leica Microsystems, Alemania). Para la adquisición de imágenes 3D se utilizó el software provisto con el microscopio y el análisis de las imágenes se realizó con la versión portable del mismo, Leica Confocal Software Lite¹⁸⁷. Los parámetros de adquisición se establecieron previamente y se mantuvieron idénticos para todas las muestras analizadas.

Las hibridaciones de ARN-FISH se observaron bajo un microscopio Nikon eclipse E400 de fluorescencia, equipado simultáneamente con una cámara Standard CCD. La

adquisición para todas las muestras analizadas se realizó en imágenes de formato jpg, de 1376x1038 píxeles de tamaño, en tres canales (rojo, verde y azul; RGB) de 8 bits por canal y se analizaron utilizando Image J ¹⁸⁵. Por cada muestra, se analizaron 60 núcleos en interfase (aproximadamente 20 por preparado).

RT-PCR semi-cuantitativa

La PCR en tiempo real (Real Time-PCR, en inglés) es una variación de la PCR con transcriptasa reversa (RT-PCR) estándar, utilizada para la semi-cuantificación (cuantificación relativa) de ARN mensajero (ARNm) de una muestra. Utilizando primers específicos de secuencia, es posible determinar la cantidad relativa de una determinada secuencia de ARN.

Extracción de ARN

Para la extracción de ARN total de las distintas subpoblaciones celulares se utilizó el reactivo Trizol (Invitrogen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se lavaron con PBS y se realizó la extracción inmediatamente por disgregación mecánica pasándolo dichas células por jeringas con agujas de grosor decreciente en 1 ml de Trizol. Se centrifugó a 12.000g por 10 minutos a 4°C y sobre el sobrenadante (en un tubo limpio) se agregó 0,2 ml de cloroformo. Se agitó con vortex y se incubó 15 minutos en hielo posteriormente se centrifugó 15 minutos a 12.000g a 4 °C y la fase acuosa superior se transfirió a otro tubo. La precipitación del ARN se realizó con 0.5 ml de isopropanol durante 45 minutos a -20°C, mientras que su aislamiento se realizó por centrifugación a 12.000g durante 15 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol 70% 3 veces para eliminar posibles restos de sales. El ARN fue resuspendido en agua estéril y conservado a -70°C. Una alícuota del

mismo fue utilizada para controlar su estado de integridad mediante electroforesis en gel de agarosa 1% y para su cuantificación mediante espectrometría.

Para eliminar posible contaminación con ADN genómico se realizó el tratamiento con ADNasa: 5 ug de ARN total fueron incubados con 5 µl de ADNasa RQ1 libre de ARNsas (Promega, USA) y 1µl de inhibidor de ARNasa (RiboLock, Fermentas, Argentina) durante 30 minutos a 37°C. Para controlar que el tratamiento fue efectivo las muestras de ARN fueron utilizadas como posible molde para PCR (las cuales resultaron negativas).

Retrotranscripción

Una alícuota de de ARN extraído de la suspensión celular fue utilizado para la síntesis de ADNc. Brevemente, 1 ug del ARN, 0,5 µl oligo dT₁₅ (Biodynamics, Argentina), 1 µl de la enzima transcriptasa reversa ImProm-II (Promega, USA), 4 µl del buffer provisto con la enzima (Promega, USA), 1 µl de inhibidor de ARNsas (RiboLock, Fermentas, Argentina) y 1 µl de dNTPs (desoxi-ribonucleotidos-trifosfatados, Biodynamics, Argentina) fueron incubados en un termociclador programado de la siguiente manera: 25°C durante 5 minutos seguido de una incubación a 42°C durante 30 minutos y finalmente a 85°C durante 5 minutos. Se controló que la transcripción reversa haya resultado efectiva mediante la realización de una PCR utilizando dicho ADNc como molde y primers para el gen GAPDH (gliceral-dehído-3-fosfatodeshidrogenasa), cuya expresión es abundante y constitutiva. Las muestras, listas para ser utilizadas para PCR en tiempo real, se almacenaron en un freezer a -70°C.

PCR en tiempo real

Las PCR en tiempo real se llevó a cabo en un termociclador LightCycler 2.0 (Roche Applied Sciences, Alemania) utilizando la enzima TaqPlatinum (Invitrogen, USA) y SYBR Green (Invitrogen, USA), un fluorocromo que emite fluorescencia cuando se une sin especificidad de secuencia con el ADN doble cadena. Esta técnica se basa en la detección de la cantidad de fluorescencia producida en cada ciclo de PCR (en tiempo real) y lo representa gráficamente respecto al número de ciclos. El software del LightCycler 2.0 calcula el punto de inflexión de la curva fluorescencia vs número de ciclos identificando el punto de cruce (Cp). El Cp corresponde al punto (en número de ciclos) en el que la aceleración de la señal de fluorescencia está en su máximo, por lo tanto, este punto de cruce debe estar siempre situado en el centro de la porción de log-lineal de la amplificación de PCR. La cantidad de fragmentos de amplificación producidos en cada ciclo es proporcional al número de moléculas de ARN inicial, de forma que en aquellas muestras con mayor expresión del gen de estudio la amplificación fluorescente aparecerá en ciclos anteriores (menor Cp). La medida de la expresión génica por medio de RT-PCR es una cuantificación relativa, en la que se compara entre las diferentes muestras la expresión del gen objeto de estudio respecto a la expresión de un gen constitutivo que no varía en las condiciones del experimento (control endógeno) En nuestro caso utilizamos la secuencia del ARNm del gen que codifica a la proteína GAPDH.

La reacción se realizó a partir de 5 µl de ADNc, 0,5 mM de los primers correspondientes, 1 µl de dNTPs (Biodynamics, Argentina), 0.5 µl de SYBR Green (Invitrogen, USA), 2 µl buffer provisto con la enzima (Invitrogen, USA) y agua hasta un volumen final de 20µl. Los primers (cebadores) fueron diseñados mediante el software Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) y sus condiciones termodinámicas

controladas con el programa de NtiVector 10.3.1 (Invitrogen, USA). Las secuencias de los primers y las temperaturas de unión al ADNc (annealing) de los mismos se describen en la tabla M.2.

Proteína de estudio	Secuencia de los primers (5'-à 3')	Tamaño del amplicón	Temperatura de unión
GAPDH	For: CTGGAGAAACCTGCCAAGTA Rev: GTCCTCAGTGTAGCCCAAGA	92	58°C
AFP	For: ATCGACCTCACCAGGAAGAT Rev: GAGTTCACAGGGCTTGCTTCA	142	57°C
CD133	For: CTCCTGGTGATTTGTCTGCT Rev: TTGCTTTGGTGTTTCAGTCA	150	55°C
CK19	For: GTCAGTGTGGAGGTGGATTC Rev: AAGGTAGGTGGCTTCAGCAT	120	58°C
CLDN3	For: CAACTGCGTACAAGACGAGA Rev: GCACCAACGGGTTATAGAAA	142	55°C
DLK1	For: CACATCCTGAAGGTGTCCAT Rev: AGGTTTCGCACTTGTTGAGA	150	58°C
EpCAM	For: TTGTGGTGGTGTCATTAGCA Rev: TCTGTGGATCTCACCCATCT	115	56°C

Tabla M.2: Secuencia de los primers diseñados para detectar el ARNm del gen que codifica a las proteínas de estudio, tamaño del amplicón y las temperaturas de unión de los mismos.

La reacción se llevó a cabo, como ya se mencionó, en un termociclador LightCycler 2.0 (Roche Applied Sciences, Alemania), bajo las siguientes condiciones: un primer paso de desnaturalización inicial a 94°C durante 10 minutos, continuado por 40 ciclos en el que cada uno incluyó desnaturalización a 94°C durante 10 segundos, unión de primers a la temperatura específica (ver Tabla M.2) durante 10 segundos y extensión a 72°C durante 10 segundos. La medición de la fluorescencia se realizó a temperatura variable según la temperatura de desnaturalización de cada producto, obtenida durante la puesta a punto de los primers. Dado que SYBR Green se une inespecíficamente al ADN doble cadena, en caso de observarse dímeros de primers, la medición de la fluorescencia (dentro de

cada ciclo) se realizó a una temperatura mayor que la de desnaturalización de los dímeros pero menor a la temperatura de desnaturalización del producto, para asegurarse que la fluorescencia sea exclusivamente debida a la unión del SYBR Green al producto de PCR. Finalizados los 40 ciclos se realizó una curva de desnaturalización final mediante un gradiente de temperatura desde 60°C hasta 90°C para detectar la temperatura de desnaturalización de los productos obtenidos. Esto permitió hacer una estimación rápida de la especificidad del producto de PCR, dado que la temperatura de desnaturalización de cada producto de PCR es una propiedad intrínseca del mismo que está relacionado con su extensión y su secuencia de bases.

En cada determinación, las PCRs en tiempo real se realizaron por duplicado para cada gen a estudiar y se verificó la presencia de un único producto y del peso molecular esperado en gel de agarosa 2%. Se utilizaron patrones de tamaño creciente de 50 pb y 100 pb (Byodinamics, Argentina).

Análisis de los datos

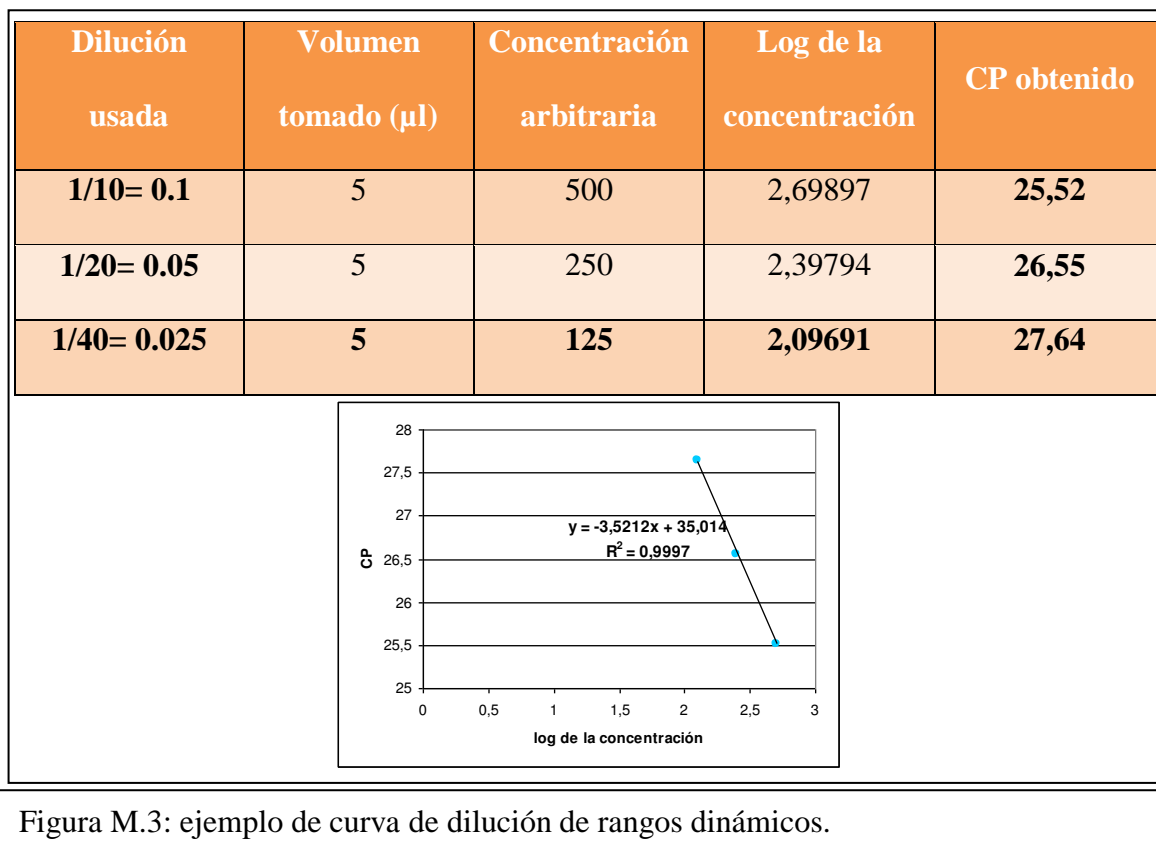
Para cada par de primers se estudió el rango dinámico de diluciones y la eficiencia de la reacción¹⁸⁸. Cada experimento fue realizado con una curva interna de calibración en la que se introdujeron los valores de C_p obtenidos para cada muestra y se obtuvo un valor de expresión arbitrario.

Se realizaron tres experimentos independientes para cada gen en cada una de las subpoblaciones estudiadas. En la determinación de cada muestra se procesó por duplicado y se tomó el valor de C_p correspondiente al promedio de los duplicados.

Primeramente se realizó una curva de rango dinámico para definir el rango en el cual la relación entre el logaritmo de la concentración de molde y el valor de C_p se mantenga lineal, esto indica que la eficiencia de la reacción de PCR se encuentra alrededor del

100% ¹⁸⁸. Para esto, durante la puesta a punto de los primers, se realizaron diluciones del ADNc y se graficó el CP obtenido para cada dilución en función del logaritmo de la concentración de ADNc. Arbitariamente se le asignó el valor de 1.000 a la cantidad de ADNc molde presente en 1 ul del stock de ADNc sin diluir. Por lo tanto, por ejemplo 5 ul de la dilución 1/10 correspondería a 500, y así sucesivamente (Figura M.3). A partir del grafico Cp vs Log [concentración] se calculó, por el método de cuadrados mínimos, la ecuación de la recta que describe esta relación. Además estudiando la bondad de ajuste de esta curva y la pendiente la misma se pudo corroborar que la relación se mantenía lineal dentro del rango de concentraciones ensayadas y que la eficiencia de la reacción era la adecuada para llevar a cabo la semi-cuantificación de los ARNm de interés. Para estos análisis de datos se utilizaron los programas informáticos GraphPad Instat ³⁶ e Infostat ¹⁸⁹.

Para las determinaciones se decidió trabajar con una dilución 1/20 del ADNc, se realizó



en cada experimento una curva interna de calibración utilizando, por ejemplo diluciones de 1/10, 1/20 y 1/40. Se graficó el C_p obtenido para cada dilución en función del logaritmo de la concentración de ADNc. A partir de este gráfico se calculó la ecuación de la recta, la que se utilizó para intrapolar el valor de C_p (promedio de los duplicados) y, de esta forma obtener un valor arbitrario de concentración de ADN molde de dicho gen. Se repitió el mismo procedimiento para todos los genes estudiados incluyendo el control interno GAPDH.

Los valores arbitrarios de concentración de cada gen fueron expresados en valores normalizados al valor arbitrario de concentración obtenido para GAPDH y se confrontaron entre sí mediante el test de ANOVA de un factor y los contrastes post-hoc de Tukey o t-de Student, según correspondía ¹⁸⁹.

Trasplante de células troncales

Preparación de la suspensión celular

Para estudiar la capacidad de anidación y proliferación de las células troncales, las células EpCAM (+) se marcaron con carboxifluoresceina-diacetato-succinimidil-ester (CFSE, Invitrogen, USA) que es un trazador que permite identificar las células in vivo. Esta molécula incolora difunde pasivamente al interior de las células, donde los grupos acetato son clivados por esterasas intracelulares para formar la molécula fluorescente, que se mantiene atrapada en el citoplasma celular. Se tomó una alícuota de $1.6 \cdot 10^6$ células suspendidas en 1ml de PBS pH 7,0, se mezcló con 1ml de una solución 20 μ M de CFSE en PBS y se incubó durante 40 minutos en un baño termostatzado a 37°C, protegido de la luz. Posteriormente las células se lavaron mediante centrifugación (3 veces) en 12 ml de medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de SFB y 1% antibiótico-antimicótico (100 U/ml penicilina/ 100 μ g/ml estreptomicina/ 0,25 μ g/ml

anfotericina B). Finalmente, se prepararon alícuotas de $2 \cdot 10^5$ células en un volumen aproximado de 150 μ l de RPMI y se conservaron en hielo protegidas de la luz hasta el momento de realizar el procedimiento de trasplante.

Trasplante esplénico de células troncales

En cada uno de 3 experimentos independientes, las células fueron trasplantadas en el bazo de 4 ratones singénicos sanos C57BL/6. Se utilizaron en total 24 ratones, a razón de cuatro ratones machos singénicos sanos tratados, 2 ratones de control, un control sham (intervención simulada) y otro control sin operar por cada uno de los 3 experimentos. Los animales fueron anestesiados como se describió anteriormente y se realizó una incisión en el cuarto inferior derecho del vientre que incluyó un corte transversal de 0,5-1 cm en la piel y luego otro corte en el mismo sentido de 0.5 cm en la pared muscular. Al mismo tiempo, la alícuota de 150 μ l de células marcadas con CFSE fue cargado en una jeringa hipodérmica sin volumen muerto de 29G (Terumo, Japón). Se expuso el bazo con la ayuda de una pinza y un hisopo estéril y se inyectaron aproximadamente 100 μ l de la suspensión de células en el extremo distal del bazo. Una vez concluida la inyección, las incisiones se cerraron mediante 3 puntos de sutura con hilo de seda (3/0) (Ethicon, USA). Los animales fueron restituidos a sus respectivas jaulas y mantenidos bajo observación durante las siguientes 2 horas.

Determinación de la capacidad de anidación

Los ratones fueron sacrificados 24 y 48 hs posteriores al trasplante (2 ratones tratados y uno control por punto temporal), se extirparon el bazo, el hígado y los pulmones, y se fijaron en PFA 4% (en PBS) a 4°C. Los tejidos fueron incluidos en tacos de parafina

que se cortaron con micrótopo a un espesor de 10µm, se montaron en portaobjetos y se incubaron en una estufa a 50°C.

Los preparados se observaron en un microscopio de fluorescencia Nikon eclipse E400 con filtros para FITC.

Resultados

1. Aislamiento y caracterización de células troncales de hígado de rata

Con el objetivo de aislar e identificar células troncales/progenitoras hepáticas (LSPC) en condiciones fisiológicas, primeramente se realizó la puesta punto de los protocolos para el aislamiento de LSPC a partir de fetos de rata, especulando que el mayor tamaño del hígado fetal de estos animales, además de facilitar la técnica de aislamiento, aseguraría una cantidad de células adecuada para desarrollo de una tecnología eficaz. Se llevaron a cabo 18 experimentos individuales con ratas preñadas de 18-20 días de gestación. Los animales fueron sacrificados e inmediatamente se extrajeron la totalidad de los fetos; los cuales, a su vez, se sometieron a extirpación quirúrgica del hígado bajo lupa. Después de la digestión enzimática de los hígados fetales, se determinó (mediante conteo en cámara hemocitométrica) que en promedio el 65% del total de las células presentes en la suspensión eran glóbulos rojos. Una vez eliminados los glóbulos rojos

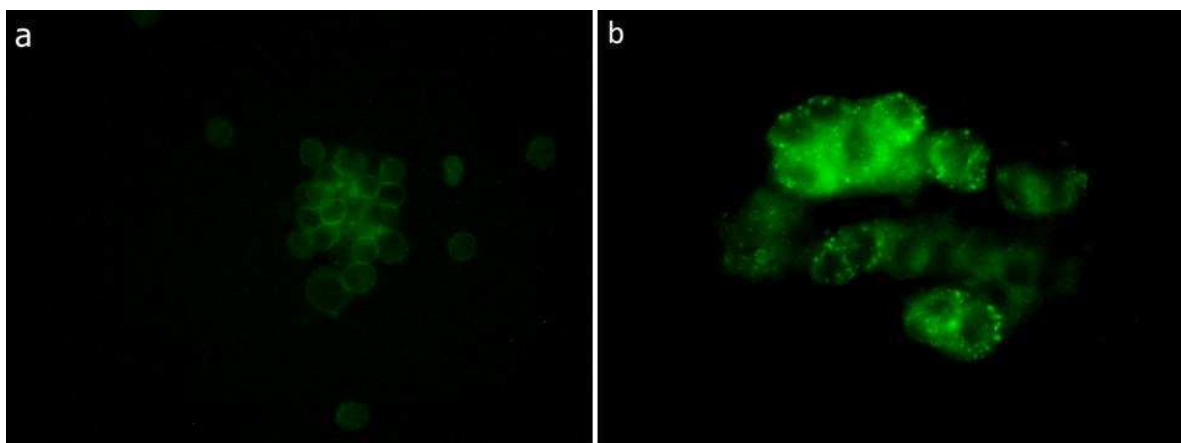


Figura R.1.1. Inmunofluorescencia indirecta para la suspensión de células totales del hígado fetal de rata de 14,5 dpc, luego de la digestión enzimática. Se identificaron células positivas tanto para el pool de anticuerpos anti-células progenitoras hematopoyéticas: Hem (a); como así también células positivas para el anticuerpo específico de hepatocitos maduros: Hep (b). Aumento 400x.

de la suspensión celular total se obtuvieron en promedio $5,63 \cdot 10^7$ células por hígado

fetal (rango: $1,34.10^7$ a $1,18.10^8$). La viabilidad de las células totales aisladas osciló entre un 96 y un 100% en todos los experimentos.

Con el objeto de identificar y caracterizar las distintas subpoblaciones presentes, se realizaron inmunomarcaciones sobre las células totales con un pool de anticuerpos para identificar células progenitoras hemopoyéticas (Hem) y otro anticuerpo específico de hepatocitos maduros (Hep). La inmunofluorescencia mostró que la suspensión de células totales contenía tanto células positivas para Hem como para Hep (Figura R.1.1a y 1.1b).

La suspensión celular se separó mediante fraccionamiento por centrifugación en un gradiente de Percoll. Luego de la centrifugación se obtuvieron dos fracciones, una en la interfase entre el 50% y el 60% de Percoll y otra en el fondo del tubo. Ambas fracciones se sometieron a inmunofluorescencia con los anticuerpos Hem y Hep. La fracción recolectada de la interfase contenía células positivas para el pool de anticuerpos Hem, y no contenía células positivas para Hep (Hem (+)/Hep (-)), y por lo tanto se la denominó fracción hemopoyética (FHM) (Figura R.1.2a). La fracción inferior del gradiente contenía células Hep (+), y no se detectaron células Hem (+), y se denominó fracción hepática (FHP) (Figura R.1.2b).

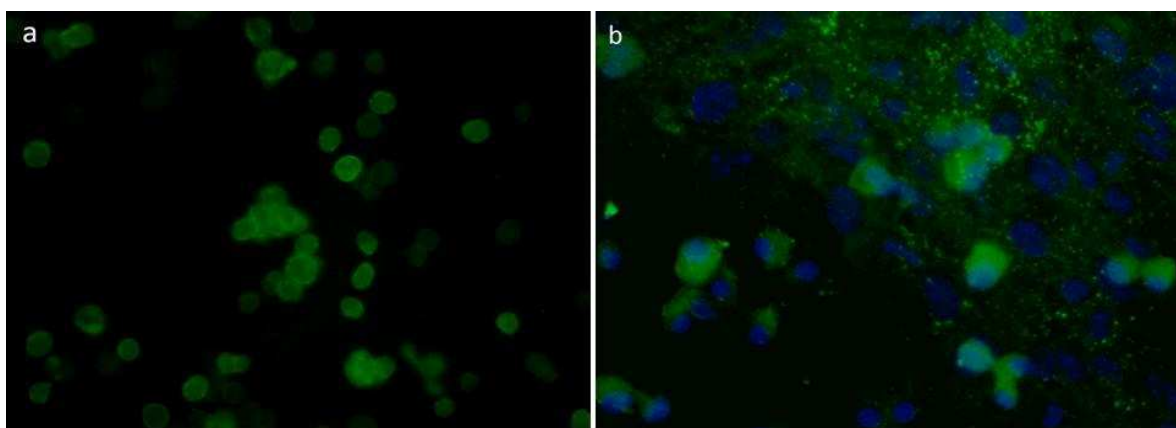


Figura R.1.2. Inmunofenotipado de las sub-poblaciones celulares. La suspensión celular fue sometida a una centrifugación en un gradiente discontinuo de Percoll, se obtuvieron dos fases: la superior contiene células Hem (+) (a) pero no presenta células positivas para el anticuerpo Hep. La fase inferior del gradiente posee sólo células Hep (+) (b)

Las células de la FHP fueron cultivadas en E de Williams suplementado (ver materiales y métodos) durante 4 días y al cabo de ese tiempo se observó la formación de una monocapa de células con morfología característica de hepatocitos maduros. Sobre estas células se realizó inmunofluorescencia con anticuerpos OC2, OC3 y Thy-1, los 3 son conocidos marcadores de células ovals ^{190,191}. Se encontró que células OC2 (+) y OC3 (+) se ubicaron dispersas sobre la monocapa de células con aspecto de hepatocitos maduros. Además, rodeando a estas células OC 2 y OC3 (+), se encontraron colonias de células más pequeñas con morfología similar a la de las células ovals, pero negativas para los marcadores OC2 y OC3, que se denominaron células tipo oval (Figura R.1.3).

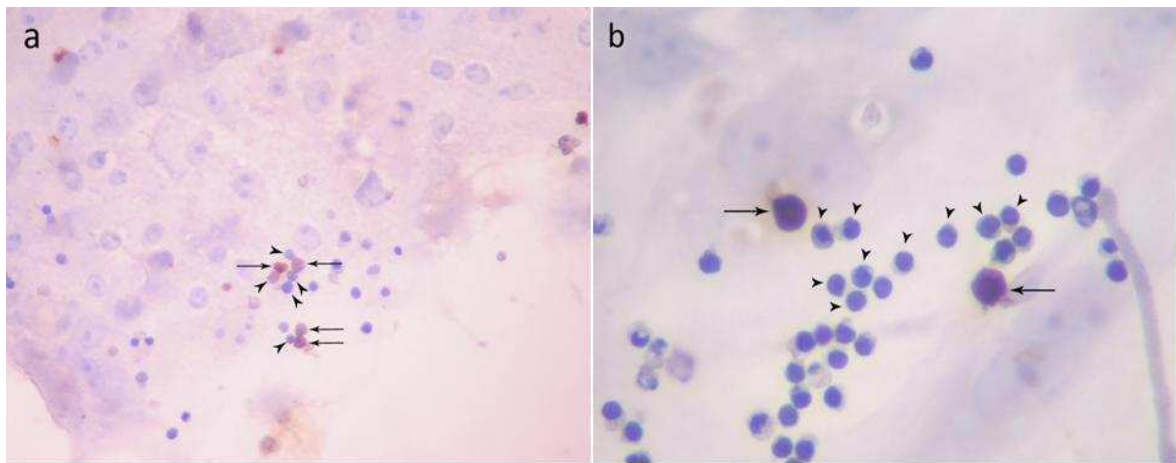


Figura R.1.3. Fracción hepática. Luego de 4 días de cultivo se observan sobre una monocapa de hepatocitos, células OC2 (+) (a) y OC3 (+) (b) (flechas) rodeadas de células “tipo oval” (puntas de flechas). Núcleos teñidos con hematoxilina. Aumentos (a) 400x; (b) 1000X.

Dentro de la FHP también se hallaron células similares en tamaño y morfología a las células OC2/OC3 (+) y que resultaron positivas para Thy-1, el otro marcador de células ovals (Figura R.1.4a). Incluso algunas de estas células mostraron doble marcación para OC2 y para Thy-1 (Figura R.1.4b).

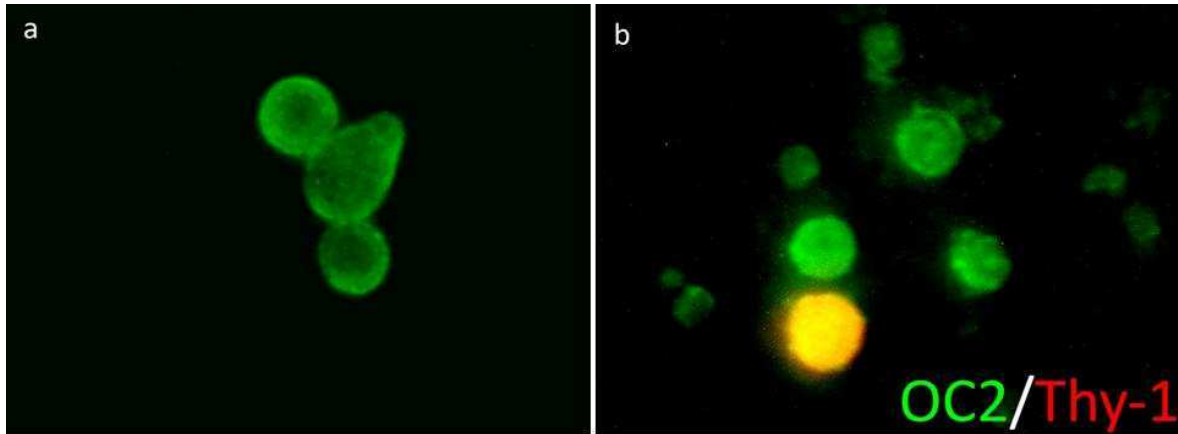


Figura R.1.4. Las células ovals de la FHP co-expresan OC2 y Thy-1. En la FHP cultivada durante 4 días observamos tanto células que expresan Thy-1 (verde) (a) como células que co-expresan OC2 (verde) y Thy-1 (rojo) (b). Aumento 400x.

Cuando las células de la FHP fueron cultivadas en el mismo medio de cultivo pero con el agregado de HGF se observó un importante aumento en la cantidad de células OC2/OC3 (+) (Figura R.1.5, células OC3 (+) no mostradas), así como también de las células más pequeñas tipo oval.

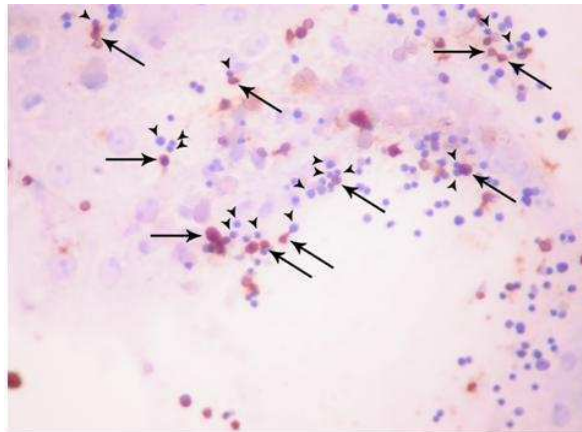


Figura R.1.5. Las células ovals de la FHP proliferan en presencia de HGF. Luego de cultivar la FHP durante 4 días con HGF observamos un enriquecimiento tanto de células ovals (OC2 (+), flechas) como de células tipo ovals (puntas de flechas). Aumento 400x.

Los cultivos de la FHP se prolongaron hasta los 6 días. Este procedimiento resultó en la formación de colonias (acúmulos celulares) (Figura R.1.6a), que fueron sub-cultivadas utilizando cilindros de clonado. Estas células subcultivadas fueron capaces de adherirse al sustrato y mantuvieron la expresión de OC2 durante 14 días, aunque no mostraron signos de proliferación posterior, in vitro (Figura R.1.6b).

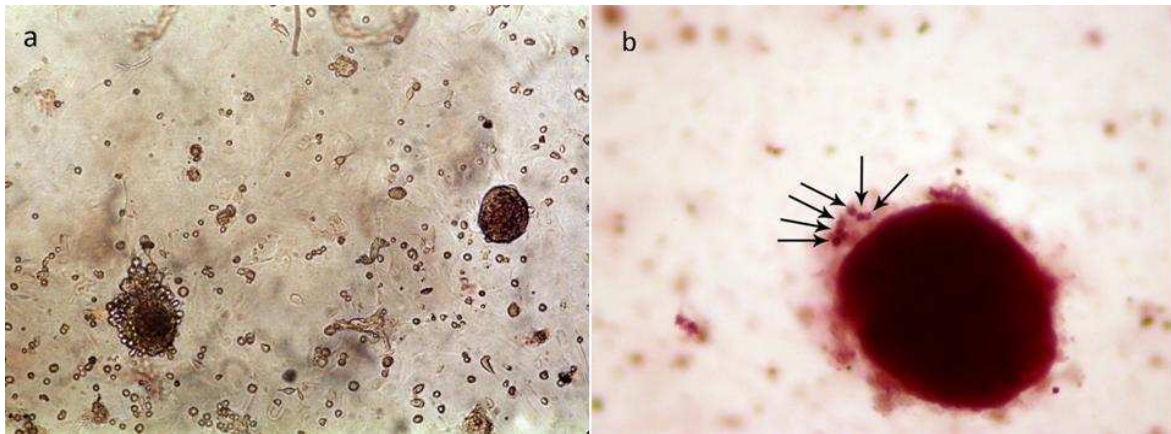


Figura R.1.6. Formación de acúmulos de células OC2 (+). Al cabo de 6 días en cultivo las células forman acúmulos (a). Luego de sub-cultivar estos acúmulos observamos que se mantiene la expresión de OC2 (b) (flechas). Aumentos 200x (a) y 400x (b).

Para mejorar la adherencia e inducir la proliferación de las células ovals sub-cultivadas, se utilizó un recubrimiento de colágeno IV sobre la superficie de cultivo. Las colonias aisladas, separadas del resto de las células utilizando cilindros de clonado, se disgregaron mecánicamente mediante la succión y liberación repetida de la suspensión con una micropipeta con una punta de 1.000 μ l (P1000). Las células ovals así obtenidas fueron subcultivadas, se adhirieron correctamente al sustrato (Figura R.1.7a) y al cabo de 4 días formaron pequeñas colonias (Figura R.1.7b), pero en ningún caso estos cultivos sobrevivieron mas allá de este periodo.

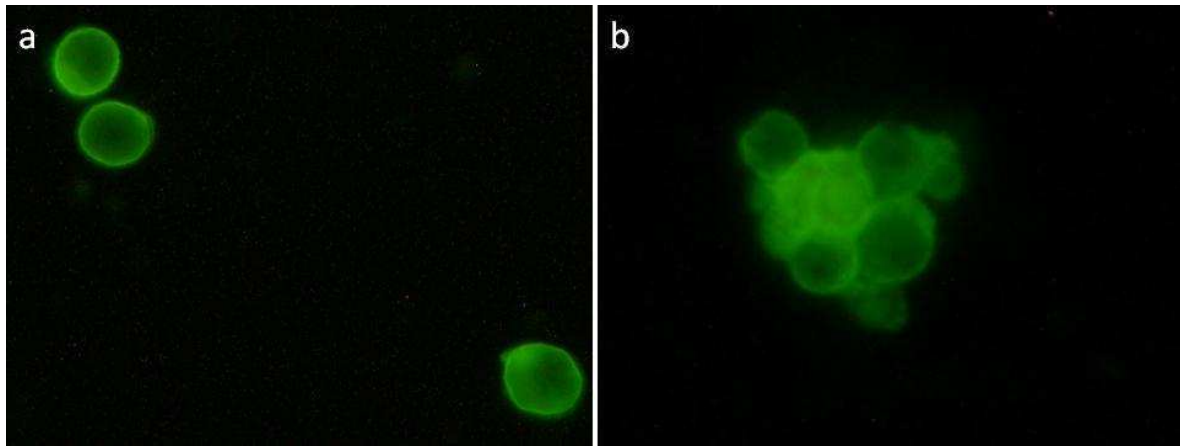


Figura R.1.7. Células ovals (OC2 (+) subcultivadas sobre colágeno IV. El recubrimiento de la superficie con colágeno IV permite la adherencia (a, 24 horas), y la formación de colonias de células ovals (b, 4 días en cultivo). Aumento 400X.

Cabe destacar que en los cultivos de las células totales sin fraccionar se encontraron escasas células positivas para los marcadores OC2 (no mostradas) y OC3 (Figura R.1.8). En este caso el agregado de HGF al medio de cultivo no tuvo el mismo efecto sobre las células ovals, ya que no se observaron células “tipo oval” alrededor, a diferencia de los cultivos de la fracción hepática.

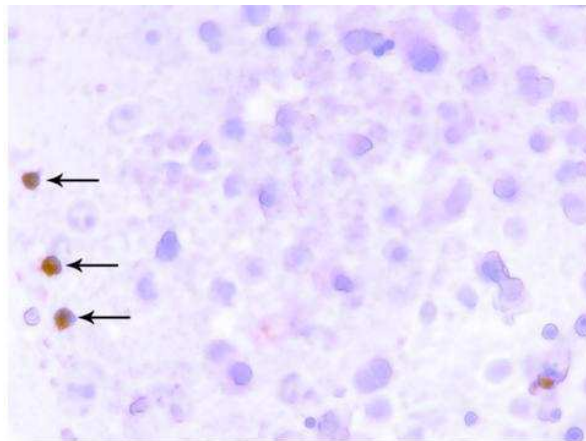


Figura R.1.8. Células totales sin fraccionar. No se observan células “tipo ovals” alrededor de células OC3 (+) (flechas) cultivadas durante 4 días en presencia de HGF. Aumento 400x.

2. Aislamiento y caracterización de células troncales de hígado de ratón

Los resultados descriptos en el capítulo anterior mostraron la factibilidad de aislar e identificar LSPC en condiciones fisiológicas a partir de hígados fetales y de enriquecer en LSPC un cultivo de células hepáticas. Por otro lado estos experimentos nos permitieron demostrar que los anticuerpos OC2 y OC3 son muy útiles para la identificación de células ovales. Sin embargo, y debido a que estos anticuerpos no se encuentran disponibles comercialmente, su uso impone limitaciones al desarrollo tecnológico planteado. Debido a ello, se decidió cambiar de sistema experimental por un modelo de ratón, para el cual existe una mayor cantidad de anticuerpos comerciales disponibles. Además pensamos que este sistema presenta mejores perspectivas a futuro, debido a la posibilidad de generar o adquirir animales transgénicos para diversas patologías que permitan estudiar las posibles aplicaciones de estas células en terapias regenerativas. Más aún, la experiencia adquirida con ratas nos permitió, no sólo evaluar la factibilidad, sino también ajustar las condiciones de cultivo en términos de soportes y medios nutritivos apropiados para la expansión de esta población celular.

Debido a que durante el desarrollo embrionario el hígado actúa como órgano hemopoyético, decidimos caracterizar en nuestro modelo la extensión temporal de la hemopoyesis en el hígado durante el desarrollo embrionario. Para ello se aislaron células totales de hígados de fetos de ratón de distintos tiempos de gestación, incluyendo embriones de edades comprendidas entre 12,5 dpc y 19,5 dpc y de ratones de 1 día de vida. Las células aisladas se cultivaron en agar semisólido durante 10 días. Mediante la observación microscópica de los cultivos, se identificaron morfológicamente y se cuantificaron las colonias eritroides (BFU-E) (Figura R.2.1a), granulocíticas-macrofágicas (UFC-GM) (Figura R.2.1b) y megacariocíticas (UFC-ME) (no mostradas). Este estudio nos permitió observar, en concordancia con lo descrito por

otros autores, que durante la fase hepática de la hemopoyesis el número de células formadoras de colonias aumentan desde 12,5 dpc llegando a un máximo hacia 17,5 dpc, donde comienza descender hacia los primeros días luego del nacimiento. Cronológicamente, se observa primero un predominio de las células del linaje eritroide y, luego, a partir de 15,5 dpc el predominio es de las células granulocíticas-macrofágicas. Las células del linaje megacariocítico aparecen en 14,5 dpc y su número se mantiene prácticamente constante hacia el nacimiento (Figura R.2.2).

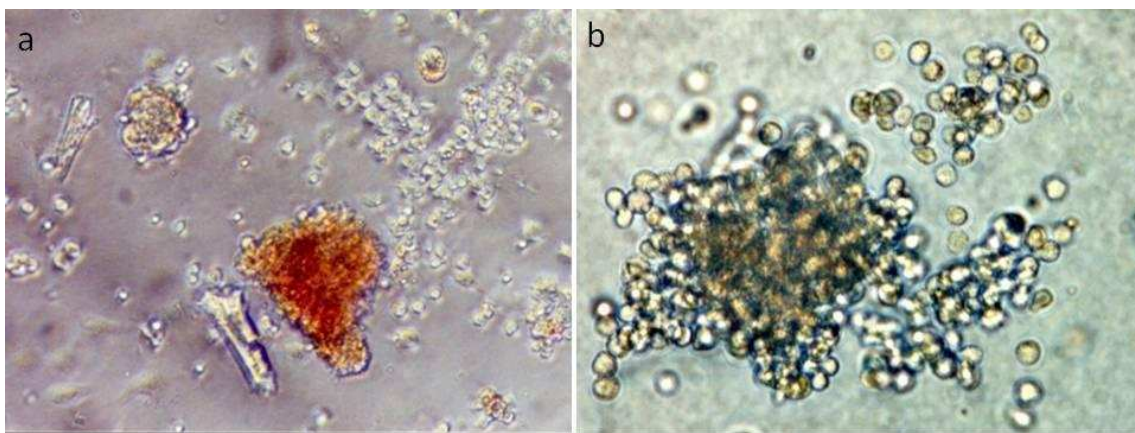


Figura R.2.1. Colonias de células progenitoras hemopoyéticas obtenidas luego de 10 días de cultivo en agar semisólido. a) Unidades formadoras de brotes eritroides (BFU-E). b) Unidades formadoras de colonias granulocíticas-macrofágicas (UFC-GM). Aumento a) 200x y b) 400x.

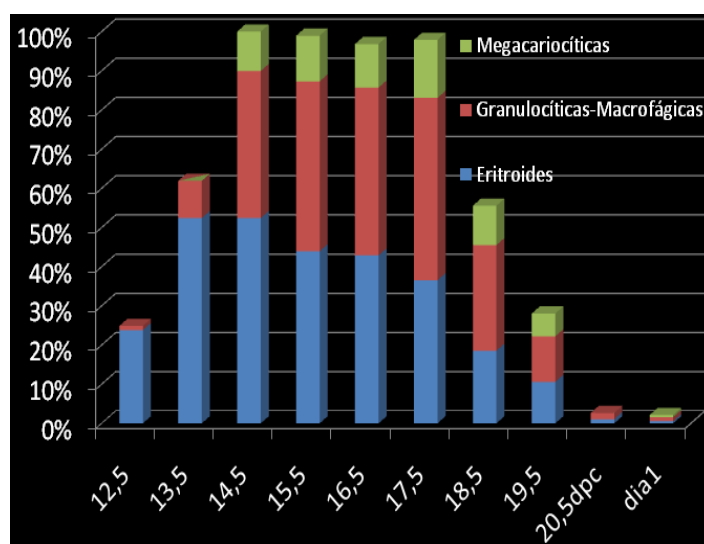


Figura R.2.2. Evolución de la hematopoyesis en el hígado fetal de ratones. Porcentaje de Unidades Formadoras de Colonias (UFCs) pertenecientes a cada linaje, normalizado al número mayor de colonias totales (189 colonias en 14,5 dpc).

Para el aislamiento y caracterización de las LSPC de ratón se realizaron 23 procedimientos de laboratorio individuales a partir de 27 hembras preñadas de 14,5 dpc, de las que se extrajeron en promedio 8,4 fetos por hembra (rango 4-20, moda 9). El hígado de fetos de 14,5 dpc tiene un tamaño aproximado de 3 x 4 mm y son fácilmente identificables bajo lupa ya que es el órgano de mayor tamaño en el abdomen del feto. En general para cada aislamiento se utilizó una hembra preñada, pero en los casos en que el número de fetos fue menor a 6, se utilizaron 2 hembras. Para la digestión y los tratamientos posteriores el material extirpado de todos los fetos fue agrupado y procesado conjuntamente. A partir de cada hígado fetal se obtuvieron en promedio $1,42 \times 10^7$ células (rango $1,23 \times 10^6$ – $4,07 \times 10^7$). La integridad de la membrana plasmática, fue utilizada como indicador de la viabilidad de las células aisladas. Con el método de exclusión de azul tripan estimamos que prácticamente el 100% de las células eran viables luego del proceso de aislamiento.

Con el objeto de caracterizar la población de células aisladas de hígado fetal de ratón de 14,5 dpc, se realizó la identificación mediante inmunofluorescencia con anticuerpos

contra las proteínas AFP, E-cadherina, Thy-1 y CK19. Aproximadamente el 60% de las células aisladas expresaron AFP (Figura R.2.3), mientras que sólo el 5% del total de las células aisladas fueron E-cadherina (+) (Figura R.2.4). Por otro lado, tanto las células CK19 (+) como las células Thy-1 (+) representan una pequeña proporción de las células totales del hígado fetal de 14,5 dpc, la cual no pudo ser cuantificada debido a que en ambos casos, las células positivas, se encontraron siempre formando pequeños acúmulos de 3 a 10 células (Figuras R.2.5 y R.2.6).

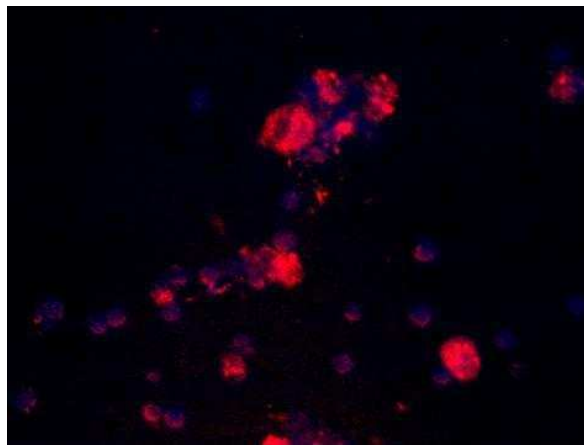


Figura R.2.3. Las células aisladas del hígado de ratón de 14,5 dpc expresan AFP. Aumento 100x.

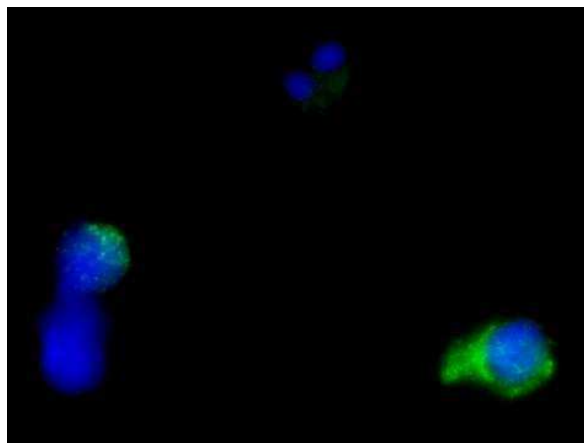


Figura R.2.4. Las células aisladas del hígado de ratón de 14,5 dpc expresan E-cadherina. Aumento 400x.

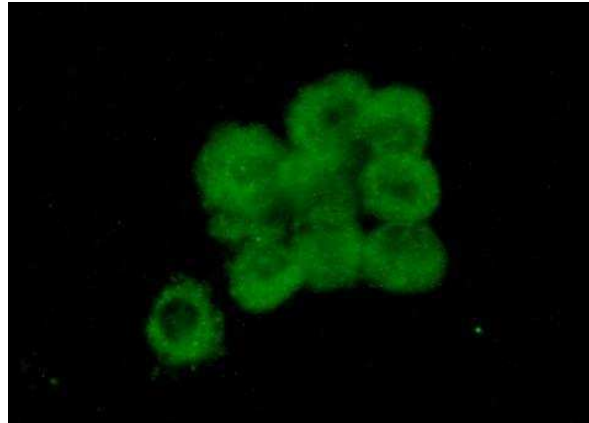


Figura R.2.5. Las células aisladas del hígado de ratón de 14,5 dpc expresan Thy-1. Aumento 400x.

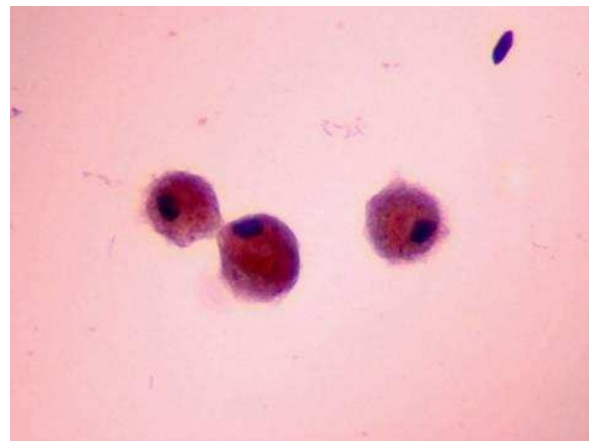


Figura R.2.6. Las células aisladas del hígado de ratón de 14,5 dpc expresan CK19. Aumento 400x.

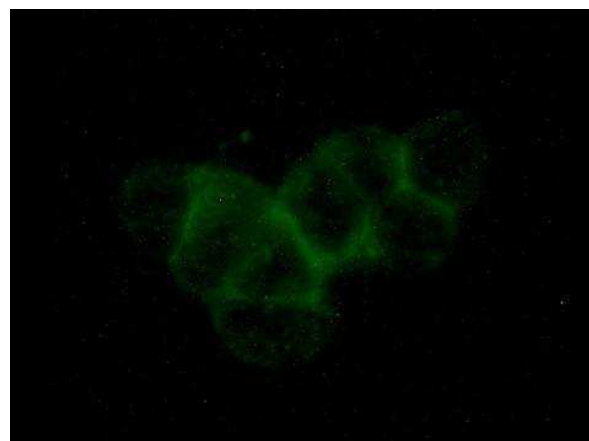


Figura R.2.7. Agregado de células EpCAM (+). La suspensión de células obtenida luego de la digestión enzimática contiene algunos agregados de células EpCAM (+). Aumento 400x.

Adicionalmente se realizó inmunofluorescencia con un anticuerpo contra EpCAM y se

determinó que aproximadamente el 12-15% de la población de células nucleadas totales expresaban esta proteína en su superficie (Figura R.2.7).

Para corroborar estos datos se realizó un análisis mediante citometría de flujo sobre las células totales utilizando anticuerpos contra EpCAM, E-cadherina y CD45. Este análisis confirmó efectivamente que en el hígado fetal de 14,5dpc, un 16,92% de las células son EpCAM (+) y que un 5,47% de las células son positivas para E-cadherina. Además, se determinó que un 17,40% de las células son positivas para CD45 (Figura R.2.8). En conjunto, las células marcadas corresponden al 39,79% del total de las células aisladas. En el diagrama de Venn de la Figura R.2.8 se observa en detalle la distribución de las subpoblaciones identificadas: EpCAM (+)/(-); E-cadherina (+)/(-) y CD45 (+)/(-). Estos resultados ponen de manifiesto que del total de las células que expresan el marcador pan-linfocitario CD45, aproximadamente un 12% expresan (y co-expresan) las moléculas características de células epiteliales EpCAM y E-cadherina.

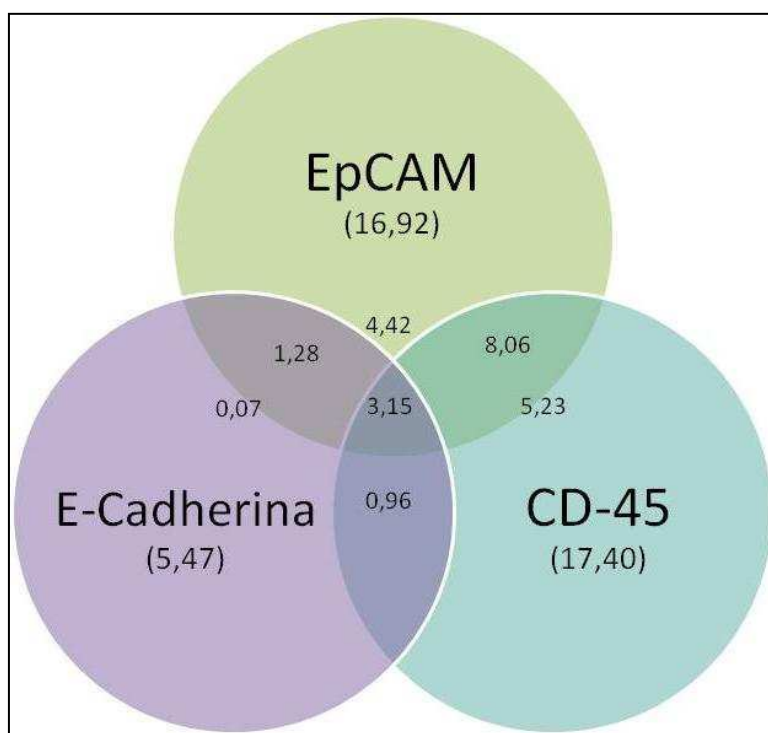


Figura R.2.8. Sub-poblaciones celulares en el hígado fetal de ratón de 14,5 dpc. En la figura se muestran los valores correspondientes al promedio de los datos de tres experimentos independientes.

Simultáneamente, y como control, se analizó por citometría de flujo la línea celular MLP29 que se considera derivada de progenitores hepáticos de ratón¹⁹². Esta línea celular presenta una robusta coexpresión de EpCAM y E-Cadherina en la mayoría de la células, aunque también se detectó una pequeña subpoblación de células CD45 (+) (Tabla R.2.1, Figura R.2.9). Aunque con diferencias en el porcentaje de células que expresan estos marcadores respecto de las células primarias de hígado fetal, es digno de notar la similitud en el perfil de proteínas de superficie de ambos tipos celulares.

Poblaciones	% del total
E-Cadherina (+)	95,83
EpCAM (+)	95,63
CD45 (+)	1,88
EpCAM (+)/E-cadherina (+)	93,53
EpCAM (+)/E-cadherina (+)/CD45 (+)	1,71

Tabla R.2.1. La línea celular MLP-29 co-expresa E-Cadherina y EpCAM. Detalle de las sub-poblaciones graficadas en la figura 4.3.

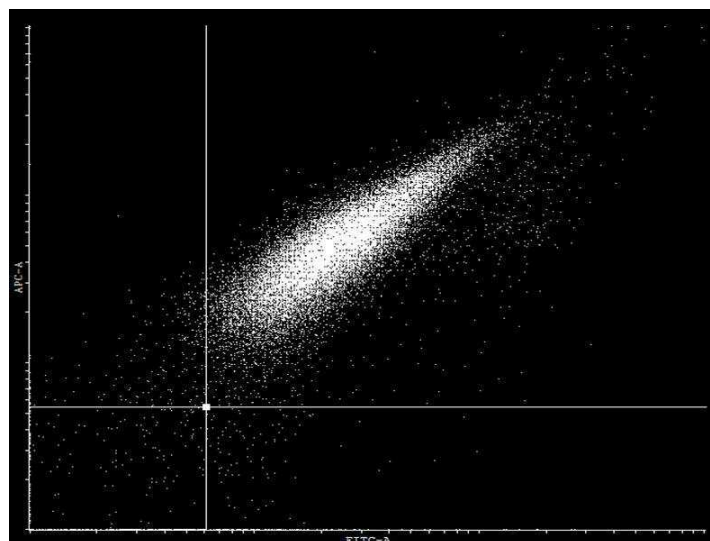


Figura R.2.9. La línea celular MLP-29 co-expresa EpCAM y E-Cadherina. Dot-plot E-Cadherina-FITC vs. EpCAM-APC.

3. Aislamiento y caracterización de células troncales EpCAM (+)

Dada la efectividad de la proteína EpCAM para la identificación de las células troncales hepáticas en humanos ¹⁴⁷, se utilizó esta proteína como diana para el aislamiento y purificación de este tipo celular mediante la separación física con anticuerpos anti-EpCAM acoplados a perlas magnéticas utilizando el sistema MACS. De los 23 experimentos que realizamos, en diez de ellos se aislaron células EpCAM (+) a partir de la suspensión de células obtenida de los hígados fetales de 14,5 dpc, con la tecnología MACS. Del total de células colocadas en cada columna de separación magnética se recuperó el 10% (SD 0,19) y la cantidad de células obtenidas en la fracción EpCAM (+) promedió el 4,90% (SD 0,02), correspondiendo el resto a células EpCAM (-).

Las células EpCAM (+) purificadas usando perlas magnéticas se caracterizaron mediante inmunofluorescencia con anticuerpos contra proteínas asociadas con el linaje mesenquimal/hemopoyético, como así también contra proteínas que expresan solo células de linajes epiteliales hepáticos clásicos. Entre las primeras se ensayó Thy-1 y se encontró que las células EpCAM (+) co-expresan esta proteína (Figura R.3.1a). La reacción de inmunofluorescencia con anticuerpos contra CK19, que indica la potencialidad de diferenciarse en células del canalículo biliar, y con anticuerpos contra las proteínas AFP y E-Cadherina específicas de hepatocitos también fueron positivos (Figura R.3.1b, c y d). Este análisis demostró que las células EpCAM (+) aisladas co-expresan cuatro de los marcadores específicos de células troncales hepáticas y demuestra que el antígeno de superficie EpCAM es apropiado y de gran utilidad para aislar y purificar células troncales hepáticas de ratón a partir de hígado fetal.

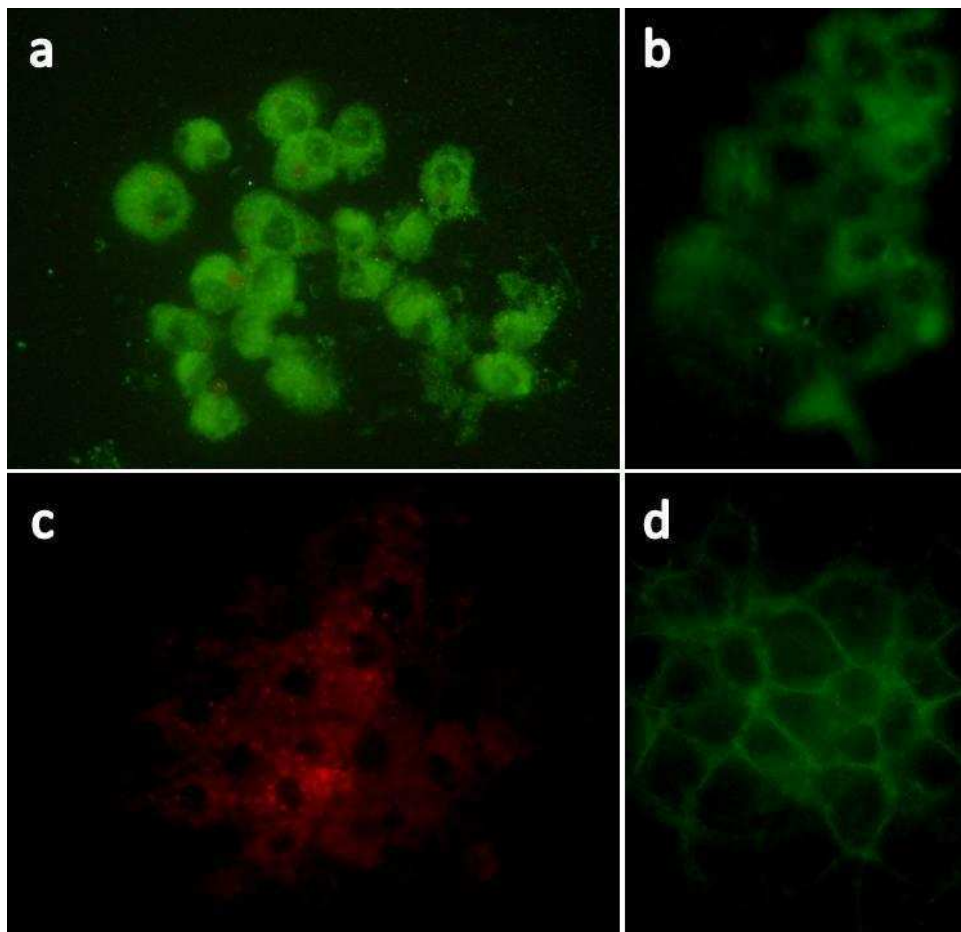


Figura R.3.1. Las células EpCAM (+) co-expresan genes compartidos con linajes hematopoyéticos mesenquimales y distintos linajes hepáticos: a) Thy-1; b) CK19; c) AFP; d) E-Cadherina. Aumento 200x.

Expresión de genes asociados al carácter hepato-específicos en células troncales

Se determinó, mediante PCR en tiempo real semi-cuantitativa, el nivel de expresión relativa del gen EpCAM en las células recién aisladas (totales) y en las subpoblaciones EpCAM (+) y EpCAM (-). Este análisis reveló que el nivel de mRNA del gen EpCAM es notablemente superior en las células de la subpoblación EpCAM (+) que en las células de la subpoblación EpCAM (-) (Figura R.3.2 columnas 3 y 4). Por otro lado, sabiendo que la misma proteína EpCAM (que utilizamos como ancla para aislar las células) puede actuar como transductor de señales y modular la expresión de su gen, fue necesario un control adicional. Para esto se incubó la suspensión de células totales con el anticuerpo anti-EpCAM (siguiendo el protocolo de marcación que utilizamos para

aislar las células mediante MACS), se extrajo el ARN y posteriormente se midió el nivel de expresión de EpCAM. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las células totales incubadas o no con el anticuerpo (Figura R.3.2 columnas 1 y 2). Este experimento mostró que la unión del anticuerpo anti-EpCAM no modula la expresión de EpCAM en la suspensión de células totales en los tiempos y bajo las condiciones que lo utilizamos como ancla para el aislamiento de las células EpCAM (+).

Con el objeto de estimar el grado de diferencia de expresión del gen en las distintas poblaciones celulares, los datos se expresaron en forma relativa al del gen GAPDH y se compararon estadísticamente mediante el test ANOVA de un factor, post-hoc Tukey ($p < 0,001$ = significativo). El análisis estadístico reveló que la expresión relativa de EpCAM en la suspensión de células EpCAM (+) es 33% superior a la de las células EpCAM (-) ($p < 0,0001$). Como control se comparó el nivel de expresión en la primera fracción con la de las células MLP29, derivada de progenitores hepáticos, e interesantemente ambos tipos celulares exhibieron un elevado nivel de transcripción del gen EpCAM. Más aún el test estadístico reveló que no existen diferencias significativas ($p > 0,1$) en la expresión relativa de EpCAM entre la subpoblación EpCAM (+) y la línea celular MLP29 (Figura R.3.2 columnas 4 y 5).

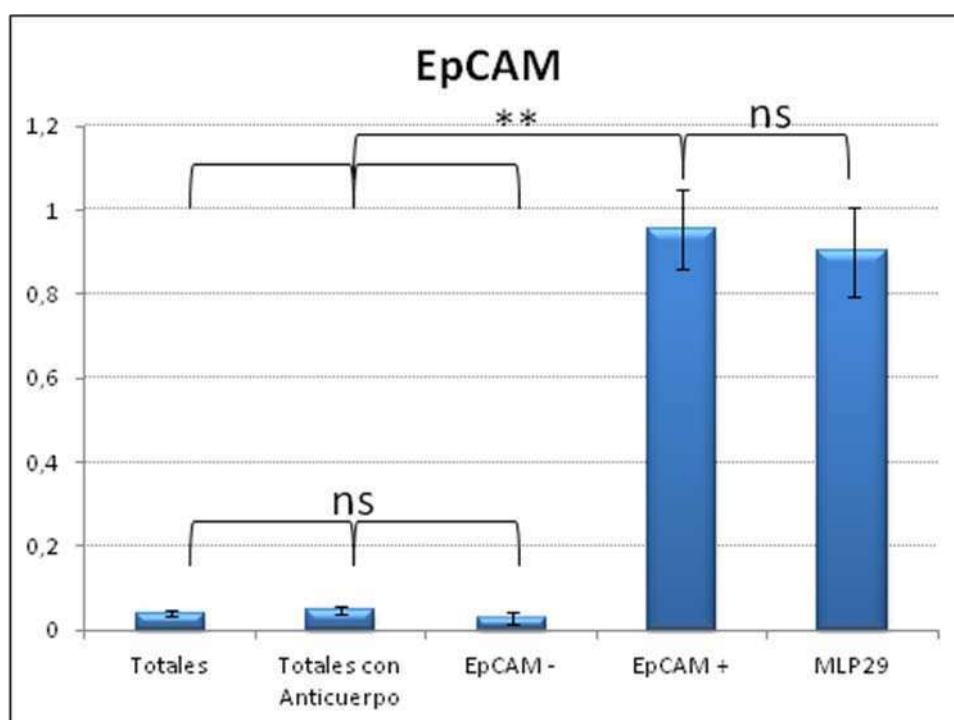


Figura R.3.2. Expresión relativa de EpCAM en células hepáticas de 14,5dpc. La expresión es relativa a GAPDH. Test estadístico de ANOVA de un factor; post-hoc Tukey ** $p < 0,001$; ns: no significativo.

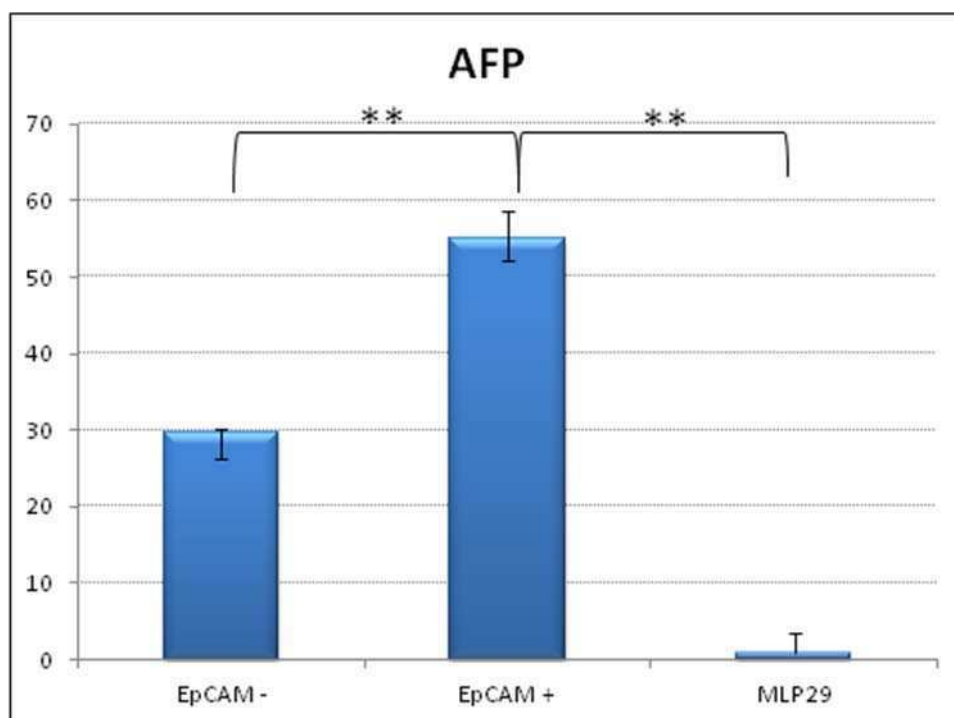


Figura R.3.3. Expresión relativa de AFP en células hepáticas de 14,5dpc. La expresión es relativa a GAPDH. Test estadístico de ANOVA de un factor; post-hoc Tukey ** $p < 0,001$.

Adicionalmente se determinó el estado transcripcional de los genes que codifican AFP y

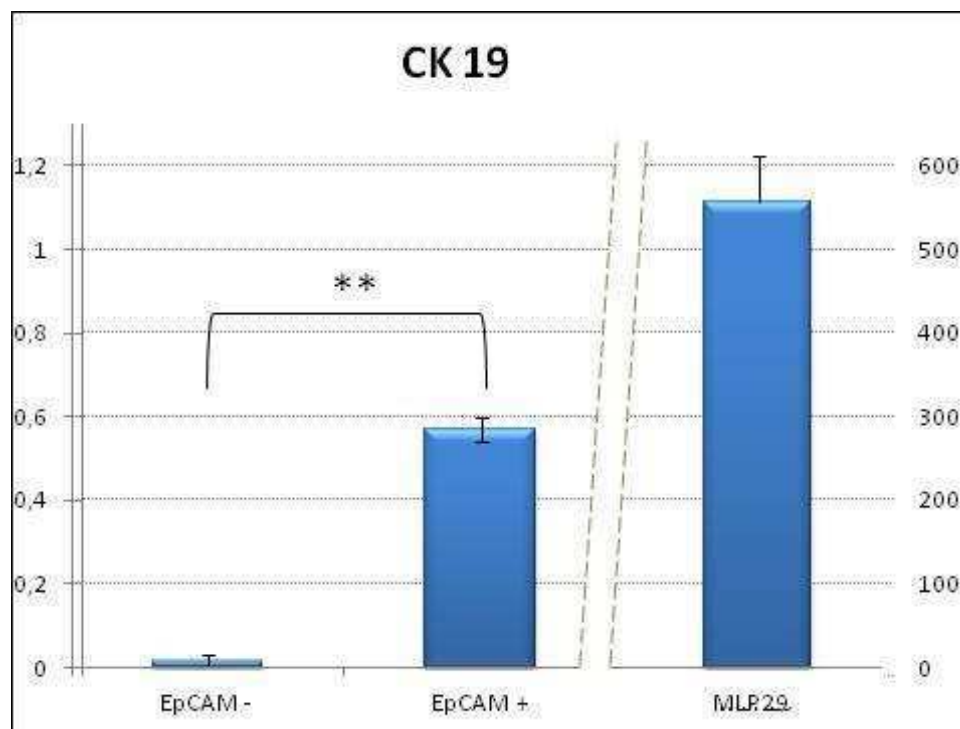


Figura R.3.4. Expresión relativa de CK19 en células hepáticas de 14,5dpc. Nótese que el nivel de expresión en la línea celular MLP29 está graficado en una escala diferente. La expresión es relativa a GAPDH. Test estadístico t de Student ** $p < 0,001$.

CK19 mediante RT-PCR. En la Figura 4.3 se observa que las células EpCAM (+) expresaron dos veces más cantidad de mRNA de AFP que las células EpCAM (-) ($p < 0,001$), mientras que la línea celular MLP29 presentó una expresión significativamente inferior de este gen respecto de las células EpCAM (+) (Figura R.3.3 columna 3). Por el contrario, la expresión relativa de CK19 en células MLP29 fue aproximadamente 1000 veces superior a la expresión de la subpoblación EpCAM (+) (Figura R.3.4 columnas 2 y 3). Sin embargo la comparación del estado transcripcional de este gen entre células EpCAM (+) con aquellas presentes en la fracción EpCAM (-) demostró que en las primeras el nivel fue 33 veces superior al de la segunda subpoblación (Figura R.3.4 columnas 1 y 2).

Expresión de genes asociados con el carácter troncal

Recientemente se ha demostrado que las proteínas codificadas por los genes Claudina3 (Cldn3) y Dlk-1, están asociados al carácter troncal en células epiteliales y hemopoyéticas^{125,193,194}. Por lo tanto y con el objetivo de conocer el perfil de expresión de estos genes en la población EpCAM (+), se realizó la semi-cuantificación mediante RT-PCR. Adicionalmente se midió el nivel de expresión del gen que codifica para CD133, un marcador ampliamente utilizado para identificar células troncales de origen mesenquimal, principalmente hemopoyéticas¹⁹⁵ y neurales¹⁹⁶.

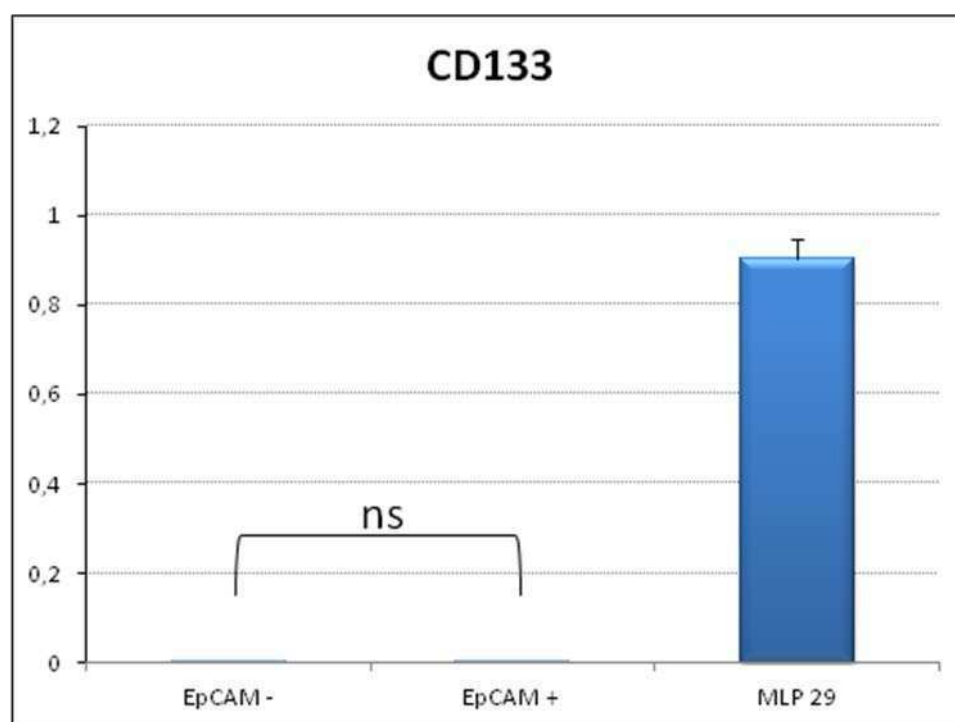


Figura R.3.5. Expresión relativa de CD133 en células hepáticas de 14,5dpc. La expresión es relativa a GAPDH. Test estadístico t de Student; ns: no significativo.

Este estudio reveló que existe actividad transcripcional del gen CD133 tanto en las subpoblaciones EpCAM (+) y EpCAM (-), como en la línea celular MLP29. Sin embargo, el nivel de expresión relativa en las células primarias fue mínimo, cerca del límite de detección del sistema (Figura R.3.5), mientras que en las células MLP29 fue

significativamente superior. Los valores obtenidos para las dos subpoblaciones de células primarias no fueron significativamente diferentes.

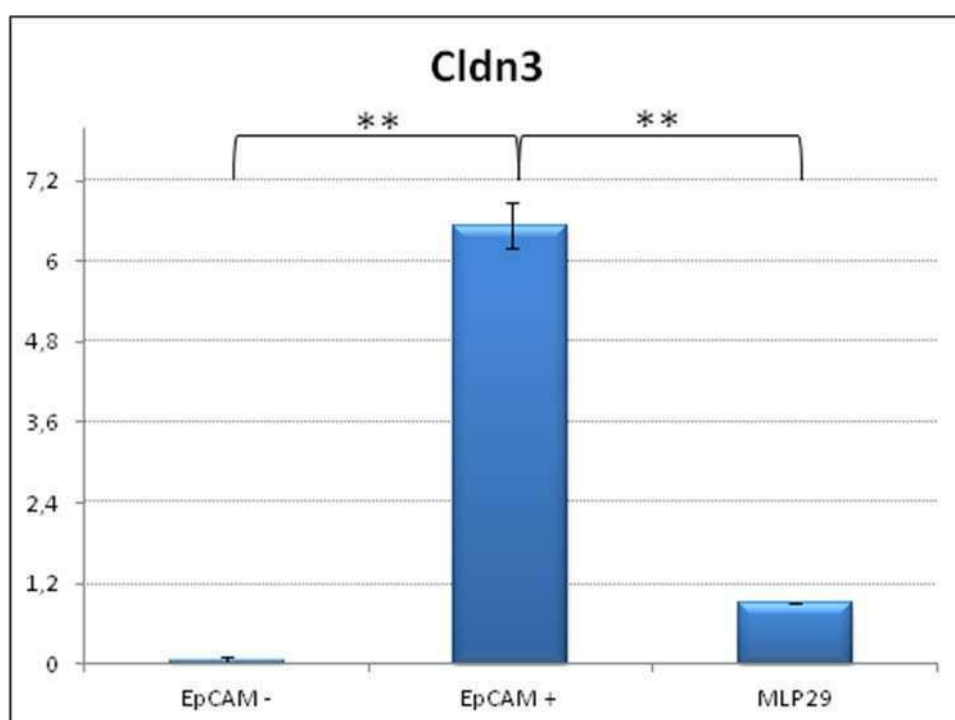


Figura R.3.6. Expresión relativa de Cldn3 en células hepáticas de 14,5dpc. La expresión es relativa a GAPDH. Test estadístico de ANOVA de un factor; post-hoc Tukey ** $p < 0,001$.

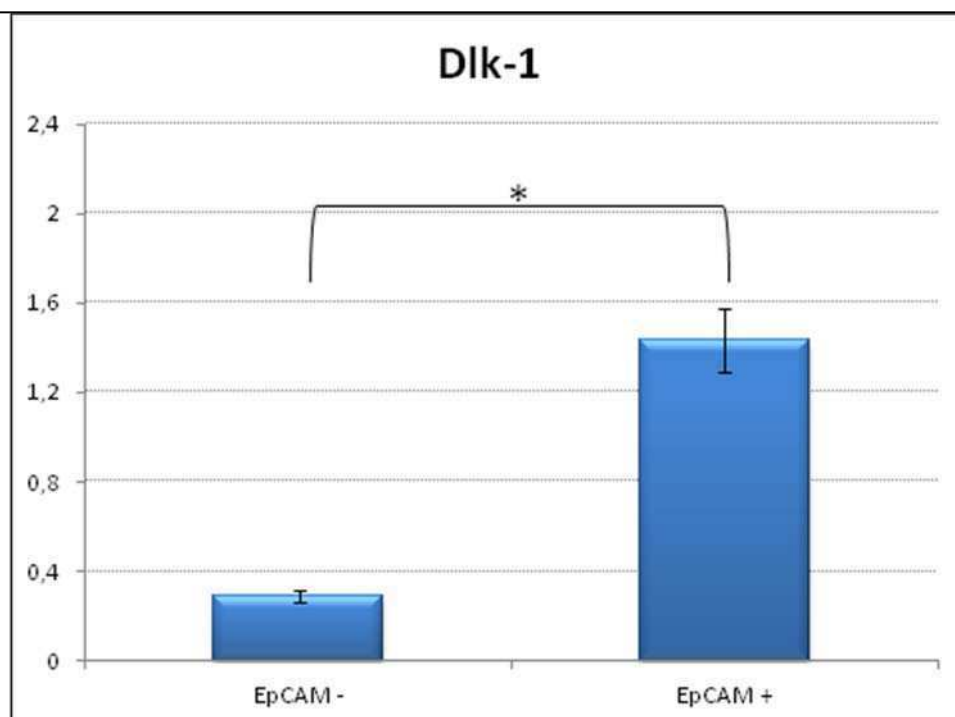


Figura R.3.7. Expresión relativa de Dlk-1 en células hepáticas de 14,5dpc. La expresión es relativa a GAPDH. Test estadístico t de Student * $p < 0,05$.

La expresión relativa de ARNm de Cldn3 en las células de la subpoblación EpCAM (+) fue 117 veces superior a la de la subpoblación EpCAM (-) y 7 veces superior al nivel de expresión de la línea celular MLP29 (Figura R.3.6). Por otro lado, la expresión relativa de Dlk-1 fue 5 veces superior en la subpoblación EpCAM (+) que en la subpoblación EpCAM (-) (Figura R.3.7). El nivel de expresión de este gen en la línea celular MLP29 fue indetectable por esta técnica. Los niveles de expresión de Cldn3 y Dlk-1 en las células de la subpoblación EpCAM (+) fueron significativamente diferentes tanto a las células EpCAM (-) como así también a las células MLP29, probablemente esto obedezca a diferencias funcionales que estarían relacionadas con el grado o compromiso que tienen los productos de estos genes en el mantenimiento del carácter troncal.

Expresión in situ de genes asociados al carácter hepático en células troncales

La tecnología RT-PCR da una medida del estado transcripcional de una población celular, es decir es un promedio en el que se incluyen células en las que el gen ensayado puede estar inactivo. Con el objeto de estudiar el perfil de transcripción en células individuales y de esta manera obtener información acerca del grado de participación de las proteínas en la mantención del carácter troncal, realizamos ARN-FISH con sondas específicas para AFP y Dlk-1 en preparaciones de las células aisladas EpCAM (+).

Las hibridaciones realizadas con sondas para los transcritos de AFP demostraron que el 18,87 % de células EpCAM (+) exhibían señales ARN-FISH; mientras que las realizadas con sondas para Dlk-1 mostraron que sólo el 5,66 % de las células EpCAM (+) expresan Dlk-1. Adicionalmente el estudio reveló que la expresión de Dlk-1 en células EpCAM (+) es siempre monoalélica; mientras que en el caso de AFP la expresión monoalélica correspondió al 60% de las células EpCAM (+)/ AFP (+) (Figura R.3.8).

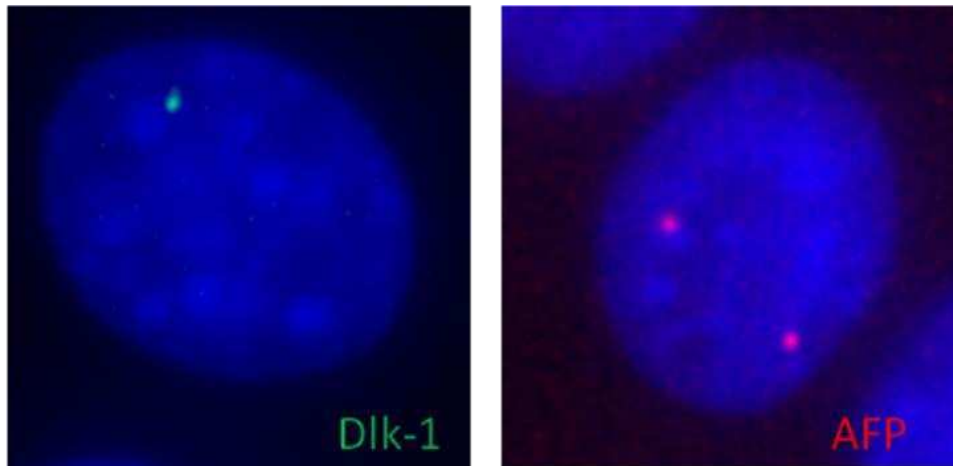


Figura R.3.8. ARN-FISH en la sub-población EpCAM (+). Las microfotografías ilustran cómo se observa una célula con una expresión monoalélica de Dlk-1 (derecha) y una expresión bialélica de AFP (izquierda).

4. Organización del genoma

Mediante ADN-FISH con sondas para las secuencias repetitivas correspondientes al ADN satélite mayor y al ADN satélite menor localizadas en la región pericentromérica de los cromosomas de ratón y microscopía confocal se estudió la organización espacial de la cromatina de la subpoblación EpCAM (+) y se la comparó con las células EpCAM (-). Se observó que en las células EpCAM (-) tanto el ADN satélite mayor como el ADN satélite menor, presentan una distribución diferente al de las células EpCAM (+). Mientras en las primeras el ADN satélite, y en consecuencia los centrómeros, presentan una agregación más pronunciada formando los clásicos dominios llamados cromocentros, mayormente ubicados en un plano paralelo al sustrato, en las células EpCAM (+) la distribución es más homogénea en todo el núcleo y con menor agregación de cromocentros (Figura R.4.1).

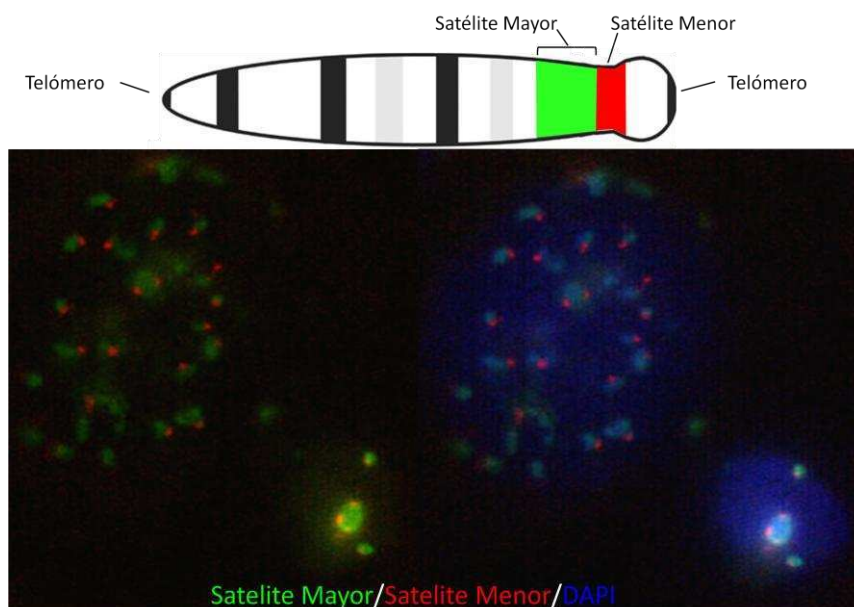


Figura R.4.1. Distribución espacial de secuencias repetitivas pericentroméricas. Célula EpCAM (+) presentan una distribución más homogénea de los bloques heterocromáticos, probablemente debido a un estado transcripcional más activo.

Adicionalmente se realizaron experimentos de inmunofluorescencia para histona H3 acetilada en lisinas 14 y 23 (Figura R.4.2) e histona H3 metilada en lisina 9 (Figura R.4.3), ambas modificaciones asociadas con el estado activo y silente de la cromatina, respectivamente. El análisis demostró que efectivamente un elevado nivel de histona H3Ac14-23 en las células precursoras (Figura R.4.2) y que la marca asociada con silenciamiento estaba preferentemente circunscripta a las regiones heterocromáticas del genoma, es decir en los cromocentros (Figura R.4.3).

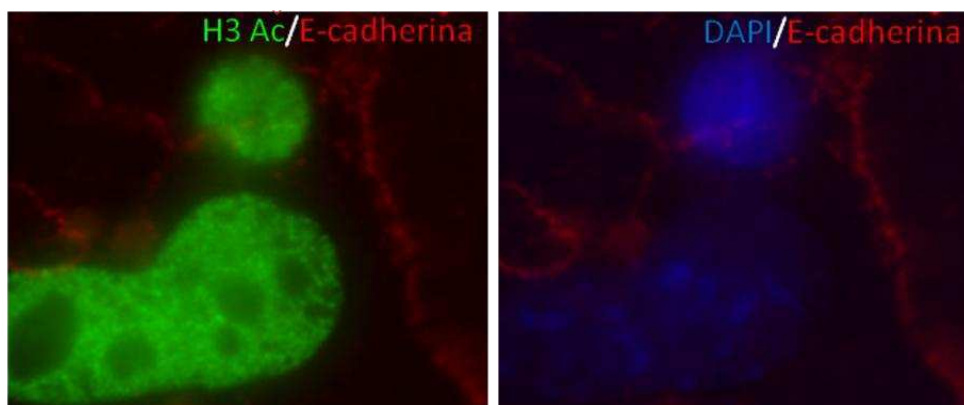


Figura R.4.3 Metilación de lisina 9 de histona H3. La modificación relacionada con el silenciamiento génico localiza preferentemente en los bloques heterocromáticos (coincidencia entre la coloración DAPI y H3-metK9).

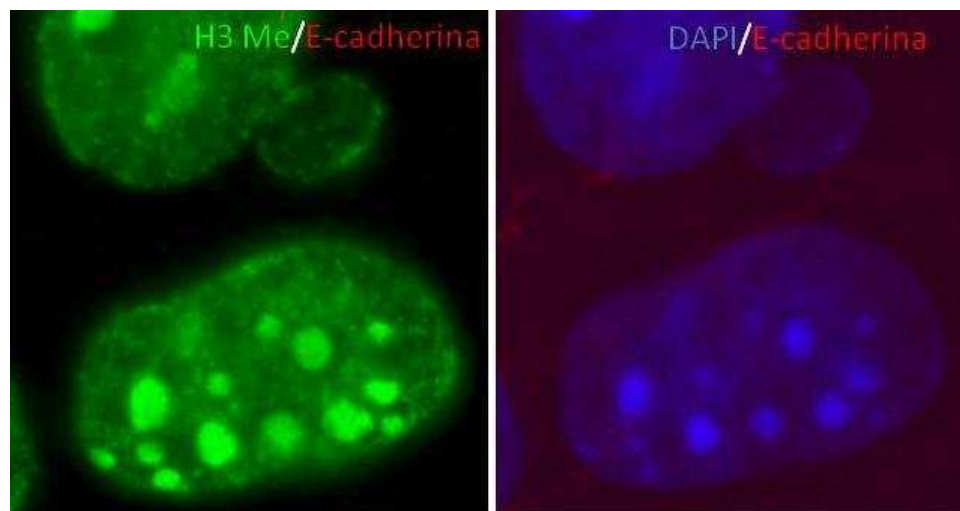


Figura R.4.2. Acetilación de lisinas 14 y 23 de la histona H3. Las células EpCAM (+) presentan un patrón de tinción difuso preferentemente asociado a zonas eucromáticas y ausente en regiones heterocromáticas como pueden observarse en el panel derecho correspondiente al mismo campo teñido con DAPI.

5. Purificación y cultivo de células troncales EpCAM (+)

Como se mencionó anteriormente, se realizaron un total de diez experimentos de aislamientos de células EpCAM (+) a partir de la suspensión de células obtenida de los hígados fetales de 14,5 dpc. Las células EpCAM (+) purificadas usando perlas magnéticas se cultivaron bajo diferentes condiciones que favorecían su proliferación y que al mismo tiempo mantenían su estado indiferenciado. En primer lugar se utilizó un medio de cultivo E-de Williams suplementado, diseñado especialmente para el crecimiento in vitro de hepatocitos (ver materiales y métodos). En estas condiciones las células EpCAM (+) no fueron capaces de proliferar en cultivo. En segundo término, se emplearon medios condicionados de hepatocitos fetales y de adultos, como así también co-cultivo de las células EpCAM (+) con explantos de hígado fetal de 14,5 dpc y con hepatocitos fetales, en este último caso mediante el uso de insertos de cultivo. Estas estrategias permitieron, en el mejor de los casos, mantener viables a las células EpCAM (+) por sólo 24hs. Dado estos resultados, se decidió utilizar el medio de cultivo RPMI suplementado y facilitar el anclaje de las células al sustrato mediante cultivo tridimensional tanto en gel de fibrina como en esferas de alginato que resultaron infructuosos para el establecimiento de cultivos in vitro de las células EpCAM (+). La cobertura de la superficie de cultivo con colágeno tipo IV permitió aumentar la adherencia de las células al sustrato y mantenerlas viables. Utilizando este método se observó que este tipo celular crece in vitro formando colonias compactas de células pequeñas con morfología epitelial (Figura R.6.1). Además se determinó, mediante el recuento celular periódico, que en nuestras manos al igual que en el caso de las LSPC de ratas, la capacidad proliferativa de las células EpCAM (+) aisladas es limitada; sólo se pudieron mantener en cultivo por un período no mayor 10 días.

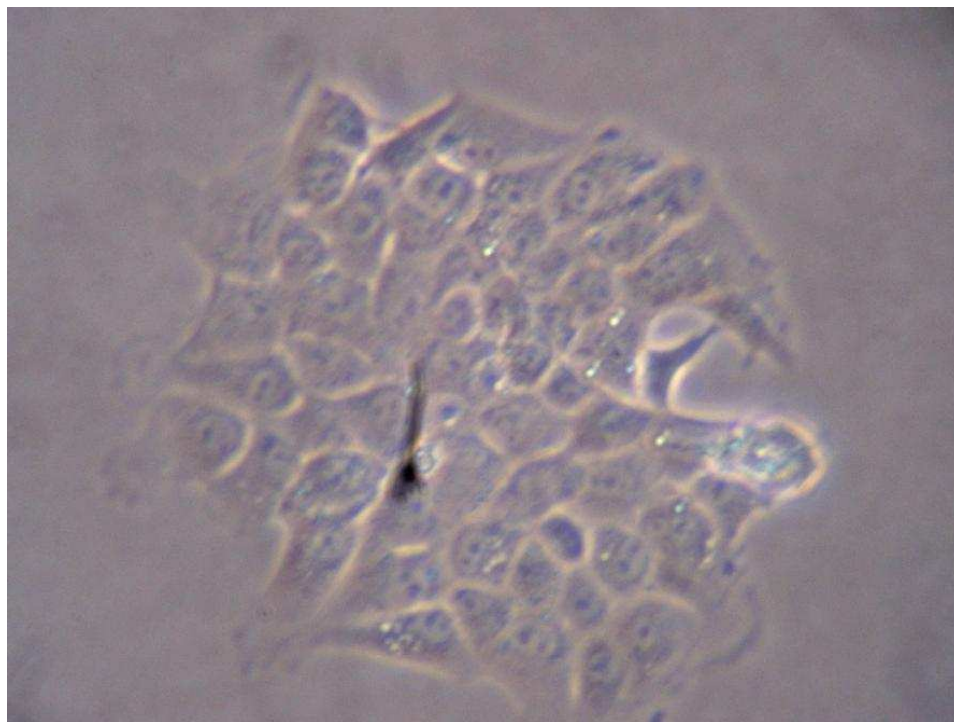


Figura R.5.1.Colonia de células EpCAM (+) cultivadas durante 72hs. Aumento 200x.

6. Trasplante de células EpCAM (+)

Con el objetivo de evaluar la capacidad de las células de la subpoblación EpCAM (+) de anidar en el hígado de ratones sanos se realizaron trasplantes intraesplénicos de células EpCAM (+) marcadas con CFSE como trazador (Figura R.6.1). Se inyectaron $2 \cdot 10^5$ células y se mantuvo a los animales bajo estricta vigilancia. Sólo se produjo la muerte

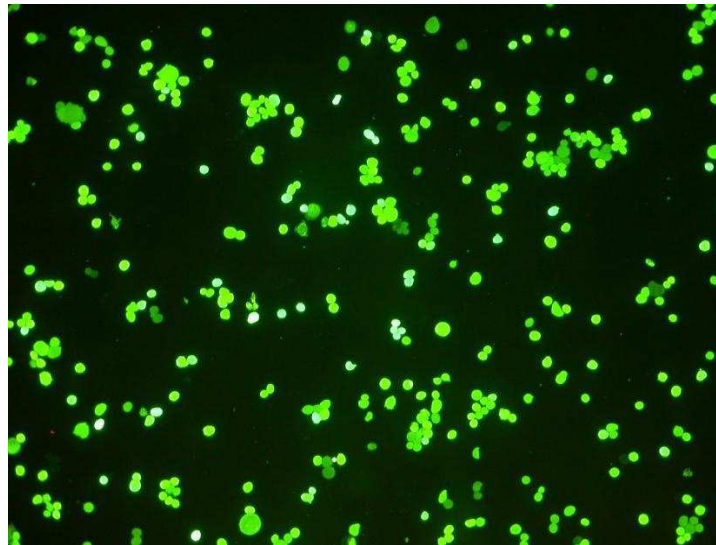


Figura R.6.1. Trasplante de células EpCAM (+). a) Las células fueron marcadas con CFSE antes del trasplante. Aumento 400x.

en uno de los ratones trasplantados, dentro de las 24hs luego del trasplante, debido a una hemorragia interna producida probablemente por una manipulación incorrecta del bazo durante la inyección de células. A excepción de este caso, los ratones se encontraban en óptimas condiciones de vitalidad al momento del sacrificio y no podían ser diferenciados en su comportamiento de los ratones control. La observación directa de los cortes histológicos bajo el microscopio de fluorescencia reveló que 24 hs luego del trasplante, las células EpCAM (+) marcadas con CFSE habían anidado en el bazo. Las células marcadas con CFSE adquirieron una disposición característica formando anillos alrededor de la pulpa blanca del tejido esplénico (Figura R.6.2). Sin embargo, no se detectaron células marcadas con CFSE en el hígado después de 24hs post-trasplante. El

examen de las preparaciones histológicas realizadas con órganos de animales extraídos 48hs después del trasplante intraesplénico, reveló que las células marcadas anidaron en el parénquima hepático, más precisamente alrededor de los vasos hepáticos (Figura R.6.3).

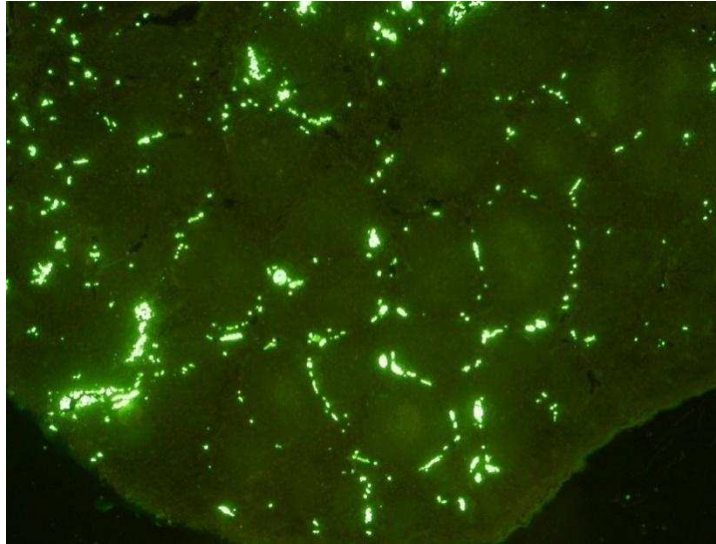


Figura R.6.2. Trasplante de células EpCAM (+). 24hs luego del trasplante se identificaron células marcadas en el bazo formando anillos alrededor de la pulpa blanca. Aumento 200x.

Adicionalmente se realizaron preparaciones histológicas con los pulmones de los ratones trasplantados con el objetivo de identificar células marcadas con CFSE en este tejido. Se analizaron preparaciones histológicas obtenidas a partir de 6 pulmones (3 provenientes de 24hs post-trasplante y 3 de 48hs post-trasplante) y en ningún caso se detectaron células marcadas en este tejido (figuras no mostradas).

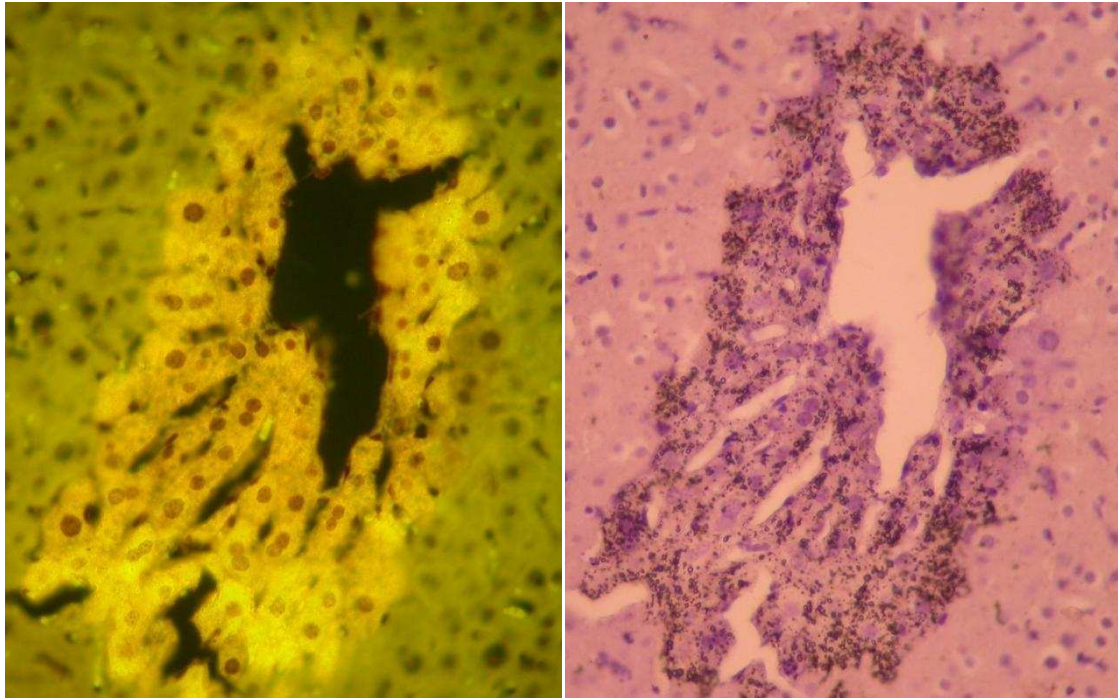


Figura R.6.3. Células EpCAM (+) en el parénquima hepático, 48Hs luego del trasplante. El mismo campo fue observado mediante fluorescencia (izquierda) y campo claro, con hematoxilina como contracoloración. Aumento 200x.

Discusión

Células troncales hepáticas de ratas

El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar una población de células troncales tejido específicas. Utilizando técnicas de biología celular y molecular se pudo develar algunas de las características estructurales sobre las que subyacen las capacidades funcionales de las células troncales.

El modelo elegido para estudiar las células troncales tejido-específicas fue el hígado, un órgano responsable de una variedad de funciones bioquímicas que permiten mantener la homeostasis del organismo. Su ubicación, interpuesto entre el aparato digestivo y el resto del cuerpo, y su afluencia de sangre hacen que el hígado reciba una gran variedad de endobióticos y xenobióticos, que incluyen desde nutrientes hasta toxinas. Esta posición como una suerte de barrera que media entre lo que ingresa al organismo por el tubo digestivo y el aparato circulatorio fue, tal vez, lo que hizo que el hígado desarrolle evolutivamente una notable capacidad regenerativa. Las LSPC son capaces de participar en los procesos de regeneración del hígado, que siguen a un daño hepático severo, durante toda la vida del individuo. Por tal motivo, el conocimiento de su biología es sumamente importante, y podría tener derivaciones de gran utilidad en el campo de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa.

Para poder caracterizar a las LSPC fue necesario desarrollar un protocolo para su aislamiento. En la bibliografía existen numerosas publicaciones en las que se describen métodos para el aislamiento de células ovas (derivadas de las LSPC) luego de la inducción de daño hepático masivo, ya sea por hepatectomías parciales reiteradas, y/o por el uso de tóxicos que inhiben la proliferación de los hepatocitos maduros al mismo tiempo que se genera un daño hepático ^{109,197,198} (Figura I.5). Debido a que nuestro

objetivo se centró en aislar y caracterizar LSPC en su estado fisiológico natural, decidimos no utilizar los protocolos antes mencionados porque consideramos que la inducción de un daño hepático severo y sostenido en el tiempo desencadena cambios sustanciales en las LSPC ¹⁹⁹. En primer lugar, se utilizó un modelo de fetos de ratas, asumiendo (luego corroborado por otros autores ¹⁴⁷) que las LSPC representarían una mayor proporción de las células totales en el hígado fetal y por lo tanto se aumentaría la eficiencia del procedimiento de aislamiento. Las células troncales hemopoyéticas y las LSPC, tienen una notable capacidad proliferativa dada su condición de células troncales, compartiendo además algunos marcadores de membrana ¹³⁵. Por lo tanto, y considerando que el hígado fetal es un órgano hemopoyético en las primeras etapas de su ontogenia ^{98,99}, se vuelve imprescindible separar ambas poblaciones. La primera estrategia fue determinar la extensión temporal de la etapa hepática de la hemopoyesis en embriones de ratones. Con los resultados de estos experimentos (Figura R.2.2) y los de otros investigadores ²⁰⁰, pudimos determinar que entre 18 y 20 días de gestación la población de células hemopoyéticas en el hígado comienza a decrecer, y se produce un aumento en la proporción de células hepáticas.

Por otra parte, la purificación por centrifugación en un gradiente discontinuo de Percoll, utilizada para separar células según sus diferentes densidades, y el cultivo en un medio especialmente formulado para el mantenimiento de células hepáticas, nos permitió obtener células hepáticas libres de progenitoras hemopoyéticas (Figura R.1.2b).

Con el protocolo que aplicamos obtuvimos dos fracciones disjuntas para los marcadores utilizados, que denominamos:

- a) Fracción hemopoyética (FHM) que contenía células Hem (+)
- b) Fracción hepática (FHP) que contenía células Hep (+) sin células Hem (+).

Se obtuvieron células positivas para los marcadores de células ovals OC2 y OC3, tanto en la suspensión de células totales como también en la FHP, ambas cultivadas durante cuatro días. Es interesante destacar que en la FHP cultivada y sólo en esta fracción se observó el desarrollo de otro tipo celular, las llamadas células “tipo oval”, ubicadas alrededor de las células ovals, formando colonias, pero de menor tamaño y con morfología similar a ellas. A pesar de ser muy semejantes a las ovals, estas células “tipo oval” no expresaban los marcadores OC2 y OC3. Las células “tipo oval” aisladas pertenecerían al compartimiento de las células ovals y creemos que se trata de células que aún no han alcanzado el estadio en el cual expresan estos marcadores. Alternativamente, estas células estarían en un estadio de diferenciación más avanzado en el que ya no expresan estos marcadores. Hixson y colaboradores, estudiando la organogénesis hepática, relacionaron la aparición del marcador OC2 in vivo, con un fenotipo migratorio de células troncales hepáticas tempranas, antes de la aparición de los ductos biliares. Estos autores observaron que estas células perdían el marcador antes de tomar contacto con el mesénquima portal, hecho que las compromete a convertirse en células ductales biliares ¹⁹⁰. Esto explicaría la activación/desactivación del marcador OC2 en células con fenotipos de transición in vivo. La aparición in vitro de células OC2 (-) formando colonias rodeando a las células OC2 (+) y que derivarían de ellas durante el cultivo, se explicaría similarmente por cambios fenotípicos como resultado de las condiciones de cultivo, particularmente por el uso de HGF como suplemento del medio de cultivo ¹⁹⁰.

El aumento diferencial en el número de células “tipo oval” hallado durante el período de cultivo ensayado (4 días) en presencia de HGF, estaría indicando un efecto estimulador de dicho factor de crecimiento. El HGF fue descubierto en estudios de regeneración hepática, a través de su participación en numerosos caminos de

señalización, favoreciendo la activación de las células troncales hepáticas y la proliferación de las células ovals. En condiciones patológicas su concentración plasmática se incrementa de 15 a 25 veces²⁰¹. También en pacientes en falla hepática fulminante, los niveles sanguíneos de HGF están incrementados, indicando un importante papel de este factor de crecimiento en la regeneración hepática. Es decir, la utilización de HGF en el cultivo in vitro podría asemejar al microambiente que se genera en el hígado con posterioridad a un daño. Aunque estas células “tipo oval” pudieron ser amplificadas significativamente durante el cultivo en presencia de HGF, no pudieron ser propagadas cuando las colonias fueron separadas del medio ambiente de siembra original, en el que muy probablemente coexistían varias poblaciones celulares. Esto indicaría que tanto las células ovals (Figuras 1.3; 1.5; 1.6b) como las “tipo oval” requieren la presencia de señales parácrinas provenientes de la población mixta, siendo éste un factor crítico para la supervivencia celular²⁰². Esto sustenta el concepto de nicho como compartimiento heterogéneo de poblaciones celulares que actúa de reservorio y sostén de las células troncales^{22,203}, se volverá sobre este tema más adelante.

Células troncales hepáticas de ratón

Los experimentos preliminares con embriones de rata fueron fundamentales como ensayo de factibilidad para obtener LSPC sin generar daño hepático. A pesar de esto, el modelo de rata para obtener LSPC presentaba limitaciones importantes, por ejemplo los anticuerpos anti-OC2 y -OC3 no están disponibles comercialmente. Estos fueron desarrollados por Hixson y colaboradores²⁰⁴, quienes gentilmente nos cedieron una alícuota para nuestras investigaciones. Sin embargo, la cantidad de anticuerpos con la que contábamos no nos permitía desarrollar todos los experimentos planificados. Además, en el mercado no se encontraban otros anticuerpos comerciales para identificar

LSPC. Tanto OV6, OV1 como A6 son, al igual que OC2 y OC3, anticuerpos generados por laboratorios de investigación. Ante la imposibilidad técnica y económica de generar nuestros propios anticuerpos para rata, decidimos volcar la experiencia obtenida con el modelo en rata a un modelo de ratón. Al mismo tiempo, a finales de 2006, hubo un gran avance en el campo de las células troncales hepáticas, que estuvo relacionado con la identificación de EpCAM como marcador de LSPC en humanos ¹⁴⁷. En ese momento, existían comercialmente anticuerpos anti-EpCAM de ratones y todos los desarrollos en este campo indicaban que este modelo animal sería el más adecuado para avanzar en el estudio de las LSPC. La incorporación de anticuerpos comerciales nos permitió además, la utilización del sistema MACS para el aislamiento de células.

Para el protocolo de aislamiento a partir de hígados de ratones utilizamos fetos de 14,5 dpc que corresponde al tiempo medio del desarrollo del hígado durante la gestación ^{2,205}. El sistema de aislamiento de las LSPC fue el dispositivo MACS que permite un aislamiento mucho más específico debido a que se basa en características biológicas de las células (expresión de EpCAM) y no en características físicas (densidad).

La expresión de AFP es característica de las células hepáticas fetales, encontrándose en aproximadamente el 60% de las células aisladas de hígado fetal de ratón de 14,5 dpc (Figura R.2.3). Por otro lado, y como se muestra en la Figura R.3.3, las células aisladas mediante MACS y anticuerpos anti-EpCAM expresaron dos veces más cantidad de mRNA de AFP que las células EpCAM (-). Originalmente los trabajos con esta proteína estuvieron orientados a elucidar la relación entre su expresión y el desarrollo del HCC ^{107,108}. Si bien es cierto que hoy en día AFP es uno de los marcadores moleculares más utilizados para la detección temprana del carcinoma hepatocelular ⁷⁴, es aún muy poco lo que se conoce sobre su función biológica, en particular durante el desarrollo embrionario ¹⁰⁸. Se sabe que AFP es una proteína inmunosupresora que protege al feto

de la reacción inmune de la madre ²⁰⁶, participando en el proceso de inmunotolerancia durante el periodo embrionario, y también que mediante una unión a estrógeno previene la masculinización de cerebro femenino en desarrollo ²⁰⁷⁻²⁰⁹. El papel de AFP en el transporte de ácidos grasos vitales hacia las neuronas fetales en el cerebro en desarrollo es quizás una de las funciones mejor estudiadas. Debido a que los ácidos grasos son necesarios para la mielinización, AFP fue propuesta como esencial para este proceso ²¹⁰. Uriel y colaboradores propusieron que la unión y el transporte de ácidos grasos poliinsaturados por AFP podría explicar la presencia de esta proteína fetal en el sistema nervioso en desarrollo ²¹⁰. En efecto, AFP humana es capaz de facilitar y regular la entrada de ácidos grasos, en especial ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido araquidónico (AA), dentro de las células en pleno crecimiento y diferenciación ^{211,212}. Se observó que la AFP humana une entre el 16 y el 42% del DHA presente en el contenido total de ácidos grasos, mientras que la ALB fetal sólo une el 4% ^{211,213,214}. En hepatocitos fetales de ratas se ha observado que AFP in vitro aumenta la conversión intracelular de ácidos grasos saturados a insaturados ^{215,216}. Como ya se ha mencionado, la expresión de AFP caracteriza a la subpoblación de hepatoblastos, y teniendo en cuenta que durante el desarrollo hepático la producción y liberación al torrente sanguíneo de AFP es manifiesta, se podría interpretar que AFP podría mejorar el transporte y la recaptación de ácidos grasos indispensables durante el desarrollo de hígado.

Estudios sobre la espermatogénesis en un modelo de criptorquidia inducido experimentalmente (EC) permitieron descubrir que el nivel de expresión de AFP aumenta en los testículos de los ratones adultos tratados ²¹⁷, mientras que, por otro lado, la proteína bloquea la espermatogénesis en ratones normales, cuando es inyectada en los tubos seminíferos. Interesantemente, cuando animales de este modelo murino EC fueron

sometidos a una hepatectomía parcial (resección de menos del 30% del volumen total de hígado), se demostró que el proceso de regeneración hepática sufre una dilación respecto de los ratones control. Yazama F y Tai A, los autores de estas investigaciones, concluyen que AFP regula la regeneración hepática a través de la inhibición de la proliferación de hepatocitos ²¹⁷. Según Lola Reid y colaboradores la expresión de AFP en células hepáticas fetales humanas divide la clasificación de las LSPC entre células troncales hepáticas propiamente dichas y hepatoblastos, es decir células progenitoras hepáticas que provienen de la diferenciación de las anteriores ¹⁴⁷ (Figura I.7). Sin embargo, de acuerdo a nuestro diseño experimental, ambas subpoblaciones se agrupan por su capacidad de expresar EpCAM. Por otra parte, Thorgeirsson y colaboradores demostraron que la administración de AAF combinada con una hepatectomía parcial (el modelo clásico de inducción de la proliferación de células ovals) causa una severa perturbación en la expresión de AFP en el hígado de ratas adultas, lo que resulta en una hipoalbuminemia y una acumulación de fluido en las cavidades corporales ²¹⁸. En este caso el papel de las LSPC (células ovals según estos autores) sería la producción de AFP para regular el equilibrio osmótico de la sangre durante la regeneración hepática

110 .

En resumen, podemos decir que la expresión de AFP durante el desarrollo hepático estaría relacionada con su función en el transporte de ácidos grasos y en el adulto sería la de mantener el equilibrio osmótico de la sangre y conferir a las LSPC, a través de la inhibición de la proliferación de los hepatocitos, una ventaja adaptativa para poblar el hígado luego de un daño reiterado o grave. Asimismo, a pesar de que se han postulado varias funciones para AFP, la parte más fascinante del problema de por qué existe una proteína del suero que está asociada específicamente a la vida fetal, conservada entre tantas especies, aún queda por ser resuelto. El ejemplo de AFP es una muestra cabal de

que los llamados marcadores que son utilizados para identificar a los distintos tipos celulares son, más allá de simples etiquetas que portan las células, moléculas indispensables para el desarrollo o mantenimiento de las características propias de cada tipo celular que han sido talladas a medida por millones de años de evolución.

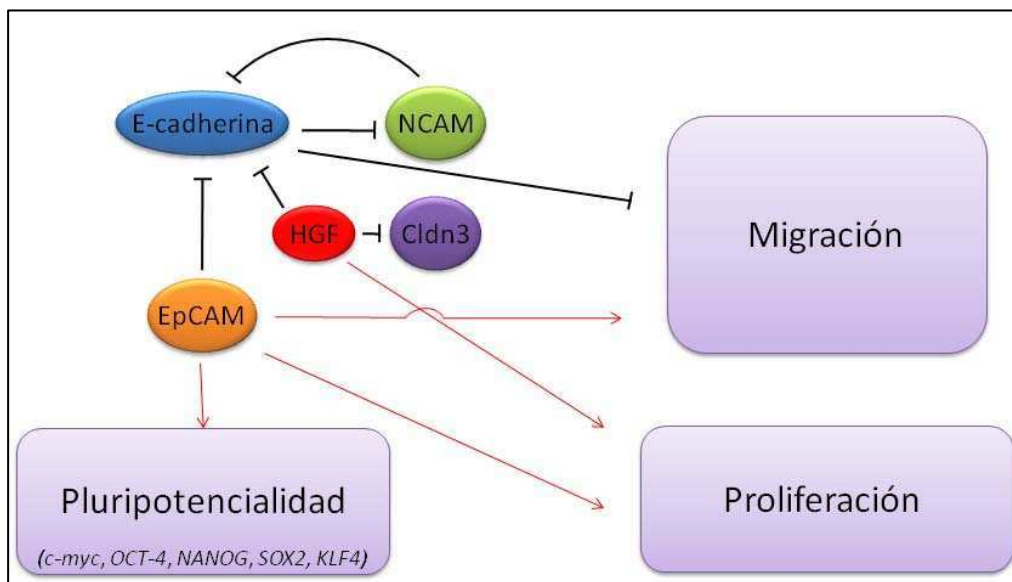


Figura D.1. Esquema de representativo de la relación de EpCAM con los procesos de migración, proliferación y pluripotencialidad.

En este trabajo se eligió a la proteína EpCAM como criterio de selección de una subpoblación de células troncales. Hasta 2004 no se tenían datos acerca de la expresión de EpCAM en células hepáticas murinas, por lo tanto en un principio esta elección estuvo basada en los resultados en humanos de otros autores ¹⁴⁷. Sin embargo el desarrollo de las investigaciones confirió sustento experimental a la hipótesis de trabajo. Como ya mencionamos, EpCAM es una molécula de adhesión que forma uniones homofílicas ^{148,149}, pero su rol en las células que lo expresan es mucho más amplio. EpCAM se encuentra en el medio de un complejo sistema que regula distintas funciones celulares (Figura D.1). Por un lado, existen evidencias que la expresión de EpCAM en la membrana celular desplaza la unión mediada por E-cadherinas, a través de la activación de la enzima fosfatidil-inositol-3-kinasa (Pi3K) ^{219,220}. Por otro lado, se ha mostrado que

la expresión de EpCAM regula positivamente la expresión del proto-oncogén c-Myc¹⁵² y de la ciclina D1²²¹ e induce la proliferación. Así mismo, la inhibición de EpCAM por ARN de interferencia (ARNi) produce una inhibición de la proliferación, migración e invasión in vitro en líneas celulares derivadas de HCC y cáncer de mama^{222 151}. Durante la proliferación y la migración, la unión intercelular fuerte mediada por E-cadherinas es anulada (vía Pi3K) y prevalece la unión más débil mediada por EpCAM²²⁰. Como demostramos previamente, el cultivo de MLP29 con HGF desencadena migración celular produciendo una baja en la expresión de E-cadherina y aumentando la expresión de EpCAM¹⁸⁴. Este fenómeno de cambio de moléculas de adhesión es un aspecto del proceso de transición epitelial-mesenquimal (EMT), el cual ha sido propuesto que ocurre durante el desarrollo embrionario y la progresión metastática de los tumores, que consiste en la pérdida de la polaridad característica de las células epiteliales (desensamblando sus uniones célula-célula) y adoptado un fenotipo migratorio²²³. La unión de HGF a su receptor induce la transcripción del represor de la transcripción Snail, el cual se une a la región promotora de los genes de E-cadherina y Cldn3 reprimiendo su transcripción²²⁴. A su vez, la actividad de Snail está regulada por la enzima glicógeno-sintetasa-3 β (GSK-3 β) la cual provee la señal de exportación nuclear de este represor para ser degradado vía proteosoma²²⁴. La vía de señalización de Wnt- β -catenina es muy importante en la activación y mantenimiento de las LSPC. Al menos en HCC, se observó que esta vía regula la expresión de EpCAM²²². Además el dominio intracelular de EpCAM es capaz de unirse a β -catenina y translocar al núcleo para actuar en un complejo transcripcional que induce entre otros a c-Myc y ciclinas¹⁸³. En ESC humanas se ha reportado que el dominio intracelular de EpCAM induce la expresión no sólo de c-Myc, sino también de OCT-4, NANOG, SOX2 y KLF4 sugiriendo que EpCAM es un excelente marcador para aislar hESC indiferenciadas²²⁵, así como

también células pluripotentes inducidas ²²⁶, jugando un papel clave en el mantenimiento de la pluripotencialidad ^{225,226}. Nuestros resultados sobre la caracterización del perfil de expresión de EpCAM (utilizando inmunofluorescencia) indican que en el hígado fetal de ratones de 14,5 dpc entre el 12 y el 15% de las células nucleadas son EpCAM (+) (Figura R.2.7). Estos resultados fueron corroborados mediante citometría de flujo, con la cual se demostró de manera más precisa que el 16,92 % de células del hígado fetal son EpCAM (+) (Figura R.2.8). Estos datos son concordantes con los obtenidos por otros grupos que trabajaron con hígados de fetos humanos de 16-20 semanas de gestación ¹³. A principios de la década del 2000, Azuma y colaboradores desarrollaron un método para aislar progenitores hepáticos a partir de ratones adultos, utilizando su capacidad de adhesión célula-célula dependiente de cadherinas ²⁶, mediante un procedimiento que incluye el cultivo preliminar de la suspensión celular total en un medio que contiene Ca^{2+} , en condiciones de hipoxia y con agitación constante durante dos horas. Con este tratamiento se eliminan casi en su totalidad los hepatocitos maduros dado que son más sensibles a la isquemia y se favorece la formación de agregados de células progenitoras. Estos autores demostraron la presencia de sólo un 5% a células epiteliales pequeñas con alta capacidad proliferativa dentro de estos agregados, y que fueron capaces de formar colonias que expresaban AFP, ALB y E-cadherina, pero no expresaban CK19 ni VE-cadherina ²²⁷. Suzuki y colaboradores utilizaron citometría de flujo para separar (FACS) una subpoblación de células progenitoras hepáticas ($\text{c-Met}^+ / \text{CD49f}^{+/bajo} / \text{c-kit}^- / \text{CD45}^- / \text{TER119}^-$) de hígados fetales de ratones Balb/cA de 13,5 dpc ^{94,140}. Mediante ensayos de formación de colonias in vitro, sobre placas recubiertas de laminina, mostraron la capacidad clonogénica y la multipotencialidad de esta subpoblación, que expresaba ALB, AFP y CK19, entre otras proteínas. Por otro lado, Minguet y colaboradores demostraron que subpoblaciones $\text{c-Kit}^{bajo} / \text{CD45}^- / \text{TER119}^-$

de células progenitoras hepáticas aisladas mediante FACS a partir de hígado de fetos de 11 dpc, tienen la capacidad de formar colonias in vitro en las que el 28% de las células expresaban tanto ALB como CK19¹⁰¹. Como ya mencionamos en la introducción, en 2003 el grupo de Miyajima logró identificar a Dlk-1 como un marcador de precursores hepáticos (hepatoblastos, según los autores), utilizando una librería de cDNA confeccionada a partir de la subpoblación CD45⁻ / TER119⁻ obtenida de hígados fetales de ratón de 14,5 dpc y técnicas de biología molecular, que les permitían aislar la secuencia de proteínas ancladas a membrana expresadas diferencialmente¹²⁵. Luego, utilizando FACS conjuntamente con una variante automatizada de MACS (AutoMACS) para enriquecer la suspensión en células Dlk-1 (+), obtuvieron una subpoblación capaz de formar colonias in vitro, de las cuales más del 60% expresaban tanto ALB como AFP. Esto significó un cambio muy importante respecto de la tecnología para el aislamiento y caracterización de células progenitoras hepáticas ya que se pasó de utilizar FACS multiparamétricos para eliminar los precursores hemopoyéticos de la suspensión aislada del hígado fetal c-kit⁻ / CD45⁻ / TER119⁻ a utilizar marcadores propios para hacer una selección positiva de la subpoblación de interés. Otros autores utilizaron la expresión de E-cadherina como criterio de separación de las células progenitoras hepáticas a partir de fetos de 12,5 dpc, si bien en ambos trabajos se obtuvieron subpoblaciones que coexpresaban E-cadherina, ALB y AFP^{143,228}. Nitou y colaboradores encontraron que estas subpoblaciones también expresaban CK19²²⁸, mientras que Nierhoff y su equipo hallaron que no expresaban CK19, pero si Liv2 y Dlk-1¹⁴³. La revisión de estos abordajes experimentales nos permitió no sólo conocer cómo evolucionaron los desarrollos tecnológicos enfocados en el aislamiento de LSPC, sino también diseñar un método de aislamiento de LSPC rápido, económico y sencillo. Además, el protocolo desarrollado para aislar LSPC EpCAM (+), mediante el sistema

MACS, puede ser realizado a mayor escala con el objeto de obtener un mayor número de células, con una eficiencia de aproximadamente un 5 % de LSPC. Este dato puede compararse con la eficiencia obtenida por Azuma y colaboradores quienes obtuvieron alrededor de un 0,5% de células progenitoras ²⁶, o la de Suzuki y colaboradores quienes obtuvieron un 5,05% (para la subpoblación c-kit⁺/ CD45⁺/ TER119⁻) ^{94,140}. Esto permite afirmar que nuestro método de aislamiento utilizando MACS presenta una eficiencia tan alta como los que utilizan FACS, a un costo notablemente menor.

Con el objeto de estudiar más detalladamente el perfil de marcadores presente en las LSPC aisladas, se realizó inmunofluorescencia indirecta con una batería de anticuerpos que incluye Thy-1, CK19, AFP y E-Cadherina. Tanto las LSPC aisladas de hígado fetal de rata como de ratón exhibieron coexpresión de Thy-1 conjuntamente a EpCAM (Figura R.1.4 y 4.1a). Thy-1 es una proteína de 25–37 kDa asociada con el linaje mesenquimal/hematopoyético, que está involucrada en la activación de células T, apoptosis, cicatrización y fibrosis. La proporción de células Thy-1 (+) detectada en la FHP obtenida de hígados fetales de ratas y cultivada durante 4 días fue muy baja. Sin embargo estas células Thy-1 (+) presentaron marcación para OC2, demostrando el carácter troncal de la población celular aislada. Por otra parte, la totalidad de células EpCAM (+) obtenida a partir de hígados de ratones expresaron Thy-1. La expresión de un marcador de linaje mesenquimal/hematopoyético resulta intrigante, aunque ha sido demostrado que células que expresan el marcador Thy-1 están presentes en el nicho de las LSPC in vivo. Yovchev y colaboradores hallaron una población de células mesenquimales activadas después de un daño hepático ¹⁹¹. Cabe mencionar que también están presentes en el hígado normal, son diferentes de las células estrelladas hepáticas, miofibroblastos y ovales residentes. Según estos autores las células Thy-1 (+) tienen la capacidad de producir señales inductivas y factores de crecimiento dentro del nicho que

son indispensables para el mantenimiento y la función de la población de LSPC ¹⁹¹. Otros autores han mostrado que en el hígado fetal humano (de entre 15 y 25 semanas de gestación) existe una subpoblación de células EpCAM (+)/ Thy-1 (+) / CD45 (+) ^{229,230}. Nuestros propios resultados de citometría de flujo sobre las células hepáticas fetales de ratón muestran que aproximadamente un 12% del total de las células coexpresan el marcador pan-linfocitario CD45 y las proteínas características de células epiteliales EpCAM y E-cadherina (Figura R.2.8). Incluso la línea celular MLP29 presenta células que coexpresan CD45 (Tabla R.2.1) y una robusta expresión de otro marcador de células mesenquimales, CD133 (Figura R.3.5), el cual se expresa débilmente en las células EpCAM (+). Aunque otros autores sostienen que las LSPC no expresan CD45 ¹³, nuestros resultados muestran claramente la existencia de una subpoblación de células que coexpresan marcadores de origen mesenquimal (CD45, Thy1, CD133) y epitelial (EpCAM, E-Cadherina). Células con un fenotipo dual epitelial-mesenquimal (es decir en EMT), fueron descritas estudiando el estroma donde se desarrollan las células hemopoyéticas del hígado fetal ²³¹. Los procesos relacionados con la EMT en el hígado fetal remontan a su génesis cuando las células del dominio anterior-ventral del endodermo del intestino anterior migran formando el brote hepático ^{2,59}. Si bien son necesarios más experimentos para determinar la clonogenicidad y bipotencialidad de nuestra población de LSPC EpCAM (+), podemos sugerir que en el hígado fetal las poblaciones de células hepáticas son distintas de las células hemopoyéticas pero están muy relacionadas. En este sentido, un trabajo publicado recientemente va mucho más allá: estudiando la subpoblación CD34^{bajo} / CD133^{bajo} en el hígado fetal humano, los autores proponen que las células hemopoyéticas y las células hepáticas se originarían de un mismo precursor en el hígado fetal ²³².

Expresión génica en células troncales hepáticas de ratón

Se determinó, mediante RT-PCR semi-cuantitativa, el estado transcripcional del gen EpCAM en las células aisladas EpCAM (+) lo cual permitió corroborar efectivamente los resultados obtenidos mediante microscopía (Figura R.3.2). Inclusive el nivel de expresión de este gen fue similar al de la línea celular MLP29 derivada de progenitores hepáticos. Adicionalmente se midió el nivel de mRNA de los genes AFP y CK19, y los resultados también fueron concordantes con los obtenidos mediante inmunofenotipado. Comparando los perfiles de expresión de la línea celular MLP29 y las células EpCAM (+), observamos que las células de la línea MLP29 tienen un perfil de célula troncal (CD 133^{alto}, EpCAM^{alto}, Cldn3^{medio}) con una cierta inclinación hacia el linaje biliar (CK19^{muy alto}, AFP^{bajo}); mientras que las células EpCAM (+) exhiben un perfil de célula troncal hepática (EpCAM, Dlk-1^{alto}, Cldn3^{alto}) con carácter bipotencial (CK19^{medio}, AFP^{alto})²⁶.

La característica más sobresaliente de esta subpoblación de células EpCAM (+), es la robusta expresión de Cldn3 (Figura R.3.6) y Dlk-1 (Figura R.3.7). Claudina (Cldn) es una familia de proteínas de transmembrana que forma parte de la unión estrecha intercelular (zonula occludens)²³³. Aunque proveniente del campo de la oncología, un cúmulo de evidencias apoya la noción que existe una relación funcional entre EpCAM y Cldn3. Estudios de expresión de genes por microarrays demostraron que la transcripción de estos genes se encuentra aumentada en tumores del epitelio ovárico²³⁴, mientras que mediante inmunohistoquímica se corroboró esta sobreexpresión a nivel de las proteínas. También se demostró la existencia de interacción física entre EpCAM y miembros de esta familia de proteínas en células tumorales. En efecto, la formación de complejos intracelulares entre EpCAM, Cldn7, isoforma variante 6 de CD44 (CD44v6) y tetraspaninas es un hallazgo frecuente en muestras de tumores primarios y metástasis

hepáticas de cáncer de colon humano ²³⁵, y en líneas celulares de carcinoma pancreático de rata ²³⁶. Más aún, los datos obtenidos mediante estas investigaciones indican que Cldn7 es la que recluta a EpCAM hacia los microdominios de membrana ricos en tetraspaninas y que esta unión promueve la resistencia a la apoptosis²³⁵. Así mismo, Cldn7 interfiere en la oligomerización de EpCAM, necesaria para su actividad como proteína de unión ¹⁴⁹, afectando la adhesión célula-célula mediada por EpCAM e incrementando consecuentemente la movilidad celular e incluso promoviendo la migración ²³⁷. Aunque el mecanismo aún no está completamente elucidado, la formación del complejo EpCAM-Cldn7 también acelera la progresión del ciclo celular en líneas celulares ²³⁷. Está ampliamente aceptado que los tumores sólidos contienen células troncales cancerosas (CSC, del inglés Cancer Stem Cells) como una subpoblación celular, las cuales son responsables de las recidivas y metástasis de los tumores debido a su capacidad de autorrenovación y proliferación, compartida con las células troncales normales y también por su resistencia a las terapias antitumorales habituales ²³⁸. Si bien los datos experimentales obtenidos no permiten afirmar que las CSC presentes en carcinomas hepatocelulares serían LSPC similares a las aisladas durante el desarrollo del presente trabajo, la similitud en el perfil de expresión de estos genes en estos dos tipos celulares es remarcable.

La expresión en el hígado de algunas de las proteínas de la familia de las Claudinas varía con la edad de manera sustancial. Entre el primer y el sexto mes de vida de los ratones prevalece la expresión de Cldn3, la cual decae a niveles mínimos desde los 16 meses de vida, aunque, la expresión de Cldn7 en el hígado se mantiene constante durante toda la vida en los ratones ²³⁹. Los resultados experimentales obtenidos en el presente trabajo son consistentes con estas investigaciones, no sólo respecto del elevado nivel expresión Cldn3 en las LSPC aisladas de hígado de fetos de ratones (Figura R.3.6)

¹³, sino que aportan un dato nuevo sobre el nivel de expresión de Cldn3 durante el desarrollo embrionario. Inclusive, podemos trazar una relación entre el patrón de expresión de Cldn3 y la variación temporal en la cantidad de LSPC a lo largo de la vida del individuo ¹³. Finalmente, y en apoyo al concepto que Cldn3 constituye un marcador apropiado para el aislamiento e identificación de LSPC, Yovchev y colaboradores encontraron que LSPC de ratas obtenidas después de un tratamiento con AAF y posterior hepatectomía parcial, exhibían una expresión aumentada de EpCAM y Claudinas ²⁴⁰.

Dlk-1 también conocida como factor preadipocítico 1 (Pref-1), es una proteína que se expresa fuertemente en el hígado fetal de ratones entre 10,5 dpc y hasta 16,5 dpc, pero no en el hígado de adulto ^{125,143}. En ratas se ha encontrado que Dlk-1 (+) define una subpoblación particular en células ovals que proliferan luego de un daño hepático ^{241,242}. En el presente trabajo se encontró que la expresión de este gen en el compartimiento celular aislado EpCAM (+), es significativamente superior al nivel de expresión en células EpCAM (-). Estos resultados concuerdan con los de Tanaka y colaboradores, quienes propusieron que la coexpresión de Dlk-1 y EpCAM identifica a los hepatoblastos de ratones ²⁴³. Dlk-1 es una proteína de membrana tipo I que posee seis dominios tipo EGF y está implicada en la inhibición de la diferenciación de los adipocitos ^{244,245} y también de células troncales mesenquimales y células hemopoyéticas ²⁴⁶⁻²⁴⁹. Es tentador especular que la expresión aumentada de Dlk-1 en la población EpCAM (+) podría cumplir un papel similar en la mantención del carácter troncal de células del linaje hepático, sobre todo teniendo en cuenta que la expresión de este gen juega un papel muy importante para el mantenimiento de la clonogenicidad y la capacidad de proliferación, en CSC de carcinomas hepatocelulares ²⁵⁰.

Interesantemente, la transcripción de Dlk-1 es monoalélica, sólo el alelo paterno se expresa ²⁵¹. Dado este mecanismo de regulación de la expresión génica, investigamos el perfil de expresión in situ de Dlk-1 en la subpoblación de células EpCAM (+). Por medio de la técnica de ARN-FISH se pudo determinar que en las células LSPC EpCAM (+) la expresión de Dlk-1 es monoalélica, mientras que la del gen AFP (que no presenta impronta génica) es 60% monoalélica y 40% bialélica (Figura R.3.8). Esto indicaría que en las LSPC EpCAM (+) se mantiene el activo el mecanismo de expresión monoalélica del gen Dlk-1. En células iPS, el mantenimiento del imprinting en el locus Dlk-1-Dio3 parece ser fundamental para lograr la pluripotencialidad ²⁵². Por otro lado, también merece consideración el hecho que a pesar de observar una robusta expresión de Dlk-1 por PCR en tiempo real en la subpoblación EpCAM (+), la proporción de células con una señal positiva de Dlk-1 por ARN-FISH fue sólo del 5,6%. Creemos que esto puede explicarse por dos factores concurrentes: por un lado, que este bajo porcentaje no necesariamente significa que las células que no dieron señal para Dlk-1 no expresan el gen, sino que se debería a un proceso de transcripción no simultáneo en todas las LSPC; por otra parte, cuestiones metodológicas y de sensibilidad que diferencian ambos métodos podrían estar creando un sesgo que impide la comparación directa de los resultados.

El núcleo de las células eucariotas es una organela altamente organizada ²⁵³. En él pueden distinguirse dos regiones diferentes tanto desde el punto de vista estructural como funcional: un compartimiento de cromatina menos compacta en el que la actividad génica está permitida, caracterizada por la presencia de histonas H3 acetiladas en lisinas 14 y 23; y otro de heterocromatina más compacta y con muy baja actividad transcripcional, caracterizada por la presencia de histona H3 metilada en lisina 9. Además, los cromosomas y los genes están distribuidos de manera no aleatoria en el

espacio nuclear de células de plantas y animales ²⁵⁴. Esta organización espacial del núcleo en interfase es mantenida en gran medida por las secuencias repetitivas que abundan en el genoma, sobre todo en las regiones heterocromáticas adyacentes a los centrómeros y telómeros. En las células de ratones, uno de los aspectos más relevantes de la arquitectura nuclear es la agregación de los centrómeros de diferentes cromosomas en dominios denominados cromocentros ²⁵⁵.

Con objeto de investigar la relación entre la expresión de EpCAM y la organización del genoma a nivel global en células fetales hepáticas de 14,5 dpc, se realizó FISH con una mezcla de sondas que identifican los tipos predominantes de secuencias repetitivas pericentroméricas: ADN satélite mayor y menor. En este caso, las LSPC EpCAM (+) presentan una distribución homogénea (distribuidos en todo el volumen nuclear) de estas secuencias pericentroméricas, mientras que en las células EpCAM (-) la distribución es mas acotada, generalmente ubicados en un plano paralelo al sustrato (Figura R.4.2). Solovei y col. demostraron que los centrómeros de linfocitos humanos experimentan reposicionamiento desde el interior del núcleo hacia la periferia según las células se encuentren en el estadio G1 o S del ciclo celular. Mientras que en células completamente diferenciadas y que no se dividen, los centrómeros se encuentran agregados en la periferia del núcleo ²⁵⁶. Por el contrario en linfocitos de ratones los centrómeros tienen una localización periférica en G1 y más central en G2 ²⁵⁷.

Por otra parte, durante la progresión hacia un linaje determinado, los cambios celulares a nivel nuclear producen que las opciones de diferenciación de una célula sean gradualmente restringidas ²⁷. A nivel de la transcripción, esto se refleja en la reducción de la expresión de los genes asociados con otros linajes. La accesibilidad a diferentes genes de los complejos encargados de la transcripción se regula a través del estado de la cromatina por medio de cambios epigenéticos ^{29,43,258}. En efecto, los mecanismos

epigenéticos son un factor clave en el mantenimiento de la pluripotencialidad y en la diferenciación a distintos linajes ⁴⁴. La naturaleza condensada de la cromatina hace que el ADN sea menos accesible a los factores de transcripción y la activación de la transcripción de genes. La accesibilidad regulada a los genes parece ser una característica crítica en el estado de célula troncal. El llamado “modelo de inicio del multilíneaje” sugiere que las células troncales expresan niveles bajos de un gran número de genes que son expresados por sus distintas progenies ²⁵⁹. La base molecular de esta hipótesis es la presencia de una estructura de cromatina abierta caracterizada por la accesibilidad a los genes propios de linajes más diferenciados, la cual es cerrada progresivamente a medida que la diferenciación avanza, acompañada por una restricción sucesiva en el repertorio de genes que pueden ser expresados ^{260,261}. Esto implica que, a lo largo del curso de la diferenciación, el número de opciones de destino celular a disposición de la célula se hace cada vez más restringido, debido a que los genes propios del linaje seleccionado son activados y los genes asociados con otro linaje están apagados. Akashi y colaboradores realizaron una comparación de los perfiles de expresión de células hemopoyéticas en diferentes etapas de diferenciación, demostrando que las células troncales expresan un gran número de genes presentes los diferentes linajes hemopoyéticos específicos, mientras que los precursores comprometidos sólo expresan la porción de los genes que están relacionados con su linaje ²⁶². Además, las células troncales hemopoyéticas expresan un 70 % de genes “no-hemopoyéticos”, en particular genes neuronales. Una situación similar parece ser el caso en las ESC, que tienen la tendencia a adquirir una identidad neuronal y expresar genes específicos de varios linajes neuronales bajo condiciones normales de cultivo ²⁶³. La cromatina de las ESC posee diferentes características específicas, que la distinguen de la cromatina de las células somáticas y las células diferenciadas ⁴⁵. La heterocromatina de las ESC se

caracteriza por estar organizada en pocos dominios y de mayor tamaño, los cuales se convierten en más pequeños, más abundantes e hipercondensados a medida que las células se diferencian ^{258,264}. Otra característica de la cromatina de las ESC indiferenciadas es la unión más laxa e hiperdinámica de algunas proteínas estructurales de la cromatina, tales como HP1 (Heterochromatin Protein 1) e histona H1 ²⁶¹. Esta característica es encontrada exclusivamente en células pluripotentes, pero no en células comprometidas con un linaje pero indiferenciadas, lo que indicaría que esta característica está asociada a la pluripotencialidad más que a la indiferenciación en sí misma ²⁶¹. De la mano con esta hiperactividad transcripcional, se observó una sobreexpresión desproporcionada de factores de transcripción y proteínas remodeladoras que son claves para el mantenimiento de la cromatina en un estado relajado y contribuyen a la expresión global del genoma de las ESC ²⁶⁰. A esto se suma la observación de marcas cromatínicas bivalentes en regiones del genoma donde se encuentran los genes que codifican factores de transcripción claves para el desarrollo ⁵⁴. En estos sectores coexisten el complejo activador Trithorax y el complejo represor Polycomb. Las proteínas Trithorax son un conjunto de activadores de la transcripción, que catalizan la eliminación de grupos metilos del ADN y se unen a histona H3 trimetilada en la lisina 4, favoreciendo la unión de la ARN polimerasa II y permitiendo la iniciación de la transcripción. Por otro lado, el complejo represor Polycomb, que cataliza la adición de grupos metilos al DNA y se une a histona H3 metilada en la lisina 27, recluta a proteínas que promueven la compactación de la cromatina ^{53,265}. Esta arquitectura particular de la cromatina de las ESC permitiría silenciar los genes relacionados con el desarrollo y la diferenciación, al mismo tiempo que los mantienen listos para ser transcritos ⁵³⁻⁵⁵. Además, miembros del complejo Polycomb, tales como IMC1, juegan un papel importante en el mantenimiento de la autorrenovación en células

troncales hemopoyéticas^{266,267}. A medida que avanza la diferenciación, la gran mayoría de las regiones bivalentes se resuelven a regiones monovalentes, ya sea de activación o de represión de genes^{53,268}. Todas estas evidencias apoyan la noción de que la cromatina de las células pluripotentes se encuentra desestructurada, lo que permite el acceso de factores de transcripción y complejos regulatorios⁵⁵ (activadores y represores) a todas las regiones del ADN, lo que permite una expresión global del genoma, que es la base para la pluripotencialidad.

Nuestros resultados muestran que existen diferencias muy notorias en la distribución de las regiones heterocromáticas y eucromáticas entre las células EpCAM (+) y EpCAM (-) (Figuras 5.3 y 5.4). La subpoblación EpCAM (+) presenta una organización nuclear propia, caracterizada globalmente por una distribución homogénea de las secuencias repetitivas pericentroméricas y un patrón difuso de acetilación, mientras que el perfil de distribución de histona H3 metilada sigue un patrón similar al de los bloques heterocromáticos (ADN repetitivo). Este patrón difuso de zonas de activación y represión de genes, se correspondería con un estado relajado o permisivo de la cromatina, es decir un estado dinámico de activación/represión de genes. Aunque nuestros resultados son cualitativos y bastante limitados es interesante notar que existen claras diferencias entre las células EpCAM (+) y las células EpCAM (-) a nivel de la estructura global del núcleo lo podría ser la base estructural de la multipotencialidad de LSPC EpCAM (+).

Cultivo de células troncales EpCAM (+)

Durante el desarrollo de este proyecto se establecieron cultivos de las LSPC en soportes plásticos (Figura R.6.1), y se ensayaron diversas estrategias para favorecer la proliferación celular in vitro. Por ejemplo, medios nutritivos diseñados específicamente

para estas células, agregado de HGF al medio de cultivo, cocultivo con explantos de hígado fetal, cocultivo con otras subpoblaciones hepáticas colocadas en insertos de cultivo, siembra por dilución (que favorece el desarrollo de células con alta tasa de proliferación), cilindros de clonado para aislar colonias de células, cobertura de las superficies de cultivo para aumentar la adherencia de las células al sustrato, etc. A pesar de las distintas estrategias ensayadas, la capacidad proliferativa y por ende la posibilidad de mantener una población de células precursoras en cultivo durante períodos prolongados fue limitada. Esto posiblemente sea debido a la pérdida de señales moleculares provenientes de células vecinas diferenciadas, imprescindibles para el mantenimiento de la población de células precursoras. Es decir es muy probablemente debido a la alteración física y funcional provocada en el nicho, más que a artefactos técnicos de la metodología desarrollada. El trabajo preliminar realizado con células ovas de rata nos permitió demostrar que LSPC de este origen se desarrollan mejor cuando son cocultivadas con células maduras, sin embargo la aplicación de esta variante al procedimiento de cultivo de las células de ratón no favoreció el crecimiento de la subpoblación EpCAM (+). Es interesante notar que las células “tipo oval” pudieron ser amplificadas significativamente durante el cultivo en presencia de HGF, pero no pudieron ser propagadas cuando las colonias de células fueron disgregadas mecánica/enzimáticamente y separadas del medio ambiente de siembra original. Esto indicaría que tanto las células ovas (de rata) como la subpoblación EpCAM (+) (de ratón) requieren la presencia de señales parácrinas provenientes de la población mixta coexistente en el soporte de cultivo, siendo éste un factor crítico para la supervivencia celular ²⁰². La matriz extracelular de la región periportal (donde se encuentran los canales de Hering, que representan el nicho natural de las LSPC) contiene componentes específicos de la matriz extracelular embrionaria tales como ácido hialurónico, colágeno

tipo III y IV, laminina y formas fetales de proteoglicanos. Este microambiente puede ser imitado in vitro utilizando condiciones de cultivo que combinen los componentes de la matriz extracelular embrionaria con soportes tridimensionales que permitan la polarización de las células y así como también cambios críticos en su morfología ²⁶⁹. Los componentes solubles, que comprenden nutrientes y factores solubles como hormonas y factores de crecimiento, etc., pueden ser imitados, en parte, por el uso de medio basal sin suero, sin cobre, calcio bajo (por debajo de 0,5 mM), trazas de elementos como selenio y zinc, una mezcla de lípidos (ácidos grasos libres unidos a albúmina y lipoproteínas de alta densidad), insulina, transferrina y hierro ^{269,270}. Otras señales, aún no identificadas, se pueden proporcionar parcialmente mediante el uso de una “monocapa de células alimentadoras” (feeder layers) de STO ²⁷⁰. Las mismas se obtienen a partir de fibroblastos embrionarios de ratones SIM (sigla en inglés de Sandoz Inbred Swiss Mouse) seleccionados con resistencia a 6-thioguanina y ouabaina (de donde surge la denominación STO). Esto muestra la necesidad de un cambio de enfoque de cara al futuro de la investigación de las LSPC y de las células troncales en general; ya no es suficiente la caracterización de las células troncales como una población aislada sino que es necesario ampliar el objeto de investigación y estudiar las células con su nicho ya que el carácter troncal es una propiedad que surge por sus interacciones ^{22,23,46,48,50,51,271-273}.

Trasplante de células EpCAM (+)

Se realizaron procedimientos de trasplante celular con el objetivo de evaluar el comportamiento in vivo de las células de la subpoblación EpCAM (+). Las células EpCAM (+) aisladas fueron marcadas con CFSE, un trazador supra vital que permite la identificación de las mismas postrasplante. Con posterioridad a la inyección

intraesplénica de células se pudo demostrar que las LSPC EpCAM (+) fueron capaces no sólo de anidar en el bazo de los ratones receptores sanos (Figura R.7.2), sino de migrar hacia el hígado e incorporarse al parénquima hepático (Figura R.7.3). Obviamente son necesarios más estudios para establecer si estas células son capaces de integrarse funcionalmente al hígado y si es posible su aplicación en modelos de daño hepático. Otros autores han estudiado la potencialidad in vivo de las LSPC: células Dlk-1 (+) aisladas (mediante MACS) de ratones transgénicos para GFP (proteína fluorescente verde) de 14,5 dpc fueron trasplantadas en el bazo de ratones tratados con un anticuerpo anti-FAS. Este anticuerpo produce apoptosis en los hepatocitos del receptor, lo que le brinda una ventaja adaptativa a las células trasplantadas para repoblar el hígado. Después de 36 semanas posteriores al trasplante, se identificaron células GFP (+)/ALB (+) en el parénquima hepático ¹²⁵. Por otro lado Gerlach y colaboradores, del McGowan Institute for Regenerative Medicine (Pittsburgh, USA), informaron en 2012 el trasplante de células hepáticas fetales humanas (sin fraccionar) en el bazo de un paciente de 57 años con cirrosis producida por el virus de la hepatitis C ²⁷⁴. Este paciente presentaba episodios recurrentes de encefalopatía hepática y un valor de 15 según sistema de puntuación MELD (escala 0-60) para la valoración de la severidad de una enfermedad hepática crónica). El paciente quien recibió 2 infusiones intraesplénicas de $5 \cdot 10^8$ células hepáticas fetales recién aisladas ABO-compatibles a través de la arteria esplénica en los días 0 y 80, exhibió una disminución del valor de MELD de 15 a 11 al tercer mes y luego de 18 meses su valor fue de 10, sin signos de encefalopatía. Al igual que ocurrió con el trasplante de hepatocitos en humanos ^{164,168-172}, este resultado sólo muestra un mejoría parcial. Tal vez sería necesario seguir investigando la conveniencia de utilizar una subpoblación definida de hepatocitos fetales, como por ejemplo EpCAM (+) buscando mejores resultados.

Conclusiones finales

El aislamiento y caracterización de LSPC motiva considerable interés no sólo para el estudio de la biología de las células troncales hepáticas sino también por su potencial terapéutico, que incluye trasplante celular, el desarrollo de sistemas bioartificiales de soporte hepático, y en general las nuevas tecnologías asociadas a la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos, para el tratamiento de enfermedades hepáticas crónicas o agudas, proveyendo quizás una potencial solución a la severa escasez de hígados donantes. En la actualidad las enfermedades hepáticas se han convertido en una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel global. En nuestro país, así como en el resto del mundo, el número de pacientes esperando un trasplante de hígado supera ampliamente al número de órganos disponibles, según la pagina Web del Instituto Nacional Central Único Coordinador de Ablación e Implante (INCUCAI - www.incuca.gov.ar) al mes de Octubre de 2013, un total de 980 pacientes están en lista de espera de un trasplante hepático.

Los protocolos más utilizados para el aislamiento de LSPC contemplan la activación de estas células mediante inducción de daño hepático. Debido a que las principales características de las células troncales radican en su potencialidad y su plasticidad, la manipulación de éstas implica sin dudas un sesgo. La tecnología presentada en el presente trabajo nos permitió aislar LSCP en condiciones fisiológicas, sin inducción del daño hepático. Este protocolo ha mostrado ser eficiente, altamente reproducible y, en comparación con otros, relativamente barato. Así mismo, este método de aislamiento presenta la posibilidad de ser aumentado en escala lo que potencia sus posibilidades de uso para futuras aplicaciones en el campo de la medicina regenerativa.

Tomados en conjunto, los resultados presentados en este trabajo aportan una visión complementaria de las células troncales, mostrándolas como productos de la evolución más que como simples herramientas. El conjunto de características observadas muestran cómo los atributos que definen el carácter troncal de las células tienen su correlato en el estado intrínseco de las células troncales. Así mismo, EpCAM ha demostrado ser un buen indicador del estado troncal de las células troncales hepáticas. Es notable cómo la presencia de proteínas asociadas a membrana ha permitido caracterizar a las LSPC. Si bien existe un sesgo debido a que históricamente este tipo de proteínas han sido las más buscadas para ser utilizadas como blanco para el posterior aislamiento de las LSCP¹²⁵, la presencia distintiva de este tipo de moléculas y sobretodo de moléculas de adhesión descubre tal vez la característica más importante de las células troncales: la relación con su ambiente, el nicho.

A partir de los resultados obtenidos así como también de la revisión bibliográfica realizada podemos divisar claramente que el futuro de la investigación de las LSPC y de las células troncales en general se encuentra en el estudio de las relaciones de las células con su nicho natural, más aún, rememorando la vieja paradoja del huevo y la gallina ¿quién surgió primero: el nicho o la célula troncal?

Bibliografía

1. Zhao R and Duncan SA. Embryonic development of the liver. *Hepatology* 2005; 41: 956-967.
2. Zaret KS. Hepatocyte differentiation: from the endoderm and beyond. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11: 568-574.
3. Michalopoulos GK and DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997; 276: 60-66.
4. Potten CS. 1997. *Stem Cells*. Cambridge. Academic Press.
5. Kuhn NZ and Tuan RS. Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *J Cell Physiol* 2009; 222: 268-277.
6. Ramalho-Santos M and Willenbring H. On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell* 2007; 1: 35-38.
7. Till JE and McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961; 14: 213-222.
8. Webb A, Li A and Kaur P. Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation* 2004; 72: 387-395.
9. Gage FH, Ray J and Fisher LJ. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci* 1995; 18: 159-192.
10. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H, Lendahl U and Frisen J. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 2000; 288: 1660-1663.
11. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000; 100: 157-168.
12. Faris RA, Konkin T and Halpert G. Liver stem cells: a potential source of hepatocytes for the treatment of human liver disease. *Artif Organs* 2001; 25: 513-521.
13. Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, Wauthier E, Ludlow J, Yao HL, Moss N, Melhem A, McClelland R, Turner W, Kulik M, Sherwood S, Tallheden T, Cheng N, Furth ME and Reid LM. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* 2007; 204: 1973-1987.
14. Bach SP, Renehan AG and Potten CS. Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis* 2000; 21: 469-476.
15. Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA and Morgan JE. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 2005; 122: 289-301.
16. Zammit PS, Partridge TA and Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J Histochem Cytochem* 2006; 54: 1177-1191.
17. Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M, Platoshyn O, Yuan JX, Evans S and Chien KR. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 2005; 433: 647-653.
18. Alison MR and Islam S. Attributes of adult stem cells. *J Pathol* 2009; 217: 144-160.
19. Fleming TP and Johnson MH. From egg to epithelium. *Annu Rev Cell Biol* 1988; 4: 459-485.

20. Katsumoto K, Shiraki N, Miki R and Kume S. Embryonic and adult stem cell systems in mammals: ontology and regulation. *Dev Growth Differ* 2010; 52: 115-129.
21. Zaret KS. Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 499-512.
22. Jones DL and Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 11-21.
23. Watt FM and Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 2000; 287: 1427-1430.
24. Wong MH and Rizvi AZ (2006). Lineage Tracking, Regulation, and Behaviors of Intestinal Stem Cells. In *Tissue Stem Cells*: 87-115. Potten, C. S., Clarke, R., Wilson, J. and Renehan, A. (Eds.). New York: Taylor & Francis Group.
25. Okano H, Kohyama J, Ohba H, Sakaguchi M, Tokunaga A, Shimazaki T and Okano HJ (2006). Neural Stem Cells: Isolation and Self-Renewal. In *Tissue Stem Cells*: 55-70. Potten, C. S., Clarke, R., Wilson, J. and Renehan, A. (Eds.). New York: Taylor & Francis Group.
26. Schmelzer E, McClelland RE, Melhem A, Zhang L, Yao H, Wauthier E, Turner WS, Furth ME, Gerber D, Gupta S and Reid LM (2006). Hepatic Stem Cells and the Liver's Maturation Lineages: Implications for Liver Biology, Gene Expression, and Cell Therapies. In *Tissue stem cells*: 161-214. Potten, C. S., Clarke, R., Wilson, J. and Renehan, A. (Eds.). New York: Taylor & Francis Group.
27. Mikkers H and Frisen J. Deconstructing stemness. *Embo J* 2005; 24: 2715-2719.
28. Chen L and Daley GQ. Molecular basis of pluripotency. *Hum Mol Genet* 2008; 17: R23-27.
29. Niwa H. How is pluripotency determined and maintained? *Development* 2007; 134: 635-646.
30. Gerrits A, Dykstra B, Otten M, Bystriykh L and de Haan G. Combining transcriptional profiling and genetic linkage analysis to uncover gene networks operating in hematopoietic stem cells and their progeny. *Immunogenetics* 2008; 60: 411-422.
31. Roeder I, Galle J and Loeffler M (2006). Theoretical Concepts of Tissue Stem-Cell Organization. In *Tissue Stem Cells*. Potten, C. S., Clarke, R., Wilson, J. and Renehan, A. (Eds.). New York: Taylor & Francis Group.
32. Evans MJ and Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-156.
33. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 7634-7638.
34. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS and Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-1147.
35. Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 435-462.
- Software G (1998). GraphPad Instat. (3.01 edn). USA.
37. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H and Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998; 95: 379-391.
38. Niwa H, Miyazaki J and Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 2000; 24: 372-376.

39. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N and Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 2003; 17: 126-140.
40. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M and Yamanaka S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003; 113: 631-642.
41. Takahashi K and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-676.
42. Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell* 2012; 10: 678-684.
43. Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, Bourque G, George J, Leong B, Liu J, Wong KY, Sung KW, Lee CW, Zhao XD, Chiu KP, Lipovich L, Kuznetsov VA, Robson P, Stanton LW, Wei CL, Ruan Y, Lim B and Ng HH. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 2006; 38: 431-440.
44. Gan Q, Yoshida T, McDonald OG and Owens GK. Concise review: epigenetic mechanisms contribute to pluripotency and cell lineage determination of embryonic stem cells. *Stem Cells* 2007; 25: 2-9.
45. Niwa H. Open conformation chromatin and pluripotency. *Genes Dev* 2007; 21: 2671-2676.
46. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 2006; 441: 1075-1079.
47. Gao JX. Cancer stem cells: the lessons from pre-cancerous stem cells. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 67-96.
48. Nern C and Momba S. The realized niche of adult neural stem cells. *Stem Cell Rev* 2006; 2: 233-240.
49. Theise ND. Gastrointestinal stem cells. III. Emergent themes of liver stem cell biology: niche, quiescence, self-renewal, and plasticity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G189-193.
50. Spradling A, Drummond-Barbosa D and Kai T. Stem cells find their niche. *Nature* 2001; 414: 98-104.
51. Lemischka IR and Moore KA. Stem cells: interactive niches. *Nature* 2003; 425: 778-779.
52. d'Inverno M, Theise ND and Prophet J (2006). *Mathematical Modeling of Stem Cells: A Complexity Primer for the Stem-Cell Biologist*. In *Tissue Stem Cells*. Potten, C. S., Clarke, R., Wilson, J. and Renahan, A. (Eds.). New York: Taylor & Francis Group.
53. Mendenhall EM and Bernstein BE. Chromatin state maps: new technologies, new insights. *Curr Opin Genet Dev* 2008; 18: 109-115.
54. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL and Lander ES. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 2006; 125: 315-326.
55. Jorgensen HF, Giadrossi S, Casanova M, Endoh M, Koseki H, Brockdorff N and Fisher AG. Stem cells primed for action: polycomb repressive complexes restrain the expression of lineage-specific regulators in embryonic stem cells. *Cell Cycle* 2006; 5: 1411-1414.
56. O'Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, Gibson WS, Balazs AB and Baltimore D. MicroRNAs enriched in hematopoietic stem cells differentially regulate long-term hematopoietic output. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 14235-14240.

57. Braun KM and Prowse DM. Distinct epidermal stem cell compartments are maintained by independent niche microenvironments. *Stem Cell Rev* 2006; 2: 221-231.
58. Zipori D. The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem Cells* 2005; 23: 719-726.
59. Wells JM and Melton DA. Vertebrate endoderm development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 393-410.
60. Tremblay KD and Zaret KS. Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues. *Dev Biol* 2005; 280: 87-99.
61. Rossi JM, Dunn NR, Hogan BL and Zaret KS. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* 2001; 15: 1998-2009.
62. Le Douarin NM. An experimental analysis of liver development. *Med Biol* 1975; 53: 427-455.
63. Gualdi R, Bossard P, Zheng M, Hamada Y, Coleman JR and Zaret KS. Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control. *Genes Dev* 1996; 10: 1670-1682.
64. Jung J, Zheng M, Goldfarb M and Zaret KS. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 1999; 284: 1998-2003.
65. Hombach-Klonisch S, Panigrahi S, Rashedi I, Seifert A, Alberti E, Pocar P, Kurpisz M, Schulze-Osthoff K, Mackiewicz A and Los M. Adult stem cells and their trans-differentiation potential--perspectives and therapeutic applications. *J Mol Med* 2008; 86: 1301-1314.
66. Shiojiri N. The origin of intrahepatic bile duct cells in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* 1984; 79: 25-39.
67. Shiojiri N, Inujima S, Ishikawa K, Terada K and Mori M. Cell lineage analysis during liver development using the *spf(ash)*-heterozygous mouse. *Lab Invest* 2001; 81: 17-25.
68. Clotman F, Jacquemin P, Plumb-Rudewiez N, Pierreux CE, Van der Smissen P, Dietz HC, Courtoy PJ, Rousseau GG and Lemaigre FP. Control of liver cell fate decision by a gradient of TGF beta signaling modulated by Onecut transcription factors. *Genes Dev* 2005; 19: 1849-1854.
69. Abelev GI. Alpha-fetoprotein in ontogenesis and its association with malignant tumors. *Adv Cancer Res* 1971; 14: 295-358.
70. Abelev GI, Perova SD, Khramkova NI, Postnikova ZA and Irlin IS. Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplantation* 1963; 1: 174-180.
71. D'Eustachio P, Ingram RS, Tilghman SM and Ruddle FH. Murine alpha-fetoprotein and albumin: two evolutionarily linked proteins encoded on the same mouse chromosome. *Somatic Cell Genet* 1981; 7: 289-294.
72. Sala-Trepat JM, Dever J, Sargent TD, Thomas K, Sell S and Bonner J. Changes in expression of albumin and alpha-fetoprotein genes during rat liver development and neoplasia. *Biochemistry* 1979; 18: 2167-2178.
73. Tilghman SM and Belayew A. Transcriptional control of the murine albumin/alpha-fetoprotein locus during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79: 5254-5257.
74. Sala M, Forner A, Varela M and Bruix J. Prognostic prediction in patients with hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 171-180.
75. Yamashita T, Forgues M, Wang W, Kim JW, Ye Q, Jia H, Budhu A, Zanetti KA, Chen Y, Qin LX, Tang ZY and Wang XW. EpCAM and alpha-fetoprotein expression

- defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008; 68: 1451-1461.
76. Zhu X, Sasse J, McAllister D and Lough J. Evidence that fibroblast growth factors 1 and 4 participate in regulation of cardiogenesis. *Dev Dyn* 1996; 207: 429-438.
77. Calmont A, Wandzioch E, Tremblay KD, Minowada G, Kaestner KH, Martin GR and Zaret KS. An FGF response pathway that mediates hepatic gene induction in embryonic endoderm cells. *Dev Cell* 2006; 11: 339-348.
78. Serls AE, Doherty S, Parvatiyar P, Wells JM and Deutsch GH. Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung. *Development* 2005; 132: 35-47.
79. Furuta Y, Piston DW and Hogan BL. Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development. *Development* 1997; 124: 2203-2212.
80. Winnier G, Blessing M, Labosky PA and Hogan BL. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 1995; 9: 2105-2116.
81. Kuo CT, Morrissey EE, Anandappa R, Sigrist K, Lu MM, Parmacek MS, Soudais C and Leiden JM. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev* 1997; 11: 1048-1060.
82. Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA and Olson EN. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 1997; 11: 1061-1072.
83. Crawford LW, Foley JF and Elmore SA. Histology atlas of the developing mouse hepatobiliary system with emphasis on embryonic days 9.5-18.5. *Toxicol Pathol* 38: 872-906.
84. Matsumoto K, Yoshitomi H, Rossant J and Zaret KS. Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science* 2001; 294: 559-563.
85. Bort R, Signore M, Tremblay K, Martinez Barbera JP and Zaret KS. Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development. *Dev Biol* 2006; 290: 44-56.
86. Deutsch G, Jung J, Zheng M, Lora J and Zaret KS. A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* 2001; 128: 871-881.
87. Zaret KS and Grompe M. Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *Science* 2008; 322: 1490-1494.
88. Dabeva MD, Hwang SG, Vasa SR, Hurston E, Novikoff PM, Hixson DC, Gupta S and Shafritz DA. Differentiation of pancreatic epithelial progenitor cells into hepatocytes following transplantation into rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 7356-7361.
89. Kohler C, Bell AW, Bowen WC, Monga SP, Fleig W and Michalopoulos GK. Expression of Notch-1 and its ligand Jagged-1 in rat liver during liver regeneration. *Hepatology* 2004; 39: 1056-1065.
90. McCright B, Lozier J and Gridley T. A mouse model of Alagille syndrome: Notch2 as a genetic modifier of Jag1 haploinsufficiency. *Development* 2002; 129: 1075-1082.
91. Lemaigre F and Zaret KS. Liver development update: new embryo models, cell lineage control, and morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2004; 14: 582-590.
92. Weinstein M, Monga SP, Liu Y, Brodie SG, Tang Y, Li C, Mishra L and Deng CX. Smad proteins and hepatocyte growth factor control parallel regulatory pathways that converge on beta1-integrin to promote normal liver development. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 5122-5131.

93. Tang Y, Katuri V, Dillner A, Mishra B, Deng CX and Mishra L. Disruption of transforming growth factor-beta signaling in ELF beta-spectrin-deficient mice. *Science* 2003; 299: 574-577.
94. Suzuki A, Zheng YW, Kaneko S, Onodera M, Fukao K, Nakauchi H and Taniguchi H. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J Cell Biol* 2002; 156: 173-184.
95. Suzuki A, Iwama A, Miyashita H, Nakauchi H and Taniguchi H. Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development* 2003; 130: 2513-2524.
96. Grisham JW and Thorgeirsson SS (1997). Liver Stem Cells. In *Stem Cells*. Potten, C. S. (Ed.) Cambridge: Academic Press.
97. Rabes HM, Bucher T, Hartmann A, Linke I and Dunnwald M. Clonal growth of carcinogen-induced enzyme-deficient preneoplastic cell populations in mouse liver. *Cancer Res* 1982; 42: 3220-3227.
98. Ema H, Douagi I, Cumano A and Kourilsky P. Development of T cell precursor activity in the murine fetal liver. *Eur J Immunol* 1998; 28: 1563-1569.
99. Ema H and Nakauchi H. Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo. *Blood* 2000; 95: 2284-2288.
100. Kamiya A, Kinoshita T, Ito Y, Matsui T, Morikawa Y, Senba E, Nakashima K, Taga T, Yoshida K, Kishimoto T and Miyajima A. Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *Embo J* 1999; 18: 2127-2136.
101. Minguet S, Cortegano I, Gonzalo P, Martinez-Marin JA, de Andres B, Salas C, Melero D, Gaspar ML and Marcos MA. A population of c-Kit(low)(CD45/TER119)-hepatic cell progenitors of 11-day postcoitus mouse embryo liver reconstitutes cell-depleted liver organoids. *J Clin Invest* 2003; 112: 1152-1163.
102. Thorgeirsson SS. Hepatic stem cells in liver regeneration. *Faseb J* 1996; 10: 1249-1256.
103. Zhang Y, Bai XF and Huang CX. Hepatic stem cells: existence and origin. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 201-204.
104. Michalopoulos GK and DeFrances M. Liver regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2005; 93: 101-134.
105. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000; 32: 19-31.
106. Heim MH, Gamboni G, Beglinger C and Gyr K. Specific activation of AP-1 but not Stat3 in regenerating liver in mice. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 948-955.
107. Farber E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res* 1956; 16: 142-148.
108. Sell S. Alpha-fetoprotein, stem cells and cancer: how study of the production of alpha-fetoprotein during chemical hepatocarcinogenesis led to reaffirmation of the stem cell theory of cancer. *Tumour Biol* 2008; 29: 161-180.
109. Evarts RP, Nagy P, Marsden E and Thorgeirsson SS. A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis* 1987; 8: 1737-1740.
110. Evarts RP, Nagy P, Nakatsukasa H, Marsden E and Thorgeirsson SS. In vivo differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes. *Cancer Res* 1989; 49: 1541-1547.
111. Thorgeirsson SS, Evarts RP, Bisgaard HC, Fujio K and Hu Z. Hepatic stem cell compartment: activation and lineage commitment. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993; 204: 253-260.

112. Solt DB, Hay JB and Farber E. Comparison of the blood supply to diethylnitrosamine-induced hyperplastic nodules and hepatomas and to the surrounding liver. *Cancer Res* 1977; 37: 1686-1691.
113. Lemire JM, Shiojiri N and Fausto N. Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. *Am J Pathol* 1991; 139: 535-552.
114. Laconi E, Sarma DS and Pani P. Transplantation of normal hepatocytes modulates the development of chronic liver lesions induced by a pyrrolizidine alkaloid, lasiocarpine. *Carcinogenesis* 1995; 16: 139-142.
115. Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK, Hurston E, Laconi S, Pani P, Dabeva MD and Shafritz DA. Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 1998; 153: 319-329.
116. Alison MR, Golding MH and Sarraf CE. Pluripotential liver stem cells: facultative stem cells located in the biliary tree. *Cell Prolif* 1996; 29: 373-402.
117. Theise ND, Saxena R, Portmann BC, Thung SN, Yee H, Chiriboga L, Kumar A and Crawford JM. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 1999; 30: 1425-1433.
118. Brill S, Holst P, Sigal S, Zvibel I, Fiorino A, Ochs A, Somasundaran U and Reid LM. Hepatic progenitor populations in embryonic, neonatal, and adult liver. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993; 204: 261-269.
119. Fausto N. Hepatocyte differentiation and liver progenitor cells. *Curr Opin Cell Biol* 1990; 2: 1036-1042.
120. Sirica AE, Mathis GA, Sano N and Elmore LW. Isolation, culture, and transplantation of intrahepatic biliary epithelial cells and oval cells. *Pathobiology* 1990; 58: 44-64.
121. Sirica AE. Ductular hepatocytes. *Histol Histopathol* 1995; 10: 433-456.
122. Fausto N (1994). Liver stem cells. In *The Liver: Biology and Pathobiology*. (Third edn): pp 1501-1518. Arias, I. M., Boyer, J. L., Fausto, N., Jakoby, W. B., Schachter, D. A. and Shafritz, D. A. (Eds.). New York: Raven Press, Ltd.
123. Gordon GJ, Butz GM, Grisham JW and Coleman WB. Isolation, short-term culture, and transplantation of small hepatocyte-like progenitor cells from retrorsine-exposed rats. *Transplantation* 2002; 73: 1236-1243.
124. Rege TA and Hagood JS. Thy-1, a versatile modulator of signaling affecting cellular adhesion, proliferation, survival, and cytokine/growth factor responses. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1763: 991-999.
125. Tanimizu N, Nishikawa M, Saito H, Tsujimura T and Miyajima A. Isolation of hepatoblasts based on the expression of Dlk/Pref-1. *J Cell Sci* 2003; 116: 1775-1786.
126. Shiojiri N. Transient expression of bile-duct-specific cytokeratin in fetal mouse hepatocytes. *Cell Tissue Res* 1994; 278: 117-123.
127. Grompe M and Finegold M (2001). Liver Stem Cells. In *Stem Cell Biology*: 550. Marshak, D., Gardner, R. and Gottlieb, D. (Eds.). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
128. Newsome PN, Hussain MA and Theise ND. Hepatic oval cells: helping redefine a paradigm in stem cell biology. *Curr Top Dev Biol* 2004; 61: 1-28.
129. Jelnes P, Santoni-Rugiu E, Rasmussen M, Friis SL, Nielsen JH, Tygstrup N and Bisgaard HC. Remarkable heterogeneity displayed by oval cells in rat and mouse models of stem cell-mediated liver regeneration. *Hepatology* 2007; 45: 1462-1470.
130. Zhou H, Rogler LE, Teperman L, Morgan G and Rogler CE. Identification of hepatocytic and bile ductular cell lineages and candidate stem cells in bipolar ductular reactions in cirrhotic human liver. *Hepatology* 2007; 45: 716-724.

131. Sell S. Is there a liver stem cell? *Cancer Res* 1990; 50: 3811-3815.
132. Sell S and Pierce GB. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Lab Invest* 1994; 70: 6-22.
133. Hixson DC, Faris RA and Thompson NL. An antigenic portrait of the liver during carcinogenesis. *Pathobiology* 1990; 58: 65-77.
134. Faris RA, Monfils BA, Dunsford HA and Hixson DC. Antigenic relationship between oval cells and a subpopulation of hepatic foci, nodules, and carcinomas induced by the "resistant hepatocyte" model system. *Cancer Res* 1991; 51: 1308-1317.
135. Crosby HA, Kelly DA and Strain AJ. Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium. *Gastroenterology* 2001; 120: 534-544.
136. Koretzky GA. Role of the CD45 tyrosine phosphatase in signal transduction in the immune system. *Faseb J* 1993; 7: 420-426.
137. Heinrich MC, Blanke CD, Druker BJ and Corless CL. Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1692-1703.
138. Lennartsson J, Jelacic T, Linnekin D and Shivakrupa R. Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem Cells* 2005; 23: 16-43.
139. He YF, Liu YK, Gao DM, Chen J and Yang PY. An efficient method of sorting liver stem cells by using immuno-magnetic microbeads. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3050-3054.
140. Suzuki A, Zheng Y, Kondo R, Kusakabe M, Takada Y, Fukao K, Nakauchi H and Taniguchi H. Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. *Hepatology* 2000; 32: 1230-1239.
141. Fujikawa T, Hirose T, Fujii H, Oe S, Yasuchika K, Azuma H and Yamaoka Y. Purification of adult hepatic progenitor cells using green fluorescent protein (GFP)-transgenic mice and fluorescence-activated cell sorting. *J Hepatol* 2003; 39: 162-170.
142. Ueberham E, Aigner T, Ueberham U and Gebhardt R. E-cadherin as a reliable cell surface marker for the identification of liver specific stem cells. *J Mol Histol* 2007; 38: 359-368.
143. Nierhoff D, Ogawa A, Oertel M, Chen YQ and Shafritz DA. Purification and characterization of mouse fetal liver epithelial cells with high in vivo repopulation capacity. *Hepatology* 2005; 42: 130-139.
144. Ochsner SA, Strick-Marchand H, Qiu Q, Venable S, Dean A, Wilde M, Weiss MC and Darlington GJ. Transcriptional profiling of bipotential embryonic liver cells to identify liver progenitor cell surface markers. *Stem Cells* 2007; 25: 2476-2487.
145. Sleeman KE, Kendrick H, Ashworth A, Isacke CM and Smalley MJ. CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. *Breast Cancer Res* 2006; 8: R7.
146. Su MC, Hsu C, Kao HL and Jeng YM. CD24 expression is a prognostic factor in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Lett* 2006; 235: 34-39.
147. Schmelzer E, Wauthier E and Reid LM. The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. *Stem Cells* 2006; 24: 1852-1858.
148. Herlyn D, Herlyn M, Stepkowski Z and Koprowski H. Monoclonal antibodies in cell-mediated cytotoxicity against human melanoma and colorectal carcinoma. *Eur J Immunol* 1979; 9: 657-659.
149. Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ and Litvinov SV. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med* 1999; 77: 699-712.

150. Schmelzer E and Reid LM. EpCAM expression in normal, non-pathological tissues. *Front Biosci* 2008; 13: 3096-3100.
151. Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, Mitas M, Salem M, Hannun YA, Cole DJ and Gillanders WE. EpCAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res* 2004; 64: 5818-5824.
152. Munz M, Kieu C, Mack B, Schmitt B, Zeidler R and Gires O. The carcinoma-associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene* 2004; 23: 5748-5758.
153. Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, Kieu C, Papior P, Baeuerle PA, Munz M and Gires O. Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 162-171.
154. Crossin KL. Cell and substrate adhesion molecules in embryonic and neural development. *Clin Chem* 1989; 35: 738-747.
155. Rutishauser U, Hoffman S and Edelman GM. Binding properties of a cell adhesion molecule from neural tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982; 79: 685-689.
156. Kiselyov VV, Berezin V, Maar TE, Soroka V, Edvardsen K, Schousboe A and Bock E. The first immunoglobulin-like neural cell adhesion molecule (NCAM) domain is involved in double-reciprocal interaction with the second immunoglobulin-like NCAM domain and in heparin binding. *J Biol Chem* 1997; 272: 10125-10134.
157. Murray BA, Owens GC, Prediger EA, Crossin KL, Cunningham BA and Edelman GM. Cell surface modulation of the neural cell adhesion molecule resulting from alternative mRNA splicing in a tissue-specific developmental sequence. *J Cell Biol* 1986; 103: 1431-1439.
158. Owens GC, Edelman GM and Cunningham BA. Organization of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) gene: alternative exon usage as the basis for different membrane-associated domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 294-298.
159. Crossin KL, Edelman GM and Cunningham BA. Mapping of three carbohydrate attachment sites in embryonic and adult forms of the neural cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 1984; 99: 1848-1855.
160. Muhlenhoff M, Oltmann-Norden I, Weinhold B, Hildebrandt H and Gerardy-Schahn R. Brain development needs sugar: the role of polysialic acid in controlling NCAM functions. *Biol Chem* 2009; 390: 567-574.
161. Shafritz DA and Dabeva MD. Liver stem cells and model systems for liver repopulation. *J Hepatol* 2002; 36: 552-564.
162. Shafritz DA. Rat liver stem cells: prospects for the future. *Hepatology* 2000; 32: 1399-1400.
163. Malhi H and Gupta S. Hepatocyte transplantation: new horizons and challenges. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001; 8: 40-50.
164. Bologna AA, Barbich MR, D'Agostino D and Argibay PF. Estado actual del trasplante de células hepáticas en pediatría. *Arch Argent Pediatr* 2011; 109: 142-149.
165. Mito M, Kusano M and Kawaura Y. Hepatocyte transplantation in man. *Transplant Proc* 1992; 24: 3052-3053.
166. Habibullah CM, Syed IH, Qamar A and Taher-Uz Z. Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation* 1994; 58: 951-952.
167. Grossman M, Rader DJ, Muller DW, Kolansky DM, Kozarsky K, Clark BJ, 3rd, Stein EA, Lupien PJ, Brewer HB, Jr., Raper SE and et al. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolaemia. *Nat Med* 1995; 1: 1148-1154.

168. Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, Dorko K, Sauter BV and Strom SC. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 1998; 338: 1422-1426.
169. Fitzpatrick E, Mitry RR and Dhawan A. Human hepatocyte transplantation: state of the art. *J Intern Med* 2009; 266: 339-357.
170. Dhawan A, Strom SC, Sokal E and Fox IJ. Human hepatocyte transplantation. *Methods Mol Biol* 2010; 640: 525-534.
171. Raper SE, Grossman M, Rader DJ, Thoene JG, Clark BJ, 3rd, Kolansky DM, Muller DW and Wilson JM. Safety and feasibility of liver-directed ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia. *Ann Surg* 1996; 223: 116-126.
172. Muraca M, Gerunda G, Neri D, Vilei MT, Granato A, Feltracco P, Meroni M, Giron G and Burlina AB. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. *Lancet* 2002; 359: 317-318.
173. Fisher RA and Strom SC. Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation* 2006; 82: 441-449.
174. Mitry RR, Dhawan A, Hughes RD, Bansal S, Lehec S, Terry C, Heaton ND, Karani JB, Mieli-Vergani G and Rela M. One liver, three recipients: segment IV from split-liver procedures as a source of hepatocytes for cell transplantation. *Transplantation* 2004; 77: 1614-1616.
175. Kim KM and Evans GRD (2005). *Tissue Engineering: The Future of Stem Cells*. In *Topics in Tissue Engineering*: 1-21. Ashammakhi, N. and Reis, R. L. (Eds.).
176. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS and Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170.
177. Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM and Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000; 31: 235-240.
178. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O and Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-16.
179. Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S and Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003; 422: 897-901.
180. Wang X, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M and Grompe M. The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100 Suppl 1: 11881-11888.
181. Yovchev MI, Grozdanov PN, Joseph B, Gupta S and Dabeva MD. Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver. *Hepatology* 2007; 45: 139-149.
182. Nierhoff D, Levoci L, Schulte S, Goeser T, Rogler LE and Shafritz DA. New cell surface markers for murine fetal hepatic stem cells identified through high density complementary DNA microarrays. *Hepatology* 2007; 46: 535-547.
183. Munz M, Baeuerle PA and Gires O. The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res* 2009; 69: 5627-5629.
184. Vellon L, Royo F, Matthiesen R, Torres-Fuenzalida J, Lorenti A and Parada LA. Functional blockade of $\alpha 5 \beta 1$ integrin induces scattering and genomic landscape remodeling of hepatic progenitor cells. *BMC Cell Biol* 2010; 11: 81.
185. Schneider CA, Rasband WS and Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012; 9: 671-675.
186. Aguirre A, Rubio ME and Gallo V. Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. *Nature* 2007; 447: 323-327.

- Microsystems L (1997-2003). Leica Confocal Software Lite. (2.5 Build 1227 edn). Mannheim, Germany.
- (2001). ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. In Relative Quantitation of Gene Expression. Foster City, CA: AB Applied Biosystems.
- Grupo InfoStat F, Universidad Nacional de Córdoba (2009). InfoStat. (2009 edn). Córdoba, Argentina.
190. Hixson DC, Chapman L, McBride A, Faris R and Yang L. Antigenic phenotypes common to rat oval cells, primary hepatocellular carcinomas and developing bile ducts. *Carcinogenesis* 1997; 18: 1169-1175.
191. Yovchev MI, Zhang J, Neufeld DS, Grozdanov PN and Dabeva MD. Thymus cell antigen-1-expressing cells in the oval cell compartment. *Hepatology* 2009; 50: 601-611.
192. Medico E, Mongioli AM, Huff J, Jelinek MA, Follenzi A, Gaudino G, Parsons JT and Comoglio PM. The tyrosine kinase receptors Ron and Sea control "scattering" and morphogenesis of liver progenitor cells in vitro. *Mol Biol Cell* 1996; 7: 495-504.
193. Kordes C, Sawitza I, Muller-Marbach A, Ale-Agha N, Keitel V, Klonowski-Stumpe H and Haussinger D. CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352: 410-417.
194. Gonzalez-Mariscal L, Lechuga S and Garay E. Role of tight junctions in cell proliferation and cancer. *Prog Histochem Cytochem* 2007; 42: 1-57.
195. Kania G, Corbeil D, Fuchs J, Tarasov KV, Blyszczuk P, Huttner WB, Boheler KR and Wobus AM. Somatic stem cell marker prominin-1/CD133 is expressed in embryonic stem cell-derived progenitors. *Stem Cells* 2005; 23: 791-804.
196. Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH and Weissman IL. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 14720-14725.
197. He ZP, Tan WQ, Tang YF, Zhang HJ and Feng MF. Activation, isolation, identification and in vitro proliferation of oval cells from adult rat livers. *Cell Prolif* 2004; 37: 177-187.
198. Dabeva MD and Shafritz DA. Activation, proliferation, and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration. *Am J Pathol* 1993; 143: 1606-1620.
199. Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 836-847.
200. Fujikura Y, Kuniki H and Fukumoto T. Analysis of hemopoietic cells in rat bone marrow and fetal liver with monoclonal antibody. *Dev Comp Immunol* 1990; 14: 121-129.
201. Zarnegar R and Michalopoulos GK. The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J Cell Biol* 1995; 129: 1177-1180.
202. Corcelle V, Stieger B, Gjinnovci A, Wollheim CB and Gauthier BR. Characterization of two distinct liver progenitor cell subpopulations of hematopoietic and hepatic origins. *Exp Cell Res* 2006; 312: 2826-2836.
203. Cimica V, Batusic D, Chen Y, Hollemann T, Pieler T and Ramadori G. Transcriptome analysis of rat liver regeneration in a model of oval hepatic stem cells. *Genomics* 2005; 86: 352-364.
204. Hixson DC and Allison JP. Monoclonal antibodies recognizing oval cells induced in the liver of rats by N-2-fluorenylacetamide or ethionine in a choline-deficient diet. *Cancer Res* 1985; 45: 3750-3760.
205. Zaret KS. Liver specification and early morphogenesis. *Mech Dev* 2000; 92: 83-88.

206. Murgita RA and Tomasi TB, Jr. Suppression of the immune response by alpha-fetoprotein on the primary and secondary antibody response. *J Exp Med* 1975; 141: 269-286.
207. De Mees C, Laes JF, Bakker J, Smitz J, Hennuy B, Van Vooren P, Gabant P, Szpirer J and Szpirer C. Alpha-fetoprotein controls female fertility and prenatal development of the gonadotropin-releasing hormone pathway through an antiestrogenic action. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 2012-2018.
208. Bakker J, De Mees C, Douhard Q, Balthazart J, Gabant P, Szpirer J and Szpirer C. Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens. *Nat Neurosci* 2006; 9: 220-226.
209. Gabant P, Forrester L, Nichols J, Van Reeth T, De Mees C, Pajack B, Watt A, Smitz J, Alexandre H, Szpirer C and Szpirer J. Alpha-fetoprotein, the major fetal serum protein, is not essential for embryonic development but is required for female fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 12865-12870.
210. Uriel J, Trojan J, Moro R and Pineiro A. Intracellular uptake of alpha-fetoprotein: a marker of neural differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 1983; 417: 321-329.
211. Hsia JC, Er SS, Tan CT, Estes T and Ruoslahti E. alpha-fetoprotein binding specificity for arachidonate, bilirubin, docosahexaenoate, and palmitate. A spin label study. *J Biol Chem* 1980; 255: 4224-4227.
212. Nishihira J, Koyama Y, Sakai M and Nishi S. The fatty acid binding site of human alpha-fetoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 196: 1049-1057.
213. Berde CB, Nagai M and Deutsch HF. Human alpha-fetoprotein. Fluorescence studies on binding and proximity relationships for fatty acids and bilirubin. *J Biol Chem* 1979; 254: 12609-12614.
214. Benassayag C, Savu L, Vallette G, Delorme J and Nunez EA. Relations between fatty acids and oestrogen binding properties of pure rat alpha 1-fetoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1979; 587: 227-237.
215. Iturralde M, Alava MA, Gonzalez B, Anel A and Pineiro A. Effect of alpha-fetoprotein and albumin on the uptake of polyunsaturated fatty acids by rat hepatoma cells and fetal rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1086: 81-88.
216. Alava MA, Iturralde M, Gonzalez B and Pineiro A. Fatty acid desaturation: effect of alphafetoprotein on alpha-linolenic acid conversion by fetal rat hepatocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1999; 60: 209-215.
217. Yazama F and Tai A. Unexpected role of alpha-fetoprotein in spermatogenesis. *PLoS One* 2011; 6: e19387.
218. Evarts RP, Nagy P, Marsden E and Thorgeirsson SS. In situ hybridization studies on expression of albumin and alpha-fetoprotein during the early stage of neoplastic transformation in rat liver. *Cancer Res* 1987; 47: 5469-5475.
219. Winter MJ, Cirulli V, Briaire-de Bruijn IH and Litvinov SV. Cadherins are regulated by Ep-CAM via phosphatidylinositol-3 kinase. *Mol Cell Biochem* 2007; 302: 19-26.
220. Winter MJ, Nagtegaal ID, van Krieken JH and Litvinov SV. The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am J Pathol* 2003; 163: 2139-2148.
221. Chaves-Perez A, Mack B, Maetzel D, Kremling H, Eggert C, Harreus U and Gires O. EpCAM regulates cell cycle progression via control of cyclin D1 expression. *Oncogene* 2013; 32: 641-650.
222. Yamashita T, Budhu A, Forgues M and Wang XW. Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2007; 67: 10831-10839.

223. Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y and Johnson KR. Cadherin switching. *J Cell Sci* 2008; 121: 727-735.
224. Grotegut S, von Schweinitz D, Christofori G and Lehenbre F. Hepatocyte growth factor induces cell scattering through MAPK/Egr-1-mediated upregulation of Snail. *Embo J* 2006; 25: 3534-3545.
225. Lu TY, Lu RM, Liao MY, Yu J, Chung CH, Kao CF and Wu HC. Epithelial cell adhesion molecule regulation is associated with the maintenance of the undifferentiated phenotype of human embryonic stem cells. *J Biol Chem* 2010; 285: 8719-8732.
226. Huang HP, Chen PH, Yu CY, Chuang CY, Stone L, Hsiao WC, Li CL, Tsai SC, Chen KY, Chen HF, Ho HN and Kuo HC. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) complex proteins promote transcription factor-mediated pluripotency reprogramming. *J Biol Chem* 2011; 286: 33520-33532.
227. Azuma H, Hirose T, Fujii H, Oe S, Yasuchika K, Fujikawa T and Yamaoka Y. Enrichment of hepatic progenitor cells from adult mouse liver. *Hepatology* 2003; 37: 1385-1394.
228. Nitou M, Sugiyama Y, Ishikawa K and Shiojiri N. Purification of fetal mouse hepatoblasts by magnetic beads coated with monoclonal anti-e-cadherin antibodies and their in vitro culture. *Exp Cell Res* 2002; 279: 330-343.
229. Rao MS, Khan AA, Parveen N, Habeeb MA, Habibullah CM and Pande G. Characterization of hepatic progenitors from human fetal liver during second trimester. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 5730-5737.
230. Fomin ME, Tai LK, Barcena A and Muench MO. Coexpression of CD14 and CD326 discriminate hepatic precursors in the human fetal liver. *Stem Cells Dev* 2011; 20: 1247-1257.
231. Chagraoui J, Lepage-Noll A, Anjo A, Uzan G and Charbord P. Fetal liver stroma consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition. *Blood* 2003; 101: 2973-2982.
232. Chen Q, Khoury M, Limmon G, Choolani M, Chan JK and Chen J. Human fetal hepatic progenitor cells are distinct from, but closely related to, hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells* 2013; 31: 1160-1169.
233. Morita K, Furuse M, Fujimoto K and Tsukita S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 511-516.
234. Heinzelmann-Schwarz VA, Gardiner-Garden M, Henshall SM, Scurry J, Scolyer RA, Davies MJ, Heinzelmann M, Kalish LH, Bali A, Kench JG, Edwards LS, Vanden Bergh PM, Hacker NF, Sutherland RL and O'Brien PM. Overexpression of the cell adhesion molecules DDR1, Claudin 3, and Ep-CAM in metaplastic ovarian epithelium and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4427-4436.
235. Kuhn S, Koch M, Nubel T, Ladwein M, Antolovic D, Klingbeil P, Hildebrand D, Moldenhauer G, Langbein L, Franke WW, Weitz J and Zoller M. A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. *Mol Cancer Res* 2007; 5: 553-567.
236. Ladwein M, Pape UF, Schmidt DS, Schnolzer M, Fiedler S, Langbein L, Franke WW, Moldenhauer G and Zoller M. The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7. *Exp Cell Res* 2005; 309: 345-357.
237. Nubel T, Preobraschenski J, Tuncay H, Weiss T, Kuhn S, Ladwein M, Langbein L and Zoller M. Claudin-7 regulates EpCAM-mediated functions in tumor progression. *Mol Cancer Res* 2009; 7: 285-299.
238. Tang C, Ang BT and Pervaiz S. Cancer stem cell: target for anti-cancer therapy. *Faseb J* 2007; 21: 3777-3785.

239. D'Souza T, Sherman-Baust CA, Poosala S, Mullin JM and Morin PJ. Age-related changes of claudin expression in mouse liver, kidney, and pancreas. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2009; 64: 1146-1153.
240. Yovchev MI, Grozdanov PN, Zhou H, Racherla H, Guha C and Dabeva MD. Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver. *Hepatology* 2008; 47: 636-647.
241. Jensen CH, Jauho EI, Santoni-Rugiu E, Holmskov U, Teisner B, Tygstrup N and Bisgaard HC. Transit-amplifying ductular (oval) cells and their hepatocytic progeny are characterized by a novel and distinctive expression of delta-like protein/preadipocyte factor 1/fetal antigen 1. *Am J Pathol* 2004; 164: 1347-1359.
242. Tanimizu N, Tsujimura T, Takahide K, Kodama T, Nakamura K and Miyajima A. Expression of Dlk/Pref-1 defines a subpopulation in the oval cell compartment of rat liver. *Gene Expr Patterns* 2004; 5: 209-218.
243. Tanaka M, Okabe M, Suzuki K, Kamiya Y, Tsukahara Y, Saito S and Miyajima A. Mouse hepatoblasts at distinct developmental stages are characterized by expression of EpCAM and DLK1: drastic change of EpCAM expression during liver development. *Mech Dev* 2009; 126: 665-676.
244. Smas CM and Sul HS. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* 1993; 73: 725-734.
245. Wang Y, Zhao L, Smas C and Sul HS. Pref-1 interacts with fibronectin to inhibit adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 2010; 30: 3480-3492.
246. Moon YS, Smas CM, Lee K, Villena JA, Kim KH, Yun EJ and Sul HS. Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 5585-5592.
247. Abdallah BM, Jensen CH, Gutierrez G, Leslie RG, Jensen TG and Kassem M. Regulation of human skeletal stem cells differentiation by Dlk1/Pref-1. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 841-852.
248. Raghunandan R, Ruiz-Hidalgo M, Jia Y, Ettinger R, Rudikoff E, Riggins P, Farnsworth R, Tesfaye A, Laborda J and Bauer SR. Dlk1 influences differentiation and function of B lymphocytes. *Stem Cells Dev* 2008; 17: 495-507.
249. Li L, Forman SJ and Bhatia R. Expression of DLK1 in hematopoietic cells results in inhibition of differentiation and proliferation. *Oncogene* 2005; 24: 4472-4476.
250. Huang J, Zhang X, Zhang M, Zhu JD, Zhang YL, Lin Y, Wang KS, Qi XF, Zhang Q, Liu GZ, Yu J, Cui Y, Yang PY, Wang ZQ and Han ZG. Up-regulation of DLK1 as an imprinted gene could contribute to human hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2007; 28: 1094-1103.
251. Schmidt JV, Matteson PG, Jones BK, Guan XJ and Tilghman SM. The Dlk1 and Gtl2 genes are linked and reciprocally imprinted. *Genes Dev* 2000; 14: 1997-2002.
252. Carey BW, Markoulaki S, Hanna JH, Faddah DA, Buganim Y, Kim J, Ganz K, Steine EJ, Cassady JP, Creighton MP, Welstead GG, Gao Q and Jaenisch R. Reprogramming factor stoichiometry influences the epigenetic state and biological properties of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2011; 9: 588-598.
253. Parada LA, Sotiriou S and Misteli T. Spatial genome organization. *Exp Cell Res* 2004; 296: 64-70.
254. Parada L and Misteli T. Chromosome positioning in the interphase nucleus. *Trends Cell Biol* 2002; 12: 425-432.
255. Guenatri M, Bailly D, Maison C and Almouzni G. Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *J Cell Biol* 2004; 166: 493-505.

256. Solovei I, Schermelleh L, During K, Engelhardt A, Stein S, Cremer C and Cremer T. Differences in centromere positioning of cycling and postmitotic human cell types. *Chromosoma* 2004; 112: 410-423.
257. Vourc'h C, Taruscio D, Boyle AL and Ward DC. Cell cycle-dependent distribution of telomeres, centromeres, and chromosome-specific subsatellite domains in the interphase nucleus of mouse lymphocytes. *Exp Cell Res* 1993; 205: 142-151.
258. Meshorer E and Misteli T. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 540-546.
259. Cross MA and Enver T. The lineage commitment of haemopoietic progenitor cells. *Curr Opin Genet Dev* 1997; 7: 609-613.
260. Efroni S, Duttagupta R, Cheng J, Dehghani H, Hoeppner DJ, Dash C, Bazett-Jones DP, Le Grice S, McKay RD, Buetow KH, Gingeras TR, Misteli T and Meshorer E. Global transcription in pluripotent embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 437-447.
261. Meshorer E, Yellajoshula D, George E, Scambler PJ, Brown DT and Misteli T. Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. *Dev Cell* 2006; 10: 105-116.
262. Akashi K, He X, Chen J, Iwasaki H, Niu C, Steenhard B, Zhang J, Haug J and Li L. Transcriptional accessibility for genes of multiple tissues and hematopoietic lineages is hierarchically controlled during early hematopoiesis. *Blood* 2003; 101: 383-389.
263. Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, Mak TW, Rossant J and van der Kooy D. Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron* 2001; 30: 65-78.
264. Kobayakawa S, Miike K, Nakao M and Abe K. Dynamic changes in the epigenomic state and nuclear organization of differentiating mouse embryonic stem cells. *Genes Cells* 2007; 12: 447-460.
265. Ringrose L and Paro R. Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu Rev Genet* 2004; 38: 413-443.
266. Park IK, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihalja M, Weissman IL, Morrison SJ and Clarke MF. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 2003; 423: 302-305.
267. Iwama A, Oguro H, Negishi M, Kato Y, Morita Y, Tsukui H, Ema H, Kamijo T, Katoh-Fukui Y, Koseki H, van Lohuizen M and Nakauchi H. Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1. *Immunity* 2004; 21: 843-851.
268. Stancheva I. Revisiting heterochromatin in embryonic stem cells. *PLoS Genet* 2011; 7: e1002093.
269. Macdonald JM XA, Hiroshi K, LeCluyse E, Hamillton G, Liu H, Rong YW, Moss N, and Lodestro C LT, Wolfe SP, Reid L. (2002). Liver Cell Culture and Lineage Biology. In *Methods of Tissue Engineering*: 151–201. Lanza WL, L. R., Vacanti J (Ed.) San Diego, CA, USA: Academic Press.
270. Kubota H and Reid LM. Clonogenic hepatoblasts, common precursors for hepatocytic and biliary lineages, are lacking classical major histocompatibility complex class I antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 12132-12137.
271. Walker MR, Patel KK and Stappenbeck TS. The stem cell niche. *J Pathol* 2009; 217: 169-180.
272. Sneddon JB and Werb Z. Location, location, location: the cancer stem cell niche. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 607-611.

273. Paku S, Schnur J, Nagy P and Thorgeirsson SS. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cells in rat liver. *Am J Pathol* 2001; 158: 1313-1323.
274. Gridelli B, Vizzini G, Pietrosi G, Luca A, Spada M, Gruttadauria S, Cintorino D, Amico G, Chinnici C, Miki T, Schmelzer E, Conaldi PG, Triolo F and Gerlach JC. Efficient human fetal liver cell isolation protocol based on vascular perfusion for liver cell-based therapy and case report on cell transplantation. *Liver Transpl* 2012; 18: 226-237.