



Unidad de Investigación

HOSPITAL UNIVERSITARIO REINA SOFÍA

INSTITUTO MAIMÓNIDES DE INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DE CÓRDOBA (IMIBIC)

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



**PAPEL DE LAS CÉLULAS MADRE DE
MÉDULA ÓSEA EN HEPATOLOGÍA:
ESTUDIOS IN VIVO E IN VITRO**

Carmen María Herencia Bellido

Córdoba, 2013

TÍTULO: *Papel de las células madre de médula ósea en hepatología: estudios in vivo e in vitro*

AUTOR: *Carmen María Herencia Bellido*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2013
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

**PAPEL DE LAS CÉLULAS MADRE DE
MÉDULA ÓSEA EN HEPATOLOGÍA:
ESTUDIOS IN VIVO E IN VITRO**

Memoria presentada por

Carmen María Herencia Bellido

Licenciada en Biología, para optar al grado de

Doctora en Biología

Tesis doctoral realizada bajo la dirección del Dr. Juan Rafael Muñoz-Castañeda en la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba. Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC).

Programa de Doctorado “Biomedicina” (mención hacia la excelencia) en la Línea de Investigación “Mecanismos celulares y moleculares en la inflamación y en el daño endotelial de la insuficiencia renal”.

La doctoranda

El director

Carmen María
Herencia Bellido

Dr. Juan Rafael
Muñoz Castañeda



TÍTULO DE LA TESIS: PAPEL DE LAS CÉLULAS MADRE DE MÉDULA ÓSEA EN HEPATOLOGÍA: ESTUDIOS IN VIVO E IN VITRO

DOCTORANDO/A: CARMEN MARIA HERENCIA BELLIDO

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

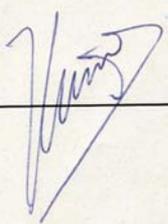
(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Dña. **Carmen María Herencia Bellido** presenta un trabajo original en el que se aborda el estudio de distintas poblaciones de células madre de la médula ósea en la fisiopatología hepática con una aproximación experimental tanto *in vitro* y como *in vivo*. El desarrollo de este trabajo de investigación ha permitido avanzar en el conocimiento de la participación de células madre adultas durante la regeneración hepática, ha contribuido a dilucidar los mecanismos por los que pueden iniciarse procesos tumorales como el carcinoma hepatocelular y, finalmente propone una nueva alternativa terapéutica basada en las células madre para el tratamiento del fallo hepático agudo. Los resultados obtenidos han sido publicados o están sometidos en distintas revistas internacionales (J Gastrointest Surgery, 2011; Plos One 2012; Liver Transplantation, sometido). Además se ha derivado de este estudio una patente (Nº de solicitud: P201330895) en la que se propone al contenido intracelular de células madre mesenquimales como una efectiva composición farmacéutica para el tratamiento del daño hepático agudo. La tesis doctoral presentada se enmarca dentro de diversos proyectos de investigación financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI041588), la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (CM0014) y la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia CTS-02137). Finalmente, cabe destacar la formación técnica y científica alcanzada por la doctoranda. El desarrollo de la tesis le ha permitido adquirir conocimientos teóricos y metodológicos que la habilitan para desarrollar nuevas hipótesis y participar activamente en la redacción y coordinación de nuevos artículos científicos y proyectos de investigación.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 10 de Julio de 2013

Firma del/de los director/es

Fdo.:  Fdo.: _____



TÍTULO DE LA TESIS: PAPEL DE LAS CÉLULAS MADRE DE MÉDULA ÓSEA EN HEPATOLOGÍA: ESTUDIOS *IN VIVO* E *IN VITRO*

DOCTORANDO/A: CARMEN MARIA HERENCIA BELLIDO

ESCRITO RAZONADO DEL RESPONSABLE DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
(Ratificando el informe favorable del director. Sólo cuando el director no pertenezca a la Universidad de Córdoba).

Por la presente ratifico el informe favorable presentado por el Dr. Juan Rafael Muñoz Castañeda, respecto a la presentación del trabajo de Tesis Doctoral de D^a Carmen María Herencia Bellido. El citado trabajo aborda un tema de gran interés en biomedicina, como es la implicación de las células madre de la médula ósea en la fisiopatología hepática. La introducción recoge de manera adecuada todos los antecedentes a partir de los cuáles se llega al planteamiento de los objetivos previstos. La bibliografía utilizada es amplia y actualizada. El diseño experimental y la metodología seguida son apropiados para la consecución de los objetivos propuestos, y los resultados obtenidos son de calidad y se han discutido de manera apropiada con respecto al conocimiento actual del tema, lo cuál refleja en la realización de publicaciones en revistas de reconocido prestigio.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, _10_ de _____ Julio _____ de _2013_

Firma del responsable de línea de investigación

Fdo.: _____

Dr. Pedro Aljama García

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de los siguientes proyectos de investigación:

- **Estudio de la viabilidad de las células hematopoyéticas humanas para la regeneración hepática en el fallo hepático fulminante.** Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI041588)
- **Células madre hematopoyéticas en un estudio clínico de pacientes sometidos a una resección hepática.** Fundación Progreso y Salud-Consejería de Salud (Junta de Andalucía) (CM0014)
- **Diferenciación de hepatocitos a partir de distintos tipos de células pluripotentes de médula ósea. Aplicación para la regeneración celular en dos modelos experimentales de lesión hepática.** (Proyecto de Excelencia Ref. CTS-02137)

ABREVIATURAS

2-AAF	2-acetaminofluorano
ABCG2	ATP-binding cassette sub-family G
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonic acid)
α1-AT	alfa 1-antitripsina
ADNc	ADN copia
ADNAsa	Endonucleasa
α-FP	alfa-fetoproteína
α-MEM	alfa Minimum Essential Medium
ALB	Albúmina
ALP	Fosfatasa alcalina
ALT	Alanina Transaminasa
ANOVA	Análisis de varianza
APC	Adenomatous polyposis coli
APT	Adenina fosforibosiltransferasa
ARNsa	Ribonucleasa
ASC	Células madre adultas
AST	Aspartato aminotransferasa
BIL	Bilirrubina
BMP-4	Bone Morphogenetic protein 4
BM-SC	Células madre adultas de médula ósea
BSA	Albúmina sérica bovina
CATB	Cathepsina B
CATD	Cathepsina D
CBP	CREB binding protein
CD	Cluster de differentiation
CDH1	Cocktail de diferenciación a hepatocitos 1
CDH2	Cocktail de diferenciación a hepatocitos 2
c/EBP	CCAAT enhancer binding proteins
CHAPS	3-(3-cholamidopropyl) dimethylammonio-1-propane sulphonate
CI	Células madre mesenquimales indiferenciadas
CK-Iα	Caseín quinasa-I alfa
CK-7	Citoqueratina-7
CK-8	Citoqueratina-8
CK-18	Citoqueratina-18
CK-19	Citoqueratina-19
CSC	Cancer stem cells
Ct	Ciclo umbral
DAB	Diaminobencidina
DAPI	4'6'diamidino 2 phenylindole
DIGE	2D-Fluoresce difference gel
DKK-1	Dickoppft
DMEM:HI2	Dulbecco's modificate essential medium:Hank's 12
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidad óptica integrada
DTT	Ditiotreitiol

dNTP	Desoxirribonucleósidos-trifosfato
Dsh	Dishewelled
EDTA	ácido entilendiamino tetraacético
EGF	Epidermal growth factor
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EpCAM	Epithelial Cell adhesión molecule
ESC	Células madre embrionarias
EPC	Células progenitoras endoteliales
FBS	Suero fetal bovino
FITC	Isocianato de fluoresceína
FGF-4	Fibroblast growth factor-4
FGF-7	Fibroblast growth factor-7
FGF-a	Fibroblast growth factor-acidic
FGF-b	Fibroblast growth factor-basic
Flt3-L	Flt3-ligando
FSS	Forward Scatter
Fzd 3	Frizzled 3
Fzd 6	Frizzled 6
Fzd 7	Frizzled 7
G-CSF	Factor de crecimiento de las colonias de granulocitos
Gly-A	Glicoforina A
gp130	Glycoprotein 130
GSK-3β	Glycogen synthase kinase 3 beta
HCC	Hepatocarcinoma
HEPES	Hidroxietil piperizina-etano-sulfonato
HGF	Hepatocyte growth factor
HLA	Human leukocyte antigens
HNF-3β	Hepatocyte nuclear factor-3 β
HNF-4α	Hepatocyte nuclear factor-4 α
HP	Hepatectomía parcial
HPC	Células progenitoras intrahepáticas
HRP	Horseradish peroxidase
HSC	Células madre hematopoyéticas
ICAM	Intracellular adhesión molecule 1
ICQ	Inmunocitoquímica
IEF	Isoelectroenfoque
IFN-γ	Interferón gamma
IHQ	Inmunohistoquímica
IκB-α	Inhibitor kappa B alpha
IMDM	Iscoveb's modified Dulbecco's medium
IMIBIC	Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba
IL-1β	Interleuquina 1- β
IL-3	Interleuquina-3
IL-6	Interleuquina-6
IL-8	Interleuquina-8
IL-10	Interleuquina-10

IL-12	Interleuquina-12
ITS	Insulina Transferrina Selenio
iPS	Induced pluripotent stem cells
kDa	kiloDalton
LDH-β	Cadena β Lactato Deshidrogenasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LEF	Lymphoid enhancing factor-1
LFA-1	Lymphocyte function associated antigen-1
LRP5/6	Low density lipoprotein receptor related protein 5/6
Lin	Lineage
LIS	Lisado de células madre mesenquimales
MAPC	Multipotent adult progenitor cells
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MHC I	Major histocompatibility complex I
MHC II	Major histocompatibility complex II
mi-RNA 124a	Micro ARN 124a
mi-RNA 125b	Micro ARN 124b
mi-RNA 155	Micro ARN 155
MMP-2	Metaloproteínasa de Matriz-2
MMP-9	Metaloproteínasa de Matriz-9
MMP-13	Metaloproteínasa de Matriz-13
MNC	Células mononucleares de sangre periférica
MO	Médula ósea
MS/MS	Espectrofotometría de masas en tán-dem
MSC	Células madre mesenquimales
MSC-CM	Conditional Medium- Mesenchymal stem cells
NFκB	Nuclear factor kappa B
NK	Natural killer
OC	Células ovas
OSM	Onconstatina-M
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
Pb	pares de bases
PBS	Solución salina tamponada de fosfato
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
rpm	Revoluciones por minuto
SC	Células madre
SCF	Stem cells factor
SDF-1	Stromal cell derived factor-1
SDS	Dodecil sulfato sódico
SFRP	Secreted Frizzled related protein
SO	Operación simulada
SP	Side population
SSC	Side scatter
SSEA-1	Stage specific embryonic antigen-1

Stat 3	Signal transducer and activator of transcription 3
TAA	Tioacetamida
TAE	Tris-acetate-EDTA
TAGL	Transgelina
TCF	T cell factor-1
TGF-β	Transforming growth factor- β
THO	Transplante de hígado ortotópico
Tm	Temperatura de fusión
TPO	Tromboeritropoyetina
TPM2	Tropomiosina 2
Tris	Tris (hidroximetil)amino metano
TTBS	Tris tampón salino con Tween-20
UI	Unidades internacionales
VCAM	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR2	Vascular endothelial growth factor receptor 2
VLA4	Major ligand very late antigen-4

ÍNDICE

Prólogo.....	1
I. Introducción.....	3
<u>BLOQUE 1.....</u>	5
1. Células madre: Definición, tipos y características.....	5
1.1 Células madre embrionarias.....	7
1.2 iPS “Induced pluripotent stem cells”.....	9
1.3 Células madre adultas.....	11
1.3.1 Médula ósea.....	13
1.3.1.1 HSC.....	14
1.3.1.2 MSC.....	15
1.3.1.3 MAPC.....	17
1.3.1.4 SP.....	19
1.3.2 Progenitores celulares intrahepáticos.....	20
2. Mecanismos moleculares de señalización.....	21
2.1 Ruta Wnt/ β -catenina en el hígado.....	22
2.1.1 Ruta Wnt/ β -catenina canónica.....	23
2.2 Ruta Wnt/ β -catenina canónica en el carcinoma hepatocelular.....	25
2.2.1 Papel de las células madre en el hepatocarcinoma.....	26
<u>BLOQUE 2.....</u>	29
3. Movilización de células madre de médula ósea hacia el hígado.....	30
4. Movilización e hígado: estudios <i>in vivo</i>	32
<u>BLOQUE 3.....</u>	35
5. Terapia celular con células madre procedentes de médula ósea.....	35
5.1 Terapia celular con células mononucleares de médula ósea.....	36
5.2 Terapia celular con HSC.....	37
5.3 Terapia celular con MSC.....	38
5.4 Terapia celular con MAPC.....	39
5.5 Terapia celular con SP.....	40

6. Mecanismos de acción de células madre de médula ósea en la regeneración hepática.....	40
6.1 Efectos paracrinos.....	42
6.2 Rutas de señalización.....	43
II. Objetivos.....	47
III. Material y métodos.....	51
<u>BLOQUE 1</u>.....	53
1. Purificación de distintas poblaciones de células madre adultas.....	53
1.1 Purificación de células madre desde médula ósea.....	53
1.1.1 Purificación de células CD133 ⁺	53
1.1.2 Aislamiento de MSC.....	56
1.1.2.1 Subcultivo de MSC.....	56
1.1.2.2 Recuento celular.....	56
1.1.2.3 Criopreservación de MSC.....	57
1.1.3 Purificación de células MAPC.....	58
1.2 Purificación de células madre CD34 ⁺ movilizadas por aféresis.....	59
1.2.1 Expansión de células CD34 ⁺	61
2. Diferenciación de células madre mesenquimales hacia hepatocitos.....	61
3. Citometría de flujo: marcadores de superficie.....	63
3.1 Adquisición y marcaje.....	64
4. Cuantificación de la expresión génica por RT-PCR.....	65
4.1 Aislamiento del ARN.....	65
4.2 Tratamiento con DNAsa.....	66
4.3 Retrotranscripción.....	67
4.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	67
5. Inmunocitoquímica (ICQ).....	72
6. Tinción PAS o Schiff.....	74
7. Microscopía confocal.....	75

8.	Electroforesis y Western-blot.....	77
8.1	Extracción de la fracción citoplasmática y nuclear... 77	77
8.2	Cuantificación de proteínas por el método Bradford.78	78
8.3	Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE.....	78
8.4	Transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa.....	79
8.5	Inmunodetección y revelado.....	80
9.	Electroforesis diferencial en gel (DIGE).....	83
9.1	Identificación de las proteínas mediante análisis LC- ESI-MS/MS.....	85
10.	Ensayo para la formación de esferas.....	86
11.	Análisis del ciclo celular.....	88
12.	Análisis estadístico.....	89
<u>BLOQUE 2.....</u>		90
13.	Pacientes sometidos a una HP: Criterios de inclusión.....	90
13.1	Hepatectomía parcial.....	92
13.2	Recogida de muestras.....	93
14.	Citometría de flujo en sangre periférica.....	94
15.	Estudio histológico.....	96
15.1	Toma de muestras y fijación del tejido.....	96
15.2	Inclusión en parafina.....	96
15.3	Corte histológico.....	97
15.4	Inmunohistoquímica en biopsias hepáticas.....	97
16.	Determinación de proteínas séricas por ensayo tipo ELISA.....	98
17.	Análisis estadístico.....	100
<u>BLOQUE 3.....</u>		101
18.	Modelo experimental de daño hepático agudo.....	101
18.1	Procedimiento quirúrgico.....	103
18.2	Recogida de muestras en animales.....	103
19.	Estudio histológico en animales.....	104
19.1	Tinción Hematoxilina-Eosina.....	105
19.2	Tinción Tricrómico de Masson.....	105
20.	Bioquímica sérica.....	106
21.	Expresión génica por RT-PCR de tejido hepático.....	107
22.	Ensayo de muerte celular por apoptosis.....	107
23.	Wester-blot en tejido hepático.....	108
24.	Aislamiento de MNC.....	109

25. Estudio de la potencialidad de las MSC infundidas.....	110
25.1 Diferenciación de MSC a osteoblastos.....	110
25.1.1 Tinción Alizarín-red.....	110
25.2 Diferenciación de MSC a adipocitos.....	111
26. mi-RNA.....	112
27. Determinación de IL-6 soluble por ensayo tipo ELISA.....	112
28. Análisis estadístico.....	112
IV. Resultados.....	113
<u>BLOQUE 1.....</u>	115
1. Valoración de la mejor fuente de células madre.....	115
1.1 Médula ósea.....	115
1.1.1 Purificación de células CD133 ⁺	115
1.1.2 Aislamiento de MSC.....	115
1.1.3 Purificación de MAPC.....	116
1.2 Purificación de células madre CD34 ⁺ desde la sangre periférica de pacientes que han sido sometidos a un proceso de aféresis.....	117
2. Diferenciación in vitro de células madre mesenquimales hacia hepatocitos maduros.....	119
3. Papel de la ruta Wnt/ β -catenina durante la diferenciación de células madre mesenquimales a hepatocitos.....	122
4. Análisis del perfil de expresión proteica de los hepatocitos obtenidos por CDH1 y CDH2.....	125
5. Las células diferenciadas con CDH1 expresan p53 durante la diferenciación de MSC hacia hepatocito.....	128
6. Cambios en el inmunofenotípico de las MSC tras la diferenciación a hepatocitos.....	129
7. La activación de la ruta Wnt/ β -catenina incrementa la proliferación celular.....	131
8. El protocolo de diferenciación CDH2 favorece la formación de tumoroesferas.....	133
<u>BLOQUE 2.....</u>	135
9. Porcentaje de células CD34 ⁺ en sangre periférica de pacientes hepatectomizados.....	135

10. Las células CD34 ⁺ detectadas en la sangre periférica de los pacientes hepatectomizados procedían de la médula ósea.....	135
11. Presencia de células CD34 ⁺ en el parénquima hepático de los pacientes sometidos a una hepatectomía parcial.....	137
12. Activación del eje SDF-1/CXCR-4 en pacientes hepatectomizados.....	138
13. Niveles séricos de citoquinas y metaloproteasas en pacientes sometidos a una hepatectomía parcial.....	141
14. Las células CD34 ⁺ que alcanzan el hígado son capaces de estimular el proceso regenerativo.....	142
BLOQUE 3.....	148
15. El tratamiento con tioacetamida origina una lesión aguda de muerte celular y necrosis.....	148
16. La infusión de células madre mesenquimales que han recibido un tratamiento con TAA.....	151
17. La infusión de células madre mesenquimales o su lisado mejoran la funcionalidad tisular en el hígado.....	153
18. Las células madre mesenquimales y sus lisados disminuyen paámetros de muerte celular en el hígado de ratas tratadas con tioacetamina.....	158
19. La infusión de células madre mesenquimales o sus lisados, desencadena la activación de rutas de señalización relacionadas con proliferación, supervivencia y la reducción de la apoptosis.....	159
20. El contenido intracelular de las células madre mesenquimales clave en la restauración de la función del hígado.....	161
V. Discusión.....	165
VI. Conclusiones.....	189
VII. Bibliografía.....	195
VIII. Anexos.....	214

PRÓLOGO

La extraordinaria biología del hígado no ha pasado desapercibida. Ya en la antigua Grecia, Platón detalló en su libro



Protágoras el mito del Prometeo (Platón, Protágoras, 320d-321d). En el se describía como cada día, un águila devoraba el hígado de Prometeo, hígado que todas las noches crecía.

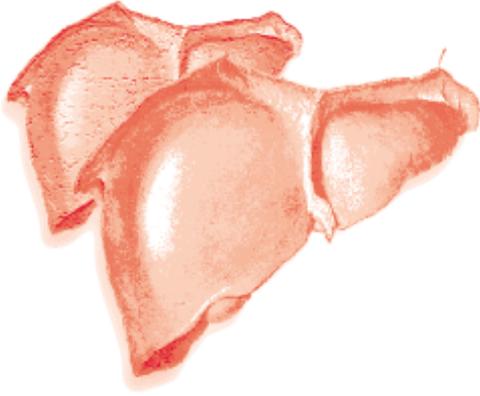
Desde la antigua Grecia a nuestros días todavía nos preguntamos acerca de los mecanismos que controlan esta regeneración. Nuestro conocimiento ha avanzado sin duda muchísimo aunque sin

embargo quedan aún muchas claves que desvelar para llegar a entender la extraordinaria biología del hígado. Esta tesis doctoral trata de contribuir al conocimiento de algunos aspectos de la regeneración hepática a través de tres aproximaciones distintas relacionadas con las células madre. La primera de ellas (Bloque 1) trató de valorar la mejor fuente de células madre adultas para obtener hepatocitos. La segunda (Bloque 2) estudió el papel de la movilización de células madre de médula ósea en pacientes sometidos a hepatectomía. Y finalmente la tercera aproximación (Bloque 3), evaluó el efecto del trasplante o

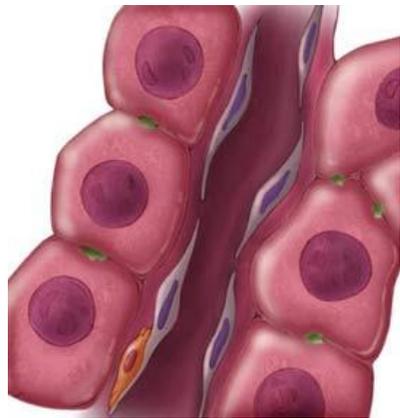
infusión de células madre mesenquimales de médula ósea intactas o de manera lisada sobre la funcionalidad hepática en un modelo experimental de daño hepático agudo.

Aunque cada uno de los bloques aborda la misma temática, para una mejor exposición y comprensión de los resultados obtenidos cada una de las aproximaciones ha sido expuesta y discutida de forma separada.

Nuestras investigaciones han contribuido a incrementar algo más el conocimiento del hígado y sobretodo nos han convencido de la extraordinaria biología del hígado.



I. INTRODUCCIÓN



BLOQUE 1: Diferenciación de células madre de médula ósea hacia hepatocitos

1. Células madre: Definición, tipos características

En 1961m dos investigadores canadienses McCulloh EA y Till JE descubrieron en la médula ósea (MO) de ratones la existencia de células con capacidad auto-replicativa. Su trabajo constituyó la base de la investigación actual en el campo de las células madre (SC, del inglés *Stem cells*)¹.

Las SC son células indiferenciadas capaces de multiplicarse en número con una división asimétrica, en la que una de las células hijas conserva las características genotípicas y fenotípicas de las SC, mientras que la otra célula hija puede diferenciarse hacia un tipo celular determinado (Figura 2). Este conjunto de habilidades que confluyen en las SC se conoce como “stemness”².

Las SC se clasifican en base a las propiedades biológicas que presentan. Entre ellas se encuentra la plasticidad o capacidad de diferenciación hacia distintos tipos de células maduras. En base a esta característica, las SC son:

- Totipotentes: pueden originar un individuo completo
- Pluripotentes: pueden originar células de las tres capas embrionarias
- Multipotentes: pueden originar células de su capa embrionaria
- Unipotentes: sólo pueden diferenciarse a un único tipo celular

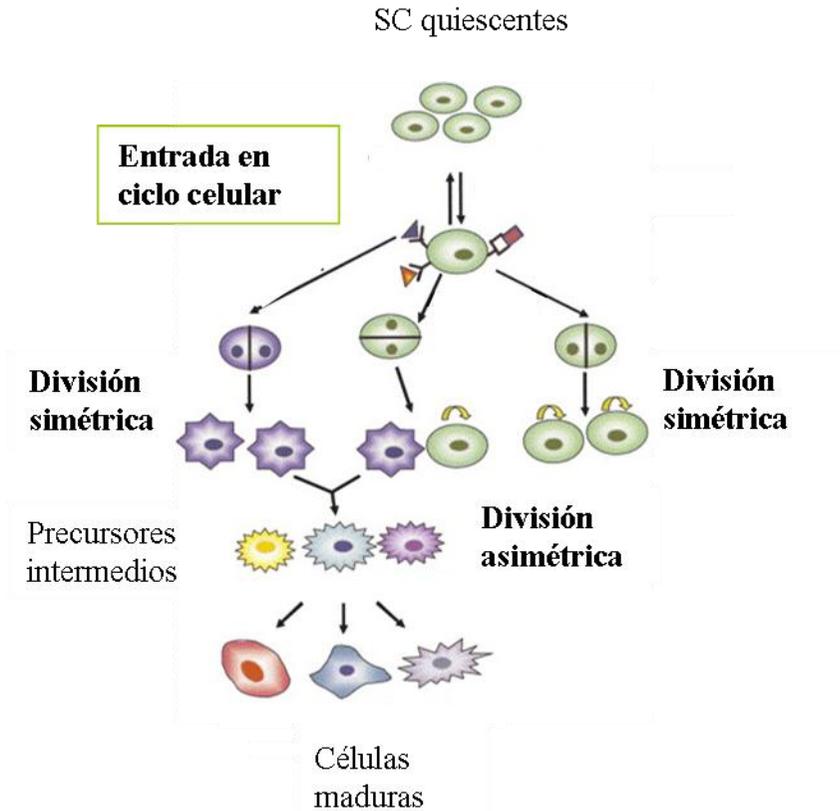


Figura 2. División celular en las células madre. Las células madre pueden dividirse de forma simétrica, multiplicando su número, y de forma asimétrica, diferenciándose una progenie celular determinada.

Las SC también se clasifican en base a su origen en:

- Células madre embrionarias (ESC, del inglés, *Embryonic stem cells*)
- iPS (del inglés, *Induced pluripotent stem cells*)
- Células madre adultas (ASC, del inglés, *Adult stem cells*)

1.1 Células madre embrionarias

Las ESC se localizan en la masa celular interna del blastocisto embrionario. Son SC totipotentes, capaces de originar cualquier tipo de célula somática e incluso un organismo completo. Esta propiedad las convierte, al menos en teoría, en una herramienta muy útil para la medicina regenerativa porque podrían reemplazar cualquier célula madura defectuosa en el organismo (Figura 3) ³.

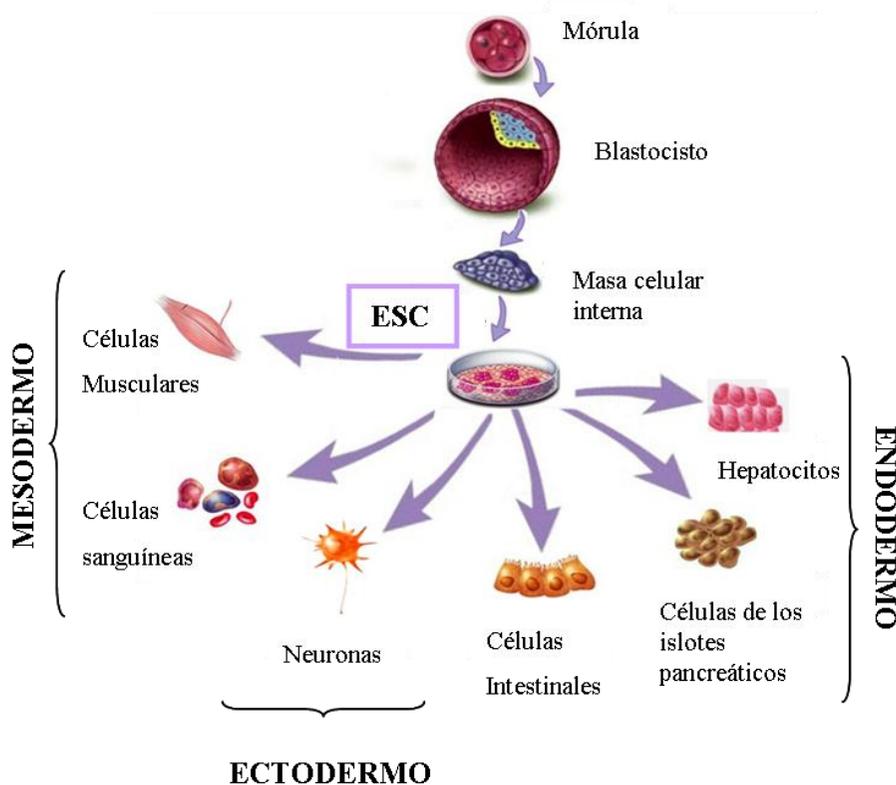


Figura 3. Plasticidad de las células madre embrionarias (ESC). Las ESC se aíslan desde la masa celular interna del blastocisto embrionario y en cultivo pueden originar cualquier tipo de células adultas perteneciente a cualquiera de las tres capas embrionarias.

Se caracterizan por tener una gran capacidad autorrenovadora gracias a la activación de factores de transcripción como Oct-4, Sox-2, GATA-4/6 y SSEA1, y a que son telomerasa positivas ⁴. En cultivos *in vitro*, el tratamiento con LIF (del inglés, *Leukocyte inhibitory factor*) ayuda a favorecer el mantenimiento de las ESC en un estado proliferativo sin pérdida de potencialidad ⁵. En base a estos indicios las ESC se han postulado como una posible herramienta para realizar una terapia celular eficaz ante diversas patologías humanas.

La diferenciación hacia hepatocitos a partir de ESC se ha demostrado ampliamente en estudios *in vitro* ⁶ e *in vivo* ⁷, y en este proceso parece ser clave la activación de factores de transcripción como BMP-4 (del inglés, *Bone morphogenetic proteín*) ⁸, HNF-4 α (del inglés, *Hepatocyte nuclear factor 4 α*) ⁹ y HNF-3 β (del inglés, *Hepatocyte nuclear factor 3 β*) ¹⁰. Las células diferenciadas expresan marcadores génicos y proteicos característicos de hepatocitos maduros como albúmina (ALB), α 1-antitripsina (α 1-AT), α -fetoproteína (α -FP), citoqueratina-8 (CK-8) y/o CK-18. Los hepatocitos generados, desarrollan funciones hepáticas específicas como la secreción de albúmina, la producción de LDL (del inglés, *Low density protein*), el almacenaje de glucógeno y/o la inducción de la actividad citocromo P450 ¹¹. De hecho en un estudio donde se transplantaron ESC en ratones deficientes para la enzima fumarilacetoacetato hidrolasa se ha comprobado que las ESC son capaces de integrarse en el parénquima hepático, proliferar y reemplazar los hepatocitos deficientes favoreciendo así un proceso regenerativo con una mejora en la funcionalidad hepática ¹².

Sin embargo, la investigación con ESC presentan una serie de limitaciones. Su aislamiento conlleva la interrupción del desarrollo embrionario, y por tanto, su utilización podría generar problemas éticos y legales. Además, el número de células que se consiguen extraer es bajo, y aunque por sus características biológicas tienen un elevado potencial proliferativo, las ESC tendrían que cultivarse a largo plazo para conseguir el número de células necesaria para realizar terapia celular. Además la prolongación del cultivo celular en el tiempo podría derivar en la formación de teratomas ¹³. También hay que tener en cuenta, que una infusión o trasplante de ESC es siempre un trasplante alogénico, que involucra un donante y un receptor que no son idénticos y por tanto presentan diferentes antígenos HLA en superficie. De esta manera el trasplante de ESC podría desencadenar un rechazo inmunológico.

1.2 iPS “Induced pluripotent stem cells”

A través de ingeniería genética se ha conseguido reprogramar células somáticas maduras consiguiendo un estado pluripotente similar al embrionario a través de la expresión de factores de transcripción Oct-3/4, Sox-2, Klf-4 y *cMyc* (Figura 3). Estas células se conocen como iPS (del inglés, *Induced pluripotent stem cells*). Las primeras iPS fueron obtenidas desde fibroblastos murinos por el Dr. Yamanaka, premiado con el premio Nobel de Medicina por este hallazgo ¹⁴, pero también se han derivado iPS desde fibroblastos humanos ¹⁵.

En la actualidad constituyen una herramienta de trabajo muy prometedora representando una alternativa terapéutica con mucho

potencial para la terapia celular y la medicina regenerativa. *In vitro* podrían ser manipuladas como ESC y ni su obtención ni su uso generarían inconvenientes éticos ni legales. Las iPS podrían ser específicas de cada individuo, y no generaría un rechazo inmunológico.

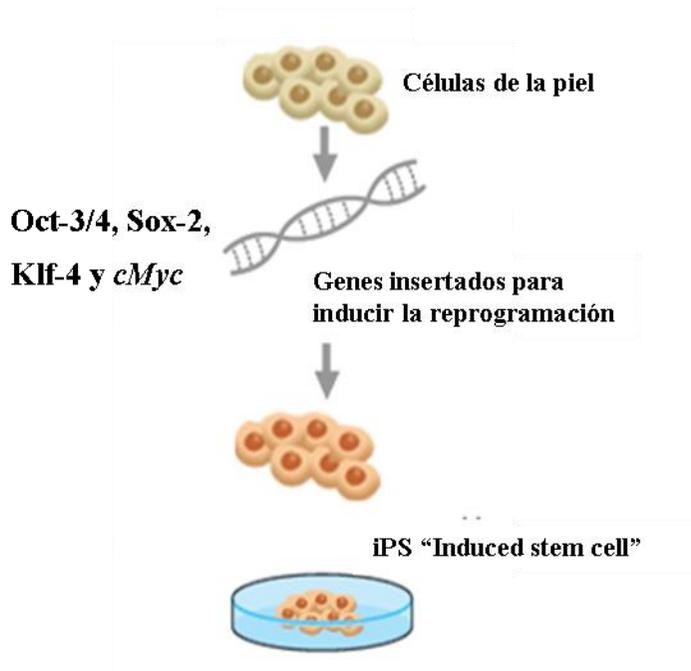


Figura 4. Generación de iPS desde células de la piel

En el campo de la hepatología, se ha demostrado que las iPS pueden originar hepatocitos *in vitro* en presencia de citoquinas como HGF (del inglés, *Hepatocyte growth factor*), FGF-4 (del inglés, *Fibroblast growth factor-4*), oncostatina M (OSM) y dexametasona ¹⁶. Los hepatocitos diferenciados tienen capacidad de expresar genes hepatoespecíficos entre los que destacan HNF-4 α , α -FP, ALB, y poseen cierta actividad funcional, dada su capacidad para almacenar glucógeno y producir LDL ¹⁷.

Las iPS pueden constituir un buen modelo para profundizar en el estudio de ciertas enfermedades humanas. Se han aislado fibroblastos para originar iPS de pacientes que sufren una enfermedad congénita hepática como el déficit en α 1-AT, glucogenosis tipo 1a o enfermedad de Von Gierke, hipercolesterolemia familiar, síndrome de Crigler-Najjar y/o tirosinemia hereditaria tipo I, que contienen el genotipo específico de cada enfermedad. A partir de estas iPS se pueden desarrollar líneas celulares que servirían como modelo para estudiar cuál es la causa de la desregulación metabólica en estas patologías ¹⁸. Incluso, pueden ser un instrumento adecuado para la investigación en biología del desarrollo porque contienen la memoria epigenética del tejido donante ¹⁹.

Sin embargo el uso de las iPS presenta una serie de limitaciones. Los factores de transcripción requeridos para la transformación celular son introducidos en la célula diana en vehículos que generalmente son virus o construcciones génicas con base vírica. Este mecanismo podría limitar su utilidad terapéutica en humanos, por la integración de secuencias de ADN viral en el genoma receptor y que podrían favorecer el desarrollo de futuros procesos patológicos en el receptor ²⁰.

1.3 Células madre adultas

Las ASC son pequeñas poblaciones celulares con características “stemness” que se alojan en diferentes localizaciones o nichos del organismo como MO, sangre de cordón umbilical, tejido adiposo, endotelio, hígado, músculo, tejido nervioso, pulpa dentaria,

epidermis...etc. Constituyen un reservorio de células que se organiza en un determinado tejido, y que reemplazan células dañadas por envejecimiento o por una lesión del tejido ²¹. En condiciones normales se mantienen en estado quiescente pero ante un daño tisular podrían activar la división o mitosis celular y diferenciarse a células somáticas.

Las ASC presentan una gran plasticidad celular, y pueden originar distintos tipos celulares del organismo de cualquiera de las tres capas embrionarias (Figura 5).

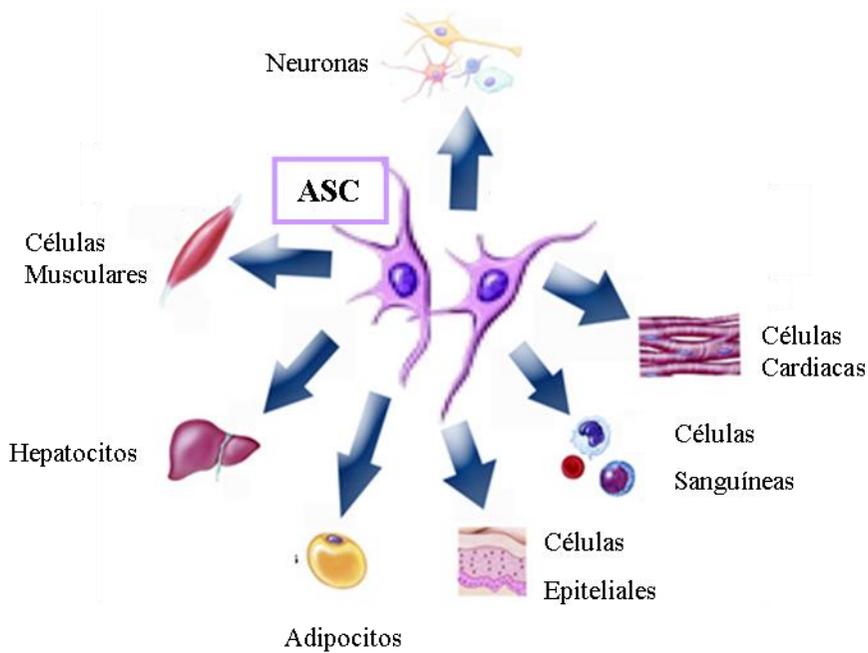


Figura 5. Pluripotencia de las células madre adultas (ASC). Las ASC tienen capacidad para diferenciarse a cualquier célula somática perteneciente a cualquiera de las tres capas embrionarias.

Además, las ASC tienen capacidad para salir de su nicho habitual y dirigirse hacia otro tejido diana donde favorece el desarrollo de un proceso regenerativo activado tras una lesión. Esta

capacidad migratoria de las ASC se conoce como “Movilización celular” y será expuesto en el siguiente bloque de experimentos de esta tesis doctoral. El microambiente (homing) del nicho que alberga las ASC juega un papel importante en su biología controlando el equilibrio entre la quiescencia celular, auto-renovación, movilización y diferenciación hacia las distintas células somáticas ²².

A continuación se detallan las características biológicas de algunas fuentes de ASC:

1.3.1 Médula ósea

La MO es un tejido esponjoso que se encuentra en el canal medular de los huesos largos y en las cavidades de huesos planos como la cresta ilíaca, esternón o el cráneo. En estos huesos se distingue dos tipos de MO: roja y amarilla.

La MO roja se encuentra en los huesos planos y en la epífisis de los huesos largos. Recibe su nombre porque en ella se lleva a cabo la hematopoyesis, proceso mediante el cuál se originan todas las células del sistema sanguíneo (células rojas, células blancas y plaquetas). Por otro lado, la médula amarilla se localiza en la diáfisis de los huesos largos, y está constituida fundamentalmente por tejido adiposo. Actúa como reserva energética para las células que llevan la hematopoyesis.

La MO constituye uno de los principales reservorios de ASC en el organismo. Actualmente, las BM-SC (del inglés, *Bone marrow stem cells*) constituyen un candidato muy destacable para su uso en medicina regenerativa principalmente porque pueden ser obtenidas con técnicas

no demasiado invasivas y del propio paciente. Por tanto, el trasplante celular no induciría un rechazo inmunológico, al tratarse de un trasplante autólogo.

En la MO roja se distinguen 4 tipos de BM-SC:

- Hematopoyéticas (HSC, del inglés, *Hematopoietic stem cells*)
- Mesenquimales (MSC, del inglés, *Mesenchymal stem cells*)
- MAPC (del inglés, *Multipotent adult progenitor cells*)
- SP (del inglés, *Side population*)

1.3.1.1 Células madre hematopoyéticas

Las HSC fueron identificadas por primera vez en 1961 por Till JE y McCulloch EA ¹. Constituyen entre un 1-3% del total celular de la MO, siendo la población de SC más abundante en este tejido. Se localizan cerca de la superficie del hueso o asociadas al endotelio sinusoidal. Su principal función es la hematopoyesis.

Existen poblaciones de HSC en otros compartimentos del organismo como sangre del cordón umbilical, placenta, y en menor medida en sangre periférica. Estas HSC se definen por un inmunofenotipo característico de antígenos en superficie. Probablemente sean la población de BM-SC mejor definida. En humanos, son CD34⁺, CD133^{+/-}, CD38^{low/-}, CD117⁺, CD45⁺ y Lin⁻ ²³. Las células CD133⁺ constituyen el estadio más inmaduro de las HSC y se postulan como las HSC con mayor potencialidad ²⁴.

Se pueden aislar fácilmente mediante kits comerciales inmunomagnéticos que reconocen sus marcadores de superficie. El número obtenido es bajo, pero el tratamiento con citoquinas como SCF

del inglés, *Stem cell factor*), G-CSF (del inglés, *Granulocyte-colony stem factor*), tromboeritropoyetina (TPO), Flt-3-ligando (Flt3-L), IL-6 (del inglés, *Interleukin-6*), IL-3, VEGF (del inglés, *Vascular endothelial growth factor*) y FGF-a (del inglés, *Fibroblast growth factor-acidic*) favorecen su multiplicación en cultivo sin perder su potencialidad para originar células de las tres capas embrionarias ²⁵.

La capacidad de diferenciación de las HSC hacia hepatocitos se ha demostrado *in vitro* en presencia de distintas combinaciones de citoquinas. Entre ellas destaca el tratamiento con HGF, junto con otros factores como SCF, FGF-a y FGF-b (del inglés, *Fibroblast growth factor-basic*). Las células resultantes mostraban altos niveles de expresión de genes y proteínas relacionados con hepatocitos, como albúmina, CK-18, CK-19 y α -FP ²⁶. Asimismo, distintos trabajos de investigación han puesto de manifiesto que las HSC también pueden originar hepatocitos funcionales *in vivo* ^{27 28}. No obstante, algunos investigadores dudan del proceso de diferenciación y creen que realmente estas HSC tras alojarse en el parénquima hepático, se fusionan con los hepatocitos residentes ²⁹.

1.3.1.2 Células madre mesenquimales

Las MSC fueron identificadas por Friedenstein et al. en 1974 ³⁰. Se localizan en el estroma medular y representan menos del 1% del total celular de la MO. Existen poblaciones de MSC en otros compartimentos del organismo como sangre del cordón umbilical, tejido adiposo, y en menor medida en sangre periférica de forma circulante.

Las MSC constituyen el soporte sobre el que se depositan las HSC, proporcionándoles el microambiente adecuado para que se lleve a cabo la hematopoyesis. Esta población celular se caracteriza por tener una morfología fibroblástica, por presentar una alta capacidad proliferativa y una gran plasticidad para originar múltiples tipos de células maduras como adipocitos, condrocitos, osteoblastos, cardiomiocitos, células musculares, hepatocitos ³¹. Las MSC conforman una población muy heterogénea, que se definen como células positivas para SH₂, SH₃, CD105, CD73, CD90, y negativas para CD34, CD45, CD14, CD19, CD3 y HLA-DR ³².

Entre las distintas propiedades biológicas que poseen las MSC destaca su capacidad para modular el sistema inmunológico, por la ausencia de moléculas de HLA en su superficie. Esta característica las convierte en un excelente candidato en la clínica para la medicina regenerativa en distintas patologías ³³. Las MSC son capaces también de inhibir la proliferación y neutralizar la acción de las células de defensa del organismo como linfocitos T, B, células dendríticas y células NK, a través de IFN- γ ³⁴. Sin embargo, posiblemente la heterogeneidad que conforma la población de MSC es la principal limitación para utilizarlas en terapia celular.

En el laboratorio se aíslan por su capacidad de adherirse a superficies de plástico y se multiplican en número rápidamente en presencia de FGF-b sin perder la potencialidad para diferenciarse a múltiples tipos de células especializadas ³⁵. En el proceso de diferenciación hacia hepatocitos, las MSC son cultivadas en presencia de citoquinas como HGF, FGF-b, EGF (del inglés, *Epidermal growth*

factor) junto a factores que participan en el metabolismo hepático como nicotinamida, dexametasona, OSM e ITS (insulina-transferrina-selenio)³⁶. Las células resultantes expresan marcadores hepatoespecíficos como ALB, CK-18, α -FP, glucosa-6-fosfato, HNF-4 α . Además tienen cierta funcionalidad porque pueden almacenar glucógeno y producir urea³⁷. Otros autores han encontrado incluso actividad enzimática característica de células hepáticas como la del citocromo P450³⁸. En este proceso de diferenciación parece jugar un papel fundamental la activación de factores de transcripción como HNF-3 β ³⁹ y c/EBP- α ⁴⁰.

En otros estudios, consiguen una diferenciación a hepatocitos efectiva mediante el co-cultivo con células hepáticas⁴¹ o utilizando matrices tridimensionales⁴². Incluso esta capacidad para originar hepatocitos funcionales se ha demostrado ampliamente en distintos modelos experimentales in vivo^{43 44}.

1.3.1.3 MAPC “Multipotent adult progenitor cells”

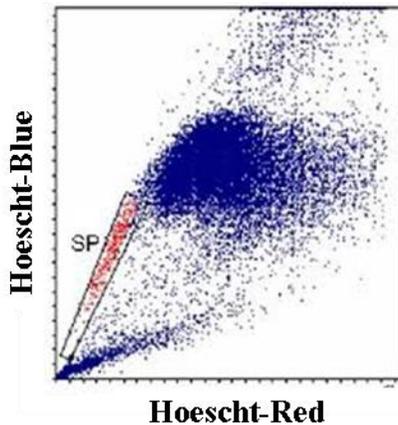
Las MAPC fueron descubiertas en la MO con cierta controversia por el grupo de Verfaillie et al⁴⁵. En la MO constituyen menos del 0.1% del total de células. También se han encontrado poblaciones MAPC en otras localizaciones como el cerebro y músculo⁴⁶. En su inmunofenotipo expresan bajos niveles de Flk-1, CD90, Sca-1, SSEA-1 (murinos) / SSEA-4 (humanos) aunque se definen como células negativas para marcadores como CD45, CD3, CD19, CD34, CD117, CD44, Glicoforina A (Gly-A), MHC-I y MHC-II. De hecho, se aíslan mediante técnicas de marcaje inmunomagnético o sorting como células negativas para CD45 y Gly-A⁴⁷.

Morfológicamente, las MAPC son muy semejantes a las MSC, sin embargo, biológicamente se parece mucho más a las ESC. De hecho, son células telomerasa positivas, lo que les proporciona una fuerte estabilidad genética a largo plazo, y contienen factores de transcripción característicos de las ESC como GATA-4, HNF-4 α , Sox17, Oct-4 y Fox-a2 que les proporciona una gran capacidad proliferativa. Además tienen una alta plasticidad y pueden diferenciarse a células somáticas funcionales de cualquiera de las tres capas embrionarias ⁴⁸.

Las MAPC, al igual que las MSC tienen propiedades inmunomoduladoras, lo que las convierten en un firme candidato para su utilización en medicina regenerativa. Las MAPC impiden la activación y la proliferación de las células T, disminuyendo así el rechazo provocado por el sistema inmunológico. Su utilización en pacientes que han sufrido un trasplante podría ser idónea para sustituir a los fármacos inmunosupresores ⁴⁹.

Las MAPC son también células con una gran pluripotencia para diferenciarse a numerosos tipos de células somáticas ⁵⁰. En concreto, la capacidad para originar hepatocitos ha sido ampliamente demostrada en ensayos *in vitro* e *in vivo* ⁵¹. En presencia de HGF y FGF-4, las MAPC originan células que presentan características específicas de hepatocitos, pues son células binucleadas, con expresión de marcadores hepatoespecíficos como ALB, α -FP, CK-18, CK-19, y transtiretina. Además tienen cierta funcionalidad hepática porque poseen actividad citocromo P450, pueden producir LDL y almacenar glucógeno ⁵¹.

1.3.1.4 SP “Side population”



Esta población se descubrió en base a su capacidad para eliminar el citofluorocromo Hoechst 33342 a través de dos transportadores de membrana: ABCG2 y glicoproteína P⁵² (Figura 6).

Figura 6. Análisis por citometría de flujo de una población de células madre Side population en una Médula ósea humana

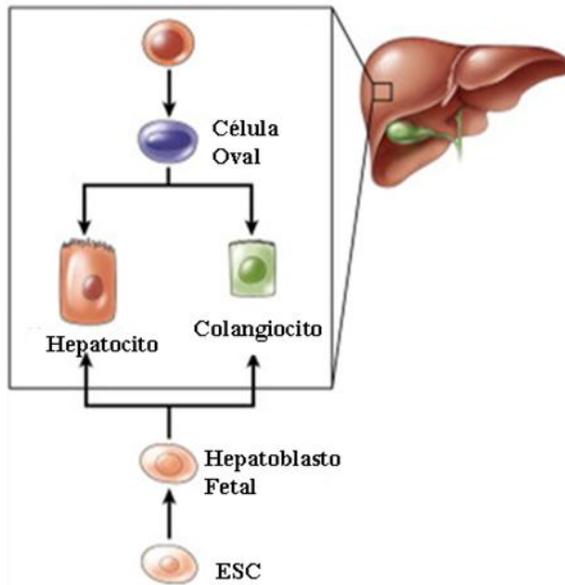
Se encuentran principalmente en la MO, dónde representan menos del 0.02%. Las SP se han detectado en otros compartimentos del organismo como sangre periférica, sangre de cordón umbilical, endometrio, pulmón, riñón, piel, córnea, músculo esquelético...⁵³. El inmunofenotipo que presentan en superficie las SP tampoco está claramente determinado pero se identifican como células CD34⁻⁵⁴. Aunque se han encontrado SP que contienen células CD34⁺⁵⁵ y células CD133⁺⁵⁶. En base a estas características, las poblaciones SP se aíslan por técnicas de sorting. Las SP pueden diferenciarse *in vitro* a hepatocitos en presencia de citoquinas como HGF, EGF, dexametasona e insulina. Las células resultantes contenían un citoplasma rico en gránulos y eran binucleadas. Cuando se analizó la expresión de genes hepatoespecíficos, se encontraron altos niveles de ALB, CK-18, el marcador de proliferación de hepatocitos HepPar y α 1-AT, así como una alta actividad del citocromo P450⁵⁷.

1.3.2 Progenitores intra-hepáticos (Células ovals)

Entre los distintos componentes celulares que conforman el parénquima hepático se encuentra una población de ASC específica del hígado. Se conocen como progenitores celulares intra-hepáticos (HPC, del inglés, *Hepatic progenitor cells*) en humanos, y como células ovals (OC, del inglés, *Oval cells*) en modelos murinos porque su núcleo tiene morfología ovoide y presentan un alto ratio núcleo/citoplasma. Esta población fue descubierta en ratones por Wilson JW y Leduc EH en 1958⁵⁸, y años más tarde, en 1978 también fue descrita en el hígado de ratas por Shinozuka et al⁵⁹. Las HPC / OC se localizan principalmente en los canales de Hering de la red de canalículos biliares del hígado⁶⁰, aunque también se han encontrado en la región periportal del lobulillo hepático⁶¹. Se caracterizan por ser bipotenciales: pueden diferenciarse a hepatocitos y colangiocitos. De hecho, expresan proteínas características de células pertenecientes a un linaje hepatocítico como ALB, glucosa-6-fosfato, CK-8, CK-18, CK-7 y CK-19⁶⁰. En condiciones normales permanecen en estado quiescente, pero ante una lesión aguda severa o un daño crónico pueden activarse y multiplicarse rápidamente originando hepatocitos y colangiocitos. De hecho, se postula que el número de HPC / OC es directamente proporcional a la severidad de la lesión⁶².

La proliferación y activación de las HPC se conoce en humanos como *reacción ductular*⁶³. El inmunofenotipo que presentan en superficie no está claramente definido. En modelos murinos, se conocen como células OV6⁺, aunque también se ha observado que co-expresan otros marcadores como Sca-1, CD45⁺, CD34⁺ y CD117⁺⁶⁴.

Figura 7. Células progenitoras intra-hepáticas / Células ovales son bipotenciales



También presentan la habilidad de expulsar Hoechst 33342 a través del transportador ABCG2 como las SP⁶⁵. Por otro lado, la población de HPC encontrada en hígados humanos, también presentan en superficie marcadores característicos de BM-SC como CD34, CD117, CD90⁶⁶.

Por este hecho, algunas teorías proponen a la MO como la posible procedencia de las HPC / OC que se alojan en el parénquima hepático para participar en el proceso regenerativo. Sin embargo, también se ha detectado que son células α -FP positivas, marcador característico de los hepatoblastos fetales⁶⁷. En base a esta propiedad, surgen otras teorías que sugieren que estas células en realidad son hepatoblastos fetales que han quedado remanentes en el hígado.

2. Mecanismos moleculares de señalización

En el transcurso del proceso de diferenciación celular hacia un determinado tipo de células somática, las ASC activan y desactivan una o varias cascadas de señalización intracelular⁶⁸. Estas rutas están

relacionadas a menudo con el mantenimiento de las propiedades específicas de estas ASC ⁶⁹. Así por ejemplo se ha publicado que en el proceso de diferenciación hacia osteoblastos, rutas como Wnt/ β -catenina y Notch deben estar activadas al inicio del proceso. Sin embargo, en el caso de la generación de adipocitos la ruta Wnt/ β -catenina debe estar inactivada.

El papel de estas cascadas de señalización intracelular no está muy descrito durante el proceso de diferenciación hacia hepatocitos. Algunos trabajos han sugerido la inactivación de la ruta Wnt/ β -catenina ⁷⁰. De hecho, la inhibición de la ruta con la presencia de ARN interferentes o con un tratamiento con inhibidores de la ruta induce la diferenciación de BM-SC a hepatocitos ⁷¹.

En el siguiente apartado se explica detalladamente esta ruta.

2.1. Ruta Wnt/ β -catenina en el hígado

Esta ruta de señalización que se encarga de regular la biología y comportamiento de las SC. Está muy conservada desde un punto de vista evolutivo y es clave en el desarrollo embrionario así como en el mantenimiento de la homeostasis celular en el organismo adulto. A nivel celular, la ruta Wnt controla los procesos básicos como proliferación, migración, apoptosis así como la diferenciación celular hacia un determinado linaje celular ⁷².

El estudio de esta ruta se divide en: *Canónica o dependiente de β -catenina*, la ruta *No canónica o dependiente de Calcio y plana o polar*.

La ruta Wnt/ β -catenina canónica destaca por ser una ruta clave durante la embriogénesis hepática participando en la regulación de la proliferación y diferenciación de hepatoblastos a hepatocitos o en procesos como la zonación hepática ⁷³. Incluso se ha relacionado a β -catenina con la regulación del metabolismo hepático, particularmente controlando la producción de glucosa e insulina ⁷⁴. Por otro lado, cuando se produce una lesión en el hígado, se ha encontrado la presencia de β -catenina nuclear en los hepatocitos que participan en el proceso regenerativo. Así, se cree que la activación de esta ruta es responsable del mantenimiento de la capacidad proliferativa de los hepatocitos ⁷⁵. Además esta ruta es particularmente importante en el hígado ya que ha sido involucrada con la generación y progresión del hepatocarcinoma (HCC) ⁷⁶.

2.1.1 Ruta Wnt/ β -catenina canónica

La figura 8 contiene un esquema detallado de la ruta Wnt/ β -catenina canónica. Como se puede observar, cuando esta ruta está inactiva, β -catenina se encuentra en el citoplasma secuestrada por un complejo proteico formado por GSK-3 β , Axin, APC y CK-I α . Allí, β -catenina es fosforilada en residuos serina/treonina, y se convierte en diana para ser degradada por ubiquitinación.

La ruta se activa cuando un ligando perteneciente a la familia de glicoproteínas Wnt se une a un receptor de 7 dominios transmembrana de la familia Frizzled (Fzd). Esta interacción con el ligando permite a Fzd, junto al co-receptor LRP5/6, activar a una proteína citoplasmática Dsh (del inglés, *Dishevelled*). Dsh inhibe al complejo formado por

GSK-3 β , Axin, APC y CK-I α , permitiendo la liberación de β -catenina, que se acumula en el citoplasma y se trasloca al núcleo, dónde interacciona con TCF/LEF regulando la expresión génica de genes diana claves en la proliferación celular como ciclina D1 ó el oncogen *c-Myc*^{77 78}. Los coactivadores CBP y p300 también se unen a β -catenina promoviendo la maquinaria transcripcional^{79 80} (Figura 8).

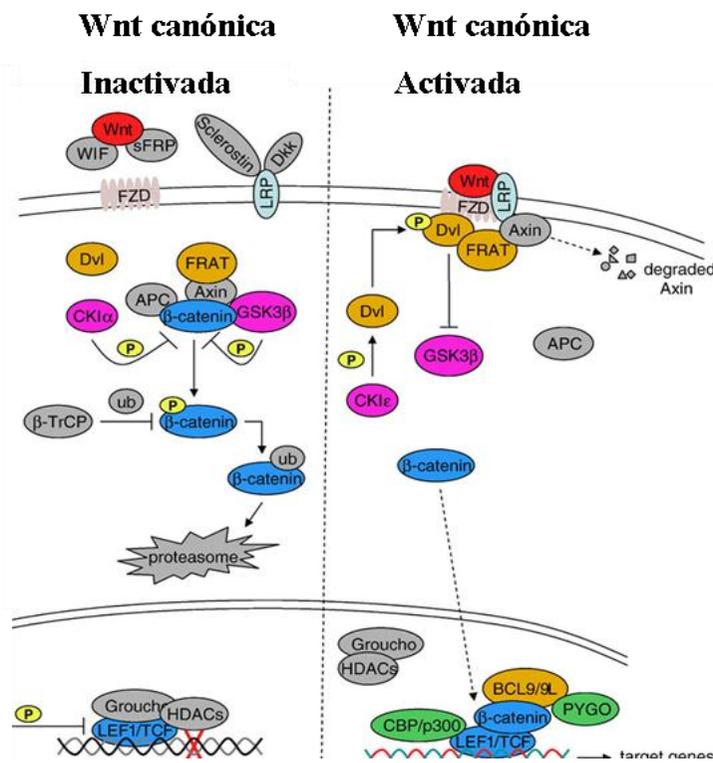


Figura 8. Esquema de la ruta Wnt/ β -catenina publicado por Ling L. et al⁶⁸

β -catenina también puede permanecer anclada a la membrana plasmática de la célula, dónde interacciona con moléculas de adhesión como E-cadherina favoreciendo la comunicación célula a célula⁸¹.

La ruta Wnt/ β -catenina tiene una fuerte regulación por retroalimentación negativa. Uno de los principales elementos inhibidores de la ruta es DKK-1 que interacciona con LRP5/6 impidiendo la unión de Fzd con Wnt ⁸². DKK-1 también puede actuar junto a una proteína citoplasmática denominada Kremen, impidiendo la traslocación de β -catenina al núcleo. Sin embargo, en ausencia de DKK-1, Kremen es capaz de realizar la acción contraria, y favorece la actividad de la ruta ⁸³. Otros inhibidores de la ruta son esclerostina o los de la familia SFRP (del inglés, *Secreted Frizzled related protein*) que compiten por Fzd impidiendo o dificultando la unión de Wnt ⁸⁴.

2.2 Ruta Wnt/ β -catenina en el carcinoma hepatocelular

La activación de la ruta Wnt/ β -catenina está estrechamente relacionada con la aparición o el desarrollo de distintos procesos tumorales. De hecho, en un 26,4% de los HCC se han detectado mutaciones en el mecanismo de regulación de la ruta Wnt/ β -catenina desencadenando una excesiva traslocación de β -catenina al núcleo ⁸⁵. La mutación en el exón 3 del gen de β -catenina es una de las más habituales aunque se han detectado otras en genes reguladores de la ruta como Axin. En otros pacientes se ha encontrado una sobreexpresión de receptores de la familia Fzd como Fzd-3/6/7 y de ligandos de la familia Wnt como Wnt-3/4/5a. Incluso, recientemente se ha descubierto que modificaciones epigenéticas como metilaciones también favorecen la sobre-activación de la ruta Wnt en células tumorales hepáticas ⁸⁶. El exceso de β -catenina nuclear, y por tanto, una expresión descontrolada de los genes diana de la ruta como *c-Myc*, un

oncogen relacionado con HCC ⁸⁷, o ciclina D1, subunidad reguladora para la transición G1/S del ciclo celular provoca que los hepatocitos abandonen su estado normal de quiescencia y entren en ciclo celular. También se han encontrado altos niveles de expresión de moléculas de adhesión como EpCAM que facilita la migración celular ⁸⁸. De hecho, la activación de la ruta Wnt/ β -catenina no sólo se ha relacionado con la aparición y progresión del HCC ⁸⁹, sino también con la recurrencia tumoral ⁹⁰, la resistencia a quimioterapia y la transición epitelio-mesenquimal ⁹¹.

2.2.1 Papel de las células madre en el hepatocarcinoma

Recientemente, se ha establecido una interconexión entre la biología de las ASC y el cáncer. En concreto, se cree que las ASC podrían estar implicadas en la aparición, expansión y progresión del HCC ⁹². En condiciones normales, en el nicho que alberga a las ASC se establece un equilibrio entre la autorrenovación y la diferenciación hacia células maduras específicas que han envejecido o sufrido un determinado daño. Sin embargo ante determinadas circunstancias como la exposición a tóxicos o sustancias mutagénicas se produce un desequilibrio fisiológico en las ASC que desencadena una fuerte activación de su capacidad proliferativa. Estas células reciben el nombre de células madre del cáncer (CSC, del inglés, *Cancer stem cells*) ^{93 94} (Figura 9).

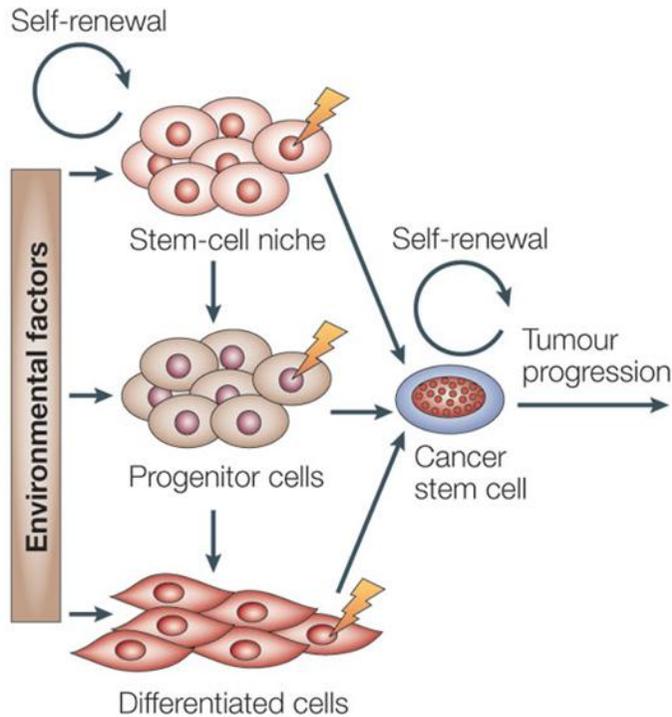


Figura 9. El nicho en el cuál se hospedan las células madre puede ser fundamental para explicar el origen de las células madre del cáncer. Publicada por Nature Publishing Group. Nature Reviewa/Cancer

Sin embargo, los mecanismos de regulación intracelulares responsables de la conversión de ASC en CSC se desconocen. No obstante, existen evidencias que permiten relacionar rutas de señalización como Wnt/ β -catenina con la aparición de CSC⁹⁵.

En la actualidad se investiga cuál es el inmunofenotipo de las CSC que podrían participar en el HCC con el objetivo de desarrollar tratamientos que frenen el avance del procesos tumoral^{96 97}. Principalmente se han identificado como células CD133⁺, aunque también se ha comprobado que expresan otros marcadores en superficie como CD29, CD34, CD44, CD49f, CD90 y CD117, los cuáles se expresan también en células madre^{98 99}.

Por tanto, con estos antecedentes el objetivo principal de este bloque de experimentos será aislar y cultivar distintas poblaciones de BM-SC para diferenciarlas hacia hepatocitos con el fin de discernir cuál es la fuente de SC más adecuada para conseguir una diferenciación eficaz hacia hepatocitos. Otro objetivo será valorar el papel de la ruta Wnt/ β -catenina en el transcurso de este proceso de diferenciación y su posible implicación en el desarrollo de un fenotipo tumoral.

BLOQUE 2: Papel de la movilización de células madre de médula ósea en pacientes con patologías hepáticas

El hígado es un órgano capaz de regenerarse tras sufrir una lesión y recuperar así una funcionalidad hepática normal en un corto periodo de tiempo. Sin embargo, no se conoce con exactitud como transcurre este complejo proceso. Se sabe que los hepatocitos juegan un papel primordial. De hecho, inmediatamente después de producirse un daño, los hepatocitos abandonan su estado de quiescencia normal y rápidamente entran en ciclo activando su división celular. El resto de poblaciones celulares que conforman el parénquima hepático, también participan en el proceso regenerativo y actúan en coordinación con los hepatocitos (Figura 10).

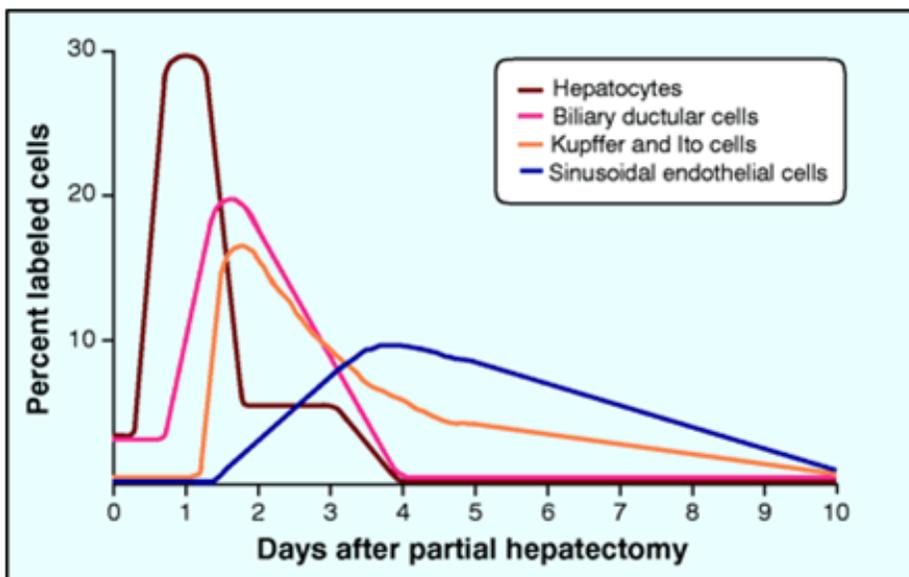


Figura 10. Cinética de las distintas poblaciones celulares que componen el parénquima hepático tras una hepatectomía parcial. Imagen publicada por Michalopoulos GK and De Frances et al.¹⁰⁰

Recientemente se ha propuesto que otras ASC como las BM-SC también podrían participar y favorecer el proceso regenerativo en el hígado. Si bien, su eficacia y regulación es hoy objeto de discusión.

3. Mobilización de células madre de médula ósea hacia el hígado

Las BM-SC pueden abandonar la MO y dirigirse, a través del torrente circulatorio, hacia un tejido diana que ha sufrido una lesión, contribuyendo así a mantener la homeostasis celular del órgano dañado. Esta migración o movilización de las BM-SC se ha descrito en los principales tejidos del organismo tales como el corazón, el hígado o el riñón, y está estrictamente regulada por el eje SDF-1/CXCR-4.

El SDF-1 es una quimioquina que atrae selectivamente a células que expresan en su superficie el receptor CXCR-4 como las BM-SC. Se produce en las células del estroma de la MO y en células epiteliales de distintos órganos. La secuencia genética de SDF-1 está muy conservada entre las distintas especies y se ha relacionado con la supervivencia en las BM-SC ¹⁰¹.

La movilización de BM-SC hacia el hígado es un proceso muy complejo en el que interaccionan factores relacionados con el daño y la regeneración hepática como enzimas, citoquinas y quimioquinas que participan en la regulación de la biología de las BM-SC. Dalakas et al. ¹⁰² publicaron un esquema explicativo de movilización de BM-SC desde la MO hacia el hígado tras una insuficiencia aguda o crónica (Figura 11).

Tras producirse un daño en el hígado o ante condiciones de estrés, los niveles de SDF-1 se reducen bruscamente en la MO y a su vez se elevan tanto en la sangre periférica como en el propio hígado, siendo este aumento máximo en el tejido hepático. Por tanto se establece un gradiente de SDF-1 que permite a las BM-SC alcanzar desde su reservorio medular y alojarse en el parénquima hepático. En el interior de la MO, las MSC liberan SDF-1 para dirigir a las HSC (CXCR-4⁺) alcanzan la matriz ósea. Una vez allí, las HSC son liberadas hacia el torrente circulatorio través del cual alcanzan el hígado. Cabe destacar también la participación de moléculas de adhesión como VLA-4/VCAM-1 y LFA-1/ICAM-1 claves en la migración de las BM-SC por el torrente circulatorio hasta alcanzar el hígado ^{102 103}.

Simultáneamente, la fuerte respuesta inflamatoria que se produce en el hígado desencadena un incremento en los niveles séricos de IL-8 e IL-12. Ambas interleuquinas desencadenan el aumento de los niveles circulantes de metaloproteasas como MMP-2 y MMP-9 desde los neutrófilos de la MO ¹⁰⁴. Estas enzimas constituyen una pieza fundamental en el proceso movilizador, ya que se encargan de descomponer la matriz ósea permitiendo así la liberación de las BM-SC al torrente sanguíneo ¹⁰⁵. Paralelamente, también se elevan los niveles séricos de distintas citoquinas y quimioquinas relacionadas con el proceso regenerativo en el hígado y /o con la atracción, proliferación y activación de las BM-SC como SCF y HGF ¹⁰⁶.

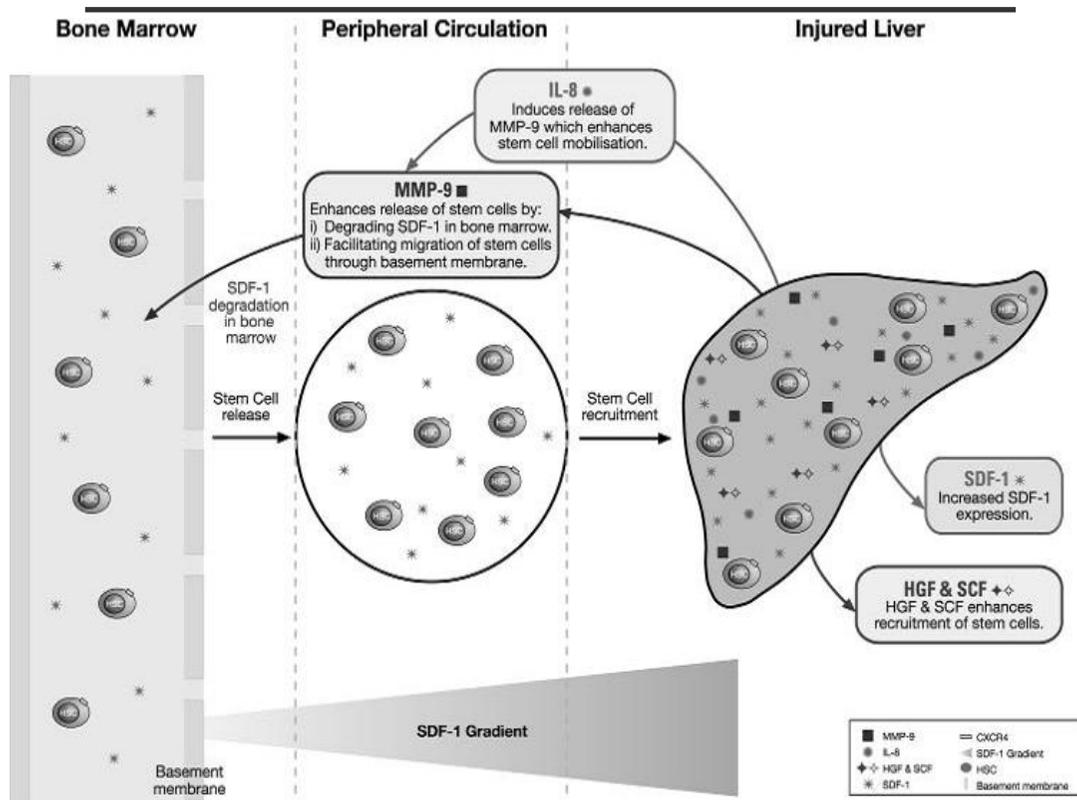


Figura 11. Esquema de la Movilización de Células madre de la Médula ósea ante una insuficiencia hepática publicado por Dalakas et al.¹⁰²

4. Movilización e hígado: Estudios *in vivo*

El tratamiento terapéutico con G-CSF favorece el establecimiento del eje SDF-1/CXCR-4 y la consecuente movilización de células CD34⁺ desde la MO hasta el torrente circulatorio^{107 108}. Actualmente existen numerosas líneas de investigación que abordan si este tratamiento y el proceso movilizador podrían constituir una opción terapéutica en pacientes que sufren patologías hepáticas con necesidades de recuperar la masa y funcionalidad del hígado¹⁰⁹.

En uno de los estudios, la movilización de células CD34⁺

consiguió reducir los índices de daño hepático, con una mejora en los ratios de supervivencia, y previniendo además el desarrollo de otros procesos patológicos como sepsis, síndrome hepatorenal y/o encefalopatía hepática ¹¹⁰. En otro estudio, pacientes con distintas patologías hepáticas crónicas recibieron una infusión de células CD34⁺ movilizadas a partir de un proceso de aféresis con un tratamiento con G-CSF. Tras el trasplante celular se redujeron los niveles séricos de bilirrubina durante un largo periodo de tiempo, favoreciendo la supervivencia ¹¹¹. Este mismo efecto beneficioso fue observado incluso en pacientes que habían desarrollado una cirrosis. En estos pacientes la infusión de células CD34⁺ redujo significativamente los valores séricos de transaminasas así como el índice Child-Pugh ¹¹².

Sin embargo, se desconoce cuál es el mecanismo de acción a través del cual la movilización de BM-SC re-establece la funcionalidad hepática. En este sentido, los resultados obtenidos en un estudio con pacientes que sufrían esteatohepatitis podrían indicar que el proceso movilizador de células CD34⁺ favorece la activación de las HPC y con ello la funcionalidad hepática ¹¹³. Resultados similares se observaron en otro trabajo pero con pacientes que habían sido sometidos a un trasplante de hígado ortotópico (THO) ¹¹⁴. Otros trabajos sugieren que el principal efecto de las células movilizadas es una diferenciación a hepatocitos ¹¹⁵.

No obstante, se desconoce cuál es la señal que dispararía el proceso movilizador. De hecho, la movilización de BM-SC hacia el hígado y su colaboración en el proceso regenerativo está actualmente en debate.

En base a estos indicios, en este bloque de experimentos intentaremos dilucidar si pacientes que sufren una patología hepática y han sido sometidos a una hepatectomía parcial (HP) pueden movilizar poblaciones de BM-SC. En el caso de que se documente, se evaluará el inmunofenotipo de las mismas. De igual modo, se analizarán los mecanismos por los cuáles se regula el proceso de movilización interviniendo en la regeneración hepática.

BLOQUE 3: Terapia celular en un modelo experimental de daño hepático agudo

5. Terapia celular con células madre procedentes de la médula ósea

Petersen et al. fueron los primeros en demostrar que en un modelo experimental de daño hepático el trasplante de las BM-SC podrían contribuir al proceso regenerativo del hígado. Este estudio se realizó en ratas hembra que presentaban una deficiencia enzimática (DPPIV⁻), y habían recibido un tratamiento con 2-AAF (2-acetilaminofluorano), junto a una HP o con Cl₄C. El tratamiento con 2-AAF impedían la activación de las HPC/OC y por tanto, dificultaba el proceso regenerativo en el hígado. La infusión de MO procedente de ratas macho DPPIV⁺, consiguió reestablecer la funcionalidad hepática. Además se comprobó que las nuevas células que conforman el parénquima hepático tras el trasplante procedían del donante porque eran positivas para el cromosoma Y, y carecían de la deficiencia enzimática ¹¹⁶.

En la actualidad, existen distintas aproximaciones de terapia celular en hepatología con distintos tipos y fuentes de células madre. Las evidencias obtenidas tanto en ensayos clínicos como en modelos experimentales muestran el elevado potencial terapéutico de las BM-SC ¹¹⁷.

5.1 Terapia celular con células mononucleares de la médula ósea

La infusión de células mononucleares de médula ósea ha sido una herramienta terapéutica ampliamente estudiada para la regeneración tisular. Este trasplante ha proporcionado resultados esperanzadores en distintos modelos experimentales en el campo de la hepatología. Así, en ratones que padecían una fibrosis o habían desarrollado una cirrosis hepática, la infusión de células mononucleares de la MO, consiguió reducir el área fibrótica y mejorar los ratios de supervivencia. Este efecto beneficioso podría estar mediado por un aumento en los niveles de expresión génica de MMP-9, que favorecerían una movilización de BM-SC que a su vez, también podrían alcanzar el hígado y favorecer la regeneración hepática ¹¹⁸. En pacientes cirróticos, tras la infusión celular, se elevaron los niveles séricos de albúmina e incluso disminuyeron el índice Child-Pugh. Además, en las biopsias de tejido hepático de estos pacientes, se detectó la presencia de α -FP y PCNA, lo que permite deducir que las células mononucleares de la MO tras alcanzar el parénquima tisular, podrían diferenciarse a hepatocitos y estimular la proliferación de las células residentes del tejido ¹¹⁹.

El uso de las células mononucleares de la MO puede ser una buena estrategia para realizar terapia celular aunque se desconoce si es el conjunto de estas células o una población en concreto las que estimularían la recuperación de la funcionalidad hepática.

5.2 Terapia celular con células madre hematopoyéticas

El uso de las HSC en diversos modelos experimentales ha puesto de manifiesto el efecto beneficioso que podría desarrollar esta población celular ante una insuficiencia hepática. Así, en un trabajo con ratones que poseían un déficit enzimático, tirosinemia tipo I (FAH^{-/-}), el trasplante de HSC consiguió restaurar la funcionalidad bioquímica. Los resultados muestran que estas HSC son capaces de alcanzar el hígado donde se diferencian a células del parénquima tisular. Estas nuevas células carecen del déficit enzimático y son FAH^{+/+}¹²⁰. Similares resultados se obtuvieron en otro estudio con ratones cirróticos. En este modelo de daño crónico, la infusión de células CD133⁺ ó CD34⁺ consiguió evitar la progresión de la cirrosis¹²¹.

La terapia celular con HSC también ha proporcionado resultados esperanzadores en ensayos clínicos con pacientes que sufrían una insuficiencia hepática. En uno de estos estudios, tres pacientes con diferentes patologías hepáticas (HCC, metástasis neuroendocrina y metástasis colorrectal) recibieron una infusión autóloga intraportal de células CD133⁺. Cabe resaltar que todos los pacientes habían sido sometidos a una embolización de los lóbulos derechos. En los tres pacientes, tras la terapia celular, incrementó de forma significativa el volumen de los lóbulos izquierdos¹²². En otro estudio, pacientes que sufrían metástasis hepática, fueron sometidos a una HP derecha junto con una embolización portal, y recibieron una infusión de células CD133⁺. La presencia de esta población celular aumentó en mayor grado el volumen de lóbulos izquierdos acelerando así el proceso regenerativo en el hígado¹²³. Incluso, en otros trabajos con pacientes

cirróticos se ha podido observar que la infusión autóloga de células CD133⁺ ó CD34⁺ reduce los niveles séricos de marcadores relacionados con el daño hepático como transaminasas, albúmina y bilirrubina ¹²⁴.

Sin embargo, la principal limitación en el uso de las HSC en medicina regenerativa es el número de células del que se dispone. Esta población se encuentra en un porcentaje bajo tanto en MO como en sangre periférica, y se necesita un volumen celular grande para realizar una terapia celular efectiva. No obstante, el número de HSC se puede multiplicar en cultivo bajo la presencia de ciertas citoquinas o con *in vivo* procesos de aféresis con G-CSF, pero la prolongación de estos tratamientos en el tiempo puede reducir la plasticidad de las HSC.

De hecho, no en todos los ensayos clínicos, el trasplante de células HSC ejerció un efecto positivo. En un trabajo con pacientes cirróticos, la infusión de células CD34⁺, a través de la arteria hepática, no consiguió re-establecer la funcionalidad tisular. Se desconoce si es debido a una menor concentración de células en el trasplante, o si la vía de infusión es la adecuada, o si es que el desarrollo de la enfermedad había superado un punto de inflexión y la situación ya era irreversible ¹²⁵.

5.3 Terapia celular con células madre mesenquimales

Cho et al. publicaron que las MSC de MO podrían ser la población celular con mayor potencialidad para regenerar el tejido hepático ¹²⁶. Las características biológicas que convierten a las MSC en una buena herramienta para medicina regenerativa son su gran

potencial de multiplicación, su alta plasticidad para diferenciarse a distintos tipos celulares maduros, y principalmente por sus propiedades inmunomoduladoras. Las MSC carecen de moléculas HLA en su membrana plasmática, y además son capaces de inhibir la acción de las células dendríticas y las células T ¹²⁷. Esta capacidad de las MSC para frenar al sistema inmunológico se ha comprobado en distintos procesos de daño hepático como inflamación severa, daños isquémicos o en un THO y podría ser fundamental para evitar el desarrollo de un rechazo inmunológico en el hospedador ¹²⁸. Parece que las MSC desarrollan la modulación del sistema inmune estimulando la liberación de IL-10, factor clave en la restauración de una funcionalidad normal en el hígado ¹²⁹. Otros autores han relacionado el potencial terapéutico de las MSC con un aumento en la expresión de MMP-9 y MMP-13 ¹³⁰ o mediante la activación de la maquinaria anti-oxidativa en las células del parénquima hepático ¹³¹.

5.4 Terapia celular con MAPC “Multipotent adult stem cells”

Las MAPC por su gran plasticidad celular y por presentar propiedades inmunomoduladoras, constituyen una de las poblaciones de BM-SC más atractivas para utilizarse en medicina regenerativa. Sin embargo, el principal impedimento para utilizarlas en terapia celular es el bajo porcentaje celular que representan en el organismo. Aunque hay pocos ensayos clínicos donde se utilicen pero se han generado resultados prometedores. Así en pacientes que habían recibido un THO, se utilizó una terapia combinada entre fármacos e infusión de MAPC que consiguió prevenir episodios de rechazo inmunológico en la fase

post-transplante gracias a las propiedades inmunomoduladores de estas células. Además la infusión de MAPC redujo la aparición de otros efectos secundarios que suelen aparecer en los pacientes transplantados como el síndrome hepatorenal o la isquemia de la vía biliar ¹³².

5.5 Terapia celular con SP “Side population”

Otra de las poblaciones de BM-SC utilizadas en distintos modelos experimentales de daño hepático son las SP, dónde se ha demostrado que contribuyen a la regeneración hepática ¹³³. En uno de los estudios con ratones hembra que habían recibido una dieta deficiente en colina, recibieron un transplante de SP de un donante macho. En el parénquima del ratón receptor se detectaron células SP positivas para el cromosoma Y, lo que indicaría que proceden de la MO donante. La presencia de células SP en el parénquima tisular, favorecían y aceleraban el proceso regenerativo en el hígado ¹³⁴. Sin embargo su uso terapéutico también se ve limitado por el bajo número de células que componen esta población.

6. Mecanismos de acción de células madre de médula ósea en la regeneración hepática

Una vez hospedadas en el parénquima hepático se desconoce cuál es el mecanismo de acción que desempeñan las BM-SC para ejercer su efecto beneficioso. Algunos investigadores creen que las células nuevas originadas encargadas del proceso regenerativo en el hígado, son realmente el resultado de una fusión entre las BM-SC y las células del parénquima hepático ¹³⁵ (Figura 12).

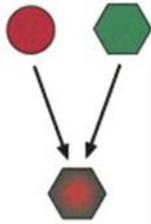


Figura 12. Fusión celular entre células madre de médula ósea (rojo) y los hepatocitos (verde)

El mecanismo de fusión se produciría de manera espontánea entre los citoplasmas celulares, núcleos o ambos^{136 137}, y las células originadas adquirirían una ventaja selectiva sobre las células residentes porque contienen las características fisiológicas de las

células del parénquima hepático y la potencialidad biológica de las BM-SC^{138 139}. Sin embargo otros autores afirman que las BM-SC tras alojarse en el tejido hepático ejercen un efecto directo, diferenciándose hacia nuevas células hepáticas^{140 141 142} que favorecen y participan en la regeneración hepática^{143 144}, o desencadenando toda una maquinaria anti-fibrótica o pro-angiogénica (Figura 13)^{145 146}.

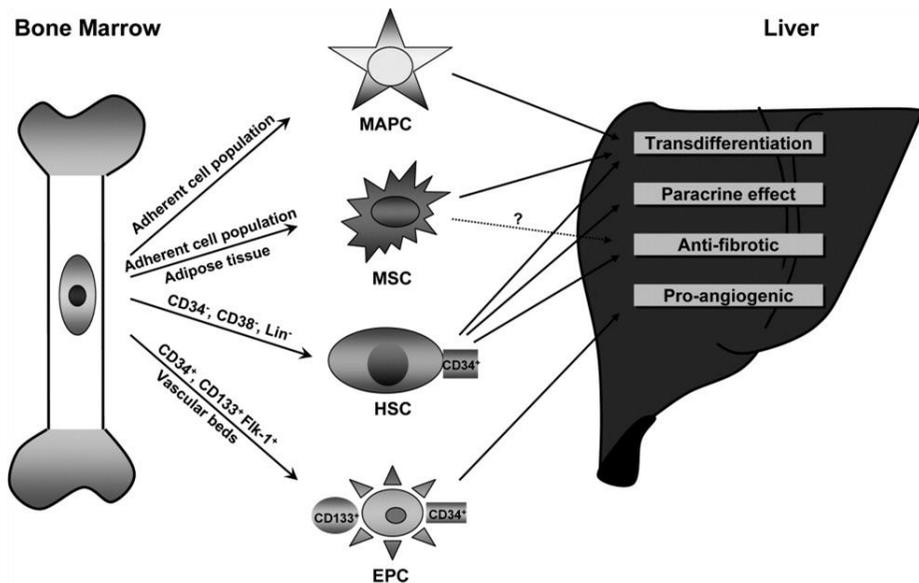


Figura 13. Posibles mecanismos de acción de células madre de médula ósea ante una insuficiencia hepática. Imagen publicada por¹⁴⁵

6.1 Efectos paracrinós

Actualmente existen evidencias que hacen pensar que las BM-SC ni se diferencian a hepatocitos ni se fusionan con las células hospedadoras, sino que mediante la secreción paracrina de citoquinas y/o factores de crecimiento, se encargarían de activar la entrada en ciclo de las distintas poblaciones del parénquima hepático. Se cree que una de sus principales dianas podrían ser las HPC / OC o los propios hepatocitos ¹⁴⁷.

Para confirmar esta teoría, algunos investigadores han infundido en distintos modelos de daño hepático agudo un concentrado del medio dónde habían sido cultivadas MSC, que contendría las moléculas secretadas por las MSC. Este concentrado se denomina MSC-CM (del inglés, *Conditioned medium*). En uno de estos estudios, las ratas habían desarrollado un fallo hepático fulminante tras la administración de un tóxico hepatoespecífico, D-Galactosamina. En este modelo experimental, el tratamiento con MSC-CM favoreció la supervivencia de los hepatocitos y proporcionó cierta protección frente a la muerte celular producida en las células del parénquima. Además la presencia de MSC-CM redujo la infiltración leucocitaria así como la duplicación de los conductos biliares. El análisis molecular de este MSC-CM mostró un alto contenido en quimioquinas relacionadas con la supervivencia celular ¹⁴⁸. De hecho, se ha demostrado que MSC-CM tiene un efecto directo sobre los hepatocitos favoreciendo su proliferación lo que favorecería el desarrollo de un proceso regenerativo en el hígado ^{149 150}.

En otro estudio con ratones que habían sido sometidos a una HP, el tratamiento con MSC-CM aceleró la recuperación de la masa tisular hasta alcanzar su tamaño normal. En este caso, se detectó en el contenido de las MSC-CM genes hepatoespecíficos, citoquinas y factores de crecimiento relacionados con la angiogénesis, proliferación y respuesta anti-inflamatoria ¹⁵¹.

6.2 Rutas de señalización

Independientemente de si el efecto de la infusión de BM-SC es directo (transdiferenciación o fusión celular) o indirecto (efecto paracrino) se desconocen cuáles son los mecanismos de señalización intracelular que desencadenan para desarrollar su efecto beneficioso en el parénquima hepático.

Una posible cascada de señalización que podría participar es la ruta NFκB, elemento de respuesta aguda que participa en la regeneración hepática. NFκB es un complejo proteico que está formado por dos subunidades, p65 (subunidad catalítica) y p50 (subunidad reguladora) y que está relacionado con procesos celulares como inflamación o supervivencia celular ¹⁵².

NFκB está relacionada entre con otras cascadas de señalización intracelular que participan en la regeneración hepática como PI3K/Akt. Ante señales de muerte, Akt citoplasmático se fosforila y activa formando un homodímero que se trasloca al núcleo activa la transcripción génica de elementos relacionados con una respuesta anti-apoptótica ¹⁵³ (Figura 14).

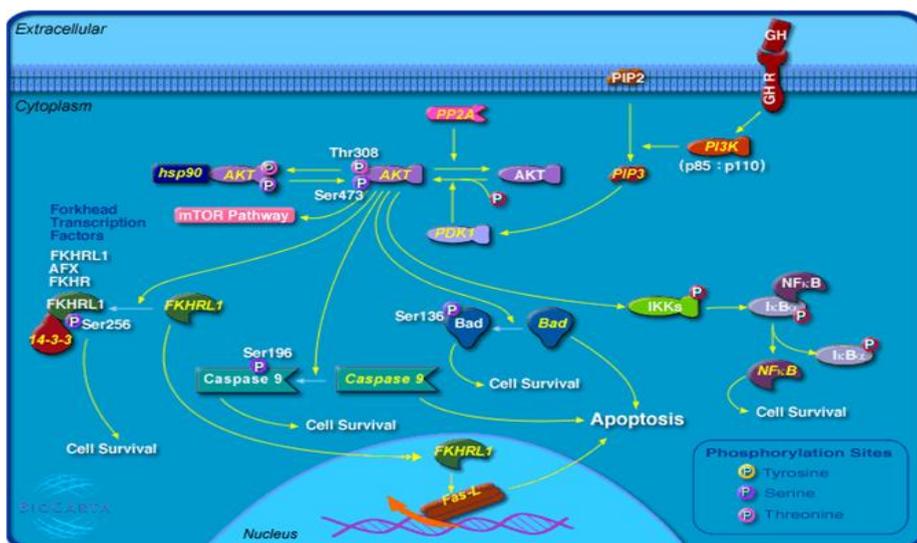


Figura 14. Cascadas de señalización intracelular de Akt y NFκB. Esquema publicado por Cell Signaling Boston, MA, USA. .

Cuando se produce un daño agudo en el hígado, se desarrolla una inflamación y una muerte celular masiva en el parénquima tisular. En este momento, el incremento de IL-6 es elemento fundamental para iniciar el proceso regenerativo en el hígado ¹⁵⁴.

IL-6 se une al receptor transmembrana gp130 y fosforila y activa a Stat3 en el citoplasma celular. Stat3 fosforilado forma un homodímero que se trasloca al núcleo celular dónde activa la transcripción de numerosos genes diana relacionados con la proliferación celular ¹⁵⁵. Recientemente, Lam et al. encontraron que la activación de IL-6/gp130 y Stat3 en MSC favorecía la diferenciación, proliferación y regeneración hepática ¹⁵⁶ (Figura 15).

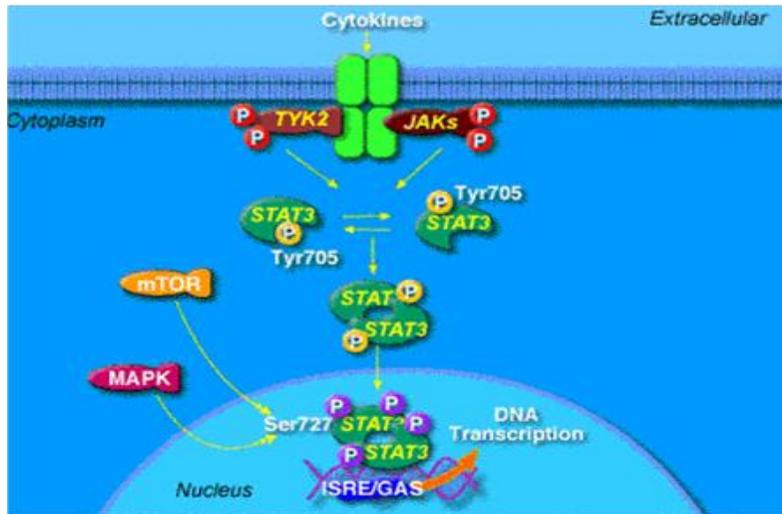
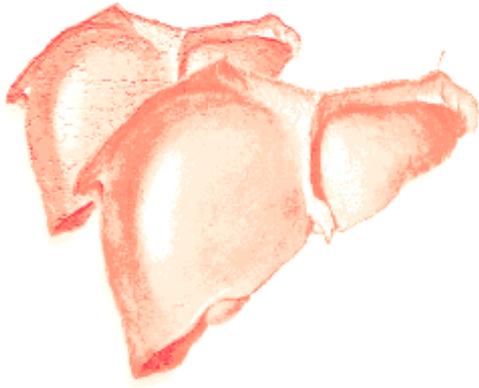
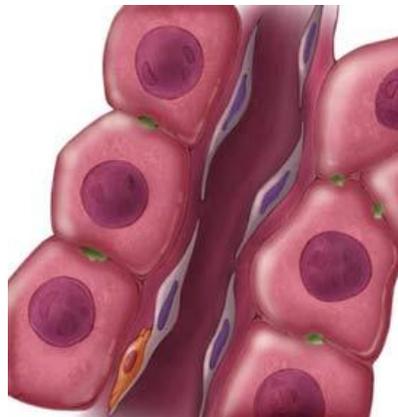


Figura 15. Cascada de señalización intracelular de Stat3. Esquema publicado por Cell Signaling Boston, MA, USA.

La terapia celular ha demostrado ser efectiva en diferentes modelos experimentales de daño hepático. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce si los efectos beneficiosos de las BM-SC son debido al anclaje de estas células en el parénquima tisular y la consecuente diferenciación a hepatocitos o si por el contrario es una consecuencia de la liberación del contenido intracelular de las BM-SC que contiene propiedades hepatoprotectoras. En esta tesis doctoral, se estudiará si en un modelo experimental de daño hepático agudo producido por tioacetamida en ratas, la infusión de MSC intactas o el lisado celular de éstas consigue restaurar la funcionalidad tisular, así como los mecanismos que subyacen al posible efecto beneficioso.



II. OBJETIVOS



- 1. Definir la fuente de células madre más idónea para la diferenciación *in vitro* de hepatocitos**
 - 1.1 Evaluar el papel de la ruta Wnt/ β -catenina en el proceso de diferenciación**

- 2. Estudiar si la resección hepática conduce a una movilización de células madre de médula ósea a sangre periférica en pacientes con distintas patologías hepáticas.**

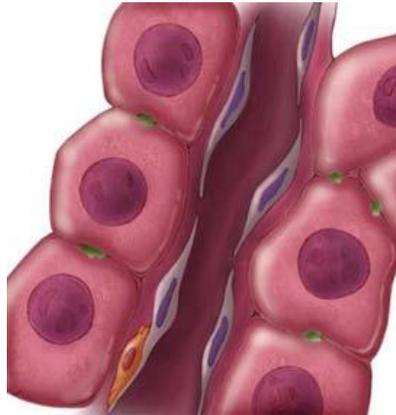
- 3. Valorar los mecanismos que activan y regulan el proceso de movilización de estas células madre.**

- 4. Evaluar y comparar el efecto de la infusión de células madre mesenquimales intactas o de su lisado en un modelo experimental de daño hepático agudo en ratas.**

- 5. Determinar los mecanismos de señalización intracelular a través de los cuales se desarrollan los efectos de la terapia celular.**



II. MATERIAL Y MÉTODOS



BLOQUE 1: Diferenciación de células madre de médula ósea hacia hepatocitos

1. Purificación de distintas poblaciones de células madre adultas

Este estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba de acuerdo a los principios expuestos en Helsinki en 1975. Las fuentes utilizadas para el aislamiento celular fueron de dos tipos: sangre periférica de pacientes que han sido sometidos a un proceso de aféresis con tratamientos con G-CSF o MO de la cresta ilíaca de donantes sanos. Las muestras para el aislamiento de las distintas poblaciones de BM-SC fueron suministradas por la Unidad de Terapia Celular del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba / Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC). Previamente, todos los donantes habían firmado un consentimiento informado por escrito para participar en esta tesis doctoral.

1.1 Purificación de células madre desde médula ósea

1.1.1 Purificación de células CD133⁺

Las células CD133⁺ fueron purificadas con un separador inmunomagnético automático AutoMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania).

Protocolo: Las células mononucleares de MO fueron aisladas con un gradiente de densidad de ficoll (Lymphoprep, Stem Cells Technologies, Grenoble, Francia). El volumen de MO fue diluido con

el mismo volumen de PBS 100 mM a pH 7.4 (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA), y fue depositado sobre ficoll en una proporción 1:2. La muestra fue centrifugada a 3000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente sin freno. El halo de células mononucleares fue recogido y lavado (2 veces) con PBS a 1800 rpm durante 5 minutos a 4° C. El sobrenadante fue descartado, y el precipitado celular fue resuspendido en una solución de trabajo que contiene PBS, 2 mM de EDTA (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) y 0.5% de BSA (del inglés, *Bovine serum albumin*) a una concentración de 100×10^6 de células mononucleares en 0.35 ml de solución de trabajo.

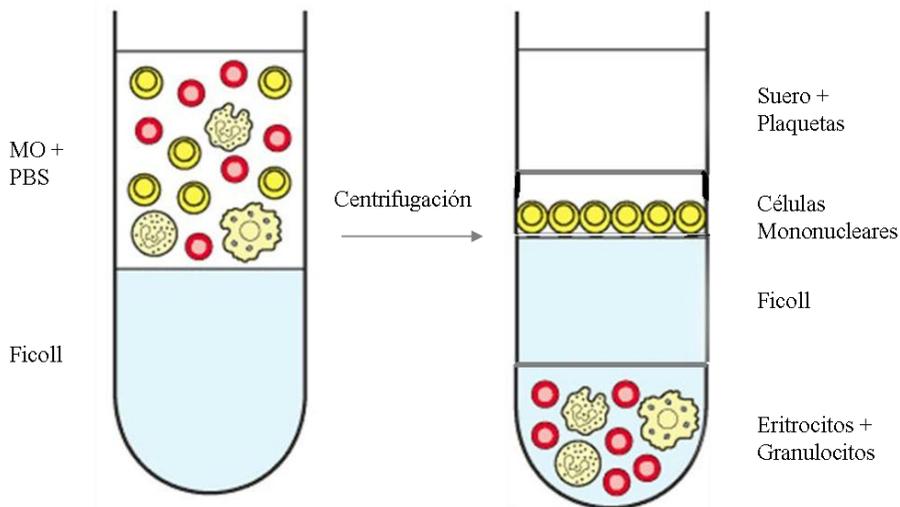


Figura 1. Separación de células mononucleares de sangre periférica con un gradiente de densidad de ficoll.

La purificación de las células $CD133^+$ se realizó siguiendo las instrucciones de un kit de marcaje indirecto de la casa comercial Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Alemania). Las células

mononucleares fueron bloqueadas y marcadas con un anticuerpo CD133/1 marcado con biotina durante 10 minutos en frío y en oscuridad. Tras la incubación, las células mononucleares lavaron con 5 ml de la solución de trabajo centrifugándose a 1800 rpm durante 5 minutos a 4° C. A continuación, se descartó el sobrenadante y el precipitado celular fue marcado con unas partículas inmunomagnéticas anti-biotina durante 15 minutos a 4° C y en oscuridad. Transcurrido el tiempo, las células se volvieron a lavar con la solución de trabajo en las mismas condiciones anteriores. Descartamos de nuevo el sobrenadante y el precipitado celular fue resuspendido en 500 µl de la solución de trabajo. Finalmente la población de células CD133⁺ fue aislada con el AutoMACS utilizando el programa Posseld.



Figura 2. Separador automático inmunomagéntico AutoMACS de la casa comercial Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Alemania).

1.1.2 Aislamiento de células madre mesenquimales

La población de MSC fue seleccionada por su capacidad de adherirse a superficies plásticas.

Protocolo: La MO se cultivó en botellas de 75 cm² (Falcon Tubes, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) a una densidad de 10 µl de MO / cm² con α -MEM (del inglés, *alpha Minimum essentials medium*) (BioWhittaker, Lonza Ltd, Basel, Suiza) suplementado con 2 mM de L-glutamina (BioWhittaker, Lonza Ltd, Basel, Suiza), 15% de FBS (del inglés, *Fetal bovine serum*, FBS) (BioWhittaker, Lonza Ltd, Basel, Suiza), 100 U/ml de penicilina (Bencilpenicilina sódica, Penilevel®, Laboratorios ERN S.A. Barcelona, España), 0.1 mg/ml de estreptomina (Sulfato de estreptomina, Laboratorios Reig Jofré, Sant Joan Despí, Barcelona, España) y 1 ng/ml de FGF-b (Peprotech EC, London, UK). Las células se incubaron en un incubador a 37° C y bajo una atmósfera de un 5% de CO₂. A las 48 h, las células se lavaron dos veces con PBS para retirar las células en suspensión. Las células que permanecen adherentes al plástico son las MSC. El medio de cultivo se cambió dos veces en semana con α -MEM suplementado con 10% de FBS y con 1 ng/ml de FGF-b durante 7 ó 10 días hasta conseguir una confluencia aproximada del 80%.

1.1.2.1 Subcultivo de células madre mesenquimales

Para realizar el subcultivo, las células se despegaron con una solución de 0.25% de tripsina-EDTA (BioWhittaker, Lonza Ltd, Basel, Suiza).

Protocolo: Se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron 2 veces con PBS, para eliminar cualquier resto de FBS que contiene factores que inhiben la acción de la tripsina. A continuación, se añadieron 4 ml de tripsina-EDTA caliente en cada botella de 75 cm² durante 5 minutos a 37° C. Transcurrido este tiempo, las células despegadas se recogieron con α -MEM suplementado con 10% de FBS. Tras la centrifugación a 1800 rpm durante 5 minutos a 4° C, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en medio de cultivo para proceder al recuento celular. Las células fueron subcultivadas a una densidad de 1×10^3 células / cm² con α -MEM suplementado con 10% de FBS y con 1 ng/ml de FGF-b.

1.1.2.2 Recuento celular

El conteo del número de células fue realizado en la cámara de Neubauer con el colorante azul tripán (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA). Este colorante es permeable a la membrana plasmática de células muertas tiñendo todo su citoplasma, mientras que es impermeable para células vivas. Se mezclaron 10 μ l de la suspensión celular con 10 μ l de azul tripán. Simultáneamente, colocar un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer. Pipetear 10 μ l de la mezcla de células con azul tripán, y difundir por capilaridad entre la cámara y el cubreobjetos.

1.1.2.3 Criopreservación de células madre mesenquimales

En caso necesario, después de tripsinizar, las MSC se congelaron a una densidad de 1×10^6 de MSC en un criotubo (Nunc,

Rochester, NY, USA) en 1 ml de medio de congelación a 4° C. Este medio contiene un 90% de FBS y un 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA). Inmediatamente el criotubo se guardó a -80° C en una caja de congelación con isopropanol que permite congelar las células de forma gradual. A las 48 h el criotubo se trasladó a un contenedor de nitrógeno líquido (-196° C), dónde se mantuvieron hasta su descongelación.

Por otro lado, para el momento de uso de las células, el contenido del criotubo se descongeló rápidamente en α -MEM al 15% de FBS a 37° C, y se procedió a cultivar en una botella de 75 cm². A las 24 h, cuando las MSC se han pegado al plástico de la botella de cultivo, las células se cultivaron con α -MEM suplementado con 10% FBS y con 1 ng/ml de FGF-b siguiendo el mismo procedimiento que se ha empleado durante la expansión celular. Con este cambio de medio de cultivo, se eliminan las células que se han muerto durante el proceso de congelación o descongelación, y se prescinde de aquellas que no se han adherido a la superficie de plástico.

1.1.3 Purificación de células MAPC

La población MAPC fue purificada mediante técnicas de separación celular por sorting.

Protocolo: Las células mononucleares fueron aisladas mediante un gradiente de densidad con ficoll, y marcadas con dos anticuerpos monoclonales: CD45-PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y Gly A-FITC (Abcam, Cambridge, UK) durante 30 minutos a temperatura ambiente en frío y en oscuridad. Al terminar la

incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1800 rpm durante 5 minutos a 4° C. Descartado el sobrenadante, el precipitado celular fue resuspendido en PBS. La población de células MAPC (CD45⁻ y Glicoforina A⁻) fue aislada en un sorter FACSVantage SE (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) en el laboratorio de citometría del servicio de Hematología del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba.

1.2 Purificación de células CD34⁺ movilizadas por aféresis

Las células CD34⁺ fueron aisladas con un kit inmunomagnético (kit CD34 humano EasySep, Stem Cells Technologies, Grenoble, Francia).

Protocolo: Las células mononucleares de sangre periférica (MNC, del inglés, *Mononuclear cells*) fueron separadas también mediante un gradiente de densidad de ficoll. El protocolo es muy similar al utilizado con muestras de MO (apartado 1.1.1 de este bloque de experimentos). Sin embargo, en este caso, el volumen de sangre fue diluido con el mismo volumen de PBS, y depositada sobre ficoll en una proporción 1:1. El precipitado celular obtenido al finalizar fue resuspendido en una solución de trabajo que contiene PBS con 2% FBS y 1 mM de EDTA a una concentración de 100×10^6 MNC / ml de solución de trabajo, y depositado en un tubo de citometría de 12 x 75 mm (Falcon Tubes, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA). El aislamiento de células CD34⁺ se realizó siguiendo el manual de instrucciones del kit comercial (Figura 4). Las MNC fueron marcadas con un anticuerpo CD34 marcado con partículas de hierro

durante 15 minutos a temperatura ambiente. Al terminar esta incubación, las células se marcaron con nanopartículas magnéticas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, las células se diluyeron con solución de trabajo hasta alcanzar un volumen final de 2,5 ml. Finalmente, el tubo de citometría fue introducido en un imán de la casa comercial (Stem Cells Technologies, Grenoble, Francia) durante 5 minutos a temperatura ambiente y se decantó el sobrenadante. Este lavado se repitió 3 veces más. Las células que permanecen pegadas al tubo de citometría son positivas para el marcador CD34.

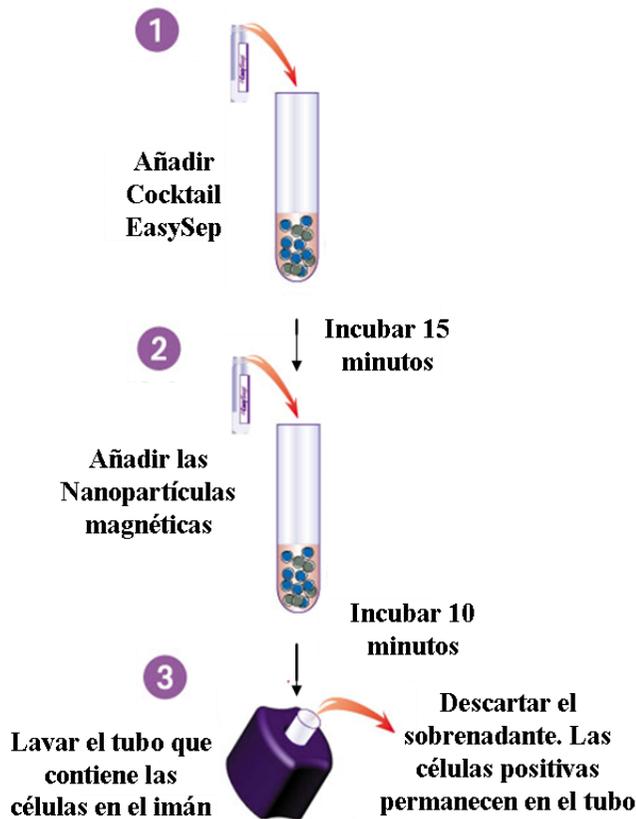


Figura 3. Esquema del kit de purificación de células CD34⁺ de la casa comercial Stem Cells Technologies

1.2.1 Expansión de CD34⁺

Las células CD34⁺ purificadas desde un producto de aféresis se cultivaron en medio IMDM (del inglés, Iscove's modified Dulbecco's medium, PAA laboratorios/GE Healthcare Europe GMBH, Velizy-Villacoublay, Francia) con un 10% de FBS, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 0.1 mg/ml de estreptomina a una densidad de 5×10^4 células / cm² en una placa de 6 pocillos (SPL Life Sciences Inc, Korea). Las células se incubaron en un incubador a 37° C y bajo una atmósfera de un 5% de CO₂. Para expandir la población celular obtenida el medio de cultivo fue suplementado con 100 ng/ml de SCF, 20 ng/ml de TPO y 100 ng/ml de Flt3-L. Todas las citoquinas son de la casa comercial Peprotech (Peprotech EC, London, UK). El medio de cultivo fue cambiado 2 veces en semana. Para ello, el volumen del pocillo fue recogido en un tubo cónico y se centrifugaron a 1800 rpm durante 5 minutos a 4° C. El sobrenadante fue descartado, y el precipitado celular fue resuspendido en medio de cultivo suplementado con las citoquinas de expansión.

2. Diferenciación de células madre mesenquimales hacia hepatocitos

Los experimentos se realizaron con MSC entre pase 2 y 4. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 1×10^3 células / cm² con α -MEM suplementado con 10% de FBS, y un tratamiento de 1 ng/ml de FGF-b. Cuando alcanzaron una confluencia total se procedió a iniciar la diferenciación a hepatocitos.

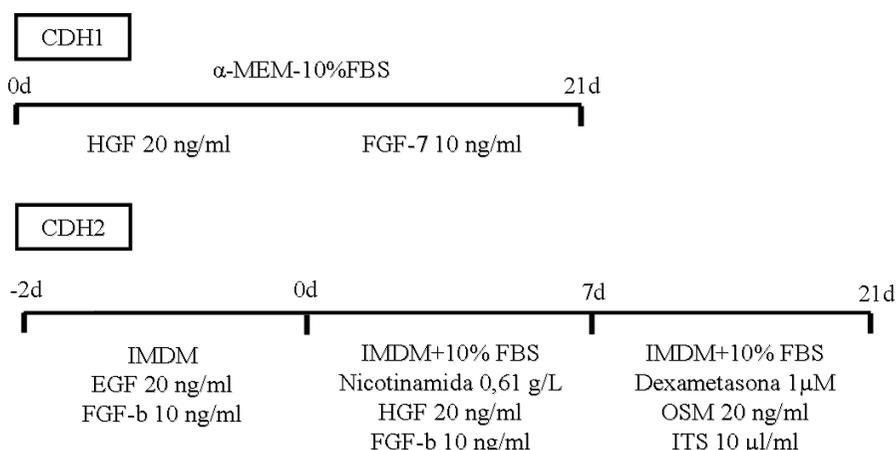
En este estudio se utilizaron dos protocolos de diferenciación. El Cocktail de Diferenciación a Hepatocios 1 (CDH1) y el 2 (CDH2).

A continuación se expone un esquema de ambos protocolos de diferenciación (Figura 4), y una tabla resumen con las citoquinas empleadas en cada uno ellos (tabla 1). Células sin medio de diferenciación fueron usadas como control.

Tabla 1. Citoquinas empleadas durante la diferenciación de células madre mesenquimales hacia hepatocitos.

Citoquinas	Casa Comercial	Referencias
HGF	Peptotech EC, London, UK	100-39
FGF-7	Peptotech EC, London, UK	100-19
EGF	Peptotech EC, London, UK	100-15
FGF-b	Peptotech EC, London, UK	100-18
Nicotinamida	Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA	N0636
ITS	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA	354352
Oncostatina-M	Peptotech EC, London, UK	167300
Dexametasona	Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA	D4902

Figura 4. Esquema de los protocolos de diferenciación CDH1 y CDH2 y concentración de citoquinas.



3. Citometría de flujo: marcadores de superficie

El análisis del inmunofenotipo de las distintas poblaciones de BM-SC purificadas fue realizado por citometría de flujo. Para ello, las células fueron marcadas con anticuerpos monoclonales unidos a fluorocromos, moléculas que emiten fluorescencia tras ser excitadas por un haz de luz. La emisión fluorescente de las células permite identificar y cuantificar la presencia de determinados marcadores moleculares.

En este estudio, se utilizó un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) y se realizó una citometría convencional de dos colores marcados con los fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) (Tabla 2). Las distintas poblaciones de BM-SC se identificaron en función de su tamaño (FSC, del inglés *Forward Scatter*), y del granulado o complejidad (SSC, del inglés *Side Scatter*).

Protocolo de marcaje: 5×10^5 de células se incubaron en oscuridad con los anticuerpos monoclonales siguiendo el manual de instrucciones de cada uno. Las células se lavaron con PBS para retirar el exceso de anticuerpo y se centrifugaron a 1800 rpm durante 5 minutos a 4° C. Descartamos el sobrenadante, y el precipitado se resuspendió en 500 μ l de suero fisiológico.

(*) En el caso concreto de las MSC, por ser células adherentes, éstas son tripsinizadas previamente al marcaje, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 1.1.2.1 de esta tesis doctoral.

Tabla 2. Anticuerpos monoclonales específicos de humanos utilizados para determinar el inmunofenotipo de las células madre mesenquimales por citometría de flujo

Anticuerpos Monoclonales	Casa Comercial	Referencias
CD73-PE	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA	550257
CD166-PE	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA	560903
CD13-FITC	Beckman Coulter Inc, Nyon, Suiza	IM778
CD44-FITC	Beckman Coulter Inc, Nyon, Suiza	IM219
CD49e-FITC	Beckman Coulter Inc, Nyon, Suiza	IM1854
CD105-FITC	R&D Systems Inc, Minneapolis, USA	FAB-10971-F
CD29-FITC	eBioscience Ltd, London, UK	MA1-18567
VEGFR2-PE	R&D Systems Inc, Minneapolis, USA	FAB-357-F
CD34-FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania	130-081-001
CD45-PE	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania	130-080-201
CD90-PE	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA	555596
CXCR-4-PE	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA	555974
CD117-PE	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania	130-091-734
CD133-PE	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania	130-050-801
IgG2a-PE	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania	130-091-835
IgG1-FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania	130-095-897

3.1 Adquisición y análisis

Se adquirieron 5×10^4 células y el análisis se realizó excluyendo el ruido de fondo o background celular con el programa CellQuest (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA). El porcentaje de células positivas se calculó tras eliminar la fluorescencia emitida por la muestra marcada con el isotipo control.

4. Cuantificación de la expresión génica por RT-PCR a tiempo real

4.1 Aislamiento de ARN total

El ARN fue aislado según el método descrito por Chomczynski y Sacchi en 1987¹⁵⁷, usando el reactivo Trizol, una mezcla monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina (Tri-reagent®, Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA). Transcurridos los distintos tratamientos, se retiró el medio de cultivo de los pocillos de la placa y las células se lavaron dos veces con PBS y se lisaron con 1 ml de Trizol por pocillo. El contenido se recogió en tubos eppendorf y tras agitarlos vigorosamente se congelaron a -80° C.

Protocolo: Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente para facilitar la disociación de los ácidos nucleicos y las proteínas. Las muestras se mezclaron con 200 µl de cloroformo (MERCK, Madrid, España) y se centrifugaron a 13000 rpm durante 15

minutos a 4° C. Al terminar la centrifugación se pueden observar dos fases: una acuosa en la parte superior, que contiene los ácidos nucleicos, y otra fenólica, con proteínas que se sitúan en la interfase de ambas (Figura 5).

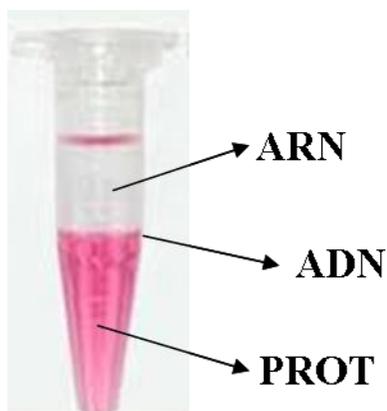


Figura 5. Extracción de ARN con Trizol. La fase acuosa (arriba) contiene el contenido celular de ARN soluble en cloroformo. La fase fenólica (abajo) contiene los restos fenólicos y el contenido proteico celular. En la interfase se puede observar un halo que contiene el ADN celular.

El ARN total disuelto en la fase acuosa se recogió y precipitó con 500 μ l de isopropanol frío (MERCK, Madrid, España) durante 10 minutos a -80° C. Antes y después de la precipitación las muestras se agitaron vigorosamente. El precipitado o pellet del ARN se sedimentó por centrifugación a 13000 rpm durante 10 minutos a 4° C. Para eliminar los restos de isopropanol y conseguir mayor pureza del ARN extraído, el precipitado se lavó con etanol al 70%, y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos a 4° C. El precipitado se dejó secar durante 20 minutos a temperatura ambiente para eliminar los posibles restos de etanol. El precipitado se diluyó en agua estéril libre de ARNasas (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) en un termobloque a 55° C durante 5 minutos. Finalmente, el ARN obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

4.2 Tratamiento con ADNasa

Para eliminar la posible contaminación con ADN genómico, el ARN total extraído con Trizol fue sometido a un tratamiento con ADNasas, enzimas que digieren fragmentos de ADN. Para ello se utilizó el kit comercial de Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA).

Protocolo: 1 μ g de ARN se trató con 1 μ l de tampón de reacción 10X, con 1 μ l de ADNsa y agua libre de ARNasas y ADNasas hasta un volumen final de 10 μ l. Esta mezcla de reacción se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, la muestra se incubó con 1 μ l de solución de parada durante 10 minutos a 70° C en un termobloque.

4.3 Retrotranscripción

El ARN tratado con ADNasa se retrotranscribió a ADNcopia (ADNc) con el kit comercial QuantiTect Reversion Transcription kit (Qiagen, Hilden, Alemania).

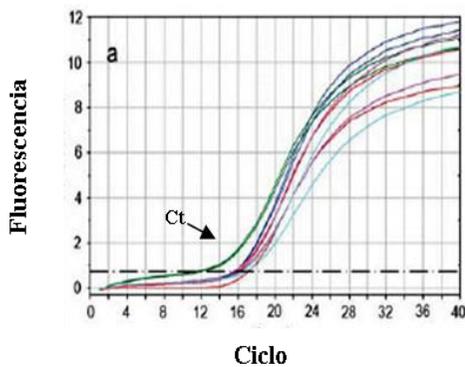
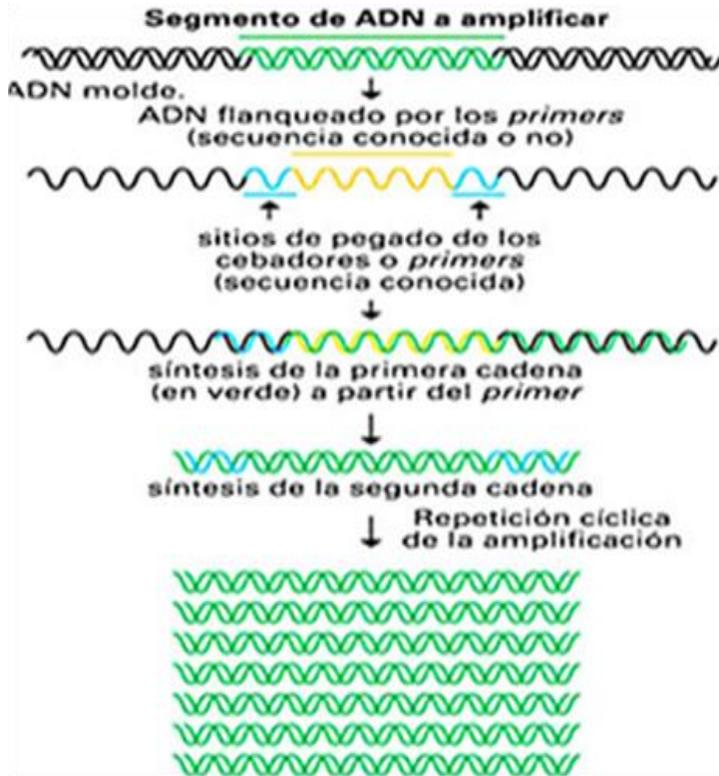
Protocolo: 1 µg de la muestra se trató con la enzima retrotranscriptasa, cebadores random y un tampón de reacción al 1X, durante 15 minutos a 42° C en un termobloque. Finalmente, para inactivar la reacción enzimática, la muestra se incubó durante 3 minutos a 95° C también en un termobloque.

4.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR a tiempo real permite la amplificación, cuantificación e identificación de un determinado fragmento de ADN. Se realizó en un termociclador LightCycler 480 en placas de 96 pocillos de Roche (Roche Molecular Biochemicals; Indianápolis, USA) con un kit comercial QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen, Hilden, Alemania). La reacción de PCR requiere la presencia de una polimerasa termoestable, iones divalentes (principalmente Cl_2Mg), 4 dNTP (Desoxirribonucleósidos-trifosfato) marcados con un fluoróforo SYBR® Green, y dos cebadores, pequeños oligonucleótidos complementarios a la secuencia génica que se desea valorar. Los cebadores son los encargados de delimitar el fragmento de ADN que se desea amplificar, indicando a la polimerasa dónde debe comenzar y parar la reacción en cada ciclo. El ADN sintetizado contiene intercalada en la monocadena el fluorocromo SYBR® Green, que se encarga de emitir una fluorescencia proporcional a la concentración de ADN.

Figura 6. Esquema de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

<http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/imagenes/CC27/1.jpg>



El ciclo umbral o Ct, es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base, y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde (Figura 7).

El ADN sintetizado y el ADN molde tras la amplificación, se unen formando una doble cadena ya que son complementarios. La temperatura de fusión o de melting (T_m), es la temperatura necesaria para separar este ADN bicatenario. La T_m es específica de cada fragmento, ya que depende de su longitud y de su contenido en G+C, de forma que pueden obtenerse curvas diferentes por cada producto amplificado, dónde el pico máximo corresponde a la T_m , y el área bajo la curva de este pico es proporcional a la cantidad de producto (Figura 8). La cuantificación de la expresión relativa se determinó por la fórmula $2^{-\Delta(\Delta CT)}$ descrita por Livak and Schmittgen (2001) ¹⁵⁸. Los cálculos se normalizan con los datos del gen 18S que posee una expresión constitutiva, no inducible.

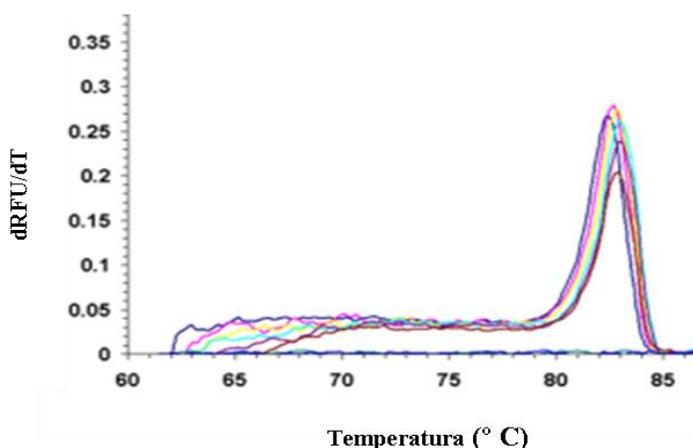


Figura 8. Imagen representativa de la curva de melting de un producto específico de PCR

<i>Programa PCR utilizado en Light-Cycler LC-480</i>	Nº Ciclo	Temperatura (° C)	Tiempo (seg)
Activación de la polimerasa	1	95	15
Amplificación	50	94	20
		60	20
		72	20
		95	1
Melting	1	65	15
		95	1
		40	5
Enfriamiento	1	40	5

En este estudio se analizó la expresión de genes hepatoespecíficos en MSC cultivadas en placas de 6 pocillos antes y después de su diferenciación hacia hepatocitos con CDH1 o CDH2. Se utilizó un volumen final de reacción de 10 µl con 50 ng de ADNc y con 0.5 µM de cebador.

Tabla 3. Cebadores utilizados para determinar la expresión génica por PCR

Cebador	Secuencia	Tm (°C)	Prod (pb)
Albumina	F: 5' TGA GAA AAC GCC AGT AAG TGA C 3' R: 5' TGC GAA ATC ATC CAT AAC AGC 3'	80	265
α-Fetoproteína	F: 5' GCT TGG TGG TGG ATG AAA CA 3' R: 5' TCC TCT GTT ATT TGT GGC TTT TG 3'	79	157
Cytoqueratina-18	F: 5' CCC GTC ACG CCC TAC AGA T 3' R: 5' ACC ACT TTG CCA TCC ACT ATC C 3'	86	216
c/EBP-α	F: 5' CCC GCC CGT GGT GTT ATT 3' R: 5' GGT TGC GTC AGT CCC GTG TA 3'	84	271
Citocromo P450	F: 5' GAT CCC CTT GAA ATT AGA CAC G 3' R: 5' TTG AAA TCT CTG GTG TTC TGG 3'	78	163
α1-antitripsina	F: 5' AAG GTG CCT ATG ATG AAG CGT 3' R: 5' GTG ATG CCC AGT TGA CCC A 3'	81	278
Lrp5/6	F: 5' GCA GCC TTT CTT CCA CAC TC 3' R: 5' CTC CTG CCT TAC ACG TCC T 3'	87	146
Frizzled-3	F: 5' TGG AGC CAT TCC ACC CTA TG 3' R: 5' GAA CCT ACT GCA TTC CAT ATC 3'	82	206
c-Myc	F: 5' ACC ACC AGC AGC GAC TCT GAG GA 3' R: 5' CGT AGT TGT GCT GAT GTG TGG AGA 3'	84	190
18S Ribosomal	F: 5' GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT 3' R: 5' CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG 3'	81	151

El diseño de los oligonucleótidos se realizó mediante el programa “*Oligo 7*” (Oligo®.net, Molecular Biology Insights, 1989) utilizando la secuencia del gen ADNc, se eligió una pareja de cebadores basándose en distintos parámetros:

- contenido de G+C (50-60%)
- temperatura de hibridación (57-63° C)
- tamaño del cebador (18-23 pb)
- tamaño del producto (100-300 pb)
- localizados entre exones diferentes

La eficiencia de las distintas parejas de oligonucleótidos fue calculada mediante diluciones seriadas de un ADNc. La recta de regresión lineal obtenida en los cebadores utilizados en esta tesis doctoral tiene una pendiente aproximada a $-3,3 \text{ Log}(x)$.

Para confirmar que el producto obtenido en la PCR es resultado específico de los cebadores empleados, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (USBiological, Massachusetts, USA) en una solución tampón que contienen Tris-base, ácido acético y EDTA (TAE) 1X (USBiological, Massachusetts, USA). El gel de agarosa contiene una solución bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA), un agente que se intercala entre los ácidos nucleicos. Cuando el gel se expone a luz ultravioleta, el bromuro de etidio emite una luz roja-anaranjada, lo que permite visualizar los productos de PCR.

Las condiciones de la electroforesis a las que fueron sometidas las muestras son constantes a 75 V y 100 mA. Las muestras se diluyeron en una solución que contiene glicerol (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) al 30% en agua con azul de bromofenol (Sigma-

Aldrich, St Louis, Missouri, USA) que proporcionan peso a la muestra para depositarla en el interior del pocillo, y coloración para visualizar el frente de avance respectivamente. Finalmente, se visualizaron las bandas en un transiluminador (LAS-3000 Imaging System from Fuji, Madrid, España).

5. Inmunocitoquímica (ICQ)

Esta técnica permite la detección de proteínas mediante la unión antígeno-anticuerpo, y una reacción colorimétrica proporcional a la cantidad de antígeno detectada. Para realizar este tipo de análisis, las MSC se sembraron en placas especialmente diseñadas para esta técnica (Nunc, Rochester, NY, USA). Las MSC fueron diferenciadas a hepatocitos a través de los protocolos CDH1 y CDH2. Al finalizar el proceso de diferenciación, se retiró el medio de cultivo y se lavaron 2 veces con PBS. Antes de comenzar la tinción, se retiró el separador de los pocillos con una hoja de bisturí.

Protocolo de ICQ: Las MSC fueron fijadas con un 5% de ácido acético en etanol al 95% a 4° C durante 30 segundos. Las células se lavaron en agua bidestilada durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación las muestras se lavaron dos veces con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras el lavado las células se incubaron 10 minutos con una solución de peróxido de hidrógeno (DakoCytomation Glostrup, Dinamarca) para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Tras lavar con solución de lavado al 1X (DakoCytomation Glostrup, Dinamarca), las muestras se incubaron con

el anticuerpo primario específico que deseamos evaluar durante 1 h a temperatura ambiente (Tabla 4). Tras otro lavado, las células se incubaron con un polímero que contiene actividad peroxidasa HRP (del inglés, *Horseradish peroxidase*, DakoCytomation Glostrup, Dinamarca) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se lavaron en las mismas condiciones descritas anteriormente, para retirar el exceso de polímero. Seguidamente, las células se trataron con el cromógeno diaminobencidina (DAB) (DakoCytomation Glostrup, Dinamarca) entre 5 y 10 minutos a temperatura ambiente según el anticuerpo. El reactivo se preparó con una gota de DAB diluída en 1 ml de diluyente de DAB. Al terminar, las muestras se lavaron en agua bidestilada durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para contrastar la tinción, las muestras se tiñeron con hematoxilina de Gill (DakoCytomation Glostrup, Dinamarca) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente las muestras fueron deshidratados en una secuencia ascendente de alcoholes, finalizando en un baño de xilol y se montaron con un medio sintético (Eukkit® mounting medium, Labolan, Navarra, España). Las imágenes digitales fueron obtenidas con un microscopio óptico Nikon Coolscope a 20 y 40 aumentos.

(*) En el caso del marcaje con α 1-AT, antes de la incubación con el anticuerpo primario fue requerido un tratamiento previo con proteinasa K (DakoCytomation Glostrup, Dinamarca) durante 5 minutos a temperatura ambiente.

(**) Para la detección de PCNA nuclear, las células fueron depositadas en un porta de poli-L-lisina (PolysineTM, VWR International Europe bvba, Leicestershire, UK) utilizando el cytospin (Shandon Cytospin 4, Thermo electron corporation, Fisher Scientific, Madrid, España).

Al finalizar la diferenciación a hepatocitos con los protocolos CDH1 y CDH2, las células fueron tripsinizadas y, 50.000 de ellas, fueron diluidas en 200 µl de PBS. La suspensión celular se colocó en el adaptador del cytospin junto al porta y se centrifugaron a 800 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente.

Tabla 4. Anticuerpos específicos para humanos utilizados para ICQ

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución	Referencia
Albumina	DakoCytomation Glostrup, Dinamarca	1:2000	A0001
α -fetoproteína	R&D Systems Inc, Minneapolis, USA	10 µg/ml	AF1368
Citoqueratina-19	R&D Systems Inc, Minneapolis, USA	10 µg/ml	MAB3506
α 1-antitripsina (*)	DakoCytomation Glostrup, Dinamarca	1:800	IR505
PCNA (**)	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, California, USA	1:75	sc-56

6. Tinción PAS o Schiff

Para determinar la presencia de depósitos de glucógeno en el interior de las MSC diferenciadas a hepatocitos, las células se tiñeron

con la tinción PAS o Schiff. Se utilizó un kit comercial de la casa Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA).

Protocolo: Las MSC se sembraron en placas de 6 pocillos y se diferenciaron a hepatocitos con ambos protocolos, CDH1 y CDH2. Se retiró el medio de cultivo y se lavaron dos veces con PBS. A continuación, las células se fijaron con una solución fijadora durante 1 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar, las MSC se lavaron con agua bidestilada y se incubaron con una solución que contiene ácido periódico durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, las células se lavaron tres veces con agua bidestilada y se tiñeron con el reactivo de Schiff, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Al terminar la incubación, las células se lavaron de nuevo con agua bi-destilada durante 5 minutos a temperatura ambiente y se contratiñeron con hematoxilina de Gill durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar con abundante agua bidestilada las células se visualizaron en el microscopio óptico y se tomaron fotos a 10X.

7. Microscopía confocal

Las MSC se sembraron en las mismas placas utilizadas para ICQ (Sección 5) y se diferenciaron a hepatocitos con ambos protocolos, CDH1 y CDH2.

Protocolo: Antes de comenzar el marcaje, se retiró el medio de cultivo y las MSC se lavaron con PBS (3 veces) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras el lavado, las células se fijaron y permeabilizaron con metanol (MERCK, Madrid, España). Primero en metanol al 50% en agua fría durante 2 minutos, luego con metanol al

100% a -20° C durante 20 minutos, y para terminar con metanol al 50% en agua fría durante 2 minutos. Al finalizar se lavaron con abundante volumen de PBS (3 veces) para retirar cualquier resto de metanol. A continuación se incubó durante 1h a temperatura ambiente con anti- β -catenina (Dilución 1:50, Referencia 610153, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA). El anticuerpo se preparó en PBS con 1% BSA para evitar uniones inespecíficas. Transcurrido el tiempo, las células se lavaron de nuevo con PBS antes del marcaje con el anticuerpo secundario. Se empleó un anti-mouse IgG-FITC (Dilución 1:500, Referencia F0232, DakoCytomation Glostrup, Dinamarca) durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. También fue diluido en PBS con 1% de BSA. Al terminar, y manteniendo las condiciones de oscuridad, se tiñeron los núcleos con DAPI (Invitrogen, California, USA) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las MSC se lavaron con PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente antes del montaje con glicerol al 70% en agua. Los márgenes del cubre se sellaron con laca de uñas. Las muestras se guardaron en frío y en oscuridad hasta ser observadas en el microscopio confocal LSM 5 Exciter Carl Zeiss (Munich, Alemania). Las imágenes fueron analizadas con el ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) utilizando el plugin Colocalization finder para generar una submáscara indicativa del grado de colocalización nuclear.

8. Electroforesis y Western-blot

8.1 Extracción de la fracción citoplasmática y nuclear

Al finalizar la diferenciación, se retiró el medio de cultivo y se lavaron los pocillos 2 veces con PBS. La fracción citoplasmática se obtuvo con una solución de lisis a pH 7.9 que contiene 10 mM Hepes, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 70 µg/ml de cocktail de inhibidores de proteasas, 0.5% Igepal CA-630. Todos los componentes celulares de esta solución de lisis son de la casa comercial Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA). La lisis se produjo en frío con ayuda de un rascador. El volumen recuperado se centrifugó a 13000 rpm durante 3 minutos a 4° C. El sobrenadante obtenido es la fracción citoplasmática. Las muestras se almacenaron a -80° C hasta el momento de uso.

La fracción nuclear se obtuvo tras incubar el precipitado celular con otra solución de lisis también a pH 7.9 que contiene 20 mM Hepes, 0.4 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 46 µg/ml cocktail de inhibidores de proteasas. Todos los componentes de la solución de lisis también son de la casa comercial Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA). Las muestras se incubaron con la solución de lisis en frío durante 20 minutos agitando vigorosamente cada 5 minutos. El volumen recuperado se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos a 4° C. El sobrenadante obtenido es la fracción nuclear. Las muestras se almacenaron a -80° C hasta el momento de uso.

8.2 Cuantificación de proteínas por el método Bradford

El reactivo denominado solución de Bradford (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemania) interacciona con las proteínas formando complejos colorimétricos relativamente estables con un pico de absorbancia a 595 nm. La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos (SPL Life Sciences Inc, Korea) y la absorbancia a 595 nm se midió en un lector de placas. La concentración de proteína de cada muestra se calculó mediante el uso de BSA como patrón en cada ensayo (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemania).

8.3 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

Para la realización del western-blot entre 20 y 50 µg de proteínas citoplasmáticas o nucleares se diluyeron en agua hasta alcanzar un volumen final de 20 µl y se mezclaron con una solución tampón de carga (Invitrogen, California, USA). Las proteínas se desnaturalizaron calentándolas a 70° C durante 10 minutos en un termobloque.

Las muestras se cargaron en geles del 7%, 10% o 12% de SDS-poliacrilamida (Invitrogen, California, USA) dependiendo del peso molecular de la proteína que se desea determinar. El tampón de electroforesis fue Tris-Acético (Invitrogen, California, USA) en el caso del gel al 7%, mientras que en el caso de los geles al 10 y 12%, el tampón de electroforesis fue MES-SDS (Invitrogen, California, USA). Las condiciones de electroforesis fueron constantes a 200 V y 90 mA (Figura 9).

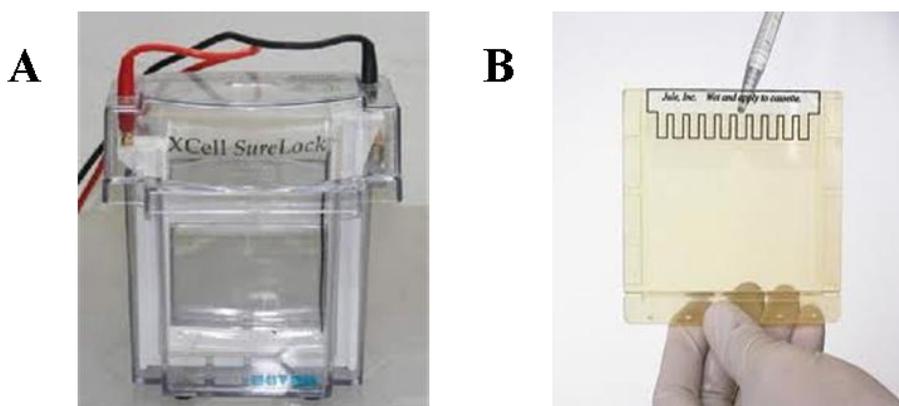


Figura 9. A: Imagen de la Cubeta de electroforesis de la casa comercial Invitrogen (California, USA). **B:** Imagen del Gel de acrilamida y peine de la casa comercial Invitrogen (California, USA)

8.4 Transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa

Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Invitrogen, California, USA). Se realizó una transferencia semiseca (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemania). Para ello hicimos un sándwich con papeles absorbentes *Whatman* (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemania) y entre ellos situamos la membrana de nitrocelulosa (Invitrogen, California, USA) y el gel. Previamente, todos estos componentes se equilibraron durante 5 minutos en un tampón que contiene: 50 mM Tris base (USBiological, Massachusetts, USA), 0.2 M Glicina (USBiological, Massachusetts, USA), SDS 0.02% (USBiological, Massachusetts, USA) y metanol 20%. La transferencia se realizó durante 1 h en condiciones constantes de 25 V y 230 mA (Figura 10).

Para confirmar la equivalencia de carga de proteína en las distintas muestras, al finalizar la transferencia las membranas se tiñeron con solución rojo Ponceau al 0.1% (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) y con un 5% de ácido acético durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron con agua hasta que la proteína transferida fue claramente visible (Figura 11).

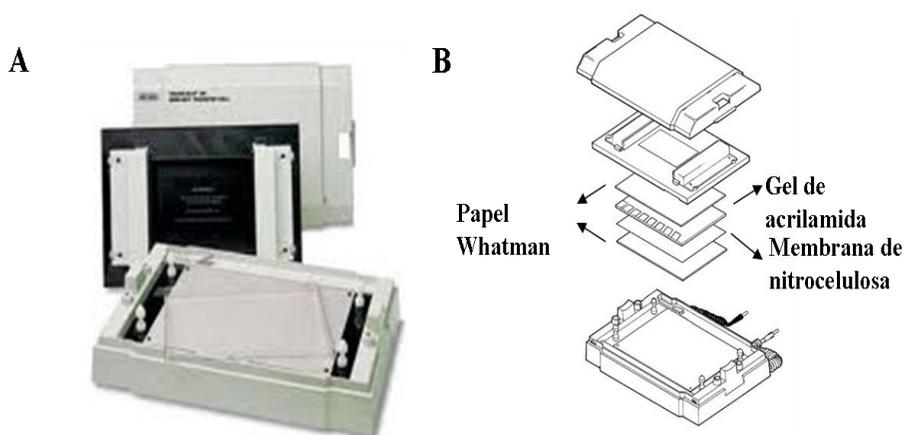


Figura 10. A: Imagen del Transfer blot de Biorad (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemania) utilizado en esta tesis para realizar una transferencia semiseca. **B:** Esquema del sándwich realizado con los papeles Whatmann, membrana de nitrocelulosa y el gel de acrilamida.

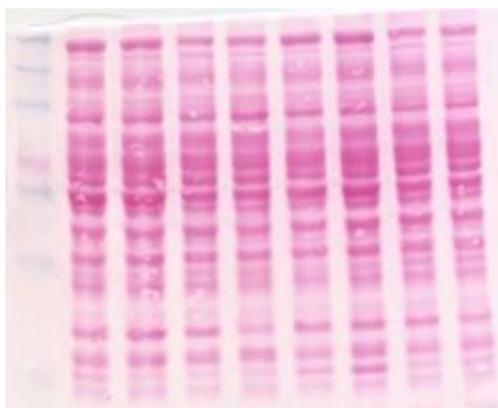


Figura 11. Imagen representativa de una membrana de nitrocelulosa teñida con rojo Ponceau

8.5 Inmunodetección y revelado

Una vez comprobado que la carga proteica en el blot y la transferencia fue correcta, la membrana se lavó durante 5 minutos a temperatura ambiente con una solución tampón denominada TTBS a pH 7.6 que contiene: Tris base 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.2% (v/v) (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) en agitación suave para eliminar completamente los restos de rojo Ponceau.

A continuación, para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario, la membrana se bloqueó con un 5% de leche (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemania) en TTBS a pH 7.6 durante 1 h a temperatura ambiente con una agitación suave. Tras el bloqueo, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluido en la solución bloqueante durante toda la noche a 4° C también con una agitación suave. Al finalizar la incubación, las membranas se lavaron 3 veces con la solución TTBS para luego incubarlas con un anticuerpo secundario conjugado con HRP y diluido en TTBS con 5% de leche. Se utilizaron anticuerpos anti-ratón-HRP (Dilución 1:5000, Referencia sc-2005, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, California, USA) o anti-conejo-HRP dependiendo del origen del anticuerpo primario (Dilución 1:5000, Referencia sc-2020, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, California, USA) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación suave. La membrana se lavó de nuevo 3 veces con TTBS.

Finalmente se revelaron empleando el sistema de detección ECL Advance (Amersham Biosciences UK. Limited, Little Chalfont, UK). La membrana se envolvió en film transparente para ser revelado

con autorradiografías (GE Healthcare, Madrid, España). Los líquidos de revelado y fijación fueron de la casa comercial Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA).

Tabla 5. Anticuerpos específicos para humanos utilizados para western-blot

Fracción nuclear			
Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución	Referencia
β-catenina	Cell Signaling, Boston, MA, USA	1:1000	9562
TFIIB	Cell Signaling, Boston, MA, USA	1:1000	4562

Fracción citoplasmática			
Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución	Referencia
Lactato deshidrogenasa	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, California, USA	1:200	sc-100775
Tropomiosina	Novus Biologicals Littleton, Colorado, USA	1:500	ABIN60488 5
Adenosil fosforibosil transferasa	Novus Biologicals Littleton, Colorado, USA	1:500	ABIN38942 6
Transgelina	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, California, USA	1:2000	sc-100960
Cathepsina B	Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA	4 µg/ml	C6243
Tubulina	Abcam, Cambridge, UK	1:10000	ab4074
p53	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, California, USA	1:200	sc-100

9. Electroforesis diferencial en gel (DIGE)

El contenido proteico de MSC indiferenciadas y diferenciadas con los protocolos CDH1 o CDH2 se precipitó con acetona y se solubilizó en un tampón que contenía: 7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS y 30mM Tris a pH 8. Todos los componentes del tampón de muestra fueron de la casa comercial Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA). 50 µg de proteína se incubaron con 400 pM de CyDye DIGE Fluor minimal dyes (GE Healthcare, Madrid, España) durante 30 minutos en oscuridad y a 4° C. Las muestras se marcaron con los fluoróforos Cy3 y Cy5, mientras que el control interno formado por una mezcla a partes iguales de todas las muestras se incubó con Cy2. La reacción se detuvo añadiendo 1 µl de una solución 10 mM de lisina (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) durante 10 minutos a 4° C. A continuación, las muestras se depositaron sobre tiras de gradiente inmovilizado de pH de 24 cm desde pH 3-11 no linear (GE Healthcare, Madrid, España) y se sometieron a isoelectroenfoque (IEF) en un equipo IPGphor™ IEF System (GE Healthcare, Madrid, España) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Al finalizar el IEF las tiras se incubaron en el tampón de equilibrado que contiene 50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% glicerol, 2% SDS, y azul bromofenol. Este tampón se complementó en el momento de uso con 0,5 p/v de DTT y se incubó durante 15 minutos. A continuación se incubaron en el mismo tampón pero esta vez complementado con 4,5% yodoacetamida durante 15 minutos. Todos los componentes de este tampón fueron de la casa comercial Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA).

Para realizar la segunda dimensión, las tiras se cargaron sobre un gel de poliacrilamida al 12,5%. Tras la electroforesis, los geles 2D se escanearon en el TyphoonTM Trio Imager (GE Healthcare, Madrid, España) con una resolución de 100 μm con $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ de 488/520, 532/580, y 633/670 nm para Cy2, Cy3, y Cy5 respectivamente. El tubo fotomultiplicador se configuró a una intensidad máxima de pixel entre 90.000 y 99.000 pixeles. El análisis de imagen se realizó empleando el software DeCyder 6.5 (GE Healthcare, Madrid, España). Para cada condición experimental se realizaron tres experimentos independientes. Se empleó el módulo de análisis diferencial en gel para la detección de spots, la cuantificación del volumen del spot y para la normalización del volumen de cada spot en diferentes muestras en un mismo gel. Luego, se empleó el módulo de análisis de variación biológica para marcar spots de proteínas entre geles diferentes y para identificar aquellos spots de proteínas que mostraron diferencias significativas entre las distintas situaciones experimentales. La expresión diferencial proteica se consideró para el análisis MS cuando los cambios fueron mayores de 1.2 veces y el valor-p tras un T test inferior al 0.05.

La electroforesis de los geles preparativos (350 μg de proteína) se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente. Las proteínas se visualizaron con la tinción SYPRO Ruby (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany) y las imágenes se adquirieron con TyphoonTM Trio Imager empleando una $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ de 532/560 nm. Los spots con expresión diferencialmente representativa se escindieron manualmente y se procesaron con MassPrep station (Waters, Milford, Massachusetts, USA). La digestión en gel se realizó con 12.5 ng/ μl de

tripsina en 50 mM de bicarbonato amónico (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) durante 12 h a 37° C. Los péptidos resultantes obtenidos se extrajeron con 5% de ácido fórmico (MERCK, Madrid, España) y 50% de acetonitrilo (MERCK, Madrid, España), y las muestras se concentraron en una bomba de vacío antes del análisis MS.

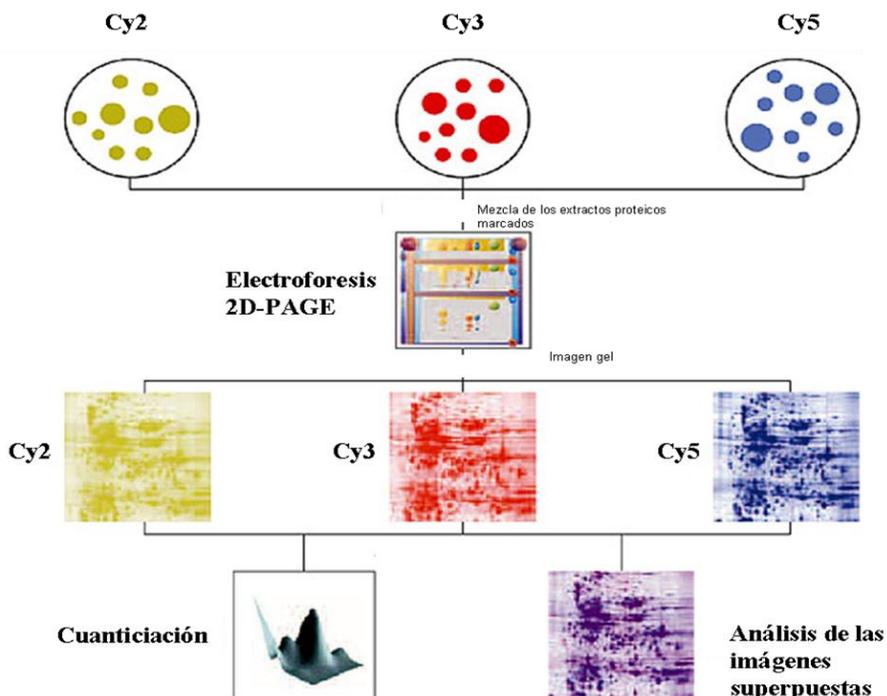


Figura 12. Esquema de una electroforesis diferencial en gel (DIGE). Esquema modificado desde <http://www.med.uc.edu/proteomics/dige.htm>

9.1 Identificación de las proteínas mediante análisis LC-ESI-MS/MS

El análisis ESI-MS/MS se llevó a cabo en la Unidad de Proteómica del CIMA, Universidad de Navarra. Se utilizaron microcapilares de fase reversa en el sistema CapLCTM (Waters,

Milford, Massachusetts, USA). La separación de los fragmentos tripticos se realizó con una columna capilar de sílice fundida Atlantis, C18, 3 μm , 75 μm x 10 cm Nano EaseTM (Waters, Milford, Massachusetts, USA) equilibrada en 5% de acetonitrilo y 0.2% de ácido fórmico. Después de inyectar la muestra, la columna se lavó durante 5 minutos con el mismo tampón y los péptidos se eluyeron usando un gradiente lineal de 5-50% de acetonitrilo en 30 minutos con un incremento constante de flujo de 0.2 μl / minuto. La columna se acopló a un espectrómetro de masas Q-TOF Micro (Waters, Milford, Massachusetts, USA) usando una fuente de ionización nanospray PicoTip (Waters, Milford, Massachusetts, USA). La temperatura del capilar fue de 80° C y el voltaje fue de 1.8-2.2 kV. Los datos de MS/MS se recogieron de modo automático, y los tres iones más intensos se fragmentaron secuencialmente por disociación inducida por colisión usando una anchura de aislamiento de 2.5 y una energía de colisión relativa del 35%. El procesamiento de los datos se realizó con MassLynx 4 y ProteinLynx Global Server 2 (Waters, Milford, Massachusetts, USA).

10. Ensayo para la formación de Esferas

Al finalizar el proceso de diferenciación de las MSC con CDH1 o CDH2, las células fueron tripsinizadas siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 1.1.2.1 de esta tesis doctoral. Las células obtenidas fueron cultivadas a una densidad de 5×10^4 células / ml en placas de 6 pocillos de baja adherencia (SPL life sciences, Korea) con el medio de cultivo DMEM:H12 (Dulbecco's modificate essential

medium:Hank's 12, PAA laboratories, GMBH, USA) sin glutamina ni antibióticos ni suero pero suplementado con 20 ng/ml de EGF, 10 ng/ml de FGF-b, B27 1X (Invitrogen, California, USA) e insulina 100 UI (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca). A los dos días de cultivo se añadió 1 ml más de medio suplementado en el pocillo, y a los 4 días se visualizaron esferas al microscopio óptico.

Para llevar a cabo un recuento celular, todo el volumen se recogió en un tubo cónico y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos a 4° C. Las esferas se disgregaron con tripsina-EDTA a 37° C durante 2 minutos. Se realizó un recuento celular en la cámara de Neubauer con azul tripán siguiendo el mismo protocolo seguido en el apartado 1.1.2.2 de esta tesis doctoral. Estas células volvieron a ser sembradas en las mismas condiciones pero en placas de 96 pocillos (SPL life sciences, Korea) para originar esferas secundarias. En este caso las células se sembraron en una dilución clonal de célula / μ l. A los 2 días de cultivo se le añadió medio fresco al cultivo, y a los 4 días se realizó un recuento del número de esferas en un microscopio óptico.

Una imagen 3D de estas esferas se obtuvo por microscopía confocal. Para ello, recogimos las esferas secundarias en un tubo eppendorf y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos a 4° C. Tras decantar el sobrenadante teñimos las células con DAPI durante 5 minutos en oscuridad. Lavamos las esferas con 500 μ l de PBS, y las centrifugamos de nuevo.

Para la reconstrucción 3D, se recogieron una serie de imágenes de confocal a través de las esferas con un tamaño de paso de 0.488 μ m entre el plano óptico adyacente, comprendiendo ambos polos de la

esfera (Z Project). La animación 3D se consiguió con el programa ImageJ.

11. Análisis del Ciclo celular

El ciclo celular es un proceso muy ordenado que conduce al crecimiento celular y a la división en dos células hijas. Se compone de cuatro fases: G1, S, G2 y M. La primera etapa G1 (intervalo 1) es una fase de crecimiento con síntesis de proteínas y ARN. La fase S, es la segunda etapa y en ella se replica el ADN. A continuación las células comienzan otra etapa de crecimiento G2 para finalizar en la fase M o de división celular que incluye la mitosis y la citocinesis (Figura 13).

Protocolo: Aproximadamente, 1×10^6 de MSC indiferenciadas y diferenciadas con ambos protocolos: CDH1 o CDH2, se tripsinizaron y se fijaron con etanol frío al 70% durante toda la noche. Al terminar, las células se centrifugaron a 1800 rpm durante 5 minutos a 4° C. Decantamos el sobrenadante y el precipitado celular se lavó 2 veces con solución de Hank's al 1X (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA). Se centrifugaron en las mismas condiciones anteriormente citadas. A continuación, las células se rompieron con una solución de extracción de ADN que contiene ácido cítrico 0.1 M (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) y fosfato disódico 0.2 M a pH 7.8 (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar, las células se centrifugaron de nuevo a 1800 rpm durante 5 minutos a 4° C, y el precipitado celular se resuspendió en 100 μ l de una solución que contiene 50 μ g/ml de ARNasa (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA), 0.1% de triton-X-100 (Sigma-Aldrich, St

Louis, Missouri, USA) y 0.1 M de EDTA en PBS. Las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

Finalmente, se resuspendieron en 1 ml de PBS y se adquirieron a baja velocidad en el citómetro de flujo. El análisis de ciclo celular se realizó con el programa FlowJo basado en el algoritmo matemático de Watson (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

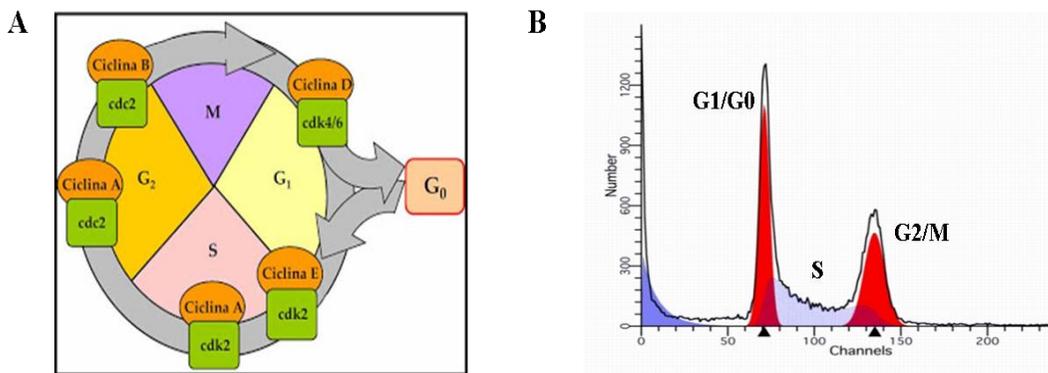


Figura 13. A: Fases del ciclo celular. B; Análisis del ciclo celular por citometría de flujo (B). G₀: quiescencia, G₁: intervalo 1, S: síntesis ADN, G₂: intervalo G₂ y M: Mitosis.

12. Análisis estadístico

Los datos se expresan como media \pm error estándar. La diferencia entre las medias de dos grupos diferentes se evaluaron por un análisis con un test t-Student para muestras independientes y los valor $p \leq 0.05$ se consideraron significativos. Los datos se analizaron con el software SPSS.11

BLOQUE 2: Papel de la movilización de células madre de médula ósea en pacientes con patologías hepáticas

13. Pacientes sometidos a una hepatectomía parcial: Criterios de inclusión

El estudio se realizó en 33 pacientes derivados de la Unidad de Cirugía Hepatobiliar del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba sometidos a una HP. El protocolo del estudio fue aprobado por el comité ético de dicho hospital cumpliendo los principios expuestos en la Declaración de Helsinki de 1975. Los pacientes se escogieron en estricto orden de ingreso durante el período de desarrollo de la investigación y firmaron un consentimiento informado para participar en el estudio.

El informe quirúrgico y clínico de los pacientes hepatectomizados fue proporcionado por la Unidad de Cirugía Hepatobiliar del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba. La tabla 6 recoge un resumen de las características clínicas de estos pacientes. Se seleccionaron indistintamente hombres y mujeres con un promedio de edad de 58,6 años (13 ± 77). La mayoría padecían un proceso tumoral primario, como HCC (21,2 %), colangiocarcinoma (15,1 %), cáncer de vesícula (9,1 %), o un tumor secundario con metástasis en hígado (27,3 %). También se incluyeron en el estudio pacientes que sufrían un proceso tumoral benigno (12,1 %) y otro tipo de lesiones con funcionalidad hepática comprometida (15,1 %).

Tabla 6. Características clínicas de los pacientes sometidos a hepatectomía parcial incluidos en el estudio.

	N	Sexo	Edad
Tumores Primarios			
HCC	7	Mujer	63
		Hombre	71
		Hombre	61
		Hombre	57
		Mujer	58
		Hombre	63
		Hombre	74
CHOL	5	Hombre	72
		Hombre	57
		Hombre	76
		Hombre	71
		Mujer	50
Cáncer de vesícula	3	Mujer	72
		Mujer	66
		Mujer	77
Tumores Secundarios			
Mtx	9	Mujer	66
		Hombre	70
		Mujer	63
		Mujer	48
		Mujer	69
		Mujer	60
		Hombre	40
		Mujer	41
		Mujer	28
Tumores Benignos			
FNH	2	Hombre	27
		Mujer	76
Adenoma	1	Mujer	13
Hemangioma	1	Mujer	56
Lesiones no tumorales			
Abceso Hídático	3	Hombre	76
		Mujer	46
		Hombre	43
Caroli	1	Hombre	65
Hematoma	1	Hombre	52

13.1 Hepatectomía parcial

La HP fue realizada siguiendo los principios de la segmentación hepática descrita por Couinaud: I-II-III-IV-V-VI-VII-VIII (Figura 14).

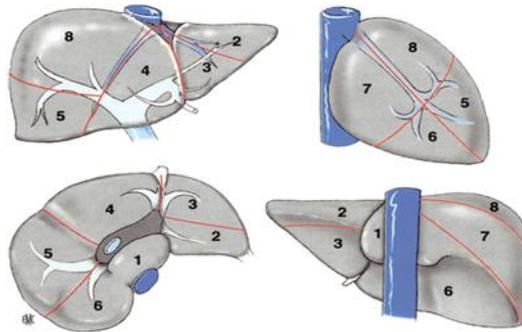


Figura 14. Esquema de los segmentos que componen el hígado en base a la segmentación hepática descrita por Couinaud.

En función del alcance de la lesión hepática de cada paciente, la resección puede ser menor (< 3 segmentos), o mayor (> 3 segmentos). La HP también se clasifica en izquierda (II-III) o derecha (resto), en función del segmento resecado. En porcentaje, la HP izquierda constituye aproximadamente un 25-30% de la masa hepática total mientras que la HP derecha constituye aproximadamente el 60-70%.

Protocolo: los pacientes se colocaron en la posición decúbito supino. La incisión en la piel y tejido subcutáneo se realizó con un bisturí eléctrico. La pared abdominal se mantiene abierta con el separador Rochard, envuelto en sus extremos con dos compresas empapadas en povidona iodada para proteger los bordes. A continuación se liga y secciona el pedículo o hilio hepático, y sus elementos: conducto cístico, arteria cística, arteria hepática y vena porta. El corte sobre el tejido se realizó con TissueLink (TissueLink

Medical Inc, Dover, NH, USA), clips y un electrocauterizador. Se termina con la disección y clampaje de la vena cava suprahepática e infrahepática. Los vasos de más de 2 mm de diámetro se ligan con hilos de seda de 4/5-0. Durante la cirugía, se realiza una reposición sistemática de líquidos y sangre si es necesario, ya que el mantenimiento hemodinámico es fundamental. También se realiza un análisis bioquímico continuado para corregir el equilibrio ácido-base, y se mantiene la temperatura corporal del paciente alrededor de los 37° C.

Para evitar una insuficiencia hepática postoperatoria, en el caso de lesiones tumorales se debe conservar al menos un 30% de la masa original del hígado. Hay que respetar el margen de seguridad de 1 cm alrededor de la lesión para evitar el riesgo de recidiva, así como los pedículos de los segmentos restantes evitando así dejar un sector mal vascularizado, fuente de isquemia y necrosis.

13.2 Recogida de muestras

Se recogieron muestras de sangre de los pacientes antes de ser sometidos a la HP (0 h) y tras 72 h de la intervención quirúrgica. La sangre obtenida se añadió a tubos de recolección que separan suero (SST Vacutainer™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) y plasma (EDTA Vacutainer™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Para obtener el suero, las muestras se centrifugan a 3500 rpm durante 5 minutos a 4° C mientras que para obtener el plasma, fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos a 4° C. Se realizaron alícuotas y se almacenaron a -20° C para futuras mediciones.

Durante la intervención también se recogieron biopsias de tejido que se limpiaron de adherencias y coágulos sanguíneos con gasas estériles y suero fisiológico. El tejido se cortó con un bisturí en finas láminas y se introdujo en paraformaldehído al 4% (MERCK, Madrid, España) a temperatura ambiente para realizar estudios histológicos.

14. Citometría de flujo en sangre periférica

La presencia de marcadores específicos de células madre en sangre periférica de pacientes sometidos a HP fueron analizados por citometría de flujo en 3 poblaciones celulares: linfocitos (R1), monocitos (R2) y granulocitos (R3) antes (0 h) y 72 h después de la resección hepática (Figura 15)

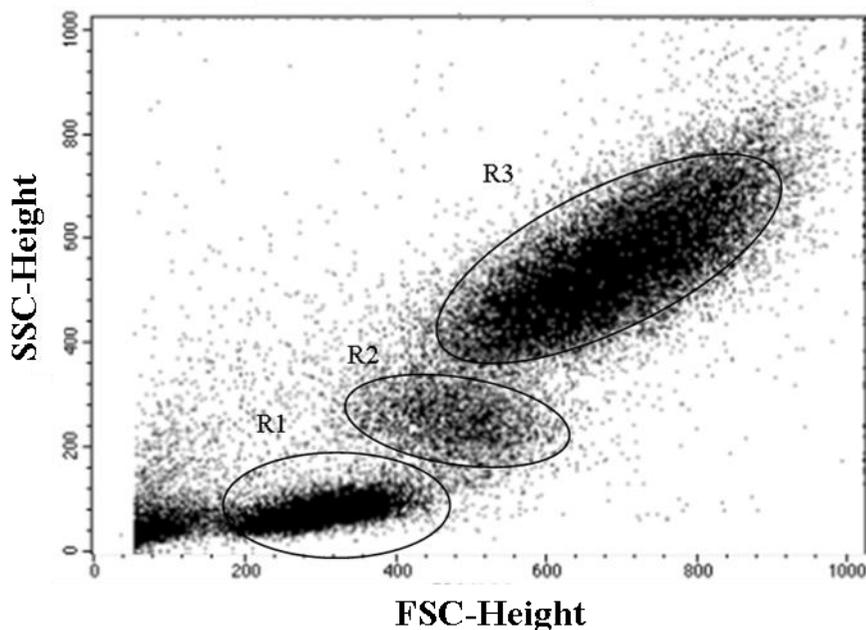


Figura 15. Diagrama del FSC y SSC de una muestra de sangre periférica. R1:linfocitos, R2:monocitos y R3:granulocitos.

Protocolo de marcaje: 100 µl de sangre total se marcaron con diferentes anticuerpos monoclonales para determinar el inmunofenotipo que presentan en superficie con una citometría convencional de dos colores: FITC y PE. Los anticuerpos utilizados se recogen en la tabla 2 del bloque 1 de experimentos de esta tesis doctoral. El ensayo se realizó en tubos de citometría adecuados para FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA).

La muestra se incubó con 10 µl del anticuerpo monoclonal durante 10 minutos a 4° C en oscuridad. Transcurrido el tiempo de marcaje con los anticuerpos, la muestra se incubó con 1 ml de tampón de lisis de eritrocitos (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. El tampón de lisis se diluyó previamente 1:10 en agua bidestilada. Después se añadió 3 ml de suero fisiológico, y las muestras se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos a 4° C. Descartamos el sobrenadante y el precipitado celular se lavó de nuevo con suero fisiológico en las mismas condiciones de centrifugación. Finalmente descartamos el sobrenadante, y el precipitado se resuspendió en 500 µl de suero fisiológico.

Para este ensayo se adquirieron 5×10^4 células en las tres poblaciones celulares y se analizaron siguiendo el mismo procedimiento que se empleó para analizar el inmunofenotipo de las MSC en el apartado 3.1 del bloque 1 de experimentos de esta tesis doctoral.

15. Estudio histológico

15.1 Toma de muestras y fijación del tejido

Las biopsias hepáticas de los pacientes sometidos a una HP se tomaron a 0 h y se lavaron con suero fisiológico para retirar los restos sanguíneos, y a continuación se fijaron con paraformaldehído al 4% para conservar la arquitectura y composición tisular lo más próxima posible a como se encontraba en el organismo vivo.

15.2 Inclusión en parafina

En primer lugar, los tejidos se colocaron en unos cassettes y se deshidrataron en un sistema automático de preparación de muestras histológicas (Leyca TP1020, Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania). La deshidratación consistió en baños de aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente en paraformaldehído al 4%, siguiendo una serie ascendente de alcoholes: 70%, 80%, 95% (2 baños) hasta 100% (3 baños) y finalmente en xilol (2 baños). A continuación, las muestras fueron incluidas en parafina líquida (2 baños). Todos los reactivos utilizados en este procesador fueron de la casa comercial MERCK (Madrid, España). Al terminar la secuencia, los tejidos se traspasaron a unos moldes de plástico que se rellenaron de parafina líquida mediante un dispensador Leyca EG1120 (Leyca, Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania). Este molde se solidificó en una placa fría. Finalmente, los bloques se conservaron a -20° C durante al menos 24 h antes de comenzar a realizar los cortes.

16.3 Corte histológico

Se realizaron en un Microtomo RM2255 (Leyca, Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania). Primero se debastó el bloque a 20 μm , y una vez llegado al tejido se realizaron secciones con un grosor de 4 μm . Los cortes se colocaron en un baño de agua a 37° C, y se recogieron con un portaobjetos de vidrio recubierto con poli-L-lisina. Posteriormente, se secaron en una estufa a 37° C durante toda la noche.

16.4 Inmunohistoquímica (IHQ) en biopsias hepáticas

La IHQ es un estudio histopatológico que se basa en la utilización de un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno presente en una muestra de tejido incluida en parafina. Este anticuerpo se une a su vez, a un complejo enzimático que es capaz de transformar un sustrato en un compuesto visible sin afectar a la interacción antígeno-anticuerpo.

Tabla 7. Anticuerpos primarios específicos para humanos utilizados en IHQ en este bloque

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución	Referencias
SDF-1	eBioscience Ltd, London, UK	5 $\mu\text{g/ml}$	14-7992
CXCR-4	eBioscience Ltd, London, UK	10 $\mu\text{g/ml}$	14-6009
CD34	DakoCytomation Glostrup, Dinamarca	Dilución 1:100	IR632
Ki67	DakoCytomation Glostrup, Dinamarca	10 $\mu\text{g/ml}$	IR626
OV-6	R&D Systems, Wiesbaden, Alemania	10 $\mu\text{g/ml}$	MAB2020

Protocolo: Los cortes histológicos se desparafinaron introduciéndolos en un baño de xilol durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se rehidrataron siguiendo con una secuencia descendente de alcoholes en baños de 5 minutos a temperatura ambiente: 100% (2 baños)-95%-80%-70%-H₂O. No obstante, los antígenos proteicos se pueden encontrar enmascarados. Para exponerlos, las muestras se trataron con una solución tampón citrato 1X (ChemMate™ Target Retrieval Solution pH 6, DakoCytomation Glostrup, Dinamarca). El tampón se llevó a ebullición y las muestras se incubaron durante 3 minutos a máxima ebullición. Luego se dejaron en reposo durante 20 minutos en este tampón citrato. A continuación se lavaron con una solución de tampón 1X (DakoCytomation Glostrup, Dinamarca) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras el lavado las muestras se introdujeron en el inmunoteñidor DakoCytomation Autostainer Universal Staining System (Glostrup, Dinamarca) dónde continuó el protocolo de manera automatizada. El procedimiento para IHQ es igual al descrito para ICQ en el apartado 5 del bloque 1 de experimentos de esta tesis doctoral.

Las imágenes digitales fueron obtenidas con un microscopio óptico Nikon Coolscope a 5, 10 y 20 aumentos, y analizadas con el programa ImageJ.

16. Determinación de proteínas séricas por ensayo tipo ELISA

A través de ELISA (acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) se determinaron antes (0 h) y 72 h después de la HP los niveles de citoquinas relacionados con la movilización de las

BM-SC hacia la sangre periférica (SCF y SDF-1), interleuquinas y citoquinas que intervienen en la regeneración hepática (HGF, IL-12 y TGF- β), y proteasas encargadas de la degradación de la matriz extracelular (MMP-2) para estudiar la evolución de los mismos en el tiempo.

Protocolo: Los kits de ELISA se caracterizan por emplear una microplaca recubierta con un anticuerpo que reconoce específicamente a una proteína problema. Muestras de suero o plasma, según indique el manual de instrucciones, se depositaron sobre los pocillos de esta placa. A continuación, se incuban con un anticuerpo policlonal unido a moléculas de biotina que reconoce a la proteína problema. Al terminar la incubación, se añadió estreptavidina conjugada a HRP, que en presencia de un sustrato con actividad peroxidasa, provoca cambios de color en las muestras. La reacción enzimática se detuvo con una solución de parada, que normalmente contiene ácido sulfúrico. Finalmente, se midió la absorbancia en un lector de microplacas (TECAN, Salzburg, Austria) a la longitud de onda que indique el kit.

Tabla 8. La siguiente tabla recoge los ELISA utilizados en esta tesis

ELISA	Casa comercial	Referencia
SCF	R&D Systems, Wiesbaden, Alemania	DCK00
SDF-1	R&D Systems, Wiesbaden, Alemania	DSA00
HGF	Biosource International, CA, USA	MBS939404
IL-12	BenderMedsystems, Vienna, Austria	ABIN365212
TGF- β	BenderMedsystems, Vienna, Austria	ABIN414922
MMP-2	R&D Systems, Wiesbaden, Alemania	DMP2F0

17. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm error estándar. Los datos se analizaron con el test Wilcoxon's, prueba no paramétrica que permite comparar la media de dos muestras relacionadas y determinar si existen diferencias entre ellas.

BLOQUE 3: Terapia celular en un modelo experimental de daño hepático agudo

18. Modelo experimental de daño hepático agudo

Se utilizaron ratas Wistar hembra de 200-250 gr de peso, alimentadas con pienso (Purina ®, Barcelona, España) y agua *ad libitum*, mantenidas en jaulas individuales bajo condiciones de temperatura y de humedad controladas, y con ciclos de 12h luz/oscuridad. La intervención quirúrgica en los animales y los demás tratamientos experimentales se realizaron en las instalaciones acreditadas para tal fin en el animalario del IMIBIC. Los procedimientos experimentales en los animales cumplieron con la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo, y con los protocolos de cuidado y uso de experimentación del IMIBIC.

El daño hepático fue inducido con una inyección intraperitoneal de 400 mg/kg de tioacetamida (TAA) (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA), un tóxico hepatoespecífico. A las 18 h de recibir el tratamiento, ya era visible el daño hepático siendo máximo a las 48 h. Estos datos serán comentados más ampliamente en la sección IV de resultados de esta tesis doctoral. En base a esto, los animales fueron infundidos una infusión intraportal de MSC o del lisado (LIS) de éstas a las 18 h de recibir el tratamiento con TAA con el fin de restaurar o acelerar la recuperación de la funcionalidad en el hígado. El sacrificio fue realizado a las 48 h de la inyección de TAA (Figura 16).

Los animales fueron asignados en los distintos grupos de trabajo:

- 1) SO (del inglés, *Sham Operation*): animales sin tratamiento
- 2) TAA: animales que recibieron una inyección intraperitoneal de TAA junto a una infusión intraportal de 300 μ l de suero fisiológico
- 3) grupo TAA+MSC: animales que a las 18 h del tratamiento con TAA recibieron una infusión intraportal de 3×10^6 de MSC diluidas en 300 μ l de suero fisiológico
- 4) grupo TAA+LIS: igual que el grupo 3, pero los animales recibieron una infusión intraportal del lisado de 3×10^6 de MSC diluidas también en 300 μ l de suero fisiológico.

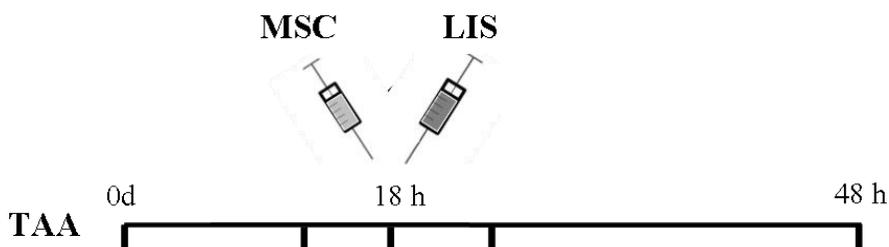


Figura 16. Diagrama del diseño experimental utilizado en este estudio. TAA: tioacetamida, MSC: células madre mesenquimales, LIS: lisado de MSC.

Las MSC se aislaron desde la cresta ilíaca de donantes humanos sanos siguiendo el mismo procedimiento empleado en apartado 1.1.2 del bloque 1 de experimentos de esta tesis doctoral. Las MSC se encontraban en fase 4. El lisado de las MSC (LIS) se obtuvo tras la sonicación de las MSC diluidas en suero fisiológico. Las células se sometieron a 3 pulsos de 1 minuto con intensidad media y descansos en hielo de 30 segundos. La solución obtenida se centrifugó a 13000 rpm

durante 5 minutos a 4° C. El sobrenadante obtenido es el lisado de las MSC. Al finalizar se comprobó en la cámara de Neubauer con azul tripán que no quedaban MSC ni vivas ni enteras.

18.1 Procedimiento quirúrgico

Los animales se sometieron a la intervención quirúrgica bajo anestesia inhalatoria con sevoflurano (Sevorane®, Abbott Laboratories S.A., Madrid España). El anestésico se va liberando por medio de un vaporizador al 3% y está conectado a una bomba de oxígeno que lo vehiculiza. Tras la sedación, se rasuró el abdomen del animal y se añadió una solución de povidona iodada desinfectante antes de comenzar la intervención. El procedimiento para la inyección intraportal de suero fisiológico, MSC o su lisado (LIS) se inició bajo condiciones de esterilidad, con una incisión en la línea media ventral, exponiendo la vena porta. Los tratamientos se inyectaron con una aguja de insulina de 29G. Al finalizar, se presionó ligeramente con un bastoncillo de algodón, al objeto de favorecer la coagulación y evitar el sangrado del animal. El cierre abdominal se realizó mediante una ligadura de seda de tipo 3/0 y con grapas. Tras la intervención quirúrgica los animales fueron tratados con el analgésico fentanilo (Kern Pharma S.L., Barcelona, España).

18.2 Recogida de muestras en animales

Los animales se sacrificaron a las 48 h de la inyección de TAA. La exanguinación se realizó mediante punción y extracción de sangre de la aorta abdominal. La sangre se depositó en tubos de recogida de

suero y plasma. Las muestras se obtuvieron siguiendo los mismos protocolos que se emplearon en la sección 14.2 del bloque 2 de experimentos de esta tesis doctoral. A continuación, el tejido hepático se perfundió in situ con suero fisiológico a 4° C a través de la aorta abdominal para eliminar los restos de sangre. Posteriormente el hígado se liberó, y se troceó con una hoja de bisturí en distintas secciones que se congelaron en criotubos para estudios génicos y proteicos. Los criotubos se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80° C. También se cortaron otras muestras de hígado en finas láminas que se almacenaron en paraformaldehído al 4%, conservando así la arquitectura y composición tisular lo más próxima posible a como se encontraba en el organismo vivo para realizar estudios histológicos.

19. Estudio histológico

El análisis para IHQ se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo empleado en las biopsias de los pacientes hepatectomizados, en la sección 16 del bloque 2 de experimentos de esta tesis doctoral. Los anticuerpos utilizados en esta ocasión se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Lista de anticuerpos para IHQ utilizados en este bloque

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución	Referencia
anti-rata β-catenina	Cell Signaling, Boston, Massachusetts, USA	1:200	9562
anti-rata PCNA	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, California, USA	1:75	sc-56
anti-humano CD90	Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA	25µg/ml	HPA003733

19.1 Tinción Hematoxilina-Eosina

Esta tinción colorea los núcleos celulares con la hematoxilina, y el citoplasma con la eosina. En primer lugar se eliminó la parafina de los portas tras una incubación en xilol durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se hidrataron en una secuencia descendente de alcoholes: 100% (2 baños), 95%, 70%, agua bidestilada, de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente.

Las muestras se incubaron durante 20 minutos en Hematoxilina de Harris (MERCK, Madrid, España) a temperatura ambiente. Se lavaron en abundante agua del grifo durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación se introdujeron 1 segundo en HCl 1 M, y se dejaron 1 minuto en una solución Azuleante (MERCK, Madrid, España) a temperatura ambiente. Después se volvieron a lavar con agua del grifo durante 5 minutos y se tiñeron con Eosina (MERCK, Madrid, España) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se lavaron de nuevo con agua del grifo durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se deshidrataron, siguiendo una secuencia ascendente de alcoholes. Las muestras acabaron en xilol (2 baños) hasta su montaje añadiendo unas gotas de medio de montaje Eukkit® sobre el corte y colocando encima un cubre hasta quedar bien sellado.

19.2 Tinción tricrómico de Masson

Esta técnica permite la coloración de fibras colágenas y elásticas, siendo adecuada para la detección de fibrosis hepática y necrosis de los conductos biliares observándose tres colores distintos: 1) azul, tejido conjuntivo, 2) rojo, tejido muscular, 3) lila, núcleo

celular. En primer lugar, las muestras se desparafinaron e hidrataron como en el apartado anterior (19.1) para la tinción de hematoxilina-eosina. A continuación, las muestras se tiñeron con una solución de Hematoxilina férrica de Weigert (Sharlau Chemie, Sharlab S.L., Barcelona, España) durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron durante 5 minutos con agua del grifo. Luego se tiñeron con una solución de Fucsina ácida 0.5% (Sharlau Chemie, Sharlab S.L., Barcelona, España) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras la incubación, las muestras se lavaron con agua del grifo durante 5 minutos. A continuación, los portas se trataron con una serie de soluciones ácidas durante 5 minutos cada una a temperatura ambiente; el orden fue el siguiente: ácido fosfomolibdico al 1% (Alfa Aesar, A Johnson Matthey Company, USA), azul de anilina (Sharlau Chemie, Sharlab S.L., Barcelona, España), ácido acético al 1% en agua, y alcohol acético (ácido acético al 1% en alcohol absoluto). Finalmente se llevó a cabo una deshidratación con un baño ascendente de alcoholes y se montaron las muestras con el medio sintético Eukkit®.

20. Bioquímica sérica

Las muestras de suero recogidas de los animales incluidos en este modelo experimental, se analizaron en el servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba donde se determinaron los niveles de Aspartato aminotransferasa (AST), Alanina transaminasa (ALT), Bilirrubina (BIL) y Fosfatasa alcalina (ALP) por técnicas espectrofotometría utilizando kits comerciales (Biosystems S.A., Barcelona, España).

21. Análisis de expresión génica por RT-PCR de tejido hepático

Se recogió en un tubo eppendorf 0.1 gr de hígado de cada uno de los animales de nuestro modelo experimental con 1 ml de Trizol. Se disgregó manualmente con ayuda de un micropistilo. Se siguió el mismo procedimiento empleado con las MSC en la sección 4 del bloque 1 de experimentos: extracción de ARN, tratamiento con DNAsa, retrotranscripción a ADNc y PCR a tiempo real para determinar la expresión del gen ciclina D1 vs. 18S. La tabla 8 muestra la secuencia génica del cebador utilizado para Ciclina D1, así como la Tm y el tamaño en pares de bases del producto obtenido. Las características del cebador 18S están recogidas en la tabla 3 del bloque 1 de experimentos de esta tesis doctoral.

Tabla 9. Cebadores de Ciclina D1 utilizado para determinar la expresión génica por PCR

Cebador	Secuencia	Tm (°C)	Producto (pb)
Ciclina D1	5' GCACAACGCACTTTCTTTCC 3' 5' TCTTCTCCACTTCCCCTTC 3'	84	157

22. Ensayo de muerte celular por Apoptosis

La apoptosis se determinó con un kit de ELISA tipo sándwich de detección de muerte celular (Roche Diagnostic, Barcelona, España) por el que se determina la cantidad de histonas citoplasmáticas asociadas a fragmentos de ADN (mono/oligonucleosomas) en los lisados celulares. Un anticuerpo-anti-histona marcado con biotina captura los nucleosomas en la placa recubierta de estreptavidina, y son detectados con el anticuerpo anti-ADN-POD marcado con peroxidada.

Protocolo: Los lisados celulares de tejido hepático se obtuvieron con un tampón que contenía 20 mM Tris a pH 7.6, 150 mM ClNa, 1mM EDTA, 1% IGEPAL, 1 mM PMSF, 70 µg/ml de cocktail de inhibidores de proteasas, 10 µl/ml de un cocktail inhibidor de fosfatasa 2 (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) y 10 µl/ml de un cocktail inhibidor de fosfatasa 3 (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA). Aproximadamente 50 mg de tejido hepático se lisó con 250 µl de tampón de lisis. Las muestras se incubaron durante 15 minutos en frío. Al finalizar se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 minutos a 4° C. El sobrenadante contenía la fracción proteica total del conjunto de células. Se guardó a -80° C hasta el momento de su uso.

Se incubó 20 µl de la suspensión proteica celular en agitación durante 2 h en unas microplacas revestidas con estreptavidina. Seguidamente, se les añadió 80 µl de inmunoreactivo compuesto por los dos anticuerpos. Los pocillos de las microplacas se lavaron 3 veces con 300 µl de tampón de lavado 1X. Al terminar, se incubaron en agitación lenta durante 3 minutos con 100 µl de sustrato ABTS. A continuación se midió la absorbancia en un lector de microplacas a una longitud de onda de 405 nm. El nivel de muerte celular se determinó como DO / mg de tejido.

23. Western-blot de tejido hepático

Se analizó la presencia de determinadas proteínas por western-blot en un extracto de proteínas intracelulares que contenía tanto la fracción citoplasmáticas como las nucleares con el mismo tampón de

lisis empleado en el apartado 5 del bloque de este bloque de experimentos. Para ello, 0.1 g de tejido se depositó en un tubo eppendorf con 500 μ l del tampón de lisis. El tejido se trituró con ayuda de un micropistilo en frío y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos a 4° C. El sobrenadante contenía la fracción proteica total del tejido.

El protocolo de western-blot es similar al utilizado con las MSC en la sección 8 del bloque 1 de experimentos de esta tesis doctoral. La única diferencia es que para la detección de proteínas fosforiladas es necesario bloquear e incubar el anticuerpo primario y secundario con un 5% de BSA en lugar de leche.

Tabla 10. Lista de anticuerpos específicos de rata para western-blot utilizados en este bloque de experimentos

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución	Referencia
NFkB	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, California, USA	1:500	sc-372
IkB-α	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, California, USA	1:500	sc-203
Akt	Cell Signaling, Boston, Massachusetts, USA	1:1000	9272
Akt-fosforilado	Cell Signaling, Boston, Massachusetts, USA	1:2000	9271

24. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica humana

Las MNC se aislaron de la sangre periférica de donantes sanos voluntarios con un gradiente de densidad de ficoll. El protocolo es igual

al utilizado en el apartado 1.1 del bloque 1 de experimentos de esta tesis doctoral. Las MNC obtenidas se diluyeron a una concentración de 3×10^6 de células en 300 μ l de suero fisiológico. Esta población también se infundió vía portal en ratas 18 h después de que recibieran una inyección intraperitoneal de TAA siguiendo el mismo procedimiento que el empleado con la sección 19 de este bloque de experimentos.

25. Estudio de la potencialidad de las células madre mesenquimales infundidas

25.1 Diferenciación de células madre mesenquimales infundidas a osteoblastos

Las MSC humanas fueron cultivadas en placas de 6 pocillos con α -MEM al 10% y 1 ng/ml de FGF-b siguiendo el mismo procedimiento empleado en la sección 2 del bloque 1 de experimentos de esta tesis doctoral hasta que alcanzaron una confluencia completa en el pocillo. A continuación se procedió a comenzar la diferenciación hacia osteoblastos. Para ello, las MSC fueron cultivadas durante 21 días con α -MEM al 10% en presencia de 1 μ M de dexametasona, 10 mM de β -glicerolfosfato (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) y 0,2 mM de ácido ascórbico (Bayer Hispania, Barcelona, España).

25.1.1 Tinción Alizarín red

Al finalizar la diferenciación a osteoblastos desde MSC, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron (3 veces) con PBS. Tras el lavado, las células se fijaron con una solución que contiene

paraformaldehído al 2% junto a un 1% de sacarosa (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Al terminar esta incubación, las células se lavaron (2 veces) con agua bidestilada a pH 7. A continuación se tiñeron con una solución a 40mM de Alizarín-red (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) a pH 4.1 durante 20 minutos a temperatura ambiente y en agitación lenta. El pH de la solución stock de Alizarín debe ajustarse con una solución al 1% de hidróxido amónico (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA). Tras la tinción, las células se lavaron (5 veces) con agua bidestilada a pH 7 durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las células se secaron al aire, se visualizaron al microscopio óptico y se escanearon.

25.2 Diferenciación de células madre mesenquimales infundidas a adipocitos

Las MSC fueron cultivadas en las mismas condiciones que que en el apartado 26.1 de este bloque de experimentos. Para conseguir una diferenciación de las MSC hacia adipocitos, las células fueron cultivadas durante 10 días con α -MEM al 10% en presencia de 0,5 μ M de dexametasona, 0,5 mM de isobutirilmetilxantina y 50 μ M de indometacina. Todos los reactivos empleados durante la diferenciación son de la casa comercial Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA). Finalmente, las células se se visualizaron al microscopio óptico para detectar las vesículas de grasa

26. mi-RNA

La expresión comparativa de mi-RNA 124a, 125b y 155 en las MSC y en MNC fue analizada usando sondas Taqman sintetizadas por Applied Biosystems Hispania S.A (Sevilla, España).

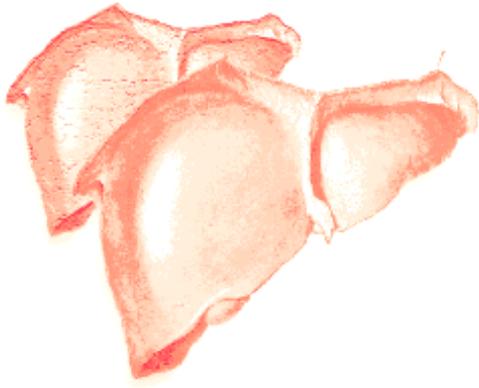
Para ello, el ARN fue extraído siguiendo el mismo procedimiento que en el apartado 4.1 del bloque 1 de experimentos de esta tesis doctoral. La PCR, al igual que en el apartado 4.4 del mismo bloque de experimentos, también se realizó en un termociclador LightCycler 480. La cuantificación de la expresión relativa también se determinó por la fórmula $2^{-\Delta(\Delta CT)}$ y los cálculos se normalizan con RNU6 (ARN nuclear pequeño U6).

27. Determinación IL-6 soluble por ensayo tipo ELISA

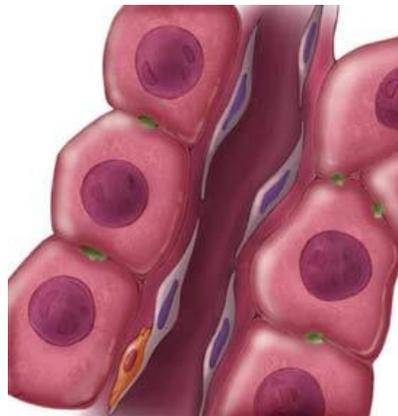
En el lisado de las MSC y de MNC se midieron los niveles solubles de IL-6 con un kit de ELISA comercial (Referencia BMS622, eBioscience Ltd, London, UK). Se siguió el mismo procedimiento empleado en la sección 17 del bloque 2 de experimentos de esta tesis doctoral.

28. Análisis estadístico

Los datos se expresan como media \pm error estándar. La diferencia entre las medias de dos grupos diferentes se evaluaron por un análisis de varianza ANOVA y un t-test con un valor de $p < 0.05$ para comparar los grupos.



IV. RESULTADOS



BLOQUE 1: Diferenciación de células madre de médula ósea hacia hepatocitos

1. Valoración de la mejor fuente de células madre

1.1. Médula ósea

1.1.1 Purificación de células CD133⁺

El aislamiento de células CD133⁺ fue realizado con un kit inmunomagnético por columnas. La población obtenida es 92% ± 1,6% doble positivas para los marcadores CD133 y CD34 (Figura 1). El número de células obtenido es bajo (70.000 ± 20.000 células / ml de MO) y la viabilidad de la población celular también fue del 53% ± 4%.

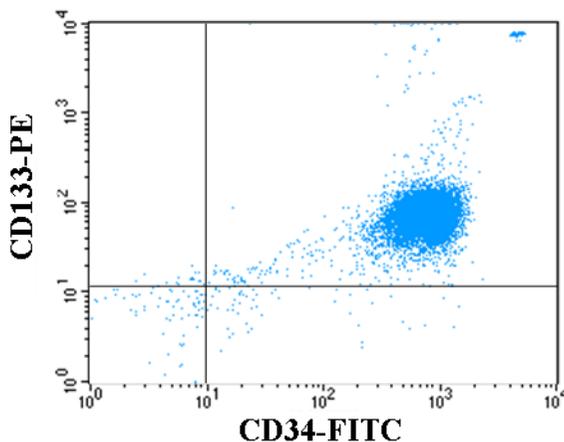


Figura 1. Análisis por citometría de flujo de la purificación de células madre CD133⁺ desde una fuente de médula ósea. La figura muestra una imagen representativa de los distintos aislamientos realizados en esta tesis doctoral.

1.1.2 Aislamiento de células madre mesenquimales

Las células MSC fueron aisladas desde la MO por su capacidad de adherirse al plástico. El número de células obtenido es alto (1×10^6 células por cada 750µl de MO), y además puede multiplicarse

exponencialmente en cultivo en presencia de FGF-b. El inmunofenotipo de la población celular seleccionada fue analizado por citometría de flujo. Las células obtenidas son negativas para CD34, CD45, CD133, CXCR-4 y VEGFR2, y son positivas en distinto grado para CD13, CD29, CD44, CD49e, CD90, CD73, CD105 y CD166. Los marcadores de superficie indican que las células analizadas por tanto son MSC (Figura 2).

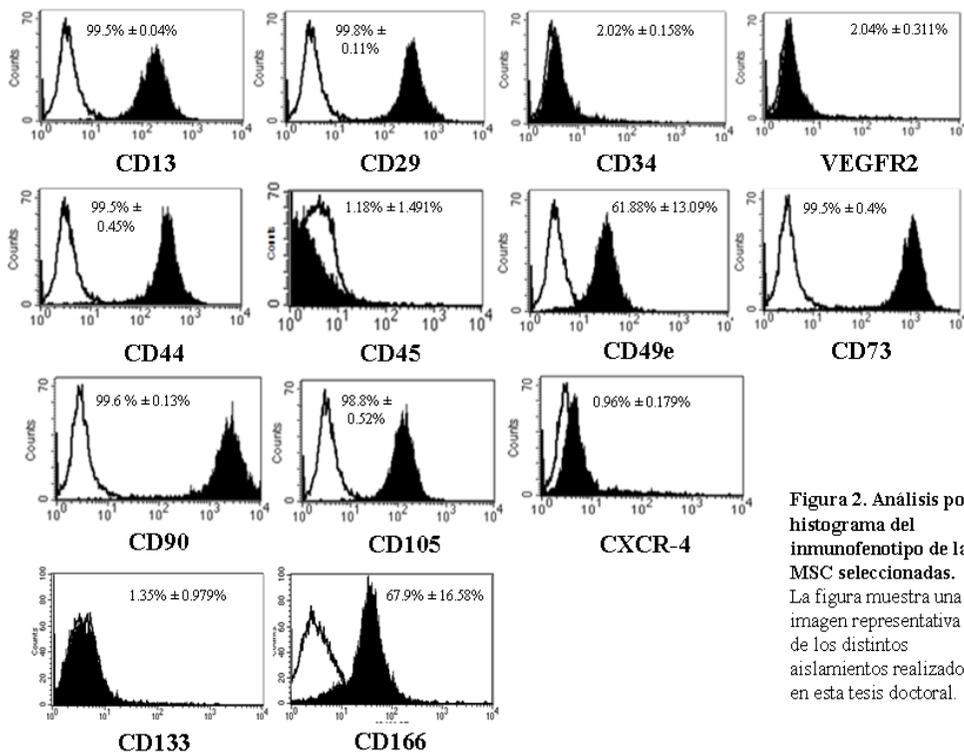


Figura 2. Análisis por histograma del inmunofenotipo de las MSC seleccionadas. La figura muestra una imagen representativa de los distintos aislamientos realizados en esta tesis doctoral.

1.1.3 Purificación de MAPC

En este caso las células MAPC (CD45⁻ y Glicoforina A⁻) fueron aisladas desde células mononucleares de MO con técnicas de

separación celular por sorting. Obtuvimos una población MAPC de bajo número 320.000 ± 75.000 / ml de MO. El aislamiento se realizó a baja velocidad (2 células/gota) y se prolongó mucho en el tiempo (aproximadamente 5 h), lo que desencadenaba una baja viabilidad celular ($43\% \pm 5\%$) (Figura 3).

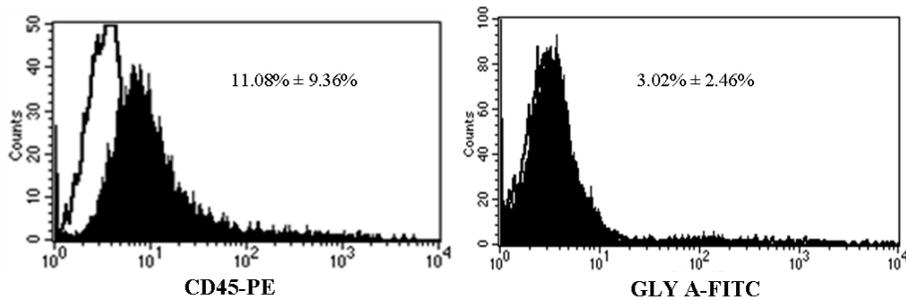


Figura 3. Análisis por citometría de flujo de la purificación de células MAPC desde médula ósea. La figura muestra una imagen representativa de los distintos aislamientos realizados en esta tesis doctoral.

1.2. Purificación de células $CD34^+$ desde la sangre periférica de pacientes sometidos a un proceso de aféresis

Esta población de células fue aislada con un kit inmunomagnético. Las células obtenidas eran positivas para el marcador CD34 (Figura 4).

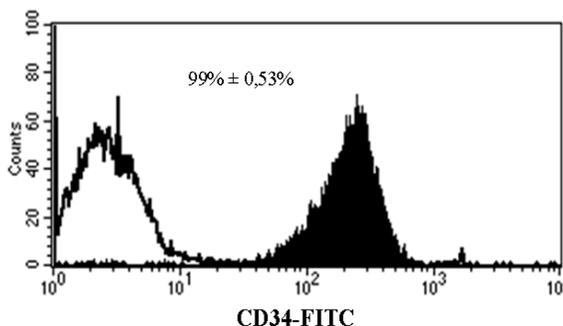


Figura 4. Histograma de la purificación de células madre $CD34^+$ desde un producto de aféresis con G-CSF. La figura muestra una imagen representativa de los distintos aislamientos realizados en esta tesis doctoral.

En este caso también se obtuvo un número de células bajo (265.000 ± 25.000 células de 100×10^6 de MNC de partida), aunque la viabilidad conseguida es muy superior ($88\% \pm 3,2\%$). El número celular conseguido puede expandirse en cultivo en presencia de SCF, TPO y Flt-3 ligando (Figura 5).

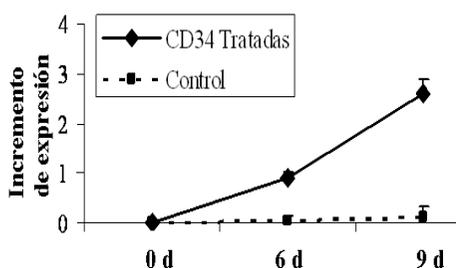


Figura 5. La aplicación de SCF, TPO y Flt-3 ligando triplicó el número de células CD34⁺ después de 9 días.

La siguiente tabla (tabla 1) resume los resultados conseguidos tras purificación de las distintas poblaciones de células madre para discernir cuál podría ser el mejor candidato para utilizarlas en medicina regenerativa:

Tabla 1. Resumen del aislamiento de estas poblaciones de células madre

	% Pureza	Número Células	Aislamiento
CD133 (MO)	>90%	Muy Bajo	Inmunomagnetismo
CD34 (aféresis)	>99%	Bajo	Inmunomagnetismo
MSC (MO)	>99%	Alto	Adherencia
MAPC (MO)	>75%	Bajo	Sorting

En base a los datos obtenidos, las células MSC podrían ser una buena herramienta de trabajo para estudiar como transcurre el proceso de diferenciación hacia hepatocitos.

2. Diferenciación *in vitro* de células madre mesenquimales a hepatocitos maduros

Las MSC se diferenciaron *in vitro* hacia células semejantes a hepatocitos mediante dos protocolos denominados CDH1 (cocktail de diferenciación a hepatocitos 1) y CDH2 (cocktail de diferenciación a hepatocitos 2). Al finalizar la diferenciación con CDH1 ó CDH2, la expresión de genes hepatoespecíficos fueron evaluados por RT-PCR a los 7, 14 y 21 días de iniciar los tratamientos.

Los resultados obtenidos mostraron un notable incremento en los niveles de ARNm de albúmina (ALB), α -fetoproteína (α -FP), α 1-antitripsina (α 1-AT) y citocromo P450-3A5 (CYP3A5), así como genes relacionados con la hepatogénesis como *c/EBP- α* en las células diferenciadas con ambos protocolos al compararlas con células indiferenciadas.

Este aumento en la expresión génica fue progresivo a los largo del tiempo de diferenciación tanto con células diferenciadas con CDH1 como con células diferenciadas con CDH2 (Figura 6).

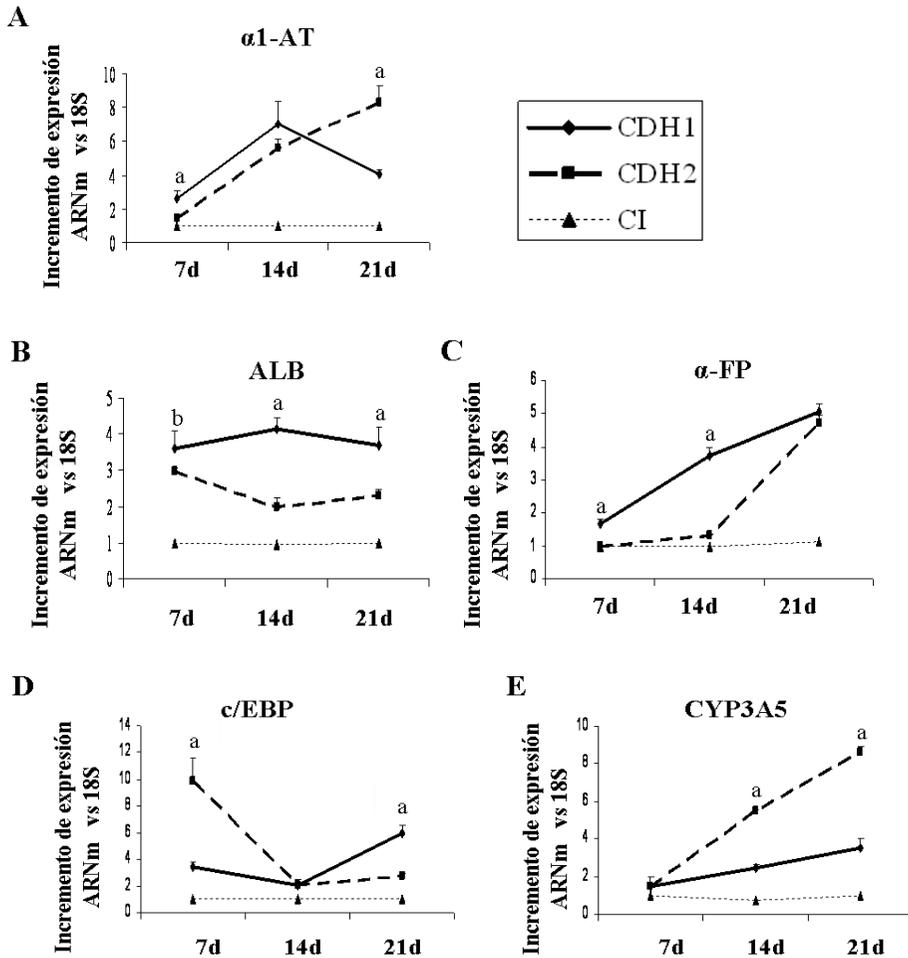


Figura 6. Los tratamientos con el cóctel de diferenciación los cóctelos de diferenciación a hepatocitos CDH1 ó CDH2 incrementan la expresión de genes hepatoespecíficos en células madre mesenquimales. Los niveles de expresión de A) $\alpha 1$ -AT, B) ALB C) α -FP, D) c/EBP- α y E) CYP3A5 se determinaron en células indiferenciadas y diferenciadas con CDH1 o CDH2 a 7, 14 y 21 días de cultivo. La expresión génica se muestra como incremento de expresión génica comparada con células indiferenciadas (CI) en cada tiempo. Los valores representados se expresan como media \pm error estándar. Todos los genes incrementan de forma significativa ($p < 0.001$) en los distintos tiempos con respecto a CI. a $p < 0.001$ b < 0.01 vs CDH1 ó CDH2.

Por otro lado, en el citoplasma celular de las MSC diferenciadas con CDH1 y CDH2 fue determinada por ICQ la presencia de proteínas específicas del hígado. La inmunotinción reveló la presencia de proteínas como ALB, α -FP, CK-19 y α 1-AT con ambos protocolos de diferenciación (Figura 7).

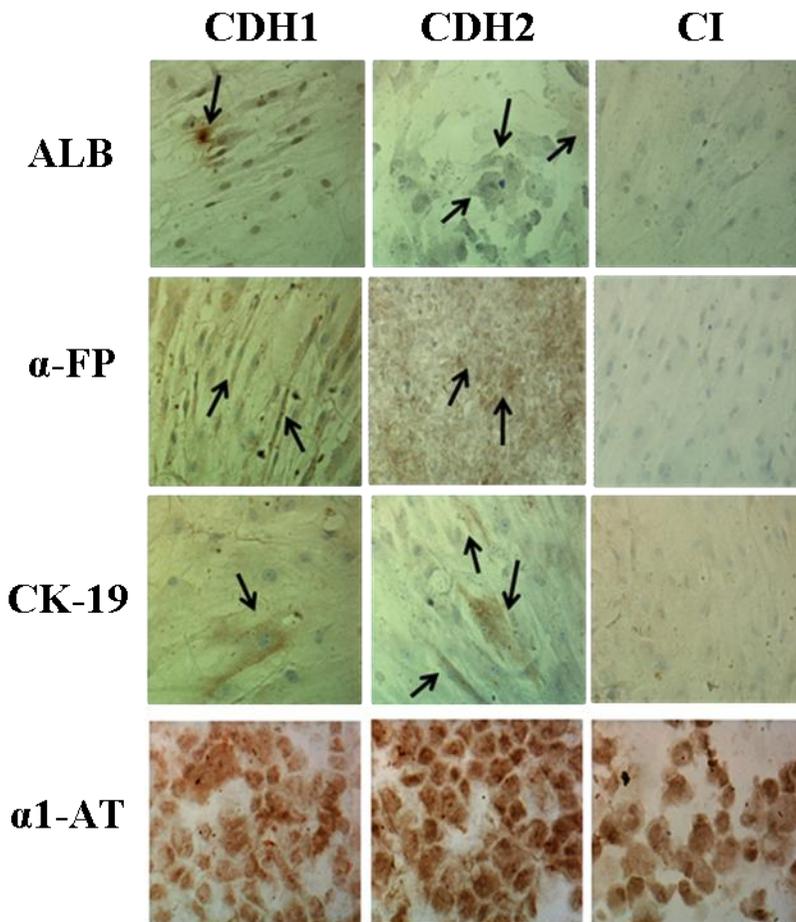


Figura 7. Presencia de proteínas hepatoespecíficas en el citoplasma de células madre mesenquimales diferenciadas con el cóctel de diferenciación CDH1 ó CDH2. La inmunotinción se realizó en células indiferenciadas (CI) y diferenciadas con CDH1 o CDH2 durante 21 días. La tinción positiva a una determinada proteína origina un precipitado de color marrón. Las áreas positivas se indican en la figura con flechas. La figura muestra una imagen significativa de 3 experimentos independientes. Magnificación: 20X.

Finalmente también se determinó la funcionalidad de los hepatocitos obtenidos con ambos protocolos, a través de la producción y almacenamiento de glucógeno mediante la tinción específica PAS. El resultado mostró que las MSC diferenciadas tanto con el protocolo CDH1 como con CDH2 tenían depósitos de glucógeno aunque éste fue mayor en células diferenciadas con CDH2 (Figura 8).

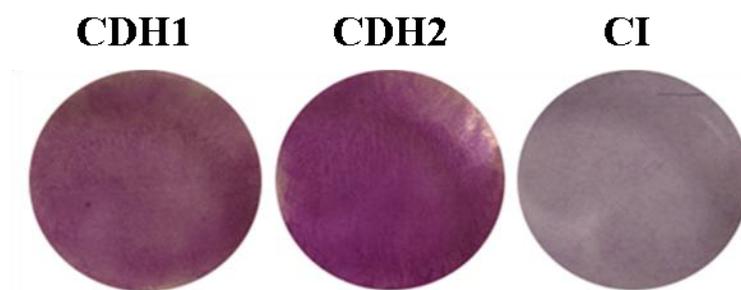


Figura 8. Las células madre mesenquimales diferenciadas con los protocolos de diferenciación a hepatocitos CDH1 ó CDH2 son capaces de producir glucógeno. La tinción PAS se llevó a cabo en células indiferenciadas (CI) y diferenciadas con CDH1 o CDH2 durante 21 días. La figura muestra una imagen significativa de 3 experimentos independiente.

3. Papel de la ruta Wnt/ β -catenina durante la diferenciación de células madre mesenquimales hacia hepatocitos

β -catenina es el efector final de la ruta Wnt canónica, uno de los mecanismos de señalización intracelular que participan en la regulación de las BM-SC. β -catenina puede anclarse en la membrana plasmática, o localizarse en el citoplasma o núcleo celular desempeñando distintas funciones biológicas. La localización intracelular de β -catenina se ha determinado en este estudio mediante microscopía confocal. La submáscara realizada mostró la co-localización del color verde (β -catenina-FITC) y el color azul (DAPI).

En las imágenes obtenidas se puede observar, la presencia de β -catenina en el citoplasmática y en la membrana plasmática, de células indiferenciadas (CI) y células diferenciadas con el protocolo CDH1. Sin embargo, bajo el tratamiento con CDH2, β -catenina se localiza también en el núcleo celular (Figura 9).

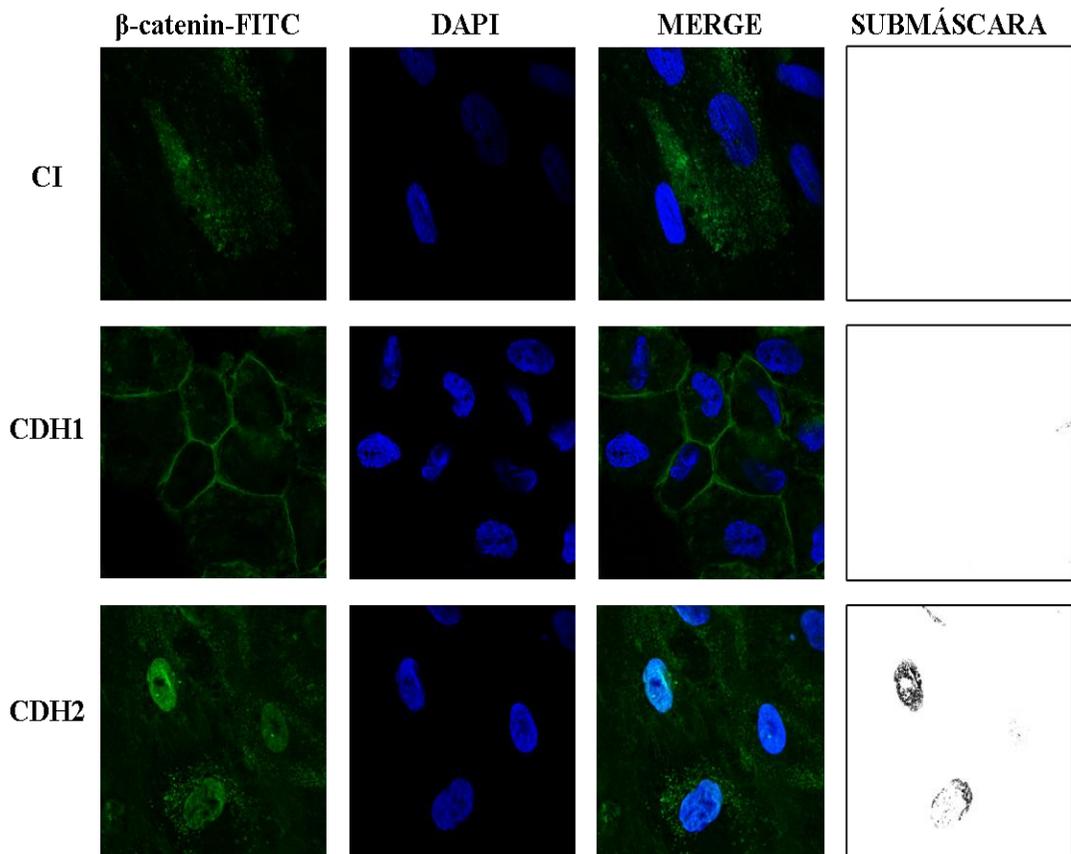


Figura 9. El tratamiento de células madre mesenquimales (MSC) con el cóctel de diferenciación a hepatocitos induce la traslocación nuclear de β -catenina. Las MSC indiferenciadas (CI) o tratadas con CDH1 o CDH2 durante 21 días se tiñeron con un anticuerpo inmunofluorescente que reconoce a β -catenina (verde) y se contratiñeron con DAPI (azul), un fluoróforo que tiñe el núcleo celular. El análisis se realizó por microscopía confocal. También se muestra la imagen superpuesta de ambos fluorocromos. La magnitud original: 40X. La figura muestra una imagen significativa de 3 experimentos independientes.

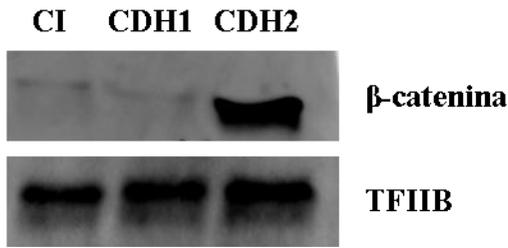


Figura 10. Western-blot de β -catenina nuclear tras diferenciación con CDH1 y CDH2. Como control de carga se empleó TFIIB. La imagen mostrada es representativa de 3 experimentos independientes.

Para confirmar la activación de la ruta Wnt, determinamos por RT-PCR la expresión de varios genes que participan en esta ruta de señalización. Se estudió el receptor del ligando Wnt, Fzd 3, así como el co-receptor Lrp5/6 y también se evaluaron los niveles del oncogen *c-Myc*, una de las principales dianas de la ruta canónica.

Los resultados muestran que únicamente la diferenciación de MSC con CDH2 presentaba un aumento significativo en la expresión de estos genes con respecto a CI o a células tratadas con CDH1 dónde la expresión de estos genes estaba incluso disminuida (Figura 11).

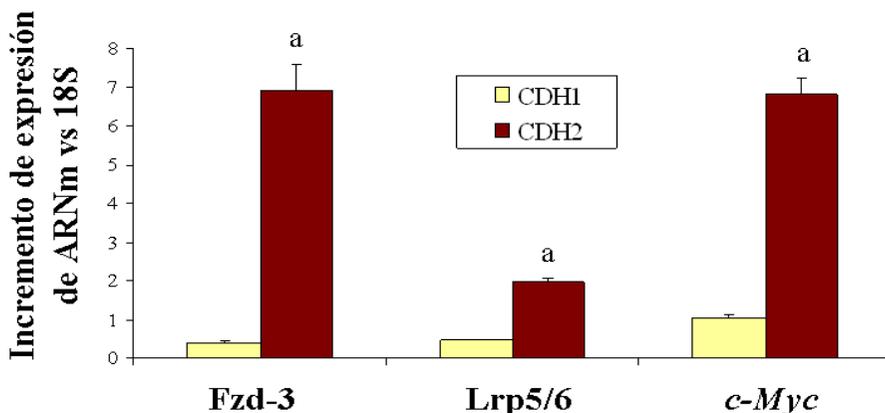


Figura 11. El tratamiento con el cóctel de diferenciación 2 induce la expresión génica de elementos reguladores de la ruta Wnt/ β -catenina. Los niveles de ARNm de Fzd-3, Lrp 5/6 y *c-Myc* se determinaron por RT-PCR en células diferenciadas con CDH1 y CDH2 a los 21 días de tratamiento. Los valores obtenidos con ambos protocolos están referidos a células indiferenciadas (CI). a $p < 0.001$ vs CDH1.

4. Análisis del perfil de expresión proteica de los hepatocitos obtenidos por CDH1 y CDH2

Se utilizó una aproximación proteómica por DIGE para identificar y comparar diferencias en las proteínas que poseen las células CI y en hepatocitos obtenidos con y sin activación de la ruta Wnt/ β -catenina.

El análisis DIGE mostró la expresión diferencial de 39 proteínas, de las cuáles, 17 pudieron ser identificadas. La tabla 2 se recoge un resumen de sus características y funciones biológicas, entre las que se incluyen chaperonas, proteínas del metabolismo, estructurales, proteolíticas e incluso relacionadas con la apoptosis, ciclo celular y la supresión de tumores.

Los resultados obtenidos en el análisis proteómico mostraron una expresión diferencial en 11 de las proteínas identificadas entre los hepatocitos obtenidos con el protocolo CDH1 y CDH2 (Figura 12). Con el cóctel CDH2 se encontró una alta presencia de proteínas relacionadas con el hepatocarcinoma como adenina fosforibosiltransferasa, catepsina B y D, triosafosfato isomerasa, pirofosfatasa inorgánica, peptidil-prolil cis-trans isomerasa A o cadena β L-lactato deshidrogenasa, al compararlos con los hepatocitos tratados con CDH1 o en células CI. Por el contrario, la expresión de otras proteínas como transgelina, cadena β tropomiosina, anexina A5 o subfamilia B AdnJ homólogo relacionados con la supresión de tumores disminuyeron en hepatocitos obtenidos tras el tratamiento con CDH2, al compararlo con las células tratadas con CDH1 o CI.

Tabla 12. Proteínas identificadas por el análisis diferencial DIGE

PROTEÍNAS IDENTIFICADAS	NCBI Acc n°	Péptidos Secuenciados	(%) Cov Secuencia	Ratio CDH1/CDH2	Valor p	Funciones Moleculares
Proteínas estructurales						
Cadena β tropomiosina	P07951	10	33	-2,68	0,0031	Contracción muscular
Transgelina	Q01995	5	32	-9,61	0,0024	Proteína muscular
Colágeno $\alpha 2$ (cadena IV)	P12110	3	2,9	-	-	Matriz extracelular
Chaperonas						
Hsp $\beta 1$	P04792	7	40	-	-	Proteína de unión
Subfamilia B AdnJ homólogo	Q9UBS4	1	17	-4,82	0,0015	Proteína de unión
Peptidil prolil isomerasa A	P62937	2	17	-	-	Isomerasa
Enzimas metabólicas						
Triosafosfato isomerasa	P60174	11	56	1,45	0,0260	Isomerasa
Pirofosfatasa inorgánica	Q15181	2	14	1,57	0,0270	Actividad difosfatasa inorgánica
Adenina fosforibosiltransferasa	P07741	4	25	1,89	0,0027	Proteína de unión a AMP
L-Lactato deshidrogenasa	P07195	5	29	-9,64	0,0026	Oxidoreductasa
NADH ubiquinona oxidoreductasa	O75489	1	9	-	-	NADH ubiquinona oxidoreductasa
Glutamato deshidrogenasa mitocondrial	P00367	1	8	-	-	Oxidoreductasa
Apoptosis						
Peroxiredoxina-4	Q13162	4	16	-	-	Actividad tioredoxin peroxidada
Factor de elongación 1- δ	P29692	4	24	-	-	Actividad traductora de señales
Anexina A5	P08758	22	73	-	-	Fosfolípido dependiente de calcio
Proteasas						
Precursor de la Catepsina B	P07858	4	18	2,79	0,0140	Hidrolasa, proteasa, tiolproteosa
Precursor de la Catepsina D	P07339	7	29	1,57	0,0410	Aspartil proteasa, hidrolasa

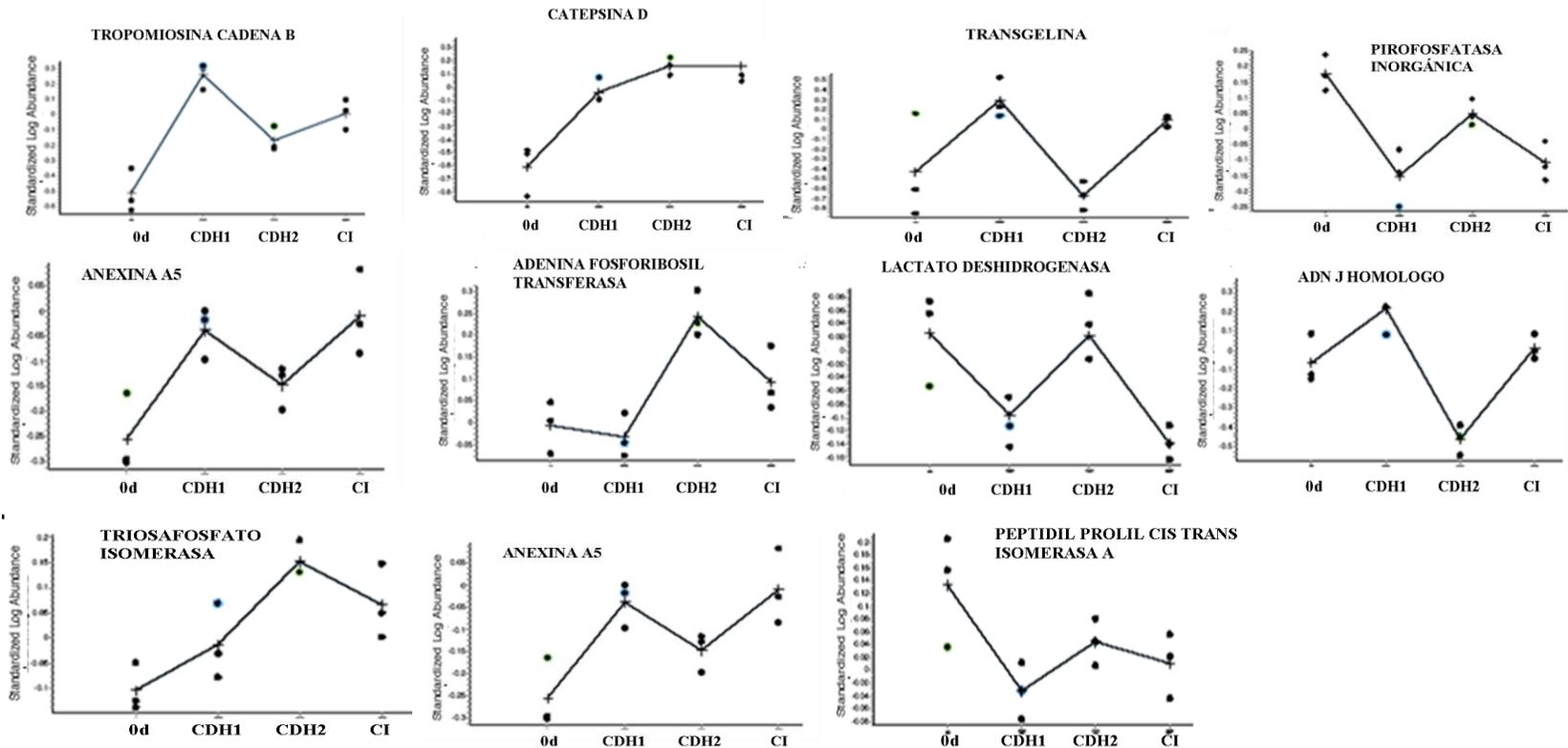


Figura 12. La activación de la ruta Wnt/ β -catenina durante la diferenciación a hepatocitos está asociada con la presencia de proteínas relacionadas con un fenotipo tumoral. La abundancia relativa de proteínas específicas en células indiferenciadas (CI) tras 21 días de cultivo y en hepatocitos diferenciados con el cóctel de diferenciación CDH1 ó CDH2 se realizó por un análisis proteómico DIGE. La estadística de las proteínas identificadas se muestra en la tabla 2 de este bloque de experimentos.

Algunas de las proteínas identificadas como adenina fosforibosiltransferasa, transgelina, catepsina B, cadena β de la tropomiosina y lactato deshidrogenasa se confirmaron por western-blot (Figura 13).

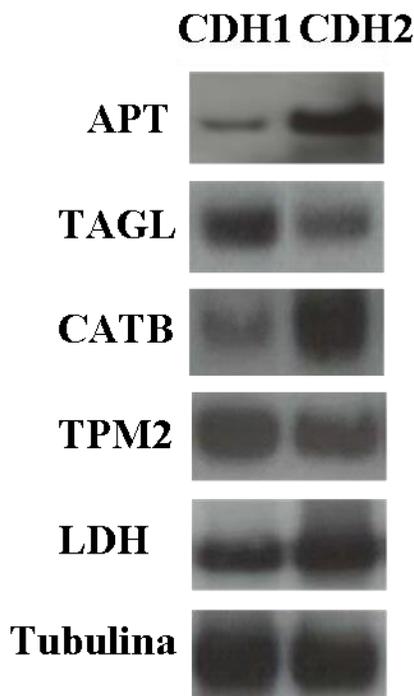


Figura 13. Western-blot de algunas de las proteínas identificadas por el análisis proteómico DIGE.

adenina fosforibosiltransferasa (APT), transgelina (TAGL), precursor de la catepsina B (CATB), tropomiosina cadena b (TPM2), L-lactato deshidrogenasa (LDH). Como control de carga se empleó tubulina.

5. Las células diferenciadas con CDH1 expresan p53 durante la diferenciación de células madre mesenquimales hacia hepatocitos

p53 es uno de los principales genes supresores de tumores, y su ausencia se ha relacionado con la progresión de algunos tipos de cáncer como hepatocarcinoma. El análisis por western-blot mostró una presencia de p53 similar entre células CI y diferenciadas con el protocolo CDH1, sin embargo esta expresión está reducida en células diferenciadas con CDH2 (Figura 14).

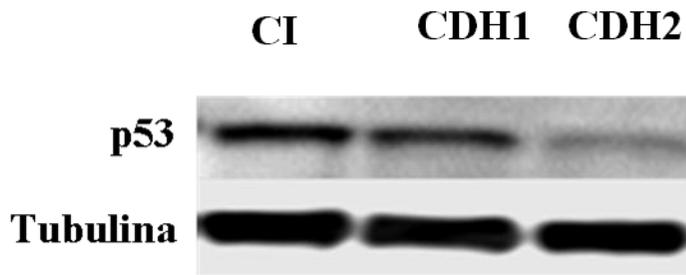


Figura 14. El tratamiento de células madre mesenquimales con el cóctel de diferenciación a hepatocitos disminuye los niveles intracelulares de p53. Como control de carga se empleó tubulina. La imagen mostrada es representativa de 3 experimentos independientes.

6. Cambios en el inmunofenotipo de las células madre mesenquimales tras la diferenciación a hepatocitos

Al finalizar el proceso de diferenciación con CDH1 o CDH2 se analizaron los marcadores que presentaban las MSC en superficie por citometría de flujo. El análisis mostró cambios significativos en los niveles de CD13, CD49e, CD133, CD166 y VEGFR2. Los valores de estos marcadores son superiores en células diferenciadas con CDH2, al compararlas con las células CI o diferenciadas con CDH1. En células tratadas con CDH1 descienden los niveles de CD13 con respecto a CI (Figura 15).

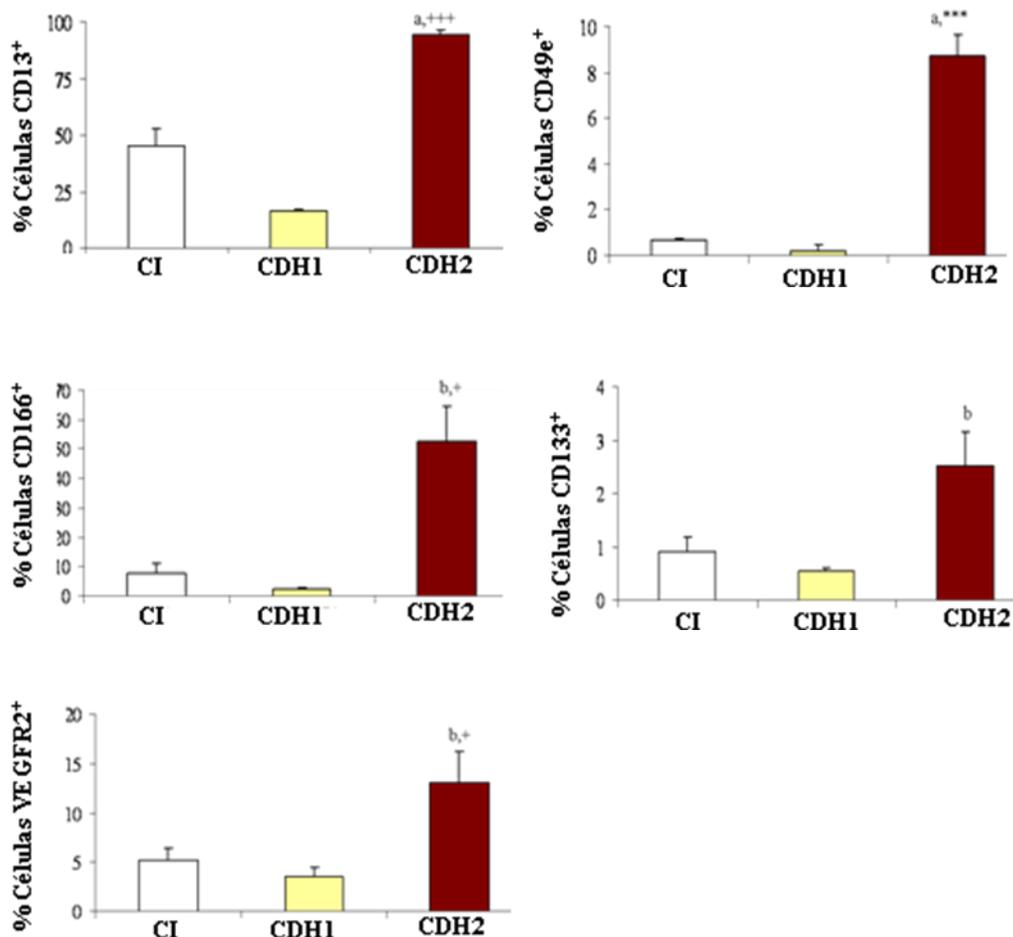


Figura 15. Inmunofenotipo de células indiferenciadas (CI) y diferenciadas con el cóctel de diferenciación CDH1 ó CDH2. Al finalizar el cultivo las células fueron marcadas con CD13-FITC, CD49e-FITC, CD166-PE, CD133-PE o VEGFR2-PE. Los valores representados se expresan en porcentaje como media \pm error estándar. a $p < 0.001$ y b $p < 0.01$ vs. células diferenciadas con CDH1; +++ $p < 0.001$ y + $p < 0,05$ vs. CI.

7. La activación de la ruta Wnt/ β -catenin incrementa la proliferación

Para determinar la capacidad de proliferación de las MSC tratadas con CDH1 o CDH2 se realizó un recuento celular por pocillo antes y al finalizar la diferenciación hacia hepatocitos.

Los datos mostraron que las MSC diferenciadas con el protocolo que transcurre con una activación de la ruta Wnt/ β -catenina (CDH2), incrementan el número de células a los 14 días de iniciar el cultivo, al compararlas con MSC diferenciadas con CDH1 o indiferenciadas (CI). Al finalizar la diferenciación a hepatocitos a los 21 días, había un 75% más de células en el pocillo tratado con CDH2 que en el tratado con CDH1 o con CI (Figura 16).

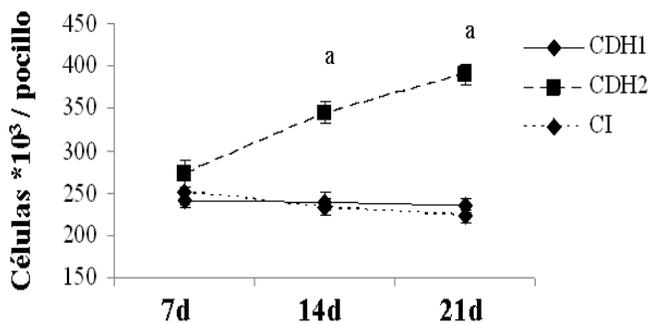


Figura 16. CDH2 induce la proliferación celular en células madre mesenquimales en cultivo. El recuento celular se determinó a los 7, 14 y 21 días de iniciar el proceso de diferenciación con CDH1 y CDH2. El número de células obtenido se comparó con células indiferenciadas (CI) a lo largo de todo el cultivo. Los valores se expresaron como media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes. ^a $p < 0.001$ vs. células tratadas con CDH1 o CI.

También se realizó una ICQ de PCNA, una proteína nuclear sintetizada durante la fase S del ciclo celular. La inmunotinción mostró que el número de células positivas fue significativamente superior en

células tratadas con CDH2 que en células indiferenciadas (CI) o tratadas con CDH1 (Figura 17)

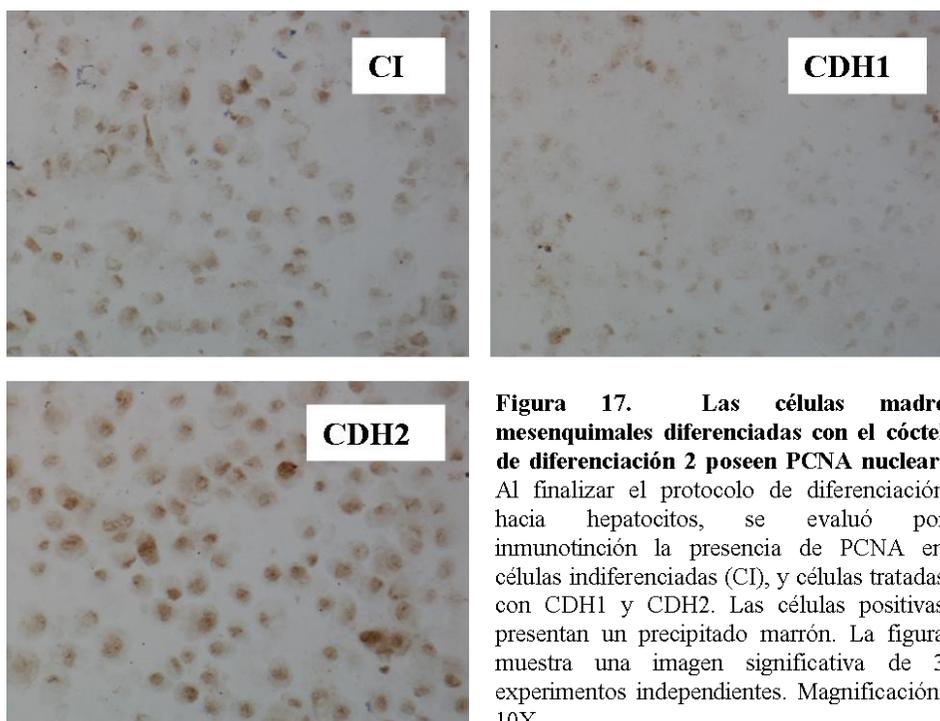


Figura 17. Las células madre mesenquimales diferenciadas con el cóctel de diferenciación 2 poseen PCNA nuclear. Al finalizar el protocolo de diferenciación hacia hepatocitos, se evaluó por inmunotinción la presencia de PCNA en células indiferenciadas (CI), y células tratadas con CDH1 y CDH2. Las células positivas presentan un precipitado marrón. La figura muestra una imagen significativa de 3 experimentos independientes. Magnificación: 10X

La inducción de la proliferación celular durante la diferenciación a hepatocitos a través del protocolo CDH2, nos condujo a estudiar como interviene también la activación de la ruta Wnt/ β -catenina en el ciclo celular. El resultado mostró que en el pocillo diferenciado con CDH2 hubo un incremento del porcentaje de células en fase S y una disminución del porcentaje de células en fase G0/G1 con respecto a las células CI o tratadas con CDH1 (Figura 18).

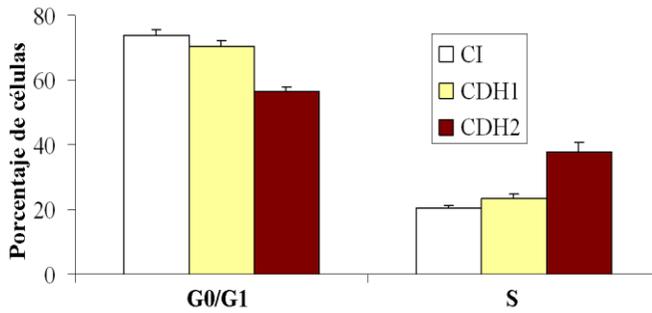
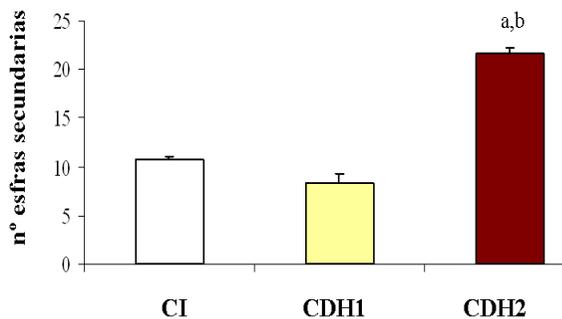


Figura 18. Las células diferenciadas a hepatocitos con el cóctel CDH2 se encuentran en la fase S del ciclo celular. El ciclo celular fue analizado por citometría de flujo al finalizar la diferenciación en células indiferenciadas (CI) y diferenciadas con CDH1 y CDH2. Los datos mostrados representan el porcentaje medio \pm error estándar. a $p < 0.001$ vs. células tratadas con CDH1, b $p < 0.001$ vs. CI.

8. El protocolo de diferenciación CDH2 favorece la formación de tumoresferas

Entre las principales propiedades de las CSC, se encuentra la capacidad de éstas de formar esferas en una placa de cultivo. Las MSC diferenciadas a hepatocitos con el tratamiento CDH1 ó CDH2 así como las células CI originan esferas primarias y secundarias. El número de esferas obtenido con CDH2 es significativamente superior al obtenido con CI o CDH1 (Figura 19).

A



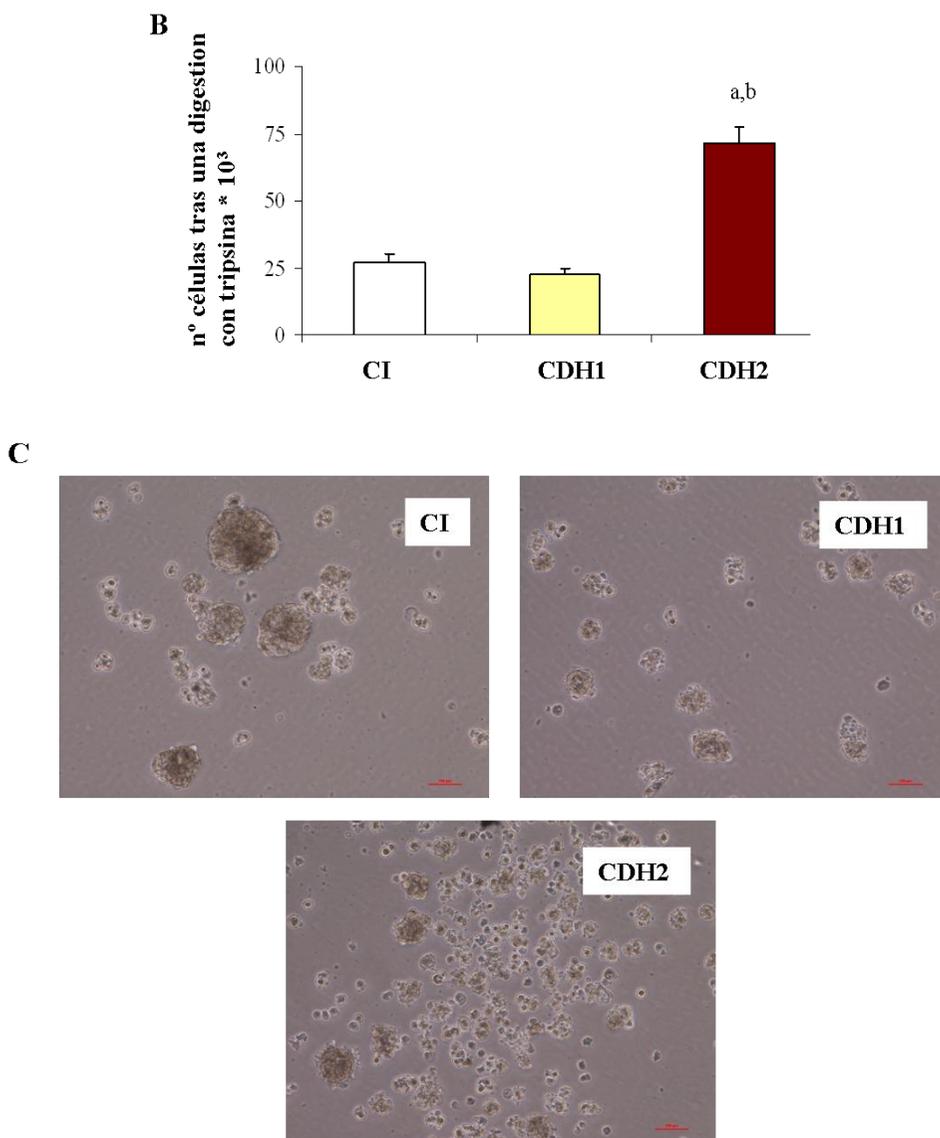


Figura 19. Ensayo para la formación de esferas primarias y secundarias. Al finalizar el proceso de diferenciación, células tratadas con los cócteles de diferenciación a hepatocitos CDH1 ó CDH2, y células indiferenciadas (CI) se tripsinizaron y se sometieron a un ensayo para la formación de esferas. A los 4 días de cultivo se originaron las esferas. Las esferas se tripsinizaron para llevar a cabo el recuento celular (A). A continuación, se cultivaron en dilución clonal para la formación de esferas secundarias. El recuento de las esferas secundarias se llevó a cabo en un microscopio invertido (B). Los datos mostrados representan el valor medio \pm error estándar. a $p < 0.001$ vs. células tratadas con CDH1, b $p < 0.001$ vs. CI. La figura muestra una imagen significativa (C) de las esferas secundarias originadas con CDH1, CDH2 o CI.

BLOQUE 2: Papel de la movilización de células madre de médula ósea en pacientes con patologías hepáticas**9. Porcentaje de células CD34⁺ en sangre periférica de pacientes hepatectomizados**

En 33 pacientes con distintas patologías hepáticas que habían sido sometidos a una HP, se analizaron los niveles circulantes de células CD34⁺ por citometría de flujo. El análisis se realizó antes (0 h) y 72 h después de la intervención quirúrgica.

El porcentaje de células CD34⁺ en la sangre periférica de cada uno de los pacientes, antes y después de la HP se recoge en la Figura 45. En ella se puede observar que sólo en 14 de los 33 pacientes, los niveles circulantes de células CD34⁺ incrementaron 72 h después de la HP al compararlos con los niveles obtenidos antes de la intervención (0 h). Estos pacientes capaces de movilizar células CD34⁺ constituyen un grupo que denominaremos 1 (G1). Los pacientes restantes presentaban a las 72 h de la HP niveles de células CD34⁺ en sangre periférica similares a los obtenidos a las 0 h o incluso inferiores. Estos pacientes conforman el llamado grupo 2 (G2).

El aumento del porcentaje de células CD34⁺ circulantes en sangre periférica a las 72 h de la HP en el grupo G1 es significativo con respecto a los niveles encontrados a las 0 h. Es interesante mostrar que en los pacientes del grupo G2, a 0 h hubo un porcentaje de células CD34⁺ superior a los pacientes G1 a 0 h (Figura 20).

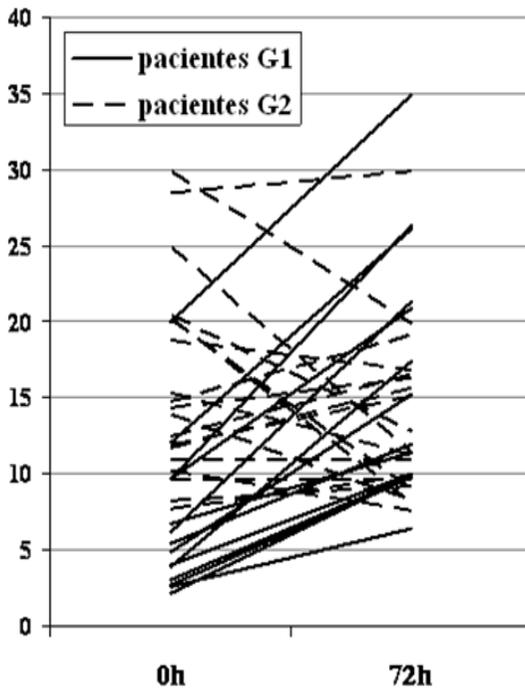
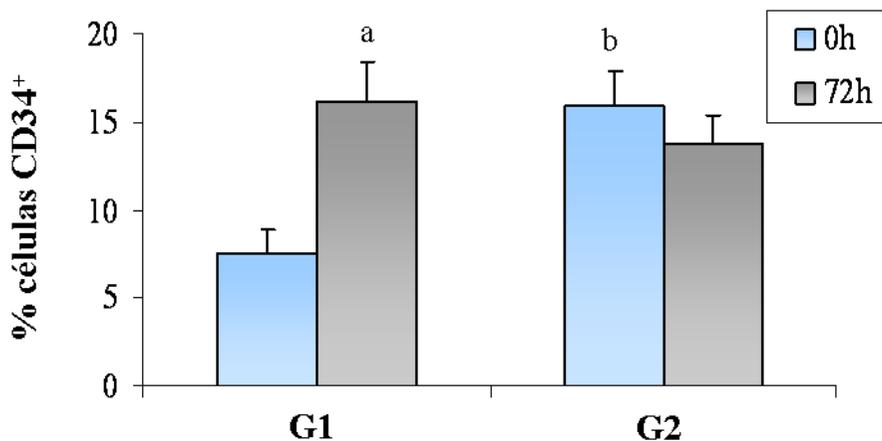


Figura 20. Niveles circulantes de células CD34⁺ en pacientes hepatectomizados. Se realizó un marcaje con anti-CD34-FITC en la sangre total de pacientes hepatectomizados. La figura muestra los valores individuales del porcentaje de células CD34⁺ antes (0 h) y después (72 h) de una HP. Los pacientes que aumentaban el porcentaje de células CD34⁺ a las 72h de la HP se representan con una línea continua (grupo 1, G1), mientras que los pacientes que disminuían el porcentaje de células CD34⁺ se representan con una línea discontinua (grupo 2, G2).

Figura 21. Porcentaje medio de células CD34⁺ en sangre periférica de pacientes pertenecientes al grupo G1 y G2 antes (0 h) y después (72 h) de la hepatectomía parcial. Los valores se expresaron como media \pm error estándar. a $p < 0.001$ vs. G1 a 0 h; b $p < 0.01$ vs. G1 en 0 h.



La siguiente tabla (tabla 3) recoge un resumen de las características clínicas de los pacientes de forma individual y su capacidad de movilizar células CD34⁺.

10. Las células CD34⁺ detectadas en la sangre periférica de los pacientes hepatectomizados procedían de la médula ósea

El análisis por citometría de flujo del inmunofenotipo que presentaban en superficie las células CD34⁺ detectadas en sangre periférica de ambos tipos de pacientes (G1 y G2) mostró que co-expresaban otros marcadores característicos de BM-SC como CD45, CD90, CD117, CD133 y CXCR4, antes y 72 h después de la HP. Cabe resaltar el alto porcentaje de células CD34⁺/CXCR-4⁺ en el grupo G2 a las 72 h de la resección hepática (Tabla 4).

Tabla 4. Inmunofenotipo de las células CD34⁺ circulantes antes (0 h) y 72 h después de una hepatectomía parcial. El análisis se realizó por citometría de flujo de dos colores. Los valores son expresados en porcentaje como media ± error estándar. a p<0.001 vs. 0 h. ns=no significativo

		pacientes G1	pacientes G2	G1 vs G2
CD34 ⁺ /CD45 ⁺	0 h	5.7±1.19	4.7±0.73	ns
	72 h	9.6±1.88 ^a	1.8±0.31	p=0.003
CD34 ⁺ /CD90 ⁺	0 h	4.6±0.94	3.4±1.28	ns
	72 h	7.1±1.59 ^a	0.6±0.17	p=0.003
CD34 ⁺ /CD117 ⁺	0 h	0.5±0.07	0.3±0.05	ns
	72 h	0.8±0.08 ^a	0.2±0.03	p=0.005
CD34 ⁺ /CD133 ⁺	0 h	0.4±0.04	0.5±0.09	ns
	72 h	0.7±0.04 ^a	0.3±0.06	p=0.040
CD34 ⁺ /CXCR4 ⁺	0 h	6.1±1.24	5.3±0.88	ns
	72 h	9.6±1.84 ^a	1.9±0.4	p=0.031

Tabla 3. Características clínicas de los pacientes hepatectomizados

	n	Sexo	Edad	Mob	Cirrosis	% Pacientes Mob	
Tumores Primarios							
HCC	7	Mujer	63	+	-		
		Hombre	71	-	-		
		Hombre	61	-	+		
		Hombre	57	-	+	14	(1/7)
		Mujer	58	-	+		
		Hombre	63	-	+		
		Hombre	74	-	+		
CHOL	5	Hombre	72	+	-		
		Hombre	57	+	-		
		Hombre	76	-	-	40	(2/5)
		Hombre	71	-	-		
		Mujer	50	-	-		
Cancer de vesícula	3	Mujer	72	+	-		
		Mujer	66	+	-	67	(2/3)
		Mujer	77	-	-		
Tumores Secundarios							
Mtx	9	Mujer	66	+	-		
		Hombre	70	+	-		
		Mujer	63	+	-		
		Mujer	48	+	-		
		Mujer	69	-	-	40	(4/9)
		Mujer	60	-	-		
		Hombre	40	-	-		
		Mujer	41	-	-		
		Mujer	28	-	-		
Tumores Benignos							
FNH	2	Hombre	27	+	-		
		Mujer	76	-	-	50	(2/4)
Adenoma	1	Mujer	13	+	-		
Hemangioma	1	Mujer	56	-	-		
Lesiones no tumorales							
Abceso Hidatídico	3	Hombre	76	+	-		
		Mujer	46	+	-		
		Hombre	43	+	-	60	(3/5)
Caroli	1	Hombre	65	-	-		
Hematoma	1	Hombre	52	-	-		

11. Presencia de células CD34⁺ en el parénquima hepático de los pacientes sometidos a una hepatectomía parcial

Con una tinción inmunohistoquímica de CD34⁺ en biopsias hepáticas de los pacientes incluidos en este estudio, evaluamos si las células CD34⁺ circulantes eran capaces de alcanzar el parénquima hepático tras la HP de pacientes G1 y G2. Las imágenes muestran la presencia de una población de células CD34⁺ en el hígado de pacientes G1 y G2, concretamente alrededor de los sinusoides hepáticos. El número de células positivas fue superior en los pacientes G2 (Figura 22).

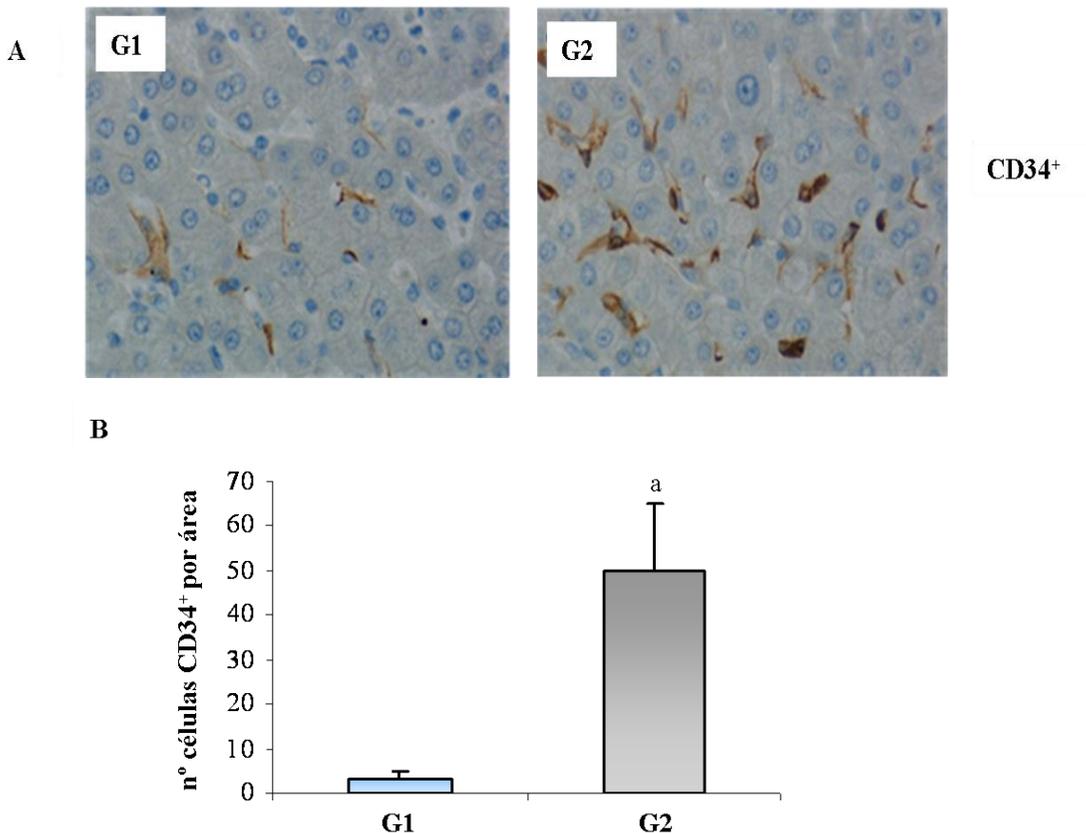


Figura 22. Presencia de una población de HSC en el hígado. (A) Las células positivas contienen un precipitado de color marrón. Se muestra una imagen significativa de pacientes hepatectomizados pertenecientes a los grupos G1 y G2. Magnificación: 20X. (B) También se realizó un análisis cuantitativo de la tinción con el programa Image J. a $p < 0.001$ vs. pacientes G1

12. Activación del eje SDF-1/CXCR-4 en pacientes hepatectomizados

Las BM-SC pueden abandonar la MO y viajar a través de la sangre periférica hasta un tejido dañado para restaurar la funcionalidad tisular. Esta migración está regulada por el eje SDF-1/CXCR-4. En base a esta premisa se procedió a examinar el papel que podría desempeñar este eje SDF-1/CXCR-4 en los pacientes hepatectomizados de este estudio con distinta movilización. Para ello, se realizó una inmunotinción de SDF-1 y CXCR-4 en biopsias hepáticas de los pacientes G1 y G2 tomadas a 0 h.

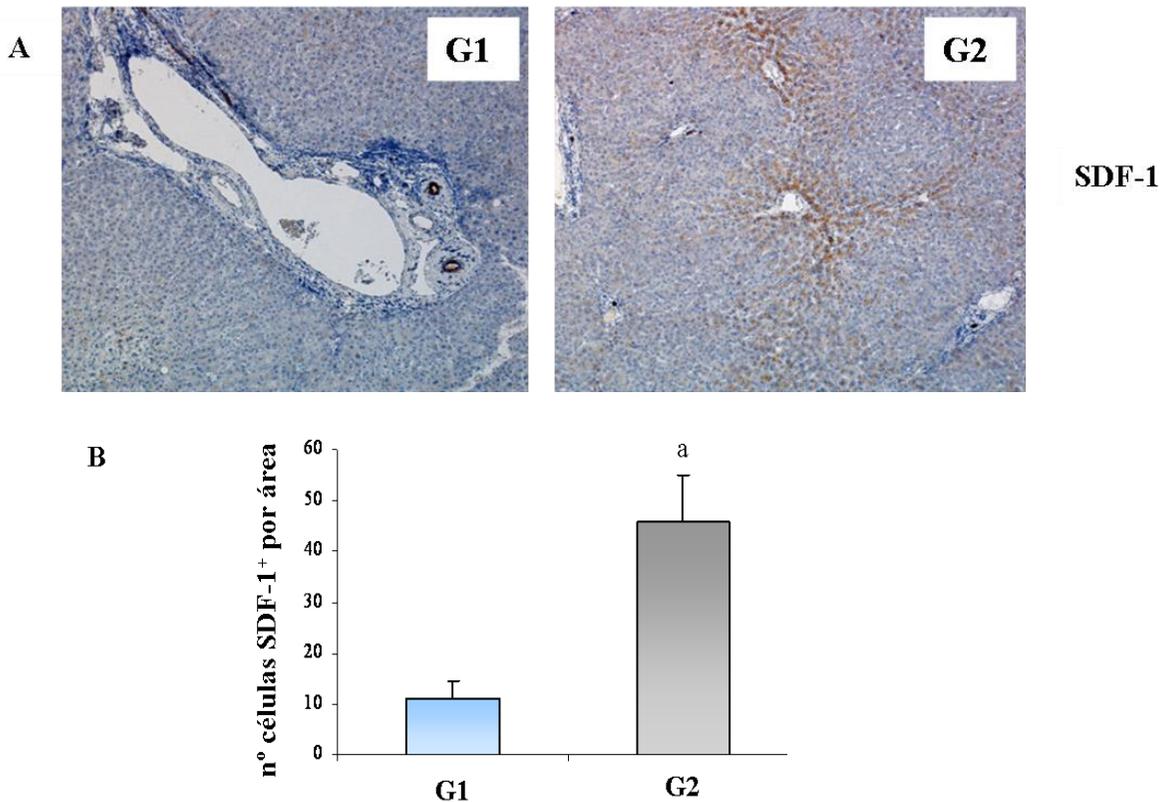


Figure 23. Tinción de SDF-1 en el hígado. (A) Las células positivas contienen un precipitado de color marrón. Se muestra una imagen significativa de pacientes hepatectomizados pertenecientes a los grupos G1 y G2. Magnificación: 5X. (B) También se realizó un análisis cuantitativo de la tinción con el programa Image J. $a < 0.001$ vs. pacientes G1

El estudio histológico mostró la presencia de células positivas para el ligando SDF-1 alrededor de los ductos biliares tanto en pacientes G1 como en los pacientes G2. Cabe destacar que el número de células que contenían SDF-1 era muy superior en pacientes G2 (Figura 23).

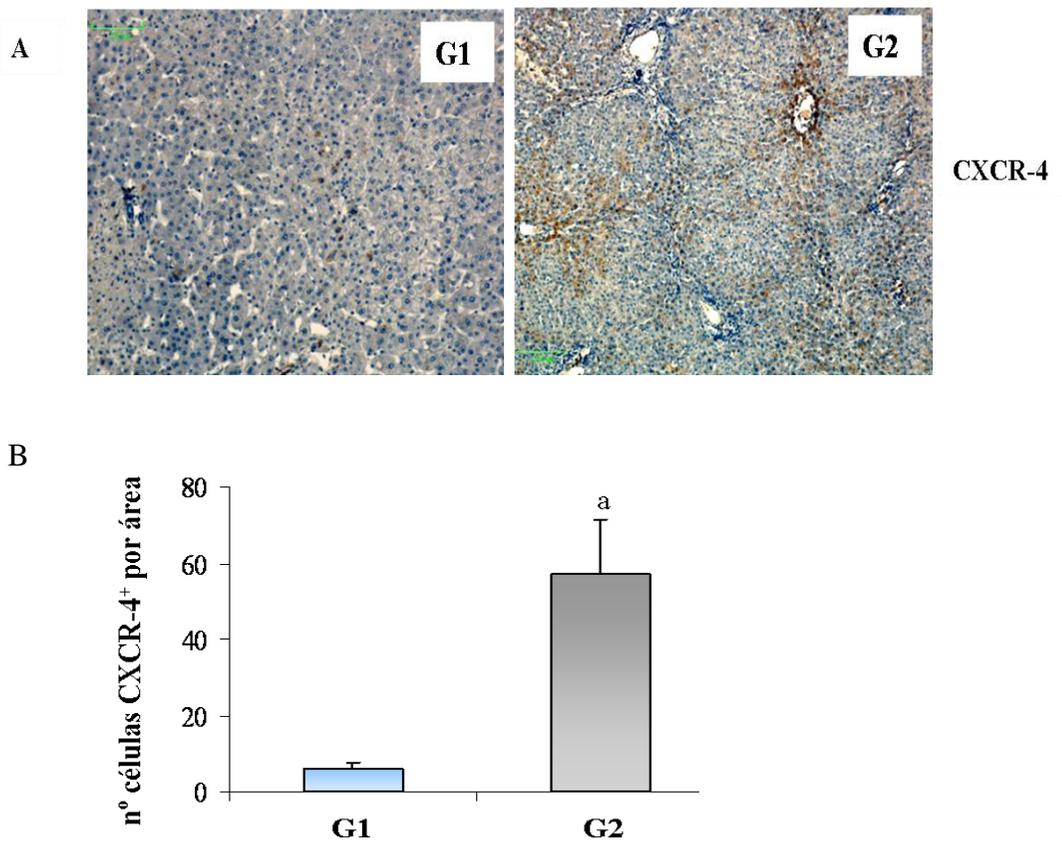


Figure 24. Tinción de CXCR-4 en el hígado. (A) Las células positivas contienen un precipitado de color marrón. Se muestra una imagen significativa de pacientes hepatectomizados pertenecientes a los grupos G1 y G2. Magnificación: 5X. (B) También se realizó un análisis cuantitativo de la tinción con el programa Image J. a $p < 0.001$ vs. pacientes G1

Los resultados inmunohistoquímicos para CXCR-4 también revelaron la presencia de células positivas alrededor de los ductos biliares en pacientes movilizados (G1) y no movilizados (G2). Las imágenes obtenidas del receptor CXCR-4, al igual que los resultados de SDF-1, también muestran un mayor número de células positivas en pacientes G2 (Figura 24).

Por otro lado, se determinaron los niveles séricos de SDF-1 antes (0 h) y 72 h después de la HP en los pacientes G1 y G2. Los valores de SDF-1 soluble eran elevados antes y después de la HP en ambos tipos de pacientes. Sin embargo no se obtuvieron diferencias significativas en los niveles obtenidos a las 72 h de la HP entre ambos tipos de pacientes. No obstante, y en concordancia con estos resultados histológicos, los niveles séricos de SDF-1 en pacientes G2 fueron significativamente superiores antes de la intervención quirúrgica (0 h) a los niveles de los pacientes G1 (Figura 25).

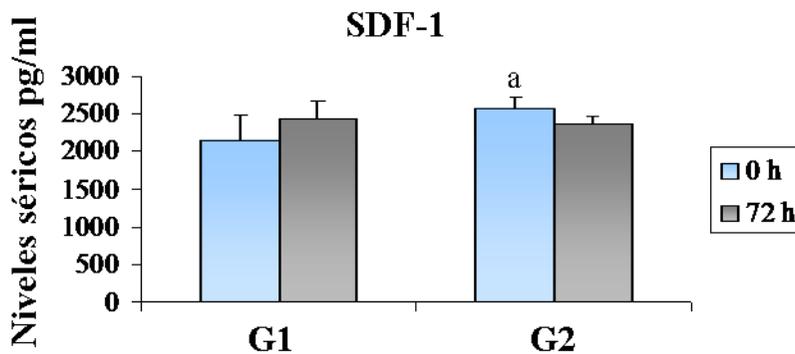


Figura 25. Niveles séricos de SDF-1 en pacientes del grupo G1 y G2 antes (0 h) y después (72 h) de la HP. Se determinaron por un ensayo enzimático inmunoabsorbente. El valor representado es la media \pm error estándar. a $p < 0.05$ vs. G1 at 0 h.

13. Niveles séricos de citoquinas y metaloproteasas en pacientes sometidos a una hepatectomía parcial

Los niveles séricos de citoquinas y otros factores que regulan la movilización de las BM-SC se determinaron mediante ensayos ELISA en pacientes G1 y G2.

Los resultados muestran un perfil de citoquinas y factores de crecimiento diferentes entre pacientes G1 y G2. Uno de los elementos analizados fue SCF, factor de crecimiento fundamental para la supervivencia y proliferación de las BM-SC. En este caso los niveles séricos de SCF eran significativamente superiores en pacientes G2 antes de la HP (0 h) (Figura 26).

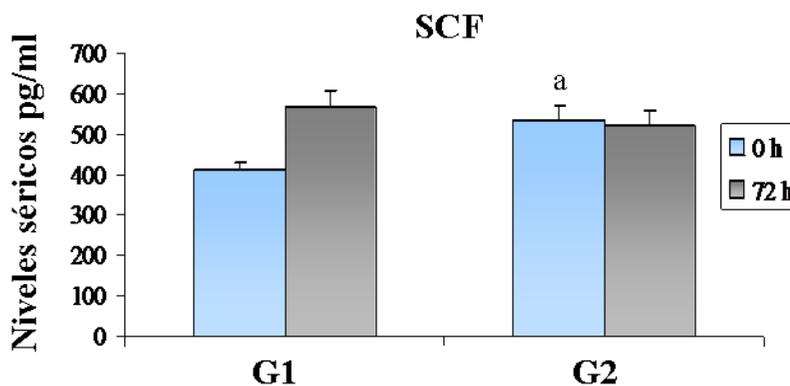


Figura 26. Niveles séricos de SCF en pacientes del grupo G1 y G2 antes (0 h) y después (72 h) de la HP. El valor representado es la media \pm error estándar. a $p < 0.01$ vs. G1 a 0 h; b $p < 0.01$ vs. G1 a 0 h.

También se determinaron los niveles circulantes de MMP-2, una metaloproteasa clave en la liberación de las BM-SC desde la matriz ósea hacia el torrente circulatorio, que fueron significativamente superiores en pacientes G2 antes (0 h) y 72 h después de la HP (Figura 27).

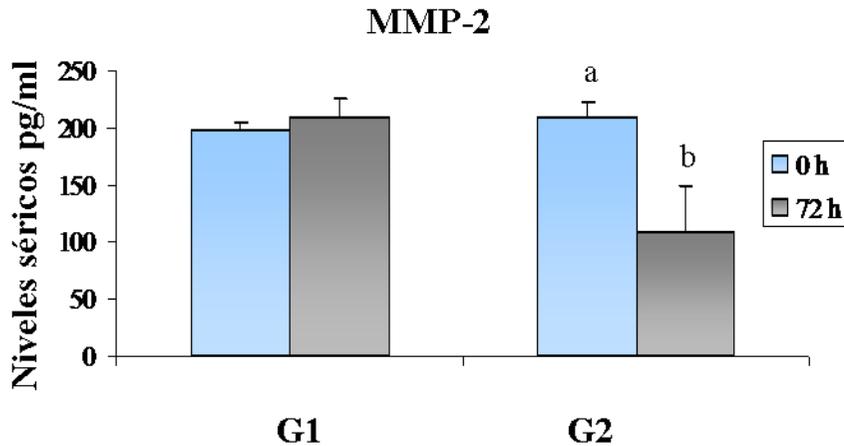


Figura 27. Niveles séricos de MMP-2 en pacientes del grupo G1 y G2 antes (0 h) y después (72 h) de la HP. El valor representado es la media \pm error estándar. a $p < 0.05$ vs. G1 a 0 h; b $p < 0.05$ vs. G1 a 72 h.

14. Las células CD34⁺ que alcanzan el hígado son capaces de estimular el proceso regenerativo

Finalmente también se evaluaron en pacientes G1 y G2 los niveles séricos de HGF, IL-12 y TGF- β por ELISA antes (0 h) y 72 h después haber sido sometidos a una HP. Los niveles circulantes de estos factores claves en la movilización de BM-SC hacia el hígado y durante la regeneración hepática eran distintos en pacientes G1 y G2. En este caso, antes de la HP (0 h), los pacientes G2 presentaban mayores niveles solubles de IL-12 y MMP-2 que los pacientes G1. Sin embargo, 72 h después de la HP, los niveles circulantes de HGF, TGF- β y MMP-2 eran más bajos en los pacientes G2 (Figura 28).

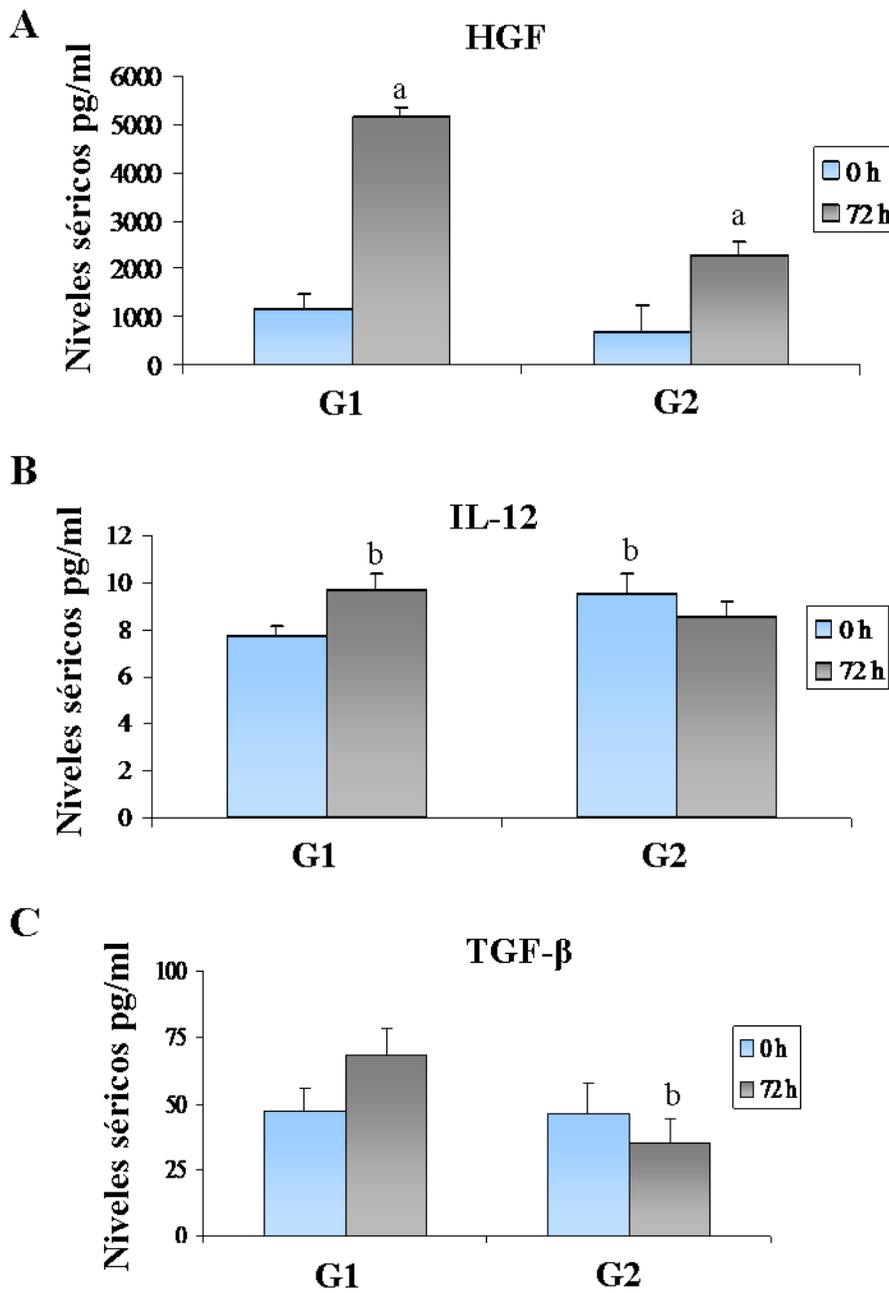


Figura 28. Niveles séricos de HGF (A), IL-12 (B) y TGF-β (C) en pacientes del grupo G1 y G2 antes (0 h) y después (72 h) de la HP. El valor representado es la media ± error estándar. a p<0.005 vs. G1 a 0 h; b p<0.05 vs. G1 a 72 h.

La regeneración hepática implica la activación del ciclo celular en los distintos componentes celulares que conforman el parénquima hepático. Un marcador específico de la proliferación de los hepatocitos es Ki67. La tinción histológica de este marcador reveló la presencia de células positivas alrededor de la vena central y en las células sinusoidales de ambos tipos de los pacientes G1 y G2. Aunque la tinción fue significativamente más intensa en pacientes G2 (Figura 29).

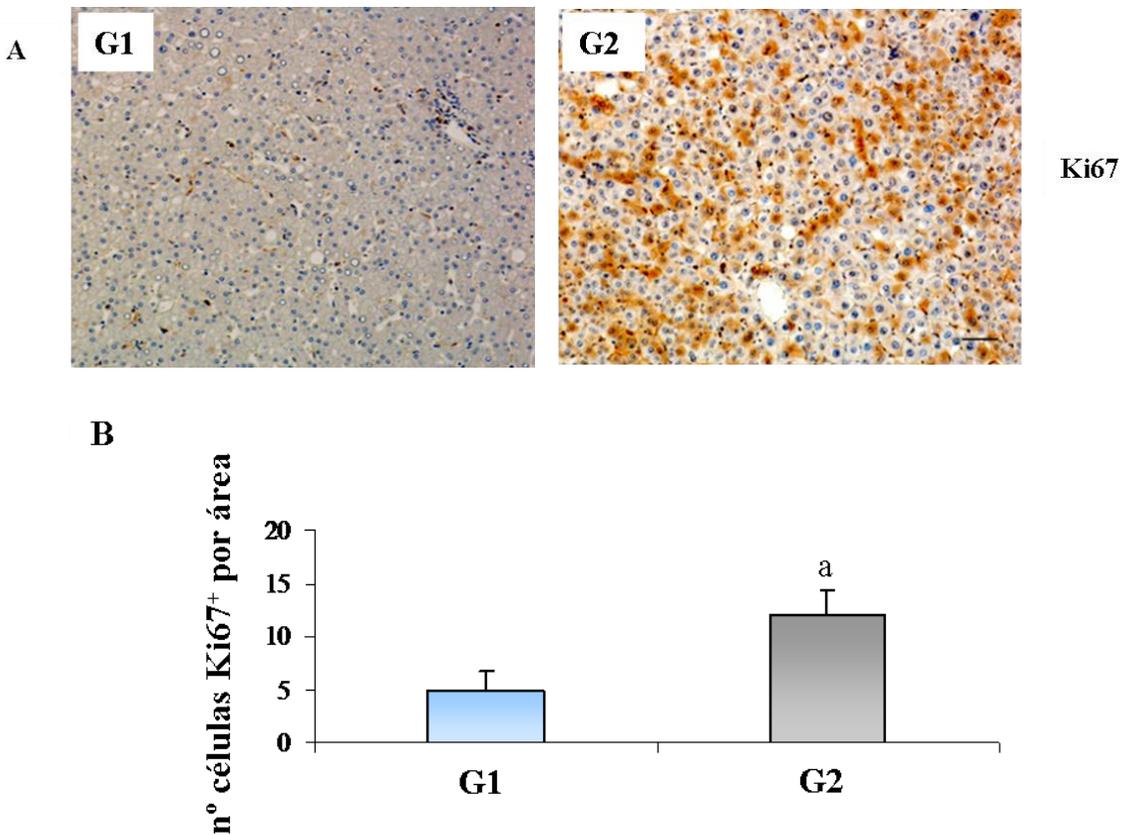


Figure 29. Tinción de Ki67 en el hígado. (A) Se muestra una imagen significativa de cada grupo de pacientes. Magnificación: 5X. Las células positivas son de color marrón. (B) Se realizó un análisis cuantitativo de la tinción con el programa Image J. a $p < 0.001$ vs. pacientes G1.

En la bibliografía está ampliamente descrito que la poénquima hepático se activa ante una lesión en el hígado. Para comprobar si estas células están presentes en los pacientes G1 y G2, se realizó una inmunotinción para OV-6⁺, uno de los marcadores de superficie que las definen. Las imágenes revelaron la presencia de células positivas alrededor de la vena central y en las células sinusoidales de ambos tipos de los pacientes G1 y G2. Aunque la tinción fue significativamente más intensa en pacientes G2 (Figura 30).

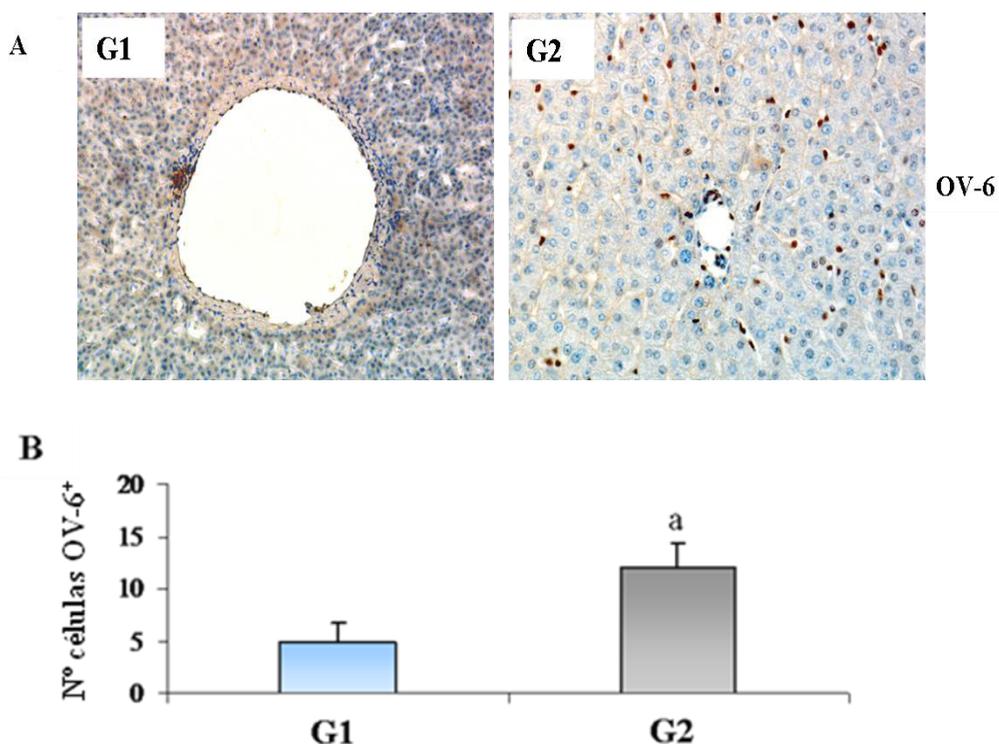
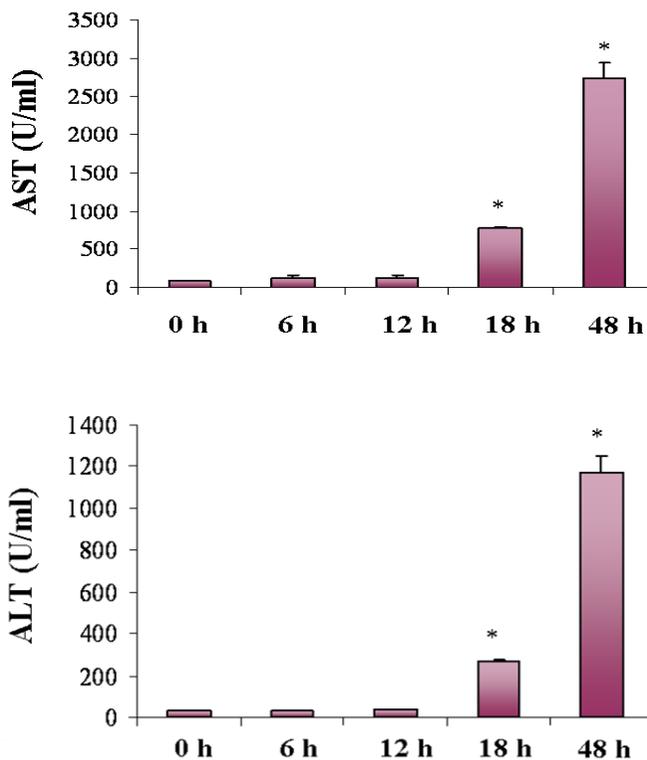


Figure 30. Tinción de OV-6 en el hígado. (A) Se muestra una imagen significativa de cada grupo de pacientes. Magnificación: 5X. Las células positivas son de color marrón. (B) Se realizó un análisis cuantitativo de la tinción con el programa Image J. a $p < 0.001$ vs. pacientes G1.

BLOQUE 3: Terapia celular en un modelo experimental de daño hepático agudo

15. El tratamiento con Tioacetamida origina una lesión aguda de muerte celular y necrosis

Una alta dosis de TAA (400 mg / kg) produjo una insuficiencia hepática de ratas Wistar hembra. La bioquímica de los animales mostró un incremento en los niveles séricos de distintos parámetros de daño hepático como transaminasas (AST y ALT), bilirrubina total y fosfatasa alcalina. Este aumento de estos valores fue progresivo a lo largo del tiempo alcanzando un pico máximo a las 48 h de la inyección (Figura 31).



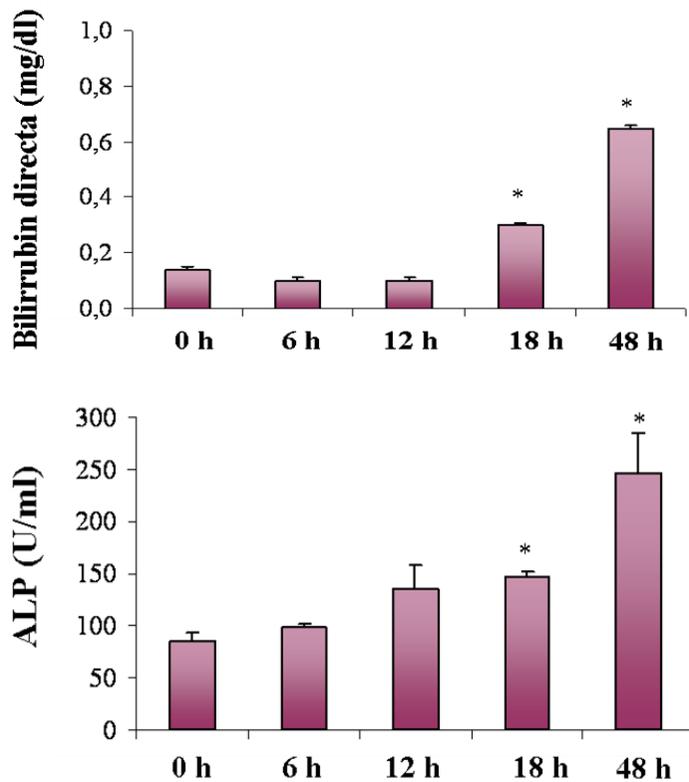
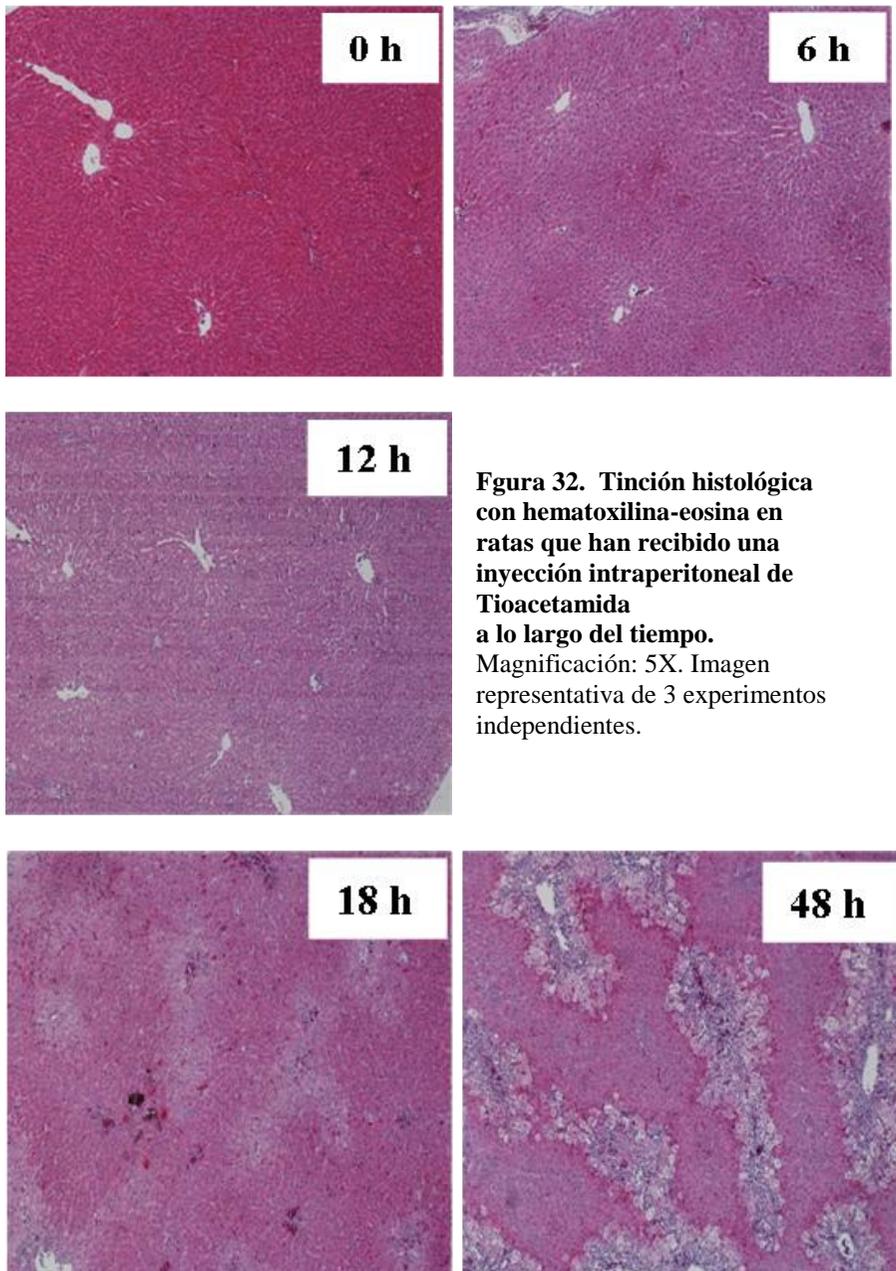


Figura 31. Parámetros bioquímicos en ratas que han recibido un tratamiento con tioacetamida (TAA). Los niveles de alanina transaminasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), bilirrubina (BIL) y fosfatasa alcalina (ALP) se determinaron con ensayos colorimétricos a lo largo del tiempo en el suero de animales que han recibido una inyección de TAA. Los valores representados son la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. * $p < 0.001$ vs. 0 h

Paralelamente, un estudio histológico con hematoxilina-eosina permitió determinar el alcance de la lesión producida por TAA en el parénquima hepático de los animales. La tinción mostró la aparición de áreas necróticas centrolobulillares en el hígado, con la consecuente pérdida de la arquitectura hepática. La destrucción celular afecta principalmente a los hepatocitos pero también a otros componentes celulares del parénquima tisular como los colangiocitos. El daño comienza

a ser visible a las 18 h del tratamiento con TAA. La lesión histológica también incrementa a lo largo del tiempo siendo mayor a las 48 h de la inyección del tóxico (Figura 32).



16. Infusión de células madre mesenquimales en el hígado de ratas que han recibido un tratamiento con tioacetamida

Las células madre aisladas desde la MO presentaban un inmunofenotipo en superficie característico de MSC (Figura 2 del bloque 1 de experimentos de esta tesis doctoral).

Las MSC obtenidas presentan una gran plasticidad celular propia de una población celular que conserva las características “stemness”. La pluripotencia de estas células fue comprobada con la diferenciación hacia un linaje osteogénico y adipogénico (Figura 33).

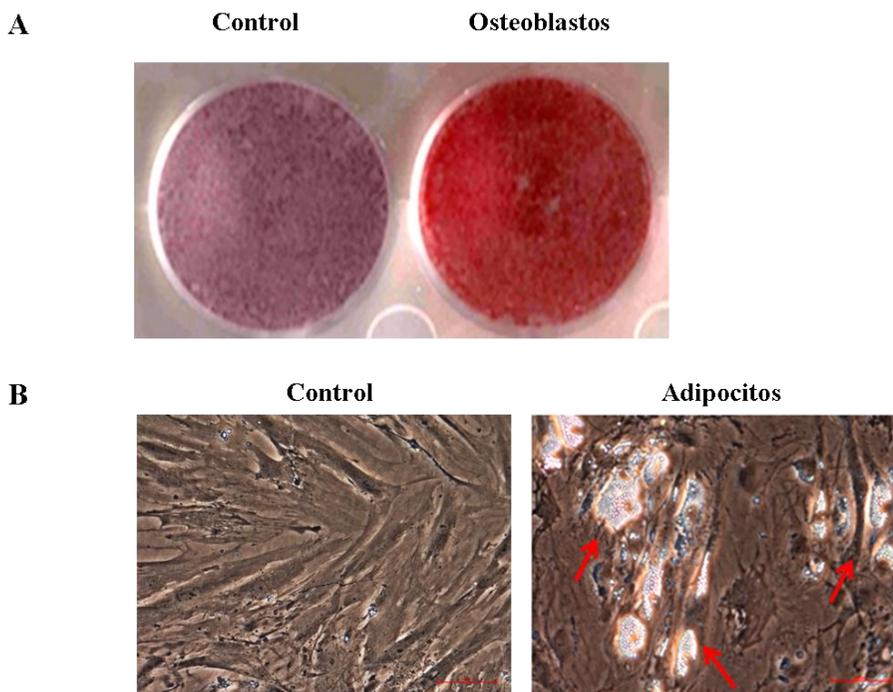


Figura 33. Pluripotencia de las células madre mesenquimales (MSC). (A) Las MSC se diferenciaron hacia osteoblastos. La tinción de Alizarín red permite detectar la mineralización y los depósitos de calcio a los 21 días de tratamiento. (B) Las MSC acumulan vesículas lipídicas a los 14 días de cultivo. Imagen representativa de ± 3 experimentos.

Estas MSC intactas o su lisado se infundieron vía portal en ratas que habían recibido un tratamiento con TAA. La infusión de ambos tipos celulares fue 18 h después de la inyección de tóxico, cuando la lesión es visible en el parénquima hepático. Las MSC y sus lisados consiguieron alcanzar y alojarse en el parénquima hepático dañado. Para localizar las MSC infundidas, se realizó una inmunohistoquímica de CD90⁺ con un anticuerpo monoclonal humano (Figura 34)

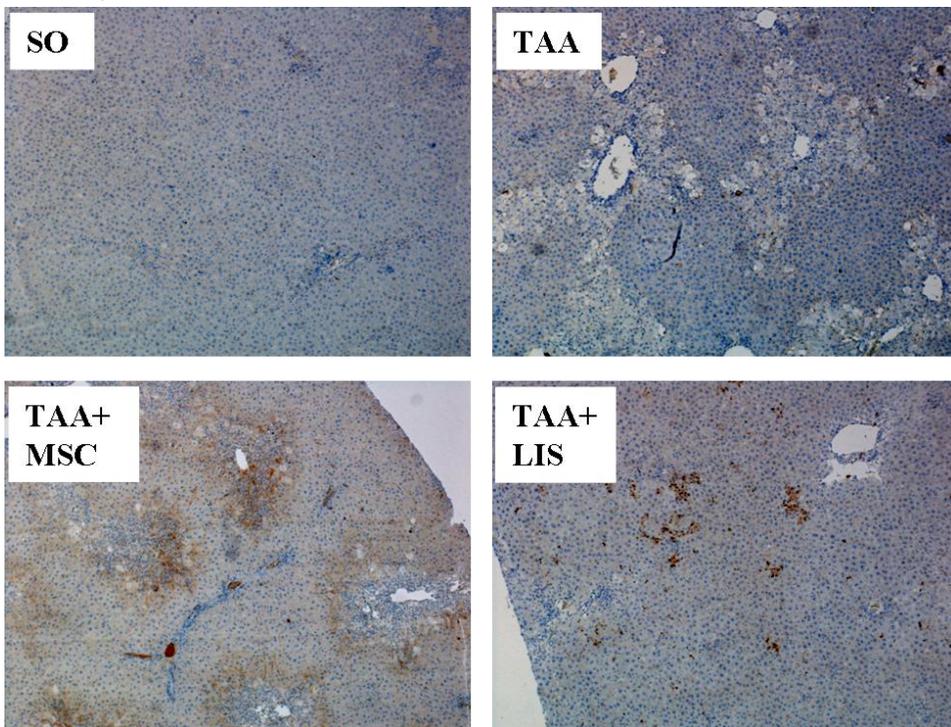
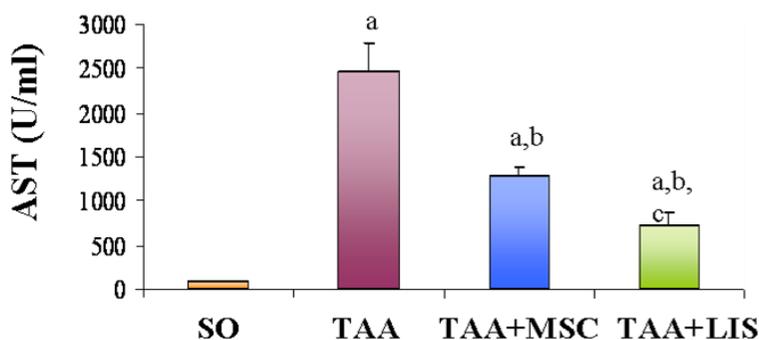


Figura 34. Detección de células CD90⁺ humanas en el tejido hepático de ratas tratadas con TAA. Se realizó una inmunotinción con un anticuerpo que reconoce el antígeno CD90 humano. Las células positivas para la tinción presentan un precipitado marrón. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes con ratas que han recibido una inyección intraperitoneal de TAA y han sido infundidas con suero fisiológico (TAA), MSC enteras (TAA+MSC) o lisados (TAA+LIS). El análisis de las imágenes fueron comparadas con un tejido hepático de ratas control (SO). Magnificación: 5X

Las imágenes mostraron la presencia de células positivas en los animales tratados con TAA e infundidos con MSC o sus lisados situados alrededor de la lesión necrótica. No obstante, el marcaje fue superior en los animales infundidos con MSC enteras. Las biopsias hepáticas de ratas control o infundidas con suero fisiológico no presentaban células positivas.

17. La infusión de células madre mesenquimales o su lisado mejoran la funcionalidad tisular en el hígado

Los parámetros fisiopatológicos relacionados con un daño en el hígado producido por un tratamiento de TAA, se redujeron tras una infusión de MSC o de su lisado. Los resultados muestran un descenso significativo en los valores de transaminasas (ALT, AST), bilirrubina y fosfatasa alcalina. La reducción producida por los lisados en AST y ALT, es significativamente mayor a la conseguida con las MSC (Figura 35).



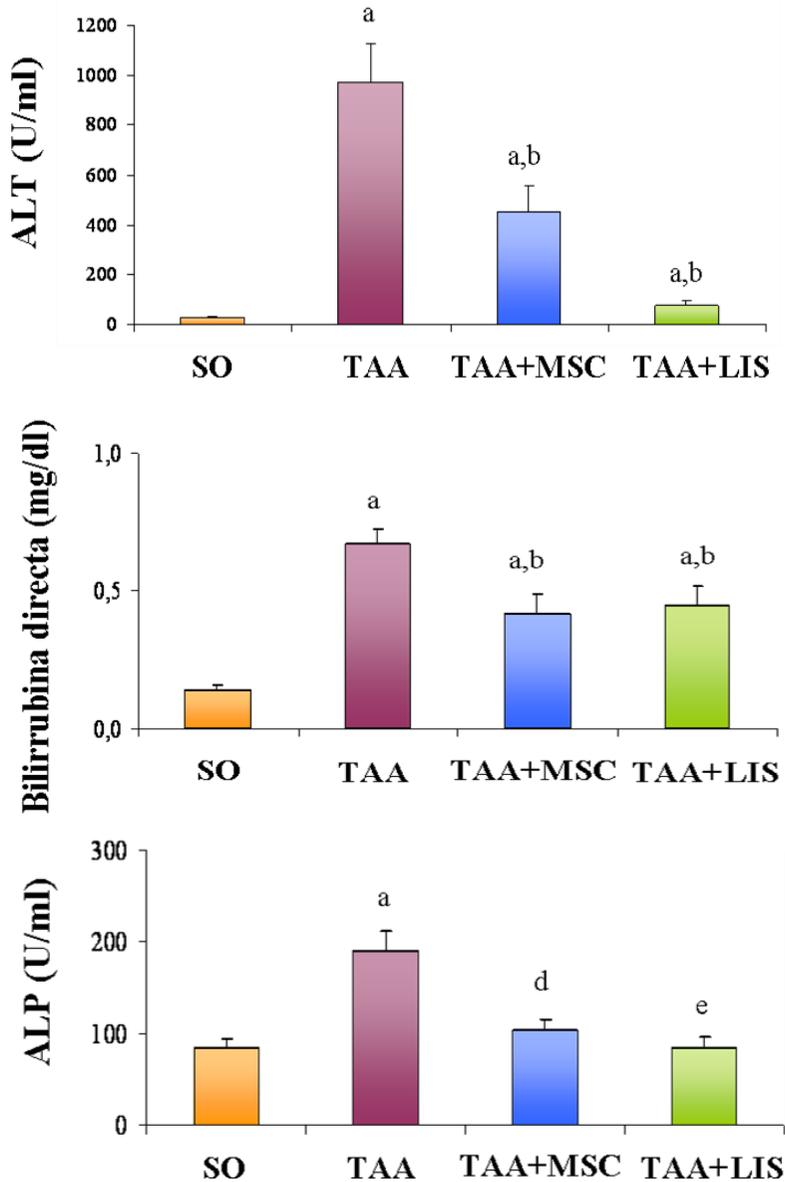


Figura 35. La inyección de células madre mesenquimales disminuye los parámetros de daño hepático. En un modelo experimental de daño hepático por TAA, la presencia de MSC mejora los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), bilirrubina (BIL) y fosfatasa alcalina (ALP). Los grupos de trabajo fueron los siguientes: SO, ratas control; TAA, ratas que han recibido una inyección intraperitoneal de TAA y han sido infundidas con suero fisiológico; TAA+MSC, ratas tratadas con TAA con una infusión de 3×10^6 MSC; y TAA+LIS ratas tratadas con TAA con una infusión de 3×10^6 MSC lisadas. Los valores representados son la media \pm error estándar. a vs. SO $p < 0.001$; b vs. TAA $p < 0.001$; c TAA+MSC vs. TAA+LIS $p < 0.001$; d vs. SO $p < 0.01$; d TAA+MSC vs. TAA+LIS $p < 0.05$.

La tinción histológica con hematoxilina-eosina corroboró los datos obtenidos con el análisis bioquímico. La infusión de MSC o de sus lisados acelera la recuperación de la arquitectura hepática, reduciendo tanto las áreas necróticas originadas por el tratamiento con TAA como la infiltración celular. Cabe resaltar que la presencia de una población de células madre en forma de lisados favorece una mayor recuperación de la funcionalidad hepática (Figura 36).

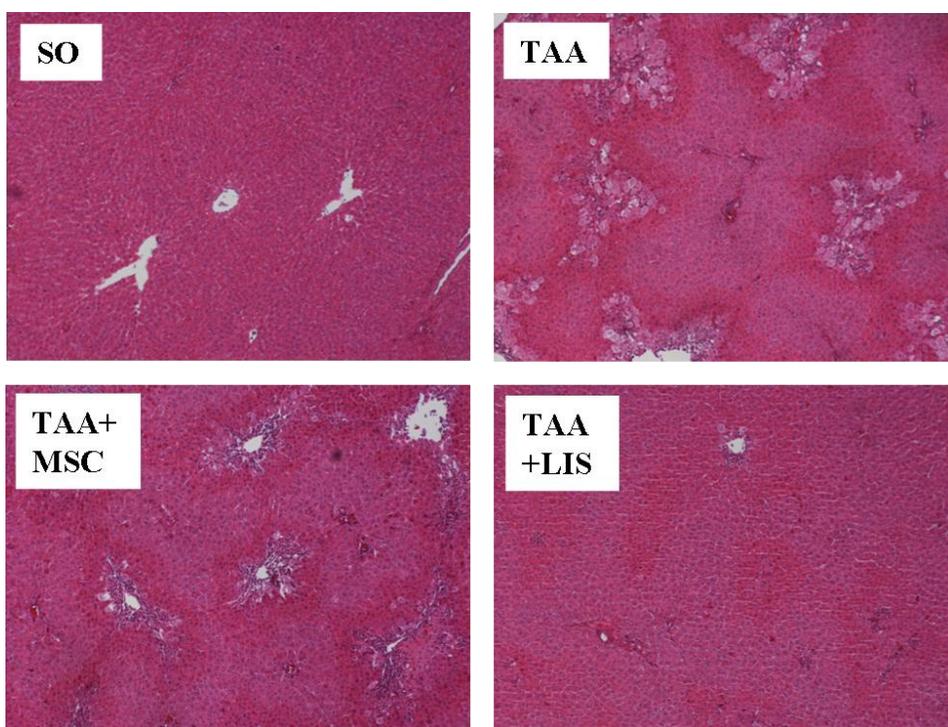


Figura 36. Secciones de hígado teñidas con hematoxilina-eosina. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes en ratas que han recibido una inyección intraperitoneal de TAA y han sido infundidas con suero fisiológico (TAA), MSC enteras (TAA+MSC) o lisados (TAA+LIS). El análisis de las imágenes fueron comparadas con un tejido hepático de ratas control (SO). Magnificación: 5X

Otra tinción analizada fue el tricrómico de Masson, que permite identificar zonas necróticas y fibrosas en biopsias de tejido. Las imágenes obtenidas reflejan en concordancia con el estudio histológico anterior, un daño severo originado por TAA en el parénquima hepático, y que la presencia de una población de células madre tanto intactas como lisadas disminuyó la lesión en el hígado (Figura 37).

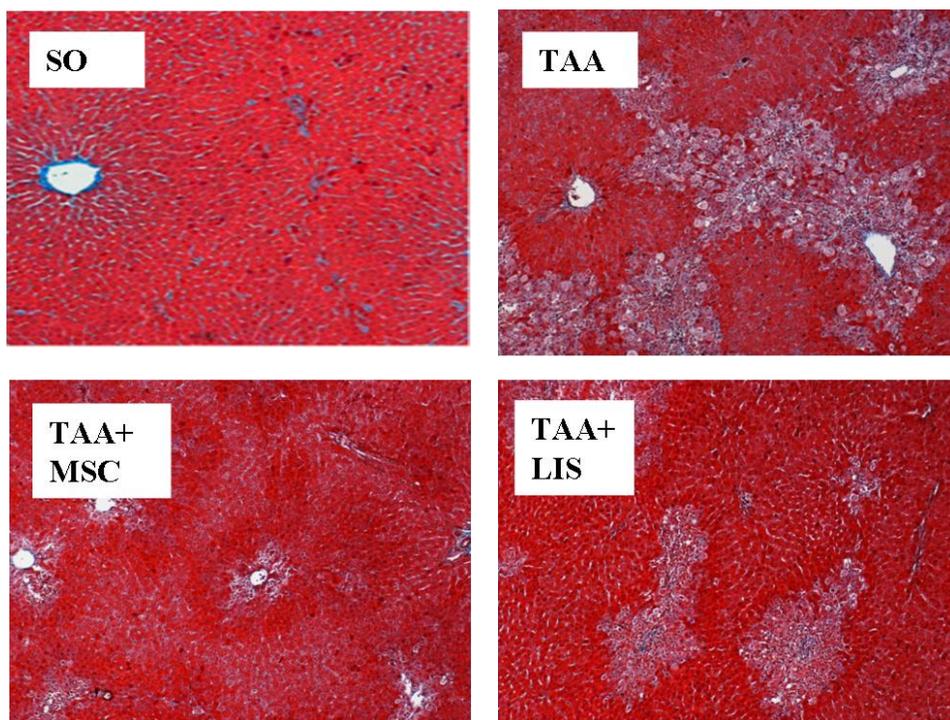


Figura 37. Secciones de hígado teñidas con Tricrómico de Masson. La fibrosis se observa de color azul en relación al resto del tejido, y en rojo el tejido sano. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes en ratas que han recibido una inyección intraperitoneal de TAA y han sido infundidas con suero fisiológico (TAA), MSC enteras (TAA+MSC) o lisadas (TAA+LIS). El análisis de las imágenes fueron comparadas con un tejido hepático de ratas control (SO). Magnificación: 5X.

TAA origina una muerte centrolobulillar masiva que provoca una desestructuración del lobulillo hepático, con la consecuente pérdida de las interacciones célula-célula como las mediadas por β -catenina de

membrana. La inmunotinción β -catenina en biopsias hepáticas de los animales incluidos en el estudio mostró la ausencia del marcador en las ratas tratadas con TAA. La terapia celular con MSC per se no consigue restaurar la presencia β -catenina en la membrana plasmática de los hepatocitos, aunque si la infusión de MSC en forma de lisados. En estos últimos animales, se pudo observar el re-establecimiento de la arquitectura del parénquima hepático (Figura 38).

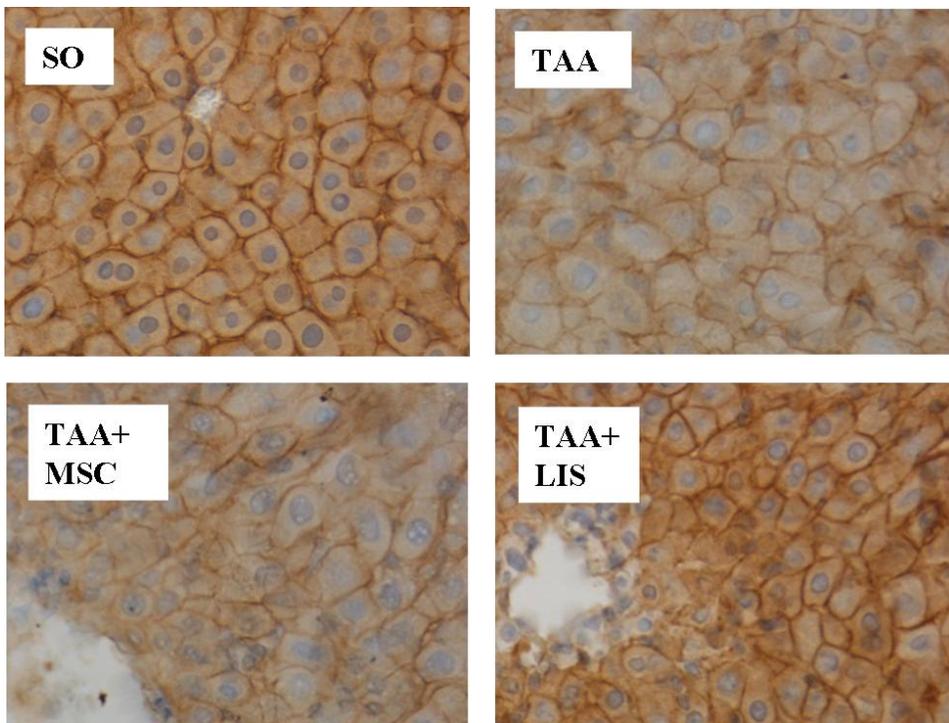


Figura 38. Inmunohistoquímica de β -catenina en el tejido hepático de ratas con daño hepático agudo. Las células positivas para la tinción presentan un precipitado marrón en la membrana plasmática. Se muestra una imagen representativa de ratas que han recibido una inyección intraperitoneal de TAA y han sido infundidas con suero fisiológico (TAA), MSC enteras (TAA+MSC) o lisados (TAA+LIS). El análisis de las imágenes fueron comparadas con un tejido hepático de ratas control (SO). Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes. Magnificación: 20X.

18. Las células madre mesenquimales y sus lisados disminuyen parámetros de muerte celular en el hígado de ratas tratadas con tioacetamida

La apoptosis celular fue determinada por un kit de ELISA que se basa en la detección de histonas asociadas a fragmentos de ADN. El resultado mostró que TAA origina una apoptosis. Estos niveles de apoptosis consiguieron reducirse tras la infusión de MSC en cualquiera de sus formas. Aunque fue significativo que el lisado de MSC produce una disminución mayor que las MSC per se (Figura 39).

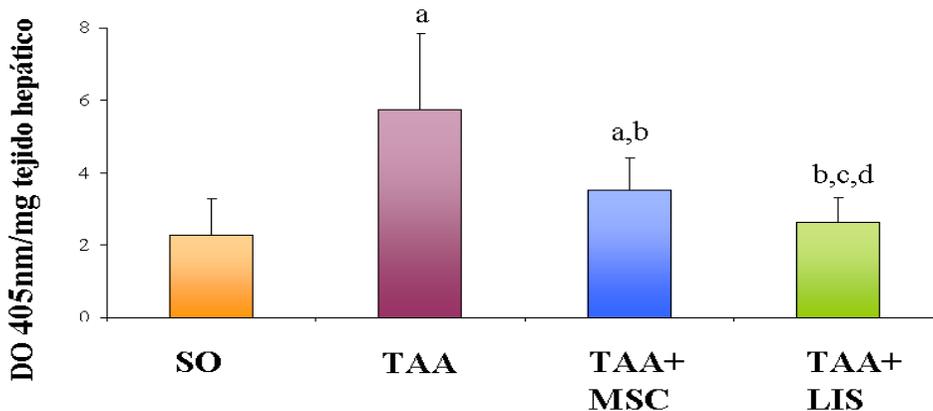


Figura 39. La inyección de MSC es capaz de disminuir los niveles de muerte en un modelo de daño hepático inducido por TAA. Los niveles de muerte fueron determinados por un ensayo enzimático inmunoabsorbente para fragmentos de ADN asociados a histonas citosólicas. SO: control, TAA: 400 mg/kg tioacetamida, TAA+MSC: 400 mg/kg tioacetamida + 3×10^6 MSC y TAA+LIS: 400 mg/kg tioacetamida + 3×10^6 MSC lisados. Los valores representan la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. a vs. SO $p < 0.001$; b vs. TAA $p < 0.001$; c TAA+MSC vs. TAA+LIS $p < 0.001$; c vs. SO $p < 0.05$.

19. La infusión de células madre mesenquimales o sus lisados desencadenan la activación de rutas de señalización relacionadas con proliferación, supervivencia y anti-apoptosis

Para determinar si las MSC puedan favorecer la proliferación de las células que conforman el parénquima hepático, se realizó una inmunotinción de PCNA, proteína nuclear sintetizada únicamente durante la mitosis. Las imágenes revelaron que sólo en presencia de las MSC, en cualquiera de sus formas, se detectaron células positivas para PCNA (Figura 40).

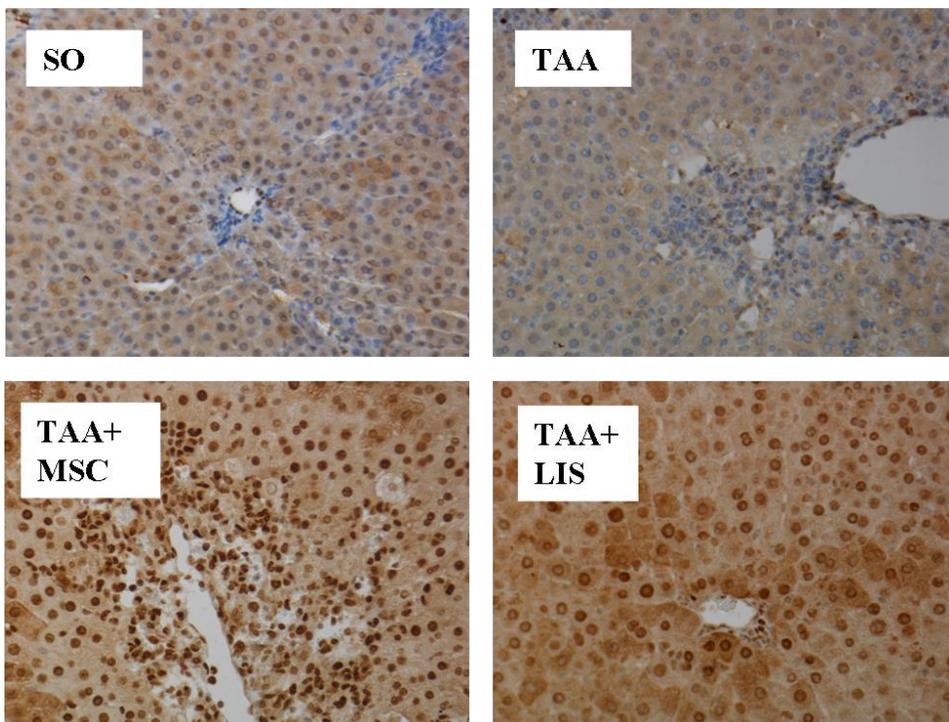


Figura 40. Inmunohistoquímica de PCNA en el hígado de ratas con un daño agudo. Las células positivas para la tinción presentan un precipitado marrón en el núcleo. Se muestra una imagen representativa de ratas que han recibido una inyección intraperitoneal de TAA y han sido infundidas con suero fisiológico (TAA), MSC enteras (TAA+MSC) o lisados (TAA+LIS). El análisis de las imágenes fueron comparadas con un tejido hepático de ratas control (SO). Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes. Magnificación: 20X.

También se determinó la expresión génica de ciclina D1, una proteína reguladora del ciclo celular y específica de la fase G1/S. El análisis va en consonancia con el estudio histológico anterior al encontrarse un incremento de la expresión de ciclina D1 tras la infusión de MSC o sus lisados (Figura 41).

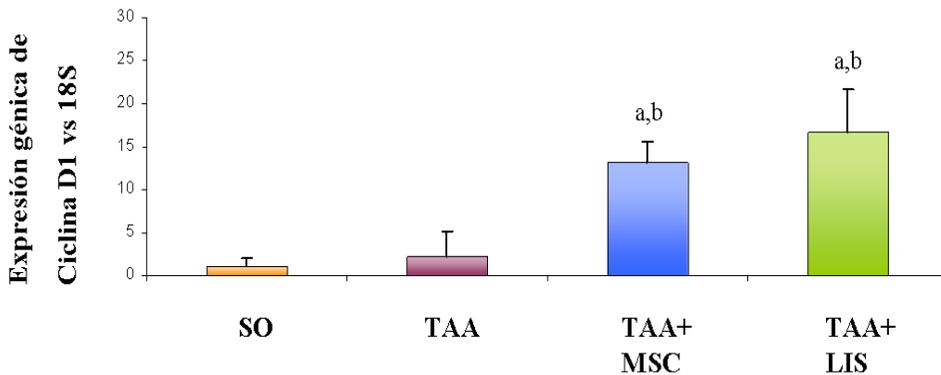


Figura 41. Expresión génica de ciclina D1 tras la infusión de MSC en un modelo de daño hepático agudo. SO: control, TAA: 400 mg/kg tioacetamida, TAA+MSC: 400 mg/kg tioacetamida + 3×10^6 MSC y TAA+LIS: 400 mg/kg tioacetamida + 3×10^6 MSC lisados. Los valores representan la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. a $p < 0.001$ vs. SO; b $p < 0.001$ vs. TAA.

En base a estos resultados procedimos a determinar cuál es el posible mecanismo de acción de las MSC o de sus lisados para desarrollar su efecto beneficioso. En este modelo experimental se evaluó el papel que podrían desempeñar la cascada intracelular PI3K/Akt, una de las principales ruta de señalización anti-apotótica que además favorece la supervivencia celular. El efector final de esta ruta es Akt-fosforilado. También se evaluó la posible participación de la ruta NFkB, cuya activación está relacionada con la supervivencia celular y es clave durante la regeneración hepática.

El análisis por western-blot mostró que el tratamiento con TAA la infusión de MSC enteras o lisadas incrementa los niveles de NFkB (p65) mientras que disminuyen los niveles de IκB-α, inhibidor de la ruta. Por otro lado, disminuyó el nivel de Akt-P, mientras que la infusión de MSC intactas o lisadas, restauró los niveles de manera similar a los encontrados en las ratas control (Figura 42).

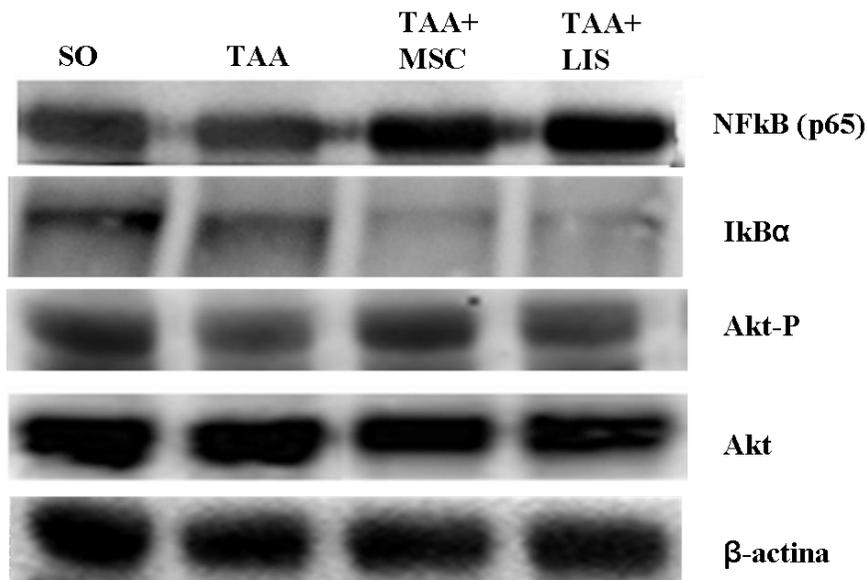


Figura 42. La infusión de MSC en un modelo de daño agudo hepático permite la activación de las rutas de señalización de Akt y NFkB. La presencia de NFkB (p65), IκB-α, Akt-fosforilado (Akt-P) y Akt se determinó por un análisis por western-blot. La imagen mostrada es representativa de 3 experimentos independientes. Se empleó como control de carga β-actina.

20. El contenido intracelular de las MSC clave en la restauración de la funcionalidad del hígado

Para determinar si el efecto beneficioso observado en este modelo experimental es debido específicamente a la presencia de las MSC en el parénquima hepático, transplantamos a un grupo de animales que habían

recibido la misma dosis de TAA otro tipo celular. Se infundieron células mononucleares (MNC) obtenidas de la sangre periférica de donantes sanos. En esta ocasión, el daño producido por TAA no es revertido por las MNC. No se detectó una reducción en los valores séricos de ALT (Figura 43A), ni se recuperó la arquitectura histológica normal del hígado (Figura 43B).

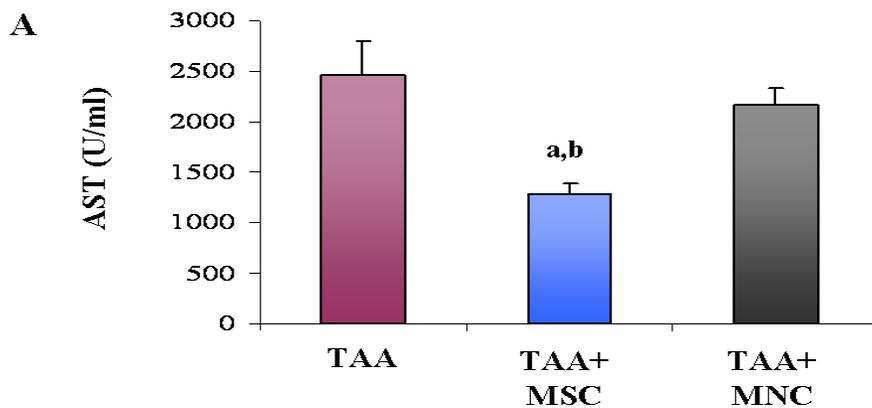
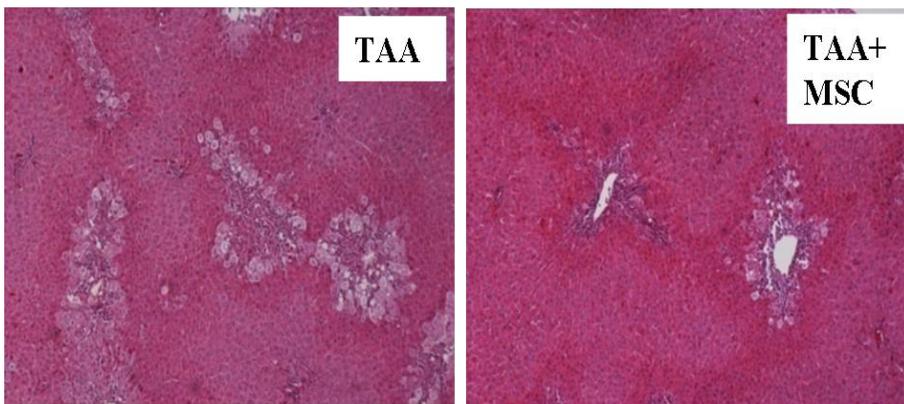


Figura 43. La infusión de células mononucleares de la sangre no restaura la funcionalidad tisular tras un daño agudo en el hígado. (A) Los niveles séricos de aspartato aminotransferasa (ALT) fueron determinados por ensayos colorimétricos. Los valores representados son la media \pm error estándar. a vs. SO $p < 0.001$; b TAA+MSC vs. TAA+MNC $p < 0.05$.

B



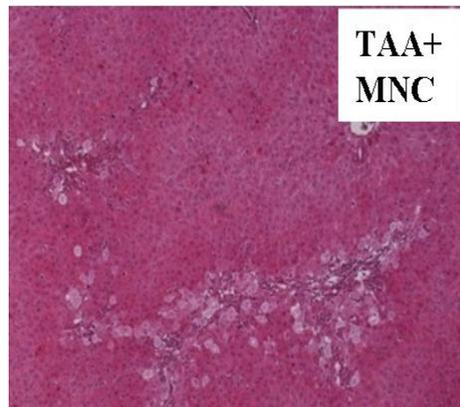


Figura 43. La infusión de células mononucleares de la sangre no restaura la funcionalidad tisular tras un daño agudo en el hígado. (B) Secciones de hígado teñidas con hematoxilina-eosina. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes. Magnificación: 5X. Los grupos de trabajo fueron los siguientes: TAA, ratas que han recibido una inyección intraperitoneal de TAA y han sido infundidas con suero fisiológico; TAA+MSC, ratas tratadas con TAA con una infusión de 3×10^6 MSC; y TAA+MNC ratas tratadas con TAA con una infusión de 3×10^6 MNC humanas.

A continuación procedimos a comparar el contenido intracelular de las MSC y MNC para identificar que factores podrían ser responsables reestablecer la funcionalidad hepática. Niveles intracelulares de micro-ARN relacionados con la apoptosis y la activación de NFkB (p65) fueron analizados. Así se detectó que las MSC poseen un contenido significativamente superior a las MNC en el miR-124a y miR-125b, mientras que poseen menos expresión del miR-155 (Figura 44). Además cabe destacar que las MSC tienen un mayor contenido de IL-6, citoquina clave en la regeneración hepática, en comparación con las MNC (Figura 45).

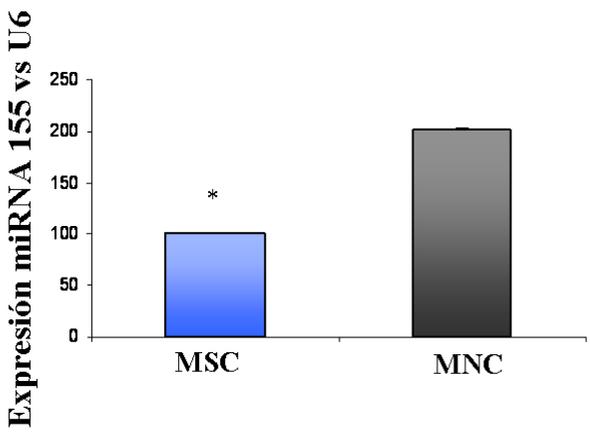
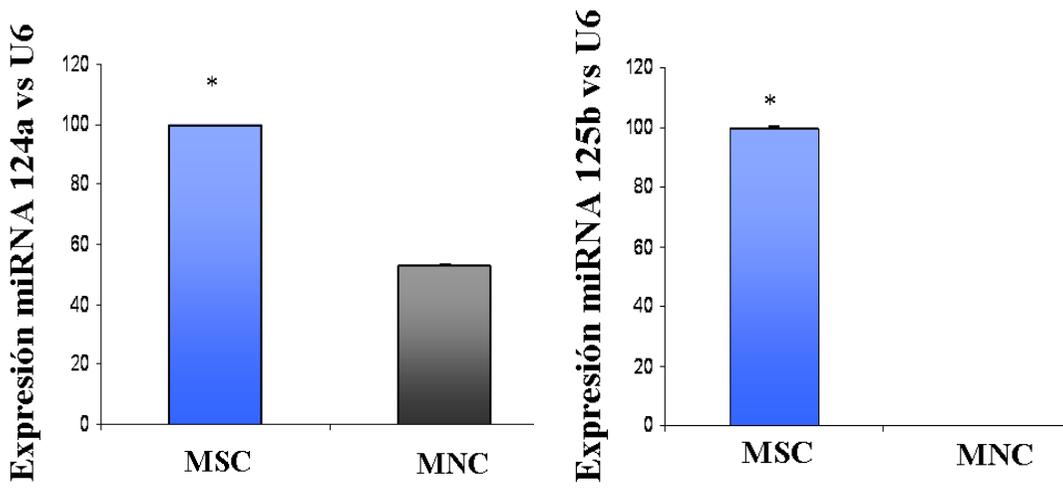


Figura 44. El contenido intracelular de las células madre mesenquimales (MSC) contiene miRNA-124a. La expresión de miRNA 124a, 125b y 155 fueron determinados por RT-PC en MSC y células mononucleares de sangre periférica (MNC). Los valores representados son la media ± error estándar. * vs MNC. $p < 0.001$.

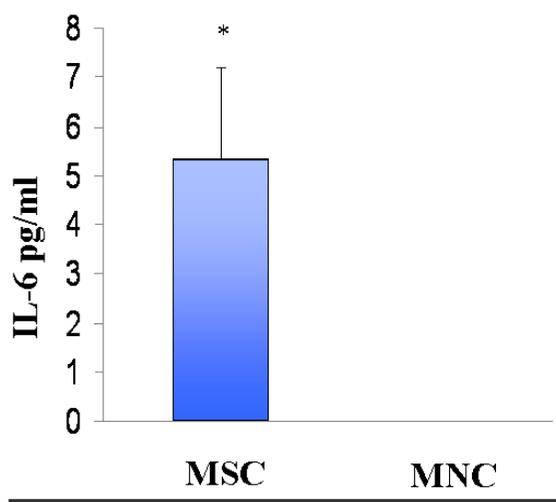
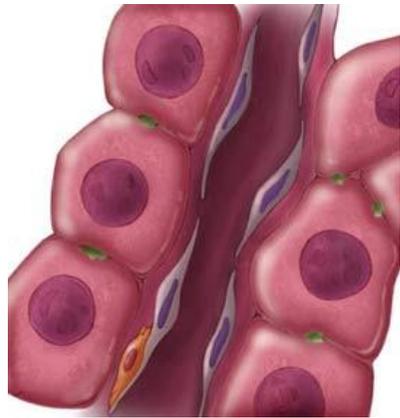


Figura 45. El contenido intracelular de las células madre mesenquimales (MSC) contiene IL-6. Los niveles intracelulares de IL-6 fueron determinados por ELISA en el lisado de MSC y células mononucleares de sangre periférica (MNC). Los valores representados son la media ± error estándar. * vs MNC. $p < 0.001$



V. DISCUSIÓN



BLOQUE 1: Diferenciación de células madre de médula ósea hacia hepatocitos

La capacidad de diferenciación de las BM-SC hacia hepatocitos está ampliamente documentada en la bibliografía. Sin embargo, no existe actualmente consenso de cuál podría ser la población de BM-SC más adecuada para realizar una diferenciación eficaz hacia células hepáticas¹⁵⁹. En este trabajo de investigación fueron aisladas distintos tipos de células con características de BM-SC fueron aisladas. Se purificaron células CD133⁺, MAPC y MSC desde una fuente de MO de donantes sanos. También se seleccionaron células CD34⁺ que han sido movilizadas hacia el torrente circulatorio desde la MO por un proceso de aféresis. El aislamiento de cada una de las poblaciones de BM-SC fue relativamente sencillo en todas excepto en las MAPC (sorting) y la pureza obtenida fue alta. Pero pese a todo, el número de células obtenido en cada caso fue bajo. Este hecho dificulta el empleo de estas células experimentalmente. La población de células CD34⁺ puede multiplicarse *in vitro* hasta 3 veces en presencia de SCF, Flt-3 ligando y TPO pero aún así el número conseguido sigue siendo insuficiente para posteriores intervenciones terapéuticas. Sin embargo, el número de MSC si puede multiplicarse ampliamente en cultivo en presencia de FGF-b. Además, por sus características biológicas, su alta capacidad de proliferación y una gran plasticidad para originar diferentes tipos celulares, las MSC podrían constituir una de las poblaciones de BM-SC más atractivas para obtener hepatocitos funcionales¹⁶⁰.

En este estudio, las MSC fueron seleccionadas desde la MO de la cresta ilíaca de donantes sanos. El análisis de su inmunofenotipo mostró que las células aisladas presentaban marcadores de característico de células con un origen mesenquimal, con ausencia de otros marcadores que definen a células HSC como el CD34⁺ (Figura 2). La tabla 3 muestra el porcentaje medio de cada uno de los marcadores de superficie analizados.

Actualmente no existe un protocolo de diferenciación establecido para obtener hepatocitos funcionales desde BM-SC ³⁸. Aunque, se han identificado algunas citoquinas y factores de crecimiento como HGF, FGF y OSM que podrían ser determinantes para conseguir una eficaz diferenciación a hepatocitos ¹⁶¹. En este estudio se utilizaron dos aproximaciones para conseguir células semejantes a hepatocitos desde MSC: CDH-1 y CDH2. Al finalizar cada uno de los protocolos de diferenciación, las células incrementaron los niveles génicos y proteicos de marcadores hepatoespecíficos. Además, las células conseguidas mostraban cierta funcionalidad hepática, ya que eran capaces de producir y almacenar glucógeno, propiedad intrínseca de las células que componen el parénquima hepático. Lo cuál indica que tanto CDH1 como CDH2 eran capaces de originar hepatocitos desde MSC. Cabe resaltar que entre ambos protocolos (CDH1 y 2) no existen diferencias significativas entre los distintos parámetros evaluados que nos permitieran discernir cuál de los dos tipos de células obtenidos son más semejantes a los hepatocitos.

Hay que tener en cuenta que el destino final que alcanzan las diferentes poblaciones de BM-SC está estrictamente regulado por

varias cascadas de señalización intracelular ¹⁶². En el caso concreto de las MSC, parece que la ruta Wnt/ β -catenina es clave durante el proceso de diferenciación a un determinado tipo celular ⁶⁹. Sin embargo, esta ruta en el campo de la hepatología se ha relacionado entre otros con la aparición o el desarrollo de procesos tumorales como el HCC o el hepatoblastoma ^{163 95}. Los datos encontrados en la bibliografía actual, indican que la diferenciación a hepatocitos desde BM-SC transcurre con una inhibición de la ruta Wnt/ β -catenin ^{70 71}. En este estudio se evaluó que implicación podría tener la traslocación de β -catenina nuclear durante este proceso de diferenciación. Para ello, se utilizaron dos protocolos uno que no activaba la ruta Wnt/ β -catenina (CDH1) y otro que translocaba β -catenina al núcleo celular (CDH2). Esta diferencia entre ambos protocolos podría ser debida al tratamiento con una alta dosis de dexametasona en el cóctel CDH2. Este glucocorticoide se ha relacionado con la activación de la ruta Wnt/ β -catenina en el proceso de diferenciación de las MSC hacia un linaje osteogénico. A continuación, procedimos a buscar posibles diferencias en el perfil de expresión de proteínas de los hepatocitos obtenidos con los protocolos CDH1 y 2. Se empleó un análisis proteómico DIGE y se encontraron diferencias de expresión en 39 proteínas. De ellas, 17 pudieron ser identificadas. Curiosamente las células tratadas con CDH2 presentaban proteínas como adenina fosforibosiltransferasa (APRT), catepsina B y D, triosafosfato isomerasa, pirofosfatasa inorgánica, peptidil-prolil cis-trans isomerasa A o cadena β L-lactato deshidrogenasa (LDH) elevadas al compararlas con células diferenciadas con CDH1 o UC. Todas estas proteínas han sido

relacionadas con la progresión de tumores en el hígado y metástasis ¹⁶⁴. Así, APRT ha sido detectada en el suero de pacientes con HCC ¹⁶⁶. Cathepsina D, por ejemplo, es un mediador clave en la regulación de la proliferación celular, angiogénesis y apoptosis ¹⁶⁷. La formación de tumores está generalmente unida al incremento de actividades enzimáticas glicolíticas como triosafosfato isomerasa ¹⁶⁸ y LDH ¹⁶⁹ ¹⁷⁰. También se ha relacionado un incremento de pirofosfatasa inorgánica en pacientes que sufren HCC ¹⁷¹. Por último, peptidil-prolil cis-trans isomerasa A ha sido implicada en varios procesos patológicos entre los que se encuentra el HCC ¹⁷².

En contraste, otras proteínas relacionadas con la supresión o inhibición de tumores estaban presentes en las células diferenciadas con CDH1. Una de esas proteínas es la cadena β de la tropomiosina que favorece la estabilización de los filamentos de actina impidiendo así la transformación tumoral de hepatocitos ¹⁷³. Otra es transgelina, que aunque es una proteína específica de células de músculo vascular actúa como una proteína supresora de tumores. De hecho, la región promotora del gen está altamente metilado en pacientes con HCC lo que provoca una disminución de la traducción proteica ¹⁷⁴. También se encontró en este estudio la expresión alterada de la proteína Anexina A5. Las anexinas constituyen una familia de proteínas reguladas por iones calcio que se unen a los fosfolípidos que componen la membrana plasmática celular participando en procesos biológicos como la señalización celular, transporte de iones división celular y apoptosis ¹⁷⁵.

En base a estos resultados que relacionaban a las células diferenciadas con CDH2 con un fenotipo tumoral, se determinaron los

niveles proteicos de uno de los genes supresores de tumores por excelencia, p53. Esta proteína está implicada en múltiples procesos celulares como el control del ciclo celular, apoptosis, ADN reparación, angiogénesis...y su supresión favorece el desarrollo de tumores como el HCC. La pérdida de p53 ha sido descrita entre el 30-60% de los HCC ¹⁷⁶. Los resultados obtenidos por western-blot iban en el sentido de los obtenidos por el análisis proteómico DIGE, donde las células diferenciadas con CDH2 contenían menos p53 en comparación con células indiferenciadas CI o con células tratadas con CDH1.

Profundizando si las células sometidas al protocolo CDH2 estaban adquiriendo características de células tumorales, procedimos a analizar el inmunofenotipo que presentaban las MSC al finalizar el proceso de diferenciación con ambos protocolos. Los datos iban en consonancia con los obtenidos en otros ensayos, y las células diferenciadas con el protocolo CDH2 presentaban mayor expresión de ciertos marcadores de superficie relacionados con el HCC ¹⁷⁷ en relación a los niveles encontrados en MSC diferenciadas con el protocolo CDH1 y CI. Uno de estos marcadores es CD13, una aminopeptidasa con actividad metaloproteinasa que juega un papel fundamental en la angiogénesis, invasividad y metástasis en procesos tumorales como HCC ¹⁷⁸. En otro estudio se ha relacionado incluso la presencia de CD13 en la superficie celular con la resistencia a la quimioterapia ¹⁷⁹. Otro marcador que se identificó fue CD49e (integrina $\alpha 5$), cuyo expresión también se encuentra elevada en líneas celulares de HCC ¹⁸⁰. Las células diferenciadas con CDH2 también elevaron los niveles de expresión de VEGFR2, elemento clave en la regulación de

procesos neo-angiogénicos que determinan el crecimiento y la metástasis tumoral en muchos tipos de cáncer como el HCC. De hecho en hepatocitos tumorales se ha encontrado una sobre-expresión de VEGFR2¹⁸¹. Por último, se identificó un incremento en los niveles de CD133, marcador que define a una población de CSC en el hígado¹⁸².

Cada vez existen más evidencias que asocian alteraciones en la regulación de las SC y la generación de CSC^{183 184}. Estas CSC tienen una alta tasa proliferativa y podría ser el origen de algunos cánceres o pueden favorecer la progresión de procesos tumorales como el HCC^{185 186}. En este sentido, las células diferenciadas con el protocolo CDH2, desde el día 14 de cultivo, ya presentaban mayor proliferación que las células diferenciadas con CDH1 o CI. Este resultado fue corroborado por una mayor tinción de PCNA nuclear y un mayor porcentaje de células que se encontraban en fase S.

Una de las propiedades principales de las CSC es su capacidad de originar esferas en cultivo¹⁸⁷. Parece que existe cierta relación entre la formación de esferas y la conservación de las propiedades “stemness” en las CSC. En nuestro caso, todos los tipos de MSC, CI y tratadas con CDH1 o CDH2, son capaces de originar esferas primarias y secundarias. Las esferas secundarias se sembraron en dilución clonal, lo que permitía distinguirlas de aglutinaciones celulares. Si cabe destacar, que el número tanto de esferas primarias como secundarias es mayor en las células tratadas con CDH2.

En resumen, las MSC purificadas desde MO podrían ser una población muy adecuada para conseguir células semejantes a hepatocitos funcionales. El proceso de diferenciación hacia hepatocitos desde MSC no es unilateral. Distintas combinaciones de citoquinas y factores de crecimiento originan hepatocitos *in vitro*. Este diferenciación hacia hepatocitos es independiente de la ruta Wnt/ β -catenina. Pero si durante el transcurso de este proceso diferenciador se β -catenina se trasloca al núcleo, las células resultantes desarrollan un fenotipo tumoral.

De este modo, el microambiente o la exposición a determinados tratamientos como glucocorticoides podrían generar cambios moleculares en las BM-SC que podrían contribuir o promocionar tumores como el HCC. Este hallazgo implica la necesidad de profundizar en la investigación con BM-SC para la realización de una terapia celular eficaz frente a diversas patologías hepáticas.

BLOQUE 2: Papel de la movilización de células madre de médula ósea en pacientes con patologías hepáticas

Los pacientes que han sido sometidos a una resección hepática por distintas patologías en el hígado, son capaces de restaurar la masa hepática y la funcionalidad hepática después de 7 y 15 días después de la intervención quirúrgica. Este hecho pone de manifiesto que la regeneración hepática es un proceso muy bien orquestado por cascadas de señalización intracelular en las que participan diversos factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas y enzimas remodeladoras de la matriz extracelular que estimulan la proliferación de las células del parénquima hepático y a su vez restauran el sistema vascular. Se cree que los propios hepatocitos remanentes, son los encargados de iniciar el proceso regenerativo, ya que, inmediatamente después de producirse una lesión en el hígado, abandonan su estado normal de quiescencia y se multiplican en número ¹⁸⁸. Sin embargo, los hepatocitos pierden esta capacidad autorenovadora ante un daño crónico o severo ¹⁸⁹. Algunos investigadores creen que los HPC son las células que tomarían el relevo. No obstante, otros investigadores han postulado que las BM-SC podrían favorecer y contribuir a la regeneración hepática y ser una fuente alternativa de nuevos hepatocitos ¹⁹⁰. Sin embargo, esta afirmación es aún controvertida, ya que no en todos los trabajos de investigación que abordan esta temática se observa una participación de la MO en el proceso regenerativo ante un daño en el hígado ^{191 192}.

Basándonos en esta controversia este estudio evaluó si la movilización de células CD34⁺ desde la MO contribuye al proceso

regenerativo en el hígado. Para ello, se analizó el porcentaje de células CD34⁺ en la sangre periférica de pacientes con distintas patologías hepáticas y que habían sido sometidos a HP. Los resultados muestran que sólo el 42,4% de los pacientes incluidos en el estudio, aumentan el porcentaje de células CD34⁺ en sangre periférica 72 h después de la resección hepática. En base a estos resultados los pacientes se dividieron en dos grupos: G1 (aumentaron el número de células CD34⁺) y G2 (disminuyeron o igualaron el número de células CD34⁺).

El análisis del inmunofenotipo de estas células mostró la presencia de otros marcadores de superficie característicos de BM-SC. Lo cuál podría indicar que el origen de estas células CD34⁺ circulantes en sangre periférica podría ser la MO. Con lo cuál, tenemos unos pacientes capaces de movilizar una población de BM-SC (G1) y otros no movilizados (G2).

Estos resultados van en consonancia con la bibliografía actual dónde unos autores detectan movilización de BM-SC hacia la sangre periférica y otros no. Una razón que explicaría esta diferencia en los resultados podría ser que se desconoce cuál es el estímulo que dispara el proceso movilizador desde la MO. En un principio se postuló que la enfermedad subyacente del paciente podría ser la responsable de iniciar la movilización celular desde la MO ¹⁹³. Sin embargo esta afirmación no está clara, ya que Gehling et al. encontraron un incremento de células CD133⁺ procedentes de la MO en la sangre periférica en donantes de hígado sanos que habían sido sometidos a una HP para participar en un transplante *in vivo* ¹¹⁵. De hecho, muchos investigadores creen que la HP es realmente la responsable de

comenzar el proceso movilizador de BM-SC hacia el hígado. Así, se ha observado una movilización de células CD34⁺ tanto en modelos experimentales de daño hepático como en pacientes con distintas patologías hepáticas que habían sido sometidos a una HP sin que se requiera un tratamiento previo con G-CSF ¹⁹⁴. De hecho, en un estudio comparativo con pacientes que sufren distintas dolencias hepáticas, se detectó una mayor movilización de células CD34⁺ en aquellos que habían sido sometidos a una HP ¹⁹⁵. Incluso se ha postulado que el número de BM-SC movilizadas en sangre periférica podría ser proporcional al porcentaje de resección que han sufrido los pacientes ¹⁹⁶. No obstante, otros autores creen que el grado de movilización tras una HP depende del estadio y del tipo de lesión hepática ¹⁹⁷. Lemoli et al. demostraron que cambios en los niveles de movilización de células madre endoteliales y de células CD34⁺ en el torrente circulatorio de pacientes sometidos a un THO o a una HP son proporcionales a los niveles séricos de citoquinas y factores de crecimiento que posean. ¹⁹⁸

Sin embargo, en otros estudios no se ha detectado la movilización de BM-SC hacia el hígado. Di Campli et al. no encontraron un incremento del número de células CD34⁺ en la sangre periférica de pacientes que sufrieran ni patologías hepáticas agudas ni crónicas, ni incluso, en pacientes sometidos a una HP ¹⁹⁹. Otros investigadores tampoco detectaron la presencia ni contribución de BM-SC en recuperar la funcionalidad tisular normal tras un THO ²⁰⁰.

En los dos tipos de pacientes encontrados en este estudio (G1 y G2) no se encontró ninguna correlación entre el número de células CD34⁺ movilizadas, el sexo, edad, porcentaje de resección o patologías

hepáticas de los pacientes. Por tanto, nuestro estudio podría validar todos los resultados ambiguos encontrados sobre la relación entre movilización e hígado.

Independientemente del porcentaje de movilización conseguido en cada tipo de pacientes, comprobamos si estas células CD34⁺ son capaces de anclarse en el parénquima hepático en mayor o menor medida. La tinción inmuohistoquímica para CD34 puso de manifiesto que ambos tipos de pacientes tenían células positivas en el parénquima hepático antes de la HP. Curiosamente los pacientes G2 (no movilizadores) presentaban un mayor número de células positivas para el marcador CD34 en el tejido. Este resultado va en consonancia con el alto porcentaje de células CD34⁺ en sangre periférica antes de la HP (0 h), que fue superior en pacientes G2. Parece que los pacientes incluidos en el grupo G2 han iniciado una movilización desde la MO antes de la resección hepática.

Para comprobarlo estudiamos el establecimiento del eje SDF-1/CXCR-4 que juega un papel fundamental en el anclaje de las BMSC en el parénquima de un hígado dañado^{201 202}. Las BMSC abandonan la MO y viajan a través del torrente circulatorio siguiendo el gradiente de SDF-1 que se establece entre la MO y el tejido dañado^{103 203}. Finalmente, las células CD34⁺ son capaces de hospedarse en su diana porque presenta en superficie el marcador CXCR-4, receptor del SDF-1²⁰⁴. Los datos obtenidos en este sentido mostraron que tanto en pacientes G1 como en pacientes G2 participaba el eje SDF-1/CXCR-4. En biopsias hepáticas de ambos tipos de pacientes antes de la resección hepática (0 h), los pacientes G2, presentan mayor número de células

positivas tanto para SDF-1 como para CXCR-4. De igual manera, se determinaron los niveles de SDF-1 solubles en el plasma de ambos tipos de pacientes a las 0 h y 72 h después de la HP, y se encontró que los niveles de SDF-1 eran significativamente superiores también en G2. De tal manera, que estos pacientes mal denominados no movilizados, han iniciado un proceso movilizador hacia el hígado antes de la resección hepática. En base a estos resultados, podemos afirmar que la HP no sería un estímulo suficiente para desencadenar la movilización de BM-SC hacia el hígado, sino más bien otros factores o rutas de señalización.

Por otro lado, se determinaron los niveles séricos de citoquinas, quimioquinas, interleuquinas, enzimas proteolíticas de la matriz extracelular así como factores de crecimiento, relacionados con la biología de las BM-SC y de las células hepáticas, antes (0 h) y 72 h después de la HP^{205 206}. De esta manera intentaremos determinar cuál podría ser el disparador de la movilización celular desde la MO. Una de las citoquinas fue SCF, clave para mantener la supervivencia y proliferación de las BMSC²⁰⁷. Los resultados mostraron niveles significativamente superiores de SCF en pacientes G1 después de la HP y en pacientes G2 a 0 h. También se determinaron los niveles de MMP-2, una metaloproteasa sintetizada por los neutrófilos de la MO que degrada la matriz osea permitiendo la liberación de las BMSC al torrente circulatorio¹⁰⁶. En este caso los pacientes G2, presentaban mayor nivel de MMP-2 sérica antes (0 h) y 72 h después de la intervención quirúrgica. Del mismo modo, se analizaron los niveles séricos de factores de crecimiento relacionados con la proliferación y

supervivencia de las células del hígado como HGF y TGF- β . Ambos tipos de pacientes, presentaban valores de HGF más elevados a las 72 h de una HP. Sin embargo, los niveles de TGF- β más bajos en pacientes G2 que en pacientes G1 a las 72 h de la HP. Finalmente se analizó la presencia de IL-12 soluble, elemento de respuesta ante el desarrollo de un proceso inflamatorio, que se le ha relacionado el reclamo de las BMSC. En este caso, los valores de IL-12, fueron significativamente superiores en los pacientes G1 después de la HP, en lugar de los pacientes G2 dónde estos niveles fueron superiores a las 0 h. Parece que los niveles de ciertos elementos reguladores implicados en la movilización hepática así como en el proceso regenerativo en el hígado es mayor en los pacientes G1 a las 72 h de la resección hepática mientras que en los pacientes G2 ya se encuentran elevados antes de la HP. Estos resultados van en consonancia con nuestra hipótesis de que el proceso movilizador en G2 fue anterior a la HP.

En la actualidad se debate si realmente las BM-SC son las encargadas de restaurar una lesión en el hígado cuando los hepatocitos y los HPC tienen reducida su potencialidad o si realmente colaboran de forma sinérgica los tres tipos de poblaciones. Para estudiar este aspecto, determinamos la presencia de Ki67, marcador específico de hepatocitos en estado proliferativo, y de OV-6, proteína específica de los HPC. De nuevo, tanto G1 como G2 contenían células positivas para ambos marcadores en el parénquima hepático antes de la HP, pero la tinción fue más intensa en los pacientes G2. Este hecho corroboró que los mecanismos de regeneración hepática no son excluyentes y que varias estrategias co-existen en espacio y tiempo incrementando el número de hepatocitos.

En resumen, los pacientes incluidos en el grupo G1, eran capaces de movilizar células CD34⁺ 72 h después de una resección hepática, y esta movilización estaba regulada principalmente por el eje SDF-1/CXCR-4 y la citoquina SCF. Estas células circulantes CD34⁺, eran capaces de alojarse en el parénquima hepático de estos pacientes dónde favorecen la regeneración hepática mediante la activación de ciertos elementos reguladores como HGF e IL-12. Por el contrario, en el grupo G2, los pacientes reúnen una serie de características antes de la intervención quirúrgica como la presencia de células positivas para CD34, SDF-1, CXCR-4 en el parénquima hepático, o niveles séricos de SCF, SDF-1, y MMP-2 superiores a los pacientes G1, que podrían indicar que estos pacientes ya habían desencadenado un proceso movilizador anterior a la HP. En este sentido, también presentaban niveles superiores de HGF, IL-12 y Ki67, así como niveles inferiores de TGF- β , que se relacionan con la regeneración hepática. Por tanto, los niveles circulantes de factores relacionados con la biología de las BMSC podrían ser los determinantes para iniciar un movilizador desde la MO hasta el hígado. Este proceso finalmente puede coincidir con otras estrategias regenerativas como las de los hepatocitos o los HPC

BLOQUE 3: Terapia celular en un modelo experimental de daño hepático agudo

La medicina regenerativa y las SC podrían constituir una alternativa eficaz frente a distintas patologías hepáticas²⁰⁸. Para realizar una terapia celular adecuada se requiere un elevado número de células y que éstas sean compatibles con el propio paciente evitando así el desarrollo de un rechazo inmunológico.

En base a estos condicionantes, las SC que se encuentran en la MO podrían ser buenas candidatas para utilizarlas en medicina regenerativa. De todas las poblaciones celulares de la MO, las MSC destacan por su potencial proliferativo, su plasticidad para diferenciarse a múltiples tipos celulares como osteoblastos, adipocitos, condrocitos cardiomiocitos, hepatocitos, células endoteliales o neuronas..., y su capacidad para modular el sistema inmune²⁰⁹. De hecho, Cho et al. compararon frente a un daño hepático el potencial regenerativo de tres poblaciones celulares, HSC, MSC y células mononucleares. De todas, parece que las MSC podrían ser las más adecuadas para recuperar la funcionalidad en el hígado²¹⁰. Estas MSC se han utilizado en diversos modelos experimentales de daño hepático, y se han obtenido resultados esperanzadores. En un estudio con cerdos con un fallo hepático fulminante, el trasplante intraportal de MSC consiguió prevenir la muerte celular en el parénquima tisular²¹¹. En otro modelo experimental con ratas que habían desarrollado un proceso de fibrosis en el hígado, la infusión de MSC consiguió reducir de forma significativa la lesión²¹². En otro estudio en ratones se obtuvieron

resultados semejantes. En este caso los autores transplantaron MSC o HSC, para comparar el efecto beneficioso de cada una por separado y con una infusión conjunta. Los autores encontraron que las MSC solas era capaces de desarrollar un efecto anti-fibrótico y anti-inflamatorio más potente que las HSC ²¹³.

En la actualidad se desconoce como las MSC son capaces de favorecer la regeneración en el hígado. Algunas autores indican que las MSC se alojan en el parénquima hepático y se diferencian *in vivo* hacia hepatocitos ²¹⁴. Aunque, Popp et al. transplantaron MSC en ratas que padecían una lesión crónica en el hígado, y no consiguieron reducir el daño ²¹⁵. En este mismo sentido, otros autores ante un daño crónico en el hígado tampoco consiguieron encontrar células en el parénquima hepático diferenciadas a hepatocitos desde MSC, sino que más bien demostraron que estas MSC tenían potencial para promover el desarrollo de una fibrosis ^{216 217}.

Recientemente se ha puesto de manifiesto que las MSC podrían desarrollar un efecto beneficioso mediante mecanismos paracrinos ²¹⁸. En varios trabajos de investigación se ha conseguido revertir lesiones de distinta naturaleza en el hígado, infundiendo simplemente los factores o moléculas que las MSC secretan al medio ^{219 220}. Existen varios trabajos de investigación en los cuáles los animales recibieron el medio de cultivo concentrado de las MSC y consiguieron recuperar la funcionalidad del hígado ^{149 150 151}.

En esta tesis doctoral se evaluó el papel que podrían desempeñar las MSC o el lisado de las mismas en un modelo experimental de daño agudo en ratas. Para ello, los animales recibieron

una inyección intraperitoneal de TAA un tóxico hepatoespecífico que a dosis altas provoca una muerte celular masiva en el parénquima hepático tras 48 h. El objetivo del estudio fue revertir la lesión hepática con una terapia celular con MSC o con su lisado. Para ello, los animales recibieron una infusión de 3×10^6 de MSC, o una infusión del lisado de 3×10^6 de MSC.

Las MSC utilizadas en este estudio fueron seleccionadas desde la MO de donantes sanos, y expandidas en cultivos *in vitro* hasta obtener un número celular necesario. A continuación se comprobó que las MSC obtenidas mantenían en superficie un inmunofenotipo característico de células de origen mesenquimal y que conservaban potencialidad para originar distintos tipos celulares maduros como osteoblastos o adipocitos.

Las MSC o sus lisados fueron infundidos a las 18 h de recibir el tratamiento con TAA, cuando la lesión todavía no ha alcanzado un grado máximo. La presencia de células CD90⁺ humanas alrededor de las áreas necróticas reveló que las MSC eran capaces de reconocer un daño en el parénquima hepático y hospedarse en él tras 30 h de tratamiento.

Los distintos grupos de animales fueron sacrificados a las 48 h de recibir el tratamiento de TAA. La bioquímica de todos los grupos demostró que las ratas tratadas con TAA desarrollaban una insuficiencia hepática con respecto a las ratas SO. Las ratas tratadas con TAA presentaban valores séricos elevados de parámetros relacionados con el daño hepático como transaminasas (AST y ALT). La infusión de MSC o sus lisados disminuyó significativamente todos estos

parámetros con respecto a las ratas tratadas con TAA. En el caso concreto de los lisados, la reducción en los valores de las transaminasas fue significativamente más baja que la alcanzada con la infusión de las MSC. Incluso, los niveles de ALT son semejantes a los que poseen las ratas SO. Estos resultados fueron corroborados con tinciones histológicas de hematoxilina-eosina y tricómico de Masson observando una mayor funcionalidad del parénquima hepático tras la infusión de células en forma de lisados. Además, TAA produce una rotura de la arquitectura característica del lobulillo hepático. Los hepatocitos pierden las moléculas de adhesión que permiten la unión con otras proteínas como β -catenina. En este caso, únicamente la infusión de los lisados celulares consiguió re-establecer la presencia de β -catenina en la membrana plasmática de las células del parénquima re-establecimiento así la formación de filas de hepatocitos a modo de cordones celulares alrededor de la vena central.

De esta manera, nuestros resultados indican que ante el desarrollo de un proceso de muerte por necrosis y apoptosis en el hígado las MSC son capaces de alcanzar el tejido, alojarse en el parénquima y acelerar el re-establecimiento de la funcionalidad hepática. Si bien, la infusión del contenido intracelular de estas MSC parece ser más efectivo que el trasplante de la célula completa.

Sin embargo, se desconocen cuáles son los mecanismos de señalización que desencadenan estas MSC o sus lisados para conseguir revertir el daño hepático producido por TAA. En la bibliografía no existen muchas evidencias sobre cuál es la ruta diana de las MSC ante una lesión en el hígado. Pan et al. encontraron que una inactivación de

la cascada de señalización MEK/ERK en hepatocitos de ratas, mejoraba el daño tisular originado por un largo proceso de isquemia/reperfusión²²¹. En otro trabajo, Lam et al demostraron que la activación de la ruta Stat3 en MSC, dependiente de IL-6, favorecía la diferenciación hepática, así como la proliferación de las células que conforman el parénquima hepático, favoreciendo por tanto, un proceso regenerativo en el hígado²²².

En este modelo experimental co TAA, se evaluó si la terapia celular era capaz de activar la proliferación de los hepatocitos, principal componente celular del parénquima hepático. Para ello, determinamos la presencia de marcadores moleculares relacionados con la división celular como PCNA nuclear, y la expresión de genes reguladores de la entrada del ciclo celular como ciclina D1. Los resultados mostraron como únicamente ante la presencia de MSC o de sus lisados se promovió la división de hepatocitos. En este caso no se encontraron diferencias significativas entre la infusión de MSC o de sus lisados.

Existen indicios que permiten relacionar que el efecto beneficioso de las MSC es a través del desencadenamiento de una inhibición de un proceso oxidativo y una disminución de la apoptosis en las células hepáticas¹⁵⁷. En nuestro caso, como TAA genera un modelo de muerte por apoptosis y necrosis, analizaremos la posible implicación de rutas relacionadas con la antiapoptosis como PI3K/Akt²²³ y la supervivencia celular como NFkB²²⁴. Los resultados mostraron que las ratas tratadas únicamente con TAA presentaban una disminución en los niveles de Akt-fosforilado, efector final de la ruta PI3K/Akt, así como de NFkB mientras que mantenía elevados los

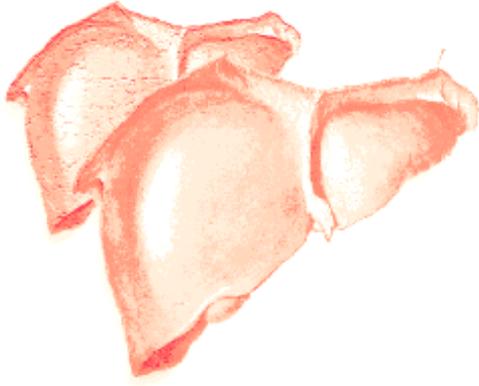
niveles de I κ B α , inhibidor específico de NF κ B. Sin embargo, tras la infusión de MSC o de sus lisados, se consigue restaurar los niveles de Akt fosforilado semejantes a los que poseen una rata SO. Además, favorecen el aumento de los niveles de NF κ B, así como la disminución de su inhibidor, I κ B α . No se encontraron diferencias significativas entre el uso de MSC enteras o en su forma de lisados.

De esta manera podemos afirmar que las MSC, en cualquiera de sus formas, son capaces de desencadenar un efecto beneficioso en el hígado de ratas que habían recibido un tratamiento con TAA a través de la activación de las rutas Akt y NF κ B. Parece que esta recuperación en la funcionalidad tisular es específica de las MSC, porque cuando se transplantan otro tipo celular como las MNC de sangre periférica de ratas no se consigue disminuir los parámetros de daño ni a nivel sérico ni histológico.

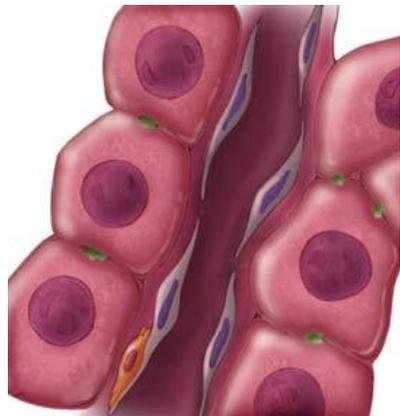
La diferencia encontrada en el uso terapéutico de ambos tipos celulares, podría estar en el contenido intracelular que componen a las MSC y a las MNC²²⁵. De hecho, las MSC poseen un alto nivel de IL-6 en comparación con las MNC. Esta interleuquina es clave durante las primeras etapas de la regeneración hepática y media la activación de diferentes cascadas de señalización que participan en dicho proceso regenerativo²²². Además las MSC presentan elevados niveles de expresión de miRNA-124a y miRNA-125b. Los miRNA son pequeñas secuencias de ARN no codificante que regulan la expresión de ciertos genes a nivel post-transcripcional tras unirse a secuencias no codificantes en el extremo 3'(3'-UTR). Los miRNA encontrados en estas MSC están relacionados con el desarrollo de efectos anti-

proliferativo y anti-apoptóticos a través de la activación de la ruta NFkB^{226 227}. También se encontró una disminución en los niveles de expresión de miRNA-155. En la bibliografía se ha relacionado a este miRNA-155 en el hígado, con la producción de TNF α , que a su vez se asocia una baja capacidad proliferativa celular.

En resumen, por sus características biológicas las MSC de MO podrían ser un buen candidato para utilizarse como instrumento en medicina regenerativa. En un modelo experimental de daño hepático agudo producido por la inyección intraperitoneal de una dosis elevada de TAA, tras la infusión intraportal de MSC se ha comprobado que se alojan en el parénquima hepático y favorecen un proceso regenerativo en el hígado. Las MSC fueron transplantadas de dos formas, intactas o en forma de lisados. Ambas formas son efectivas frente a una lesión hepática y disminuyen los parámetros de daño hepático y de muerte. Los animales que recibieron la infusión de MSC en lisados, recuperó más rápidamente la funcionalidad normal del hígado. Las MSC per se o los lisados son capaces de activar el proceso regenerativo en el hígado estimulando la proliferación de los distintos componentes celulares. Parece que este efecto beneficioso por parte de las MSC transcurre mediante la activación de la ruta NFkB y Akt, por un alto contenido intracelular de IL-6 y la presencia de microRNA claves en el control y regulación de NFkB.



VI. CONCLUSIONES



- 1. Las células madre mesenquimales de médula ósea poseen potencialidad para originar células semejantes a hepatocitos funcionales.**
- 2. La modulación de la ruta Wnt/ β -catenina no es un elemento clave para la obtención de marcadores hepatoespecíficos en células madre mesenquimales de médula ósea diferenciadas a hepatocitos.**
- 3. La activación de la ruta Wnt/ β -catenina durante el proceso de diferenciación de células madre mesenquimales hacia hepatocitos conduce a la generación de un fenotipo tumoral.**
- 4. El nivel de movilización de células CD34⁺ desde la médula ósea hacia la sangre periférica depende de los niveles séricos de ciertas citoquinas claves en el proceso regenerativo. Por tanto, la hepatectomía parcial no es un estímulo suficiente para disparar el proceso movilizador desde la médula ósea.**

- 5. Existe una correlación positiva entre el grado de movilización previo a la resección hepática y la expresión hepática de SDF-1 y CXCR4.**
- 6. Durante el proceso de regeneración hepática activado por una hepatectomía intervienen de forma simultánea hepatocitos, células progenitoras hepáticas y células madre movilizadas desde la médula ósea. vías de regeneración**
- 7. La inyección intraperitoneal de tioacetamida conduce a un daño hepático originado por necrosis y apoptosis del parénquima hepático.**
- 8. La infusión intraportal de una población de células madre mesenquimales intactas o del lisado celular de estas células mejora la funcionalidad hepática, incrementa la proliferación y disminuye la apoptosis en ratas tratadas con tioacetamida.**
- 9. El efecto beneficioso de las células madre mesenquimales en un modelo experimental de daño hepático agudo podría ser debido a la**

presencia de altos niveles intra-celulares de IL-6 y de los miRNA 124a y 125b.

10. Comparativamente la infusión del lisado de células madre mesenquimales en un modelo experimental de daño hepático agudo recupera la funcionalidad hepática mejor que el trasplante de células madre mesenquimales intactas.

1. TILL, J. E. & McCULLOCH, E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* **14**, 213–222 (1961).
2. Morrison, S. J. & Kimble, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **441**, 1068–1074 (2006).
3. Mountford, J. C. Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy. *Transfus. Med. Oxf. Engl.* **18**, 1–12 (2008).
4. Boiani, M. & Schöler, H. R. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 872–884 (2005).
5. Dahéron, L. *et al.* LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **22**, 770–778 (2004).
6. Pauwelyn, K. *et al.* Culture of mouse embryonic stem cells with serum but without exogenous growth factors is sufficient to generate functional hepatocyte-like cells. *Plos One* **6**, e23096 (2011).
7. Yin, Y. *et al.* AFP(+), ESC-derived cells engraft and differentiate into hepatocytes in vivo. *Stem Cells Dayt. Ohio* **20**, 338–346 (2002).
8. Gouon-Evans, V. *et al.* BMP-4 is required for hepatic specification of mouse embryonic stem cell-derived definitive endoderm. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1402–1411 (2006).
9. Takayama, K. *et al.* Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 α transduction. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **20**, 127–137 (2012).
10. Ishizaka, S. *et al.* Development of hepatocytes from ES cells after transfection with the HNF-3 β gene. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **16**, 1444–1446 (2002).
11. Duan, Y. *et al.* Differentiation and characterization of metabolically functioning hepatocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **28**, 674–686 (2010).
12. Heo, J. *et al.* Hepatic precursors derived from murine embryonic stem cells contribute to regeneration of injured liver. *Hepatology. Baltim. Md* **44**, 1478–1486 (2006).

13. Draper, J. S., Moore, H. D., Ruban, L. N., Gokhale, P. J. & Andrews, P. W. Culture and characterization of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* **13**, 325–336 (2004).
14. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
15. Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).
16. Behbahan, I. S. *et al.* New approaches in the differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells toward hepatocytes. *Stem Cell Rev.* **7**, 748–759 (2011).
17. Si-Tayeb, K. *et al.* Highly Efficient Generation of Human Hepatocyte-like Cells from Induced Pluripotent Stem Cells. *Hepatology. Baltim. Md* **51**, 297–305 (2010).
18. Rashid, S. T. *et al.* Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J. Clin. Invest.* **120**, 3127–3136 (2010).
19. Kim, K.-S. Induced pluripotent stem (iPS) cells and their future in psychiatry. *Neuropsychopharmacology* **35**, 346–348 (2010).
20. Si-Tayeb, K. *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors. *Bmc Dev. Biol.* **10**, 81 (2010).
21. Stocum, D. L. Stem cells in regenerative biology and medicine. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* **9**, 429–442 (2001).
22. Votteler, M., Kluger, P. J., Walles, H. & Schenke-Layland, K. Stem cell microenvironments--unveiling the secret of how stem cell fate is defined. *Macromol. Biosci.* **10**, 1302–1315 (2010).
23. Wilson, A. & Trumpp, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 93–106 (2006).
24. Handgretinger, R. *et al.* Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **996**, 141–151 (2003).
25. Sorrentino, B. P. Clinical strategies for expansion of haematopoietic stem cells. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 878–888 (2004).
26. Fiegel, H. C. *et al.* Liver-specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **21**, 98–104 (2003).

27. Khurana, S. & Mukhopadhyay, A. Characterization of the Potential Subpopulation of Bone Marrow Cells Involved in the Repair of Injured Liver Tissue. *Stem Cells* **25**, 1439–1447 (2007).
28. Wagers, A. J., Sherwood, R. I., Christensen, J. L. & Weissman, I. L. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* **297**, 2256–2259 (2002).
29. Camargo, F. D., Finegold, M. & Goodell, M. A. Hematopoietic myelomonocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners. *J. Clin. Invest.* **113**, 1266–1270 (2004).
30. Friedenstein, A. J. *et al.* Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol.* **2**, 83–92 (1974).
31. Saulnier, N. *et al.* Mesenchymal stromal cells multipotency and plasticity: induction toward the hepatic lineage. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **13 Suppl 1**, 71–78 (2009).
32. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B. & Middleton, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells Dayt. Ohio* **25**, 2739–2749 (2007).
33. Yi, T. & Song, S. U. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch. Pharm. Res.* **35**, 213–221 (2012).
34. Krampera, M. *et al.* Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr. Opin. Pharmacol.* **6**, 435–441 (2006).
35. Haack-Sørensen, M. *et al.* Mesenchymal Stromal Cell Phenotype is not Influenced by Confluence during Culture Expansion. *Stem Cell Rev.* (2012). doi:10.1007/s12015-012-9386-3
36. Lee, K.-D. *et al.* In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatol. Baltim. Md* **40**, 1275–1284 (2004).
37. Stock, P. *et al.* Hepatocytes derived from adult stem cells. *Transplant. Proc.* **40**, 620–623 (2008).
38. Snykers, S., De Kock, J., Tamara, V. & Rogiers, V. Hepatic differentiation of mesenchymal stem cells: in vitro strategies. *Methods Mol. Biol. Clifton Nj* **698**, 305–314 (2011).

39. Ishii, K. *et al.* Hepatic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by tetracycline-regulated hepatocyte nuclear factor 3beta. *Hepatology*. *Baltimore, Md* **48**, 597–606 (2008).
40. Smink, J. J. & Leutz, A. Instruction of mesenchymal cell fate by the transcription factor C/EBP β . *Gene* **497**, 10–17 (2012).
41. Chivu, M. *et al.* In vitro hepatic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells under differential exposure to liver-specific factors. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* **154**, 122–132 (2009).
2. Lin, N. *et al.* Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells in an alginate scaffold. *Cell Prolif.* **43**, 427–434 (2010).
43. Anjos-Afonso, F., Siapati, E. K. & Bonnet, D. In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. *J. Cell Sci.* **117**, 5655–5664 (2004).
44. Kashofer, K. & Bonnet, D. Gene therapy progress and prospects: stem cell plasticity. *Gene Ther.* **12**, 1229–1234 (2005).
45. Reyes, M. *et al.* Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J. Clin. Invest.* **109**, 337–346 (2002).
46. Jiang, Y. *et al.* Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp. Hematol.* **30**, 896–904 (2002).
47. Reyes, M. *et al.* Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* **98**, 2615–2625 (2001).
48. Ulloa-Montoya, F. *et al.* Comparative transcriptome analysis of embryonic and adult stem cells with extended and limited differentiation capacity. *Genome Biol.* **8**, R163 (2007).
49. Jacobs, S. A. *et al.* Human multipotent adult progenitor cells are non-immunogenic and exert potent immunomodulatory effects on alloreactive T cell responses. *Cell Transplant.* (2012). doi:10.3727/096368912X657369
50. Jiang, Y. *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41–49 (2002).
51. Schwartz, R. E. *et al.* Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest.* **109**, 1291–1302 (2002).

52. Eaker, S. S., Hawley, T. S., Ramezani, A. & Hawley, R. G. Detection and enrichment of hematopoietic stem cells by side population phenotype. *Methods Mol. Biol. Clifton Nj* **263**, 161–180 (2004).
53. Guo, Y., Follo, M., Geiger, K., Lübbert, M. & Engelhardt, M. Side-population cells from different precursor compartments. *J. Hematother. Stem Cell Res.* **12**, 71–82 (2003).
54. Sales-Pardo, I. *et al.* Flow cytometry of the Side Population: tips & tricks. *Cell. Oncol. Off. J. Int. Soc. Cell. Oncol.* **28**, 37–53 (2006).
55. Josefsen, D. *et al.* Side population cells in highly enriched CD34-positive cells from peripheral blood progenitor cells identify an immature subtype of hematopoietic progenitor cells but do not predict time to engraftment in patients treated with high-dose therapy. *Eur. J. Haematol.* **87**, 494–502 (2011).
56. Zhou, J. *et al.* Side population rather than CD133(+) cells distinguishes enriched tumorigenicity in hTERT-immortalized primary prostate cancer cells. *Mol. Cancer* **10**, 112 (2011).
57. Hussain, S. Z. *et al.* Side population cells derived from adult human liver generate hepatocyte-like cells in vitro. *Dig. Dis. Sci.* **50**, 1755–1763 (2005).
58. LEDUC, E. H. & WILSON, J. W. Injury to liver cells in carbon tetrachloride poisoning; histochemical changes induced by carbon tetrachloride in mouse liver protected by sulfaguanidine. *Ama Arch. Pathol.* **65**, 147–157 (1958).
59. Shinozuka, H., Lombardi, B., Sell, S. & Iammarino, R. M. Early histological and functional alterations of ethionine liver carcinogenesis in rats fed a choline-deficient diet. *Cancer Res.* **38**, 1092–1098 (1978).
60. Bird, T. G., Lorenzini, S. & Forbes, S. J. Activation of stem cells in hepatic diseases. *Cell Tissue Res.* **331**, 283–300 (2008).
61. Fellous, T. G. *et al.* Locating the stem cell niche and tracing hepatocyte lineages in human liver. *Hepatol. Baltim. Md* **49**, 1655–1663 (2009).
62. Lowes, K. N., Brennan, B. A., Yeoh, G. C. & Olynyk, J. K. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *Am. J. Pathol.* **154**, 537–541 (1999).

63. Roskams, T. A. *et al.* Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology*. *Baltimore, Md* **39**, 1739–1745 (2004).
64. Petersen, B. E. *et al.* Mouse A6-positive hepatic oval cells also express several hematopoietic stem cell markers. *Hepatology*. *Baltimore, Md* **37**, 632–640 (2003).
65. Shimano, K. *et al.* Hepatic Oval Cells Have the Side Population Phenotype Defined by Expression of ATP-Binding Cassette Transporter ABCG2/BCRP1. *Am. J. Pathol.* **163**, 3–9 (2003).
66. Crosby, H. A., Kelly, D. A. & Strain, A. J. Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium. *Gastroenterology* **120**, 534–544 (2001).
67. Nierhoff, D., Ogawa, A., Oertel, M., Chen, Y.-Q. & Shafritz, D. A. Purification and characterization of mouse fetal liver epithelial cells with high in vivo repopulation capacity. *Hepatology*. *Baltimore, Md* **42**, 130–139 (2005)
68. Ling, L., Nurcombe, V. & Cool, S. M. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene* **433**, 1–7 (2009).
69. Ling, L., Nurcombe, V. & Cool, S. M. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene* **433**, 1–7 (2009).
70. Ke, Z. *et al.* Down-regulation of Wnt signaling could promote bone marrow-derived mesenchymal stem cells to differentiate into hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **367**, 342–348 (2008).
71. Yoshida, Y. *et al.* A role of Wnt/beta-catenin signals in hepatic fate specification of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **293**, G1089–1098 (2007).
72. Katoh, M. & Katoh, M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **13**, 4042–4045 (2007).
73. So, J., Martin, B. L., Kimelman, D. & Shin, D. Wnt/ β -catenin signaling cell-autonomously converts non-hepatic endodermal cells to a liver fate. *Biol. Open* **2**, 30–36 (2013).
74. Liu, H. *et al.* Wnt signaling regulates hepatic metabolism. *Sci. Signal.* **4**, ra6 (2011).
75. Sánchez, A. & Fabregat, I. Growth factor- and cytokine-driven pathways governing liver stemness and differentiation. *World J. Gastroenterol. Wjg* **16**, 5148–5161 (2010).

76. Nejak-Bowen, K. N. & Monga, S. P. S. Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: sorting the good from the bad. *Semin. Cancer Biol.* **21**, 44–58 (2011).
77. Yang, Y. Wnt signaling in development and disease. *Cell Biosci.* **2**, 14 (2012).
78. Anna, C. H., Iida, M., Sills, R. C. & Devereux, T. R. Expression of potential beta-catenin targets, cyclin D1, c-Jun, c-Myc, E-cadherin, and EGFR in chemically induced hepatocellular neoplasms from B6C3F1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **190**, 135–145 (2003).
79. Takemaru, K. I. & Moon, R. T. The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J. Cell Biol.* **149**, 249–254 (2000).
80. Sun, Y. *et al.* Regulation of beta -catenin transformation by the p300 transcriptional coactivator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 12613–12618 (2000).
81. Nelson, W. J. & Nusse, R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* **303**, 1483–1487 (2004).
82. Li, Y. *et al.* Dkk1 stabilizes Wnt co-receptor LRP6: implication for Wnt ligand-induced LRP6 down-regulation. *Plos One* **5**, e11014 (2010).
83. Cselenyi, C. S. & Lee, E. Context-dependent activation or inhibition of Wnt-beta-catenin signaling by Kremen. *Sci. Signal.* **1**, pe10 (2008).
84. Jones, S. E. & Jomary, C. Secreted Frizzled-related proteins: searching for relationships and patterns. *Bioessays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **24**, 811–820 (2002).
85. Chiang, D. Y. *et al.* Focal Gains of Vascular Endothelial Growth Factor A and Molecular Classification of Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res.* **68**, 6779–6788 (2008).
86. Nejak-Bowen, K. N. & Monga, S. P. S. Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: sorting the good from the bad. *Semin. Cancer Biol.* **21**, 44–58 (2011).
87. Monga, S. P. S. Role of Wnt/ β -catenin signaling in liver metabolism and cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 1021–1029 (2011).

88. Yamashita, T., Budhu, A., Forgues, M. & Wang, X. W. Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* **67**, 10831–10839 (2007).
89. Fodde, R. & Brabletz, T. Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**, 150–158 (2007).
90. Zulehner, G. *et al.* Nuclear beta-catenin induces an early liver progenitor phenotype in hepatocellular carcinoma and promotes tumor recurrence. *Am. J. Pathol.* **176**, 472–481 (2010).
91. Korbut, E., Ptak-Belowska, A. & Brzozowski, T. Mechanisms promoting physiological cells progression into tumorigenesis. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* **63**, 565–570 (2012).
92. Zhang, N. *et al.* Characterization of a stem-like population in hepatocellular carcinoma MHCC97 cells. *Oncol. Rep.* **23**, 827–831 (2010).
93. Wu, X.-Z. Origin of cancer stem cells: the role of self-renewal and differentiation. *Ann. Surg. Oncol.* **15**, 407–414 (2008).
94. Burkert, J., Wright, N. A. & Alison, M. R. Stem cells and cancer: an intimate relationship. *J. Pathol.* **209**, 287–297 (2006).
95. Armengol, C., Cairo, S., Fabre, M. & Buendia, M. A. Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: the hepatoblastoma model. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**, 265–270 (2011).
96. Marquardt, J. U., Galle, P. R. & Teufel, A. Molecular diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma (HCC): an emerging field for advanced technologies. *J. Hepatol.* **56**, 267–275 (2012).
97. Darini, C. Y. *et al.* Self-renewal gene tracking to identify tumour-initiating cells associated with metastatic potential. *Oncogene* **31**, 2438–2449 (2012).
98. Ma, S. *et al.* Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* **132**, 2542–2556 (2007).
99. Tomuleasa, C. *et al.* Isolation and characterization of hepatic cancer cells with stem-like properties from hepatocellular carcinoma. *J. Gastrointest. Liver Dis. Jgld* **19**, 61–67 (2010).
100. Michalopoulos, G. K. & DeFrances, M. C. Liver regeneration. *Science* **276**, 60–66 (1997).
101. Lapidot, T., Dar, A. & Kollet, O. How do stem cells find their way home? *Blood* **106**, 1901–1910 (2005).

102. Dalakas, E., Newsome, P. N., Harrison, D. J. & Plevris, J. N. Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **19**, 1225–1231 (2005).
103. Petit, I. *et al.* G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat. Immunol.* **3**, 687–694 (2002).
104. Kawai, K. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 contributes to the mobilization of bone marrow cells in the injured liver. *Cell Transplant.* **21**, 453–464 (2012).
105. Papayannopoulou, T. Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood* **103**, 1580–1585 (2004).
106. Kollet, O. *et al.* HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J. Clin. Invest.* **112**, 160–169 (2003).
107. Lei, Y. *et al.* G-CSF enhanced SDF-1 gradient between bone marrow and liver associated with mobilization of peripheral blood CD34+ cells in rats with acute liver failure. *Dig. Dis. Sci.* **55**, 285–291 (2010).
108. Jin, S.-Z. *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor enhances bone marrow mononuclear cell homing to the liver in a mouse model of acute hepatic injury. *Dig. Dis. Sci.* **55**, 2805–2813 (2010).
109. Masson, S., Harrison, D. J., Plevris, J. N. & Newsome, P. N. Potential of hematopoietic stem cell therapy in hepatology: a critical review. *Stem Cells Dayt. Ohio* **22**, 897–907 (2004).
110. Garg, V. *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes CD34(+) cells and improves survival of patients with acute-on-chronic liver failure. *Gastroenterology* **142**, 505–512.e1 (2012).
111. Levicar, N. *et al.* Long-term clinical results of autologous infusion of mobilized adult bone marrow derived CD34+ cells in patients with chronic liver disease. *Cell Prolif.* **41 Suppl 1**, 115–125 (2008).
112. Pai, M. *et al.* Autologous infusion of expanded mobilized adult bone marrow-derived CD34+ cells into patients with alcoholic liver cirrhosis. *Am. J. Gastroenterol.* **103**, 1952–1958 (2008).
113. Spahr, L. *et al.* Granulocyte-colony stimulating factor induces proliferation of hepatic progenitors in alcoholic steatohepatitis: a randomized trial. *Hepatol. Baltim. Md* **48**, 221–229 (2008).

114. Liu, F. *et al.* Hematopoietic stem cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor partly contribute to liver graft regeneration after partial orthotopic liver transplantation. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* **12**, 1129–1137 (2006).
115. Gehling, U. M. *et al.* Partial hepatectomy induces mobilization of a unique population of haematopoietic progenitor cells in human healthy liver donors. *J. Hepatol.* **43**, 845–853 (2005).
116. Petersen, B. E. *et al.* Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* **284**, 1168–1170 (1999).
117. Stutchfield, B. M., Forbes, S. J. & Wigmore, S. J. Prospects for stem cell transplantation in the treatment of hepatic disease. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* **16**, 827–836 (2010).
118. Sakaida, I. *et al.* Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology* **40**, 1304–1311 (2004).
119. Terai, S. *et al.* Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells Dayt. Ohio* **24**, 2292–2298 (2006).
120. Lagasse, E. *et al.* Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat. Med.* **6**, 1229–1234 (2000)
121. Takami, T., Terai, S. & Sakaida, I. Advanced therapies using autologous bone marrow cells for chronic liver disease. *Discov. Med.* **14**, 7–12 (2012).
122. Am Esch, J. S. *et al.* Portal Application of Autologous CD133+ Bone Marrow Cells to the Liver: A Novel Concept to Support Hepatic Regeneration. *Stem Cells* **23**, 463–470 (2005).
123. Fürst, G. *et al.* Portal Vein Embolization and Autologous CD133+ Bone Marrow Stem Cells for Liver Regeneration: Initial Experience¹. *Radiology* **243**, 171–179 (2007).
124. Salama, H. *et al.* Autologous CD34+ and CD133+ stem cells transplantation in patients with end stage liver disease. *World J. Gastroenterol. Wjg* **16**, 5297–5305 (2010).
125. Mohamadnejad, M. *et al.* Phase 1 human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis. *World J. Gastroenterol. Wjg* **13**, 3359–3363 (2007).

126. Cho, K.-A. *et al.* Mesenchymal stem cells showed the highest potential for the regeneration of injured liver tissue compared with other subpopulations of the bone marrow. *Cell Biol. Int.* **33**, 772–777 (2009).
127. Yagi, H. *et al.* Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant.* **19**, 667–679 (2010).
128. Popp, F. C. *et al.* Mesenchymal stem cells as immunomodulators after liver transplantation. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* **15**, 1192–1198 (2009).
129. Zhao, W. *et al.* Intravenous injection of mesenchymal stem cells is effective in treating liver fibrosis. *World J. Gastroenterol. Wjg* **18**, 1048–1058 (2012).
130. Rabani, V. *et al.* Mesenchymal stem cell infusion therapy in a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model affects matrix metalloproteinase expression. *Cell Biol. Int.* **34**, 601–605 (2010).
131. Cho, K.-A., Woo, S.-Y., Seoh, J.-Y., Han, H.-S. & Ryu, K.-H. Mesenchymal stem cells restore CCl₄-induced liver injury by an antioxidative process. *Cell Biol. Int.* (2012). doi:10.1042/CBI20110634
132. Popp, F. C. *et al.* Safety and feasibility of third-party multipotent adult progenitor cells for immunomodulation therapy after liver transplantation--a phase I study (MISOT-I). *J. Transl. Med.* **9**, 124 (2011).
133. Abe, S., Lauby, G., Boyer, C., Rennard, S. I. & Sharp, J. G. Transplanted BM and BM side population cells contribute progeny to the lung and liver in irradiated mice. *Cytotherapy* **5**, 523–533 (2003).
134. Wulf, G. G., Luo, K.-L., Jackson, K. A., Brenner, M. K. & Goodell, M. A. Cells of the hepatic side population contribute to liver regeneration and can be replenished with bone marrow stem cells. *Haematologica* **88**, 368–378 (2003).
135. Körbling, M. *et al.* Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N. Engl. J. Med.* **346**, 738–746 (2002).
136. Theise, N. D. *et al.* Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* **31**, 235–240 (2000).

137. Terada, N. *et al.* Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* **416**, 542–545 (2002).
138. Quintana-Bustamante, O. *et al.* Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes via in vivo cell fusion. *Hepatology. Baltim. Md* **43**, 108–116 (2006).
139. Vassilopoulos, G. & Russell, D. W. Cell fusion: an alternative to stem cell plasticity and its therapeutic implications. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 480–485 (2003).
140. Menthena, A. *et al.* Bone marrow progenitors are not the source of expanding oval cells in injured liver. *Stem Cells Dayt. Ohio* **22**, 1049–1061 (2004).
141. Sato, Y. *et al.* Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* **106**, 756–763 (2005).
142. Jang, Y.-Y., Collector, M. I., Baylin, S. B., Diehl, A. M. & Sharkis, S. J. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat. Cell Biol.* **6**, 532–539 (2004).
143. Saji, Y. *et al.* Basic fibroblast growth factor promotes the trans-differentiation of mouse bone marrow cells into hepatic lineage cells via multiple liver-enriched transcription factors. *J. Hepatology* **41**, 545–550 (2004).
144. Harris, R. G. *et al.* Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science* **305**, 90–93 (2004).
145. Houlihan, D. D. & Newsome, P. N. Critical review of clinical trials of bone marrow stem cells in liver disease. *Gastroenterology* **135**, 438–450 (2008).
146. Wagers, A. J. & Weissman, I. L. Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell* **116**, 639–648 (2004).
147. KUO, T. K. *et al.* Stem Cell Therapy for Liver Disease: Parameters Governing the Success of Using Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Gastroenterology* **134**, 2111–2121.e3 (2008).
148. Parekkadan, B. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *Plos One* **2**, e941 (2007).
149. Van Poll, D. *et al.* Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology. Baltim. Md* **47**, 1634–1643 (2008).

150. Du, Z. *et al.* Mesenchymal stem cell-conditioned medium reduces liver injury and enhances regeneration in reduced-size rat liver transplantation. *J. Surg. Res.* (2013). doi:10.1016/j.jss.2013.02.009
151. Fouraschen, S. M. G. *et al.* Secreted factors of human liver-derived mesenchymal stem cells promote liver regeneration early after partial hepatectomy. *Stem Cells Dev.* **21**, 2410–2419 (2012).
152. Sánchez, A., Factor, V. M., Schroeder, I. S., Nagy, P. & Thorgeirsson, S. S. Activation of NF- κ B and STAT3 in rat oval cells during 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy-induced liver regeneration. *Hepatology* **39**, 376–385 (2004).
153. Ping, C. *et al.* The phosphoinositide 3-kinase/Akt-signal pathway mediates proliferation and secretory function of hepatic sinusoidal endothelial cells in rats after partial hepatectomy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 887–893 (2006).
154. Bansal, M. B. *et al.* Interleukin-6 protects hepatocytes from CCl₄-mediated necrosis and apoptosis in mice by reducing MMP-2 expression. *J. Hepatol.* **42**, 548–556 (2005).
155. Tschaharganeh, D. F. *et al.* Glycoprotein 130-dependent pathways in host hepatocytes are important for liver repopulation in mice. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* **16**, 23–32 (2010).
156. Lam, S. P. *et al.* Activation of interleukin-6-induced glycoprotein 130/signal transducer and activator of transcription 3 pathway in mesenchymal stem cells enhances hepatic differentiation, proliferation, and liver regeneration. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* **16**, 1195–1206 (2010)
157. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156–159 (1987).
158. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods San Diego Calif* **25**, 402–408 (2001).
159. Zhang, L., Ye, J.-S., Decot, V., Stoltz, J.-F. & de Isla, N. Research on stem cells as candidates to be differentiated into hepatocytes. *Biomed. Mater. Eng.* **22**, 105–111 (2012).

160. Saulnier, N. *et al.* Mesenchymal stromal cells multipotency and plasticity: induction toward the hepatic lineage. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **13 Suppl 1**, 71–78 (2009).
161. Dong, X.-J., Zhang, H., Pan, R.-L., Xiang, L.-X. & Shao, J.-Z. Identification of cytokines involved in hepatic differentiation of mBM-MSCs under liver-injury conditions. *World J. Gastroenterol. Wjg* **16**, 3267–3278 (2010).
162. Blank, U., Karlsson, G. & Karlsson, S. Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood* **111**, 492–503 (2008).
163. Thompson, M. D. & Monga, S. P. S. WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. *Hepatol. Baltim. Md* **45**, 1298–1305 (2007).
164. Liu, Z., Ma, Y., Yang, J. & Qin, H. Upregulated and downregulated proteins in hepatocellular carcinoma: a systematic review of proteomic profiling studies. *Omics J. Integr. Biol.* **15**, 61–71 (2011).
165. Chen, X., Fu, S., Chen, F., Chen, H. & Chen, Z. Identification of tumor-associated antigens in human hepatocellular carcinoma by autoantibodies. *Oncol. Rep.* **20**, 979–985 (2008).
166. Chafey, P. *et al.* Proteomic analysis of beta-catenin activation in mouse liver by DIGE analysis identifies glucose metabolism as a new target of the Wnt pathway. *Proteomics* **9**, 3889–3900 (2009).
167. Beaujouin, M. & Liaudet-Coopman, E. Cathepsin D overexpressed by cancer cells can enhance apoptosis-dependent chemo-sensitivity independently of its catalytic activity. *Adv. Exp. Med. Biol.* **617**, 453–461 (2008).
168. Li, L., Chen, S., Yu, C., Li, Y. & Wang, S. Identification of hepatocellular-carcinoma-associated antigens and autoantibodies by serological proteome analysis combined with protein microarray. *J. Proteome Res.* **7**, 611–620 (2008).
169. Fantin, V. R. & Leder, P. Mitochondriotoxic compounds for cancer therapy. *Oncogene* **25**, 4787–4797 (2006).
170. Shen, H. *et al.* Expressed proteome analysis of human hepatocellular carcinoma in nude mice (LCI-D20) with high metastasis potential. *Proteomics* **6**, 528–537 (2006).
171. Liang, Y. *et al.* Increased hepatic and decreased urinary metallothionein in rats after cessation of oral cadmium exposure. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **106**, 348–355 (2010).

172. Chen, S. *et al.* Oligo-microarray analysis reveals the role of cyclophilin A in drug resistance. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **61**, 459–469 (2008).
173. Bharadwaj, S. & Prasad, G. L. Tropomyosin-1, a novel suppressor of cellular transformation is downregulated by promoter methylation in cancer cells. *Cancer Lett.* **183**, 205–213 (2002).
174. Hirasawa, Y. *et al.* Methylation status of genes upregulated by demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine in hepatocellular carcinoma. *Oncology* **71**, 77–85 (2006).
175. Fan, H. *et al.* Comparative proteomics and molecular mechanical analysis in CDA-II induced therapy of LCI-D20 hepatocellular carcinoma model. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **135**, 591–602 (2009).
176. Martin, J. & Dufour, J.-F. Tumor suppressor and hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol. Wjg* **14**, 1720–1733 (2008).
177. Ji, J. & Wang, X. W. Clinical implications of cancer stem cell biology in hepatocellular carcinoma. *Semin. Oncol.* **39**, 461–472 (2012).
178. Haraguchi, N. *et al.* CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *J. Clin. Invest.* **120**, 3326–3339 (2010).
179. Petrovic, N. *et al.* CD13/APN regulates endothelial invasion and filopodia formation. *Blood* **110**, 142–150 (2007).
180. Fu, B.-H., Wu, Z.-Z. & Qin, J. Effects of integrins on laminin chemotaxis by hepatocellular carcinoma cells. *Mol. Biol. Rep.* **37**, 1665–1670 (2010).
181. Huang, J. *et al.* Prognostic significance and potential therapeutic target of VEGFR2 in hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Pathol.* **64**, 343–348 (2011).
182. Piao, L. S. *et al.* CD133+ liver cancer stem cells modulate radioresistance in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* **315**, 129–137 (2012).
183. Serakinci, N. *et al.* Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene* **23**, 5095–5098 (2004).
184. Voog, J. & Jones, D. L. Stem Cells and the Niche: A Dynamic Duo. *Cell Stem Cell* **6**, 103–115 (2010).
185. Alison, M. R., Lovell, M. J., Direkze, N. C., Wright, N. A. & Poulson, R. Stem cell plasticity and tumour formation. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **42**, 1247–1256 (2006).

186. Shen, Y. & Cao, D. Hepatocellular carcinoma stem cells: origins and roles in hepatocarcinogenesis and disease progression. *Front. Biosci. Elite Ed.* **4**, 1157–1169 (2012).
187. Cao, L. *et al.* Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. *Bmc Gastroenterol.* **11**, 71 (2011).
188. Michalopoulos, G. K. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am. J. Pathol.* **176**, 2–13 (2010).
189. Viebahn, C. S. & Yeoh, G. C. T. What fires prometheus? The link between inflammation and regeneration following chronic liver injury. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 855–873 (2008).
190. Almeida-Porada, G., Zanjani, E. D. & Porada, C. D. Bone marrow stem cells and liver regeneration. *Exp. Hematol.* **38**, 574–580 (2010).
191. Dalakas, E. *et al.* Bone marrow stem cells contribute to alcohol liver fibrosis in humans. *Stem Cells Dev.* **19**, 1417–1425 (2010).
192. Cantz, T. *et al.* Reevaluation of bone marrow-derived cells as a source for hepatocyte regeneration. *Cell Transplant.* **13**, 659–666 (2004).
193. Lorenzini, S. *et al.* Stem cell mobilization and collection in patients with liver cirrhosis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **27**, 932–939 (2008).
194. Fujii, H. *et al.* Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J. Hepatol.* **36**, 653–659 (2002).
195. De Silvestro, G. *et al.* Mobilization of peripheral blood hematopoietic stem cells following liver resection surgery. *Hepatology.* **51**, 805–810 (2004).
196. Zocco, M. A. *et al.* CD133+ stem cell mobilization after partial hepatectomy depends on resection extent and underlying disease. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver* **43**, 147–154 (2011).
197. Menegazzo, M. *et al.* Reduced mobilisation of hematopoietic stem cells after hepatic resection for malignant liver disease. *Pathol. Oncol. Res. Por* **14**, 381–385 (2008).
198. Lemoli, R. M. *et al.* Mobilization of bone marrow-derived hematopoietic and endothelial stem cells after orthotopic liver transplantation and liver resection. *Stem Cells Dayt. Ohio* **24**, 2817–2825 (2006).

199. Di Campli, C. *et al.* No evidence of hematopoietic stem cell mobilization in patients submitted to hepatectomy or in patients with acute on chronic liver failure. *Transplant. Proc.* **37**, 2563–2566 (2005).
200. Pilat, N. *et al.* No Evidence for Recipient-Derived Hepatocytes in Serial Biopsies of Sex-Mismatched Liver Transplants. *Transplantation* (2012). doi:10.1097/TP.0b013e318269e68d
201. Terada, R. *et al.* Stromal cell-derived factor-1 from biliary epithelial cells recruits CXCR4-positive cells: implications for inflammatory liver diseases. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **83**, 665–672 (2003).
202. Lau, T. T. & Wang, D.-A. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1): homing factor for engineered regenerative medicine. *Expert Opin. Biol. Ther.* **11**, 189–197 (2011).
203. Lapidot, T., Dar, A. & Kollet, O. How do stem cells find their way home? *Blood* **106**, 1901–1910 (2005).
204. Kyriakou, C., Rabin, N., Pizzey, A., Nathwani, A. & Yong, K. Factors that influence short-term homing of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a xenogeneic animal model. *Haematologica* **93**, 1457–1465 (2008).
205. Nervi, B., Link, D. C. & DiPersio, J. F. Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *J. Cell. Biochem.* **99**, 690–705 (2006).
206. Tong-Jing, X. *et al.* Mechanism and Efficacy of Mobilization of Granulocyte Colony-Stimulating Factor in the Treatment of Chronic Hepatic Failure. *Hepatogastroenterology.* **60**, (2012).
207. Baccarani, U. *et al.* Implication of stem cell factor in human liver regeneration after transplantation and resection. *Growth Factors Chur Switz.* **24**, 107–110 (2006).
208. Cantz, T., Manns, M. P. & Ott, M. Stem cells in liver regeneration and therapy. *Cell Tissue Res.* **331**, 271–282 (2008).
209. Satija, N. K. *et al.* Mesenchymal stem cell-based therapy: a new paradigm in regenerative medicine. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 4385–4402 (2009).
210. Cho, K.-A. *et al.* Mesenchymal stem cells showed the highest potential for the regeneration of injured liver tissue compared with other subpopulations of the bone marrow. *Cell Biol. Int.* **33**, 772–777 (2009).

211. Li, J. *et al.* Immediate intraportal transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cells prevents death from fulminant hepatic failure in pigs. *Hepatology*. *Baltimore, Md* **56**, 1044–1052 (2012).
212. Chang, Y.-J. *et al.* Mesenchymal stem cells facilitate recovery from chemically induced liver damage and decrease liver fibrosis. *Life Sci.* **85**, 517–525 (2009).
213. Pulavendran, S., Vignesh, J. & Rose, C. Differential anti-inflammatory and anti-fibrotic activity of transplanted mesenchymal vs. hematopoietic stem cells in carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *Int. Immunopharmacol.* **10**, 513–519 (2010).
214. Hwang, S. *et al.* Hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a rat model of thioacetamide-induced liver cirrhosis. *Cell Biol. Int.* **36**, 279–288 (2012).
215. Popp, F. C. *et al.* No contribution of multipotent mesenchymal stromal cells to liver regeneration in a rat model of prolonged hepatic injury. *Stem Cells Dayt. Ohio* **25**, 639–645 (2007).
216. Di Bonzo, L. V. *et al.* Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential. *Gut* **57**, 223–231 (2008).
217. Otto, W. R. & Wright, N. A. Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic. *Fibrogenesis Tissue Repair* **4**, 20 (2011).
218. Deans, R. J. & Moseley, A. B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp. Hematol.* **28**, 875–884 (2000).
219. Caplan, A. I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J. Cell. Physiol.* **213**, 341–347 (2007).
220. Puglisi, M. A. *et al.* Therapeutic implications of mesenchymal stem cells in liver injury. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 860578 (2011).
221. Pan, G. *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia/reperfusion injuries via inactivation of the MEK/ERK signaling pathway in rats. *J. Surg. Res.* **178**, 935–948 (2012).

222. Lam, S. P. *et al.* Activation of interleukin-6-induced glycoprotein 130/signal transducer and activator of transcription 3 pathway in mesenchymal stem cells enhances hepatic differentiation, proliferation, and liver regeneration. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* **16**, 1195–1206 (2010).
223. Haga, S. *et al.* The survival pathways phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)/phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)/Akt modulate liver regeneration through hepatocyte size rather than proliferation. *Hepatology. Baltim. Md* **49**, 204–214 (2009).
224. Sánchez, A., Factor, V. M., Schroeder, I. S., Nagy, P. & Thorgeirsson, S. S. Activation of NF- κ B and STAT3 in rat oval cells during 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy-induced liver regeneration. *Hepatology* **39**, 376–385 (2004).
225. Jenhani, F. *et al.* Human cytokine expression profile in various conditioned media for in vitro expansion bone marrow and umbilical cord blood immunophenotyped mesenchymal stem cells. *Transplant. Proc.* **43**, 639–643 (2011).
226. Kim, S.-W. *et al.* MicroRNAs miR-125a and miR-125b constitutively activate the NF- κ B pathway by targeting the tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 7865–7870 (2012).
227. Tan, G., Niu, J., Shi, Y., Ouyang, H. & Wu, Z.-H. NF- κ B-dependent microRNA-125b up-regulation promotes cell survival by targeting p38 α upon ultraviolet radiation. *J. Biol. Chem.* **287**, 33036–33047 (2012).

Differential Bone Marrow Hematopoietic Stem Cells Mobilization in Hepatectomized Patients

Carmen Herencia · Antonio Rodríguez-Ariza · Antonio Canalejo · Álvaro Naranjo ·
F. Javier Briceño · Pedro López-Cillero · Manuel De la Mata ·
Juan R. Muñoz-Castañeda

Received: 27 February 2011 / Accepted: 5 April 2011
© 2011 The Society for Surgery of the Alimentary Tract

Abstract

Background The involvement of bone marrow hematopoietic stem cells (BMHSC) mobilization during liver regeneration from hepatectomized patients is under debate. The main aim of this study was to investigate the role of BMHSC mobilization after hepatic resection in 33 patients with liver disease.

Methods and Results Mobilization of CD34⁺ BMHSC after 72 h of surgery was found in peripheral blood of some, but not all, of the hepatectomized patients. These CD34⁺ cells co-expressed other stem cells markers. The patients without BMHSC mobilization showed high levels of circulating and liver tissue BMHSC (CD34⁺ cells) previous to surgery. Therefore, two types of patients: “mobilizers” and “non-mobilizers” were distinguished based on the values of CD34⁺ cells before and after surgery. Changes in cytokines involved in the hepatic regeneration (HGF and TGF-β), and in BMHSC mobilization process (SCF, SDF-1, IL-12, or MMP-2), were detected in both groups. In addition, a higher activation previous to surgery of the SDF-1/CXCR4 axis in liver tissue was observed in non mobilizers patients compared to mobilizer patients.

Conclusion BMHSC mobilization seems to be associated with variations in the levels of cytokines and proteolytic enzymes involved in hepatic regeneration and bone marrow matrix degradation. Hepatectomy may be an insufficient stimulus for BMHSC mobilization. The pre-hepatectomy higher levels CD34⁺ cells in peripheral blood and liver, associated to the activation of hepatic SDF-1/CXCR4 axis, suggest a BMHSC mobilization process previous to surgery in non mobilizer patients.

Keywords Bone marrow hematopoietic stem cells ·
Hepatic regeneration · Mobilization · SDF-1/CXCR4- axis

Introduction

Liver regeneration after partial hepatectomy is a very complex and well-orchestrated phenomenon associated with signaling

casades involving growth factors, cytokines, chemokines, matrix remodeling, and several feedbacks stimulating and inhibitory cell growth-related signals.^{1,2} During this process, the source of new hepatocytes remains as a key unanswered question.³ Hepatocytes themselves have been proposed as the main cells involved in this hepatic regeneration.⁴ Many studies have described the capability of these cells to modulate the final hepatic mass after an orthotopic liver

C. Herencia · A. Rodríguez-Ariza · M. De la Mata ·
J. R. Muñoz-Castañeda
Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba,
(IMIBIC), Hospital Universitario Reina Sofía,
Córdoba, Spain

A. Canalejo
Departamento de Biología Ambiental y Salud Pública,
Universidad de Huelva,
Huelva, Spain

Á. Naranjo · F. J. Briceño · P. López-Cillero
Servicio de Cirugía, Hospital Universitario Reina Sofía,
Córdoba, Spain

F. J. Briceño · P. López-Cillero · M. De la Mata
Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades
Hepáticas y Digestivas (Ciberehd),
Madrid, Spain

J. R. Muñoz-Castañeda (✉)
Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba,
(IMIBIC), Hospital Universitario Reina Sofía,
Avda. Menéndez-Pidal s/n.,
Córdoba, Spain 14004
e-mail: juanr.munoz.exts@juntadeandalucia.es

transplant or hepatectomy.⁵ However, under specific conditions of liver damage, these hepatocytes lose substantially the capability to regenerate the liver.⁶ In these circumstances, other types of cells, such as bone marrow hematopoietic stem cells (BMHSC) or hepatic progenitors cells contribute to hepatic regeneration,^{3,6,7} serving as an alternative source of hepatocytes in damaged livers.^{8,9} Bone marrow has a heterogeneous population of stem and progenitor cells, which have the capacity to differentiate into hepatocytes. These cells might participate in hepatic regeneration after hepatectomy through a BMHSC mobilization process.

In renal and cardiac injury models, it has been reported that BMHSC are mobilized from the bone marrow to the bloodstream with destination to the damaged organ.^{10,11} In relation to hepatectomy, some studies have shown an involvement of BMHSC in hepatic regeneration after hepatic resection or chronic hepatic diseases^{12,13} while others did not.^{14,15} Therefore, the mobilization of stem cells from bone marrow to bloodstream after hepatectomy is unclear.

Based on the hypothesis that BMSHC may contribute to liver repair after hepatectomy, and that these cells must be present in the circulation before reaching the liver, we have investigated the number and type of CD34⁺ cells in peripheral blood from hepatectomized patients. Once the CD34⁺ hematopoietic stem cells are released into peripheral blood, these cells migrate and anchor to the liver in response to stress signals, to changes in the levels of cytokines and/or after activation of SDF-1/CXCR4 axis.¹⁶ SDF-1 was the first chemoattractant reported for human CD34⁺ hematopoietic stem cells and SDF-1/CXCR4 interaction regulates the homing and repopulation of stem cells into injured organ.¹⁷ An altered response to SDF-1 may be associated with CD34⁺ progenitor cells mobilization.¹⁸

In this study, we analyzed the relationships between BMHSC mobilization, cytokines associated to hepatic regeneration and bone marrow matrix degradation, and the activation of the SDF-1/CXCR4 axis in hepatectomized patients.

Material and Methods

Patients

The study included 33 consecutive patients admitted to the hospital for medically indicated hepatectomy. Hepatic biopsies (during the surgery) and blood samples before (0 h) and 72 h after surgery were obtained from all the patients. All patients underwent anesthesia and laparotomy. The clinical characteristics of the patients included in this study are included in Table 1. The study protocol was

approved by the local ethics committee of the Reina Sofia University Hospital and conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all patients included in the study.

Hepatectomy Procedure

Liver anatomy terms used are based on Couinaud's classification. Liver parenchymal transection was accomplished using an ultrasonic dissector. Intermittent inflow occlusion was applied when necessary. The cut surface of the liver was secured with TissueLink (TissueLink Medical Inc, Dover, NH, USA), electrocautery, and clips. Vessels more than 2 mm in diameter were ligated or sutured with 4/5-0 stitches. At the end of hepatectomy, the raw surface of the liver was carefully assessed to rule out bleeding or bile leakage.

Flow Cytometry Analysis

The presence of CD34⁺ cells, at 0 and 72 h after of surgery, was quantified in peripheral blood using flow cytometry. The immunophenotype of the CD34⁺ circulating cells in peripheral blood was also evaluated by conventional dual color immunofluorescence using fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated CD34 and phycoerythrin (PE)-conjugated monoclonal antibodies: anti-CD45 from Sigma Aldrich (Sigma, Saint Louis, MI, USA), anti-CD90 and anti- CXCR4 from Becton Dickinson (Becton, Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and anti-CD117 and anti- CD133 from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). To this end, 5×10^4 cells were acquired by flow cytometry (FACSCalibur; Becton Dickinson) excluding cellular debris in a side scatter/forward scatter dot plot and analyzed using CellQuest software. The percentage of positive cells was calculated after subtraction of background fluorescence as measured with the appropriate isotype control mouse PE-IgG2a and mouse FITC-IgG1 (Miltenyi Biotec).

Cytokine Levels Determination

Serum and plasma levels of cytokines, stem cell factor (SCF), stromal derived factor 1 (SDF-1), interleukine 12 (IL-12), hepatocyte growth factor (HGF), transforming growth factor- β (TGF- β), and MMP-2 protease were measured at 0 and 72 h after surgery by using high-sensitivity ELISA. TGF- β and IL-12 kits were purchased from BenderMedsystems (Vienna, Austria), SCF, SDF-1, and MMP-2 kits were purchased from R&D Systems (Wiesbaden, Germany), and HGF kit was purchased from Biosource International (Camarillo, CA).

Table 1 Characteristics of the patients included in the study

	<i>n</i>	Gender	Age	Mob.	%Hx	% CD34 cells 0 h	Cirrhosis	Mob. Patients in the group (%)
Primary tumors								
HCC	1	Female	63	+	20	15.08	–	14
	2	Male	71	–	25	13.80	–	
	3	Male	61	–	25	4.16	+	
	4	Male	57	–	2	9.03	+	
	5	Female	58	–	25	34.50	+	
	6	Male	63	–	20	15.15	+	
	7	Male	74	–	10	10.13	+	
CHOL	1	Male	72	+	60	2.18	–	40
	2	Male	57	+	30	10.00	–	
	3	Male	76	–	60	13.19	–	
	4	Male	71	–	60	19.42	–	
	5	Female	50	–	35	10.47	–	
Gallbladder cancer	1	Female	72	+	15	5.40	–	67
	2	Female	66	+	15	9.65	–	
	3	Female	77	–	15	25.5	–	
Secondary tumors								
Metastasis	1	Female	66	+	15	2.62	–	40
	2	Male	70	+	10	4.89	–	
	3	Female	63	+	30	10.56	–	
	4	Female	48	+	60	11.73	–	
	5	Female	69	–	60	19.07	–	
	6	Female	60	–	30	15.73	–	
	7	Male	40	–	25	14.95	–	
	8	Female	41	–	15	28.08	–	
	9	Female	28	–	15	20.37	–	
	10	Female	70	–	30	23.96	–	
Benign tumors								
FNH Adenoma FNH Hemangioma	1	Male	27	+	60	3.8	–	50
	2	Femal	76	+	10	1.62	–	
	4	Female	13	–	30	8.74	–	
	5	Female	56	–	10	11.76	–	
	No tumoral lesions							
Hydatic abscess Hydatic abscess Hydatic abscess Caroli Hematoma	1	Male	76	+	60	6.09	–	60
	2	Female	46	+	60	6.18	–	
	3	Male	43	+	20	12.1	–	
	4	Male	65	–	60	13.33	–	
	5	Male	52	–	60	13.53	–	

Immunohistochemical Analysis

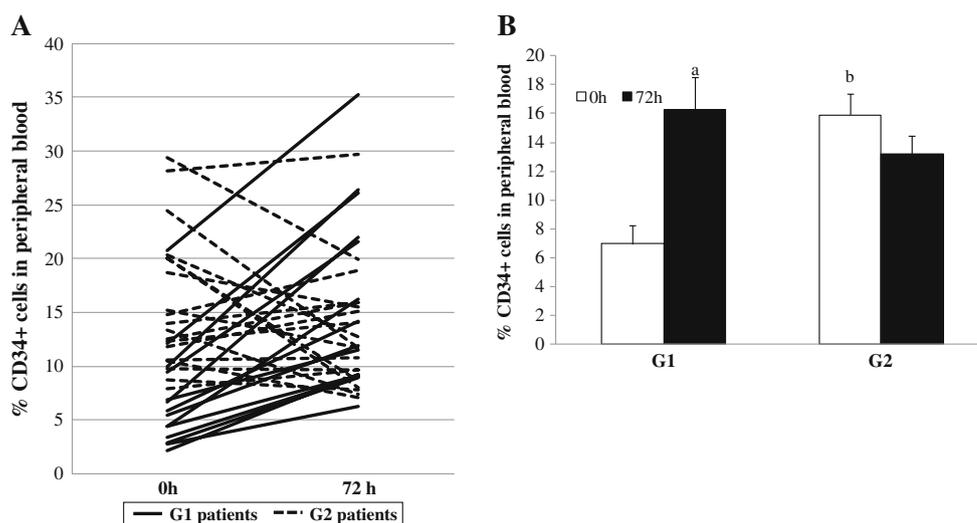
Liver samples obtained from biopsies at 0 h were immunostained in a DakoCytomation Autostainer Universal Staining System (Glostrup, Denmark), using anti-SDF-1 (5 µg/ml) and anti-CXCR4 (10 µg/ml) from eBioscience, and anti-CD34 (1/100) and Ki67 (10 µg/ml) from Dako. Labeled polymer-HRP anti-mouse and anti-rabbit from Dako Envision + Dual Link System-HRP (DAB+) was

used. The quantification of positive staining in digital images was performed using ImageJ software (developed by Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Statistical Analysis

Results are expressed as mean±standard error. The data were analyzed with the Wilcoxon's test for paired data and

Fig. 1 Bone marrow stem cells mobilization in patients undergoing hepatic resection. **a** Individual values of circulating CD34⁺ cells in peripheral blood before and after hepatectomy in 33 patients with liver disease. **b** Circulating levels of CD34⁺ cells in the peripheral blood before (0 h) and 72 h after hepatectomy in G1 and G2 patients (see text for details). Values are expressed as mean ± standard error. ^a*p*<0.001 vs. G1 at 0 h; ^b*p*=0.002 vs. G1 at 0 h



the Mann–Whitney’s test. A *p*<0.05 was considered statistically significant. Data processing was performed with the SPSS statistical package for Windows (11.0.1, Chicago, IL, USA, <http://www.spss.com>).

Results

Circulating Levels of CD34⁺ Cells in Hepatectomized Patients

Circulating CD34⁺ cells levels were measured before and 72 h after surgery in 33 consecutive hepatectomized patients with different types of liver diseases. In 14 of 33 patients, the levels of circulating CD34⁺ cells increased 72 h after hepatectomy as compared with the pre-hepatectomy levels (0 h), whereas in the other 19 patients, these values were lower or similar (Fig. 1a). Accordingly, the group of patients with an increase in circulating CD34⁺ cells after 72 h of hepatectomy was designated as group 1

(G1), and the group of patients with lower or similar levels of CD34⁺ cells after 72 h was named as group 2 (G2). The mean values of CD34⁺ cells in peripheral blood from both groups of patients are shown in Fig. 1b. Interestingly, G2 patients showed significant higher pre-hepatectomy levels of CD34⁺ cells than G1 patients. The clinical characteristics of the patients are shown in Table 1. It is interesting to note that the lowest percentage of mobilizer patients was observed in the HCC group (14%) compared with other liver pathologies. A large portion of the HCC patients (71%) had cirrhosis as underlying liver disease. No significant differences in BMHSC mobilization were observed among other liver pathology groups.

Immunophenotype Analysis of CD34⁺ Cells

CD34⁺ cells detected in peripheral blood of G1 and G2 patients co-expressed other surface proteins and BMSC markers such as CD45, CD90, CD117, CD133, and CXCR4 (Table 2). An increase in CD34⁺CD45⁺, CD34⁺CD90⁺,

Table 2 Immunophenotype analysis of CD34⁺ cells

		G1 patients	G2 patients	G1 vs. G2 patients
% CD34 ⁺ /CD45 ⁺	0 h	5.7±1.19	4.7±0.73	ns
	72 h	9.6±1.88 ^a	1.8±0.31	<i>p</i> =0.003
% CD34 ⁺ /CD90 ⁺	0 h	4.6±0.94	3.4±1.28	ns
	72 h	7.1±1.59 ^a	0.6±0.17	<i>p</i> =0.003
% CD34 ⁺ /CD117 ⁺	0 h	0.5±0.07	0.3±0.05	ns
	72 h	0.8±0.08 ^a	0.2±0.03	<i>p</i> =0.005
% CD34 ⁺ /CD133 ⁺	0 h	0.4±0.04	0.5±0.09	ns
	72 h	0.7±0.09 ^a	0.3±0.06	<i>p</i> =0.040
% CD34 ⁺ /CXCR4 ⁺	0 h	6.1±1.24	5.3±0.88	ns
	72 h	9.6±1.84 ^a	1.9±0.40	<i>p</i> =0.031

^a *p*<0.001 vs. 0 h

CD34⁺CD117⁺, CD34⁺CD133⁺, and CD34⁺CXCR4⁺ levels was observed in G1 patients after 72 h of hepatectomy. Significantly, G2 patients showed higher pre-hepatectomy levels of CXCR4, the single receptor for stromal-derived factor-1 (SDF-1) than G1 patients (73%±16.7% vs. 47%±5.7%, $p<0.05$; Table 2).

Presence of CD34⁺ Cells in the Liver

The potential presence of a CD34⁺ hematopoietic stem cell population in the liver previous to hepatectomy was immunohistochemically evaluated in both groups of patients. In all patients, a positive staining of CD34⁺ cells was observed in the hepatic parenchyma and sinusoids. However, the CD34⁺ immunostaining was remarkably higher in G2 compared to G1 patients (Fig. 2).

Levels of CD34⁺ Cells and the SDF-1/CXCR4 Axis

The relationship between CD34⁺ stem cells mobilization and SDF-1/CXCR4 axis was studied in both groups of patients G1 and G2. We analyzed the expression of SDF-1 and CXCR4 by immunohistochemistry. SDF-1 staining was positive in the bile ducts and parenchyma of livers from both groups of patients, but it was significantly higher in those from G2 patients (Fig. 3a, b). CXCR4 staining was similar to that observed for SDF-1, with expression around the central vein and parenchyma of livers from both groups of patients. Similarly, a higher CXCR4 staining was observed in livers from patients with lower levels of circulating CD34⁺ cells after 72 h of hepatectomy (G2), (Fig. 3c, d). Figure 3e shows these significant differences in SDF-1 and CXCR4 expression between G1 and G2 patients.

CD34⁺ Cells Mobilization and Changes in Circulating Levels of Cytokines

The circulating levels of cytokines involved in BMHSC mobilization (SDF-1, SCF, IL-12, and MMP-2) and hepatic regeneration (HGF, TGF- β) were evaluated. A distinct cytokine profile was observed in both groups of patients (G1 and G2; Fig. 4). Previous to hepatectomy, higher levels of SDF-1, SCF, IL-12, and MMP-2 were found in G2 compared to G1 patients. On the contrary, after 72 h of hepatectomy, the levels of cytokines involved with hepatic regeneration such as HGF or TGF- β and MMP-2 were lower in G2 patients than in G1 patients.

Association of BMHSC Mobilization and Hepatic Regeneration

The presence of Ki67, as a marker of hepatocyte regeneration, was analyzed by immunohistochemistry in liver

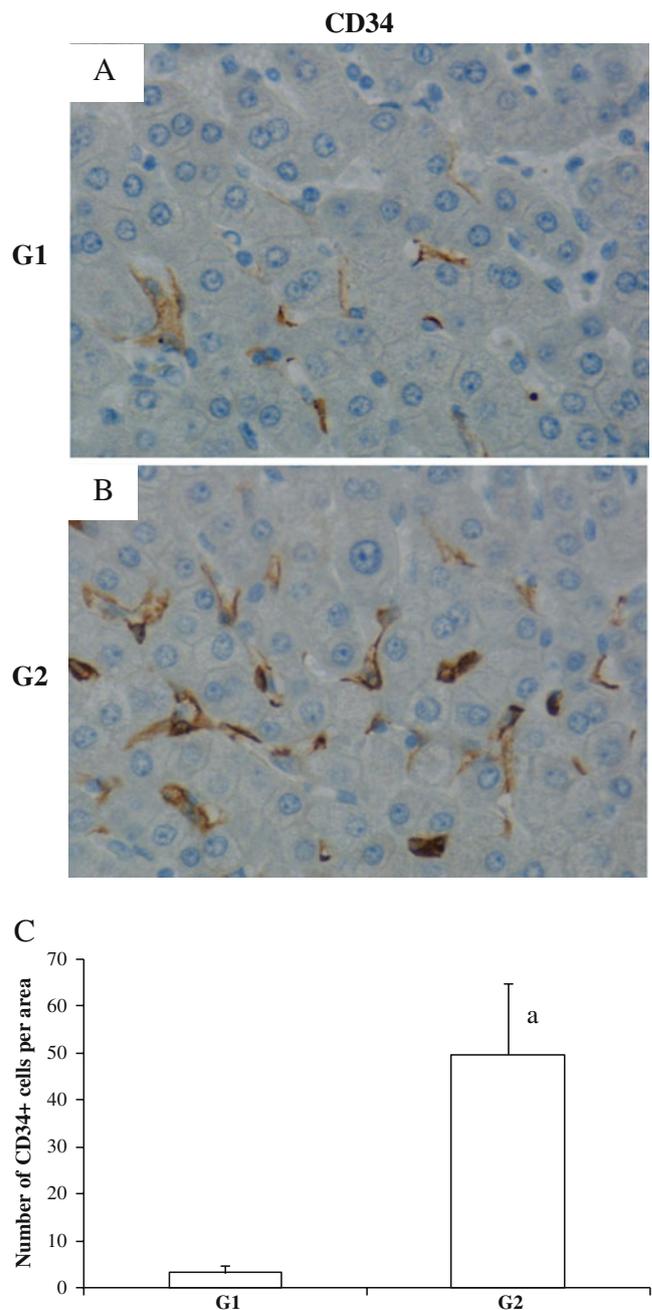
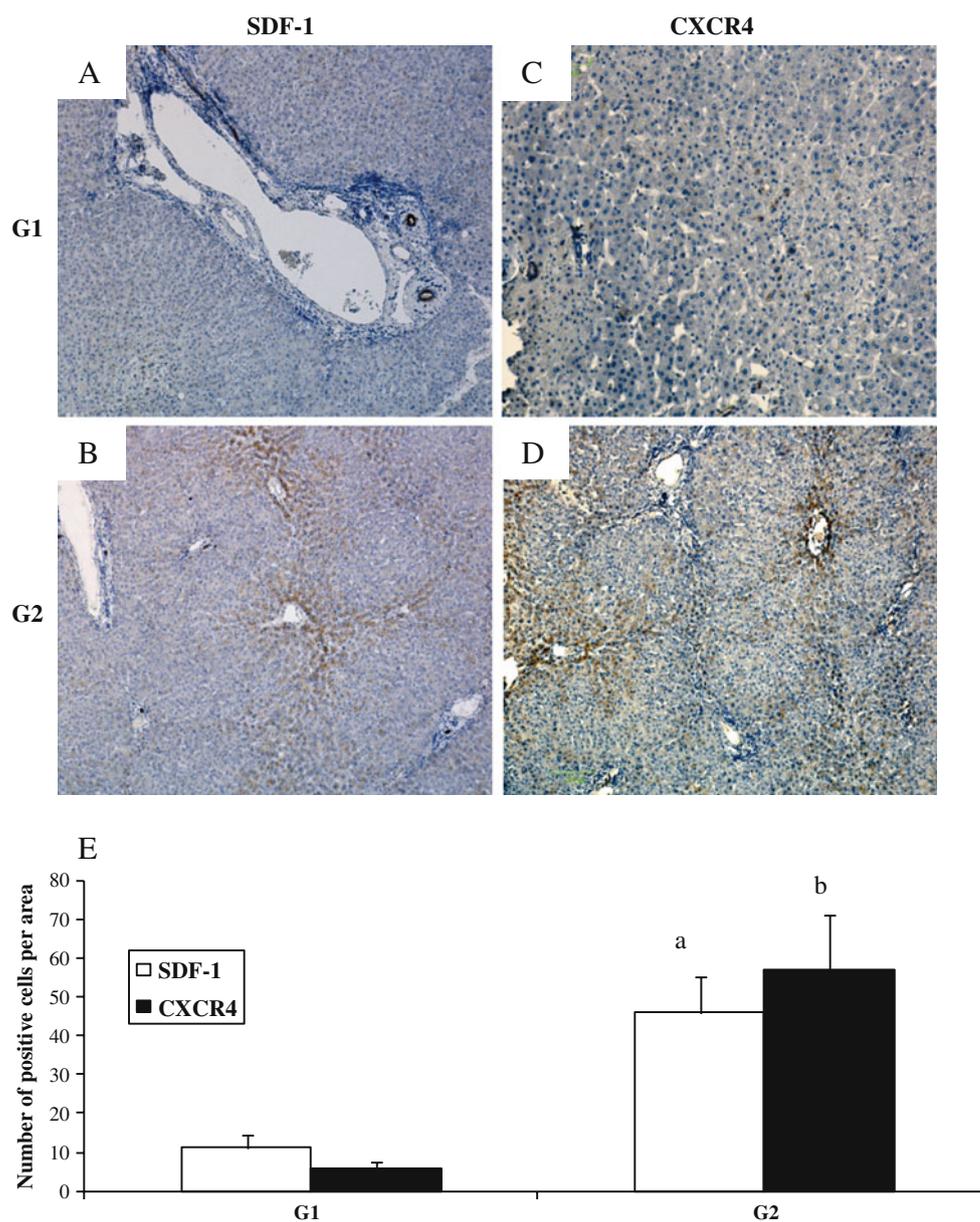


Fig. 2 Presence of a CD34⁺ hematopoietic stem cell population in liver. CD34⁺ immunohistochemical staining in liver tissue from G1 patients (a) and G2 patients (b). A representative image from each group of patients is displayed. Magnification: $\times 20$. Quantitative analysis of CD34⁺ immunohistochemical staining (c). CD34⁺ staining was quantified with Image J software ^a $p<0.001$ vs. G1 patients

tissue of all the studied patients. The nuclear Ki67 staining was positive in both G1 and G2 patients. In G1 patients, the Ki67 expression was mainly observed around central vein and in sinusoidal cells. Comparatively, the Ki67 staining in G2 patients was significantly more intense and localized in

Fig. 3 Expression of SDF-1 and CXCR4 in liver. **a, b** SDF-1 immunohistochemistry from liver tissue of G1 and G2 patients. **c, d** CXCR4 immunohistochemistry from G1 and G2 patients. **e** Levels of SDF-1 and CXCR4 were quantified from immunohistochemical staining in the livers G1 and G2 patients. SDF-1 and CXCR4 staining was quantified with Image J software. Biopsies were obtained during surgery (0 h). Values are expressed as mean \pm standard error. ^a $p < 0.001$ vs. G1 patients group and ^b $p < 0.001$ vs. G1 patients group. Magnifications: $\times 20$



the parenchymal hepatocytes and in sinusoidal cells (Fig. 5).

Discussion

This study was aimed to investigate the role of BMHSC mobilization after hepatectomy in patients with hepatic disease. A mobilization of CD34⁺ BMHSC in some (14 from 33) but not all of the hepatectomized patients was found. The pattern of co-expression of other surface proteins and stem cell markers (CD45, CD90, CD117, CD133, and CXCR4) with CD34⁺ revealed their bone marrow origin. Interestingly, the pre-hepatectomy levels of

circulating CD34⁺ cells were significantly higher in patients without BMHSC mobilization (G2). Two distinct types of patients (mobilizers and no mobilizers) were found after hepatectomy. Our results suggest that hepatectomy is an insufficient stimulus to induce BMHSC mobilization in patients with hepatic disease and that not all hepatectomized patients share the same stimuli to activate a BMHSC mobilization process.

These data are in agreement with other studies, although conflicting results have arisen regarding the role of the mobilization of BMHSC in the hepatic regeneration. Some studies have reported BMHSC mobilization in patients subjected to hepatectomy,^{16,19} while in others, this mobilization process was not observed.^{20,21} Thus, Di Campli et

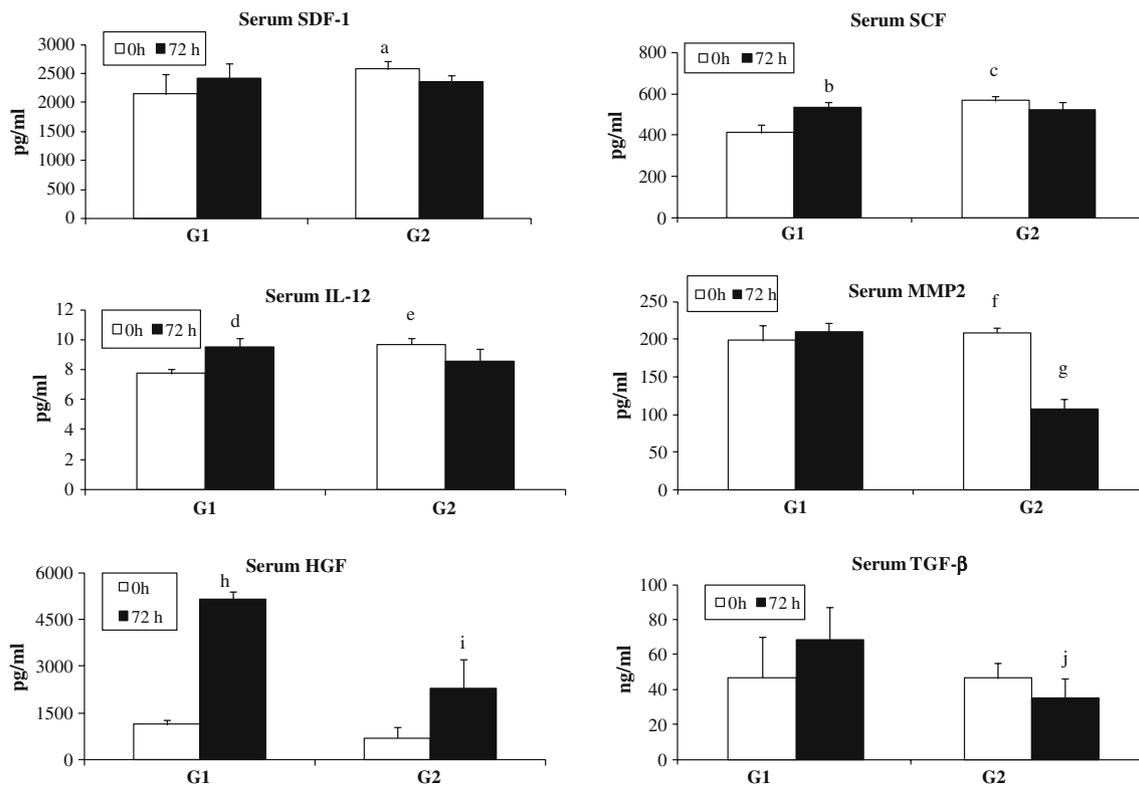


Fig. 4 Circulating levels of cytokines and proteolytic enzymes involved in stem cell mobilization and hepatic regeneration. Serum and plasma levels of cytokines and proteolytic enzymes were measured before (0 h) and after (72 h) hepatectomy in G1 and G2 patients. Values are mean \pm

standard error. ^a $p=0.045$ vs. G1 at 0 h; ^b $p<0.00$ vs. G1 at 0 h; ^c $p=0.007$ vs. G1 at 0 h; ^d $p=0.042$ vs. G1 at 0 h; ^e $p=0.034$ vs. G1 at 0 h; ^f $p=0.016$ vs. G1 at 0 h; ^g $p=0.044$ vs. G1 at 72 h. ^h $p=0.004$ vs. G1 at 0 h; ⁱ $p=0.013$ vs. G1 at 72 h; ^j $p=0.037$ vs. G1 at 72 h

al.²⁰ did not find evidences of hematopoietic stem cell mobilization in six hepatectomized patients or in eight patients with acute and chronic liver failure. In other study,¹⁶ only six from 13 hepatectomized patients augmented the levels of CD34⁺, CXCR4⁺ CD90⁺ in peripheral blood 72 h after the surgery. On the contrary, Gehling et al.¹⁹ found an increase in CD133⁺ CD45⁺ CD14⁺ cells but not in CD34⁺ cells in living donors submitted to liver resection. Other authors have shown that cirrhotic patients without hepatectomy are able to mobilize bone marrow stem cells to the bloodstream.²² Menegazzo et al. have shown that the type of the hepatic lesion influences the regenerative response after hepatic resection, with a reduced mobilization of HSC in the malignant liver diseases.²¹ In the present study, the analysis of a comparatively higher number of patients has shown no association between the levels of CD34⁺ cells and the clinical characteristic of the patients. However, it is interesting to note that the patients with hepatocellular carcinoma and metastasis showed lower percentages of BMSC mobilization (14% and 40%, respectively) compared to other type of pathologies. It is tempting to speculate that the underlying cirrhosis in the HCC patients may contribute to a previous

BMHSC mobilization. This may explain the very low number of mobilizer patients observed in this group compared with the other liver pathologies.

However, other differences between G1 and G2 patients were found. Hepatic tissue of G2 patients showed pre-hepatectomy higher levels of expression of CD34⁺, SDF-1, and CXCR4. Interestingly, in G2 patients, these data correlated with the observed levels of these proteins in peripheral blood at 0 h. The presence of CD34⁺, SDF-1, and CXCR4 in liver tissue before surgery suggests that hepatectomy is not necessary to trigger a CD34⁺ stem cells mobilization and might explain why some patients (G2) do not mobilize BMHSC after hepatectomy. In this sense, activation and modulation of the SDF-1/CXCR4 axis is critical for the induction of the BMHSC mobilization process.^{17,23,24} SDF-1 is involved in the recruitment of HSC toward the hepatic tissue,^{17,25,26} and other studies have related an increase of SDF-1 levels with the capacity of mobilization of BMHSC in patients without hepatectomy and cirrhosis.²²

Differences in the cytokine profile and in the levels of proteolytic enzymes involved in hepatic regeneration and BMHSC mobilization were also found between G1 and G2

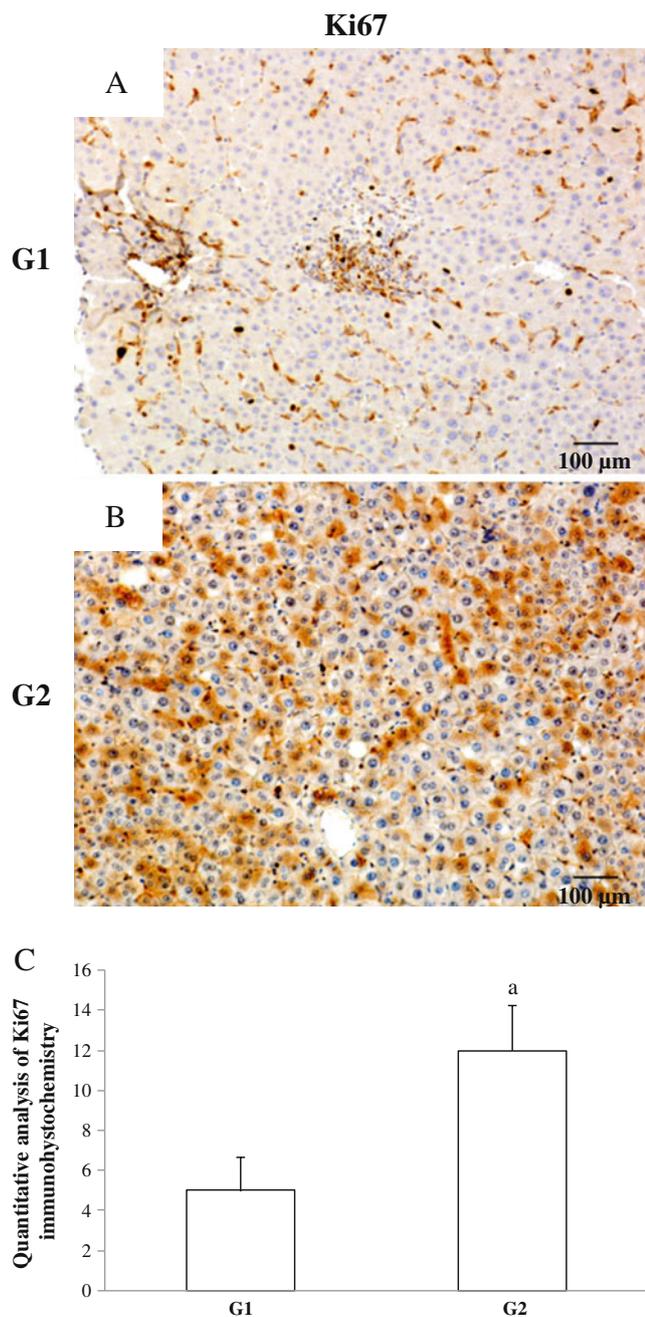


Fig. 5 Association of BMHSC mobilization and hepatic regeneration. Ki67 immunohistochemistry from liver tissue of G1 (a) and G2 (b) patients. A representative image of each group is shown. Ki67 staining was quantified in the livers of G1 and G2 patients (c). Ki67 staining was quantified with Image J software. Values are expressed as mean \pm standard error. Biopsies were obtained during surgery (0 h). ^a $p < 0.001$ vs. G1 patients group. Magnifications: $\times 20$

patients. The different levels of cytokines found might explain the differences in the mobilization process observed between G1 and G2 patients. In non-mobilizer patients (G2), the higher levels of cytokines related to a BMSC

mobilization process were observed before surgery (SCF, SDF-1, IL-12, and MMP-2), and these elevated levels were not altered after 72 h. However, a positive increase in the levels of these cytokines was observed in mobilizer patients (G1) 72 h after surgery. A lower bone marrow extracellular matrix degradation and release of hematopoietic stem cells into the bloodstream was observed in G2 patients compared to G1 patients. These data might explain the different degree of BMHSC mobilization among hepatectomized patients.

BMHSC mobilization is finely regulated by several cytokines and its triggering depends on the levels of specific cytokines.^{10,25} SCF has a key role in the stimulation of HSC proliferation and mobilization,²⁷ and its levels may be influenced by liver injury.²⁸ The activation of proteolytic enzymes, such as MMP-2, MMP-9, or Cathepsin L, as well as the modulation of IL-6 and IL-12, have also been related with the increase of SCF levels.²⁹ SCF modulates SDF-1 concentration, causing the release of CD34⁺ cells from the bone marrow into peripheral blood.^{10,25,30}

After 72 h of surgery, non-mobilizer patients (G2) showed lower levels of cytokines involved with hepatic regeneration (HGF and TGF- β) than mobilizer patients (G1). This might explain the lower capability of BMHSC mobilization observed in G2 patients. HGF participates in hepatic regeneration and is also responsible for the events of regeneration and migration of human CD34⁺ stem cells.^{31,32} Kollet and coworkers demonstrated that HGF also induces cytoskeleton rearrangement, increases cell motility, and enhances the response of immature CD34⁺ cells to SDF-1 signaling by inducing CXCR4 up-regulation and synergizing with SCF.²⁵

An early BMHSC mobilization process in G2 patients is suggested by the high levels of CD34 cells, SDF-1, and CXCR4 previous to surgery and the significant variations in the levels of cytokines that are key for this mobilization process, such as stem cell factor, interleukin-12, matrix metalloproteinase 2, HGF, or TGF- β . Moreover, our data of Ki67 staining suggest that this previous BMHSC mobilization process might be associated with the higher hepatic regeneration observed in G2 patients.

In summary, hepatectomy may be an insufficient stimulus to trigger the BMHSC mobilization process. This process seems to be associated with variations in the levels of cytokines and proteolytic enzymes involved in bone marrow matrix degradation and hepatic regeneration. The pre-hepatectomy higher levels of CD34⁺ cells in peripheral blood and liver, associated to an increased expression of SDF-1/CXCR4 axis and Ki67 in non-mobilizer patients, might suggest a BMHSC mobilization process previous to surgery in non-mobilizer patients.

Acknowledgment This research was supported by grants CM014/05 from Fundación Progreso y Salud, Junta de Andalucía and CTS-02137 from Consejería de Innovación Ciencia y Empresa. M-C JR has conceived, designed and interpreted the research. M-C JR is supported by Contrato Sara Borrel from Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain.

Conflict of Interest No potential and real conflicts of interest.

References

- Yokoyama Y, Nagino M, Nimura Y (2007) Mechanism of impaired hepatic regeneration in cholestatic liver. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 14:159–166
- Michalopoulos GK (2010) Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol* 176:2–13
- Fausto N (2004) Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 39:1477–1487
- Taub R (2004) Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:836–847
- Alison MR, Islam S, Lim S (2009) Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly. *J Pathol* 217:282–298
- Viebahn CS and Yeoh GC (2008) What fires prometheus? The link between inflammation and regeneration following chronic liver injury. *Int J Biochem Cell Biol* 40:855–873
- Cantz T, Manns MP, Ott M (2008) Stem cells in liver regeneration and therapy. *Cell Tissue Res* 331:271–282
- Austin TW and Lagasse E (2003) Hepatic regeneration from hematopoietic stem cells. *Mech Dev* 120:131–135
- Korbling M, Katz RL, Khanna A et al (2002) Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 346:738–746
- Dalakas E, Newsome PN, Harrison DJ et al (2005) Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury. *FASEB J* 19:1225–1231
- Gilchrist ES and Plevris JN (2010) Bone marrow-derived stem cells in liver repair: 10 years down the line. *Liver Transpl* 16:118–129
- am Esch JS, Knoefel WT, Klein M et al (2005) Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells* 23:463–470
- Pai M, Zacharoulis D, Milicevic MN et al (2008) Autologous infusion of expanded mobilized adult bone marrow-derived CD34+ cells into patients with alcoholic liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 103:1952–1958
- Cantz T, Sharma AD, Jochheim-Richter A et al (2004) Reevaluation of bone marrow-derived cells as a source for hepatocyte regeneration. *Cell Transplant* 13:659–666
- Dalakas E, Newsome PN, Boyle S et al (2010) Bone marrow stem cells contribute to alcohol liver fibrosis in humans. *Stem Cells Dev* 19: 1417–25
- Lemoli RM, Catani L, Talarico S et al (2006) Mobilization of bone marrow-derived hematopoietic and endothelial stem cells after orthotopic liver transplantation and liver resection. *Stem Cells* 24:2817–2825
- Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A et al (2002) G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 3:687–694
- Aiuti A, Webb IJ, Bleul C et al (1997) The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med* 185:111–120
- Gehling UM, Willems M, Dandri M et al (2005) Partial hepatectomy induces mobilization of a unique population of haematopoietic progenitor cells in human healthy liver donors. *J Hepatol* 43:845–853
- Di CC, Piscaglia AC, Giuliante F et al (2005) No evidence of hematopoietic stem cell mobilization in patients submitted to hepatectomy or in patients with acute on chronic liver failure. *Transplant Proc* 37:2563–2566
- Menegazzo M, Bagatella P, Marson P et al (2008) Reduced Mobilisation of Hematopoietic Stem Cells After Hepatic Resection for Malignant Liver Disease. *Pathol Oncol Res* 14:381–385
- Gehling UM, Willems M, Schlagner K et al (2010) Mobilization of hematopoietic progenitor cells in patients with liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 16:217–224
- Gazitt Y and Liu Q (2001) Plasma levels of SDF-1 and expression of SDF-1 receptor on CD34+ cells in mobilized peripheral blood of non-Hodgkin's lymphoma patients. *Stem Cells* 19:37–45
- Terada R, Yamamoto K, Hakoda T et al (2003) Stromal cell-derived factor-1 from biliary epithelial cells recruits CXCR4-positive cells: implications for inflammatory liver diseases. *Lab Invest* 83:665–672
- Kollet O, Shivtiel S, Chen YQ et al (2003) HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 112:160–169
- Lapidot T and Petit I (2002) Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp Hematol* 30:973–981
- Nervi B, Link DC, DiPersio JF (2006) Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *J Cell Biochem* 99:690–705
- Baccarani U, De SG, Adani GL et al (2006) Implication of stem cell factor in human liver regeneration after transplantation and resection. *Growth Factors* 24:107–110
- Levesque JP, Takamatsu Y, Nilsson SK et al (2001) Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 98:1289–1297
- Heissig B, Hattori K, Dias S et al (2002) Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109:625–637
- Yang ZJ, Xu SL, Chen B et al (2009) Hepatocyte growth factor plays a critical role in the regulation of cytokine production and induction of endothelial progenitor cell mobilization: a pilot gene therapy study in patients with coronary heart disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36:790–796
- Weimar IS, Miranda N, Muller EJ et al (1998) Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is produced by human bone marrow stromal cells and promotes proliferation, adhesion and survival of human hematopoietic progenitor cells (CD34+). *Exp Hematol* 26:885–894

Nuclear Translocation of β -Catenin during Mesenchymal Stem Cells Differentiation into Hepatocytes Is Associated with a Tumoral Phenotype

Carmen Herencia¹, Julio M. Martínez-Moreno¹, Concepción Herrera², Fernando Corrales³, Raquel Santiago-Mora⁴, Isabel Espejo⁴, Monserrat Barco⁴, Yolanda Almadén¹, Manuel de la Mata⁵, Antonio Rodríguez-Ariza¹, Juan R. Muñoz-Castañeda^{1*}

1 Maimónides Institute for Biomedical Research (IMIBIC)/Reina Sofia University Hospital/University of Córdoba, Córdoba, Spain, 2 Cellular Therapy Unit, IMIBIC/Reina Sofia University Hospital, Córdoba, Spain, 3 Center for Applied Medical Research, University of Navarra, Proteomics Laboratory, Pamplona, Spain, 4 Service of Clinic Analysis, Reina Sofia University Hospital, Córdoba, Spain, 5 Liver Research Unit, CIBERehd, IMIBIC/Reina Sofia University Hospital, Córdoba, Spain

Abstract

Wnt/ β -catenin pathway controls biochemical processes related to cell differentiation. In committed cells the alteration of this pathway has been associated with tumors as hepatocellular carcinoma or hepatoblastoma. The present study evaluated the role of Wnt/ β -catenin activation during human mesenchymal stem cells differentiation into hepatocytes. The differentiation to hepatocytes was achieved by the addition of two different conditioned media. In one of them, β -catenin nuclear translocation, up-regulation of genes related to the Wnt/ β -catenin pathway, such as Lrp5 and Fzd3, as well as the oncogenes *c-myc* and *p53* were observed. While in the other protocol there was a Wnt/ β -catenin inactivation. Hepatocytes with nuclear translocation of β -catenin also had abnormal cellular proliferation, and expressed membrane proteins involved in hepatocellular carcinoma, metastatic behavior and cancer stem cells. Further, these cells had also increased auto-renewal capability as shown in spheroids formation assay. Comparison of both differentiation protocols by 2D-DIGE proteomic analysis revealed differential expression of 11 proteins with altered expression in hepatocellular carcinoma. Cathepsin B and D, adenine phosphoribosyltransferase, triosephosphate isomerase, inorganic pyrophosphatase, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A or lactate dehydrogenase β -chain were up-regulated only with the protocol associated with Wnt signaling activation while other proteins involved in tumor suppression, such as transgelin or tropomyosin β -chain were down-regulated in this protocol. In conclusion, our results suggest that activation of the Wnt/ β -catenin pathway during human mesenchymal stem cells differentiation into hepatocytes is associated with a tumoral phenotype.

Citation: Herencia C, Martínez-Moreno JM, Herrera C, Corrales F, Santiago-Mora R, et al. (2012) Nuclear Translocation of β -Catenin during Mesenchymal Stem Cells Differentiation into Hepatocytes Is Associated with a Tumoral Phenotype. PLoS ONE 7(4): e34656. doi:10.1371/journal.pone.0034656

Editor: Cara Gottardi, Northwestern University Feinberg School of Medicine, United States of America

Received: September 14, 2011; **Accepted:** March 7, 2012; **Published:** April 10, 2012

Copyright: © 2012 Herencia et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by a grant from Consejería de Economía, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia: P06-CTS-02137). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: juanr.munoz.exts@juntadeandalucia.es

Introduction

Wnt/ β -catenin signaling pathway is a master regulator of cell fate and proliferation during embryonic development that plays a main role in the control of differentiation of embryonic and adult stem cells [1]. A key element of this pathway is β -catenin, a multifunctional protein with important functions in intracellular adhesion, cell growth, survival and differentiation [2]. In the canonical Wnt/ β -catenin pathway, nuclear β -catenin is associated with T cell factors and lymphoid enhancer-binding factor1 leading to transcriptional activation of target genes that regulate many cellular processes, such as cell cycle control through *c-myc* or cellular differentiation [3]. Wnt/ β -catenin is activated during mesenchymal stem cells (MSC) differentiation to osteoblasts [4] and inactivated during differentiation into adipocytes [5]. Some studies have also recently documented the inactivation of this pathway during differentiation of MSC into hepatocytes [6,7,8]. The aberrant activation of Wnt/ β -catenin

pathway in committed cells has been related with the development of several types of tumors, including hepatocellular carcinoma or hepatoblastoma [9,10,11]. The Wnt/ β -catenin pathway could be implicated in the mechanisms that participate in the progression of functional differentiated hepatocytes into tumor cells [10,11,12,13].

Stem cells and cancer are inextricably linked and emerging data suggest an association between alterations in stem cells and the generation of cancer stem cells (CSC) [14,15,16]. However, the mechanisms by which stem cells adopt CSC properties are presently unknown. In this context it is particularly interesting to study the consequences of the activation of Wnt/ β -catenin pathway during MSC differentiation into hepatocytes and its relationship with the occurrence of a tumoral phenotype. This study examines the effects of Wnt/ β -catenin activation during the differentiation of MSC into hepatocytes as well as on the association of Wnt/ β -catenin pathway activation with the generation of a tumoral phenotype.

Table 1. Stem cells/cancer stem cells markers expression in undifferentiated cells at time 0 days.

	Undifferentiated cells (t = 0)
% CD13	99.5±0.04
% CD29	99.8±0.11
% CD34	2.02±0.158
% CD44	99.5±0.45
% CD45	1.18±1.491
% CD49e	61.8±13.09
% CD73	99.5±0.40
% CD90	99.6±0.13
% CD105	98.8±0.52
% CD133	1.35±0.979
% CD166	67.9±16.58
% CXCR4	0.96±0.179
% VEGFR2	2.04±0.311

Data are included as mean ± standard deviation.
doi:10.1371/journal.pone.0034656.t001

Results

Immunophenotype of human mesenchymal stem cells before and after differentiation into hepatocytes

Human MSCs specific markers were evaluated by flow cytometry before and after 21 days of treatment with two protocols (CM1 and CM2) of hepatocytes differentiation. At 0 days, undifferentiated human bone marrow MSCs were negative for the expression of CD34, CD45, CD117, CD133, CD184 and VEGFR2, but positive for the expression of CD13, CD26, CD29, CD44, CD49e, CD90, CD105 and CD166 (Table 1). When human MSCs were cultured during 21 days for hepatocytes differentiation, marked differences in the levels of CD13, CD49e, CD133, CD166 and VEGFR2 were observed in CM1 and CM2-treated cells. The levels of these markers were significant higher in CM2-treated cells as compared to undifferentiated cells or CM1-treated cells (Figure 1).

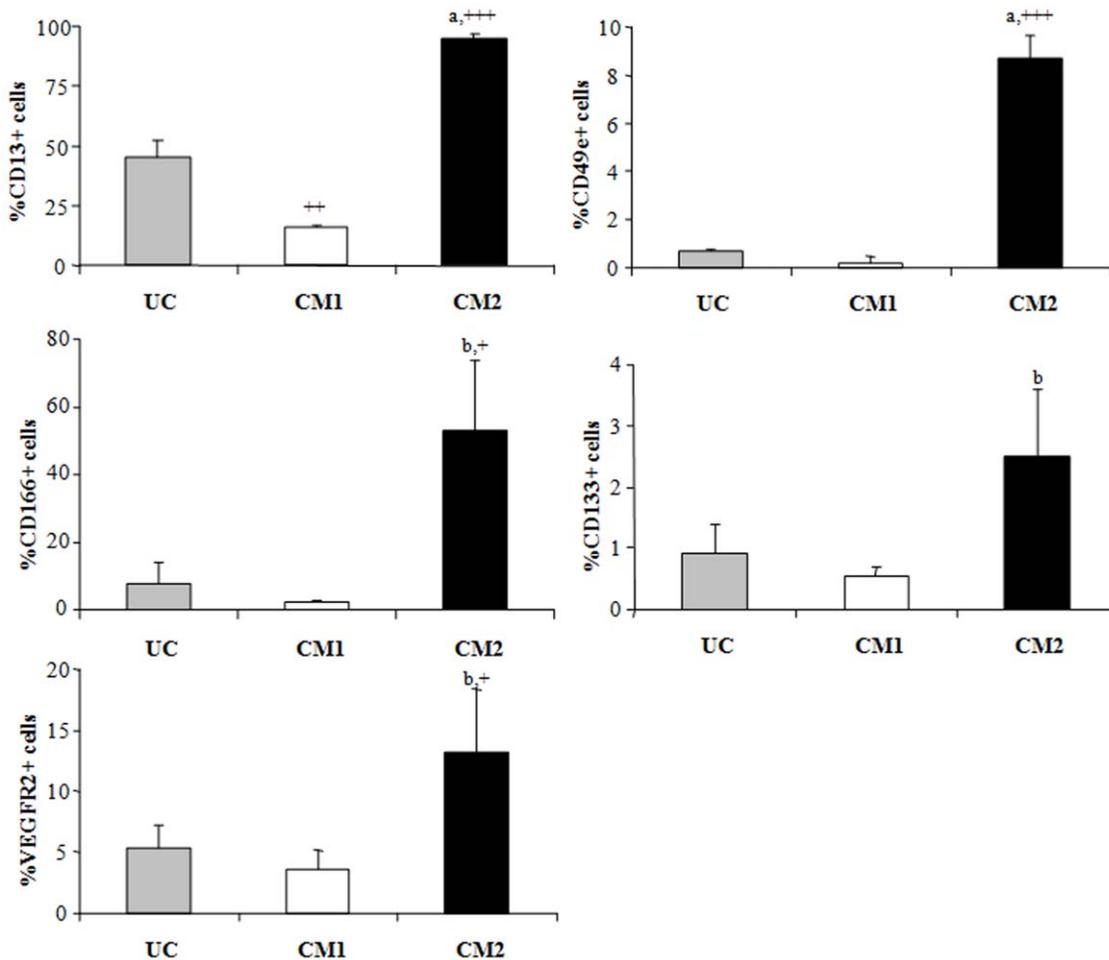


Figure 1. Differential stem cells markers in undifferentiated and differentiated human mesenchymal stem cells. Levels of CD13, CD49e, CD166, CD133 and VEGFR2 in undifferentiated cells (UC), CM1 and CM2-treated cells after 21 days of culture. (Conditioned medium: CM). Values are expressed as mean of percentage ± standard deviation. (a p<0.001 and b p<0.01 vs. CM1-treated cells; +++ p<0,001 and + p<0,05 vs. undifferentiated cells).

doi:10.1371/journal.pone.0034656.g001

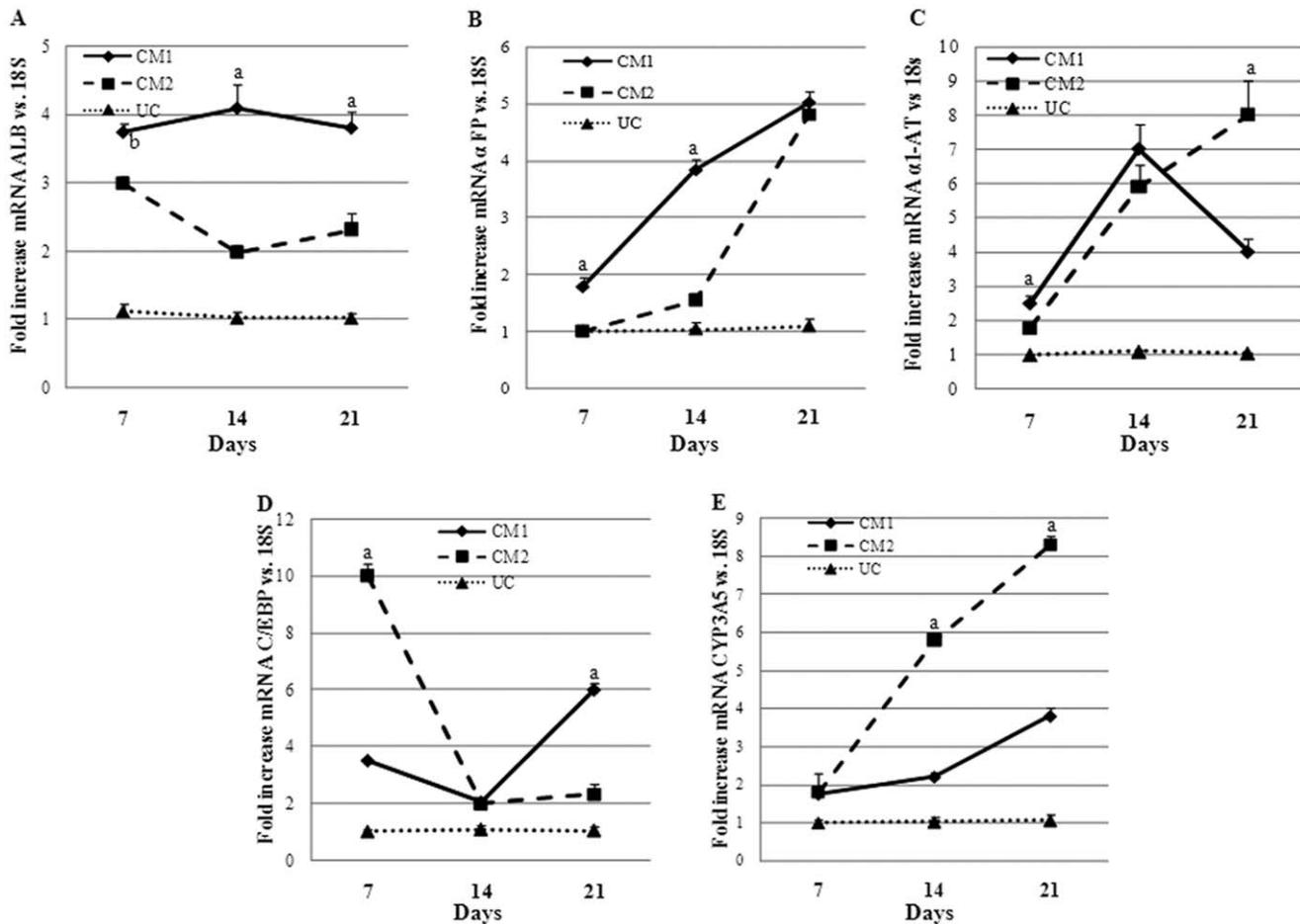


Figure 2. The treatments with CM1 or CM2 increase the expression of hepatospecific genes in human mesenchymal stem cells. Relative levels of mRNA expression of A) albumin (ALB), B) α -fetoprotein (α FP), C) α 1-antitrypsin (α 1-AT), D) CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP) and E) cytochrome P450 (CYP3A5) were determined in human undifferentiated mesenchymal stem cells before and after differentiation with conditioned medium 1 (CM1) or 2 (CM2) after 7, 14 and 21 days of culture; Gene expression is shown as fold-changes compared to undifferentiated cells at each time. Values are expressed as mean \pm standard deviation. All genes were increased significantly respect to undifferentiated cells (UC). ^a $p < 0.001$, ^b $p < 0.01$ vs. CM1 or CM2. doi:10.1371/journal.pone.0034656.g002

Expression of hepatospecific markers in human mesenchymal stem cells during their differentiation into hepatocytes

To compare the potential for hepatic differentiation of both protocols, the expression of hepatospecific genes was evaluated measuring mRNA levels by RT-PCR and protein expression by immunocytochemistry. The mRNA levels of albumin (ALB), α -fetoprotein (α FP), α 1-antitrypsin (α 1-AT), C/EBP α and CYP3A5 were strongly induced in human MSCs treated with CM1 or CM2 at 7, 14 and 21 days, compared to undifferentiated cells (UC). Comparatively, at 21 days of differentiation, there are no significant differences between both differentiation protocols. In CM2-treated cells there were not significant differences in the expression of these genes between cells to time 0 and cells after 48 h of treatment. The expressions of albumin and C/EBP were bigger in CM1 than CM2-treated cells while the expressions of α 1-AT and CYP3A5 were increased in CM2 vs. CM1-treated cells. The expression of α FP was similar with both protocols (Figure 2).

Expression of hepatospecific proteins, such as albumin, α 1-antitrypsin, α -fetoprotein and cytochrome P450 were also immunodetected in cells after 21 days of differentiation with both protocols

CM1 or CM2 (Figure 3). Both protocols expressed with similar intensity hepatospecific proteins. Undifferentiated cells at 21 days were negative for the expression of these proteins. PAS stain was positive after treatment with CM1 and CM2 although a higher intensity was observed in cells cultured with CM2.

Role of Wnt/ β -catenin pathway and p53 during human mesenchymal stem cells differentiation into hepatocytes

Since Wnt/ β -catenin pathway plays a main role in the control of differentiation of adult stem cells, confocal microscopy was used to study the subcellular localization of β -catenin during differentiation into hepatocytes in both CM1 and CM2 (Figure 4A). Immunofluorescence staining demonstrated that β -catenin localized to the cell membrane or to the peri-membrane region in undifferentiated and CM1 cells after 21 days, while there was no evidence of nuclear translocation. In contrast, there was a clear localization of β -catenin to the nuclei of differentiated human MSCs after treatment with CM2.

To confirm Wnt/ β -catenin pathway activation during CM2 protocol, the expression of several genes regulated by this pathway, such as Lrp5/6, Frizzled 3 and c-myc, were next analyzed. The

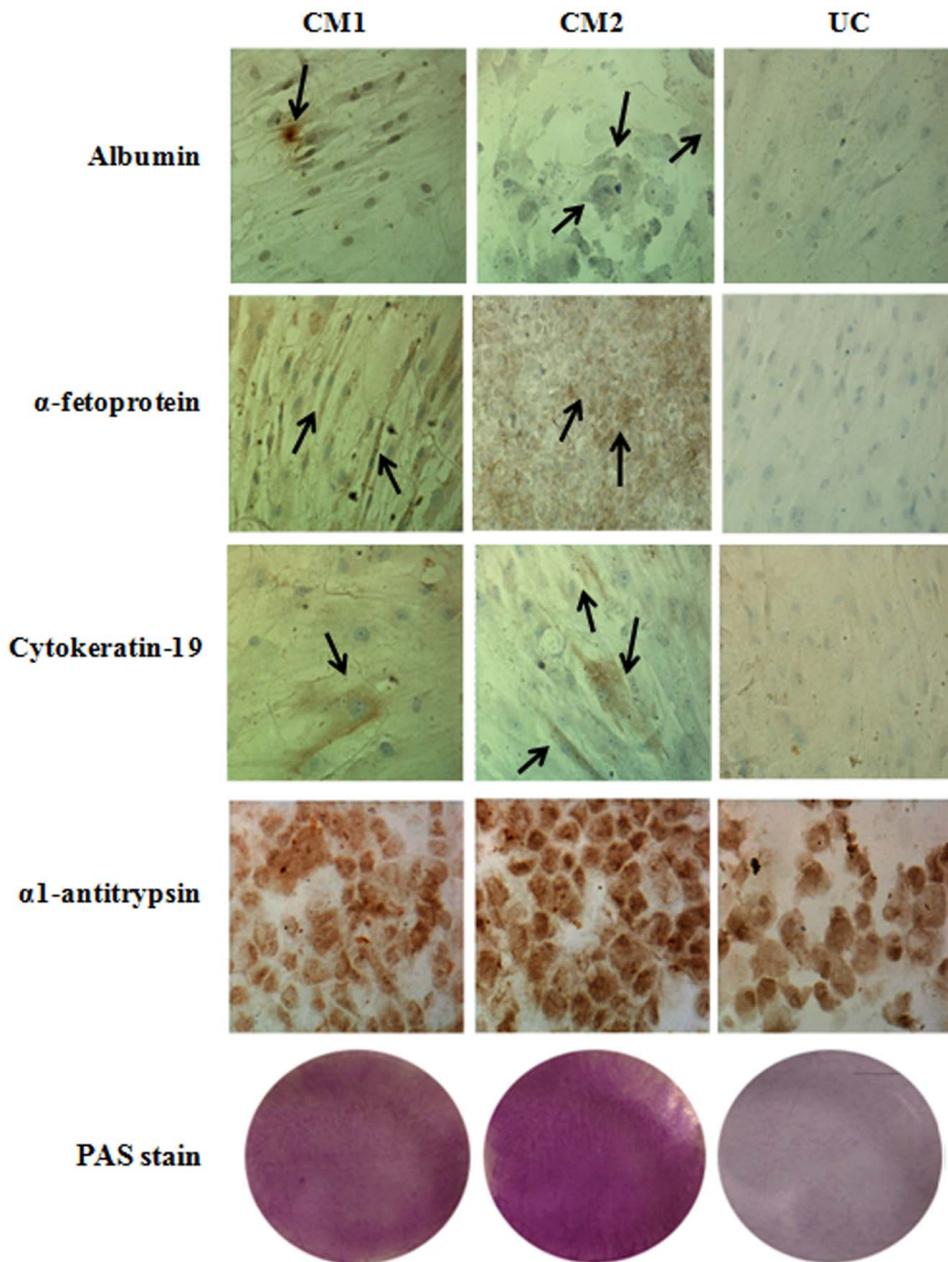


Figure 3. The treatment with CM1 or CM2 induces the presence of hepatospecific proteins in human mesenchymal stem cells. The presence of hepatospecific proteins such as albumin, α 1-antitrypsin, α-fetoprotein, cytokeratin-19 and PAS stain were evaluated by immunohistochemistry after 21 days of culture with conditioned medium CM1 or CM2. Arrows show positive staining area. doi:10.1371/journal.pone.0034656.g003

differentiation of human MSCs into hepatocytes with CM2 increased the mRNA expression of Lrp5, Frizzled 3 and c-myc. Conversely, undifferentiated cells and CM1-treated cells showed much lower levels of expression of these genes (Figure 4B).

Figure 4c shows western blot of p53 and tubulin as loading control. The expression of p53 was similar in undifferentiated and CM1-treated cells however its expression was significantly reduced in CM2-treated cells.

Wnt/β-catenin activation leads to abnormal proliferation and spheroids formation

Figure 5a shows that after 14 days of hepatocytes differentiation the number of CM2-treated cells begins to be higher with this

treatment than CM1-treated cells or undifferentiated cells. At 21 days of hepatocytes differentiation, in CM2-treated cells there was a 75% more of cells than in undifferentiated or CM1-treated cells (a p<0.001 vs. CM1-treated cells and undifferentiated cells at 14 days and 21 days).

Nuclear staining of PCNA was significantly higher in CM2-treated cells than in undifferentiated or CM1-treated cells (Figure 5b). PCNA staining reinforces the abnormal proliferation detected in CM2-treated cells. With respect to cell cycle, Figure 5c shows a similar percentage of cells in G0/G1, G2/M and S phase in undifferentiated cells and CM1-treated cells. However in CM2-treated cells it is interesting to note a significant increase in the percentage of cells in S phase as well

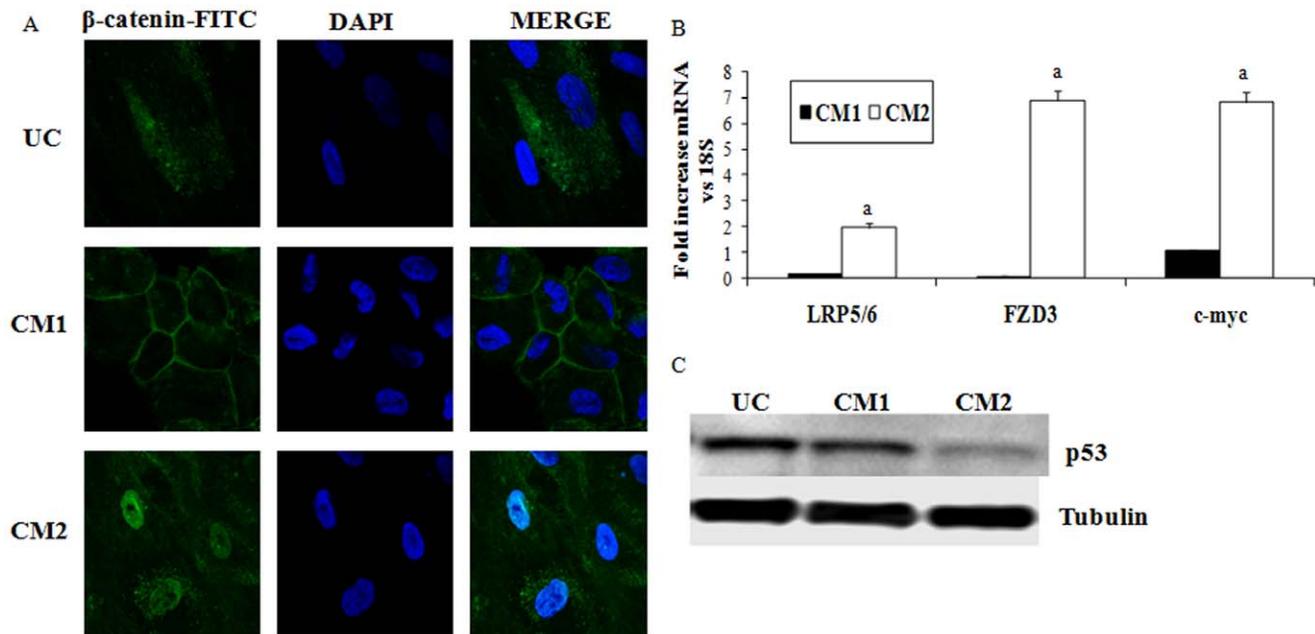


Figure 4. The treatment of human mesenchymal stem cells with CM2 induces nuclear translocation of β -catenin and Wnt signaling activation. A) To determine β -catenin subcellular localization, human mesenchymal stem cells undifferentiated (UC) and treated with conditioned medium 1 (CM1) or 2 (CM2) after 21 days of culture were stained for β -catenin immunofluorescence (green) and counterstained with DAPI (blue). Merged image of β -catenin-FITC and DAPI staining is also shown. Original magnification: 40 \times . B) mRNA expression of Lrp5/6, Frizzled-3 (FZD3) and c-myc was evaluated in undifferentiated cells and cells treated with conditioned medium 1 (CM1) or 2 (CM2). Fold of undifferentiated cells at 21 days of culture. ^a $p < 0.001$ vs. CM1-treated cells. C) Figure 4 c shows western blot of p53 and α -tubulin as loading control. Image is representative of three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0034656.g004

as a decrease in G0/G1 phase with respect to undifferentiated and CM1-treated cells.

For spheroid assay, differentiated cells for 21 days were cultured in low adherent plates for 4 days. Primary spheroids were detected in all groups although the number of spheres seemed be higher in CM2-treated cells. To quantify this data spheres were digested with trypsin-EDTA and subsequently counted. It is interesting to note that the capability to form spheres and the number of cells was higher in CM2-treated cells than the other cells (Figure 5d). After 4 days more of culture in low adherence plates and a clonal dilution the number of secondary spheres was significantly higher in CM2-treated cells than in undifferentiated cells (+++ $p < 0.001$) and CM1-treated cells (a $p < 0.001$). There was not difference in the number of spheres between undifferentiated and CM1-treated cells (Figure 5e). A detail of these secondary spheroids is showed in the microphotographs of Figure 5f. 3D structure of spheroids is showed in the movie of Supporting Information files (Figure S1). 3D animation of detected spheres was observed in each treatment; however we show only an example of this 3D-structure in this case a spheroid corresponding to CM2-treated cells.

Analysis of protein expression profile by DIGE

A proteomic DIGE approach was used to analyze the repertoire of proteins differentially expressed in control cells and hepatocytes obtained with CM1 or CM2 differentiation protocols. The DIGE analysis showed 39 differentially expressed proteins, and 17 of them were identified, including chaperones, metabolic, structural, proteolytic and apoptosis-related proteins (Table 2). Eleven of these proteins were differentially expressed in CM1 vs. CM2 (Figure 6). The differential expression in CM1 vs. CM2 of proteins, such as adenine phosphoribosyl transferase, transgelin, cathepsine B precursor, tropomyosin β chain and L-lactate

dehydrogenase β chain was confirmed by western blots (Figure 5B). DIGE analysis showed a higher expression of adenine phosphoribosyltransferase, cathepsin B and D, triosephosphate isomerase, inorganic pyrophosphatase, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A or L-lactate dehydrogenase β -chain in hepatocytes obtained after treatment with CM2, than in CM1-treated or undifferentiated cells. In contrast, the expression of other proteins, such as transgelin, tropomyosin β chain, annexin A5 or Dna J homologous subfamily B decreased in hepatocytes obtained after treatment with CM2, compared to CM1-treated or undifferentiated cells. Nuclear β -catenin was also more expressed after treatment with CM2 than in CM1-treated cells.

Discussion

Hepatocytes differentiation has been achieved using different types of stem cells, MSC [17], embryonic stem cells [18] or induced pluripotent stem cells [19]. However in these studies the role of Wnt/ β -catenin activation during hepatogenesis is unclear. In our study, we used human MSC and two different protocols to achieve differentiation into hepatocytes; one without Wnt/ β -catenin activation (CM1) and other with Wnt signaling activation (CM2). The expression of hepatospecific genes and the key regulator of hepatogenesis CEBP were achieved in both protocols. Similar differentiation results has been obtained by others authors using other stem cells [20].

Wnt/ β -catenin pathway activation took place in CM2-treated cells, with nuclear β -catenin translocation and up-regulation of genes related to this pathway. Treatment of cells with another protocol (CM1) also induced hepatic differentiation but without the concurrence activation of Wnt/ β -catenin pathway. We show for the first time the capability of CM1 (HGF+FGF7) to

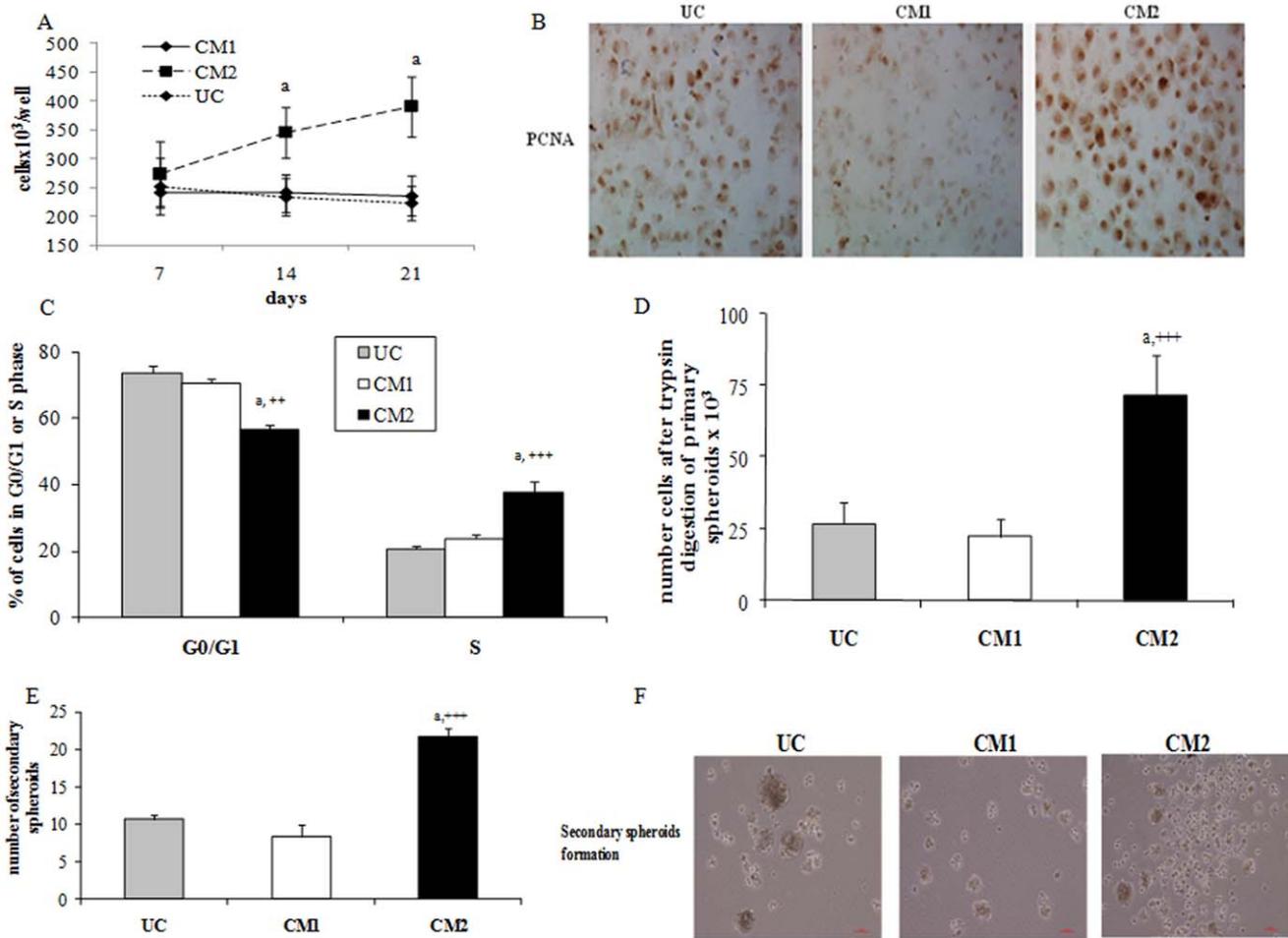


Figure 5. Markers of tumoral phenotype. A) Number of cells after 7, 14 and 21 days of culture in undifferentiated, CM1 and CM2-treated cells. Values expressed as mean \pm standard deviation. a $p < 0.001$ vs. CM1-treated cells and undifferentiated cells. B) The presence of nuclear PCNA (brown nucleus) was evaluated by immunohistochemistry after 21 days of culture in undifferentiated cells, CM and CM2-treated cells. Image is representative of three experiments. Original magnification: 20 \times . C) Cell cycle was analyzed at 21 days of hepatocyte differentiation in undifferentiated, CM1 and CM2-treated cells. Data are showed as mean of percentage plus standard deviation. a $p < 0.001$ vs. CM1-treated cells, $++$ $p < 0.01$ and $+++$ $p < 0.001$ vs. undifferentiated cells. D) Primary spheroid assay with count of number of cells after 4 days of culture with conditioned medium for spheroid formation. Data are showed that mean \pm standard deviation (a $p < 0.001$ vs. CM1-treated cells and $+++$ $p < 0.001$ vs. undifferentiated cells). E) Secondary spheroid formation assay. Number of secondary spheroids was counted in an inverted microscope. Three experiments were carried out and data are expressed as mean \pm standard deviation (a $p < 0.001$ vs. CM1-treated cells and $+++$ $p < 0.001$ vs. undifferentiated cells). F) Detail of secondary spheroids is showed in the microphotographs of undifferentiated cells, CM1 and CM2-treated cells. doi:10.1371/journal.pone.0034656.g005

differentiate human MSC into hepatocytes. Our results show also that differentiation into hepatocytes may be induced with or without activation of Wnt/ β -catenin pathway. Our results with CM1-treated cells are consistent with other studies where down-regulation of Wnt/ β -catenin pathway during hepatic differentiation is observed [6,7,8]. On the other hand, in protocol CM2, dexamethasone was administered, and the administration of high dose of this glucocorticoid may be responsible of the nuclear β -catenin translocation observed. Others authors have demonstrated that equal concentration of dexamethasone induced osteogenesis of murine MSC via nuclear β -catenin translocation [15]. These data suggest that the down-regulation of this pathway is not essential for the differentiation of human MSC into hepatocytes. Therefore, in our hands the activation or inhibition of Wnt/ β -catenin signaling pathway did not lead the hepatogenesis of human MSCs. However, the activation of Wnt signaling during hepatocytes differentiation might be associated with the generation

of a tumoral phenotype and the expression of proteins related to liver cancer. Wnt/ β -catenin pathway has been involved in the development, maintenance and differentiation of normal and malignant liver progenitor cells or MSC [16]. The sequence of molecular events leading to liver carcinogenesis is not well known. The accumulation of genetic alterations driving a cirrhotic liver to cancer is a multistep process originating from stem cells or mature hepatocytes [21]. Adult human MSC may be targets for malignant transformation and may undergo spontaneous transformation after long-term *in vitro* culture, supporting the hypothesis that some CSC originate from multipotential stem cells [22,23]. *In vitro* data from transgenic mice suggest that activation of the Wnt/ β -catenin pathway in epidermal stem cells leads to epithelial cancers [24]. The nuclear translocation of β -catenin in neoplastic hepatocytes leads to retrodifferentiation into immature hepatocyte progenitors [10]. Many *in vivo* studies have associated Wnt/ β -catenin pathway activation with hepatic tumoral processes, such as

Table 2. Comparative analysis by DIGE of proteins differentially expressed in hepatocytes obtained with CM1 or CM2 differentiation protocols.

Protein name	NCBI Acc n°	Sequenced Peptides	Sequence Cov (%)	Av. Ratio CM1/CM2	p value	Subcellular location	Molecular function
Structural proteins							
Tropomyosin beta chain	P07951	10	33	-2,68	0,0031	Cyt	Muscle contraction
Transgelin	Q01995	5	32	-9,61	0,0024	Cyt/Nuc	Muscle protein
Collagen alpha-2 (VI) chain	P12110	3	2,9	-	-	Secr	Extracellular matrix structural constituent
Chaperones							
Heat-shock protein beta-1	P04792	7	40	-	-	Cyt/Nuc	Heat shock protein binding
DnaJ homolog subfamily B member 11 precursor	Q9UBS4	1	17	-4,82	0,0015	ER	Heat shock protein binding
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	P62937	2	17	-	-	Cyt	Isomerase
Metabolic enzymes							
Triosephosphate isomerase	P60174	11	56	1,45	0,0260	Cyt	Isomerase
Inorganic pyrophosphatase	Q15181	2	14	1,57	0,0270	Cyt	Inorganic diphosphatase activity
Adenine phosphoribosyltransferase	P07741	4	25	1,89	0,0027	Cyt	AMP binding
L-lactate dehydrogenase beta chain	P07195	5	29	-9,64	0,0026	Cyt	Oxidoreductase
NADH ubiquinone oxidoreductase 30 kDa subunit	O75489	1	9	-	-	Mit	NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity
Glutamate dehydrogenase 1 mitochondrial	P00367	1	8	-	-	Mit	Oxidoreductase
Apoptosis-related proteins							
Peroxisredoxin-4	Q13162	4	16	-	-	Cyt	Thioredoxin peroxidase activity
Elongation factor 1-delta	P29692	4	24	-	-	Cyt	Signal transducer activity
Annexin A5	P08758	22	73	-	-	Cyt	Calcium-dependent phospholipid binding
Proteases							
Cathepsin B precursor	P07858	4	18	2,79	0,0140	Lys	Hydrolase, protease, thiol protease
Cathepsin D precursor	P07339	7	29	1,57	0,0410	Lys	Aspartyl protease, hydrolase

Cyt: Cytoplasm; Nuc: Nucleus; Secr: Secreted protein; ER: Endoplasmic reticulum; Mit: Mitochondria; Lys: Lysosome.
doi:10.1371/journal.pone.0034656.t002

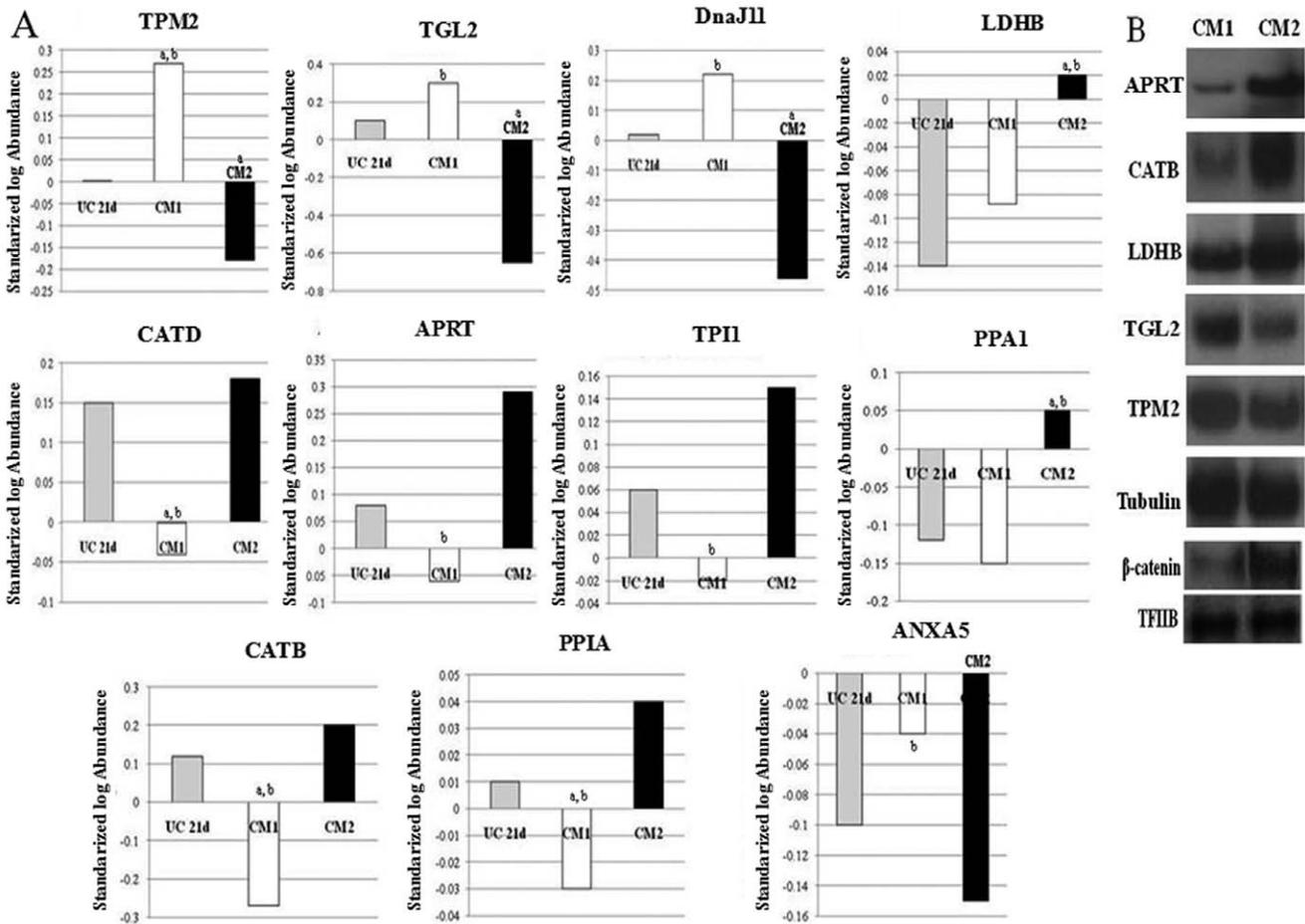


Figure 6. The activation of Wnt/ β -catenin during hepatocyte differentiation is associated with the presence of related proteins to tumoral phenotype. Relative abundance of specific proteins (DIGE analysis) in human mesenchymal stem cells undifferentiated after 21 days of culture (UC21d) and in mesenchymal stem cells differentiated into hepatocytes with conditioned medium 1 (CM1) or 2 (CM2). B) Western blot confirmation of the changes observed by DIGE analysis in the abundance of some proteins in CM1 and CM2 hepatocytes: Adenine phosphoribosyl transferase (APT), cathepsin B precursor (CATB), L-lactate dehydrogenase β chain (LDHB), transgelin (TGL2), tropomyosin β chain (TPM2) and nuclear β -catenin. Tubulin and TFIIB were used as cytoplasm and nuclear loading control respectively. doi:10.1371/journal.pone.0034656.g006

hepatocellular carcinoma or hepatoblastoma [9,25,26]. Aberrant deregulation of Wnt signaling has been implicated as a major mechanism of liver tumorigenesis [27,28] and up-regulation of Wnt signaling is a hallmark of hepatoblastoma, the predominant hepatic neoplasm in infants and children. Wnt/ β -catenin activation has been found to be associated with increases in *c-myc* and cyclin D1 staining in tumours of patients with hepatoblastoma [29]. In the case of hepatocellular carcinoma molecular alterations responsible for its development and progression include: 1) loss of tumor suppressors genes, as p53 and/or activation of cyclin D1, 2) activation of oncoproteins as *c-myc*, and 3) alterations in Wnt signaling leading to nuclear accumulation of β -catenin [10,30]. Our results show that the majority of these alterations (loss of p53, nuclear accumulation of β -catenin or *c-myc* overexpression), are present, along with the activation of Wnt signaling, in the hepatocytes obtained after CM2 treatment. Protein p53 is implicated in the control of cell cycle, apoptosis, DNA repair and angiogenesis and deregulation of p53 favors the development of liver tumor [31]. The loss of p53 has been described in many types of human tumors, particularly in 30%–60% of hepatocellular carcinoma contributing with the tumor progression [32]. The increases of *c-myc* observed in

hepatocytes obtained by CM2 and the Wnt/ β -catenin activation could also suggest a transformation of these cells into CSC. This hypothesis is reinforced with data obtained in CM2-treated cells related to an abnormal proliferation, higher PCNA expression, cell cycle alteration and secondary spheroids formation. These results suggest that in contrast to undifferentiated or CM1-treated cells, CM2-treated cells conserve stemness capability. This capability to form spheroids is intrinsic of stem cells or CSC. Sphere forming ability is known to be one of properties of CSCs [33,34]. Secondary spheres formation after seeding cells at clonal density confirms that spheres formation reflects auto-renewal rather than cell aggregation. In addition the increased expression of CD13, CD49e, CD133, CD166 or VEGFR2 in CM2-treated cells suggests also similarities to CSC. Some proteins as CD13 or CD49e participate in process of chemotaxis, invasion and metastasis of malignant cells [35]. CD13 is an aminopeptidase N with matrix metalloproteinase activity that has been shown to play a role in tumor angiogenesis, invasion and metastasis, radiation resistance, and antiapoptosis [36,37] and it has been involved with human liver CSC [38]. Haraguchi et al showed that the suppression of CD13 inhibited self renewal and the tumor initiation ability of CD13⁺ cells [38]. CD49e, also known as

Table 3. Primers used for quantitative RT-PCR analyses.

Albumin (ALB)	F:	5' TGA GAA AAC GCC AGT AAG TGA C 3'
	R:	5' TGC GAA ATC ATC CAT AAC AGC 3'
α-Fetoprotein (AFP)	F:	5' GCT TGG TGG TGG ATG AAA CA 3'
	R:	5' TCC TCT GTT ATT TGT GGC TTT TG 3'
CK18 (KRT18)	F:	5' CCC GTC ACG CCC TAC AGA T 3'
	R:	5' ACC ACT TTG CCA TCC ACT ATC C 3'
C/EBPα (CEBPG)	F:	5' CCC GCC CGT GGT GTT ATT 3'
	R:	5' GGT TGC GTC AGT CCC GTG TA 3'
Cytochrome P450 CYP3A5	F:	5' GAT CCC CTT GAA ATT AGA CAC G 3'
	R:	5' TTG AAA TCT CTG GTG TTC TGG 3'
α1-antitrypsin (SERPINA1)	F:	5' AAG GTG CCT ATG ATG AAG CGT 3'
	R:	5' GTG ATG CCC AGT TGA CCC A 3'
Lrp5/6	F:	5' GCA GCC TTT CTT CCA CAC TC 3'
	R:	5' CTC CTG CCT TAC ACG TCC T 3'
Frizzled-3 (FZD3)	F:	5' TGG AGC CAT TCC ACC CTA TG 3'
	R:	5' GAA CCT ACT GCA TTC CAT ATC 3'
c-myc MYC	F:	5' ACC ACC AGC AGC GAC TCT GAG GA 3'
	R:	5' CGT AGT TGT GCT GAT GTG TGG AGA 3'
18S Ribosomal RN18S1	F:	5' GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT 3'
	R:	5' CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG 3'

doi:10.1371/journal.pone.0034656.t003

integrin α 5, is identified as one of the fibronectin receptor and its expression is increased in the hepatocellular carcinoma cell lines MHCC97 [39] and SMMC-7721 [35]. Angiogenesis is important for tumor growth, and is regulated by vascular endothelial growth factor (VEGF). Hepatocellular carcinoma is a solid tumor with rich neovasculature and VEGFR2 overexpression has been localized in tumoral hepatocytes [40]. CD133 is a CSC marker associated with radioresistance and chemoresistance in various cancers and has been also identified as specific antigenic marker of liver CSC [41,42].

Finally, our proteomic analysis showed a higher presence of hepatocellular carcinoma-related proteins, such as cathepsin β precursor, cathepsin D precursor, adenine phosphoribosyl transferase, L-lactate dehydrogenase, triosephosphate isomerase, inorganic pyrophosphatase or peptidyl prolyl cis-trans isomerase, in CM2 treated cells compared to CM1 treated cells. A high expression of these proteins has been observed in hepatic tumor and metastasis [43,44,45]. Some of the detected proteins in this study participate in processes associated with the pathogenesis and the metastatic spread of hepatocellular carcinoma, such as cell motility and invasion, metabolism and signal transduction. Cathepsin-D has been reported to play an essential role in multiple tumor progression steps, affecting cell proliferation, angiogenesis, and apoptosis. Other reports also suggest that cathepsin D is a key mediator in induced apoptosis [46,47]. Adenine phosphoribosyltransferase is an enzyme involved in the purine nucleotide salvage pathway, which is up-regulated in hepatocellular carcinoma and has been associated with Wnt/

β -catenin activation [30]. Tumor formation is generally linked to increased activity of glycolytic enzymes, such as lactate dehydrogenase β [45,43,48] or triosephosphate isomerase [45,49] and both proteins have been shown to be increased in CM2 treated cells in the present study. The reduction in LDH activity has been reported to result in diminished tumorigenicity, demonstrating that LDH plays a key role in tumor maintenance [50]. Peptidyl-prolyl isomerase (Cyclophilin A) has been implicated in several pathological processes, including hepatocellular carcinoma [51,52]. Other studies have also showed the up-regulation of inorganic pyrophosphatase during hepatocellular carcinoma [45].

In contrast, other proteins are down-regulated in tumoral processes, including hepatocellular carcinoma. Tropomyosin β chain, transgelin or annexin A5, with a lower expression in CM2-treated cells compared to CM1-treated cells, are down-regulated proteins in hepatocellular carcinoma. Tropomyosin plays a role of stabilization of actin filaments and in the suppression of cellular transformation in non muscle cells, such as hepatocytes [53]. Other studies showed a decreased expression of this protein in hepatocellular carcinoma [54]. Transgelin is also a specific protein of smooth muscle cells, but its involvement in tumoral processes as a novel tumor suppressor protein has been documented. The loss of transgelin is a characteristic signature of colon and prostate carcinogenesis and its restoration suppresses colon tumorigenicity in vivo and in vitro [55]. Besides, the promoter regions of transgelin are highly methylated in hepatocellular carcinoma [56]. Our study shows that the expression of transgelin was significantly decreased in CM2 vs. CM1 treated cells. Another protein with altered expression in our study is annexin A5. Annexins belong to a family of calcium-regulated phospholipid-binding proteins that has various intra- and extracellular roles in a range of cellular processes such as cell signalling, ion transport, cell division, and apoptosis [57]. The expression of DnaJ homologous subfamily B (member 11) was also decreased in CM2 vs. CM1 treated cells, and the decrease of this anti apoptotic protein may participate in the observed tumoral phenotype of CM2-treated cells.

In summary, our study demonstrates that Wnt/ β -catenin down-regulation is not necessary for hepatocyte differentiation of MSC. We show for the first time a cross-talk between human bone marrow MSC hepatocytes differentiation, Wnt/ β -catenin pathway and a tumoral phenotype. The activation of Wnt/ β -catenin during human MSC differentiation into hepatocytes is associated with abnormal proliferation, expression of CSC markers, spheroid formation and the generation of liver cells with tumoral characteristics, in contrast to hepatocytes differentiated without Wnt/ β -catenin activation. Exploration of the differences between cancer stem cells from normal stem cells is crucial not only for the understanding of tumor biology but also for the prevention of potential complications derived from future liver therapies with human MSC.

Materials and Methods

Ethics Statement

This study was approved by the Reina Sofia University Hospital Review Board. The procedures followed were in accordance with the ethical standards of the ethic committee from Hospital Reina Sofia and with the Declaration of Helsinki. All samples were collected after written informed consent.

Human mesenchymal stem cells (MSCs) isolation

Human bone marrow (BM) was aspirated from the iliac crest of healthy donors. Fresh BM was cultured in flasks (FalconTM, BD Pharmigen, Franklin Lakes, NJ) seeding 10 μ l BM cells/cm² with alpha-minimum essential medium (α -MEM) supplemented with

2 mM L-glutamine, 15% fetal bovine serum (FBS) (BioWhittaker, Switzerland), 100 U/ml Penicillin, 0.1 mg/ml Streptomycin and 1 ng/ml of fibroblast growth factor-basic (FGF-b, Peprotech EC, London, UK) [58]. Cells were allowed to adhere for 48 h and non-adherent cells were washed out with phosphate-buffer saline (PBS) 100 mM pH 7.4 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). After 48 h, α -MEM supplemented with 10% FBS and 1 ng/ml FGF-b was added twice weekly. All cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. When adherent cells reached 90% confluence they were detached with 0.25% trypsin-EDTA (BioWhittaker, Switzerland), washed twice with PBS, centrifuged at 1800 rpm, 5 minutes and 4°C and replated in 6-well plates (SPL life sciences, Korea) at 10³ cells/cm² and cultured under the same conditions.

In vitro hepatic differentiation

Two different differentiation protocols were applied to confluent human MSCs for their differentiation into hepatocytes. An explicative diagram is included in Supporting Information (Figure S2). In the first protocol (conditioned medium 1, CM1), cells were cultured in α -MEM containing 10% FBS, 20 ng/ml hepatocyte growth factor (HGF) and 10 ng/ml fibroblast growth factor-7 for 21 days. The second protocol (conditioned medium 2, CM2) is based in the article by Kuan der Lee [17]. Briefly, human MSCs were previously treated with epidermal growth factor (EGF) 20 ng/ml and FGF-b 10 ng/ml for 48 h. Then, 20 ng/ml HGF, 10 ng/ml FGF-b and 0.61 g/L nicotinamide were added for one week. Finally, cells were treated for fourteen days with 1 μ M dexamethasone, 20 ng/ml oncostatin and 10 μ l/ml ITS. Treatments were refreshed 2–3 times per week. All cytokines were purchased from Peprotech EC (Paris, France), nicotinamide and dexamethasone were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO) and ITS from BD Pharmigen (Franklin Lakes, NJ, USA). Nuclear and cytoplasmic proteins and RNA were collected at 7, 14 and 21 days of culture.

Flow Cytometry Analysis

For immunophenotype studies, basal and differentiated human MSC were detached and stained with fluorescein- or phycoerythrin-coupled antibodies and analyzed with a FACSCalibur flow cytometer (Becton, Dickinson). Anti-CD34-FITC, anti-CD45-PE and anti-CD133 were purchased from Miltenyi Biotec (Berlin, Germany), anti-CD73-PE, anti-CD90-PE and anti-CD166 were from BD Pharmigen (Franklin Lakes, NJ), anti-CD13-FITC, anti-CD44-FITC and anti-CD49e-FITC were from Beckman Coulter, Inc (CA, USA), anti-CD105-FITC was from R&D Systems (MN, USA), and anti-CD29-FITC, anti-CD184-PE and VEGFR2 were from eBioscience, Ltd (London, UK).

Quantitative real time RT-PCR analysis

Total RNA was extracted following a modification of Chomczynski and Sacchi's protocol with Trizol reagent Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Total RNA was quantified by spectrophotometry (ND-1000, Nanodrop Technologies, DE, USA). One μ g of total RNA was treated with DNase (DNase kit, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) and complementary DNA was amplified using the QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen, Hilden, Germany). Primers were designated with the free Oligo 7 software and their sequences are listed in Table 3. Quantitative real-time PCR was performed in a Light cycler 480 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

Immunocytochemical analysis

Human MSCs were cultured on chamber slides (Nunc, Rochester, NY, USA) for 21 days and then were fixed and treated

during 20 min with 0.01 M citrate buffer pH 6. Cells were incubated for 1 h at room temperature with: anti-PCNA (1:75 dilution, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA), anti-albumin (DakoCytomation Glostrup, Denmark, 1:2000 dilution), anti- α -fetoprotein (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, 10 μ g/ml), anti-cytokeratin-19 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, 10 μ g/ml), or anti- α -1-antitrypsin (DakoCytomation Glostrup, Denmark, 1:800 dilution) primary antibodies. HRP-labelled polymer conjugated to secondary antibodies was used for 30 minutes at room temperature and diaminobenzidine was added to detect positive staining. Finally, cells were counterstained with hematoxylin (DakoCytomation Glostrup, Denmark). During all the procedure three washes with PBS were performed after each step.

Confocal microscopy analysis

Undifferentiated and differentiated human MSCs were cultured on chamber slides and, after the corresponding treatments; they were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 15 minutes at room temperature. Samples were then treated with chilled methanol (−20°C) for 10 min and washed in PBS (3 \times , for 5 min) and then sequentially incubated for 60 minutes each with anti- β -catenin (1:50, BD Pharmigen, Franklin Lakes, NJ) and anti-mouse IgG-FITC (DakoCytomation Glostrup, Denmark). Between incubations, slides were washed with PBS+1% BSA (Sigma-Aldrich) for 10 minutes. DAPI (Invitrogen, CA, USA) was used for nuclear stain. Cells were examined by confocal fluorescence microscopy using a confocal microscope (LSM 5 Exciter Carl Zeiss).

Cell count

The number of undifferentiated cells, CM1 and CM2-treated cells was counted at 0, 7, 14 and 21 days of culture. Cells were treated with Trypsin-EDTA (Sigma), inactivated with medium plus FBS and washed with PBS. Trypan blue was used to measure the cellular viability and the count was carried out with a Neubauer chamber.

Cell cycle

For cell cycle, the different types of cells (undifferentiated, CM1 and CM2-treated cells) were harvested after 21 days of differentiation. Cells were trypsinized and subsequently fixed in 70% cold ethanol overnight. After cells were centrifuged and washed with Hank's solution 1 \times (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) twice. Cells were lysated with DNA extraction buffer which contained citric acid 0.1 M and anhydrous disodium phosphate 0.2 M (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) for 5 minutes. After incubation, cells pellets were resuspended in 100 μ l staining buffer which containing 50 μ g/ml propidium iodine, 50 μ g/ml RNase, 0.1% Triton-X-100 and 0.1 M EDTA in PBS (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Cells were incubated for 30 min in darkness. Finally, cells were resuspended in PBS and they were acquired at low speed using FACScaliber (Becton Dickinson, CA, USA). Cell cycle analysis was performed on FlowJo program based on the mathematical algorithm of Watson (Becton Dickinson, CA, USA).

Spheroid formation assay

Figure S3 from Supporting Information section indicates the followed steps for spheroids assay. After 21 days of culture, cells were collected with Trypsin-EDTA and harvested at 50000 cell/ml in low adherence plates (6 wells) with DMEM:H12 medium without glutamine, antibiotics or serum and plus 20 ng/ml EGF (Peprotech, NJ, USA), 10 ng/ml bFGF (Peprotech), B27 1 \times (Invitrogen, CA, USA) and insulin 100 IU (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark). After 4 days of culture, spheres formation

was visualized in a microscope and the number of cells after trypsin-EDTA digestion was counted.

To analyze the number of secondary spheroids undifferentiated cells, CM1 and CM2 treated cells were harvested at clonal dilution (cell/ul) on low adherence plates. After 4 days of culture the number of spheres was counted in an inverted microscope. Three experiments were carried out and the data are expressed as mean of number of spheres \pm standard deviation. Representative microphotographs of secondary spheroids were taken in an inverted microscope to 10 \times .

To check 3-dimensional structure of spheroids, undifferentiated cells, CM1 and CM2-treated cells were collected from plates and stained with DAPI for 5 minutes. Subsequently cell were centrifuged gently and resuspended in 15 μ l of PBS. Spheroids' mounting was carried out according to the protocol described by Weiswald et al [59]. For 3D reconstruction, a stack of confocal images was collected through the spheroids with step size of 0.488 μ m between adjacent optical planes, starting from one pole of the spheroids. 360 $^\circ$ 3D projects plugging from ImageJ was used to generate a 3D animation.

Two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) analysis

After acetone precipitation, protein samples (Control cells at 0 and 21 days of culture and hepatocytes obtained by CM1 or CM2) were solubilized in 2-D DIGE sample buffer: 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris, buffered to pH 8. Protein concentration was determined using the Bradford's assay (Bio-Rad). Then, 50 μ g protein was labelled with 400 pmol of CyDye DIGE Fluor minimal dyes (GE Healthcare) and incubated on ice in the dark for 30 min according to the manufacturer's instructions (Cy3, Cy5 for samples and Cy2 for internal control consisting of a mixture composed by equal amounts of protein from all samples). Paired samples were reverse-labeled in order to prevent potential dye labeling bias. The reaction was stopped by addition of 1 μ l of 10 mM lysine and incubated on ice for 10 min. Samples were cup-loaded onto IPG strips, 24 cm, pH 3–11NL (GE Healthcare), and subjected to isoelectrofocusing (IEF) in IPGphorTM IEF System (GE Healthcare) according to the manufacturer's recommendations. Upon IEF, strips were incubated in equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, a trace of bromophenol blue), containing 0.5% DTT for 15 min and thereafter in the same buffer with 4.5% iodoacetamide for 15 min. For the second dimension, strips were loaded on top of 12.5% polyacrylamide gels and run (1 W/gel) for 12–14 h until the bromophenol blue dye reached the gel bottom-end. Subsequently, 2D gels were scanned using a TyphoonTM Trio Imager (GE Healthcare) at 100 μ m resolution with $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ of 488/520, 532/580, and 633/670 nm for Cy2, Cy3, and Cy5 respectively. The photomultiplier tube was set to ensure that the maximum pixel intensity was between 90,000 and 99,000 pixels. Image analysis was performed using DeCyder 6.5 software (GE Healthcare) as described in the user's manual. Three independent experiments were performed for each experimental setup. Briefly, the differential in-gel analysis module was used for spot detection, spot volume quantification and volume ratio normalization of different samples in the same gel. Then the Biological Variation Analysis (BVA) module was used to match protein spots among different gels and to identify protein spots that exhibit significant differences. Manual editing was performed in the BVA module to ensure that spots were correctly matched between different gels, and to get rid of streaks and speckles. Differentially expressed spots were considered for MS analysis when the fold change was larger than 1.2 and the p-value after T-test was below 0.05. Preparative gels were run with 350 μ g of protein following the same procedure

described above. Proteins were visualized by staining with SYPRO Ruby Protein Gel Stain (Bio-Rad) and images were acquired with a TyphoonTM Trio Imager using $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ of 532/560 nm. Spots differentially represented were excised manually and gel specimens were processed with a MassPrep station (Waters). In-gel tryptic digestion was performed with 12.5 ng/ μ l trypsin in 50 mM ammonium bicarbonate for 12 h at 37 $^\circ$ C. The resulting peptides were extracted with 5% formic acid, 50% acetonitrile. Samples were then concentrated in a speed-vac before MS analysis.

Protein identification by LC-ESI-MS/MS analysis

Microcapillary reversed phase LC was performed with a CapLCTM (Waters) capillary system. Reversed phase separation of tryptic digests was performed with an Atlantis, C18, 3 μ m, 75 μ m \times 10 cm Nano EaseTM fused silica capillary column (Waters) equilibrated in 5% acetonitrile, 0.2% formic acid. After injection of 6 μ l of sample, the column was washed during 5 min with the same buffer and the peptides were eluted using a linear gradient of 5–50% acetonitrile in 30 min at a constant flow rate of 0.2 μ l/min. The column was coupled online to a Q-TOF Micro (Waters) using a PicoTip nanospray ionization source (Waters). The heated capillary temperature was 80 $^\circ$ C and the spray voltage was 1.8–2.2 kV. MS/MS data were collected in an automated data-dependent mode. The three most intense ions in each survey scan were sequentially fragmented by CID using an isolation width of 2.5 and relative collision energy of 35%. Data processing was performed with MassLynx 4.0. Database searching was done with ProteinLynx Global Server 2.1 (Waters) and Phenyx 2.2 (GeneBio, Geneva, Switzerland) against Uniprot knowledgebase Release 12.3 consisting of UniprotKB/Swiss-Prot Release 54.3 and UniprotKB/TrEMBL Release 37.3 with 285,335 and 4,932,421 entries respectively. The search was enzymatically constrained for trypsin and allowed for one missed cleavage site. Further search parameters were as follows: no restriction on molecular weight and isoelectric point; fixed modification, carbamidomethylation of cysteine; variable modification, oxidation of methionine.

Preparation of cell lysates for Western Blot

Cytosolic extracts were obtained with a lysis buffer A, pH 7.9, containing 10 mM Hepes, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 70 μ g/ml Protease Inhibitor Cocktail, 0.5% Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). The suspension was centrifuged (13000 rpm, 3 min and 4 $^\circ$ C) and supernatant was stored at –80 $^\circ$ C until used. Nuclear extracts were obtained by incubating the pellet obtained as described above in a lysis buffer B, pH7.9, containing 20 mM Hepes, 0.4 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 46 μ g/ml Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Protein concentration was determined using the Bradford assay (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany). For Western Blot analyses, equal amounts of protein were loaded and electrophoresed on 7% SDS-polyacrylamide gel (Invitrogen; CA, USA). The protein was transferred to a nitrocellulose membrane (Invitrogen; CA, USA), and blots were incubated in blocking solution (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany). Primary antibodies were diluted in TTBS+5% non fat dry milk powder. Anti- β -catenin antibody (Cell Signaling, Boston, MA, USA) was diluted 1:1000 before use and anti-TFIIB (1:500 dilution, Santa Cruz Biotechnology) was used as loading control of nuclear extract. Other primary antibodies used were: anti-p53 (1:500) and anti-L-lactate dehydrogenase β chain (1:200) from Santa Cruz Biotechnologies, anti-tropomyosin β chain (1:500), adenine phosphoribosyltransferase (1:500) and Transgelin (1:2000) that were purchased from Novus Biologicals Littleton, CO,

cathepsin B (4 µg/ml) from Sigma-Aldrich and tubulin 1:10000 from Abcam (Cambridge, UK) were performed. Blots were immunolabeled using a horseradish peroxidase conjugated secondary antibody and developed on autoradiographic film using the ECL Plus Western Blotting Detection System from Amersham Biosciences U.K. Limited (Little Chalfont, England).

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SD. The difference between means from two different groups was evaluated by performing a *t* test and *p* values less than 0.05 were considered significant. The data analysis was performed with SPSS.11 software.

Supporting Information

Figure S1 Movie showing the 3D structure of a representative spheroid in CM2-treated cells.
(AVI)

References

1. Haegbarth A, Clevers H (2009) Wnt signaling, *lgr5*, and stem cells in the intestine and skin. *Am J Pathol* 174: 715–721.
2. Armengol C, Cairo S, Fabre M, Buendia MA (2011) Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: the hepatoblastoma model. *Int J Biochem Cell Biol* 43: 265–270.
3. Nusse R (2005) Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 15: 28–32.
4. Tang N, Song WX, Luo J, Luo X, Chen J, et al. (2009) BMP-9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitors requires functional canonical Wnt/ β -catenin signalling. *J Cell Mol Med* 13: 2448–2464.
5. Laudes M (2011) Role of WNT pathway in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. *J Mol Endocrinol* 46(2): R65–72.
6. Ishii K, Yoshida Y, Akechi Y, Sakabe T, Nishio R, et al. (2008) Hepatic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by tetracycline-regulated hepatocyte nuclear factor 3 β . *Hepatology* 48: 597–606.
7. Yoshida Y, Shimomura T, Sakabe T, Ishii K, Gonda K, et al. (2007) A role of Wnt/ β -catenin signals in hepatic fate specification of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: G1089–G1098.
8. Ke Z, Zhou F, Wang L, Chen S, Liu F, et al. (2008) Down-regulation of Wnt signaling could promote bone marrow-derived mesenchymal stem cells to differentiate into hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 367: 342–348.
9. Wei Y, Fabre M, Branchereau S, Gauthier F, Perilongo G, et al. (2000) Activation of β -catenin in epithelial and mesenchymal hepatoblastomas. *Oncogene* 19: 498–504.
10. Zulehner G, Mikula M, Schneller D, van ZF, Huber H, et al. (2010) Nuclear β -catenin induces an early liver progenitor phenotype in hepatocellular carcinoma and promotes tumor recurrence. *Am J Pathol* 176: 472–481.
11. Monga SP, Micsenyi A, Germinaro M, Apte U, Bell A (2006) β -Catenin regulation during matrigel-induced rat hepatocyte differentiation. *Cell Tissue Res* 323: 71–79.
12. Wu XZ (2008) Origin of cancer stem cells: the role of self-renewal and differentiation. *Ann Surg Oncol* 15: 407–414.
13. Marquardt JU, Factor VM, Thorgeirsson SS (2010) Epigenetic regulation of cancer stem cells in liver cancer: current concepts and clinical implications. *J Hepatol* 53: 568–577.
14. Serakinci N, Gulberg P, Burns JS, Abdallah B, Schrodder H, et al. (2004) Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene* 23: 5095–5098.
15. Hamidouche Z, Hay E, Vaudin P, Charbord P, Schule R, et al. (2008) FHL2 mediates dexamethasone-induced mesenchymal cell differentiation into osteoblasts by activating Wnt/ β -catenin signaling-dependent *Runx2* expression. *FASEB J* 22: 3813–3822.
16. Mishra L, Banker T, Murray J, Byers S, Thenappan A, et al. (2009) Liver stem cells and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 49: 318–329.
17. Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, et al. (2004) In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 40: 1275–1284.
18. Basma H, Soto-Gutierrez A, Yannam GR, Liu L, Ito R, et al. (2009) Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes. *Gastroenterology* 136: 990–999.
19. Iwamura M, Komaki T, Kubota Y, Seita M, Kawamoto H, et al. (2010) Hepatic differentiation of mouse iPS cells in vitro. *Cell Transplant* 19: 841–847.
20. Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, Li J, Battle MA, et al. (2010) Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 51: 297–305.

Figure S2 Explicative diagram of both differentiation protocols (CM1 and CM2).
(TIF)

Figure S3 Explicative diagram of spheroid formation assay.
(TIF)

Acknowledgments

We acknowledge the technical support provided by Esther Peralbo in performing the studies with Confocal Microscopy (IMBIC).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JRM-C MDLM. Performed the experiments: C. Herencia JMM-M FC IE MB YA RS-M. Analyzed the data: C. Herencia JMM-M FC IE MB YA RS-M JRM-C. Contributed reagents/materials/analysis tools: C. Herrera JRM-C AR-A. Wrote the paper: JRM-C AR-A.

21. Llovet JM, Bruix J (2008) Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 48: 1312–1327.
22. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la FR, Cigudosa JC, et al. (2005) Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 65: 3035–3039.
23. Burns JS, Abdallah BM, Gulberg P, Rygaard J, Schroder HD, et al. (2005) Tumorigenic heterogeneity in cancer stem cells evolved from long-term cultures of telomerase-immortalized human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 65: 3126–3135.
24. Malanchi I, Peinado H, Kassen D, Hussenet T, Metzger D, et al. (2008) Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on β -catenin signalling. *Nature* 452: 650–653.
25. Yamada S, Ohira M, Horie H, Ando K, Takayasu H, et al. (2004) Expression profiling and differential screening between hepatoblastomas and the corresponding normal livers: identification of high expression of the *PLK1* oncogene as a poor-prognostic indicator of hepatoblastomas. *Oncogene* 23: 5901–5911.
26. Zimmermann A (2005) The emerging family of hepatoblastoma tumours: from ontogenesis to oncogenesis. *Eur J Cancer* 41: 1503–1514.
27. Monga SP (2009) Role of Wnt/ β -catenin signaling in liver metabolism and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 43(7): 1021–9.
28. Jeng YM, Wu MZ, Mao TL, Chang MH, Hsu HC (2000) Somatic mutations of β -catenin play a crucial role in the tumorigenesis of sporadic hepatoblastoma. *Cancer Lett* 152: 45–51.
29. Ranganathan S, Tan X, Monga SP (2005) β -Catenin and met deregulation in childhood Hepatoblastomas. *Pediatr Dev Pathol* 8: 435–447.
30. Chafey P, Finzi L, Boisgard R, Cauzac M, Clary G, et al. (2009) Proteomic analysis of β -catenin activation in mouse liver by DIGE analysis identifies glucose metabolism as a new target of the Wnt pathway. *Proteomics* 9: 3889–3900.
31. Martin J, Dufour JF (2008) Tumor suppressor and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 14: 1720–1733.
32. Teramoto T, Satonaka K, Kitazawa S, Fujimori T, Hayashi K, et al. (1994) *p53* gene abnormalities are closely related to hepatoviral infections and occur at a late stage of hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 54: 231–235.
33. Uchida Y, Tanaka S, Aihara A, Adikrisna R, Yoshitake K, et al. (2010) Analogy between sphere forming ability and stemness of human hepatoma cells. *Oncol Rep* 24: 1147–1151.
34. Cao L, Zhou Y, Zhai B, Liao J, Xu W, et al. (2011) Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. *BMC Gastroenterol* 11: 71-.
35. Fu BH, Wu ZZ, Qin J (2010) Effects of integrins on laminin chemotaxis by hepatocellular carcinoma cells. *Mol Biol Rep* 37: 1665–1670.
36. Bhagwat SV, Lahdenranta J, Giordano R, Arap W, Pasqualini R, et al. (2001) *CD13/APN* is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood* 97: 652–659.
37. Petrovic N, Schacke W, Gahagan JR, O’Conor CA, Winnicka B, et al. (2007) *CD13/APN* regulates endothelial invasion and filopodia formation. *Blood* 110: 142–150.
38. Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, Tanaka F, Ohkuma M, et al. (2010) *CD13* is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *J Clin Invest* 120: 3326–3339.
39. Tian J, Tang ZY, Ye SL, Liu YK, Lin ZY, et al. (1999) New human hepatocellular carcinoma (HCC) cell line with highly metastatic potential (MHCC97) and its expressions of the factors associated with metastasis. *Br J Cancer* 81: 814–821.
40. Huang J, Zhang X, Tang Q, Zhang F, Li Y, et al. (2011) Prognostic significance and potential therapeutic target of *VEGFR2* in hepatocellular carcinoma. *J Clin Pathol* 64: 343–348.

41. Piao LS, Hur W, Kim TK, Hong SW, Kim SW, et al. (2012) CD133+ liver cancer stem cells modulate radioresistance in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 315: 129–137.
42. Shen Y, Cao D (2012) Hepatocellular carcinoma stem cells: origins and roles in hepatocarcinogenesis and disease progression. *Front Biosci (Elite Ed)* 4: 1157–1169.
43. Chen X, Fu S, Chen F, Chen H, Chen Z (2008) Identification of tumor-associated antigens in human hepatocellular carcinoma by autoantibodies. *Oncol Rep* 20: 979–985.
44. Liu Z, Ma Y, Yang J, Qin H (2011) Upregulated and downregulated proteins in hepatocellular carcinoma: a systematic review of proteomic profiling studies. *OMICS* 15: 61–71.
45. Liang RC, Neo JC, Lo SL, Tan GS, Seow TK, et al. (2002) Proteome database of hepatocellular carcinoma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 771: 303–328.
46. Beaujourn M, Liaudet-Coopman E (2008) Cathepsin D overexpressed by cancer cells can enhance apoptosis-dependent chemo-sensitivity independently of its catalytic activity. *Adv Exp Med Biol* 617: 453–461.
47. Srisomsap C, Sawangaretrakul P, Subhasitanont P, Chokchaichamnankit D, Chiablaem K, et al. (2010) Proteomic studies of cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma cell secretomes. *J Biomed Biotechnol* 2010: 437143-.
48. Shen H, Cheng G, Fan H, Zhang J, Zhang X, et al. (2006) Expressed proteome analysis of human hepatocellular carcinoma in nude mice (LCI-D20) with high metastasis potential. *Proteomics* 6: 528–537.
49. Li L, Chen SH, Yu CH, Li YM, Wang SQ (2008) Identification of hepatocellular carcinoma-associated antigens and autoantibodies by serological proteome analysis combined with protein microarray. *J Proteome Res* 7: 611–620.
50. Fantin VR, St-Pierre J, Leder P (2006) Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 9: 425–434.
51. Chen S, Zhang M, Ma H, Saiyin H, Shen S, et al. (2008) Oligo-microarray analysis reveals the role of cyclophilin A in drug resistance. *Cancer Chemother Pharmacol* 61: 459–469.
52. Lim SO, Park SJ, Kim W, Park SG, Kim HJ, et al. (2002) Proteome analysis of hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 1031–1037.
53. Bharadwaj S, Prasad GL (2002) Tropomyosin-1, a novel suppressor of cellular transformation is downregulated by promoter methylation in cancer cells. *Cancer Lett* 183: 205–213.
54. Yokoyama Y, Kuramitsu Y, Takashima M, Iizuka N, Toda T, et al. (2004) Proteomic profiling of proteins decreased in hepatocellular carcinoma from patients infected with hepatitis C virus. *Proteomics* 4: 2111–2116.
55. Yeo M, Kim DK, Park HJ, Oh TY, Kim JH, et al. (2006) Loss of transgelin in repeated bouts of ulcerative colitis-induced colon carcinogenesis. *Proteomics* 6: 1158–1165.
56. Hirasawa Y, Arai M, Imazeki F, Tada M, Mikata R, et al. (2006) Methylation status of genes upregulated by demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine in hepatocellular carcinoma. *Oncology* 71: 77–85.
57. Fan HZ, Liu H, Zhang C, Gao DM, Xue Q, et al. (2009) Comparative proteomics and molecular mechanical analysis in CDA-II induced therapy of LCI-D20 hepatocellular carcinoma model. *J Cancer Res Clin Oncol* 135: 591–602.
58. Kotobuki N, Hirose M, Takakura Y, Ohgushi H (2004) Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artif Organs* 28: 33–39.
59. Weiswald LB, Guinebretiere JM, Richon S, Bellet D, Saubamea B, et al. (2010) In situ protein expression in tumour spheres: development of an immunostaining protocol for confocal microscopy. *BMC Cancer* 10: 106-.



Justificante de presentación electrónica de solicitud de patente

Este documento es un justificante de que se ha recibido una solicitud española de patente por vía electrónica, utilizando la conexión segura de la O.E.P.M. Asimismo, se le ha asignado de forma automática un número de solicitud y una fecha de recepción, conforme al artículo 14.3 del Reglamento para la ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes. La fecha de presentación de la solicitud de acuerdo con el art. 22 de la Ley de Patentes, le será comunicada posteriormente.

Número de solicitud:	P201330895	
Fecha de recepción:	14 junio 2013, 15:01 (CEST)	
Oficina receptora:	OEPM Madrid	
Su referencia:	900 140	
Solicitante:	Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud	
Número de solicitantes:	3	
País:	ES	
Título:	Composiciones para el tratamiento del daño hepático	
Documentos enviados:	Reivindicaciones.pdf (2 p.) Dibujos.pdf (8 p.) Resumen.pdf (1 p.) Descripcion.pdf (25 p.) OLF-ARCHIVE.zip SEQLPDF.pdf (1 p.) SEQLTXT.txt	package-data.xml es-request.xml application-body.xml es-fee-sheet.xml feesheet.pdf request.pdf
Enviados por:	CN=G. Fuster 26814,O=Hoffmann Eitle,C=DE	
Fecha y hora de recepción:	14 junio 2013, 15:01 (CEST)	
Codificación del envío:	01:12:14:26:B4:E3:DA:45:96:99:A9:AB:16:E7:FB:5D:05:F5:5B:E1	

/Madrid, Oficina Receptora/

	TELÉFONO: FAX: PERSONA DE CONTACTO: MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(6-3) SOLICITANTE 3:	INVENCIÓN LABORAL: CONTRATO: SUCESIÓN: DENOMINACIÓN SOCIAL: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/CIF/PASAPORTE: CNAE: PYME: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: PERSONA DE CONTACTO: MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Universidad de Córdoba España ES Q1418001B Avda. Medina Azahara, 5 Córdoba 14 Córdoba 14004 España ES <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
(7-1) INVENTOR 1:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	Almadén Peña Yolanda España ES 30532724-V
(7-2) INVENTOR 2:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	Herencia Bellido Carmen España ES 30964373-W
(7-3) INVENTOR 3:	APELLIDOS: NOMBRE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/PASAPORTE:	Muñoz Castañeda Juan Rafael España ES 30821424-K
(8) TÍTULO DE LA INVENCIÓN:		Composiciones para el tratamiento del daño hepático
(9) PETICIÓN DE INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA:	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(10) SOLICITA LA INCLUSIÓN EN EL PROCEDIMIENTO ACELERADO DE CONCESIÓN	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:	SI NO	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>

(12) DEPÓSITO:	REFERENCIA DE IDENTIFICACIÓN: INSTITUCIÓN DE DEPÓSITO: NÚMERO DE DEPÓSITO: ACCESIBILIDAD RESTRINGIDA A UN EXPERTO (ART. 45.1. B):	
(13) DECLARACIONES RELATIVAS A LA LISTA DE SECUENCIAS:	LA LISTA DE SECUENCIAS NO VA MÁS ALLÁ DEL CONTENIDO DE LA SOLICITUD LA LISTA DE SECUENCIAS EN FORMATO PDF Y ASCII SON IDENTICOS	<input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>
(14) EXPOSICIONES OFICIALES:	LUGAR: FECHA:	
(15) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:	PAÍS DE ORIGEN: CÓDIGO PAÍS: NÚMERO: FECHA:	
(16) AGENTE/REPRESENTANTE:	APELLIDOS: NOMBRE: CÓDIGO DE AGENTE: NACIONALIDAD: CÓDIGO PAÍS: DNI/CIF/PASAPORTE: DOMICILIO: LOCALIDAD: PROVINCIA: CÓDIGO POSTAL: PAÍS RESIDENCIA: CÓDIGO PAÍS: TELÉFONO: FAX: CORREO ELECTRÓNICO: NÚMERO DE PODER:	Fúster Gustavo 1039/1 España ES 33530042-K Paseo de la Habana, 9-11 Madrid 28 Madrid 28036 España ES +34912986178 +34915639710 gfuster@hoffmanneitle.com
(17) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:	DESCRIPCIÓN: REIVINDICACIONES: DIBUJOS: RESUMEN: FIGURA(S) A PUBLICAR CON EL RESUMEN: ARCHIVO DE PRECONVERSION: DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN: LISTA DE SECUENCIAS PDF: ARCHIVO PARA LA BUSQUEDA DE LS: OTROS (Aparecerán detallados):	<input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 25 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de reivindicaciones: 16 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de dibujos: 8 <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 <input type="checkbox"/> N.º de figura(s): <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input checked="" type="checkbox"/> N.º de páginas: 1 <input checked="" type="checkbox"/>
(18) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASA PREVISTO EN EL ART. 162 DE LA LEY 11/1986 DE PATENTES, DECLARA: BAJO JURAMIENTO O PROMESA SER CIERTOS TODOS LOS DATOS QUE FIGURAN EN LA DOCUMENTACIÓN ADJUNTA:	DOC COPIA DNI: DOC COPIA DECLARACIÓN DE CARENCIA DE MEDIOS: DOC COPIA CERTIFICACIÓN DE HABERES: DOC COPIA ÚLTIMA DECLARACIÓN DE LA RENTA: DOC COPIA LIBRO DE FAMILIA: DOC COPIA OTROS:	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> N.º de páginas: <input type="checkbox"/> N.º de páginas:
(19) NOTAS:		
(20) FIRMA:		

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE:

DE, Hoffmann Eitle, G. Fuster

LUGAR DE FIRMA:

26814

Madrid

FECHA DE FIRMA:

14 Junio 2013



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS		
Hoja informativa sobre pago de tasas de una solicitud de patente o modelo de utilidad		
1. REFERENCIA DE SOLICITUD	900 140	
2. TASAS	Importe (en euros)	
Concepto	Código de barras asignado	Importe
IE01 Solicitud de demanda de depósito o de rehabilitación.	85011584335	62,43
IE02 Solicitud de cambio de modalidad en la protección		0,00
IE04 Petición IET		0,00
IE06 Prioridad extranjera (0)		0,00
El solicitante se acoge a la exención del pago de tasas	<input type="checkbox"/>	
El solicitante es una Universidad pública	<input type="checkbox"/>	
	Importe total	62,43
	Importe abonado	62,43

Se ha aplicado el 15% de descuento sobre la tasa de solicitud de acuerdo con la D. Adic. 8.2 Ley de Marcas.

Composiciones para el tratamiento del daño hepático.

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología y la medicina, y se refiere al uso del contenido intracelular de células madre mesenquimales humanas (MSC) en la elaboración de un medicamento para la regeneración celular, tisular y de órganos, y especialmente del hígado. Preferiblemente, se refiere al uso del contenido intracelular de células madre mesenquimales humanas (MSC) en la
10 elaboración de un medicamento para el tratamiento de patologías hepáticas, y preferiblemente para el tratamiento del daño hepático agudo.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 El hígado tiene una gran capacidad de regeneración en respuesta a una lesión. Los hepatocitos maduros pueden volver a entrar en ciclo celular y dividirse para restaurar la masa hepática. Sin embargo después de un daño hepático crónico, la capacidad de regeneración de los hepatocitos se pierde. En estos casos, el hígado es capaz de mantener su masa funcional, y en clínica se denomina insuficiencia hepática
20 (Forbes, 2008. *Gut*. 57 (2) 153-155).

En las últimas décadas la morbilidad y la mortalidad por patologías hepáticas han aumentado considerablemente. En la actualidad, el trasplante de hígado ortópico es la única opción terapéutica para los pacientes con fallo hepático fulminante. Sin
25 embargo, esta opción tiene los inconvenientes propios del procedimiento: mala supervivencia a largo plazo, escasez de órganos, altos costos y problemas inmunológicos (Blachier *et al.* 2013. *J. Hepatol.* Mar. 58(3), 593-608).

La alternativa al trasplante es la terapia celular. Desde hace más de 30 años se
30 llevan a cabo trasplantes de hepatocitos y muchos ensayos clínicos se han dirigido en esta línea para tratar muchas enfermedades hepáticas (Muraca, 2011. *Digestive and Liver Disease*, 43 (3), 180-187). Sin embargo, el trasplante de células de hígado tiene problemas prácticos: escasez de donantes, riesgo de rechazo, la baja viabilidad de los hepatocitos (sólo el 30% sobreviven en el trasplante) y la incapacidad de

mantener y amplificar los cultivos de células (Wu *et al.*, 2008. *Hepatology* 47 (1) 279-287).

5 Actualmente y teniendo en cuenta los antecedentes, se está trabajando en el desarrollo de terapias alternativas que se centren en el uso de células madre para reparar y regenerar hígados lesionados (Merion *et al.*, 2010. *Semin. Liver Dis.* 30(4): 411-421; Tuttle-Newhall *et al.*, 2005. *Curr Probl Surg* 42(3):144-183). En los últimos años la información conocida acerca de las células madre se ha incrementado de manera notable y se cree que estas células podrían actuar como tratamiento para
10 contribuir a la regeneración de hígados lesionados. Las células madre embrionarias, iPS o adultas han sido diferenciadas *in vitro* hasta hepatocitos. Otros estudios *in vivo* también han demostrado los efectos de la infusión de células madre en distintas lesiones hepáticas.

15 Sin embargo, existen muchos interrogantes aún sin resolver como por ejemplo, cuál es la mejor fuente de células madre para llevar a cabo las terapias hepatológicas o cuáles son los mecanismos que permiten que estas células ejerzan efectos hepatoprotectores. Tampoco está muy claro si los efectos beneficiosos producidos por estas células madre son debidos a su anclaje en el hígado o a la liberación de su
20 contenido intracelular.

Los resultados actuales apuntan que el mejor tipo de células madre para el trasplante hepático son las células madre mesenquimales (MSC). Las MSC presentan diversas ventajas que conviene resaltar: son relativamente fáciles de
25 obtener, tienen un amplio potencial de diferenciación hacia muchos tipos de células, se pueden obtener del mismo paciente y sin modificaciones genéticas y son muy resistentes a daño oxidativo.

Las MSC pueden formar hepatocitos *in vitro* (Aurich *et al.*, 2009. *Gut* 58 (4), 570-581) y poseen la capacidad de secretar factores solubles que estimulan la regeneración
30 tisular (Caplan *et al.*, 2006. *J. Cell. Biochem.* 98, 1076-1084). En un modelo experimental de fibrosis se ha demostrado que el trasplante de MSC puede reducir el daño y restaurar la funcionalidad hepática (Cho *et al.*, 2011. *Liver Int.* 31 (7), 932-939). Los estudios en modelos animales han revelado que el efecto del trasplante de
35 hepatocitos derivados de MSC, por vía intravenosa hacia el hígado, son beneficiosos

Hasta el momento sólo se han realizado estudios en pacientes en fase terminal de enfermedad hepática causada por hepatitis B, hepatitis C y fibrosis alcohólica. Los resultados apuntan que la inyección de MSC puede utilizarse para el tratamiento terminal ya que los resultados muestran efectos clínicos relevantes (Kharaziha *et al.* 2009. *Europea Jornal of Gastroenterología and Hepatology* 21(10), 1199-1205).

Aunque existan muchos estudios experimentales y clínicos que demuestran un aumento en la regeneración hepática después del tratamiento con MSC, no están claros los mecanismos que promueven este efecto hepatoprotector ni las estrategias para encontrarlos. Las MSC podrían diferenciarse hasta hepatocitos funcionales y secretar una amplia variedad de factores de crecimiento y citoquinas con los que disminuir la respuesta inflamatoria, reducir la apoptosis de hepatocitos y finalmente, mejorar la funcionalidad hepática.

Sin embargo, la administración de células madre mesenquimales en un organismo, tiene numerosos problemas:

Así, cuando las células administradas proceden del mismo individuo, es decir, trasplante autólogo, los principales problemas están relacionados con el manejo de las mismas y con la optimización de la dosis. Además, las células pueden ser de difícil control y existe la posibilidad de generar otros problemas, como por ejemplo la generación de tumores (Koh y Kang, 2012. *EMBO Rep.* May, 13(5): 412–422)

Por otro lado, cuando las células administradas proceden de otro individuo, es decir, trasplante alogénico, aparecen problemas asociados a la compatibilidad y otros que pueden aparecer en el proceso de inmunosupresión del receptor. Las MSC tienen propiedades inmunomoduladoras por lo que están indicadas para prevenir y reducir el rechazo. Sin embargo el uso o la terapia con este tipo de células ha sido relacionado con la formación de tumores (Mishra *et al.*, 2008. *CancerResearch.* 68 (11), 4331–4339).

Parte de los efectos desencadenados por las MSC se deben a las interacciones célula-célula promovidas por las proteínas de membrana. A través de la sonicación celular podemos lisar las MSC y tras centrifugación obtener el contenido intracelular

desprovisto de proteínas de membrana. El uso exclusivo del contenido intracelular de las células madre mesenquimales, ayudaría a evitar estos problemas.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Un aspecto de la invención se refiere al uso del contenido intracelular de una célula madre mesenquimal aislada en la elaboración de un medicamento. Alternativamente, se refiere al contenido intracelular de una célula madre mesenquimal aislada para su
10 uso como medicamento. En una realización preferida, la célula madre mesenquimal aislada es una célula humana.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del contenido intracelular de una célula madre mesenquimal aislada en la elaboración de un medicamento para la reparación
15 y regeneración de órganos y tejidos. Alternativamente se refiere al contenido intracelular de una célula madre mesenquimal aislada para la reparación y regeneración de órganos y tejidos. Una realización preferida de este aspecto se refiere al uso del contenido intracelular de una célula madre mesenquimal aislada en la elaboración de un medicamento para la reparación y regeneración del hígado, o
20 alternativamente, al contenido intracelular de una célula madre mesenquimal aislada para la reparación y regeneración del hígado. En otra realización preferida, la célula madre mesenquimal aislada es una célula humana. En otra realización preferida, la célula madre mesenquimal aislada procede del mismo individuo al que se va administrar el contenido intracelular.

25 Otro aspecto de la invención se refiere al uso del contenido intracelular de una célula madre mesenquimal aislada en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del daño hepático, o alternativamente, al contenido intracelular de una célula madre mesenquimal aislada para el tratamiento del daño hepático. En una
30 realización preferida de este aspecto de la invención, el daño hepático es daño hepático agudo. En otra realización preferida, la célula madre mesenquimal aislada es una célula humana. En otra realización preferida, la célula madre mesenquimal aislada procede del mismo individuo al que se va administrar el contenido intracelular.

35

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende el contenido intracelular de células madre mesenquimales. Preferiblemente, la célula madre mesenquimal aislada es una célula humana. Más preferiblemente, la composición es una composición farmacéutica. Aún más preferiblemente, la composición además comprende excipientes farmacéuticamente aceptables.

Otro aspecto se refiere al uso de la composición de la invención en la elaboración de un medicamento para la reparación y/o regeneración de órganos y/o tejidos, o alternativamente a la composición de la invención para la reparación y/o regeneración de órganos y/o tejidos. Más preferiblemente, para la reparación y/o regeneración del hígado. En otra realización preferida, la célula madre mesenquimal aislada procede del mismo individuo al que se va administrar la composición de la invención.

Otro aspecto se refiere al uso de la composición de la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del daño hepático, o alternativamente a la composición de la invención para el tratamiento del daño hepático. Más preferiblemente, el daño hepático es agudo. En otra realización preferida, la célula madre mesenquimal aislada procede del mismo individuo al que se va administrar la composición de la invención.

Otro aspecto se refiere al uso de la composición de la invención para la conservación extra-corpórea de órganos extraídos para un posterior trasplante. En una realización preferida, el órgano que se va a conservar es el hígado.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han evaluado el efecto beneficioso del contenido intracelular de las células mesenquimales (MSC) en hígados lesionados por tioacetamida. La solución actual para afrontar el daño hepático agudo consiste en el trasplante hepático, aunque dada la velocidad de la patología y los problemas intrínsecos de realizar un trasplante, en muchas ocasiones no puede ser realizado. Además han encontrado una serie de diferencias que indican que la infusión de contenido intracelular de las células madre mesenquimales presenta ventajas frente

al trasplante de estas células intactas. Así la presente invención proporciona un método hepatoprotector y de mejora de la función hepática en individuos con daño hepático agudo mediante la infusión de contenido intracelular de MSC por la vena porta.

5

Por tanto un primer aspecto de la invención se refiere al uso del contenido intracelular de células madre mesenquimal aislada en la elaboración de un medicamento. Alternativamente, se refiere al contenido intracelular de una célula madre mesenquimal aislada para su uso como medicamento. En una realización preferida, la célula madre mesenquimal aislada es una célula humana.

10

Las células madre mesenquimales son obtenidas de un tejido o un órgano de un individuo en un estado de crecimiento posterior al estado embrionario, preferiblemente de su médula ósea. Preferiblemente, las células madre de la investigación han sido aisladas en un estado post-natal. Preferiblemente han sido aisladas de un mamífero, y más preferiblemente de un humano, incluyendo neonatos, juveniles, adolescentes y adultos. En otra realización preferida, la célula madre mesenquimal aislada procede del mismo individuo al que se va administrar el contenido intracelular.

20

El término "individuo" incluye a cualquier animal, en particular, animales vertebrados, preferentemente mamíferos, tales como ratones, ratas, caballos, cerdos, conejos, gatos, ovejas, perros, vacas, seres humanos, etc. El término mamífero, tal como se entiende en esta memoria, hace referencia a cualquier organismo del superreino *Eukaryota*, reino *Metazoa*, Phylum *Chordata*, clase *Mammalia*. Así, la sangre puede obtenerse del seno coronario de ratón, rata, cerdo y humano. En otra realización aún más preferida, el mamífero es el ser humano.

25

Si se desea, las células madre mesenquimales que dan lugar al lisado intracelular de la invención puede ser modificada genéticamente por cualquier método convencional incluyendo, a modo ilustrativo, no limitativo, procesos de transgénesis, deleciones o inserciones en su genoma que modifiquen la expresión de genes que sean importantes para sus propiedades básicas (proliferación, migración, diferenciación, etc.), o mediante la inserción de secuencias de nucleótidos que codifiquen proteínas de interés como, por ejemplo, proteínas con propiedades terapéuticas. Por tanto, en

30
35

otra realización preferida, la célula de la invención ha sido modificada genéticamente.

5 La progenie de una sola célula clonal puede expandirse mediante numerosos pases, sin aparentemente sufrir ninguna anomalía cromosómica, o la pérdida de sus propiedades de crecimiento y diferenciación.

10 Por tanto, si se desea, las células mesenquimales pueden expandirse clonalmente usando un procedimiento adecuado para clonar poblaciones celulares. Por ejemplo, una población proliferada de células puede recogerse físicamente y sembrarse en una placa separada (o los pocillos de una placa "multi-pocillo"). Otra opción es que la células pueden subclonarse en una placa "multi-pocillo" en una relación estadística para facilitar la operación de colocar una única célula en cada pocillo (por ejemplo, desde aproximadamente 0,1 a cerca de una célula/pocillo o incluso de unas 0,25 a 15 0,5 células/pocillo, como por ejemplo 0,5 células/pocillo). Por supuesto, las células pueden clonarse a baja densidad (por ejemplo, en una placa de Petri u otro sustrato adecuado) y aislarlas de otras células usando dispositivos tales como anillos de clonación. La producción de una población clonal puede expandirse en cualquier medio de cultivo adecuado. En cualquier caso, las células aisladas pueden cultivarse 20 hasta un punto adecuado cuando su fenotipo de desarrollo pueda evaluarse.

El término "aislada" indica que la célula o la población celular de la invención a la que se refiere, no se encuentran en su ambiente natural. Esto es, la célula o la población celular han sido separadas de su tejido circundante. Particularmente significa que 25 dicha célula o la población celular está sustancialmente exenta (libre) de otras células normalmente presentes en el tejido del que han sido aisladas, esto es, cuando se separa de, al menos, el 60%, preferentemente de al menos el 80%, preferentemente de, al menos, el 90%, más preferentemente de, al menos, el 95%, aún más preferentemente de, al menos, el 96%, 97%, 98% o incluso 99%, de otras 30 células presentes en el tejido del que han sido aisladas.

También se refiere a las células o poblaciones celulares que han sido aisladas del organismo en el que se originan. El término también incluye células que han sido aisladas de un organismo y re-introducidas en el mismo organismo, o en otro.

Otro aspecto de la presente invención se refiere uso del contenido intracelular una célula madre mesenquimal aislada en la elaboración de un medicamento para la reparación y/o regeneración de órganos y/o tejidos. Alternativamente se refiere al contenido intracelular de una célula madre mesenquimal aislada para la reparación y regeneración de órganos y tejidos. Una realización preferida de este aspecto se refiere al uso del contenido intracelular de una célula madre mesenquimal aislada en la elaboración de un medicamento para la reparación y regeneración del hígado, o alternativamente, al contenido intracelular de una célula madre mesenquimal aislada para la reparación y regeneración del hígado .En otra realización preferida, la célula madre mesenquimal aislada es una célula humana. Más preferiblemente, la célula madre mesenquimal aislada procede del mismo individuo al que se va a administrar el medicamento.

En general hay ventajas asociadas con el uso de células o tejidos autólogos, o con el contenido intracelular de células autólogas, que incluyen: (a) una reducción significativa del número de infecciones desde el donante al receptor por agentes infecciosos, y (b) la ausencia del efecto de rechazo inmunitario, por lo tanto, el paciente no tiene que someterse a otros tratamientos, y se previenen los efectos y problemas asociados con la inmunodepresión.

En una realización preferida de la invención, el órgano preferido capaz de regenerarse y/o repararse es el hígado. En otra realización preferida la patología es daño hepático, preferiblemente daño hepático agudo. En otra realización preferida de la invención, la célula madre mesenquimal aislada es una célula humana.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del contenido intracelular de una célula madre mesenquimal aislada en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del daño hepático, o alternativamente, al contenido intracelular de una célula madre mesenquimal aislada para el tratamiento del daño hepático. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el daño hepático es daño hepático agudo. En otra realización preferida, la célula madre mesenquimal aislada es una célula humana.

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA DE LA INVENCION

Otro de los objetos de la presente invención se refiere a una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que comprende el contenido intracelular de al menos una célula madre mesenquimal aislada. Preferiblemente, la célula madre mesenquimal aislada es una célula humana. Más preferiblemente, la composición es una composición farmacéutica. Aún más preferiblemente, la composición además comprende excipientes farmacéuticamente aceptables.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, las células madre mesenquimales son de origen humano. En otra realización preferida de la invención, la composición es una composición farmacéutica que además comprende excipientes farmacéuticamente aceptables.

El contenido intracelular de la composición de la invención se obtiene a partir de células mesenquimales, que comprende una célula aislada o una población aislada de la invención.

Dicha composición se obtiene a partir de células madre mesenquimales de la invención y puede contener un medio en el que se encuentren las células de la invención; dicho medio debe ser compatible con dichas células. Por ejemplo, pero sin limitarse, soluciones isotónicas, opcionalmente suplementadas con suero; medios de cultivo celular o, alternativamente, un medio soporte sólido, semisólido, gelatinoso o viscoso.

Las células madre mesenquimales de la invención, la población celular de la invención, así como la composición de la invención, pueden formar parte de una composición farmacéutica para su administración a un sujeto. Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica, de ahora en adelante composición farmacéutica de la invención, que comprende el contenido intracelular una célula mesenquimal aislada de la invención ó una población de células mesenquimales de la invención. En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización preferida, la composición farmacéutica de la invención además comprende otro principio activo.

El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo que debe

estar aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal o enumerado en la Farmacopea Estadounidense o la Farmacopea Europea, u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más concretamente en humanos.

5

El término “vehículo” se refiere a un diluyente, coadyuvante, excipiente o portador con el que se deben administrar el contenido intracelular de las células mesenquimales de la invención o de dicha composición que comprende el contenido intracelular de células madre mesenquimales obtenibles según el procedimiento de la invención; obviamente, dicho vehículo debe ser compatible con dicho contenido intracelular.

10

La composición farmacéutica de la invención, si se desea, puede contener también, cuando sea necesario, aditivos para aumentar, controlar o dirigir de otro modo el efecto terapéutico deseado del contenido intracelular de las células madre mesenquimales, las cuales comprenden dicha composición farmacéutica, y/o sustancias auxiliares o sustancias farmacéuticamente aceptables, tales como agentes tamponantes, tensioactivos, codisolventes, conservantes, etc. Dichas sustancias farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en la composición farmacéutica de la invención son conocidas, en general, los técnicos en la materia y se usan normalmente en la elaboración de composiciones celulares. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen, por ejemplo, en “Remington's Pharmaceutical Sciences”, de E.W. Martin. Puede encontrarse información adicional sobre dichos vehículos en cualquier manual de tecnología farmacéutica (Farmacia Galénica).

15
20
25

Como se emplea aquí, el término “principio activo”, “sustancia activa”, “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” ó “ingrediente farmacéuticamente activo” significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

30
35

USOS DE LA COMPOSICIÓN

Otro aspecto se refiere al uso de la composición de la invención, o a la composición farmacéutica de la invención, en la elaboración de un medicamento para la reparación y/o regeneración de órganos y/o tejidos.

Otro aspecto se refiere al uso de la composición de la invención, o de la composición farmacéutica de la invención, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del daño hepático. Más preferiblemente, para el tratamiento del daño hepático agudo.

En una realización preferida de la invención, el órgano preferido capaz de regenerarse y/o repararse es el hígado. En otra realización preferida la patología es daño hepático, preferiblemente daño hepático agudo.

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención, la enfermedad es una enfermedad hepática, y más preferiblemente daño hepático agudo.

La composición farmacéutica de la invención contendrá una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de contenido intracelular de células madre mesequimales, para proporcionar el efecto terapéutico deseado. Tal como se usa en la presente descripción, el término "cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva" se refiere a la cantidad de contenido intracelular de células madre mesequimales contenida en la composición farmacéutica que es capaz de producir el efecto terapéutico deseado y, en general, se determinará, entre otros factores, por las propias características del lisado intracelular las células y el efecto terapéutico deseado que se persigue. En general, la cantidad terapéuticamente efectiva de contenido intracelular de la invención que debe administrarse dependerá, entre otros factores, de las propias características del sujeto, la gravedad de la enfermedad, la forma de administración, etc. Por este motivo, las dosis mencionadas en esta invención deben tenerse en cuenta sólo como guía para la persona concedora de la técnica, que debe ajustar

esta dosis dependiendo de los factores anteriormente descritos.

La composición farmacéutica de la invención se formulará de acuerdo con la forma de administración elegida. La composición farmacéutica de la invención puede prepararse en un modo de dosificación líquido o gel, por ejemplo, en forma de suspensión, para ser inyectada o perfundida al individuo.

La administración de la composición farmacéutica de la invención al individuo se llevará a cabo por los medios convencionales. Por ejemplo, dicha composición farmacéutica se puede administrar a dicho individuo por vía intravenosa utilizando los dispositivos adecuados, tales como jeringas, catéteres (un catéter intravenoso periférico estándar, un catéter venoso central o un catéter arterial pulmonar, etc.), trocares, cánulas, etc. En todos los casos, la composición farmacéutica de la invención se administrará utilizando los equipos, aparatos y dispositivos adecuados a la administración de composiciones celulares y conocidos por el experto en la técnica.

Como entiende el experto en la materia, en ocasiones la administración directa de la composición farmacéutica de la invención al sitio que se pretende beneficiar puede ser ventajosa. De este modo, la administración directa de la composición farmacéutica de la invención al órgano o tejido deseado se puede lograr por administración directa (por inyección, etc.) en la superficie externa del órgano o tejido afectado por medio de inserción de un dispositivo adecuado, e.g., una cánula apropiada, por perfusión arterial o venosa (incluyendo mecanismos de flujo retrógrado) o por otros medios mencionados en esta descripción o conocidos en la técnica.

La composición farmacéutica de la invención, si se desea, se puede almacenar hasta el momento de su aplicación mediante los procedimientos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. Esta composición farmacéutica también se puede almacenar junto a medicamentos adicionales, útiles en el tratamiento en enfermedades, en una forma activa que comprende una terapia combinada.

Como se ha dicho previamente, si se desea, la células madre mesenquimales que dan lugar al contenido intracelular de la invención puede ser modificada

genéticamente por cualquier método convencional incluyendo, a modo ilustrativo, no limitativo, procesos de transgénesis, deleciones o inserciones en su genoma que modifiquen la expresión de genes que sean importantes para sus propiedades básicas (proliferación, migración, transdiferenciación, etc.).

5

A los efectos de la presente invención el término daño hepático agudo se refiere a la presencia de afectación hepática de cualquier etiología. Entre las enfermedades hepáticas referidas en la presente invención se encuentran: Hepatitis viral aguda (virus de la hepatitis A,B,C,D,E), otros virus (citomegalovirus, herpes, EbsteinBarr, fiebre amarilla, otros), infecciones no virales (bacterianas sistémicas, tuberculosis, histoplasmosis, fiebre Q, colangitis), hepatitis alcohólica aguda, tóxicos y fármacos, origen vascular (hipoxia hepática aguda, Budd-Chiari agudo, ligadura a.hepática+trombosis portal), daño hepático en SIDA (Infecciones, neoplasias, drogas), esteatosis aguda del embarazo, toxemia gravídica (síndrome de HELP) y/o cualquiera de sus combinaciones.

10
15

A los efectos de la presente invención el término daño hepático agudo se diagnostica usandolas concentraciones séricas de aspartatoaminotransferasa (AST), alaninaaminotransferasa (ALT), bilirrubina total y fosfatasa alcalina medidas usando los indicadores de daño hepático de acuerdo con los kits de diagnóstico estándares (Biosystems SA, Barcelona, España).

20

Las aminotransferasas se liberan hacia la sangre en grandes cantidades cuando hay daño a la membrana del hepatocito. Los niveles de AST/ALT son los marcadores habitualmente utilizados en la práctica clínica para detectar disfuncionalidad hepática tanto aguda como crónica. Por otro lado, las alteraciones de los niveles séricos de fosfatasa alcalina y bilirrubina correlacionan proporcionalmente con el daño de colangiocitos, células de los conductos biliares presente en el parénquima hepático y susceptibles también de ser dañadas. Todos estos parámetros son analizados de forma rutinaria en la unidad de análisis clínicos del hospital.

25
30

Otro aspecto de la invención describe el uso de esta composición para la conservación extra-corpórea de órganos extraídos para trasplante. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el órgano es el hígado.

La solución actual para afrontar el daño hepático agudo consiste en el trasplante hepático, aunque dada la velocidad de la patología y los problemas intrínsecos de realizar un trasplante, en muchas ocasiones no puede ser realizado. La infusión a través de la vena de contenido intracelular de MSC podría permitir que los pacientes 5 tuvieran un tratamiento rápido.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, 10 componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

15

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20 **Figura 1. Esquema del diseño experimental**

Figura 2. Análisis del inmunofenotipo y pluripotencia de las células madres mesenquimales.

A) El inmunofenotipo de las células madre mesenquimales (MSCs) trasplantadas se 25 analizó por citometría de flujo. La imagen representa tres experimentos distintos. B) Las MSCs se diferenciaron en osteoblastos y C) adipocitos. Después de 21 días de estímulos osteogénicos se observó mineralización y depósitos de calcio mediante tinción de rojo alizarina. C) Después de 14 días de estímulos adipogénicos se observaron vesículas lipídicas.

30

Figura 3. Presencia de células humanas CD90⁺ en el parénquima del hígado de ratas tratadas con TAA.

El análisis inmunohistoquímico de la expresión de CD90⁺ en MSC humanas se llevó a cabo en el hígado de ratas después de 48 de la inyección de TAA. La imagen es

representativa de los siguientes grupos: SO (Sham Operated), TAA, TAA+MSC (tioacetamida más infusión MSC) y TAA+IC-MSC (tioacetamida más contenido intracelular de MSC). Ampliación 5X.

5 **Figura 4. El trasplante de MSC humanas o la infusión de su contenido intracelular mejoran la función hepática de ratas tratadas con TAA.**

A las 48 horas de una inyección de tioacetamida (TAA) (A) los niveles séricos de aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), bilirrubina directa y fosfatasa alcalina (ALP) se analizaron con kits colorimétricos. Los datos
10 representan la media \pm error estándar. (a $P < 0,001$ vs SO, b vs. TAA y c vs. TAA+MSC). (B) Estudios histológicos mediante tinción de hematoxilina-eosina, tinción tricrómica de Masson y análisis inmunohistoquímico de β -catenina. Las imágenes son representativas de cada grupo. La ampliación para las tinciones de hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson fue del 5X y para la β -catenina del 20X.

15

Figura 5. El trasplante de MSC humanas o la infusión de su contenido intracelular activan las vías antiapoptóticas y disminuyen la muerte celular.

A) p65 (de NF- κ B), I κ B α , fosfo-Akt, y Akt se analizaron mediante western-blot en la fracción proteica. β -catenina se usó como control de carga. La imagen es
20 representativa de tres experimentos independientes.

B) Los niveles de apoptosis se midieron a través de un ensayo tipo ELISA de Roche Diagnostic que detecta fragmentos de ADN encontrados durante la apoptosis. Los datos representan la media \pm desviación estándar (a $P < 0,05$ vs SO, b vs. TAA y c vs. TAA+MSC).

25

Figura 6. El trasplante de MSC humanas o la infusión de su contenido intracelular estimulan la proliferación hepática.

A) Expresión de mRNA de la ciclina D1. Los datos representan la media \pm desviación estándar (a $P < 0,001$ vs SO, b vs. TAA y c vs. TAA+MSC). B) Análisis de PCNA por
30 Inmunohistoquímica. La imagen es representativa de cada grupo: SO (Sham Operated), TAA, TAA+MSC (tioacetamida más infusión MSC) y TAA+IC-MSC (tioacetamida más contenido intracelular de MSC). Ampliación 5X.

Figura 7. Efectos hepatoprotectores debidos a MSCs humanas.

A) Se midieron los niveles séricos de AST después del trasplante de MNC o MCS humanas en ratas tratadas con TAA. Los datos representan la media \pm desviación estándar (a. $P < 0,001$ vs. TAA+MSC). B) Tinción de hematoxilina-eosina después del trasplante de MSC o MSC en ratas tratadas con TAA. Las imágenes son representativas de cada grupo. Ampliación 5X.

Figura 8. Efectos hepatoprotectores debidos a MSCs humanas.

A) Comparación del contenido en microARN (miRNA-124a, miRNA-125b y miRNA-155) en MSC y MNC (a. $P < 0,001$ vs. Human MNC).
B) Contenido intracelular de IL-6 después de sonicación de 3×10^6 MSC y 3×10^6 MNC.

EJEMPLOS DE LA INVENCION

El siguiente ejemplo se proporciona a modo de ilustración, y no se pretende que sea limitativo de la presente invención.

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los cuidados animales y procedimientos experimentales se aprobaron por el comité de investigación y ética del Hospital Universitario Reina Sofía/IMIBIC de acuerdo con la Directiva 2010/63/EU del Parlamento Europeo y los boletines institucionales para el uso y cuidado de animales de laboratorio. Todas las muestras humanas se recogieron después de firmarse un acuerdo de consentimiento de acuerdo con la declaración de Helsinki,

Aislamiento de células madre mesenquimales humanas (MSCs)

Se tomaron muestras de médula ósea humana (BM) de la Cresta ílica de donantes sanos. Se cultivaron en matraces (Falcon™, Becton y Dickinson Pharmigen, Franklin Lakes, EE.UU) sembrando $10 \mu\text{l}$ de BM células/cm² en medio esencial mínimo alfa- (α -MEM) (Sigma-Aldrich, St Louis MO) suplementado con 2 mM L-glutamina (BioWhittaker, Suiza), 15% de suero fetal bovino (FBS) (BioWhittaker, Suiza), 100 U/ml Penicilina (Penilevel laboratorios ERN, Barcelona, España), 0,1 mg/ml de

estreptomycin (laboratorios Normon, Sevilla, España) y 1 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (b-FGF; CE Peptotech, Londres, Reino Unido).

Se permitió que las células se adhiran durante 48h y las no adheridas se lavaron con un buffer fosfato salino (PSB) 100mM pH=7,4 (Sigma-Aldrich, St Louis MO). Después de 48h, α -MEM se suplementó con 10% de FBS y 1ng / ml de FGF-b, añadido dos veces por semana. Todos los cultivos se mantuvieron a 37 ° C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. Cuando las células adherentes alcanzaron 90% de confluencia se separaron con 0,25% de tripsina-EDTA (BioWhittaker, Suiza), se lavó dos veces con PBS, se centrifugó a 1800 rpm durante 5 min a 4 °C. Las MSC se utilizaron entre el paso 2 y 4.

Inmunofenotipo y análisis de multipotencia de MSC

El inmunofenotipo de las MSC se evaluó mediante incubación con anticuerpos monoclonales conjugados por isocianato fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE). Los anticuerpos Anti-CD90-PE (Sigma-Aldrich, St Louis MO), anti-CD34-FITC (Myltenyi Biotec, Alemania) y anti-CD45-PE (Sigma-Aldrich, St Louis MO) se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se adquirieron 5 x 10⁴ células por citometría de flujo (FACSCalibur, Becton y Dickinson, Franklin Lakes, EE.UU.) excluyendo los desechos celulares por dispersión lateral y analizado mediante el software CellQuest. El porcentaje de células positivas se calculó después de quitar la fluorescencia de fondo, medida con los apropiados isotipos control: PE-IgG2a-ratón y FITC-IgG1 (Miltényi Biotec, Alemania).

Diferenciación adipogénica y ostiogénica de MSC humanas

La adipogénesis se desarrolló mediante el cultivo durante 10 días con medio adipogénico (dexametasona 0,5 μ M, isobutimetilxantina 0,5 mM, y 50 μ M indometacina; Sigma-Aldrich, St Louis MO) en placas multiwell de 6 pocillos con 1,5 ml de volumen. La osteogénesis se indujo con un tratamiento de 21 días con dexametasona 0,5 μ M, ácido ascórbico 0,2 mM y β -glicerofosfato 10mM en placas multiwell de 6 pocillos con 1,5 ml de volumen. Para detectar mineralización y

depósitos de calcio se realizó una tinción con rojo alizarina. En resumen, después de 21 días las células se lavaron con PBS (1,5 ml por pocillo), se fijaron con formaldehído 4% y 2% de sacarosa durante 15 minutos. Se retiró la solución de fijación y se lavó con agua (1,5 ml por pocillo). Se tiñeron con rojo alizarina 40mM (pH 4,2) durante 20 minutos a temperatura ambiente (2 ml por pocillo). Las células teñidas se lavaron con 5 enjuagues con agua pH 7, seguidas de un lavado de 15 minutos con rotación (2 ml por pocillo). Los cultivos teñidos se fotografiaron.

Diseño experimental y procedimientos quirúrgicos

10

Hembras de ratas Wistar de 200-250g (Fondo de Reproducción Animal del Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, España) se mantuvieron en condiciones controladas de luz (ciclo: 12h luz-12h oscuridad) y temperatura (22 °C), provistas de alimentación (Purina®, Barcelona, España) y agua *ad libitum*.

15

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio del efecto hepatotóxico de la tioacetamida (TAA) en ratas. Para ello, se inyectó por vía intraperitoneal una dosis de 400mg de TAA /kg de peso corporal (Sigma-Aldrich, St. Louis MO). Las muestras hepáticas y de sangre se recogieron de 0, 6, 12, 24, y 48h después de la administración TAA. A cada tiempo se usaron 5 ratas. Los efectos hepatotóxicos del TAA se detectaron de 12-24h, siendo máximos a las 48h. A partir de estos datos se desarrolló el diseño experimental (Figura 1).

20

Al inicio del experimento (t=0) se inyectaron 400 mg de TAA / kg de peso corporal excepto al grupo operación simulada (SO). Después de 18h de tratamiento con TAA, las ratas se anestesiaron con sevoflurano al 3% y el procedimiento quirúrgico mediante una incisión ventral media hasta la exposición de la vena porta. Se realizó una infusión por la vena porta de suero fisiológico (TAA), MSC intactas (TAA+MSC) o contenido intracelular de MSC (TAA+IC-MSC) en un volumen final de 0,3ml, en siete individuos por grupo (n=7). Se usó una aguja 26G. En el grupo TAA+MSC se trasplantaron 3×10^6 MSC intactas. Para obtener el contenido intracelular, 3×10^6 MSC se rompieron mediante sonicación (Diagenode, Legen, Bélgica). Después de este tratamiento se comprobó la ausencia de viabilidad celular mediante la prueba de azul de tripano (Sigma-Aldrich, St Louis MO). Las células se centrifugaron a 1800 rpm durante 10 minutos para antes de estar listas para la infusión. La infusión se llevo a

35

cabo ejerciendo una presión suave en la vena porta durante 15-30 segundos para evitar el sangrado. Para el cierre abdominal y de la piel se utilizó Prolene 6/0. Como agente analgésico se usó Fentanil (0,4mg/kg de peso; Ratiopharm, Madrid, España).

5 Con el fin de comparar los efectos de las MSCs con otro tipo celular, se trasplantaron células mononucleares humanas (MNC) de sangre periférica por la vena porta. Las MNC se obtuvieron de voluntarios sanos que prestaron su consentimiento. Para su obtención se realizó una centrifugación a 3000rpm durante 20 minutos a 4°C de la
10 sangre y se aplicó un gradiente de Ficoll, PSB y de nuevo Ficoll. En ratas tratadas con TAA se trasplantaron a través de la vena porta 3×10^6 MNC. Finalmente, 48h después de la administración del TAA, los animales se anestesiaron con pentobarbital (100mg/Kg peso corporal) y se sacrificaron mediante punción aórtica abdominal. Se recogió la sangre y el plasma y el suero obtenido se congelaron a -20 ° C hasta que se hicieron los exámenes bioquímicos e histológicos. El hígado se lavó
15 con solución salina fría y se retiró rápidamente para realizar los exámenes bioquímicos e histológicos. Las muestras de hígado se almacenaron a -80 ° C y en formaldehído 4%.

Parámetros de la función hepática

20 Las concentraciones séricas de aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), bilirrubina total y fosfatasa alcalina se midieron usando los indicadores de daño hepático de acuerdo con los kits de diagnóstico estándares (Biosystems SA, Barcelona, España).

25

Análisis Western blot

Las muestras de hígado se congelaron a -80°C hasta que se realizó el Western blot. El hígado se homogeneizó mediante incubación con un tampón de lisis pH 7,9 que contiene 10mM Hepes, 10mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1mM mM DTT,
30 0,5MM PMSF, 70µg/ml mezcla de inhibidor de proteasa, 0,5% Igual CA-630 (Sigma-Aldrich, St Louis MO). Después de 15 minutos en hielo, las muestras se centrifugaron a 10000g a 4°C durante 5 minutos. Se recogieron los sobrenadantes y se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford (Bio-Rad, Hércules, CA). Las proteínas se separaron usando 50 µg de proteínas de lisado de hígado en geles
35 SDS-poliacrilamida al 7% (Bio-Rad, Hércules, CA) y se transfirió a una membrana de

nitrocelulosa (Bio-Rad, Hércules, CA). Las membranas se incubaron en una solución de bloqueo BSA (Sigma-Aldrich, St Louis MO) para proteínas fosforiladas o con leche en polvo no grasa (Bio-Rad, Hércules, CA) para el resto de proteínas. Akt (1:1000 dilución, Cell Signaling, Boston, MA, USA), Akt-fosforilada (1:1000 dilución, 5 Cell Signaling, Boston, MA, USA), NFkB (p50) (1:500 dilución, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), IκBα (1:500 dilución, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) y β-actina (1:1000 dilución, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) se utilizaron como anticuerpos primarios en diluidos en solución Tween Tris (TTBS; Sigma-Aldrich, St Louis MO) con BSA al 5% o leche en polvo sin grasas. Las transferencias se inmunoetiquetaron 10 usando un anticuerpo secundario conjugado de peroxidasa de rábano y se revelaron utilizando el sistema ECL Avanzado para la detección por Western Blot (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia).

Análisis de RT-PCR cuantitativa a tiempo real

15 El ARN total se extrajo a partir de hígado con el reactivo Trizol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). El ARN total se cuantificó mediante espectrofotometría (ND-1000, Technologies Nanodrop, DE, EE.UU.). Se trató con ADNasa (ADNasa kit, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 1 µg del ARN total. El kit Quantitect de PCR en tiempo real 20 (Qiagen, Hilden, Alemania) se utilizó para llevar a cabo la retrotranscripción de ARNm. La PCR se llevó a cabo en un ciclador de luz 480 de Roche Diagnostic, Basilea, Suiza. La ciclina D1 y 18S ribosomal fueron designados con el software libre Oligo 7 y sus secuencias son ciclina D1 F: 5' CCG AGG AGC TGC TGC AAA TGG A 3' (SEQ ID NO: 1), R: 5' ATG GAG GGC GGA TTG GAA ATG AAC 3' (SEQ ID NO: 25 2), 18S F: 5' GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT 3' (SEQ ID NO: 3), R: 5' CCA TCC CGG AAT TAG TAG CG 3' (SEQ ID NO: 4).

Análisis de microRNA

30 Se realizó una prueba de expresión comparativa de miRNA-124a, miRNA-125b y miRNA-155 entre MSC y MNC. El ARN total se extrajo con TriZol. Para cuantificar la expresión del microARN entre MSC y MSC se preparó una PCR a tiempo real, empleando sondas Taqman sintetizadas por Qiagen (Qiagen, Hilden, Alemania) y utilizando un ciclador de luz (Roche Diagnostic, Basilea, Suiza). Los datos se 35 analizaron comparativamente usando la fórmula $2^{(-\Delta Ct)}$. Se utilizaron pequeños ARN

U6 como limpiadores que normalizaran los miRNAs. Los resultados se muestran como cambios respecto a MSC.

Análisis inmunohistoquímico

5

Las biopsias de hígado se fijaron en formaldehído al 4%, se trataron con alcohol, xileno se embebieron en parafina. Los reactivos usados se adquirieron en MERCK (Darmstadt, Alemania). Se cortaron secciones de cuatro micrómetros y se tiñeron con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson para las CD90, PCNA y β -catenina de acuerdo con los procedimientos estándares. Los análisis inmunohistoquímicos se hicieron con el kit de tinción DakoCytomation (Glostrup, Dinamarca). La cera de las secciones de hígado se eliminó con xileno, rehidratación etanol e incubación a 100 °C en solución Target RetrievalChemMate™ (Dako, Barcelona, España) durante 20 minutos. Después se lavó con PSB, los portaobjetos se incubaron durante 10 minutos en peróxido de hidrógeno al 3% para bloquear la peroxidasa endógena. Durante 30 minutos se incubó con los siguientes anticuerpos: Anti-humano CD90 (Sigma-Aldrich, St Louis MO), anti PCNA de rata (Santa Cruz Biotechnology, Inc) y β -catenina de rata (Señalización Celular, Boston, MA, EE.UU.). Después las láminas se lavaron durante 5 minutos en PBS y se incubaron 30' con un polímero marcado con HRP. Para colorear de marrón las áreas positivas se utilizó diaminobencidina durante 5 minutos. Por último, se tiñeron con hematoxilina y montadas en medio de montaje Eukitt (Eukitt Medio de Montaje, Labobam, Navarra, España).

25

Ensayo de muerte celular por apoptosis

La apoptosis se midió mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas de detección de muerte celular de Roche Diagnostic (Barcelona, España) y de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, el homogeneizado de hígado se incubó con anticuerpos anti-histona etiquetados con biotina y anti-DNA conjugados con microplacas de peroxidasa cubiertas de estreptavidina durante 2 horas. Se lavaron los pocillos de las microplacas y se incubaron con el sustrato para su medición colorimétrica a longitud de onda 405nm con referencia de 490nm

35

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media \pm error estándar. Las comparaciones se hicieron usando el test ANOVA. La significación estadística se estableció en $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

La administración de tioacetamida induce daño hepático en ratas

10 En primer lugar se analizaron los efectos hepatotóxicos de una sola inyección de tioacetamida (TAA; 400mg/kg de peso corporal). Dieciocho horas después de la administración de TAA empezaron a aumentar los marcadores de lesión hepática; aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP) y la bilirrubina directa. Después de 12-18h de la inyección de TAA, los estudios histológicos mostraron la presencia de células apoptóticas y necróticas
15 alrededor de la vena central y en el parénquima hepático. El efecto hepatotóxico mayor del TAA se registró a las 48h de la administración y se observaron altos niveles de transaminasas, fosfatasa alcalina, bilirrubina total y grandes áreas necróticas y apoptóticas alrededor de la vena central.

20 En estas condiciones se analizaron los efectos de la infusión de MSC o su contenido intracelular. Se evaluó el efecto de la terapia con células madre a las 48 horas de la administración de TAA, donde se encontró el daño hepático mayor.

Inmunofenotipo y pluripotencia de células trasplantadas

25 El inmunofenotipo de las células trasplantadas en la vena porta de las ratas tratadas con TAA se analizó mediante citometría de flujo. En estas células se evaluaron los marcadores característicos de las MSC, tales como CD90⁺, CD45⁻ y CD34⁻(Figura 2A). Para comprobar la pluripotencia se realizaron diferenciaciones osteogénica y
30 adipogénica. La Figura 2B revela la presencia de mineralización de la matriz específica de osteoblastos, mientras que la figura 2C muestra gotas de lípidos específicas de adipocitos.

MSC humanas trasplantadas están localizadas dentro del hígado de rata

35

En primer lugar se analizó si las células trasplantadas a través de la vena porta se implantaron en el parénquima hepático de las ratas tratadas con TAA. En el parénquima del hígado se detectaron antígenos humanos CD90, uno de los principales marcadores de MSC. Las ratas con infusión de MSC humanas (TAA+MSC) se localizaron alrededor de las áreas necróticas inducidas por TAA. En las ratas con infusión de contenido intracelular de MSC (TAA+IC-MS

5 C) se detectó este marcador humano con menor intensidad en el parénquima hepático y también en el sinusoide. Las ratas sanas y tratadas con TAA no mostraron tinción de CD90 humano (Figura 3) lo que indica la tinción positiva, activada por la presencia de antígenos humanos, encontrada después de la infusión de células madre (MSC y IC-MS

10 C).

El trasplante de MSCs o la infusión su contenido intracelular mejoran la función hepática de ratas tratadas con TAA

Para evaluar los efectos de ambas terapias (MSC y su lisado) en las ratas tratadas con TAA se evaluaron varios parámetros relacionados con la función hepática. Después de 48h de la administración de TAA se encontraron niveles significativos de ALT, AST, ALP y bilirrubina (Figura 4). El trasplante de MSC (TAA+MSC) redujo significativamente los niveles de estos parámetros de daño hepático. En comparación con el trasplante de MSC, la infusión de IC-MS

20 C provocó una disminución más efectiva de los niveles de AST, ALT, ALP y de bilirrubina que MSC intactas (c $p < 0,001$ vs. TAA+MSC; Figura 4A).

Los estudios histológicos (Hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson) corroboraron estos datos. Las imágenes mostraron claramente que los trasplantes de MSC redujeron las áreas necróticas producidas por TAA. En comparación con TAA+MSC, la administración de los lisados de MSC (TAA+IC-MS

25 C) mejoró significativamente la arquitectura hepática con menos necrosis y apoptosis (Figura 4B).

En condiciones normales, los hepatocitos establecen uniones célula-célula donde participa la β -catenina. En las áreas de necrosis y apoptosis inducida por TAA había claramente una pérdida de β -catenina en la membrana plasmática de los hepatocitos. MSC trasplante (TAA + MSC) frenó la pérdida de β -catenina. Contenido intracelular de administración MSC (TAA + IC-MS

30 C) fue capaz de recuperar la tinción

35

de β -catenina la restauración de la arquitectura característica del parénquima hepático (Figura 4B).

El trasplante de MSCs o la infusión su contenido intracelular activan las vías antiapoptóticas y disminuye la muerte celular.

5

La administración de TAA incrementa la apoptosis con respecto a las ratas control (SO). El contenido de fragmentos de ADN asociados a histonas citosólicas y muerte celular se redujo después del trasplante de MSC (TAA+MSC). Se encontró que la apoptosis fue significativamente menor en el grupo de TAA+IC-MS

10

Además, se detectaron niveles bajo de NF- κ B, una proteína que participa en la supervivencia celular, en ratas tratadas con TAA. El trasplante de MSC intactas (TAA+MSC) o la infusión del lisado del MSC humano (TAA+IC-MS) aumentó la expresión de esta proteína anti-apoptótica. Los niveles de I κ B α , un inhibidor endógeno de NF-kappa B, también se redujeron después de la terapia con MSCs humanas. Finalmente se observó un aumento del estado de fosforilación de Akt después del trasplante de MSC intactas (TAA + MSC) o la infusión intracelular de MSC (TAA + IC-MS) con respecto a las ratas tratadas con TAA (Figura 5B). Estas proteínas no fueron expresadas diferencialmente en TAA+MSC y TAA+IC-MS.

20

El trasplante de MSC o la infusión de su contenido intracelular estimulan la proliferación hepática.

25

La proliferación hepática se evaluó a través de la expresión del ARNm de la ciclina D1, un regulador de la proteína de ciclo celular específica de la fase G1/S. Se detectaron altos niveles de ciclina D1 después de las terapias con MSC respecto al control de ratas tratadas TAA, donde se mantuvieron los niveles (Figura 6A).

30

La proteína PCNA es una proteína nuclear que se sintetiza sólo durante la división celular y se detectó mediante pruebas inmunohistoquímicas del tejido hepático. Las ratas tratadas con TAA mostraron niveles similares de PCNA que las ratas control. Se observó una tinción nuclear positiva de PCNA después de las terapias TAA+MSC y TAA+IC-MS mostrando un aumento de la proliferación hepática (Figura 6B).

35

Los efectos hepatoprotectores son específicos de las MSC humanas

5 Con el fin de comprobar el potencial terapéutico específico de MSC, las células
mononucleares humanas (MNC) se trasplantaron en ratas con daño hepático por
TAA. La infusión de MNC humanas se comparó con el trasplante de MSC. MNC no
mejoró la función hepática; y los valores de ALT fueron similares a los encontrados
en ratas tratadas con TAA (Figura 7A). Además, la tinción de hematoxilina reveló
10 áreas necróticas y apoptóticas similares en ratas tratadas con TAA y tratadas con
MNC (Figura 7B).

Expresión diferenciada entre MNC y MSC de miRNA-124a, miRNA-125b y miRNA-155

15 Para explicar los efectos diferentes del trasplante de MSC y MNC se analizó la
expresión de varios microARN. Los resultados mostraron que en MSC, miRNA-124a
y miRNA 125b se sobre expresaron 2 y 1000 veces sus valores normales,
respectivamente (Figura 8C), no obstante la expresión de miRNA-155 en MSC se
disminuye la expresión 2 veces con respecto a las MNC (Figura 8A). El contenido
20 intracelular de IL-6 se evaluó por ELISA. Los resultados mostraron que el contenido
de IL-6 fue mayor de cinco veces en el MSC de MNC (Figura 8D).

REIVINDICACIONES

- 1.- El uso del contenido intracelular de una célula madre mesenquimal aislada en la elaboración de un medicamento.
- 5
- 2.- El uso del contenido intracelular de una célula madre mesenquimal aislada en la elaboración de un medicamento para la reparación y/o regeneración de órganos y/o tejidos.
- 10
- 3.- El uso del contenido intracelular de una célula madre mesenquimal aislada en la elaboración de un medicamento para la reparación y/o regeneración del hígado.
- 4.- El uso del contenido intracelular de una célula madre mesenquimal aislada en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del daño hepático.
- 15
- 5.- El uso del contenido intracelular de una célula madre mesenquimal aislada según la reivindicación anterior, donde el daño hepático es daño hepático agudo.
- 6.- El uso del contenido intracelular de una célula madre mesenquimal aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la célula madre mesenquimal aislada es una célula humana.
- 20
- 7.- Una composición que comprende el contenido intracelular de células madre mesenquimales.
- 25
- 8.- La composición según la reivindicación 7, donde la célula madre mesenquimal aislada es una célula humana.
- 9.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde la composición es una composición farmacéutica.
- 30
- 10.- La composición según cualquiera de las reivindicaciones 7-9, que además comprende excipientes farmacéuticamente aceptables.

11.- El uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 - 10 en la elaboración de un medicamento para la reparación y/o regeneración de órganos y/o tejidos.

5 12.- El uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 - 10 en la elaboración de un medicamento para la reparación y/o regeneración del hígado.

13.- El uso de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 - 10 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del daño hepático.

10

14.- El uso de una composición según la reivindicación anterior, donde el daño hepático es daño hepático agudo.

15 15.- El uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 7-10 para la conservación extra-corpórea de órganos extraídos para trasplante.

16. El uso de la composición según la reivindicación anterior, donde el órgano es el hígado.

RESUMEN

COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DEL DAÑO HEPÁTICO

- 5 La presente invención describe el uso del contenido intracelular de células madre mesenquimales en individuos con daño hepático agudo para estimular la supervivencia, regeneración y/o reparación del órgano dañado. Además, la presente invención también describe el uso de este lisado para la elaboración de una composición farmacéutica que comprenda dicho contenido intracelular, destinada a estimular la supervivencia,
- 10 regeneración y/o reparación de órganos, específicamente del hígado.

1/8

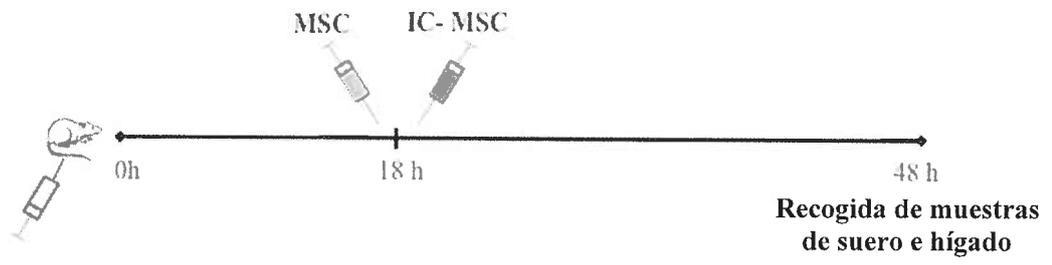


Figura 1

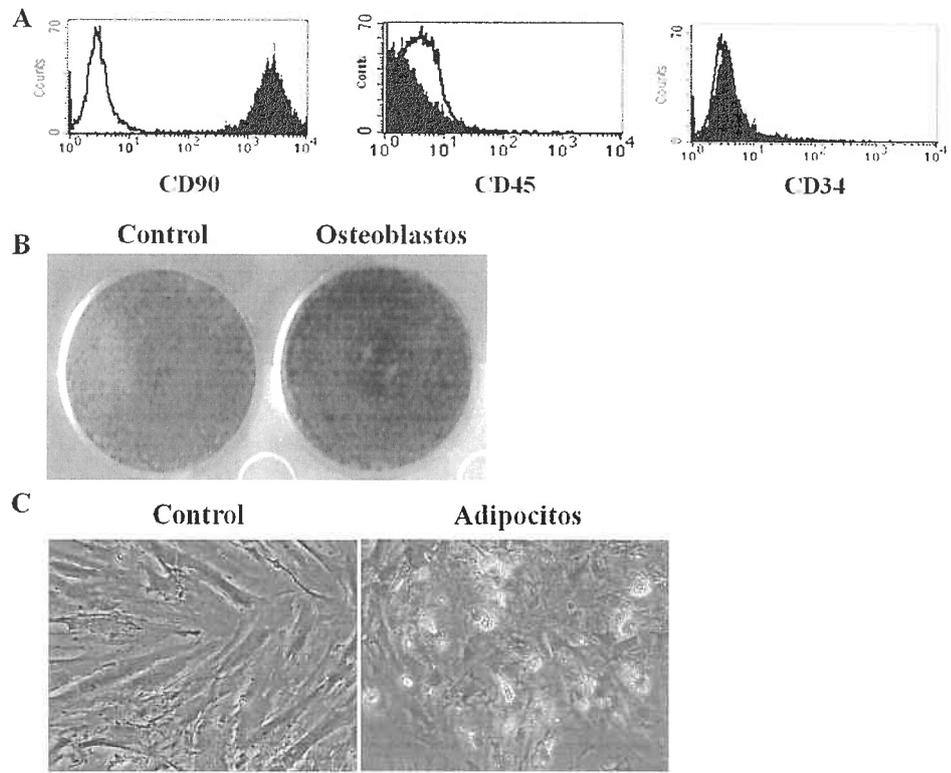


Figura 2

CD90 humanas

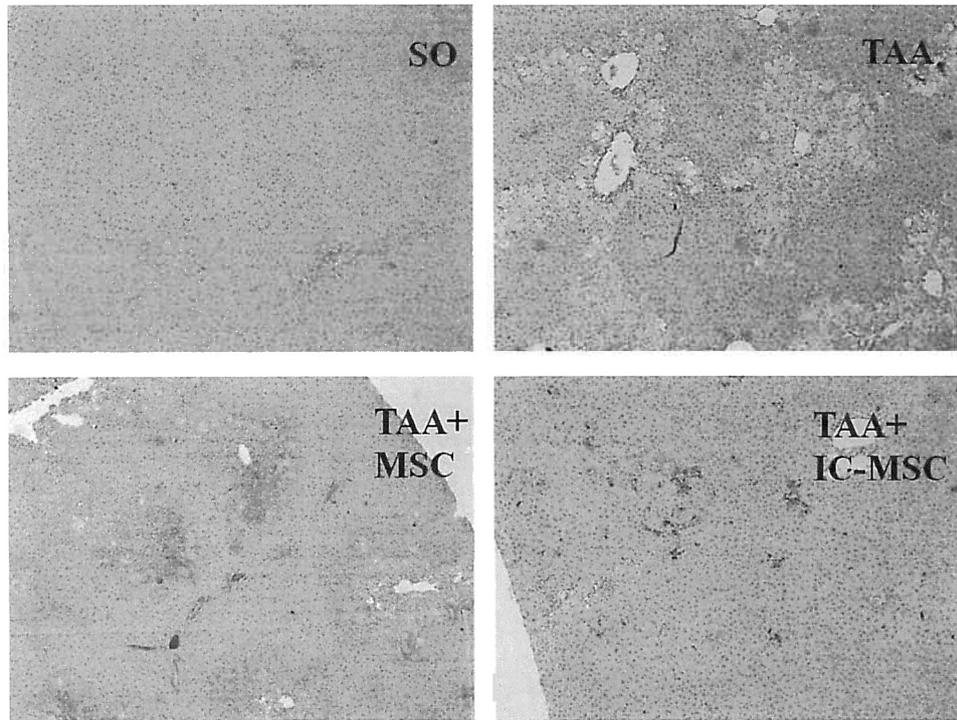


Figura 3

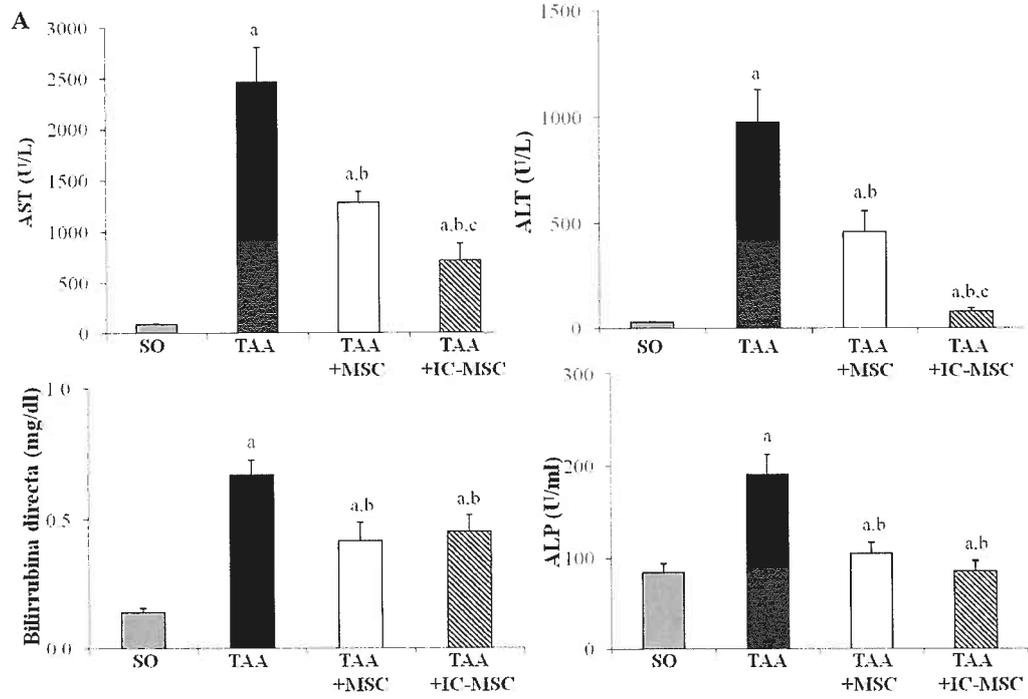


Figura 4 A

B

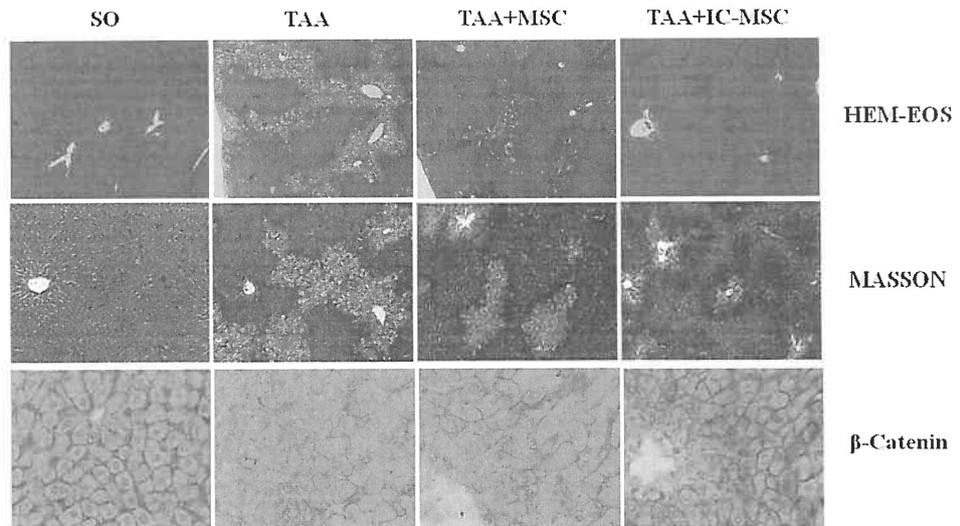


Figura 4 B

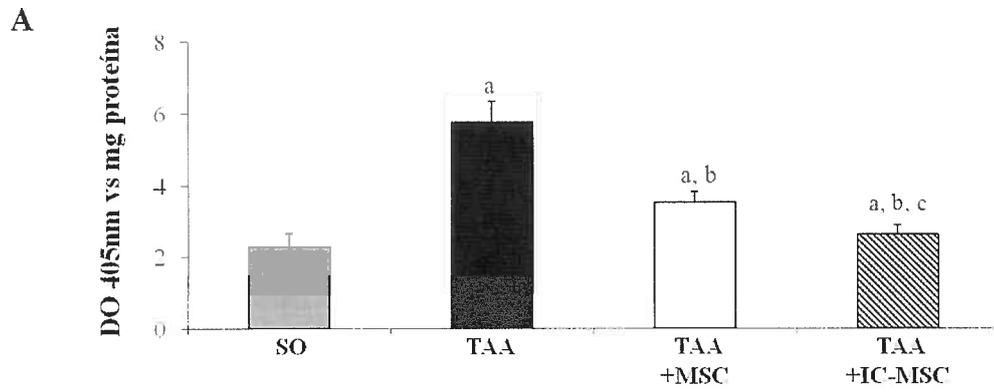


Figura 5 A

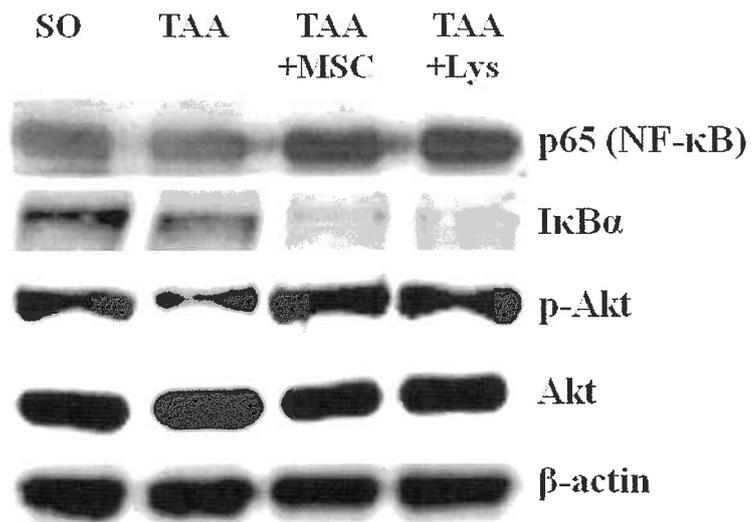
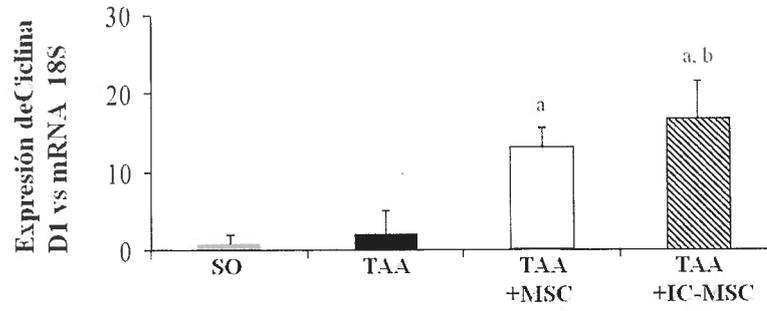


Figura 5 B

A



B

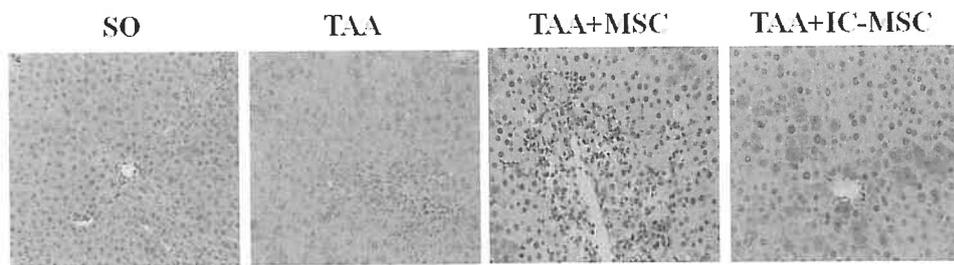


Figura 6

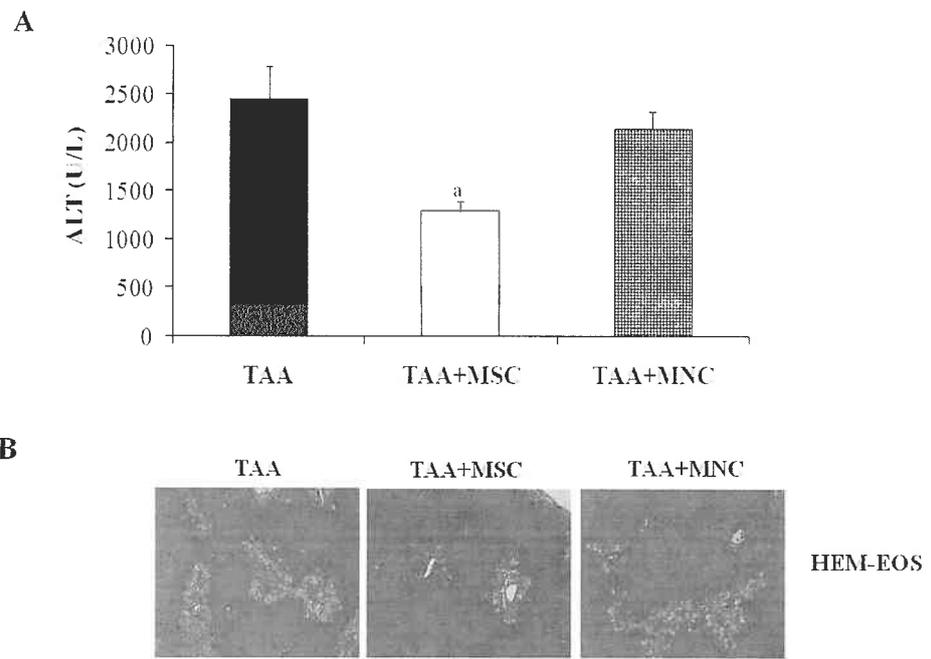


Figura 7

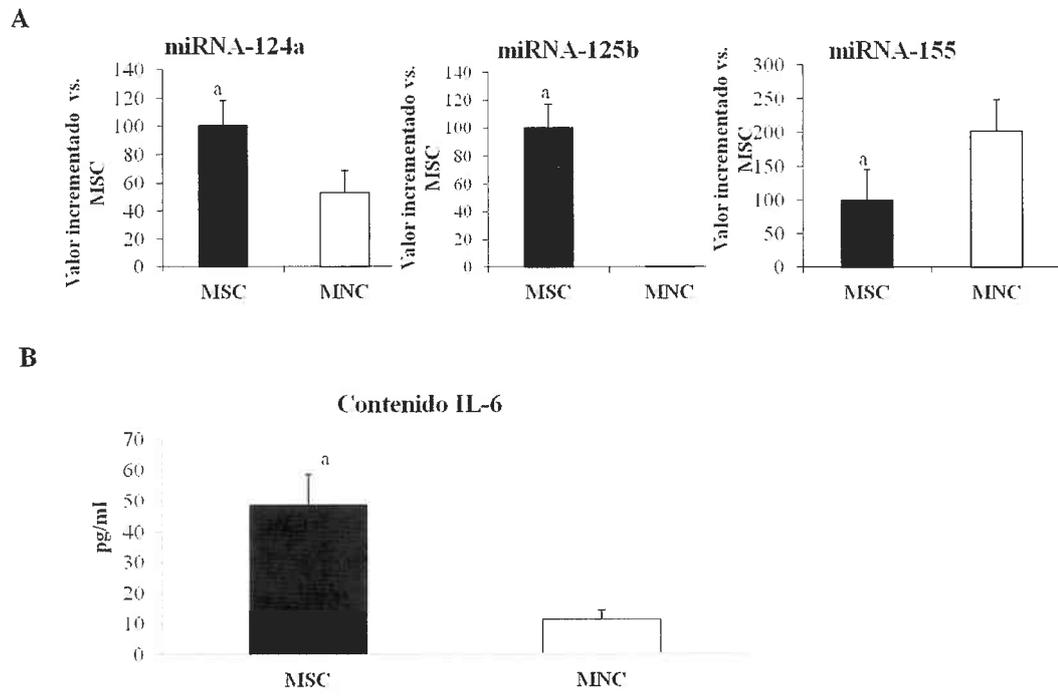


Figura 8

secuencias FIBICO-13011_ST25
SEQUENCE LISTING

<110> Fundación Pública Andalulza Progreso y Salud
Fundación para la investigación biomédica de Córdoba
Universidadd de Córdoba

<120> Composiciones para el tratamiento del daño hepático.

<130> FIBICO-13011

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer D1 F

<400> 1
ccgaggagct gctgcaaatg ga 22

<210> 2
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer D1 R

<400> 2
atggagggcg gattggaaat gaac 24

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer 18S F

<400> 3
gtaacccggtt gaacccatt 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer 18S R

<400> 4
ccatcccgga attagtagcg 20