



**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**PLASTICIDAD DE CÉLULAS
HEMATOPOYÉTICAS EN RATONES
CON DAÑO HEPÁTICO**

**ÓSCAR QUINTANA BUSTAMANTE
MADRID, 2006**



**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**PLASTICIDAD DE CÉLULAS
HEMATOPOYÉTICAS EN RATONES
CON DAÑO HEPÁTICO**

**ÓSCAR QUINTANA BUSTAMANTE
MADRID, 2006**



**FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

PLASTICIDAD DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS EN RATONES CON DAÑO HEPÁTICO

Memoria presentada por **ÓSCAR QUINTANA BUSTAMANTE** para optar al grado de doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Director de Tesis: **José Carlos Segovia Sanz**

El trabajo de investigación descrito en esta memoria ha sido realizado en el Programa de Hematopoyesis: Biología, Lesiones y Terapia Génica de células madre del Centro de Investigaciones Energéticas, Medio Ambientales y Tecnológicas (CIEMAT)

MADRID, 2006

A Nuria, por su sonrisa y sus bromas, por hacerme todo más llevadero. Por quererme a pesar de mis fallos. Conseguiremos nuestros sueños juntos.

Cuando empecé a escribir esta tesis no me podía imaginar lo duro que sería, total resumir unos cuantos experimentos; pero no fue así, ha sido duro, mucho más de lo que me hubiera podido imaginar. Esos días que pasaban uno tras otros, y en los que lo único que hacía era escribir una frase para luego borrarla y luego volver a escribirla. Los días se convertían en semanas, que también pasaban, y la tesis sólo había engordado folio y medio. Los meses, con algún apartado que otro, también iban pasando. Y las fechas para acabar se iban retrasando. Pero todo llega, y por fin estoy escribiendo lo último de esta tesis.

Espero que el que se atreva a leer esta tesis, le guste, y que sea consciente que detrás de ella, no sólo está el trabajo de una persona sino de muchas más, que han ayudado, contribuido o simplemente dado ánimos para que un día tuviera forma. A todas esas personas tengo la necesidad de darles gracias, por que me han hecho que esas horas al microscopio nunca estuviera solo y han dado sentido a muchas horas delante del ordenador.

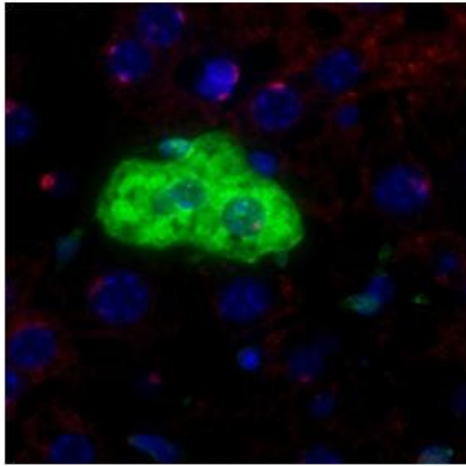
Como podría agradecer al Dr. José Carlos Segovia, a JC, que más que mi director de tesis haya sido un amigo, que ha hecho posible que viviera un sueño. Aún recuerdo cuando me llamó por teléfono para entrevistarme, esa llamada ha sido una de esas pequeñas cosas que te cambian la vida; gracias a ella no solo he podido trabajar durante cuatro años en lo que más me gusta, sino también formar parte de un grupo excepcional. Gracias JC por llamarme.

Gracias a todos los del labo. Al resto de los JC's 5: Néstor, nuestro oráculo venezolano, que sepa que siempre estaré dispuesto acompañarle con el café (capuccino sin azúcar y por supuesto con purito), gracias y mucha suerte; Susana, hemos tenido suerte que ya no seas Susana 12; Mary Eugene, que consiguió que tuviera hasta ritmo. A Guille, por sus historias y sus broncas en molecular. A Afri, por ese espacio de mesa que le he robado poco a poco, y por tenerla siempre cerca. A Mluz, siempre sonriente y dispuesta a echar una mano. A Paula, por recibirme en el labo y enseñarme. A Maru, por entender a los de Burgos aunque sea argentina. A Rosa, por endulzarnos a todos. A Bea, por demostrarme que la biología puede seguir sorprendiendo. A Susana, que aunque estés en Sevilla, aún siento que estas por aquí. A Elena, por tener siempre hueco para un coffebreak. A Ari, por contagiarme con su entusiasmo. A Jaco, por que con sus innumerables paseos por el pasillo me ha enseñado la mejor forma de concentrarme. A Monste, por alegrarme en molecular. A Laura, por que somos del mismo gremio. A Antonio, por revolucionar al todo el labo. A Marina, nuestra inglesa con acento andaluz. A Miguel, porque hemos tenido la suerte de tener a Shakespeare por secretario. A Isra, por dejarme siempre helado en citometría. A Raquel, la última adquisición que ya empieza a formar parte del grupo. A Jesús, porque a pesar de las protestas, siempre he tenido ratoncillos. A Elena y Aurora, por ahorrarme muchos dolores de cabeza, no sabéis lo importante que sois. A Sergio, por esas clases de pesca. Y por supuesto a Juan, por enseñarme a pensar y a simplificar los problemas, pero sobre todo, gracias por juntarnos a todos.

También quiero dar las gracias a mi escape en los momentos de agotamiento, por ayudarme a ver mas alla del labo. A mis Amigos de Burgos, por que son los mejores amigos que alguien podrá tener; que aunque no los he tenido cerca, siempre los he sentido junto a mí y he podido contar con ellos. A mis dos compañeros de jueves, porque me han ayudado que la semana fuera más corta. A mis amigos de Madrid, por encontrar en ellos unos verdaderos amigos.

Por supuesto a mis abuelos, a mi hermano, al resto de mi familia, porque estar siempre apoyandome a pesar de ser él que se dedica a cosas raras.

A mis padres, que siempre han confiado en mí, y me han hecho mucho más fácil todas las aventuras de la vida. Quiero que sientan este trabajo también es suyo.



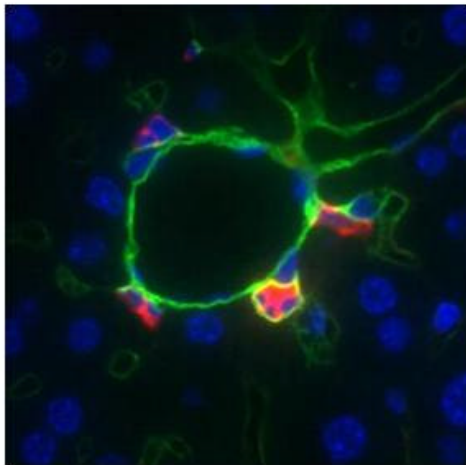
I

- I. ÍNDICE
- II. ABREVIATURAS
- III. RESUMEN
- IV. INTRODUCCIÓN
- V. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS
- VI. MATERIALES Y MÉTODOS
- VII. RESULTADOS
- VIII. DISCUSIÓN
- IX. CONCLUSIONES
- X. BIBLIOGRAFÍA
- XI. ANEXOS

I.	ÍNDICE.	1
II.	ABREVIATURAS.	7
III.	RESUMEN.	11
IV.	INTRODUCCIÓN.	15
	1. TERAPIA CELULAR.	17
	1.1. Fuentes de células madre.	17
	1.2. Procesos de plasticidad celular.	18
	1.3. Plasticidad de células adultas.	19
	2. SISTEMA HEMATOPOYÉTICO.	22
	2.1. Jerarquía del sistema hematopoyético.	22
	2.1.1. Células madre hematopoyéticas.	23
	2.1.2. Células progenitoras comprometidas.	24
	2.1.3. Células de morfología reconocible o células maduras.	24
	2.2. Movilización de células progenitoras y células madre hematopoyéticas.	25
	3. EL HÍGADO.	27
	3.1. Anatomía macroscópica.	27
	3.2. Anatomía microscópica.	28
	3.3. Funciones del hígado.	29
	3.4. Patologías hepáticas.	29
	3.4.1. Toxicidad inducida por tetracloruro de carbono.	30
	3.5. Regeneración hepática.	31
	4. HEPATOCITOS DERIVADOS DE MÉDULA ÓSEA (HDMO).	33
	4.1. Identificación de HDMO.	33
	4.2. Mecanismos de conversión de células de MO a HDMO.	35
	4.3. HDMO como herramienta terapéutica.	37
V.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.	39
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS.	43
	1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.	45
	2. GENERACIÓN DE RATONES QUIMÉRICOS.	45
	2.1. Trasplante de MO.	45
	2.2. Trasplante de CMHs con el fenotipo LSK.	45
	2.3. Trasplante de CMHs en receptores no irradiados.	46
	2.4. Estudio de repoblación competitiva.	47
	3. ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO.	47
	3.1. Análisis del compartimento de CMHs.	47
	3.2. Análisis del injerto hematopoyético.	47
	4. ANÁLISIS DE LA CELULARIDAD EN SP.	48
	5. MODELO DE DAÑO POR CCl₄.	48
	6. MOVILIZACIÓN HEMATOPOYÉTICA.	48
	6.1. Movilización con factores de crecimiento.	48
	6.2. Coadministración de CCl ₄ y de G-CSF.	48

7. INHIBICIÓN DE LOS PROCESOS DE FAGOCITOSIS.	48
8. ANÁLISIS DE PARÁMETROS HEPÁTICOS EN PLASMA.	49
9. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES.	49
10. ANÁLISIS HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOLÓGICO.	50
10.1. Estudio histológico del hígado.	50
10.2. Marcajes múltiples de antígenos mediante inmunofluorescencia.	50
10.3. Detección de glucógeno intracelular.	51
10.4. Identificación de la reacción oval.	52
10.5. Identificación del cromosoma Y.	52
10.5.1. <i>Hibridación in situ fluorescente del cromosoma Y (Y-FISH).</i>	52
10.5.2. <i>Hibridación in situ cromogénica del cromosoma Y (Y-CISH).</i>	53
11. ANÁLISIS DE IMAGEN.	53
11.1. Cuantificación de HDMO.	53
11.2. Cuantificación de intensidad de fluorescencia.	54
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	54
VII. RESULTADOS.	55
1. MODELO DE DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR CCl₄ Y MOVILIZACIÓN CON G-CSF.	57
1.1. Establecimiento de un modelo de hematopoyesis quimérica.	57
1.2. Evaluación del daño hepático inducido por el tratamiento continuado con CCl ₄ .	58
1.3. Análisis del efecto de la movilización con G-CSF.	59
2. ESTUDIO DE PROCESOS DE PLASTICIDAD EN UN MODELO MURINO DE DAÑO HEPÁTICO, MEDIADO POR CÉLULAS DE MO.	64
2.1. Presencia de células hematopoyéticas en la estructura del hígado.	64
2.2. Localización de hepatocitos derivados de MO.	66
2.3. Modulación de la presencia de HDMO en hígado con daño hepático por CCl ₄ , mediante la movilización con G-CSF.	69
2.4. Efecto de la concentración de CCl ₄ y de la combinación de G-CSF/TPO.	69
2.4.1. <i>Efecto de la concentración de CCl₄.</i>	70
2.4.2. <i>Comparación entre la movilización con G-CSF y con G-CSF/TPO.</i>	71
3. POBLACIÓN DE CÉLULAS DE MO RESPONSABLE DEL PROCESO DE PLASTICIDAD.	73
3.1. Plasticidad derivada de la población LSK.	73
3.2. Implicación directa de células madre en los procesos de plasticidad.	74
4. MECANISMO RESPONSABLE DE LA APARICIÓN DE HDMO.	76
4.1. Implicación de la transdiferenciación o de la fusión celular en la generación de HDMO.	76
4.2. Mecanismo de la fusión celular <i>in vivo</i> .	78
5. REPROGRAMACIÓN NUCLEAR.	80
5.1. Morfología de los núcleos de los HDMO.	80
5.2. Pérdida del programa hematopoyético.	82
5.3. Ganancia del programa hepático.	84

VIII.	DISCUSIÓN.	87
1.	MODELO DE DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR CCl₄ Y MOVILIZACIÓN CON G-CSF.	89
1.1.	Daño hepático inducido por el tratamiento continuado con CCl ₄ .	89
1.2.	Movilización hematopoyética con la administración reiterada de G-CSF.	89
2.	ESTUDIO DE PROCESOS DE PLASTICIDAD DE CÉLULAS DE MO EN UN MODELO DE DAÑO HEPÁTICO EN RATÓN.	91
2.1.	Expresión de EGFP en la mayoría de células derivadas de la MO.	91
2.2.	Aumento de células hematopoyéticas infiltradas en el hígado.	91
2.3.	Modelo de plasticidad de MO a hígado.	92
2.4.	La movilización con G-CSF aumenta los HDMO en ratones con daño hepático.	93
2.5.	La concentración de CCl ₄ no afecta la aparición de HDMO.	94
2.6.	Efectos similares de la movilización con G-CSF o con G-CSF/TPO.	94
3.	ORIGEN HEMATOPOYÉTICO DEL PROCESO DE PLASTICIDAD.	95
4.	MECANISMO RESPONSABLE DE LA APARICIÓN DE HDMO.	97
4.1.	Los HDMO se originan por fusión celular.	97
4.2.	La fagocitosis como posible mecanismo responsable del origen de los HDMO.	98
5.	REPROGRAMACIÓN NUCLEAR EN EL PROCESO DE FUSIÓN CELULAR.	100
5.1.	Silenciamiento y activación del programa hematopoyético y hepático en los HDMO.	100
5.2.	La conversión del programa de expresión en los núcleos de los HDMO se desarrolla a través de un estado de mayor condensación de la cromatina.	101
6.	PERSPECTIVAS FUTURAS.	103
IX.	CONCLUSIONES.	105
X.	BIBLIOGRAFÍA.	109
XI.	ANEXOS.	117

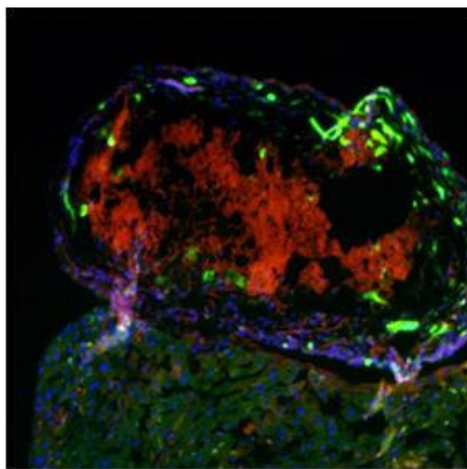


II

- I. ÍNDICE
- II. ABREVIATURAS**
- III. RESUMEN
- IV. INTRODUCCIÓN
- V. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS
- VI. MATERIALES Y MÉTODOS
- VII. RESULTADOS
- VIII. DISCUSIÓN
- IX. CONCLUSIONES
- X. BIBLIOGRAFÍA
- XI. ANEXOS

2-AAF	2-acetilaminofluoreno
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
B6D2F1	Ratones C57BL/6J x DBA/2 F1
BDGF1	Ratones C57BL/6J- <i>βactin</i> EGFP x DBA/2 F1
BFU-E	Unidad formadora de <i>bust</i> eritroide
BGP1	Glicoproteína biliar 1
BSA	Albúmina bovina
CCl₃*	Radical triclorometilo
CCl₃OO*	Radical triclorometilperóxido
CCl₄	Tetracloruro de carbono
CEA	Antígeno carcinoembriónico
CFU-GM	Unidad formadora de colonias granulo-macrofágicas
CFU-Meg	Unidad formadora de colonias megacariocíticas
CLP	Progenitor linfoide común
CMH	Célula madre hematopoyética
CMP	Progenitor mieloide común
Cr-Y	Cromosoma Y
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DDC	3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento endotelial
EGFP	<i>Enhancer Green Flourescece Protein</i>
FAH	Fumarilacetoacetato hidrolasa
FISH	<i>Fluorescence In Situ Fluorescence Detection</i>
FITC	Fluoresceína
DF	Densidad de fluorescencia
G-CSF	<i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
GMP	Progenitor granulo-macrofágico
GOT	Transaminasa glutámico oxalacético
GPT	Transaminasa glutámico pirúvico
Gy	Gray
HCl	Ácido clorhídrico
HDMO	Hepatocito derivado de médula ósea
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HNF-1	<i>Hepatocyte Growth Factor 1</i>
IL-3	Interleuquina 3
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8

IL-10	Interleuquina 10
IL7R	Receptor de la interleuquina 7
IF	Índice de fluorescencia
IP	Yoduro de propidio
LSK	Lin ⁻ /c-Kit ⁺ /Sca-1 ⁺
LSKT	Lin ⁻ /c-Kit ⁺ /Sca-1 ⁺ /Thy-1 ^{low}
MAPC	<i>Multipotent Adult Progenitor Cells</i>
MO	Médula ósea
NaCl	Cloruro sódico
NaSCN	Tiocianato sódico
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Oxido nitroso
O₂	Oxígeno molecular
p.p.m.	Partes por millón
P/v	Relación peso/volumen
P3D2F1	Ratones B6SJL- <i>Ptprc^{a/b}Pep^{3b}</i> /BoyJ x DBA/2 F1
PAS	Ácido periódico-Schiff
PBA	PBS/0,1% BSA
PBS	Tampón fosfato salino
PE	Ficoeritrina
PFA	<i>p</i> -Formaldehído
SAV-TRC	Estreptavidina tricolor
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SDF-1	<i>Stromal derived factor-1</i>
SP	Sangre periférica
SP	<i>Side Population</i>
SSC	Disolución 15 mM de NaCl/1,5 mM citrato trisódico
TBST	Tampón salino Tris con Tween 20
TGF-α	Factor de crecimiento transformante α
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TPO	Trombopoyetina
TRITC	Isocianato de tetrametilrodamina
U.I.	Unidades internacionales
v/v	Relación volumen/volumen
Y-CISH	<i>Y Chromosome Chromogenic In Situ Fluorescence Detection</i>
Y-FISH	<i>Y Chromosome Fluorescence In Situ Fluorescence Detection</i>



III

- I. ÍNDICE
- II. ABREVIATURAS
- III. RESUMEN**
- IV. INTRODUCCIÓN
- V. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS
- VI. MATERIALES Y MÉTODOS
- VII. RESULTADOS
- VIII. DISCUSIÓN
- IX. CONCLUSIONES
- X. BIBLIOGRAFÍA
- XI. ANEXOS

The presence of Bone Marrow derived Hepatocytes (BMDH) in the liver has been described in different models, although the mechanism accounting for their origin is not clear yet. Direct differentiation of Hematopoietic Stem Cell (HSC) progeny and *in vivo* cell fusion of HSC-derived cells with endogenous hepatocytes have been proposed as mechanisms. The BMDH appearance has been related to the model used, and has varied from close to 30% of the total hepatocytes to very rare events.

A mouse model has been developed in order to study the generation of BMDH. Female mice were myeloablated and transplanted with BM cells from transgenic male mice, which expressed the green fluorescent protein (EGFP) under the control of β -actin ubiquitous promoter. After the establishment of a steady-state hematopoiesis, the animals were injected with saline or with carbon tetrachloride (CCl₄) to induce a hepatic cirrhosis-like damage. A great difference in serologic parameters and a completely altered hepatic structure was observed in the CCl₄-treated animals. The appearance of BMDH, identified as EGFP⁺CD45⁻ cells with hepatocyte morphology and expressing hepatocyte specific proteins by fluorescent immuno-histochemistry, was evaluated in 1 in 250,000 total hepatocytes.

Subsequently, animals were mobilized with Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) or G-CSF/thrombopoietin (TPO) for three weeks. G-CSF mobilization significantly increased the percentage of BMDHs (up to 17-fold) in the liver of CCl₄-treated mice. Moreover, the increment of BMDH was directly depended to the numbers of weeks with G-CSF treatment. The same BMDH frequency was reached with G-CSF/TPO mobilization. Similar numbers of BMDH were also detected when the mice were transplanted with a purified HSC population (Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺/EGFP⁺ phenotype), which needed previous engraftment in the bone marrow. Indicating the hematopoietic origin of BMDH.

To analyze the mechanisms underlying the generation of BMDH, male mice were transplanted with BM cells from female EGFP-transgenic mice and Y-chromosome analyses by fluorescent in situ hybridization were performed. We detected that most hepatocytes expressed EGFP and had the Y-chromosome, indicating that their origin was the result of the *in vivo* fusion between an endogenous male hepatocyte and a female blood cell. This process was increased using Ammonium Chloride (NH₄Cl), a phagocytosis inhibitor, suggesting that endocytic processes characteristic of monocyte-macrophage cells were involved in the BMDH formation.

Finally, to study how the hematopoietic nucleus of BMDH was reprogrammed, several nuclear characteristics were analyzed qualitatively and quantitatively. A sequential process was identified, in which the hematopoietic nucleus changed its morphology, lost hematopoietic nuclear factors and finally, expressed hepatic nuclear factors characteristic of the hepatic nucleus.

Overall, we have demonstrated that: i) The presence of BMDH in the liver is ensured when hepatic damage exists. ii) The presence of these cells can be increased significantly with hematopoietic growth factor treatment. iii) BMDHs are originated by *in vivo* fusion between hematopoietic cells and hepatocytes. iv) The hematopoietic nuclei of BMDH suffer changes in morphology, silence hematopoietic genes and incorporate hepatic nuclear proteins.

La presencia de hepatocitos derivados de médula ósea (HDMO) en el hígado se ha descrito en diferentes modelos. El mecanismo implicado en su origen no está del todo claro. Se ha propuesto como posibles mecanismos la diferenciación directa de la progenie de células madre hematopoyéticas (CMHs) y/o la fusión celular entre células derivadas de CMHs y hepatocitos endógenos. La frecuencia de aparición de HDMO está relacionada con el modelo estudiado, y varía según la fuente desde el 30% de todos los hepatocitos a ser un fenómeno muy escaso.

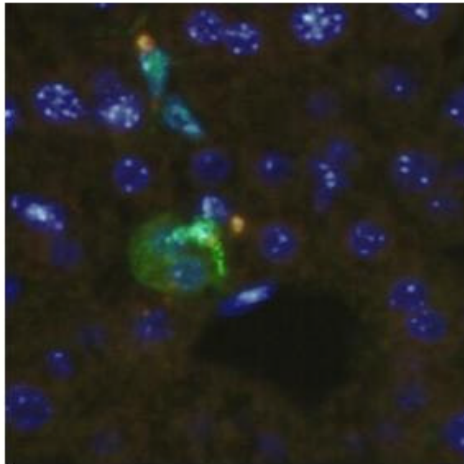
Para estudiar el proceso de generación de HDMO, se ha desarrollado un modelo en ratón, en el que ratones hembra letalmente irradiados fueron trasplantados con células de MO ratones transgénicos machos, que expresaban la proteína verde fluorescente (EGFP) bajo el control del promotor ubicuo de la β -actina. Después del establecimiento de la hematopoyesis quimérica, los animales fueron inyectados con solución salina o tetracloruro de (CCl₄) para inducir un daño hepático similar a una cirrosis crónica. En los animales tratados con CCl₄ se observó una gran diferencia en los parámetros serológicos y una estructura hepática completamente alterada. Los HDMO se identificaron mediante inmunofluorescencia como células EGFP⁺ con morfología de hepatocito, expresando proteínas específicas de hepatocito y no expresando marcadores hematopoyéticos (CD45⁻); la frecuencia de HDMO en los hígados dañados fue de 1 por 250.000 hepatocitos totales.

Posteriormente, se movilizó durante tres semanas con el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) o con G-CSF/trombopoyétina (TPO) a la mitad de los animales de cada grupo. Una semana más tarde, se sacrificaron los animales y se analizó la presencia de HDMO. La movilización con G-CSF incrementó significativamente el porcentaje de HDMO (más de 17 veces) en el hígado de los animales tratados con CCl₄. Una frecuencia igual, se alcanzó con la movilización con G-CSF/TPO. Números similares de HDMO se detectaron también cuando los ratones fueron trasplantados con una población purificada de CMHs (fenotipo Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺/EGFP⁺), las cuales necesitaron un injerto en médula ósea previo.

El análisis de los mecanismos implicados en la generación de HDMO, se realizó mediante la colocalización de marcadores celulares del donante de MO hembra (EGFP) y de los ratones receptores macho (cromosoma Y). Se detectó que la mayoría de los hepatocitos que expresaban EGFP también tenían el cromosoma Y, indicando que su origen era el resultado de una fusión *in vivo* entre hepatocitos endógenos y células sanguíneas de la hembra. Este proceso fue incrementado usando cloruro amónico (NH₄Cl), un inhibidor de la fagocitosis, sugiriendo que los procesos endocíticos característicos de monocitos-macrófagos, estaban implicados en la formación de HDMO. Por último, para determinar la forma en el que el núcleo hematopoyético se reprogramaba, se analizó cualitativa y cuantitativamente la morfología y la expresión de antígenos nucleares específicos de linaje. Se identificó un proceso secuencial, a través del cual el núcleo hematopoyético cambiaba su morfología, perdía factores nucleares hematopoyéticos y finalmente adquiría factores nucleares hepáticos, igualando a los núcleos de los hepatocitos.

En resumen, hemos demostrado que: i) la presencia de HDMO en el hígado se produce cuando existe un daño hepático. ii) La presencia de estas células puede ser incrementada significativamente con el uso de factores de crecimiento hematopoyéticos. iii) El origen de los HDMO es hematopoyético y se producen mediante fusión *in vivo* entre células hematopoyéticas y hepatocitos. iv) El núcleo hematopoyético de los HDMO sufre cambios en su morfología, silencia genes hematopoyéticos y presenta marcadores nucleares hepáticos.

IV



- I. ÍNDICE
- II. ABREVIATURAS
- III. RESUMEN
- IV. INTRODUCCIÓN**
- V. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS
- VI. MATERIALES Y MÉTODOS
- VII. RESULTADOS
- VIII. DISCUSIÓN
- IX. CONCLUSIONES
- X. BIBLIOGRAFÍA
- XI. ANEXOS

1. TERAPIA CELULAR.

Debido a las mejoras sanitarias que se han producido en los países desarrollados, se ha conseguido combatir eficazmente un gran número de enfermedades. Unido a este desarrollo han surgido numerosos nuevos retos como es el tratamiento de las enfermedades degenerativas, las cuales, debido al estilo y al aumento en la esperanza de vida, afectan a un porcentaje cada vez más alto de la población. Con el objetivo de restaurar la función de los tejidos y órganos dañados en procesos degenerativos, la terapia celular plantea el uso de células vivas como herramienta terapéutica.

La utilización de células para el tratamiento de enfermedades no es algo reciente. Ya a finales de la década de los 50 del pasado siglo, el grupo del Dr. E. Donnall Thomas (Ferrebee et al., 1958) consiguió realizar trasplantes de MO en un modelo canino después de irradiación. Diez años más tarde, el grupo del Dr. Robert Good realizó el primer trasplante de médula ósea (MO) en un paciente inmunodeficiente (Gatti et al., 1968). Estos estudios marcaron el inicio de la terapia celular, y más concretamente del trasplante de MO para el tratamiento de diversas enfermedades hematológicas. La terapia celular no se ha limitado al tratamiento de enfermedades hematológicas, sino que también se han desarrollado protocolos para el tratamiento de otras patologías.

Los tratamientos de terapia celular pueden basarse en el trasplante de células totalmente diferenciadas, como sucede en el trasplante de piel artificial para el tratamiento de quemados o en otras patologías. Sin embargo, debido a la existencia de células madre en distintos tejidos, que presentan la capacidad de originar todo el repertorio de células diferenciadas de ese tejido, la terapia celular presenta su mayor potencialidad en el uso de estas células madre para regenerar sus órganos, como ocurre actualmente en el caso del trasplante de MO. Aún más, el trasplante con células madre será clave para conseguir reemplazar a las células perdidas en otras enfermedades degenerativas como pueden ser el Alzheimer, Parkinson, diabetes, infarto de miocardio o enfermedades renales o hepáticas.

1.1. Fuentes de células madre.

Con el estudio de las células madre embrionarias y de las células madre adultas, la terapia celular ha adquirido una nueva dimensión, en la cual células de fuentes diversas son capaces de restaurar tejidos u órganos.

El inicio de un organismo tan compartimentalizado como el de un animal adulto (figura 1), formado por una innumerable cantidad de células especializadas, tiene lugar en la fecundación, donde un espermatozoide se fusiona con un oocito para originar el cigoto, considerado como totipotente por poseer la capacidad de generar todas las células de los tejidos embrionarios y extraembrionarios, placenta y cordón umbilical. El siguiente estadio de diferenciación consiste en la formación del blastocisto, donde residen células pluripotenciales, al ser capaces de originar células derivadas de las capas embrionarias (mesodermo, endodermo y neuroectodermo). En el blastocisto se localiza la masa celular interna, a partir de la cuál se obtienen las células madre embrionarias que presentan también características de pluripotencia. La especificación en las tres capas embrionarias se establece en el estadio de gástrula. A partir de cada capa embrionaria surge la multitud de tejidos presentes en el

organismo adulto. A las células con la potencialidad para originar células pertenecientes a los distintos tejidos adultos de una misma capa embrionaria, se les ha denominado como células multipotentes, al ser capaces de originar células de varios linajes distintos. Ya en el organismo adulto, en determinados tejidos existen células madre adultas, que mantienen la homeostasis propia del tejido, al reparar y reemplazar sus células maduras. Las células madre adultas presentan una serie de características esenciales, como son la de automantenerse y originar todos los tipos de células maduras del tejido al que pertenecen.

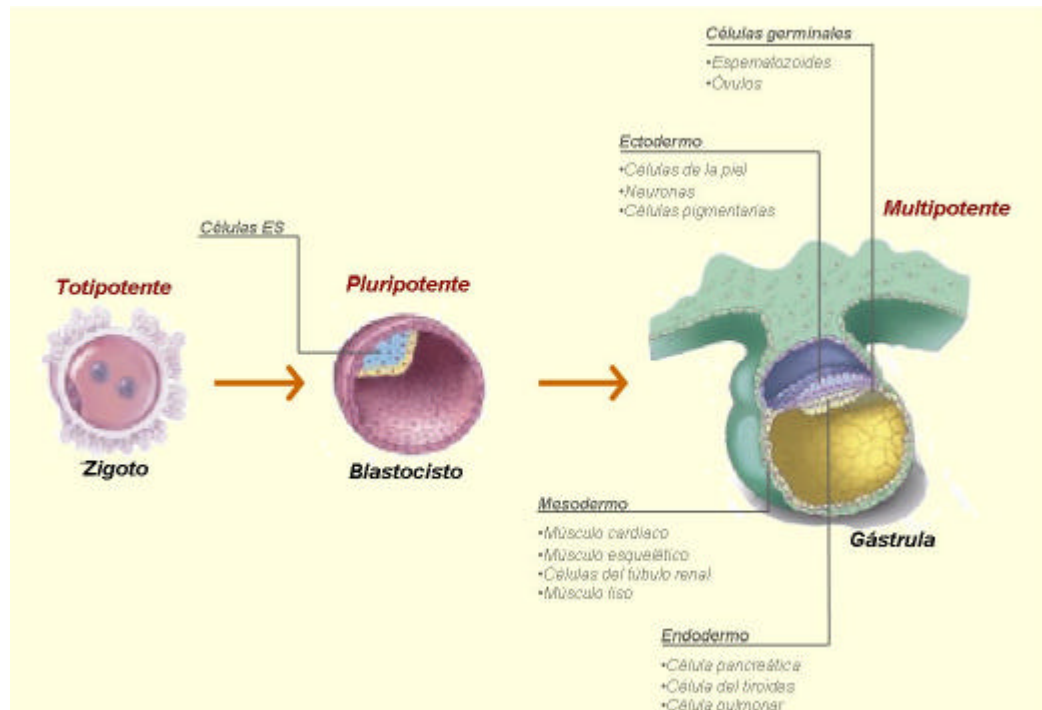


Figura 1. Compromiso tisular durante el desarrollo embrionario. Durante el desarrollo embrionario se originan multitud de tejidos que estarán presentes en el organismo adulto, mediante un proceso gradual de especialización. En el momento de la fecundación, se origina el cigoto, con capacidad de totipotencia; conforme se avanza en el desarrollo embrionario, se forma el blastocisto, en el que existen células pluripotenciales. En una etapa más avanzada se produce la especialización en capas embrionarias (mesodermo, endodermo y neuroectodermo). Dentro de cada capa existen células multipotentes capaces de originar los diferentes tejidos de una misma capa embrionaria. Por último se originan los diferentes tejidos que están presentes en el organismo adulto. Modificado de *Stem Cells: Scientific Progress and Future Directions. NIH Report*.

1.2. Procesos de plasticidad celular.

Durante los últimos años, el dogma central de la biología del desarrollo, según el cual cada una de las tres capas embrionarias determina de forma muy estricta la diferenciación posterior, ha sido cuestionado como resultado del potencial de plasticidad que poseen las células adultas, denominada plasticidad celular. El término plasticidad describe la conversión de una célula de un linaje tisular a otro completamente diferente, con una pérdida de marcadores específicos y de la funcionalidad del tejido original, y con la adquisición de marcadores y funciones características del nuevo linaje (Krause, 2002; Theise and Wilmut, 2003).

La existencia de la plasticidad celular se pone más de manifiesto durante el desarrollo embrionario, donde a partir de una única célula se originan numerosos tipos celulares que son necesarios para la formación del organismo adulto. En el caso de los mamíferos existen más de 200

tipos distintos de células, muchas de ellas altamente especializadas como son las neuronas, células sanguíneas, miocitos o hepatocitos.

Existen en la naturaleza ejemplos donde la plasticidad celular cobra también un papel esencial. Éste es el caso de los mecanismos que intervienen en la regeneración de órganos y apéndices después de daño o de pérdida total de una extremidad. Éstos ocurren en diversos animales como es el caso de las salamandras, que son capaces de regenerar sus extremidades, cola, mandíbula superior, tejidos oculares, intestino y pequeñas secciones de corazón, a partir de unas pocas células maduras, mediante la formación de unas estructuras llamadas blastemas (Brockes and Kumar, 2005). Las salamandras constituyen uno de los pocos ejemplos de vertebrados adultos en los que se observa una capacidad de plasticidad celular tan significativa, como es la regeneración de estructuras tisulares complejas a partir de una pequeña población de células.

La existencia de procesos de plasticidad celular en mamíferos adultos nos indicaría una reminiscencia de la potencialidad de las células madre embrionarias o de los que se producen en organismo inferiores.

Estas potencialidades de las células adultas, aumentan considerablemente su posible aplicación en terapia celular, al no restringirse su diferenciación a un determinado tejido.

1.3. Plasticidad de células adultas.

La constatación de la existencia de procesos de plasticidad celular en mamíferos adultos, ha producido durante los últimos años una gran controversia. Con anterioridad al estudio de estos procesos de plasticidad celular, se conocía la existencia de células madre de distintos tejidos, con una capacidad para automantenerse y de originar todas las células presentes en su tejido. Éstas eran las únicas células identificadas en los organismos adultos responsables del desarrollo y de la regeneración de su propio tejido (Weissman, 2000). Se ha descrito la existencia de células madre adultas en multitud de tejidos, como el sistema hematopoyético, piel, epitelio intestinal, sistema nervioso o músculo (Fuchs and Segre, 2000). Estas células madre adultas, responsables del mantenimiento de la homeostasis y de la regeneración de su propio tejido, se habían descrito con un potencial de plasticidad celular limitado al tener sólo la capacidad de originar todos los tipos celulares del tejido en el que residen (Hirschi and Goodell, 2002; Krause, 2002).

Desde finales de la década de los 90, numerosos grupos de investigadores describieron inesperados procesos de plasticidad por parte de células adultas. Es decir, diferentes tipos de células, eran capaces de originar una gran variedad de tejidos distintos del que procedían (ver tabla 1).

Ya en 1998, Ferrari y colaboradores describieron la contribución de células de MO marcadas genéticamente en un modelo de ratón para reparar músculo esquelético dañado mediante su diferenciación a fibras musculares (Ferrari et al., 1998). Esto ocurría a través de intermediarios hematopoyéticos mieloides (Camargo et al., 2003), demostrando que las células madre presentaban un potencial de diferenciación mucho mayor de lo que hasta la fecha se había pensado. En un modelo de ratón de distrofia muscular, se vio la potencial aplicación clínica de células de la MO para restaurar esta enfermedad (Gussoni et al., 1999; Fukada et al., 2002). Incluso su contribución muscular iba más allá,

al transformarse en células satélite, consideradas como las células madre del músculo (LaBarge and Blau, 2002).

Tejido origen	Tejido formado	Referencia
MO	Músculo	(Ferrari et al., 1998; Bittner et al., 1999; Gussoni et al., 1999; Gussoni et al., 2002; LaBarge and Blau, 2002; Corbel et al., 2003; Dreyfus et al., 2004; Abedi et al., 2004a; Abedi et al., 2004b; Ratajczak et al., 2004; Yoshimoto et al., 2005)
MO	Corazón/músculo cardíaco	(Bittner et al., 1999; Jackson et al., 2001; Orlic et al., 2001a; Orlic et al., 2001b; Quaini et al., 2002; Alvarez-Dolado et al., 2003; Deb et al., 2003; Stamm et al., 2003; Tse et al., 2003)
MO	Sistema nervioso central	(Brazelton et al., 2000; Mezey et al., 2000; Priller et al., 2001a; Priller et al., 2001b; Jiang et al., 2002b; Alvarez-Dolado et al., 2003; Jiang et al., 2003; Ratajczak et al., 2004)
MO	Hígado	Revisado en tabla 2 y en Referencia (Thorgeirsson and Grisham, 2006)
MO	Riñón	(Cornacchia et al., 2001; Grimm et al., 2001; Imasawa et al., 2001; Ito et al., 2001; Poulsom et al., 2001; Gupta et al., 2002; Kale et al., 2003)
MO	Páncreas	(Hess et al., 2003; Ianus et al., 2003)
MO	Tracto gastrointestinal	(Krause et al., 2001; Korbling et al., 2002; Okamoto et al., 2002)
MO	Pulmón	(Kotton et al., 2001; Krause et al., 2001; Jiang et al., 2002b; Theise et al., 2002; Abe et al., 2003; Harris et al., 2004; Aliotta et al., 2006)
MO	Piel	(Krause et al., 2001; Hematti et al., 2002; Korbling et al., 2002; Badiavas et al., 2003; Abedi et al., 2004a; Harris et al., 2004; Brittan et al., 2005)
MO	Endotelio	(Shi et al., 1998; Jackson et al., 2001; Kocher et al., 2001; Orlic et al., 2001a; Jiang et al., 2002b; Stadtfeld and Graf, 2005)
Músculo	Hematopoyesis	(Jackson et al., 1999; Pang, 2000)
Sistema nervioso	Hematopoyesis	(Bjornson et al., 1999)
Sistema nervioso	Músculo	(Rietze et al., 2001)
Piel	Músculo	(Toma et al., 2001)
Piel	Sistema nervioso	(Toma et al., 2001; Fernandes et al., 2004)

Tabla 1. Resumen de la plasticidad de células adultas. Sólo se han recogido las publicaciones más representativas. MO indica médula ósea.

También ha quedado demostrado en numerosos trabajos, la contribución de células de MO a tejido cardíaco. Así, el grupo de Orlic y colaboradores, demostraron la contribución de una población deplecionada en células maduras de MO que expresaban la proteína verde fluorescente (EGFP), en la restauración de la función cardíaca en la zona de isquemia producida por ligación coronaria en un modelo de infarto de miocardio en ratón. Estos autores localizaron, a los nueve días del trasplante, células EGFP⁺ que además expresaban marcadores de cardiomiocitos (Orlic et al., 2001a). En otro estudio semejante también se identificó la participación de células de MO en la regeneración cardíaca, en ratones cuya hematopoyesis había sido restaurada a partir de células de MO que portaban *LacZ* como gen marcador, se comprobó que en la zona de daño cardíaco había reclutado células de MO y que expresaban marcadores cardíacos (Jackson et al., 2001). De nuevo el grupo de Orlic, en 2001 demostró que la movilización de células hematopoyéticas con factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF, del inglés *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) antes y después del daño cardíaco en ratón, reducía el tamaño de la región dañada y la mortalidad (Orlic et al., 2001b). Sin

embargo, en experimentos similares realizados en primates no humanos, no se consiguió reparar la zona infartada, reduciéndose la acción de G-CSF a inducir angiogénesis (Norol et al., 2003). En el 2004, se demostró que esta conversión de células de MO hacia cardiomiocitos, ocurría a través de fusión celular entre ambos tipos celulares (Nygren et al., 2004). También en humanos se observó la contribución de las células de MO al corazón en pacientes varones que habían recibido un trasplante cardíaco procedente de donantes mujeres (Deb et al., 2003).

En 1999 se consiguió restaurar la hematopoyesis de ratones letalmente irradiados, después de trasplantarlos con células madre nerviosas (Bjornson et al., 1999). Un año más tarde se identificó el proceso contrario. A partir del trasplante de células de MO se identificaron células procedentes del trasplante que se localizaban en el cerebro y expresaban marcadores neuronales (Brazelton et al., 2000; Mezey et al., 2000). Por otra parte el grupo del Dr. Dirgnal identificó tanto microglías (Priller et al., 2001a) como neuronas de Purkinje funcionales (Priller et al., 2001b; Alvarez-Dolado et al., 2003) derivadas de la MO, siguiendo su origen mediante el marcaje con vectores retrovirales. Esto abría una alternativa para posibles terapias de enfermedades neurodegenerativas.

En un trabajo de la Dra. D. Krause (Krause et al., 2001), observó el amplio potencial de plasticidad celular de las células hematopoyéticas para diferenciarse a multitud de tejidos. En dicho trabajo, se demostró que una sola célula madre hematopoyética (CMH), no sólo reconstituía todos los linajes hematopoyéticos en receptores letalmente irradiados, sino también que una amplia variedad de tejidos no hematopoyéticos eran derivados de la MO. Se localizaron células derivadas de aquella única célula en bronquios (el $2,32 \pm 1,45\%$ de las células de los bronquios se derivaban de las CMHs), alvéolos ($12,58 \pm 4,07$), esófago ($1,12 \pm 1,14\%$), estómago ($0,32 \pm 0,21$), intestino delgado ($0,54 \pm 0,61\%$), intestino grueso ($0,12 \pm 0,13\%$), piel ($2,1 \pm 0,66$) y conducto biliar ($0,52 \pm 0,95\%$).

2. SISTEMA HEMATOPOYÉTICO.

El tejido hematopoyético es un sistema con distribución jerárquica en el que, por sucesivos eventos de proliferación y diferenciación finamente regulados, se generan todas las células funcionales de la sangre. Durante el desarrollo fetal, la hematopoyesis avanza desde el saco vitelino y la región aorta-gónada-mesonefro (AGM) (Medvinsky and Dzierzak, 1996; Sanchez et al., 1996) al hígado fetal, bazo y finalmente a la MO (Tavassoli, 1994). En el estado adulto la hematopoyesis tiene lugar fundamentalmente en MO, timo y en el caso del ratón, también en el bazo.

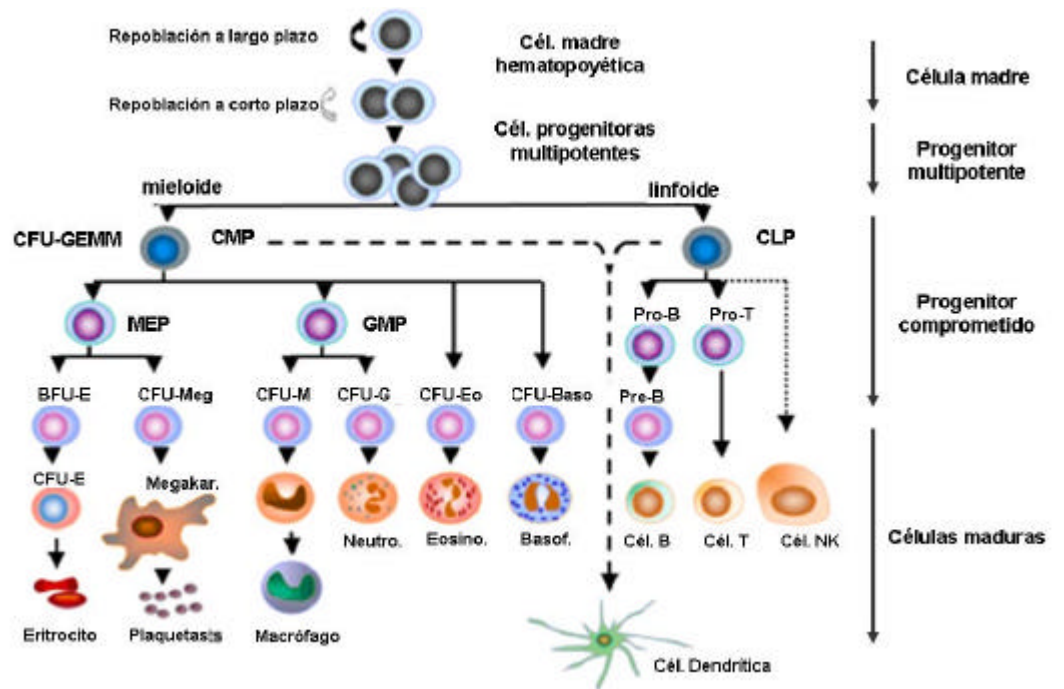


Figura 2. Esquema del sistema hematopoyético. Existen tres compartimentos celulares: células madre hematopoyéticas, células progenitoras comprometidas y células maduras con morfología reconocible. CFU-GEMM, unidad formadora de colonias de granulocitos, eritrocitos, monocitos y megacariocitos; CMP, progenitor mielóide común; CLP, progenitor linfóide común; MEP, progenitor megacariocítico-eritroide; GMP, progenitor granulocítico-macrofágico; BFU-E, unidad formadora de empedrado eritroide; CFU-Meg, unidad formadora de colonias megacariocíticas; CFU-M, unidad formadora de colonias de macrófagos; CFU-G, unidad formadora de colonias granulocíticas; CFU-Eo, unidad formadora de colonias eosinofílicas; CFU-Baso, unidad formadora de colonias.

2.1. Jerarquía del sistema hematopoyético.

En el sistema hematopoyético (figura 2), se establece una estructura altamente jerarquizada a medida que se avanza en el proceso de maduración de las células hematopoyéticas, las cuales adquieren una capacidad de diferenciación más restringida y una limitada capacidad de automantenimiento. Siguiendo este criterio, las células hematopoyéticas se distribuyen en una estructura compuesta por tres compartimentos, según su capacidad de diferenciación y automantenimiento:

2.1.1. Células madre hematopoyéticas.

Son células con capacidad de autorenovación a lo largo de la vida del individuo y de diferenciación a progenitores más comprometidos y a células maduras especializadas funcionales (Till and Mc, 1961). A lo largo del proceso de maduración, las CMHs originan células progenitoras de los dos linajes hematopoyéticos (mieloide y linfoide) a partir de las cuales deriva todo el repertorio de células maduras.

El único ensayo válido para identificar la presencia de CMHs, es evaluar su capacidad para reconstituir el sistema hematopoyético de un receptor que ha sido irradiado. Ésto se debe a que la reconstitución hematopoyética requiere de las células trasplantadas un gran potencial de autorenovación y de diferenciación a todos los tipos de células sanguíneas, características que únicamente poseen las CMHs. En ratones y humanos, se han desarrollado numerosas estrategias para aislar y caracterizar las CMHs. Para ratón, muchos protocolos de purificación comienzan con un paso de depleción de células comprometidas, en el que se retiran todas las células que expresan marcadores específicos de linaje (ej. CD11b para macrófagos y granulocitos, CD3 para células T, B220 para células B, y Ter-119 para células rojas). La población resultante, llamada Lin⁻, está enriquecida de 10 a 100 veces en CMHs.

Una mayor purificación de las CMHSs puede llevarse a cabo de varias formas. Mediante la selección de las células que excluyen los colorantes rodamina y Hoechst (Hoechst^{low}/rodamina^{low}) dentro de la población Lin⁻, se ha conseguido purificar CMHSs (Wolf et al., 1993). Los fenotipos CD34⁺/Lin⁻ (Krause et al., 1994), y Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺/Thy-1^{low} (Fleming et al., 1993), también han sido utilizadas para la purificación de CMHs. A pesar de que la población CD34⁺/Lin⁻ puede reconstituir hematopoyesis (Donnelly et al., 1999) y por lo tanto contener CMHs, el Osawa y colaboradores, demostraron que dentro de la población CD34⁻ residen las CMHs más primitivas (Osawa et al., 1996). También se encuentra enriquecida en CMHs la población SP (del inglés *Side Population*), denominada así por su capacidad para excluir el colorante Hoechst; las células SP también están presentes en otros tejidos, incluido el músculo esquelético (Asakura and Rudnicki, 2002). Algunos autores sugieren que las células SP pueden ser células madre específicas de tejido. Otros proponen que son células derivadas de MO alojadas dentro de otros tejidos (Asakura and Rudnicki, 2002; Majka et al., 2003). Otro método para purificar CMHs en ratón, descrito por el Dr. S. J. Sharkis (Krause et al., 2001; Jang et al., 2004), se basa en el hecho de que las CMHs son células poco proliferativas, por lo que si son tratadas con PKH26, el cual tiñe la membrana celular y es distribuido por igual entre las células hijas en una división celular. Estas células trasplantadas en un receptor letalmente irradiado, en las primeras 24 horas no se dividirán, manteniendo toda la fluorescencia debida a la tinción, y podrán ser fácilmente aisladas mediante procesos de selección celular.

El CD34 fue el primer marcador encontrado en las CMHs humanas (Civin et al., 1984). Junto con la selección Thy-1⁺ y un cóctel Lin⁻, identifica CMHs humanas (Baum et al., 1992; Craig et al., 1993). También se ha descrito al marcador CD133 como un posible sustituto del CD34 (Yin et al., 1997). En 1998, se describió una separación muy restrictiva con el fenotipo CD34⁺/Thy-1⁺/Lin⁻/CD38⁻ (Uchida et al., 1998). Una característica para identificar a las CMHs humanas, es su capacidad para repoblar eficazmente ratones irradiados SCID-hu o NOD-SCID (Ploemacher, 1997).

2.1.2. Células progenitoras comprometidas.

Son células con una elevada tasa proliferativa, presentan una capacidad de automantenimiento baja o nula y su diferenciación está restringida hacia un tipo celular concreto (Metcalf, 1989). Son las encargadas de la amplificación que ocurre en la producción de células de la sangre. Su frecuencia es aproximadamente de 1:1000 células de MO.

Los precursores hematopoyéticos comprometidos se pueden estimular *in vitro* mediante la adición de factores de crecimiento hematopoyético y esta capacidad es la base de la realización de ensayos clonogénicos en los cuales dichos progenitores dan lugar a colonias cuantificables de células diferenciadas en cultivos en medio semisólido. Su primera descripción fue en los años 60. Dos trabajos independientes demostraron que cuando suspensiones celulares de MO y bazo eran cultivadas en agar, se desarrollaban colonias de células compuestas por granulocitos y/o macrófagos (Pluznik and Sachs, 1965; Bradley and Metcalf, 1966). La formación de estas colonias es una prueba indirecta de la existencia de un precursor de la línea granulomacrofágica, y se denominan unidades formadoras de colonias granulo-macrofágicas (CFU-GM). Cuando a los cultivos semisólidos se les añaden concentraciones relativamente altas de eritropoyétina, se observan colonias derivadas de precursores de la línea eritroide, son las unidades formadoras de *burst* eritroides (BFU-E) (Gregory and Eaves, 1978). En cuanto a la línea megacariocítica se refiere, la unidad formadora de megacariocitos (CFU-Meg) es el precursor celular comprometido más temprano que se puede detectar (McLeod et al., 1976; Nakeff and Daniels-McQueen, 1976).

Para la purificación de progenitores comprometidos se han seguido aproximaciones a las de las CMHs. Así, el progenitor común linfóide (CLP) se purificó según su expresión del receptor de la interleuquina-7 (IL-7R) definiéndose una población de la MO enriquecida en actividad progenitora linfóide (Ryan et al., 1997). Además, como los progenitores mieloeritroides son c-Kit⁺, los progenitores no linfoides de la MO pertenecerían a la población IL-7R/c-Kit⁺ (Kouro et al., 2002). Akashi y colaboradores (Akashi et al., 1998) fueron capaces, gracias a su fenotipo, de purificar tres grandes tipos de progenitores mieloides, como son el progenitor común mielóide (CMP) (CD34⁺/F_c?R^{low}), y dos progenitores más comprometidos, el progenitor megacariocito/eritrocito (MEP) (CD34⁺/F_c?R^{low}) y el progenitor granulocito/monocito (GMP) (CD34⁺/F_c?R^{high}) (Lagasse et al., 2001; Kouro et al., 2002).

2.1.3. Células de morfología reconocible o células maduras.

Corresponden al nivel máximo de diferenciación hematopoyética en el que se incluyen las células en maduración o ya maduras y funcionalmente activas. Se caracterizan por presentar baja o nula capacidad de proliferación y automantenimiento.

El linaje linfóide está formado por tres poblaciones de linfocitos distintas: células T, células B, y células *natural killer* (NK); tanto los linfocitos T como B poseen especificidad antigénica; por el contrario las células NK forman parte de la respuesta inmune natural (Abbas, 2004). Los linfocitos T y B son los responsables de la respuesta inmune específica. Se producen en los órganos linfoides primarios del orden de 1000 millones al día, y de allí migran a órganos linfoides secundarios y a espacios tisulares. En el individuo adulto existe un billón de linfocitos, lo que supone el 2% del peso corporal total, y suponen entre el 20 y el 40% de los leucocitos totales.

El linaje mieloide está formado por monocitos, granulocitos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos, megacariocitos, plaquetas y eritrocitos. Se ha definido el sistema fagocítico mononuclear, cuya función básica es la fagocitosis, que juega un papel importante en la inmunidad natural; se origina en la MO, desde donde pasan a sangre periférica (SP). Los monocitos migran a los tejidos, transformándose en macrófagos, que pueden activarse y adquirir diferentes formas (células gigante multinucleadas, microglías, células de Kupffer, macrófagos alveolares y osteoclastos). Los granulocitos presentan numerosos gránulos citoplasmáticos y actúan en procesos de inflamación y en inmunidad natural. Existen tres tipos de granulocitos: neutrófilos, eosinófilos y basófilos. A partir de los megacariocitos se forman las plaquetas, en un proceso denominado megacariocitopoyesis; las plaquetas participan en la coagulación sanguínea. Los eritrocitos son los encargados del transporte de oxígeno y dióxido de carbono en el organismo y se originan mediante el proceso denominado eritropoyesis.

Existe otro tipo celular, las células dendríticas, que pueden derivar tanto de células del linaje linfoide como mieloide; son importantes en la presentación de antígenos a los linfocitos T.

2.2. Movilización de células progenitoras y células madre hematopoyéticas.

Existe un estado de homeostasis entre las células de los diferentes compartimentos hematopoyéticos que se encuentran en el torrente sanguíneo y las residentes en MO. Este equilibrio se ve interrumpido ante diferentes señales, creándose una situación de alarma en la que se incrementa la liberación de células inmaduras y maduras desde MO a SP. A este proceso se le denomina movilización, y ocurre naturalmente durante un proceso inflamatorio o de daño. Esta liberación también

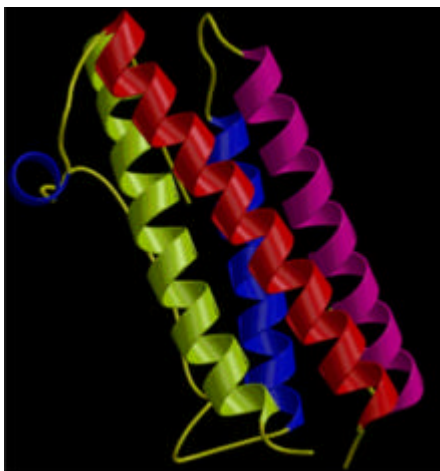


Figura 3. Estructura molecular del G-CSF.

se induce clínicamente o en modelos animales por una amplia gama de moléculas y/o tratamientos: agentes que causan daño al ácido desoxirribonucleico (ADN), drogas quimioterapéuticas como la ciclofosfamida, o regímenes de quimioterapia combinados tales como fosfamida, carboplatino y etoposido (ICE), metilprednisolona, ara-c y cisplatino (ESHAP). Citoquinas como G-CSF (del inglés *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*), GM-CSF (del inglés *Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor*), SCF (del inglés *Stem Cell Factor*) y flt-3 ligando y quimioquinas tales como interleuquina 8 (IL-8), Mip-1 α , Gro β y SDF-1 (del inglés *Stromal derived factor-1*) (Cottler-Fox et al., 2003) también inducen esta movilización.

El G-CSF (figura 3) fue el primer factor descrito con capacidad de incrementar el número total de células hematopoyéticas circulantes (Molineux et al., 1990; Varas et al., 1996; Molineux et al., 1999). La administración de G-CSF se ha utilizado tradicionalmente en la profilaxis de la neutropenia inducida por quimioterapia. También actúa como un agente efectivo para la movilización de progenitores hematopoyéticos desde MO a SP y promueve la diferenciación de progenitores granulocíticos a granulocitos maduros (Drize et al., 1993; Bodine et al., 1996; de Haan et al., 2000; Cottler-Fox et al., 2003;). Mediante el uso de Neulasta (Amgen), cuyo principio activo es un G-CSF modificado por pegilación, se consigue un efecto en la movilización de progenitores hematopoyéticos efecto similar al obtenido con G-CSF, pero sin la necesidad de varias inyecciones diarias, facilitándose así su administración (Willis and Pettengell, 2002; Lyman, 2005).

En resumen, con la movilización se consigue el reclutamiento de progenitores hematopoyéticos durante situaciones de alarma; la médula ósea actúa como un reservorio de células hematopoyéticas maduras e inmaduras que son liberadas al torrente sanguíneo ante señales de estrés, para migrar al lugar de daño y así contribuir a la defensa del huésped y a la reparación tisular.

3. EL HÍGADO.

El hígado es el órgano más grande y uno de los más importantes del organismo (Volwier W., 2006). Está localizado bajo la caja torácica, en el lado derecho del abdomen. En individuos adultos pesa alrededor de 1,5Kg, y desarrolla más de 500 funciones vitales. Así, por ejemplo, sin él no podríamos ni absorber comida ni eliminar sustancias tóxicas.

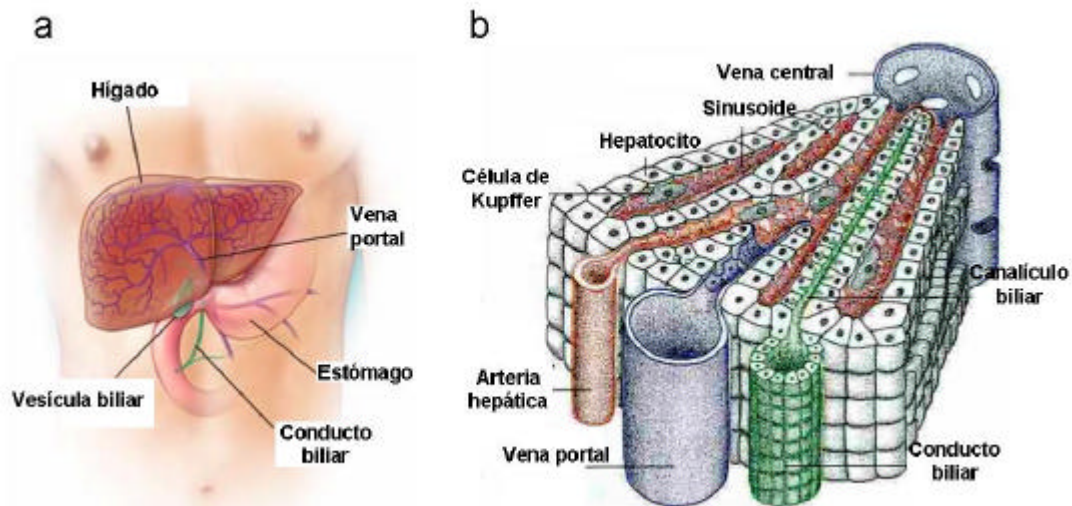


Figura 4. Anatomía hepática. a) Localización del hígado dentro del organismo. b) Representación esquemática del lobulillo hepático.

3.1. Anatomía macroscópica.

La mayor parte del hígado se haya alojada debajo de la cúpula diafragmática derecha (Figura 4a). Su cara anterior está protegida por las costillas del hemitórax derecho, y su borde anterior aflora por debajo del reborde costal del mismo lado. Separada por el diafragma, su cara superior está en relación con la pleura y el pulmón derecho; su cara inferior, en la cavidad abdominal, se relaciona con el colon derecho, el duodeno y el páncreas, y su cara posterior con el riñón derecho.

El hígado humano está constituido por una masa única, dividida en lóbulos; los dos de mayor tamaño, el izquierdo y el derecho, están separados por la vena porta y la arteria hepática. Visto por su cara inferior, se distinguen otros dos lóbulos de menor tamaño, el lóbulo caudado y el cuadrado. Toda su superficie está recubierta por una doble membrana fibrosa, el peritoneo visceral y la cápsula de Glisson.

El hígado es un órgano muy irrigado, realizándose la vascularización a través de la vena porta y la arteria hepática. La vena porta proporciona entre el 65 y el 85% de la sangre que llega al hígado, y el 20 y el 35% del aporte sanguíneo se realiza por la arteria hepática. La oxigenación de las células hepáticas la realizan a parte iguales tanto la vena porta como la arteria hepática. Esto se debe a que la concentración de oxígeno de la vena porta es algo inferior a la de la sangre arterial, pero muy superior a la de la sangre venosa. La vena porta y la arteria hepática entran en el hígado a través del tronco celíaco, donde cada uno de ellos se divide en dos ramas, destinadas a la irrigación de los lóbulos hepáticos, y en cuyo interior y por sucesivas ramificaciones terminan en una red vascular común, la

sinusoide hepática. El drenaje venoso del hígado se realiza a través de vénulas, las suprahepáticas derecha e izquierda, que desembocan en un tronco suprahepático común, el cual acaba en la vena cava inferior.

3.2. Anatomía microscópica.

La unidad microscópica del hígado es el lobulillo hepático (figura 4b). Cada lobulillo tiene un aspecto piriforme, en el que está centrada la vena central del lobulillo y en su periferia se sitúan los espacios portales (tríada portal), que contienen ramificaciones portal, arterial y el conducto biliar. En forma radial, desde la vena central hasta la periferia, se extienden hileras de hepatocitos, y entre cada hilera se constituyen las sinusoides hepáticas. Desde los espacios portales, las ramas terminales de la vena porta y de la arteria hepática envían la sangre hacia la vena central. El hígado posee varios tipos de células:

Hepatocitos: Constituyen entre el 60 al 80% de la masa hepática. Presentan una forma poliédrica de unos 20 a 30 μm de diámetro; poseen núcleos con numerosos nucleolos, y una relación núcleo/citoplasma baja o moderada. Se disponen en hileras, las cuales se estructuran en sinusoides, formadas por dos hileras de hepatocitos que están separadas por el espacio de Disse. Se distinguen distintos dominios en el hepatocito, los dominios laterales y los sinusoidales. En los dominios laterales, donde se establece el contacto con los hepatocitos adyacentes de su misma hilera, quedándose un surco de microvellosidades, que junto al de otro hepatocito vecino forma un capilar biliar, donde se vierte bilis. Los dominios sinusoidales están dirigidos al espacio de Disse, hacia el cual se disponen microvellosidades. Los hepatocitos situados en la zona periportal de un lobulillo hepático, establecen contactos con células biliares, formando el canal de Hering, por donde fluye la bilis hasta los capilares biliares.

Células de Kupffer: Son células de origen macrófagico situado en las sinusoides hepáticas. Su principal función es retirar de la sangre las partículas contaminantes que estén presentes, así como los eritrocitos envejecidos.

Células de Ito: Se localizan en el espacio de Disse. Almacenan vitamina A, sintetizan proteínas de tejido conectivo y diversos factores de crecimiento. En condiciones de daño adquieren capacidad fibroblástica.

Células endoteliales fenestradas: Conforman la barrera entre el espacio de Disse y la sinusoide hepática, y son las únicas células endoteliales con grandes huecos citoplasmáticos que permiten un contacto máximo entre la sangre circulante y los hepatocitos.

Colangiocitos o células biliares: Son células epiteliales, que forman el conducto biliar, a donde desemboca la bilis producida por los hepatocitos.

Células ovals: No se conoce su naturaleza exacta. Se ha pensado que pudieran constituir una población de células madre hepáticas que son capaces de originar tanto hepatocitos como colangiocitos, o incluso ser un intermediario de la hipotética célula madre hepática y su descendencia. Estas células proliferan bajo determinadas condiciones, principalmente cuando los hepatocitos no consiguen proliferar ante un proceso de daño. A esta proliferación de las células ovals se denomina

reacción oval (Kofman et al., 2005). Existe discrepancia en su localización, que pudiera ser en el canal de Hering o cerca de los conductos biliares (Petersen et al., 1999).

Otros tipos celulares: Células endoteliales que forman los vasos sanguíneos y linfáticos, y células de músculo liso, localizados en las venas y arterias; células nerviosas, fibroblastos y células inflamatorias.

3.3. Funciones del hígado.

Debido a su localización entre el sistema digestivo y el resto del organismo, el hígado tiene un papel fundamental en la regulación de la concentración sanguínea de numerosas moléculas, ya que es el encargado de controlar el aporte de nutrientes derivados de la dieta. Entre las principales funciones desarrolladas por el hígado se encuentran:

Metabolismo de la bilirrubina: La bilirrubina es un producto tóxico y liposoluble, resultante de la degradación del grupo hemo de la hemoglobina de los eritrocitos. La medida de los niveles de bilirrubina es una prueba bioquímica que indica la funcionalidad hepática.

Metabolismo de aminoácidos y proteínas: El hígado es el principal responsable de la distribución de los aminoácidos y péptidos procedentes de la dieta. El hígado actúa como reservorio de aminoácidos libres, y se encarga de la síntesis de muchas proteínas plasmáticas.

Metabolismo de hidratos de carbono: En el hígado se desarrolla la gluconeogénesis de hidratos de carbono para almacenarlos en forma de glucógeno, a partir de los azúcares de la dieta, y en condiciones de escasez de glucosa, también a partir de aminoácidos o de lípidos.

Metabolismo de los lípidos: A parte de la absorción de los lípidos ingeridos por parte del intestino, el hígado también es capaz de sintetizar ácidos grasos a partir de precursores hidrocarbonados (lipogénesis).

Metabolismo de las sales biliares: Las sales biliares son las responsables de la solubilización de los lípidos para que sean absorbidos por el intestino.

Función fagocítica del hígado: Es llevada a cabo por las células de Kupffer. Estas células forman parte del sistema fagocítico mononuclear y se encargan de fagocitar bacterias, virus y partículas extrañas.

Otras funciones: Los hepatocitos son capaces de endocitar hormonas, secretándolas a través del canalículo biliar, o de ser degradados. Intervienen en el proceso de detoxificación de fármacos y otras toxinas. Y actúan como depósito de vitamina A.

3.4. Patologías hepáticas.

Existen numerosas afecciones que pueden dañar al hígado, en primer lugar porque sufre la acción directa de toxinas que entran en el organismo, o incluso debido a la bioactivación de

compuestos aparentemente inertes, que son transformados por alguna de las enzimas que intervienen en procesos de óxido-reducción en el hígado. También es susceptible al ataque de distintos virus o de otras enfermedades genéticas. Las mayores causas de daño en el hígado pueden ser infecciones virales, respuestas autoinmunes, drogas, alcohol, o enfermedades genéticas como la enfermedad de Wilson o la deficiencia de α -1-antitripsina (Howard J. Worman, 2003; Volwier W., 2006), y sus síntomas en el hígado se manifiestan con distintos grados de severidad, como son:

Hígado graso: Es la acumulación de depósitos de grasa en los hepatocitos. Puede aparecer con el abuso del alcohol y en individuos obesos. Viene acompañado de inflamación, que puede desembocar en cirrosis.

Hepatitis: Con este nombre se designan inflamaciones difusas del hígado. Pueden ser víricas (hepatitis A, B y C), o causadas por alcohol u otras drogas. La hepatitis puede ser aguda o crónica. La primera se caracteriza por alteraciones centrolobulillares, como necrosis, inflamación, aparición de signos regenerativos, como son aumento de mitosis y de hepatocitos binucleados. La hepatitis crónica se define como la presencia de inflamación en el hígado durante más de seis meses, que puede desembocar en cirrosis, fallo hepático e incluso la muerte.

Cirrosis: Se define como una fibrosis hepática ampliamente distribuida y con distorsión de la arquitectura lobular hepática. Producida por una inflamación persistente y/o la necrosis de células del parénquima, combinada con una regeneración en forma de nódulos.

3.4.1. Toxicidad inducida por tetracloruro de carbono.

El tetracloruro de carbono (CCl_4) (Ariosto et al., 1989; Lee, 1993; Weber et al., 2003) es utilizado frecuentemente para producir daño hepático generalizado, con el que se consigue degradación de lípidos, fibrosis, muerte hepatocelular y actúa como carcinógeno; la acción de este compuesto depende de la dosis, del tiempo de exposición, de la presencia de agentes potenciadores y de la edad del organismo afectado, y produce la activación del programa de regeneración hepática.

La activación del CCl_4 se debe a la acción de los citocromos (CYP)2E1, CYP2P1 o CYP2B2, y posiblemente el CYP3A, produciendo el radical triclorometilo (CCl_3^*). Este radical se puede unir a moléculas celulares (ácidos nucleicos, proteínas o lípidos), deteriorando procesos cruciales como el metabolismo de los lípidos. La formación de aductos entre CCl_3^* y ADN puede actuar como iniciador de cáncer hepático. Este radical también puede reaccionar con oxígeno molecular (O_2) para formar el radical triclorometilperóxido (CCl_3OO^*), una especie altamente reactiva. El CCl_3OO^* inicia la reacción en cadena de peroxidación de los lípidos, resultando en la destrucción de los ácidos grasos poliinsaturados, en particular los asociados a fosfolípidos; esto afecta a la permeabilidad mitocondrial del retículo endoplásmico y de las membranas plasmáticas, resultando con la pérdida de calcio celular; también se produce un incremento de la síntesis de triglicéridos, acumulándose en el interior de los hepatocitos, característico del hígado graso. Casi todos los productos de la degradación de los ácidos grasos son aldehídos reactivos, especialmente 4-hidroxinonenal, que se unen fácilmente a grupos de proteínas inhibiendo la actividad de muchas enzimas. La intoxicación con CCl_4 también produce la hipometilación de componentes celulares; en el caso del ácido ribonucleico (ARN), el resultado de esta hipometilación es la inhibición de la síntesis de proteínas, y en los fosfolípidos produce la inhibición de la secreción de lipoproteínas.

La acción del CCl_4 también se manifiesta en muchas rutas de señalización celular. Activa el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), el óxido nítrico (NO), y los factores de crecimiento transformante α y β (TGF- α y β), procesos que parecen estar directamente dirigidos a la autodestrucción celular y a los procesos de fibrosis. TNF- α señala hacia apoptosis y TGF se relaciona con fibrosis en el hígado; TNF- α también induce las interleuquinas 6 (IL-6) y 10 (IL-10), que actúan como agentes antiapoptóticos, con lo que ambas interleuquinas podrían iniciar la recuperación de los hepatocitos dañados con CCl_4 .

3.5. Regeneración hepática.

El hígado presenta una gran capacidad para regenerarse, presumiblemente para protegerse de una pérdida de su masa como consecuencia a la posible ingesta de tóxicos en la dieta. Esta capacidad ya se identificó en la mitología griega, con el mito de Prometeo, quien robó el secreto del fuego a los dioses, por lo que fue castigado por toda la eternidad a que parte de su hígado fuera devorado cada día por un águila, regenerándose durante la noche.

En 1931, Higgins y Anderson, después de realizar hepatectomias parciales en ratas de determinados lóbulos, extirpando hasta dos tercios del hígado, comprobaron que los lóbulos que permanecían eran capaces de regenerar a los lóbulos amputados (Michalopoulos and DeFrances, 1997; Fausto, 2001). Otro ejemplo de la capacidad del hígado, está en dos casos de trasplante de hígado de babuinos en pacientes, donde el hígado del babuino crecía hasta alcanzar el tamaño de un hígado humano (Starzl et al., 1993).

A diferencia de otros tejidos, la regeneración hepática no se debe a una población de células madre residentes (células ovas), sino a los propios hepatocitos maduros, y sólo cuando la proliferación de éstos estuviera inhibida, intervendría el compartimiento de células madre hepáticas. Los hepatocitos son las primeras células que proliferan durante la regeneración hepática, comenzando por los de la zona de la tríada portal (compuesta por la arteria hepática, la vena portal y el conducto biliar), alcanzándose luego la zona pericentral. Se postula que los hepatocitos aportan el estímulo que hace proliferar al resto de las células residentes en el hígado. Se ha demostrado que el trasplante de hepatocitos normales es capaz de restaurar por completo todas las funciones hepáticas en dos modelos de ratón; uno de ellos, en el cual la uroquinasa se expresaba bajo el promotor de la albúmina (Rhim et al., 1995), y el otro, un modelo en ratón para la tirosinemia hereditaria, una deficiencia en fumarilacetoacetato hidrolasa (FAH) (Overturf et al., 1996). Se ha calculado que un hepatocito es capaz de sufrir hasta 34 divisiones, con lo que originaría $1,7 \times 10^{10}$ células. Hay que destacar la capacidad que tienen los hepatocitos para proliferar a la vez que mantienen sus funciones. Este proceso está regulado por una gran cantidad de moléculas, cuyo patrón de expresión varía con la activación de la regeneración hepática. Algunas de las posibles candidatas para activar esta regeneración son el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), TNF- α , IL-6, factor de crecimiento endotelial (EGF) o incluso factores con un efecto paracrino (Michalopoulos and DeFrances, 1997; Fausto, 2001).

El programa de regeneración hepática posee la capacidad de restaurar las funciones hepáticas en situaciones de daño, pero puede ser incapaz de actuar en casos de daño más drásticos o crónicos, agotándose la capacidad autorregeneradora hepática.

Con la descripción de la capacidad de originar células hepáticas a partir de la MO, se abre una nueva posibilidad para el tratamiento de enfermedades hepáticas, como es el uso de la terapia celular basada en los procesos de plasticidad de las células de MO.

4. HEPATOCITOS DERIVADOS DE MÉDULA ÓSEA (HDMO).

4.1. Identificación de HDMO.

Durante los primeros años en los que se describió el proceso de plasticidad por parte de las células de MO (Ferrari et al., 1998; Bjornson et al., 1999; Mezey et al., 2000), se identificó la expresión de marcadores específicos de hematopoyesis en las células ovales. Ésto, junto a que el hígado fetal es el órgano donde se desarrolla la hematopoyesis embrionaria, contribuyeron a elaborar la hipótesis de que las CMHs podían originar células epiteliales, incluidas las células ovales consideradas como las células progenitoras, tanto de los hepatocitos como de las células biliares (Fujio et al., 1994; Blakolmer et al., 1995; Omori et al., 1997; Lemmer et al., 1998; Petersen et al., 1998).

Ésto se confirmó en 1999 por Petersen y colaboradores (Petersen et al., 1999), en un sistema donde se originaron células hepáticas a partir de células de MO procedentes de ratas macho, trasplantadas en ratas hembra. Se desarrolló un protocolo de tratamiento con 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) para bloquear la proliferación de los hepatocitos, seguido de un daño hepático inducido o bien con CCl₄ o mediante hepatectomía parcial, con el objetivo de inducir la proliferación de las células ovales, y comprobar si la MO participaba en la producción de hepatocitos, células biliares o células ovales durante la regeneración hepática. Los autores identificaron la aparición de células ovales y de hepatocitos que presentaban el cromosoma Y (Cr-Y), poniendo de manifiesto que las células madre de la MO poseían también la capacidad de originar linaje epitelial.

Otros trabajos (tabla 2 y revisado en referencia Thorgeirsson and Grisham, 2006) también confirmaron la participación de células de MO en el origen de células hepáticas, en modelos desarrollados en ratón (Theise et al., 2000a). Esto también se observó en pacientes humanos (Alison et al., 2000; Theise et al., 2000b), los cuales habían sido trasplantados con MO o con hígado procedente de donantes del sexo contrario al suyo, con lo que la contribución de la MO al hígado se podía observar mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para los cromosomas sexuales. Hay que destacar que algunos autores han descrito que hasta más del 30% de los hepatocitos procedían de la MO (Theise et al., 2000b).

Ante la confirmación del proceso de conversión de células de MO en hepatocitos, se plantearon una serie de interrogantes sobre estos hepatocitos derivados de MO (HDMO), como pueden ser: su funcionalidad, el tipo celular residente en MO capaz de este proceso y el mecanismo por el cual se originaban los HDMO.

En primer lugar, quedó demostrada la funcionalidad de estos HDMO mediante los distintos trabajos desarrollados en los modelos de ratones deficientes en FAH (Lagasse et al., 2000; Vassilopoulos et al., 2003; Willenbring et al., 2004). Después de realizar un trasplante de células de MO normales, éstas eran capaces de revertir el fenotipo de este modelo de tirosinemia hereditaria, incluso repoblando gran parte del hígado. Se demostraba que los HDMO, aparte de ser funcionales, eran capaces de proliferar. Otros trabajos en modelos xenogénicos desarrollados en ratones inmunodeficientes, demostraron que las células hematopoyéticas humanas (Danet et al., 2002; Ishikawa et al., 2003; Kollet et al., 2003; Kashofer et al., 2005) también eran capaces de originar HDMO.

Células donadoras	Receptor	Modelo de selección	Porcentaje de conversión	Ref.
MO de rata	Rata	Irrad. + 2-AAF	0,14%	(Petersen et al., 1999)
MO ratón	Ratón	Irrad.	>2,2%	(Theise et al., 2000a)
MO humana	Humano	Irrad. o quimioterapia	4-43%	(Theise et al., 2000b)
MO humana	Humano	Irrad.	0,5-2%	(Alison et al., 2000)
Células LSKT de ratón	Ratón Fah ^{-/-}	Irrad. + Selección de células Fah ^{+/+}	30-50%	(Lagasse et al., 2000)
Células PKH26 ⁺ Fr25Lin ⁻ de ratón	Ratón	Irrad.	0,52±0,95%	(Krause et al., 2001)
MO humana	Humana	Irrad.	0-7%	(Korbling et al., 2002)
Células Lin ⁻ de ratón transgénico Bcl2	Ratón	Irrad. + Resistencia apoptosis	0,05-0,8%	(Mallet et al., 2002)
MO o células LSK de ratón	Ratón Fah ^{-/-}	Irrad. + Selección de células Fah ^{+/+}	>30%	(Wang et al., 2002)
Células LSKT de ratón	Ratón	Irrad.	0,0015%	(Wagers et al., 2002)
MO de ratón	Ratón	Irrad. + hepatectomía	0%	(Fujii et al., 2002)
MAPC de ratón	<i>in vitro</i>			(Jiang et al., 2002b)
Células Lin ⁻ /CD45 ⁺ /CD38 ⁻ /CD34 ⁺ o C1qRp ⁺ humanas	Ratón inmunod.	SCF + IL-3 + G-CSF	<0,1%	(Danet et al., 2002)
MO de ratón	Ratón	Irrad. + CCl ₄ o Irrad. + dieta baja en colina + etionina	0,0012%	(Kanazawa and Verma, 2003)
MO o <i>Side Population</i> de ratón	Ratón	Irrad.	4%	(Abe et al., 2003)
MO de ratón	Ratón Fah ^{-/-}	Irrad. + DDC + Selección de células Fah ^{+/+}	>90%	(Wang et al., 2003a)
MO de ratón	Ratón Fah ^{-/-}	Irrad. + Selección de células Fah ^{+/+}	20-30%	(Wang et al., 2003c)
Células Lin ⁻ de ratón	Ratón Fah ^{-/-}	Irrad. + Selección de células Fah ^{+/+}	20-30%	(Vassilopoulos et al., 2003)
MO de ratón	Ratón	Irrad.	0,0045%	(Alvarez-Dolado et al., 2003)
MO de ratón	Ratón	CCl ₄	25%	(Terai et al., 2003)
Células CD34 ⁺ o CD34 ⁺ /CD38 ⁻ /CD7 ⁻ humanas	Ratón inmunod.	Irrad. + CCl ₄ + HGF	1-10%	(Wang et al., 2003b)
Células mononucleadas humanas	Ratón inmunod.	Irrad.	0,011%	(Newsome et al., 2003)
Sca-1 ⁺ <i>Side Population</i> de ratón	Ratón	Irrad. + DDC	0,0003-0,0007%	(Camargo et al., 2004)
Células PKH26 ⁺ Fr25lin ⁻ de ratón	Ratón	Irrad. + CCl ₄	0,9%	(Jang et al., 2004)
Células CXCR-4 ⁺ de MO de ratón	Ratón	Irrad. + CCl ₄		(Ratajczak et al., 2004)
MO de ratón	Ratón Fah ^{-/-}	Irrad. + Selección de células Fah ^{+/+}	>80%	(Willenbring et al., 2004)
MO de ratón	Ratón	Irrad. + CCl ₄	baja	(Abedi et al., 2004a)
MO de ratón	Ratón	Irrad. + CCl ₄	0,0013%	(Stadtfeld and Graf, 2005)
MO o Lin ⁻ /Sca-1 ⁺ o <i>Side Population</i> de ratón	Ratón	Irrad. + CCl ₄	0%	(Cantz et al., 2004)
MO de ratón	Ratón	Irrad. + CCl ₄ + G-CSF	4%	(Yannaki et al., 2005)

Tabla 2. Resumen de la plasticidad de células de MO a hepatocitos. Sólo se han recogido las publicaciones más representativas (Thorgeirsson and Grisham, 2006). MO indica médula ósea; irradi., irradiación; 2-AAF, 2-acetilaminofluoreno; LSKT, células de MO Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺/Thy-1^{low}; Fah, fumarilacetato hidrolasa; LSK, Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺; SCF, del inglés *Stem Cell Factor*; IL-3, Interleuquina 3; G-CSF, del inglés *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*; CCl₄, tetracloruro de carbono; DDC, 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina; HGF, del inglés *Hepatocyte Growth Factor*;

Ya en 1999 se identificaron procesos de plasticidad hacia HDMO con el trasplante de una población de CMHs, demostrando que este proceso de plasticidad era debido a una población hematopoyética (Lanzkron et al., 1999; Lagasse et al., 2000; Camargo et al., 2004). Lagasse y colaboradores, consiguieron HDMO con un inóculo de 50 células purificadas según su fenotipo Lin⁻/Sca-1⁺/c-Kit⁺/Thy-1^{low} (LSKT), que corresponde con una población de CMHs. En 2001, con el trasplante de una única CMH, Krause y colaboradores comprobaron que, no sólo reconstituían la hematopoyesis de ratones previamente irradiados, sino que contribuían a procesos de plasticidad en distintos órganos, incluso del hígado (Krause et al., 2001).

4.2. Mecanismos de conversión de células de MO a HDMO.

Son varios los mecanismos que se han propuesto para explicar la conversión de células de MO a HDMO (figura 5):

- i. **Existencia de células madre pluripotentes:** Se basa en la posibilidad de que dentro de la MO residan células madre pluripotentes con capacidad de originar células de diferentes tejidos. Éste podría ser el caso de las células descritas por el grupo de la Dra. C. Verfaillie (Jiang et al., 2002b; Verfaillie, 2005), las MAPC (del inglés *Multipotent Adult Progenitor Cells*), que expresan diferentes marcadores de células madre embrionarias, y son capaces de contribuir a multitud de tejidos cuando son inyectadas en un blastocisto.
- ii. **Distintas poblaciones de células madre específicas de tejidos:** Trabajos realizados por Ratajczak y colaboradores (Ratajczak et al., 2004; Kucia et al., 2005a; Kucia et al., 2005b) sugieren una reinterpretación de los procesos de plasticidad, basándose en que se pueden aislar células madre de distintos tejidos de MO gracias a la expresión en su superficie de CXCR-4, que facilita su migración en función a gradientes de SDF-1 (del inglés *Stromal Derived Factor 1*). La secreción de este factor está incrementada en los tejidos dañados y provoca el reclutamiento de estas células madre residentes en MO.
- iii. **Rediferenciación celular:** El proceso de plasticidad transcurriría en varias etapas: en la primera, una célula madura migraría hacia un determinado tejido, donde sufriría un proceso de desdiferenciación a células madre de ese tejido, y finalmente, a partir de esa nueva célula madre específica, se originarían las células maduras de ese tejido. Como evidencia de esta teoría, en un modelo de ratón mediante radiación, se eliminaron las células satélite, células madre musculares, repoblándose con células derivadas de MO, adquiriendo un fenotipo indistinguible de las células satélite endógenas. Después de esta etapa, y mediante la activación de las células satélite como respuesta a ejercicio, éstas se fusionaron para producir fibras musculares, en las cuales también se localizaban las células derivadas de la MO trasplantadas (LaBarge and Blau, 2002; Dreyfus et al., 2004; Yoshimoto et al., 2005).

iv. **Transdiferenciación celular:** Una población altamente enriquecida de CMHs puede inducirse a un fenotipo hepático por los factores liberados desde un hígado dañado. El grupo del Dr. S. J. Sharkis cocultivó *in vitro* una población de CMHs junto con hígado dañado, separados ambos por una membrana que impide su contacto y que tan sólo permite el paso de moléculas. Se observó que al cabo de unos días las células de MO expresaban marcadores típicamente hepáticos. Ésto mismo sucede cuando se trasplanta esta población de CMHs en ratones irradiados. Cuando se analizó el contenido cromosómico de los HDMO resultantes, se constató que era idéntico al de la población inicial. Esto indicaba que las células hematopoyéticas en un entorno de daño hepático sufren un proceso de transdiferenciación, en el que su programa de expresión hematopoyético se transforma en un programa hepático (Jang and Sharkis, 2004; Jang et al., 2004).

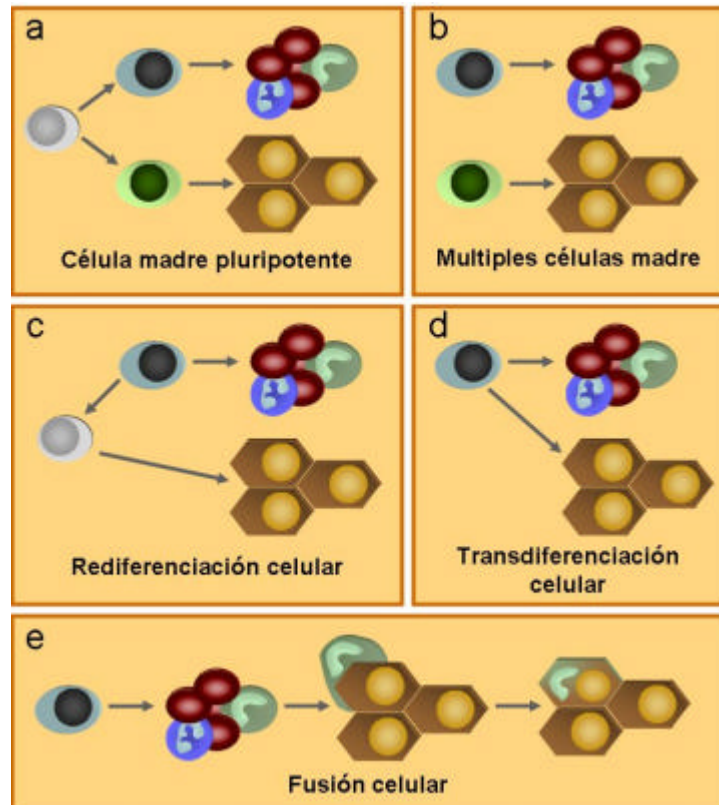


Figura 5. Esquema de los posibles mecanismos de conversión de células de MO a HDMO. a) Existencia en la MO de células madre más primitivas que las células madres específicas de tejidos. b) Presencia de distintas células madre específicas de tejidos en la MO. c) Rediferenciación celular por parte de una célula específica de tejido a una célula más pluripotente. d) Proceso de transdiferenciación celular de una CMH por el que adquiere la capacidad de originar células maduras de otros tejidos no hematopoyéticos. e) Fusión celular entre células maduras hematopoyéticas y otros tipos celulares, con adquisición de funciones de este último tipo celular.

v. **Fusión celular:** El proceso de plasticidad, se origina mediante la fusión entre dos células adultas, en las que una de ellas adquiere el fenotipo de la otra. Las primeras evidencias de la importancia de la fusión celular en los procesos de plasticidad celular se basaron en los trabajos de Terada (Terada et al., 2002) y de Ying (Ying et al., 2002), donde en cocultivos de células de MO adultas y células madre embrionarias, el primero, o células madre neuronales y células madre embrionarias el segundo, se observó que era posible obtener células similares a las células madre embrionarias, pero portando marcadores específicos de los dos tipos celulares cocultivados. Es más, en el estudio de Ying, la inyección de estas células fusionadas en blastocistos, fueron capaces de contribuir a la producción de numerosos tejidos.

Otros ejemplos de fusión celular se describieron en los trabajos de Weimann (Weimann et al., 2003) y de Alvarez-Dolado (Alvarez-Dolado et al., 2003), donde se identificaron neuronas de Purkinje, cardiomiocitos y hepatocitos derivados de la fusión de células de MO y células endógenas. En varios trabajos con el modelo de ratón FAH^{-/-} (Lagasse et al., 2000; Vassilopoulos et al., 2003; Wang et al., 2003c), se constató que además de originarse HDMO mediante fusión celular, éstos eran capaces de contribuir a la regeneración de gran parte del hígado. Es más, se determinó que las células hematopoyéticas responsables de los procesos de fusión celular, son células pertenecientes

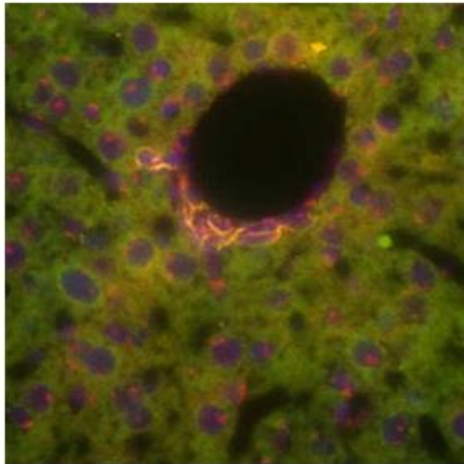
al sistema monomielocítico, presumiblemente macrófagos (Camargo et al., 2004; Willenbring et al., 2004; Stadtfeld and Graf, 2005).

Las implicaciones de que un proceso de fusión celular sea capaz de cambiar el patrón de expresión de células adultas ya ha sido descrito, tanto en células madre embrionales (Cowan et al., 2005), como en células adultas (Terranova et al., 2006). Ambos trabajos describen que en modelos *in vitro*, donde se ha inducido fusión celular con polietilenglicol, se consigue que el núcleo de una de las células fusionadas, re programe su expresión hacia el programa genético de la otra célula implicada en el proceso, y silencie el suyo propio.

4.3. HDMO como herramienta terapéutica.

Dependiendo de distintos autores, la frecuencia de aparición de HDMO varía considerablemente. Desde 1-2% del total de los hepatocitos (Theise et al., 2000a) a valores mucho más bajos, e incluso despreciables (Wagers et al., 2002; Kanazawa and Verma, 2003). A pesar de su baja incidencia, su posible uso clínico dependerá del límite terapéutico que presente cada una de las potenciales enfermedades a tratar. Así, por ejemplo, se ha barajado que si tan solo el 1% de los hepatocitos produjese el factor VIII clonado, se conseguiría una terapia eficaz contra la hemofilia; algo similar ocurre con la fenilcetonuria, donde, si sólo el 2% de los hepatocitos sanos se conseguiría combatir la enfermedad. En cambio, para el tratamiento de desórdenes en el ciclo de la urea, al menos el 50% de los hepatocitos deberían estar sanos. Con todo, no hay que olvidar que con HDMO se consigue recuperar por completo un modelo de tirosinemia hereditaria tipo I (Grompe, 2005). Es, por tanto, factible pensar que en un futuro, los procesos de plasticidad celular podrían ser utilizados para restaurar la salud de pacientes.

V



- I. ÍNDICE
- II. ABREVIATURAS
- III. RESUMEN
- IV. INTRODUCCIÓN
- V. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**
- VI. MATERIALES Y MÉTODOS
- VII. RESULTADOS
- VIII. DISCUSIÓN
- IX. CONCLUSIONES
- X. BIBLIOGRAFÍA
- XI. ANEXOS

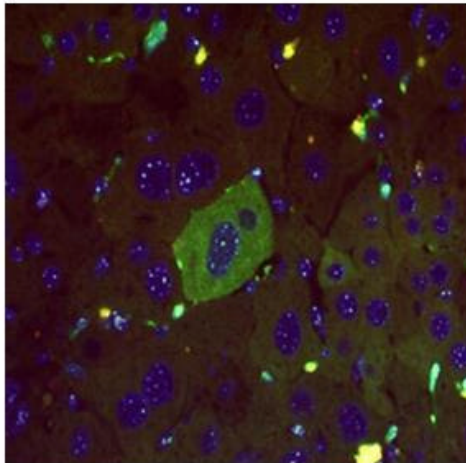
Durante los últimos años, numerosos trabajos han descrito la contribución de células de médula ósea (MO) al epitelio hepático. Ésto abre el camino al uso terapéutico de células de MO para el tratamiento de enfermedades hepáticas, especialmente en procesos de daño crónico, donde se reduce la capacidad de regeneración del hígado.

El papel que ejercen las células de MO en la reparación hepática es muy discutido, y es por ello necesario conocer la participación de esta nueva fuente de células hepáticas en los procesos de reparación del tejido hepático, así como promoverla con la idea de establecer nuevas armas curativas para el tratamiento de enfermedades. Independientemente del posible uso clínico, es necesario conocer los mecanismos implicados en la plasticidad de las células de MO debido a su relevancia como proceso biológico, al implicar la conversión entre distintos patrones de expresión específicos de tejidos.

Para profundizar en el conocimiento de los procesos por los que células de MO originan hepatocitos y determinar su importancia fisiológica, se han planteado en esta tesis doctoral los siguientes objetivos:

1. Desarrollar un modelo en ratón que permita estudiar los procesos de plasticidad de células de MO a hepatocitos y, determinar su posible contribución a los procesos de recuperación del daño hepático.
2. Estudiar el efecto de la movilización con factores de crecimiento hematopoyéticos sobre la generación de hepatocitos derivadas de MO (HDMO).
3. Identificar la población de la MO responsable de los procesos de plasticidad celular y, estudiar los mecanismos celulares y moleculares subyacentes a la generación de HDMO.

VI



- I. ÍNDICE
- II. ABREVIATURAS
- III. RESUMEN
- IV. INTRODUCCIÓN
- V. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS
- VI. MATERIALES Y MÉTODOS**
- VII. RESULTADOS
- VIII. DISCUSIÓN
- IX. CONCLUSIONES
- X. BIBLIOGRAFÍA
- XI. ANEXOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) de distintas cepas: C57BL/6J x DBA/2 F1 (B6D2F1, expresando el marcador panleucocitario de ratón CD45.2), B6SJL-*Ptprc*^{a/b}*Pep*^{3b}/BoyJ x DBA/2 F1 (P3D2F1, expresando tanto CD45.1 como CD45.2) y ratones C57BL/6J-*βactin*EGFP (cedidos por cortesía del Dr. M. Okabe, Osaka, Japón) x DBA/2 F1 (BDGF1; expresando ubicuamente EGFP y en el tejido hematopoyético CD45.2).

Las parejas reproductoras originales de cada cepa fueron obtenidas de los laboratorios Jackson (Bar Harbor, MA, EEUU). Su cría y mantenimiento se realizó en el Servicio del Animalario del CIEMAT (Centro de Usuarios de Animales de Experimentación N° 28079-21A). Los ratones se mantuvieron en condiciones controladas de aire filtrado a través de filtros Hepa, humedad relativa ($55 \pm 15\%$) y temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, alimentación *ad libitum* con pienso UAR A04 (UAR, Villemoisson-sur-orge, Francia) y agua de bebida irradiada con luz ultravioleta con, al menos, 4 p.p.m. de cloro libre residual.

El estado de salud de los animales se controló rutinariamente mediante análisis en animales centinelas, de acuerdo con los procedimientos recomendados por FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*). Todos los experimentos fueron realizados a cabo de acuerdo a la legislación europea y española vigente sobre el uso y tratamiento de animales de experimentación (RD 233/1988 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, y Convenio Europeo 12-3 del 18/3/1986) y de acuerdo a los principios éticos y de bioseguridad de nuestro centro.

2. GENERACIÓN DE RATONES QUIMÉRICOS.

2.1. Trasplante de MO.

Hembras de entre 8 a 10 semanas de edad pertenecientes a las cepas B6D2F1 o P3D2F1 fueron letalmente irradiadas con una dosis de 12 Gy (divididas en dos dosis de 6 Gy, espaciadas 24 horas) en un equipo de rayos X MG324 (Philips, Hamburgo, Alemania), a 300 kV y 12,8 mA, con una tasa de dosis de 1,03 Gy/min. Los animales se trasplantaron con 1×10^7 células de MO sin purificar, procedentes de ratones macho BDGF1 extraídas mediante la perfusión con medio *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM, Cambrex, Verviers, Bélgica) de sus fémures y tibias.

En determinados experimentos, se cambio el sexo de los ratones donadores y receptores, siendo machos los ratones receptores del trasplante de MO y hembras los ratones donadores de la MO EGFP⁺.

2.2. Trasplante de CMHs con el fenotipo LSK.

Se extrajeron células de MO de ratones macho BDGF1 de 6 semanas de edad. Las células resultantes se resuspendieron, después de ser filtradas por un filtro de nylon de 30 μm de tamaño de poro (*MACS Pre-Separation filter*, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania), en PBS (tampón

fosfato salino)/0,1% BSA (PBA) a una concentración de 1×10^7 células/80 μ L de PBA, a los que se añadió 20 μ L cada 1×10^7 células de anticuerpo contra c-Kit unido a partículas magnéticas (CD117 *Microbeads*, MACS, Miltenyi Biotec). Se incubó durante 15 minutos a 4°C, tras los cuales se lavaron y resuspendieron en PBA desgasificado, a una concentración celular de 2×10^8 células/mililitro de PBA. Se pasaron a través del filtro de nylon y se añadieron a una columna para su separación magnética (*LS Separation Column*, Miltenyi Biotec) previamente hidratada y montada sobre la unidad de separación magnética (*VarioMACS Separator*, Miltenyi Biotec). Se dejó eluir las células a través de la columna y se lavaron tres veces con PBA, con el fin de que sólo las células positivas para c-Kit fueran retenidas por el campo magnético de la unidad de separación y no eluyeran de la columna. Finalizados los ciclos de lavado, se separó la columna del soporte magnético para permitir que las células c-Kit⁺ eluyeran con un nuevo lavado.

Una vez obtenida una población enriquecida en c-Kit, se procedió a la separación de una fracción aún más enriquecida en CMHs mediante *cell-sorting*. Se marcaron las células recuperadas de la columna con anticuerpos contra Mac-1, Gr-1, B220, CD3e, Ter119 acoplados a biotina y Sca-1 acoplado a ficoeritrina (PE) (BD Bioscience Pharmingen, San Jose, CA, EEUU), durante 30 minutos a 4° y en oscuridad. Después de la incubación se lavaron las células, y se resuspendieron en PBA para marcarlas con estreptavidina acoplado a tricolor (SAV-TRC, Caltag Laboratories, Burlingame, CA, EEUU) durante 25 minutos a 4° y oscuridad. Una vez finalizado el marcaje, se resuspendieron en PBA y se procedió a la separación de la población Lin⁻/Sca-1⁺/EGFP⁺, mediante el equipo EPICS ALTRA (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EEUU). Después de este proceso de purificación se obtuvo una población altamente enriquecida de células de MO con el fenotipo Lin⁻/Sca-1⁺/c-kit⁺/EGFP⁺ (LSK EGFP⁺).

$5,6 \times 10^4$ células de la población hematopoyética LSK EGFP⁺, se trasplantaron mediante inyección intravenosa, en hembras B6D2F1 de entre 8 a 10 semanas de edad, que previamente habían sido letalmente irradiadas.

2.3. Trasplante de CMHs en receptores no irradiados.

Se purificó una población Lin⁻/Sca-1⁺/EGFP⁺ como se ha indicado previamente. Brevemente, se recolectaron las células de su MO, se marcaron con un anticuerpo anti-Sca-1 conjugado a bolas magnéticas (MACS, Miltenyi Biotec), tras lo cual se procedió a la separación magnética. Esta población enriquecida en células Sca-1⁺ se marcó con un cóctel de anticuerpos específicos para linajes hematopoyéticos de células comprometidas (Mac-1, Gr-1, B220, CD3e, Ter119 acoplados a biotina, BD Bioscience Pharmingen), que luego se identificaron con el marcaje con SAV-TRC (Caltag Laboratories). Para finalizar se separó la población Lin⁻/Sca-1⁺/EGFP⁺ mediante el equipo EPICS ALTRA (Beckman Coulter).

Se trasplantaron $1,7 \times 10^5$ células Lin⁻/Sca-1⁺/EGFP⁺ en ratones hembra B6D2F1, sin ningún tipo de acondicionamiento, a través de la vena de la cola.

2.4. Estudio de repoblación competitiva.

Se mezclaron células de ratones B6D2F1 (CD45.2⁺), procedentes de punciones medulares de fémur, con un número igual de células procedentes de la perfusión de las tibias y fémures de ratones P3D2F1 (CD45.1⁺/CD45.2⁺). Estas suspensiones celulares se trasplantaron por inyección intravenosa en ratones BDGF1 (EGFP⁺/CD45.2⁺) irradiados letalmente tal como se ha descrito.

3. ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO.

3.1. Análisis del compartimento de CMHs.

Para determinar la presencia de CMHs, identificadas con el fenotipo LSK, 25 μ L de SP obtenidas a partir de la vena de la cola, se recogieron sobre ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) a una concentración final de entre 10 a 20 mM. La sangre se marcó con anticuerpos monoclonales anti Gr-1, Mac-1, B220, CD3e y Ter119 conjugados a biotina (BD Bioscience Pharmingen, San Jose, CA, EEUU) durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad. Después los eritrocitos se lisaron durante 10 minutos con 24 volúmenes de solución de lisis (0,155 mM NH₄Cl/0,01 mM KHCO₃/10⁻⁴ mM EDTA). Tras centrifugar y resuspender las células restantes, éstas se lavaron con PBA y se marcaron con anticuerpos contra c-kit conjugado a PE, Sca-1 conjugado a fluoresceína (FITC) (BD Bioscience Pharmingen) y SAV-TRC (Caltag Laboratories), durante 25 minutos en oscuridad y a 4°C. Para finalizar, se lavaron las células marcadas, que se resuspendieron en 2 μ g/mL de yoduro de propidio (IP)/PBA para determinar viabilidad celular. El análisis se realizó en un citómetro de flujo EPICS XL (Coulter Electronics, Hialeah, FL, EEUU), y los datos resultantes se analizaron utilizando el software EXPO32 ADC Analysis (Applied Cytometry Systems, Dinnington, Sheffield, Reino Unido).

3.2. Análisis del injerto hematopoyético.

La reconstitución hematopoyética de los ratones a partir de las células exógenas se evaluó mediante análisis de citometría de flujo de muestras de SP al mes, tres meses o incluso seis (para el estudio de repoblación competitiva) después de haberse realizado el trasplante de MO. Para ello, se recogió la SP sobre EDTA 0,5 M. Y se marcó con anticuerpos monoclonales contra CD45.2 conjugado a biotina (BD Bioscience Pharmingen), y posteriormente a la lisis de las células, con anti-CD45.1 conjugado a PE (BD Bioscience Pharmingen) y con SAV-TRC (Caltag Laboratories). La viabilidad fue determinada con solución IP/PBA. La cuantificación del injerto hematopoyético exógeno se determinó por el porcentaje de células CD45.1⁺/CD45.2⁺.

Para analizar el injerto hematopoyético exógeno en cada linaje hematopoyético, se realizó un marcaje celular similar a lo descrito anteriormente. Se incubaron distintas porciones de las muestras de SP por separado con cada uno de los anticuerpos monoclonales: anti-Gr-1, anti-Mac-1, anti-B220 o anti-CD3e, todos ellos conjugados a biotina (BD Bioscience Pharmingen); después se lisaron los eritrocitos y se identificaron las células unidas a cada anticuerpo específico de linaje con un anticuerpo secundario, SAV-TRC (Caltag Laboratories); finalmente se añadió IP/PBA para excluir las células muertas.

4. ANÁLISIS DE LA CELULARIDAD EN SP.

Se extrajo SP mediante un corte en la cola, que fue recogida sobre heparina sódica 1000 U.I./mL o EDTA 0,5M. En un analizador hematológico Abacus Junior Vet (Diatron, Budapest, Hungría) se realizó el conteo del número de leucocitos totales por mililitro de SP, y el porcentaje correspondiente a distintas poblaciones hematopoyéticas, como son, granulocitos, monocitos, células linfoides, plaquetas y hematíes.

5. MODELO DE DAÑO POR CCl₄.

Durante uno o tres meses, grupos de animales fueron tratados semanalmente con inyecciones intraperitoneales de CCl₄ (Fluka, Buchs, Suiza), siendo la relación de compuesto hepatotóxico suministrado de 10 mL de una solución del 10% de CCl₄ en aceite de oliva por kilogramo de peso corporal (1×10^{-2} mol/Kg), o de 10 mL de una solución del 20% de CCl₄ por kilogramo de peso corporal (2×10^{-2} mol/Kg); simultáneamente al grupo control se le inyectó PBS (Sigma-Aldrich) en la misma relación volumen/peso corporal.

6. MOVILIZACIÓN HEMATOPOYÉTICA.

6.1. Movilización con factores de crecimiento.

La movilización de células hematopoyéticas y progenitores se llevó a cabo mediante la administración de G-CSF o G-CSF/TPO (trombopoyétina). Un día antes de la cuarta y última inyección intraperitoneal comenzó el protocolo de movilización, consistente en la administración subcutánea a cada ratón durante una, dos o tres semanas de 200 μ L de PBS/0,1% BSA (PBA), o 50 μ g de G-CSF (Neulasta, Amgen, Breda, Holanda) en 200 μ L de PBA, o 50 μ g de G-CSF combinado con 0,3 μ g de TPO (Amgen) en 200 μ L de PBA.

6.2. Coadministración de CCl₄ y de G-CSF.

Se comenzó con un tratamiento de una inyección semanal de 10 mL de una solución del 10% de CCl₄ en aceite de oliva por kilogramo de peso corporal (1×10^{-2} mol/Kg) durante cuatro semanas. En el momento de la segunda inyección con CCl₄, a los animales se les movilizó con 50 μ g de G-CSF (Amgen) en 200 μ L de PBA por ratón, simultaneándoles el resto de las inyecciones del compuesto hepatotóxico con dosis de movilización con G-CSF, recibiendo tres dosis de G-CSF junto con las tres últimas inyecciones de CCl₄ (ver figura 24a).

7. INHIBICIÓN DE LOS PROCESOS DE FAGOCITOSIS.

A los animales que habían sido simultáneamente dañados con CCl₄ y movilizadas con G-CSF, se les inyectó intraperitonealmente 75 μ mol de NH₄Cl (Merck) diluidos en PBS hasta un volumen de 300

μL por animal (Kitano et al., 2004). Los animales fueron analizados 2 días después del tratamiento con el NH_4Cl .

8. ANÁLISIS DE PARÁMETROS HEPÁTICOS EN PLASMA.

Se extrajo SP mediante un corte en la cola, que fue recogida sobre 15 μL de heparina sódica 1000 U.I./mL. Se separó la porción plasmática de las células sanguíneas mediante centrifugación a 10000 r.p.m. durante 5 minutos en una microcentrífuga Centrifuge 5415 D (Eppendorf, Hamburgo, Alemania), y se analizó la presencia de transaminasa glutámico pirúvica (GPT), transaminasa glutámico oxalacético (GOT) y bilirrubina en el plasma, utilizando un equipo Konelab 20 (Termo Clinical Labsystems, Helsinki, Finlandia).

9. SACRIFICIO DE LOS ANIMALES.

El sacrificio se realizó mediante perfusión intracardíaca, una vez que fueron anestesiados con 20 μL por gramo de peso corporal de una disolución 2,5% de avertina (2,2,2-tribromoetanol/2-metil-2-butanol, Sigma-Aldrich). Se inmovilizaron los animales y se procedió a exponer su corazón. Una vez el ápice cardíaco fue accesible, se inyectó en el ventrículo izquierdo la aguja de una palomilla quirúrgica (Butterfly[®]23, Venisystems, Abbot Laboratories, Sligo, Irlanda), conectada a una jeringuilla con 25mM de EDTA en PBS, mantenido frío (4°C). Con unas tijeras se realizó un pequeño corte en la aurícula derecha, como vía de salida. Se inyectó la solución lentamente (aproximadamente 10 mL/90 segundos), para un lavado completo del sistema circulatorio del ratón. Una vez que se hubo limpiado el animal con 15-20 mL de PBS/EDTA, y se introdujo de una forma similar 4% P/v *p*-formaldehído (paraformaldehído o PFA, Merck, Darmstadt, Alemania) en PBS, perfundiéndose con 25 mL de PFA frío.

Una vez realizada la perfusión, se extrajo el hígado del ratón, reservándose una parte de cada lóbulo hepático para conservarlo según distintos protocolos para la preservación de tejidos.

La mitad de las porciones del hígado se destinaron para su conservación a -70°C, para lo cual se introdujeron durante 24 horas en 4% PFA/PBS a 4°C, pasándose luego a una disolución del 30% de sacarosa (P/v) en PBS durante toda una noche a 4°C. Al día siguiente el tejido se introdujo en *Optimal Cutting Temperature solution* (OCT, Sakura Finetek, Zoeterwoude, Holanda), y fue congelado inmediatamente en N_2 líquido y almacenado a -70°C hasta su crioseccionado.

El resto de porciones, se introdujeron en 3,7-4% formaldehído (Panreac Química, Barcelona, España) entre 2 y 4 días, tras los cuales se embebieron en parafina plastificada (Histocomp, Vogel, Giessen, Alemania).

10. ANÁLISIS HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOLÓGICO.

10.1. Estudio histológico del hígado.

El estudio histológico del hígado se basó en el análisis de su estructura en secciones hepáticas embebidas en parafina de 5 μm , las cuales se tiñeron con hematoxilina y eosina. Para ello se desparafinaron introduciéndose durante 30 minutos en una estufa a 54°C para que se derritiese la parafina, que fue totalmente disuelta mediante inmersiones en *Histo-Clear* (National Diagnostics, Hessle Hull, Reino Unido). Después se hidrataron en una serie decreciente en la concentración de etanol (Scharlau Chemie, Barcelona, España) desde 100%, 95%, 70%, 50% (v/v) y finalmente en agua. Una vez desparafinadas se tiñeron con una solución de hematoxilina (*Gill-2 Haematoxylin*, Thermo, Pittsburg, EEUU) para teñir los núcleos celulares. Se lavaron con agua y se sumergieron en 4% (v/v) de ácido acético (Scharlau Chemie), el cual se diluyó con otra inmersión en agua antes de introducirlos en *Bluing Reagent* (Thermo). Para teñir el citoplasma celular, se sumergieron en etanol 95%, pasándose luego a eosina (*Eosin y Alcoholic*, Thermo). Finalmente se deshidrataron en etanol 95%, 100% e *Histo-Clear*, antes de realizar el montaje con cubreobjetos en *Xylene Substitute Mountant* (Thermo).

10.2. Marcajes múltiples de antígenos mediante inmunofluorescencia.

Tanto en secciones de 12-15 μm realizadas en criotomo Jung CM 3000 (Leica, Wetzlar, Alemania) a partir de tejido conservado en OCT a -70°C, como en secciones hepáticas de 5 μm embebidas en parafina, se desarrolló inmunofluorescencia para la identificación de la expresión del marcador hematopoyético CD45 y la presencia de EGFP. Para ello, las secciones a partir de tejido congelado se dejaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, tras los cuales se post-fijaron introduciéndolas durante 15 minutos en acetona (Scharlau) a -20°C, se lavaron con PBS y se bloquearon con 5% FCS (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, EEUU) en PBS. Una vez bloqueadas las uniones no específicas, se incubó durante 1 hora a 37°C o 12 horas a 4°C, con 1,25 $\mu\text{g/mL}$ del anticuerpo monoclonal de rata acoplado a biotina específico contra CD45 de ratón (clon 30-F11, BD Bioscience Pharmingen) y con 20 $\mu\text{g/mL}$ el anticuerpo monoclonal de conejo contra GFP (Molecular Probes, Eugen, OR, EEUU). A continuación, se lavaron las preparaciones en tampón salino Tris con Tween 20 (TBST, DakoCytomation), y se revelaron los marcadores específicos, mediante el marcaje con 5 $\mu\text{g/mL}$ de avidina acoplado al fluorocromo Texas Red (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EEUU) y con 1,5 $\mu\text{g/mL}$ de anticuerpo de cabra contra inmunoglobulinas de conejo acoplado a FITC (Jackson Immunoresearch Laboratories, Cambridgeshire, Reino Unido). Para finalizar, después de lavar con TBST las secciones, los núcleos celulares se tiñeron con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Boehringer, Ingelheim, Alemania) disuelto en una solución de alcohol polivinílico (*Mowiol*, Sigma-Aldrich) que constituía el medio de montaje.

En el caso de realizar este marcaje en secciones de tejido embebidos en parafina, una vez que fueron desparafinadas se digirieron con proteinasa K (DakoCytomation, Carpintería, CA, EEUU) a 37°C durante 20 minutos. Para finalizar la digestión enzimática, se lavó en PBS y se bloquearon las uniones inespecíficas con *Protein block serum-free* (DakoCytomation) durante 30 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se incubaron con los anticuerpos primarios (anti-CD45 y anti-GFP) en las mismas condiciones descritas para los criocortes; los anticuerpos secundarios empleados ahora

fueron 4 µg/mL estreptavidina acoplado a Alexa Fluor® 594 (Molecular Probes) y 2 µg/mL de anticuerpo de burro contra inmunoglobulinas de conejo conjugado a Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes). Una vez concluido el marcaje, se tiñeron los núcleos y se montaron las preparaciones con la solución *Mowiol*/DAPI.

También se desarrollaron otros marcajes en secciones hepáticas de tejidos embebidos en parafina. Para la identificación de la presencia de macrófagos y de la expresión de EGFP, una vez digerido el tejido con proteinasa K y bloqueadas las uniones inespecíficas, las preparaciones se incubaron con 10 µg/mL anticuerpo monoclonal de rata contra F4/80 (Abcam, Cambridge, Reino Unido) y 20 µg/mL del anticuerpo contra GFP. Se reveló, empleando como anticuerpos secundarios anti-rata conjugado a Texas Red de burro (Jackson Immunoresearch Laboratories) a una concentración de 3 µg/mL y 2 µg/mL de anticuerpo de burro anti-conejo conjugado a Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes). Para la identificación conjunta de marcadores específicos de hepatocitos se emplearon 0,4 mg/mL anti-albúmina humana (DakoCytomation), que presenta una reacción cruzada con la albúmina de ratón, o 0,43 mg/mL del anticuerpo contra varias citoqueratinas bovinas (DakoCytomation), o 80 µg/mL anti-antígeno carcinoembrionario (CEA, DakoCytomation), todos ellos policlonales de conejo, combinados con 20 µg/mL el anticuerpo monoclonal de ratón contra GFP (Molecular Probes). Para su visualización se empleó 8 µg/mL del policlonal de cerdo anti-conejo conjugado a isocianato de tetrametilrodamina (TRITC) (DakoCytomation) y anti-ratón conjugado a FITC (Vector Laboratories).

Para el estudio de reprogramación nuclear que tiene lugar en los HDMO, se desarrolló el marcaje de inmunofluorescencia de la presencia de factores de transcripción, tanto hematopoyéticos como hepáticos, en los hepatocitos que expresaban EGFP. Una vez que se desparafinaron secciones hepáticas de 5 µm, se expusieron los antígenos mediante el calentamiento (95-100°C) de las secciones durante 20 minutos en tampón citrato (10 mM citrato trisódico / 4,4 mM HCl pH 6), dejándolas enfriar durante otros 20 minutos, después de los cuales se lavaron con repetidos baños en agua y finalmente PBS. Antes de incubar con los anticuerpos para los antígenos nucleares, se bloquearon durante 30 minutos a temperatura ambiente con *Protein block serum-free* y se incubaron durante toda una noche a 4°C con 8 µg/ml del anticuerpo policlonal de conejo contra el factor de transcripción hematopoyético murino PU.1 (clon T-21, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU) o con 8 µg/ml del anticuerpo policlonal de conejo contra el factor de transcripción hepático HNF-1 (clon H-205, Santa Cruz Biotechnology); tanto el marcaje hematopoyético como el hepático se lavaron con TBST. Para amplificar la señal de los anticuerpos primarios y bloquear la mayor parte de las inmunoglobulinas de conejo, se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con 7,5 µg/ml del anticuerpo conjugado a Texas Red (Jackson Immunoresearch Laboratories) y con 5 µg/ml del anticuerpo biotinilado (Jackson Immunoresearch Laboratories), ambos realizados en burro y con un reconocimiento específico para las inmunoglobulinas de conejo. Tras un nuevo lavado con TBST, se amplificó la señal fluorescente con un nuevo marcaje de 4 µg/mL estreptavidina acoplado a Alexa Fluor® 594 (Molecular Probes). Para concluir se lavó y se volvió a bloquear antes de identificar la expresión de EGFP con 20 µg/mL de anti-GFP de conejo (Molecular Probes), que se reveló empleando 2 µg/mL de anti-conejo Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes). Los núcleos se marcaron con DAPI disuelto en la solución de montaje.

10.3. Detección de glucógeno intracelular.

Para identificar la presencia de glucógeno hepatocelular, se realizó la tinción de ácido periódico-Schiff (PAS, Merck) sobre secciones en las que se habían identificado CD45/EGFP. Una vez que se retiró el cubreobjeto de las preparaciones, manteniéndolas sumergidas durante una noche en agua

destilada para disolver la solución de *Mowiol*, se incubaron durante 5 minutos con 0,5% de ácido periódico, y después de lavar con agua se reveló incubando con reactivo de Schiff durante 15 minutos. Finalizados los mismos se pasó a contrateñir los núcleos con hematoxilina, según lo descrito anteriormente.

10.4. Identificación de la reacción oval.

Para identificar la reacción oval, se realizó la tinción para citoqueratinas de tipo biliar, utilizando el anticuerpo de amplio espectro de conejo anti-citoqueratinas bovinas (DakoCytomation), en tejidos embebidos en parafina, que se colorearon con diaminobencidina (DAB) y hematoxilina de Mayer. Para contabilizar el número de células ovals por tracto portal, se analizó su número alrededor de 25 tractos portales. La identificación de la reacción oval se desarrolló en el laboratorio del Dr. N. D. Theise, de acuerdo al protocolo establecido en su laboratorio (Kofman et al., 2005).

10.5. Identificación del cromosoma Y.

10.5.1. Hibridación *in situ* fluorescente del cromosoma Y (Y-FISH).

Para la identificación del Cr-Y mediante Y-FISH, se desparafinaron secciones de 5 μ m de tejidos conservados en parafina, se digirieron con proteinasa K (DakoCytomation) durante 20 minutos a 42°C y se lavaron en una disolución 15 mM de cloruro sódico (NaCl, Merck)/1,5 mM citrato trisódico (Merck) (2xSSC). Para desnaturalizar la cromatina, las preparaciones se sumergieron durante 20 minutos en 0,2 M ácido clorhídrico (HCl, Merck), lavándose otra vez con 2xSSC antes de ser tratadas con 1 M tiocianato sódico (NaSCN, Sigma-Aldrich) a 67°C durante 20 minutos, dejando que se enfriase durante 15 minutos en esta misma solución. Las secciones fueron de nuevo lavadas en 2xSSC antes de ser deshidratadas mediante inmersiones de tres minutos a -20°C en diluciones seriadas de 70%, 95% y 100% de etanol (Scharlau Chemie). Se dejó que se evaporase todo el etanol antes de aplicar a las muestras la sonda del Cr-Y biotinilada en solución de hibridación (Cambio, Cambridge, Reino Unido) y se cubrieron con un portaobjetos que se selló con pegamento. La hibridación consistió en calentar hasta 90°C durante 6 minutos, manteniendo luego las preparaciones durante una noche a 37°C. Al día siguiente, una vez retirados los cubreobjetos, las muestras ya hibridadas se incubaron en 50% formamida (Sigma-Aldrich) en 2xSSC durante 5 minutos a 42°C. Se lavaron en 1,5mM NaCl / 0,15 mM citrato sódico (0,2xSSC) a 42°C, y se bloqueó durante 30 minutos a 37°C con *FISH block solution* (Cambio), después de lo cual se incubó otra media hora a 37°C con avidina conjugada a *Texas Red* (Cambio). Para eliminar uniones inespecíficas, se lavó con una solución a 42°C de 30 mM NaCl / 3 mM citrato sódico / 0,1% Tween 20 (4xSSC), incubándose entonces 30 minutos con un anticuerpo anti-avidina conjugado a biotina (Cambio), que después de un nuevo lavado con 4xSSC, para amplificar la señal de la sonda para el Cr-Y, se volvió a incubar con avidina-*Texas Red*.

Para identificar simultáneamente la presencia del Cr-Y en células que expresasen EGFP, se desarrolló un marcaje de inmunofluorescencia después del marcaje con avidina-*Texas Red*. Brevemente, se bloqueó con *Protein block serum-free*, se incubó con anti-GFP de conejo, se reveló con anti-conejo *Alexa Fluor*[®] 488, y finalmente se montaron las preparaciones con *Mowiol*/DAPI.

Para detectar conjuntamente el Cr-Y, la expresión de EGFP y de citoqueratinas, una vez localizadas las células de interés, se despegaron los cubreobjetos, como se ha indicado anteriormente, se bloqueó de nuevo con *Protein block serum-free*, se incubaron 0,43 mg/mL del anticuerpo anti-citoqueratinas (DakoCytomation) durante una hora a temperatura ambiente, después de los cuales se lavaron y se identificó con anticuerpo biotinilado de cabra anti-conejo (DakoCytomation), amplificándose esta detección mediante el *ABC kit* (Vector) y revelándose el marcaje mediante la reacción enzimática con diaminobenzidina (DAB, Vector). Una vez montadas, se visualizaron las células de interés para identificar su expresión de citoqueratinas.

10.5.2. Hibridación *in situ* cromogénica del cromosoma Y (Y-CISH).

Como alternativa para identificar el origen de los núcleos presentes en los HDMO, se desarrolló la identificación del Cr-Y mediante técnicas de hibridación *in situ* cromogénica del Cr-Y (Y-CISH). Una vez identificados y localizados los HDMO, se despegaron los cubreobjetos de las preparaciones con el marcaje de fluorescencia para los factores de transcripción específicos de tejido, manteniéndolos inmersos en agua durante al menos una noche. Estas preparaciones se digirieron durante 20 minutos con 50% proteinasa K (DakoCytomation) en PBS a temperatura ambiente. Después de lo cual se continuó la hibridación de la sonda para el Cr-Y biotinilada como se ha descrito en el apartado anterior. Para amplificar la señal se utilizó el kit ABC (Vector), después de ser bloqueados con *FISH block solution* (Cambio); se lavó con 4xSSC y se reveló mediante el método enzimático basado en la reacción de la peroxidasa con DAB de Vector; finalmente se tiñeron los núcleos y se montaron las preparaciones con la solución *Mowiol/DAPI*. Se volvieron a localizar los HDMO, e identificar la posible presencia del Cr-Y.

11. ANÁLISIS DE IMAGEN.

Una vez que las secciones hepáticas fueron teñidas para su identificación, se visualizaron en un microscopio fluorescente Axioplan 2 imaging (Zeiss, Jena, Alemania). Las imágenes de diferentes zonas de interés de las secciones fueron tomadas con una cámara Axiocam MRm (Zeiss) y pseudocoloreadas con Corel Photo-paint 11 (Corel Corporation, Ottawa, Canadá).

Las imágenes confocales fueron tomadas mediante el sistema confocal Bio-Rad Radiance 2100 (Zeiss), y analizadas con el software Confocal Assistant 4.02 (Zeiss). Los análisis de colocalización en tres dimensiones, se realizaron mediante la captación de imágenes en el eje Z de un grosor de 0,25 μm , separadas 1 μm .

11.1. Cuantificación de HDMO.

La cuantificación de HDMO se llevó a cabo contabilizando todas las células que cumplieran los requisitos para ser consideradas HDMO en cada sección analizada. Se analizaron al menos 4 secciones diferentes de distintos lóbulos de cada animal. Para calcular el número aproximado de hepatocitos y de células hematopoyéticas, se adquirieron entre 5 y 8 imágenes de 100x, donde se contaron, utilizando el software Image Tool 3.00 (University of Texas, San Antonio, Tx, EEUU), tanto hepatocitos como células hematopoyéticas, calculándose un valor medio de los dos distintos tipos de células por cada imagen 100x tomada de un mismo animal. También se calculó el número aproximado

de posibles imágenes 100x que se podrían tomar de cada corte analizado, teniendo en cuenta el número de células presentes en cada imagen 100x de cada animal y el número aproximado de imágenes 100x revisadas. Se calculó tanto el total de hepatocitos como de células hematopoyéticas observadas en las secciones hepáticas analizadas de cada animal. La relación de HDMO se calculó empleando la siguiente fórmula: número total de HDMO por animal / número aproximado de hepatocitos observados del ratón.

11.2. Cuantificación de intensidad de fluorescencia.

Para cuantificar la densidad de fluorescencia debida a la tinción con DAPI de los núcleos, se utilizó el software *Image Tool 3.00 (University of Texas)*, con el que se calcularon los valores de densidad de fluorescencia (DF) en el canal azul. Se determinó la DF debida al DAPI en tres núcleos diferentes de células hematopoyéticas y en tres núcleos de hepatocitos. Se definió la relación de fluorescencia del DAPI (RF) para cada núcleo, como la relación entre la DF del DAPI de un núcleo dado respecto a la media aritmética de los valores de DF de los núcleos de los hepatocitos utilizados como controles en cada imagen (figura 25b).

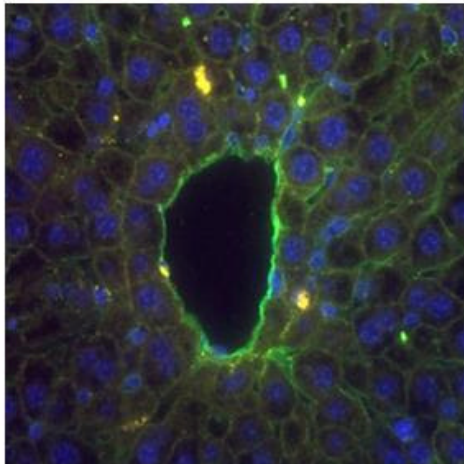
La cuantificación de la fluorescencia debida a la presencia de PU.1, se realizó de manera similar. Se determinó el valor de DF para PU.1 (canal rojo). En la misma imagen, se evaluaron los valores de DF de tres núcleos de células hematopoyéticas diferentes y de tres núcleos de hepatocitos, con lo que se evitaban las diferencias de fluorescencia entre distintas imágenes. Considerando que 1 sería el índice de fluorescencia (IF) de un núcleo hematopoyético y 0 el de un núcleo hepático, para PU.1 en cada imagen, realizamos el cálculo de la IF para cada núcleo de cada HDMO en cada imagen, mediante el ajuste según la ecuación de la figura 26b.

Del mismo modo se calculó la IF de HNF-1, considerando que 0 sería la IF para los núcleos de células hematopoyéticas y 1 para los núcleos de los hepatocitos (figura 27b).

12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos han sido expresados como la media aritmética \pm error estándar. La significación de las diferencias se determinó utilizando el test no paramétrico Wilcoxon Mann-Whitney y el test de Kruskal Wallis, con el soporte del programa informático Statgraphics (Manugistic Inc., Rockville, MD, EEUU).

VII



- I. ÍNDICE
- II. ABREVIATURAS
- III. RESUMEN
- IV. INTRODUCCIÓN
- V. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS
- VI. MATERIALES Y MÉTODOS
- VII. RESULTADOS**
- VIII. DISCUSIÓN
- IX. CONCLUSIONES
- X. BIBLIOGRAFÍA
- XI. ANEXOS

1. MODELO DE DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR CCl₄ Y MOVILIZACIÓN CON G-CSF.

1.1. Establecimiento de un modelo de hematopoyesis quimérica.

En primer lugar y con la finalidad de poder identificar con facilidad las células derivadas de la MO, se estableció un modelo de animales quiméricos. Para conseguir una hematopoyesis quimérica, se realizó un trasplante en ratones hembra P3D2F1 irradiados letalmente, los cuales expresaban los marcadores panleucocitarios CD45.1 y CD45.2, con 1×10^7 células de MO procedentes de ratones macho BDGF1, que expresaban el marcador panleucocitario CD45.2 y que además eran transgénicos para la expresión de EGFP bajo el control del promotor ubicuo de la β -actina.

El seguimiento del injerto hematopoyético exógeno en los ratones quiméricos se evaluó mediante análisis de SP. Se cuantificó tanto la presencia de células CD45.2⁺ en el fondo endógeno CD45.1⁺/CD45.2⁺, como la expresión de la proteína marcadora EGFP. Después de al menos tres meses de haber sido realizado el trasplante de MO, se consideró reestablecida la hematopoyesis de los ratones irradiados letalmente. Esta reconstitución hematopoyética se debió mayoritariamente a células procedentes de los ratones donadores (CD45.2⁺) (figura 6a), siendo su porcentaje respecto al total de leucocitos de $96,1 \pm 0,8$ (n=55). En cambio, cuando se cuantificó el porcentaje de leucocitos que expresaban EGFP, se vio que era un $79,4 \pm 0,7$ (n=55) (figura 6b). Existía por tanto, un porcentaje de células de la sangre que, a pesar de proceder de los ratones transgénicos para la EGFP, no expresaban este marcador fluorescente. Esta variación también se observó tanto en SP donde el $86,4 \pm 1,8\%$ (n=3) de las células expresaban EGFP (figura 7a), como en secciones de hígado de los propios ratones donadores BDGF1, donde existía alrededor del 10-15% de los hepatocitos transgénicos que no expresaban EGFP (figura 7b).

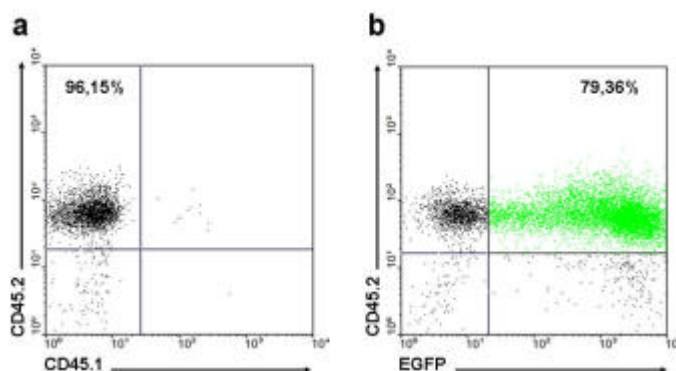
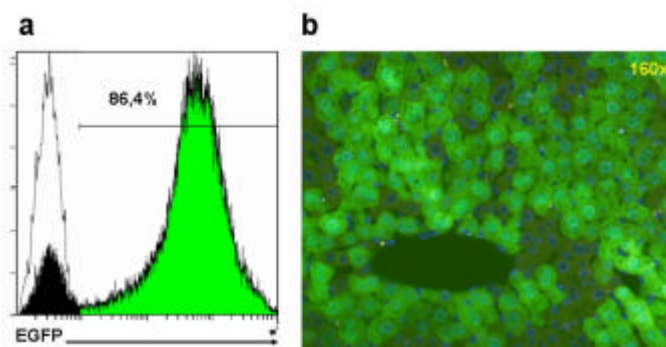


Figura 6. Análisis de citometría de SP de los ratones quiméricos.
a) Porcentaje de reconstitución hematopoyética a partir del injerto exógeno procedente del trasplante de MO de ratones BDGF1 (CD45.2⁺) en ratones P3D2F1 (CD45.1⁺/CD45.2⁺). **b)** Porcentaje de células hematopoyéticas con expresión de EGFP. (n=55).

Figura 7. Variación de la expresión de EGFP en los ratones BDGF1.

a) Histograma donde se representa la expresión de EGFP de células de SP de un ratón BDGF1. En negro células EGFP⁻ y en verde células EGFP⁺. El histograma blanco representa el análisis de sangre periférica de un ratón P3D2F1 que no expresa EGFP. **b)** Variación de la expresión de EGFP de una sección hepática de un ratón BDGF1.



En conjunto, los ratones quiméricos, resultantes del trasplante de MO procedente de ratones BDGF1, constituían un buen modelo para el seguimiento de las células derivadas de la MO, ya que la gran mayoría de estas células eran positivas para la expresión de la proteína marcadora.

1.2. Evaluación del daño hepático inducido por el tratamiento continuado con CCl₄.

Se había descrito previamente que el CCl₄ actuaba como un compuesto hepatotóxico (Ariosto et al., 1989; Lee, 1993; Constandinou et al., 2005). Por esta razón, le utilizamos para el establecimiento de un protocolo de inducción de daño hepático en un modelo de ratón. Nuestro modelo de generación de daño hepático se basó en la administración de 1ml CCl₄/Kg peso corporal (1×10^{-2} mol CCl₄/Kg peso corporal).

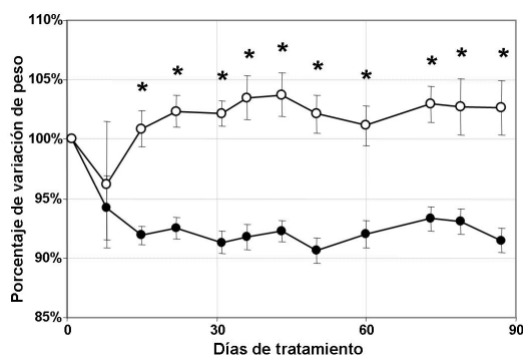


Figura 8. Variación del peso. Evolución del peso del grupo tratado con CCl₄ (●) o con PBS (○), representado respecto al peso inicial, durante el tratamiento. Diferencia significativa de la variación de peso entre el grupo tratado con CCl₄ (n=20) y con PBS (n=6) (*, p<0,05).

Se establecieron dos grupos de ratones quiméricos, según se les administró CCl₄ o solución salina, y se realizaron mediante inyecciones intraperitoneales repetidas semanalmente durante un periodo de tres meses. A ambos grupos de animales se les monitorizó durante el tratamiento, su peso y diferentes parámetros plasmáticos para valorar la función hepática, como son la GPT, la GOT y bilirrubina. La GPT, la GOT y la bilirrubina se liberan a la sangre en condiciones de daño hepático.

Como se ve en la figura 8, el peso del grupo tratado con CCl₄ se redujo significativamente (p<0,001) en torno al 10% de su peso inicial durante el tratamiento, hasta el 91,5±1,0% (n=20) respecto al peso inicial después tres meses. Por el contrario el grupo tratado con PBS apenas varió su peso después del mismo periodo de tiempo (102,7±2,3 % del peso inicial, n=6).

En el análisis de los diferentes parámetros plasmáticos tras dos meses de tratamiento (figura 9), se observó que los valores de GPT, GOT y bilirrubina en el plasma del grupo tratado con CCl₄ (n=20) estaban aumentados significativamente (p<0,05) respecto al grupo control (n=6), en 14,5 veces, 4

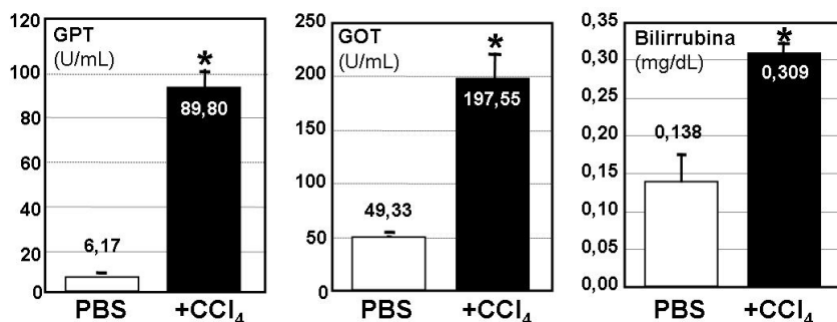


Figura 9. Análisis de parámetros plasmáticos. Valores de transaminasa glutámico pirúvica (GPT), transaminasa glutámico oxalacética (GOT) y bilirrubina, medidos en el plasma durante el tratamiento con PBS (□) o CCl₄ (■). Diferencias significativas entre el grupo tratado con CCl₄ (n=20) y con PBS (n=6). Diferencias significativas de los tres valores están indicados (*, p< 0,05).

veces y 2,2 veces respectivamente. Este incremento en los valores medidos en el plasma, del grupo tratado con respecto al grupo control, nos indicaba la efectividad del tratamiento recurrente con CCl₄ para inducir un daño hepático.

A partir de secciones hepáticas de los diferentes grupos, se analizó histológicamente el efecto del tratamiento en el hígado. En la figura 10 se recogen cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina. Se apreciaba que, en contraste con las secciones de los ratones control, donde todos los hepatocitos tenían un tamaño similar y había poca infiltración de células hematopoyéticas en el parénquima hepático (figura 10a), en el grupo de animales tratados con CCl₄ aparecía una regeneración hepatocelular con una prominente anisonucleosis focal, con focos desperdigados de necrosis dentro del parénquima hepático sin una distribución zonal obvia. Los hepatocitos presentaban un tamaño poco uniforme y muchos presentaban nucleolos prominentes, algo característico de los procesos inflamatorios (figura 10b y 10c). Gracias a que las células procedentes de la MO de los ratones quiméricos expresaban la EGFP, se pudo determinar, mediante técnicas de inmunofluorescencia, la expresión de EGFP en los infiltrados celulares, que fueron predominantemente grupos de histiocitos de origen hematopoyético (CD45⁺, figura 10d recuadro pequeño). No se pudo observar la transición a cirrosis esperada, en la que se produciría una fibrosis en el hígado, así como un proceso de regeneración nodular.

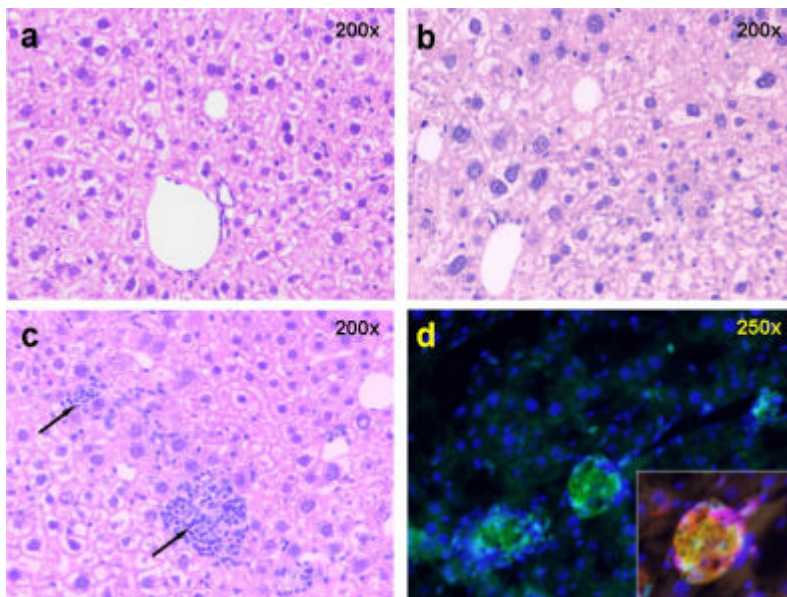


Figura 10. Características histológicas inducidas por el tratamiento con CCl₄. Microfotografías de secciones hepáticas teñidas con hematoxilina-eosina de **a)** animales sin tratar, **b-c)** animales tratados con CCl₄. **b)** hepatocitos con tamaños muy diferenciados. **c)** infiltraciones hematopoyéticas (flechas). **d)** Análisis mediante inmunofluorescencia de un hígado dañado con CCl₄, expresión de EGFP (verde) y tinción de DAPI de los núcleos (azul). En el recuadro expresión de CD45 (rojo), colocalizándose con EGFP (amarillo) en los nódulos histiocíticos.

Se estudió si existía reacción oval, consistente en la proliferación de las células ovals, posibles precursores hepáticos, mediante su identificación gracias a la expresión de citoqueratinas de tipo biliar. En otros modelos de daño hepático donde la regeneración hepática ocurre también a partir de estas células, se aprecia una importante reacción oval, incrementándose el número de las células ovals (Kofman et al., 2005). El número de éstas por tracto oval fue el doble en el grupo con daño hepático que en el grupo control, aunque no fue estadísticamente significativo (datos no mostrados).

1.3. Análisis del efecto de la movilización con G-CSF.

La movilización con G-CSF ha sido utilizada en los últimos años para enriquecer en progenitores hematopoyéticos la SP (Cottler-Fox et al., 2003). Se quiso comprobar el efecto del tratamiento con CCl₄ en la movilización con G-CSF, así como la acción que la movilización hematopoyética con G-CSF ejercía sobre el modelo establecido de daño hepático.

Se establecieron dos grupos de ratones, a un grupo de animales (n=8) se les trató con una inyección semanal de CCl₄ (1ml CCl₄/Kg peso corporal) durante cuatro semanas y al otro grupo con

PBS (n=8) durante el mismo periodo de tiempo. Un día antes de la última dosis con CCl₄, se comenzó el protocolo de movilización a la mitad de los animales de cada grupo (n=4), dejando al resto como controles sin movilizar. El protocolo de movilización consistió en tres ciclos semanales de 50µg Peg-G-CSF/ratón. Para el seguimiento del efecto de las distintas etapas del tratamiento, se realizaron distintas extracciones de sangre, como se esquematiza en la figura 11a. En cada punto se analizó el número de leucocitos totales (figura 11b), el porcentaje de granulocitos (figura 11c), el porcentaje de células linfoides (figura 11d), el porcentaje de monocitos (figura 11e) y el porcentaje de progenitores hematopoyéticos más primitivos, definidos como células con el fenotipo LSK (figura 11f).

Previamente al inicio de la administración de G-CSF, se observó que los ratones dañados con CCl₄ presentaban unos valores significativamente más altos de leucocitos totales, que los observados en el grupo que sólo había recibido PBS ($10,8 \times 10^6 \pm 0,6 \times 10^6$ frente a $7,3 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$ leucocitos totales/mL, $p < 0,05$) (figura 11b). De ellos, el $21,4 \pm 1,7\%$ eran granulocitos en el grupo tratado con CCl₄ y sólo el $7,1 \pm 0,9\%$ en los ratones control (figura 11c). Como se observa en la figura 11d, el porcentaje de linfocitos sufrió una disminución con el daño con CCl₄, pasando de un $91,0 \pm 0,9\%$ a $77,6 \pm 1,7\%$ con daño hepático. Sin embargo, ni el porcentaje de monocitos ni de células LSK sufrieron variación significativa con el CCl₄. Por tanto, el daño producido por el CCl₄, incrementaba el número de células hematopoyéticas en SP, principalmente de la serie granulocítica.

Cinco días después del primer ciclo de administración del G-CSF, se comprobó su efecto en SP. Como se ve en la figura 11, el G-CSF fue capaz de inducir una movilización hematopoyética, tanto en el grupo de ratones control como en los que habían sido tratados con CCl₄ y presentaban daño hepático, produciéndose un incremento muy significativo ($p < 0,05$) en el número de células hematopoyéticas en comparación con los grupos que no habían sido movilizados (grupos G-CSF y CCl₄/G-CSF con $23,5 \times 10^6 \pm 1,9 \times 10^6$ y $27,1 \times 10^6 \pm 2,6 \times 10^6$ leucocitos totales/mL respectivamente, frente $8,2 \times 10^6 \pm 0,7 \times 10^6$ y $7,4 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$ para los grupos control y CCl₄). Este fuerte incremento en la movilización de los grupos G-CSF y CCl₄/G-CSF se repitió con el segundo ciclo de movilización, produciéndose incluso un mayor aumento en el número de leucocitos en el grupo G-CSF ($45,0 \times 10^6 \pm 6,6 \times 10^6$ leucocitos totales/mL) que incluso en el grupo CCl₄/G-CSF ($27,6 \times 10^6 \pm 4,8 \times 10^6$ leucocitos totales/mL) y ambos muy superiores al grupo CCl₄ o al control ($7,4 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$ o $6,5 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$ leucocitos totales/mL respectivamente).

Cuando se analizaron los efectos del tercer ciclo de movilización con G-CSF en los diferentes grupos, se observó que en los ratones movilizados apenas se producía una ligera elevación del número de leucocitos (figura 11b), estando los valores de todos los grupos en torno a 10×10^6 leucocitos totales/mL.

Al profundizar en el estudio de las subpoblaciones hematopoyéticas que más respondían a la movilización con G-CSF, se observó que el mayor aporte a la elevación de los leucocitos totales se debía al compartimento mielóide. Los granulocitos constituían el $47,6 \pm 1,5\%$ de las células totales presentes en SP de los ratones del grupo G-CSF durante el primer ciclo de G-CSF y hasta un $72,6 \pm 3,0\%$ en el segundo ciclo. Y ya en el tercer ciclo, no se consiguió aumentar el porcentaje de granulocitos por encima del valor del grupo control, cuyo valor permaneció estable entorno al 10% de los leucocitos de SP durante los tres ciclos. En cuanto a los grupos dañados con CCl₄, los resultados fueron similares, salvo por el hecho de que se partió de valores más altos que los que recibieron PBS.

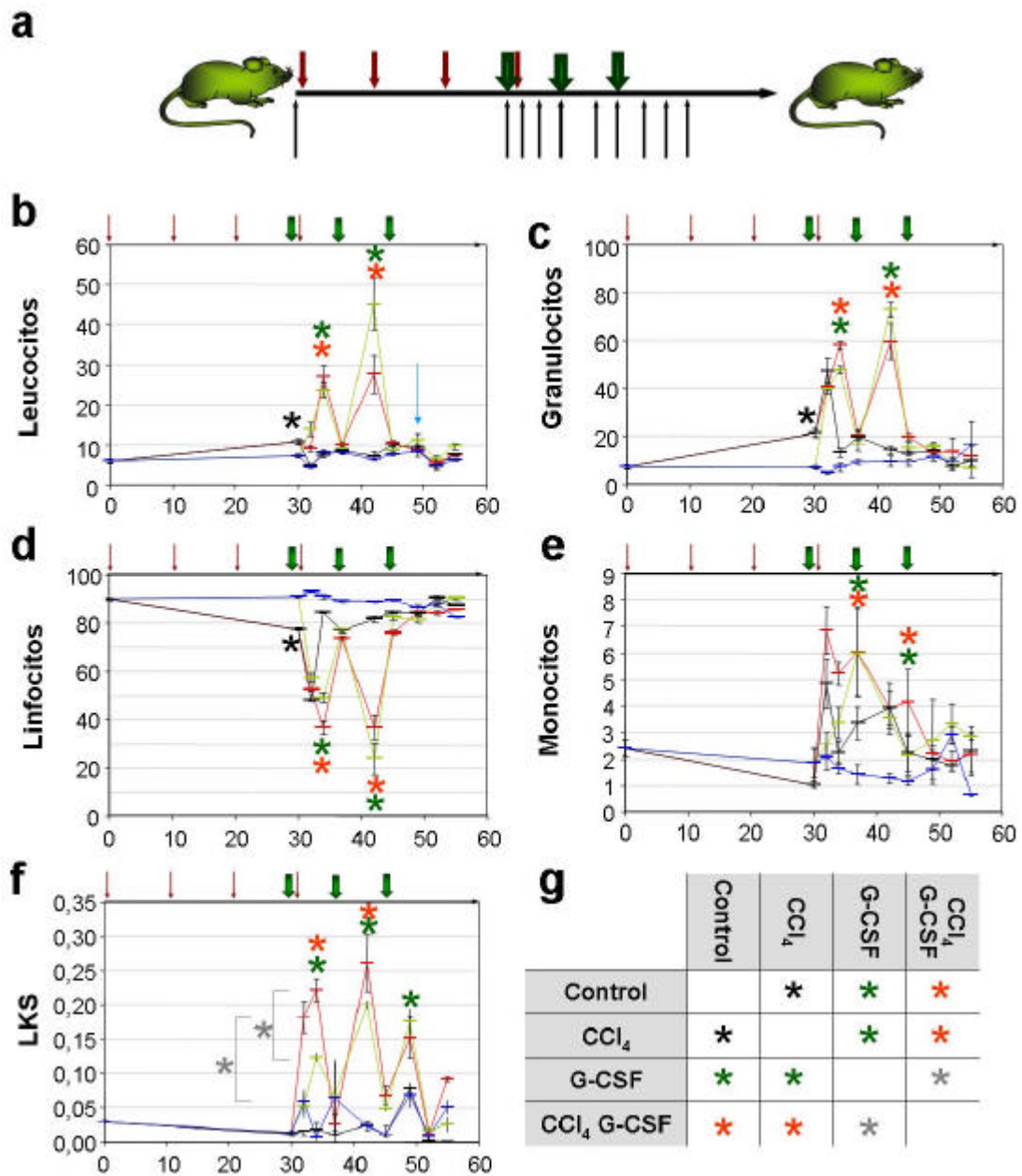


Figura 11. Análisis de la movilización con G-CSF en animales dañados con CCl₄: **a)** Esquema del protocolo combinado de daño hepático y movilización. Inyecciones intraperitoneales semanales de 10% CCl₄ (flechas rojas), movilización hematopoyética con 50µg de Peg-G-CSF/ratón (flechas verdes) y extracción de SP (flechas negras). **b-f)** Evolución de distintas poblaciones hematopoyéticas en SP a lo largo del tiempo de tratamiento (eje de abscisas en días), para los distintos grupos de animales: control (línea azul), dañado con CCl₄ (línea negra), movilizado con G-CSF (línea verde) y tratado con CCl₄ y G-CSF (línea roja). **b)** Contaje de leucocitos totales en SP a lo largo del tratamiento, expresado en 10⁶ células/mL. Fallo de movilización en el tercer ciclo de G-CSF (flecha azul) **c)** Porcentaje de granulocitos. **d)** Porcentaje de linfocitos. **e)** Porcentaje de monocitos. **f)** Porcentaje de CMH, reconocidas por fenotipo LSK. **g)** Diferencias significativas entre los diferentes grupos, todas ellas con p<0,05.

El porcentaje de monocitos en SP siguió un comportamiento similar al de los granulocitos con los diferentes ciclos de movilización, aunque nunca superando el 8% de leucocitos en SP. Los valores totales de monocitos en los grupos sin daño con CCl₄, se incrementaron con los dos primeros ciclos de G-CSF; desde $0,15 \pm 0,05 \times 10^6$ monocitos/mL se pasó a $0,78 \pm 0,15 \times 10^6$ monocitos/mL y $1,51 \pm 0,11 \times 10^6$ monocitos/mL con el primer y el segundo ciclo de movilización, pero con el tercer sólo se consiguió un valor de $0,35 \pm 0,22 \times 10^6$ monocitos/mL. El grupo con daño hepático siguió una tendencia similar.

La población linfoide sufre un ligero incremento en sus valores con los ciclos de G-CSF, pero debido a que el resto de células hematopoyéticas en SP es mucho mayor con la movilización, el porcentaje de linfocitos disminuye, al disminuir también su contribución al total de leucocitos.

Por último, se analizó el efecto de la movilización en el compartimento de células madre hematopoyéticas, identificadas como la población de células LSK. También se apreció un incremento de esta población en los dos grupos movilizados durante el primer ciclo de G-CSF, produciéndose este incremento de forma significativamente superior ($p < 0,05$) en el grupo CCl_4 /G-CSF que pasa de $0,012 \pm 0,002\%$ de células LSK en el momento de la primera dosis de G-CSF, a un $0,18 \pm 0,02\%$ dos días más tarde (un día después de la última inyección con CCl_4) y alcanzándose un $0,22 \pm 0,02\%$ en el momento máximo de movilización del primer ciclo (cinco días después de la administración con G-CSF). En cambio, el grupo que sólo fue movilizado, pasó de un $0,01 \pm 0,00\%$ el día de la primera movilización, a un $0,05 \pm 0,01\%$ después de dos días y con un máximo, a los cinco días, de $0,12 \pm 0,02\%$. Durante el segundo ciclo de movilización, el efecto del G-CSF en el porcentaje de LSK fue similar al del ciclo anterior en los ratones tratados previamente con CCl_4 ($0,26 \pm 0,04\%$) y en los que no ($0,20 \pm 0,03\%$). Valores significativamente superiores ($p < 0,05$) a los de los respectivos controles sin movilizar, $0,026 \pm 0,04\%$ para los tratados con CCl_4 y $0,02 \pm 0,01\%$ para los animales control; además, se consigue alcanzar esta mayor presencia de la población LSK en SP de una manera semejante tanto en los dañados como en los que no. En el último ciclo de movilización se reduce la capacidad de las células LSK para mobilizarse del grupo con daño hepático, con respecto a los ciclos de movilización anteriores, siendo significativamente inferior al del primer ciclo de G-CSF, aunque el valor de LSK en SP de $0,15 \pm 0,03\%$ sigue siendo superior al de los animales sin movilizar. Por el contrario el G-CSF ejerce el mismo efecto de movilizar LSK en el grupo sin daño hepático previo, alcanzándose un $0,17 \pm 0,04\%$ de células LSK en SP, significativamente superior ($p < 0,05$) a los valores de los grupos sin movilizar ($0,08 \pm 0,01\%$ para el grupo dañado y no movilizado, y de $0,07 \pm 0,02\%$ para el grupo control).

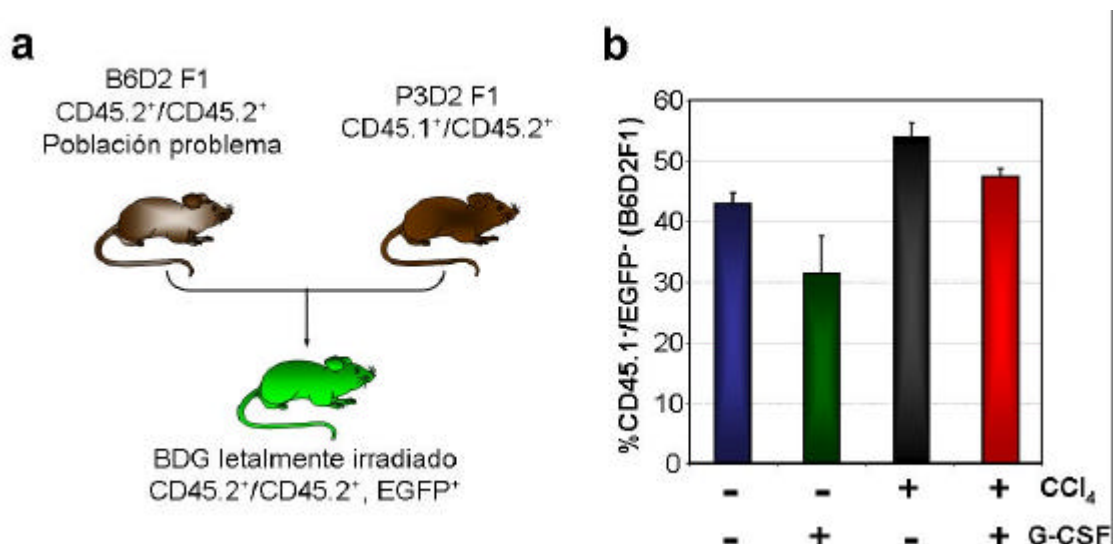


Figura 12. Ensayo de repoblación competitiva. a) Esquema del modelo de trasplante en competición. **b)** Injertos hematopoyéticos de la MO de los ratones tratados (población problema) a los cuatro meses de la competición.

Con la intención de estudiar el contenido en CMHs de los ratones después de los tres ciclos de movilización con G-CSF, se realizaron ensayos de repoblación competitiva. Para ello, ratones BDGF1 letalmente irradiados, fueron trasplantados con células de MO de ratones de los distintos grupos, todos ellos B6D2F1 (CD45.2⁺/CD45.2⁺), justo con un número similar de células de MO procedente de ratones

P3D2F1 sin tratar (CD45.1⁺/CD45.2⁺) (figura 12a), y se realizó un seguimiento en el tiempo del origen de las células que reconstituían los ratones receptores. Como se ve en la figura 12b, no existían diferencias significativas en el porcentaje de células CD45.2/CD45.2 a los cuatro meses de haber sido realizado el trasplante de las poblaciones competidoras de MO. Ésto nos indicaba que el compartimiento de células madre hematopoyéticas de los grupos tratados con CCl₄ y/o con G-CSF, no se había visto afectado por los tres ciclos de movilización con G-CSF, ya que eran capaces de competir de igual forma que las células procedentes de los grupos no movilizados.

2. ESTUDIO DE PROCESOS DE PLASTICIDAD EN UN MODELO MURINO DE DAÑO HEPÁTICO, MEDIADO POR CÉLULAS DE MO.

El siguiente paso fue evaluar la presencia de células derivadas de la MO en el hígado de los ratones dañados, en comparación con los no dañados. Se utilizaron los animales quiméricos, donde la gran mayoría de sus células hematopoyéticas expresaban EGFP (ver apartado 1.1), y donde éramos capaces de identificar fácilmente las células derivadas de la MO trasplantada, gracias a la expresión de la proteína marcadora.

2.1. Presencia de células hematopoyéticas en la estructura del hígado.

Como ya quedó descrito anteriormente, la movilización con G-CSF provoca un incremento del número total de células hematopoyéticas presentes en SP. Por ello se estudió la presencia de células procedentes de MO en el parénquima hepático y si el incremento de células hematopoyéticas circulantes en SP, debido a la movilización con G-CSF, se reflejaba en un aumento de la infiltración de células hematopoyéticas en el hígado. Para realizar este estudio, ratones quiméricos tratados y no tratados con CCl₄ durante tres meses, recibieron 1, 2 ó 3 ciclos semanales de movilización con G-CSF, y se analizó la presencia de células derivadas de MO una semana después de la última administración de G-CSF. Para eliminar al máximo posible las células de la sangre en el espacio sinusoidal hepático, en el momento del sacrificio los animales fueron perfundidos con una solución de EDTA 25mM en PBS antes de su fijación (Wagers et al., 2002). El número de células hematopoyéticas presentes en el parénquima hepático fue determinado por inmunofluorescencia, para lo que se utilizaron anticuerpos anti-CD45 y anti-EGFP. Al igual que ocurría en el análisis de la SP de los ratones quiméricos por citometría de flujo, en la identificación de las células hematopoyéticas presentes en el hígado por inmunofluorescencia, se observó un pequeño porcentaje de células positivas para este marcador hematopoyético, expresado en la superficie celular, en las que no se detectaba la expresión de EGFP. Como se aprecia en la figura 13a, se distinguen claramente las células hematopoyéticas presentes en estas secciones de tejido hepático, las cuales expresan el marcador CD45 (en rojo) y en la mayoría de ellas se localiza conjuntamente la expresión de EGFP (células verde-amarillas). Presentan además una morfología claramente distinguible de los hepatocitos que las rodean. Éstos además de ser negativos para CD45, poseen una morfología mucho más poligonal. Cuando se comparó la distribución de las células hematopoyéticas en la estructura del hígado, se observó que en el grupo de ratones control (no dañados, ni movilizados con G-CSF), las células hematopoyéticas se distribuían uniformemente entre los hepatocitos. Tras la movilización se apreció un incremento en el número de células hematopoyéticas infiltradas en el parénquima. En los ratones que habían sido dañados con CCl₄, se observó un mayor número de células hematopoyéticas y en ocasiones formando grupos. También se encontró una gran cantidad de células con morfología macrofágica, efecto que se vio incrementado en el grupo que aparte de daño hepático, había sido movilizado. Incluso en algunos animales dañados con CCl₄ se apreciaban nódulos macroscópicos en el hígado. Estos nódulos emitían fluorescencia verde, indicando su origen a partir de células del trasplante de MO (figura 13a y 14).

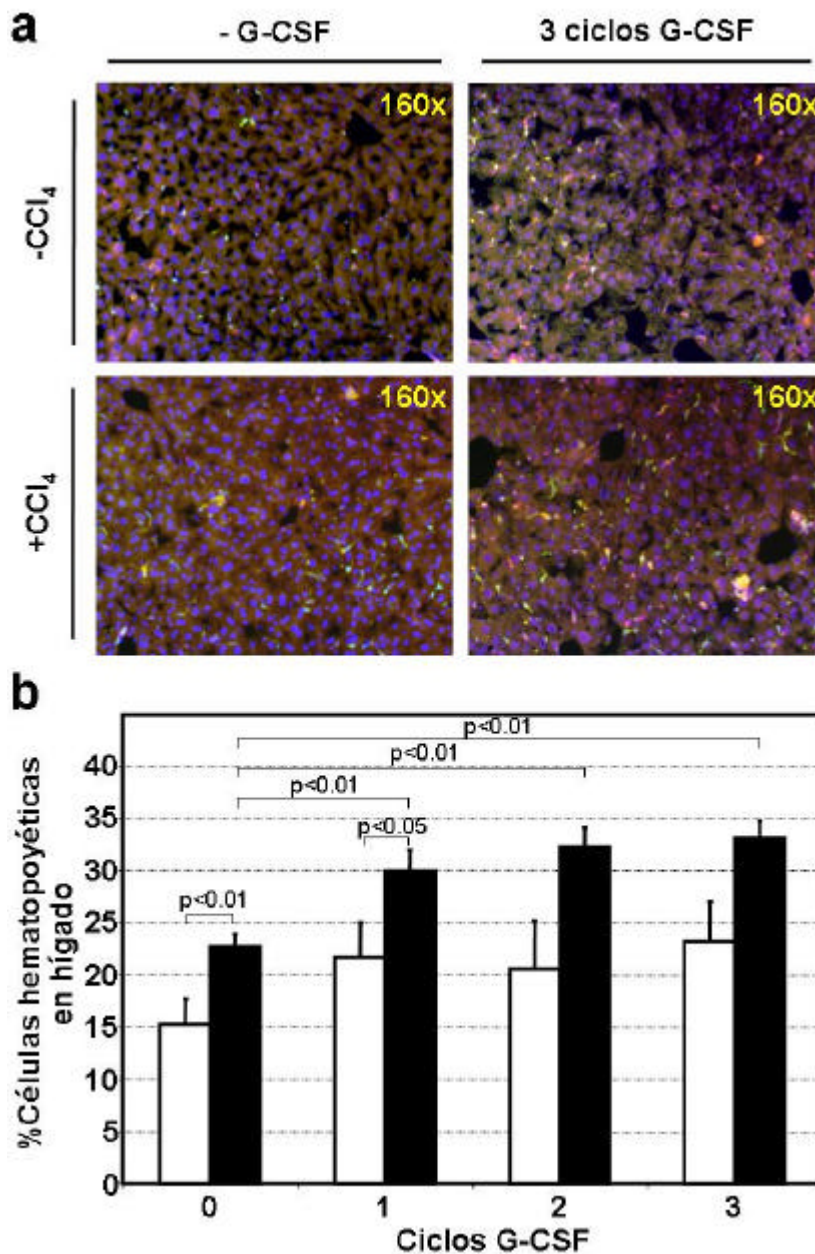


Figura 13. La movilización con G-CSF induce la infiltración de células hematopoyéticas en el hígado de ratones tratados con CCl₄. a) Crio secciones hepáticas de ratones no tratados o tratados con CCl₄ y movilizados o no con G-CSF, durante tres semanas. Los hígados se extrajeron una semana después del último tratamiento con G-CSF. Triple marcaje para EGFP (verde), CD45 (rojo) y núcleos (azul). b) Cuantificación de la presencia hematopoyética en el hígado después de 0, 1, 2 ó 3 semanas de movilización, en los ratones tratados con CCl₄ (■) o sin tratar (□). Las diferencias estadísticamente significativas están representadas (p< 0,05 y p<0,01).

Se cuantificaron los diferentes grados de infiltración hematopoyética, como número de células CD45⁺ respecto al total de células presentes en el hígado. Como se observa en la figura 13b, se encontró una diferencia significativa (p<0,01) en el porcentaje de células hematopoyéticas presentes en el hígado de los ratones control (donde el 15,2±1,4% de todas las células presentes en el hígado son hematopoyéticas) con respecto a los ratones en los que se había inducido un daño hepático (22,7±1,2%).

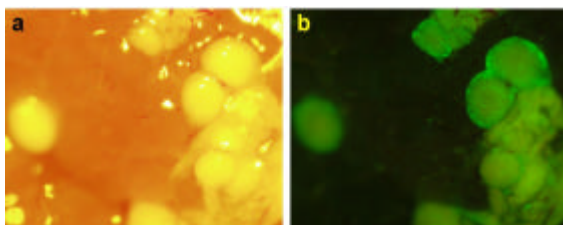


Figura 14. Aspecto macroscópico del hígado dañado con CCl₄. Nódulos observados en algunos animales quiméricos dañados con CCl₄. a) Fotografía en campo claro. b) Expresión de EGFP indicando su formación a partir de células derivadas de la MO.

El porcentaje de células infiltradas aumentó progresivamente cuando los ratones recibieron un número mayor de ciclos de movilización, llegando hasta un 23,2±1,0% en los animales con tres dosis de G-CSF o 33,2±1,8% en los ratones con igual número de ciclos de movilización pero con daño hepático.

Como ya se ha expuesto anteriormente, en los ratones con daño hepático, la infiltración hematopoyética se distribuía principalmente en grupos de células, posiblemente macrófagos. Para confirmarlo, se realizó la identificación de los macrófagos presentes en el hígado mediante el uso del anticuerpo F4/80, que reconoce específicamente a células del sistema fagocítico mononuclear. Como se representa en la figura 15, el porcentaje de macrófagos presentes en hígado en animales sin daño ni movilización fue del $10,5 \pm 0,2\%$, sufriendo un leve aumento en el grupo con daño hepático ($12,3 \pm 0,4\%$). En los ratones que habían sido dañados con CCl_4 y movilizados con tres ciclos de G-CSF, la presencia de macrófagos en el hígado aumentó significativamente ($p < 0,05$), hasta el $20,2 \pm 2,9\%$, a diferencia del grupo sólo tratado con G-CSF, en el que no varió el porcentaje de macrófagos ($12,3 \pm 0,4\%$).

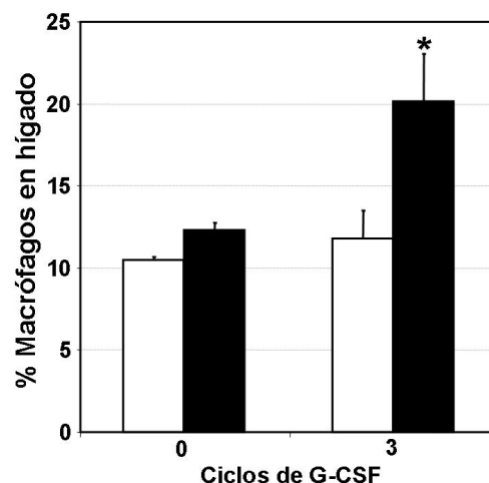


Figura 15. Cuantificación de la presencia de células del sistema fagocítico mononuclear en el hígado. Porcentaje calculado contabilizando las células positivas para el marcaje con el anticuerpo F4/80 en 6 campos aleatorios de diferentes secciones hepáticas, pertenecientes a 2 ratones por grupo. (*, $p < 0,05$)

2.2. Localización de hepatocitos derivados de MO.

En los últimos años se había descrito la existencia de fenómenos de plasticidad celular por parte de células procedentes de MO. Son muchos los autores que han descrito la conversión de células derivadas de MO hacia hepatocitos (ver tabla 2 y referencias (Fuchs and Segre, 2000; Weissman, 2000; Fausto, 2001; Grompe, 2005; Kucia et al., 2005a; Kucia et al., 2005b; Verfaillie, 2005; Thorgeirsson and Grisham, 2006)). Por tanto, se quiso investigar la relevancia de estos fenómenos en nuestro modelo. Para comprobar la existencia de HDMO se establecieron una serie de requisitos: i) Garantizar que habían dejado de comportarse como células de origen hematopoyético, mediante la pérdida del marcador panleucocitario CD45. ii) Comportarse como hepatocitos funcionales, con la morfología característica de hepatocito (células grandes y regulares, con uno o varios núcleos que a menudo presentan muchos nucleolos, y una razón núcleo/citoplasma baja o moderada). iii) Expresar proteínas y funciones específicas hepáticas. iv) Se deberían poder identificar los HDMO respecto al resto de hepatocitos adyacentes. Nuestro modelo era adecuado para ello, ya que la mayoría de células cuyo origen estaba en la MO, expresaban la EGFP, que actuaría como proteína marcadora. En resumen, para considerar a una célula presente en el hígado como un HDMO debería poseer morfología de hepatocito, carecer de CD45, expresar EGFP y distintas proteínas específicas de hepatocito.

Se analizaron secciones de hígado de ratones de los diferentes grupos para identificar HDMO. Se detectaron células EGFP⁺, con una morfología típica de hepatocito, principalmente en los animales que habían sido dañados con CCl_4 . Estas células se encontraban integradas dentro del entramado hepatocelular, presentaban una apariencia idéntica a la de los hepatocitos adyacentes, y no expresaban el marcador hematopoyético CD45 (figura 16a), lo que nos indicaba que a pesar de ser células derivadas de MO al expresar EGFP, ya no eran células hematopoyéticas. La ausencia de expresión del marcador panleucocitario se confirmó mediante fotografías de microscopía confocal. Se

tomaron secuencias de imágenes confocales a lo largo del eje Z de la sección (12-15 μm de grosor). En estas secuencias de fotografías, se observó que en células EGFP⁺ con morfología de hepatocito nunca se detectaba la expresión de CD45; sin embargo el resto de células EGFP⁺, además de presentar una morfología diferente, eran positivas para CD45, colocándose su expresión junto a la EGFP en un mismo plano focal o en planos consecutivos (figura 16b). La mayoría de HDMO fueron localizados como células aisladas, aunque una pequeña proporción de ellas también se encontró formando parejas de células.

Para confirmar la funcionalidad de célula hepática de los HDMO, se analizó la expresión de diferentes proteínas específicas de hepatocitos. Mediante inmunofluorescencia en secciones hepáticas embebidas en parafina, se detectó la expresión de albúmina, glicoproteína biliar 1 (BGP1) la cual se identifica mediante la reacción cruzada con el anticuerpo de conejo policlonal específico para el antígeno carcinoembrionario (CEA) (Sheahan et al., 1990), y citoqueratinas específicas de hepatocitos. Cuando se realizó el análisis de la expresión de albúmina en secciones hepáticas, se comprobó que existía una distribución heterogénea entre los hepatocitos, localizándose algunos con una alta expresión de albúmina, la cual se encontraba en el citoplasma de los hepatocitos en forma de gránulos, pero también se identificó una cantidad considerable de hepatocitos que no eran positivos para el anticuerpo específico contra la albúmina. Esta heterogeneidad en la expresión de la albúmina, también se observó en HDMO. Se identificaron algunos que eran negativos para la expresión de albúmina, pero otros en cambio sí que presentaron las acumulaciones citoplasmáticas de albúmina (figura 16c). Esto confirmaba la identificación de los HDMO como células que, aunque procedentes de la MO, eran capaces de localizarse en el hígado y mostrar características hepáticas. Los HDMO también eran positivos para la BGP1 (Godfraind et al., 1995), una proteína de la familia de antígenos carcinoembrionales, que juega un papel en la adhesión celular, transporte de ácido biliar y actividad ATPasa ectópica. Se expresa en la membrana de células epiteliales, como los hepatocitos. En la figura 16c, se visualiza un HDMO con un claro marcaje para la expresión de esta glicoproteína, localizándose en la zona de su membrana donde se encuentra adyacente a otros dos hepatocitos. Los HDMO también fueron positivos para el marcaje con un anticuerpo policlonal que reconocía un amplio espectro de citoqueratinas, entre las que se encontraban tanto la citoqueratina 8 como la 18, ambas características de hepatocitos; su localización fue alrededor de la membrana citoplasmática (figura 23b₂”, recuadro pequeño). La autofluorescencia propia de los hepatocitos, causada por la presencia de porfirinas (Gschnait et al., 1975), fue otra característica de estas células hepáticas que se pudo identificar en los HDMO (no se muestra).

Por último, se analizó la capacidad de almacenar glucógeno de los HDMO, mediante la tinción de PAS, que identifica los polisacáridos presentes en las células. En la figura 16d se muestra como los HDMO presentan la capacidad de acumular glucógeno en su citoplasma, como revela el color rosado de los productos de la reacción de PAS.

Podemos concluir que, en nuestro modelo experimental, se identifican células derivadas de la MO, que expresan múltiples marcadores específicos de hepatocitos, a las cuales definimos como HDMO. Aunque la frecuencia de aparición de los HDMO fue muy baja (sólo 1 HDMO por cada 250.000 hepatocitos) se identificaron principalmente en el grupo de ratones dañados con CCl₄, lo que nos indicaba que el daño hepático causado por CCl₄ favorece o incluso era necesario para la formación de hepatocitos derivados de MO.

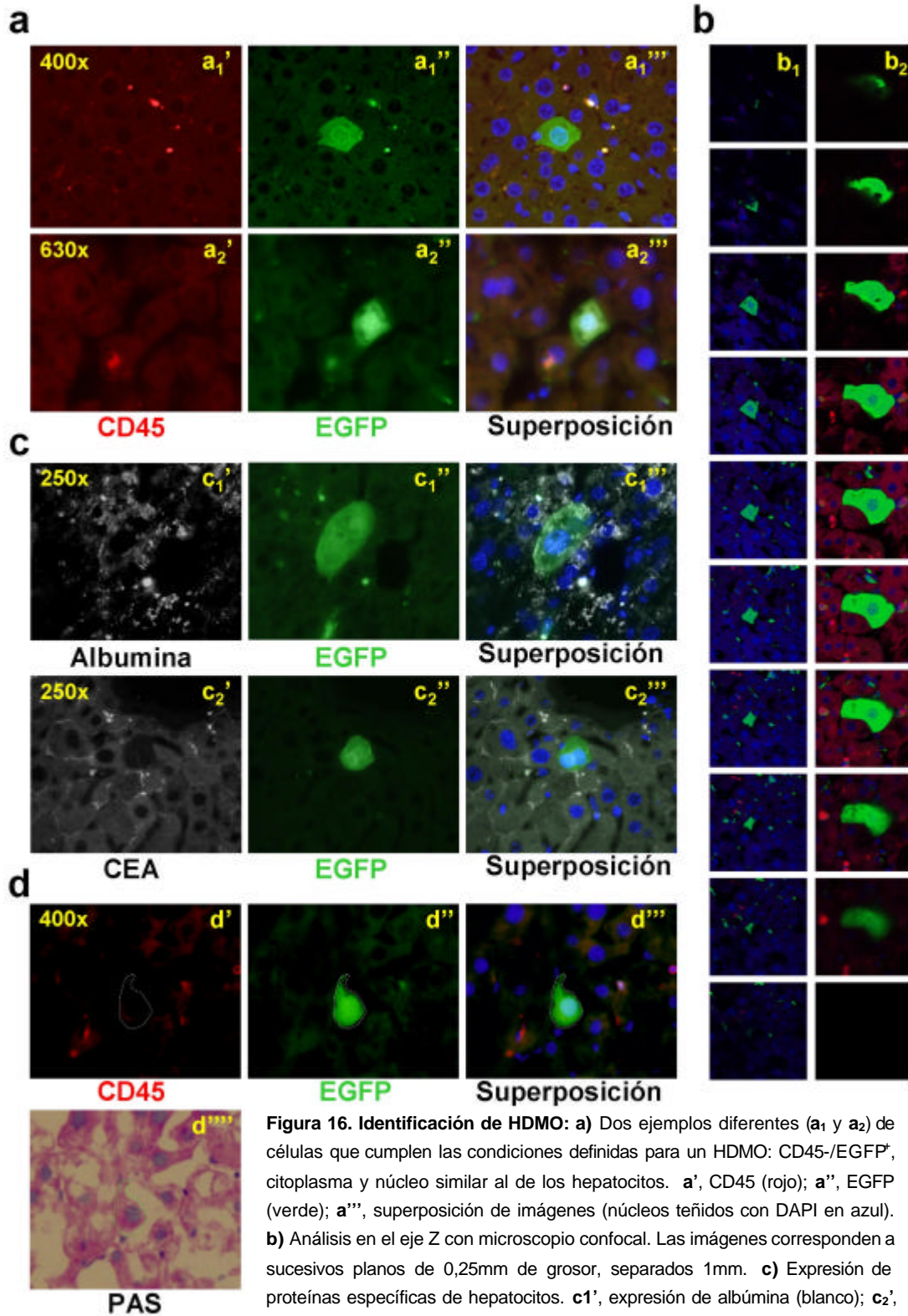


Figura 16. Identificación de HDMO: **a)** Dos ejemplos diferentes (a_1 y a_2) de células que cumplen las condiciones definidas para un HDMO: CD45-/EGFP, citoplasma y núcleo similar al de los hepatocitos. a' , CD45 (rojo); a'' , EGFP (verde); a''' , superposición de imágenes (núcleos teñidos con DAPI en azul). **b)** Análisis en el eje Z con microscopio confocal. Las imágenes corresponden a sucesivos planos de 0,25mm de grosor, separados 1mm. **c)** Expresión de proteínas específicas de hepatocitos. c_1' , expresión de albúmina (blanco); c_2' , expresión de CEA (blanco); c_2'' , EGFP (verde); c_2''' , superposición de imágenes con tinción del DAPI (azul). **d)** Tinción PAS

2.3. Modulación de la presencia de HDMO en hígado con daño hepático por CCl₄, mediante la movilización con G-CSF.

Después de demostrar la existencia de HDMO, se evaluó el efecto del tratamiento con G-CSF sobre la frecuencia de aparición de éstos. Se cuantificó la presencia de HDMO en los grupos de ratones que habían sido dañados con CCl₄ y movilizados con G-CSF durante diferentes periodos de tiempo, desde 0 a 3 semanas (figura 17). Se utilizó un análisis de inmunofluorescencia para identificar la expresión de EGFP y CD45 en secciones hepáticas de distintos lóbulos hepáticos de cada ratón. Se revisó un número aproximado de 100.000 hepatocitos por cada animal. Se identificó sólo 1 HDMO por cada 250.000 hepatocitos totales en el grupo de ratones con daño hepático inducido por CCl₄ y no movilizados (n=6). En el grupo de ratones que, además de daño hepático habían sido movilizados con un único ciclo de G-CSF (n=3), la frecuencia de HDMO aumento 1,50 veces. Con daño y dos ciclos de G-CSF (n=4) se incrementó significativamente (p<0,01) hasta 7,00 veces (0,28±0,03 HDMO por cada 1x10⁴ hepatocitos). Por último, hasta 17,25 veces con tres ciclos de G-CSF en ratones dañados (n=5), en los que se identificaron 0,693±0,045 HDMO por cada 1x10⁴ hepatocitos, siendo una diferencia muy significativa con respecto al grupo sin movilizar (p<0,01). Se comprobó que existía una relación directa entre el número de semanas de movilización con G-CSF y el incremento en la frecuencia de HDMO en los ratones con daño hepático.

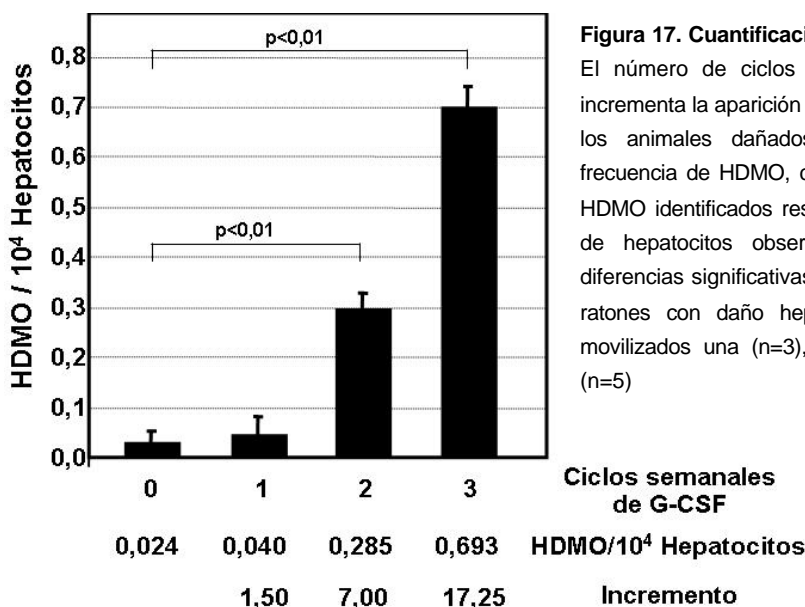


Figura 17. Cuantificación de la frecuencia HDMO: El número de ciclos de movilización con GCSF, incrementa la aparición de los HDMO en el hígado de los animales dañados con CCl₄. Se indica la frecuencia de HDMO, calculada como el número de HDMO identificados respecto al número aproximado de hepatocitos observados. Se representan las diferencias significativas (p<0,01) entre los grupos de ratones con daño hepático sin movilizar (n=6) o movilizados una (n=3), dos (n=4) o tres semanas (n=5)

2.4. Efecto de la concentración de CCl₄ y de la combinación de G-CSF/TPO.

Para tratar de incrementar la presencia de HDMO, se modificó el protocolo de daño hepático y también el tipo de movilización de las células de la MO.

Debido a que se requiere la existencia de daño hepático previo para detectar fenómenos de plasticidad, se intentó producir un mayor daño hepático aumentando la concentración de CCl₄ por encima del 10%. Se establecieron tres grupos de animales según la concentración de CCl₄ empleada, que fueron tratados durante un mes. Se administró sólo PBS o 1ml de CCl₄/Kg peso corporal

(disolución 10% de CCl₄ en aceite de oliva), o con 2ml de CCl₄/Kg peso corporal (disolución 20% de CCl₄ en aceite de oliva).

Al finalizar el periodo de daño hepático, se efectuó la movilización hematopoyética, empleando un tratamiento combinado de G-CSF con TPO (Grossmann et al., 1996), el cual presenta un efecto sinérgico, incrementando la recuperación de los distintos linajes hematopoyéticos después de un tratamiento mieloablativo. Un día antes de concluir el periodo de daño hepático, los progenitores hematopoyéticos fueron movilizados, con el protocolo anteriormente utilizado de tres dosis semanales de 50µg/animal de G-CSF o un protocolo alternativo de 50µg/animal de G-CSF combinado con 0,3µg/animal de TPO, en tres dosis semanales. Los animales se sacrificaron una semana más tarde de la tercera dosis de factores de crecimiento.

2.4.1. Efecto de la concentración de CCl₄.

Como se ha descrito anteriormente, el tratamiento con 10% de CCl₄ provoca un daño hepático caracterizado por una anisonucleosis en los hepatocitos y un tamaño poco homogéneo, existiendo zonas de regeneración donde están los hepatocitos de un tamaño menor. También existen zonas necróticas, y sobre todo, mayor presencia de células hematopoyéticas infiltradas en el parénquima hepático. Tal como se puede apreciar en la figura 18a, estas características también estaban presentes en el grupo de ratones tratados con 20% de CCl₄. Cuando se evaluó el porcentaje de infiltración hematopoyética (figura 18b), cuantificada por el total de células CD45⁺ en el total de células presentes en el parénquima hepático, el daño hepático con ambas dosis de CCl₄ produjo un incremento de las células hematopoyéticas infiltradas, pero no se apreció una mayor presencia en el grupo tratado con 20% de CCl₄.

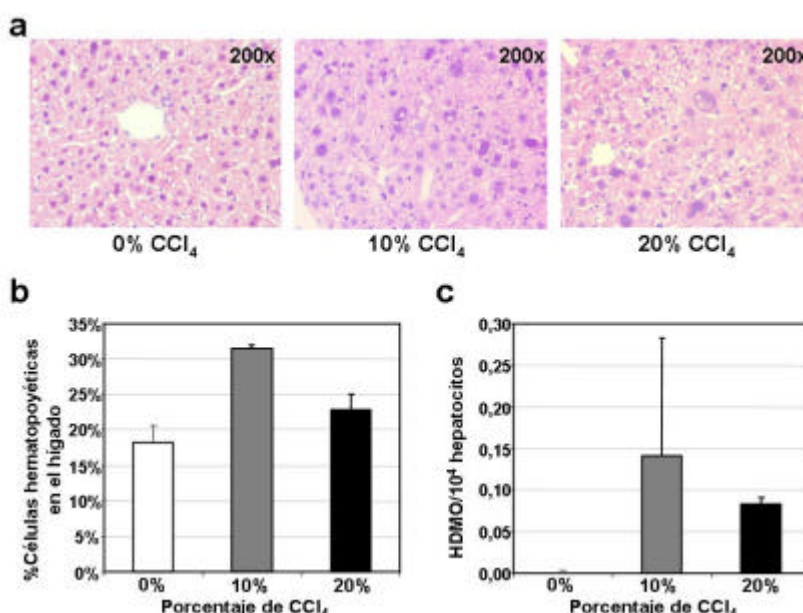


Figura 18. Efecto de la concentración de CCl₄: a) Microfotografías de secciones hepáticas teñidas con hematoxilina y eosina, de animales tratados durante un mes con PBS o con 10% o 20% de CCl₄. Se sacrificaron un mes más tarde de concluir este tratamiento. b) Cuantificación de la presencia de células hematopoyéticas, mediante su identificación por inmunofluorescencia (CD45⁺) en secciones hepáticas de los ratones tratados con las diferentes concentraciones de CCl₄. c) Frecuencia de aparición de HDMO, identificados por inmunofluorescencia (EGFP⁺/CD45/Morfología de hepatocito), en las distintas condiciones de daño hepático inducido por CCl₄.

Se calculó la incidencia que presentaban los HDMO en los animales sin daño, o los que habían sido tratados con 10% o 20% CCl₄ (figura 18c), observándose que no existían diferencias significativas entre los dos grupos con daño hepático. Para el grupo tratado con 10% de CCl₄ la frecuencia fue de 0,14±0,14 HDMO por cada 1x10⁴ hepatocitos, y para el de 20% de 0,08±0,01 HDMO por cada 1x10⁴ hepatocitos, demostrándose que un aumento en la concentración de CCl₄ no favorecía una mayor presencia de HDMO.

2.4.2. Comparación entre la movilización con G-CSF y con G-CSF/TPO.

Para estudiar el efecto de los distintos protocolos de movilización, se contabilizó el número de leucocitos totales en SP (tabla 3). Al igual que se había observado con la movilización, se consigue incrementar los valores de células hematopoyéticas en SP, apreciándose mejor en aquellos grupos de animales con daño hepático. Los niveles de leucocitos en SP de los animales con daño hepático pasaron de $9,07 \times 10^6 \pm 0,29 \times 10^6$ (n=3) leucocitos totales por mililitro de SP, a $11,49 \times 10^6 \pm 0,66 \times 10^6$ leucocitos totales/mL (n=4) o $11,31 \times 10^6 \pm 1,11 \times 10^6$ leucocitos totales/mL (n=4) en los grupos movilizados con G-CSF o con G-CSF/TPO respectivamente, no observándose diferencia significativa entre los valores de ambos grupos. También se apreció una tendencia al incremento en el número de plaquetas en los grupos movilizados, siendo $431,2 \times 10^6 \pm 43,0 \times 10^6$ (n=3) plaquetas por mililitro de SP en los animales dañados que no se movilizaron, con respecto a $633,4 \times 10^6 \pm 71,4 \times 10^6$ plaquetas/mL (n=4) en los movilizados con G-CSF sólo y $673,5 \times 10^6 \pm 87,1 \times 10^6$ plaquetas/mL (n=4) cuando habían recibido G-CSF/TPO (tabla 3), aunque no se observaron diferencias entre los dos protocolos de movilización. Los valores de los eritrocitos en SP no sufrieron variaciones entre los diferentes grupos de animales dañados no movilizados ($4,50 \times 10^9 \pm 0,17 \times 10^9$ eritrocitos/mL, n=3) o movilizados con G-CSF ($4,23 \times 10^9 \pm 0,11 \times 10^9$ eritrocitos/mL, n=4) o G-CSF/TPO ($4,35 \times 10^9 \pm 0,43 \times 10^9$ eritrocitos/mL, n=4). Estos valores indicaron que, al menos en SP, tanto la movilización con G-CSF/TPO o solo con G-CSF, producían un efecto similar.

Un resultado semejante se obtuvo al cuantificar la infiltración hematopoyética en el hígado. En el grupo de ratones sin daño se observó, que tanto la movilización con G-CSF como la combinación G-CSF/TPO, incrementaban el porcentaje de células hematopoyéticas presentes en el hígado. Como ya se había observado, los animales del grupo con daño hepático partían ya de unos valores de infiltración hematopoyética mayores, que aumentaban al ser movilizados. Se observó que la presencia de células hematopoyéticas en el hígado era similar con la administración de G-CSF/TPO ($29,61 \pm 1,76\%$, n=6) que con sólo G-CSF ($27,21 \pm 1,68\%$, n=5) (figura 19a). La combinación de G-CSF con TPO no incrementaba de manera apreciable la infiltración de células hematopoyéticas en el parénquima hepático.

CCl ₄	G-CSF	TPO	Leucocitos (10 ⁶ /mL)	Plaquetas (10 ⁹ /mL)	Eritrocitos (10 ⁹ /mL)
-	-	-	6,48	573,0±84,0	6,05±1,56
-	+	-	10,42±1,41	744,5±80,5	4,14±0,07
-	+	+	7,92±1,91	599,5±146,5	4,29±0,07
+	-	-	9,07±0,29	431,2±43,0	4,50±0,17
+	+	-	11,49±0,66	633,4±71,4	4,23±0,11
+	+	+	11,31±1,11	673,5±87,1	4,35±0,43

Tabla 3. Cuantificación hematológica del efecto de la movilización con GCSF o GCSF/TPO.

Medidas de distintas poblaciones hematopoyéticas presentes en SP de los ratones con o sin daño hepático, movilizados o no con tres ciclos semanales de 50 µg de G-CSF o 50 µg de G-CSF/ 0,3 µg de TPO por ratón v semana.

Se procedió a cuantificar la presencia de HDMO en secciones hepáticas de ratones sometidos a los diferentes protocolos de movilización. En los ratones dañados pero no movilizados, la frecuencia de aparición de HDMO fue de $0,11 \pm 0,06$ (n=4) y se incrementó hasta $0,70 \pm 0,28$ (n=5) con los tres ciclos de G-CSF. No obstante, apenas sufrió ninguna variación cuando se administró TPO junto con el G-CSF, alcanzándose los $0,75 \pm 0,21$ HDMO por cada 1×10^4 hepatocitos (n=6) (figura 19b).

Como conclusión, la combinación G-CSF/TPO no provoca ningún aumento, ni en la cantidad de células hematopoyéticas infiltradas en el hígado dañado, ni en la frecuencia de aparición de HDMO.

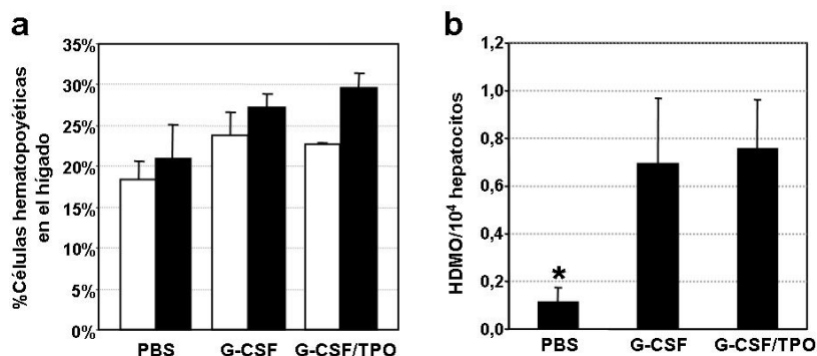


Figura 19. Presencia de células derivadas de MO en hígado debido a la movilización con G-CSF/TPO: a) Cuantificación de las células hematopoyéticas presentes en el hígado de ratones no movilizados, o movilizados con 3 ciclos semanales de G-CSF o G-CSF/TPO. Los animales fueron dañados con CCl₄ (■) o no dañados (□) **b)** Cuantificación de la presencia de HDMO en ratones con daño hepático inducido por CCl₄, y posterior movilización con G-CSF o G-CSF/TPO o sin movilizar. (*, p<0,05)

3. POBLACIÓN DE CÉLULAS DE MO RESPONSABLE DEL PROCESO DE PLASTICIDAD.

Se ha descrito que, los fenómenos de plasticidad observados en hígado pueden provenir de diversas fuentes de células presentes en MO, como pueden ser células hematopoyéticas, células mesenquimales, células progenitoras adultas multipotentes (*Multipotent Adult Progenitor Cells*, MAPC) o a partir de células madre de otros tejidos residentes en MO.

Para determinar si el origen de los HDMO era hematopoyético, se realizó un trasplante altamente enriquecido en CMHs procedentes de ratones transgénicos para la expresión de EGFP, por lo que sólo las células derivadas del trasplante de CMHs, serían positivas para la expresión de EGFP.

3.1. Plasticidad derivada de la población LSK.

Para realizar el trasplante, se purificó una población enriquecida en CMHs, definida por el grupo del Dr. Weissman en 1988 (Spangrude et al., 1988). $5,6 \times 10^4$ células procedentes de ratones macho y transgénicos para EGFP que habían sido purificadas según el fenotipo LSK EGFP⁺; se trasplantaron en ratones hembra B6D2F1 letalmente irradiados. Un mes después del trasplante de CMHs, presentaban una reconstitución hematopoyética completa, tanto en linaje linfoide, como mieloides (tabla 4), garantizando que la población trasplantada poseía capacidad para reconstituir los diferentes linajes hematopoyéticos. Además, el 86,81±1,51% de las células de SP expresaban EGFP (figura 20). Esta expresión se identificaba también en las distintas poblaciones hematopoyéticas analizadas (figura 20): el 45,03±3,86% de CD3⁺, 88,31±1,06% de B220⁺, 90,71±2,62% de Gr-1⁺ y 84,16±4,40% de Mac-1⁺ expresaban el marcador EGFP⁺. Hay que indicar que existe una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el porcentaje de células CD3⁺/EGFP⁺ y el resto de células EGFP⁺ del resto de poblaciones.

Ratón	%CD3	%B220	%Gr-1	%Mac-1
1	9,87	36,18	43,82	51,21
2	3,59	6,06	85,99	80,93
3	13,94	19,53	60,52	42,40
4	14,08	22,40	51,96	34,13
5	6,77	28,75	49,76	42,38
Media	9,65±2,04	22,58±5,03	58,41±7,40	50,21±8,14

Tabla 4. Repoblación multilínea:

Porcentaje de los distintos linajes hematopoyéticos de ratones B6D2F1 letalmente irradiados y trasplantados con una población de células LSK EGFP⁺ de MO de ratones BDGF1. CD3, linfocitos T; B220, linfocitos B; células mieloides (Gr-1⁺ y Mac-1⁺).

Tres meses después de haber sido realizado el trasplante de la población enriquecida en CMHs, y de reconstituirse la hematopoyesis de los animales, un grupo de tres animales fue tratado con CCl₄ durante diez semanas. Como en anteriores experimentos, el día antes de la última inyección del compuesto hepatotóxico se comenzó con la movilización hematopoyética, mediante tres ciclos semanales de G-CSF, sacrificándose una semana después del último ciclo de movilización.

Cuando se analizó la presencia de células derivadas de MO en cortes de hígado, se observó que existía infiltración hematopoyética de 27,25±3,09% (n=3). Estas células hematopoyéticas, cuantificadas por su expresión de CD45, en su mayoría también eran positivas para EGFP, por lo que derivaban de las CMHs LSK EGFP⁺.

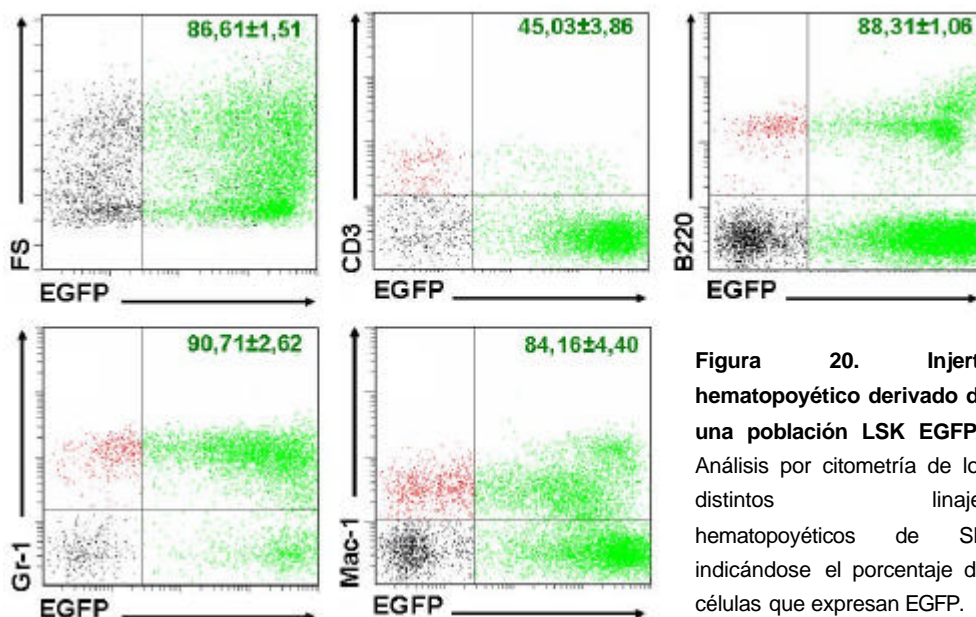


Figura 20. Injerto hematopoyético derivado de una población LSK EGFP⁺. Análisis por citometría de los distintos linajes hematopoyéticos de SP, indicándose el porcentaje de células que expresan EGFP.

En estos ratones trasplantados con CMHs LSK EGFP⁺ se identificaron HDMO, con una frecuencia de 0,26±0,01 HDMO por cada 1x10⁴ hepatocitos (n=3). Este valor no presenta diferencia significativa con la frecuencia de HDMO observada en ratones trasplantados con una población de MO total (0,46±0,17 HDMO por cada 1x10⁴ hepatocitos, n=4) (figura 21).

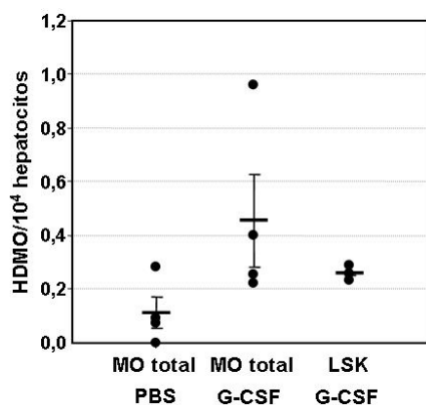


Figura 21. HDMO derivadas de una población LSK EGFP⁺. Frecuencia de HDMO de ratones cuya hematopoyesis ha sido reconstituida a partir del trasplante de MO total o de una población LSK, todos ellos con daño hepático inducido por CCl₄, con o sin movilizar.

3.2. Implicación directa de células madre en los procesos de plasticidad.

La siguiente cuestión planteada fue definir si los HDMO se podrían originar directamente a partir de las células madre infundidas en el trasplante, o si era necesario su injerto previo para originar HDMO.

Para conocer la participación directa de CMHs o de otra célula primitiva presente en MO en la generación de HDMO, se desarrolló un modelo de daño hepático mediado por la administración de CCl₄ y el trasplante de células hematopoyéticas, basado en el descrito por S. Terai y colaboradores (Terai et al., 2003). Estos autores describían que, si se realizaba un daño hepático con dos inyecciones semanales de CCl₄ durante un mes y el trasplante, de 1x10⁵ células de MO procedentes de ratones transgénicos para la EGFP, sin realizar ningún protocolo de mieloablación a los ratones receptores, la repoblación de células EGFP⁺ en el hígado era del 25% al mes de su trasplante, y además estas

habían sido capaces de transdiferenciarse hacia hepatocitos. Nuestro modelo consistió en inyecciones intraperitoneales semanales con CCl_4 (n=6) o PBS (n=3) durante seis semanas, después de las cuales se trasplantó $1,7 \times 10^5$ células enriquecidas en CMHs según su patrón de expresión $\text{Lin}^-/\text{Sca-1}^+/\text{EGFP}^+$ (lo que suponía un enriquecimiento en CMHs de más de cien veces respecto a una población de células totales de MO). Se prosiguió el daño hepático con dos inyecciones semanales de CCl_4 durante otras dos semanas y se sacrificaron y analizaron los animales una semana después (figura 22).

Se analizó mediante inmunofluorescencia la expresión del marcador hematopoyético CD45 y de la expresión de EGFP en secciones hepáticas de todos los animales, alcanzándose un número aproximado de entre 1×10^6 a $1,5 \times 10^6$ hepatocitos analizados. Aunque el porcentaje de células CD45^+

eran similares a lo obtenido en otros experimentos, no se consiguió identificar ni una sola célula $\text{EGFP}^+/\text{CD45}^+$.

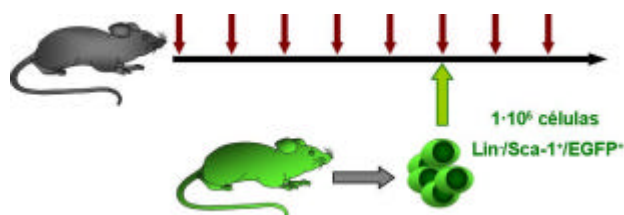


Figura 22. Protocolo de contribución directa de CMH. Para determinar la contribución directa a la formación de HDMO de una población enriquecida en CMH, se trató a ratones B6D2F1 durante 6 semanas con dosis intraperitoneales de CCl_4 (flechas rojas). A la sexta semana de daño hepático, se trasplantaron con 1×10^5 células $\text{Lin}^-/\text{Sca-1}^+/\text{EGFP}^+$ (flecha verde), procedentes de ratones B6DGF1. Se continuó el daño hepático durante dos semanas más, después de las cuales se sacrificaron los animales. Se analizó la presencia de células EGFP^+ en secciones hepáticas.

La infusión de una población altamente enriquecida en células madre y progenitores, falló en producir procesos de plasticidad, al no poder identificar ningún hepatocito EGFP^+ . Por lo tanto, en nuestro diseño experimental, células madre o progenitores no son capaces de generar HDMO sin que hayan injertado previamente y generado una hematopoyesis previa en los ratones.

4. MECANISMO RESPONSABLE DE LA APARICIÓN DE HDMO.

Una vez determinado el origen hematopoyético de los HDMO, pasamos a estudiar el mecanismo por el que éstos se generaban. Se han propuesto una serie de mecanismos por los que células de la MO son capaces de originar hepatocitos funcionales; los más destacados son: i) un proceso de transdiferenciación, en el que células hematopoyéticas perderían su compromiso al linaje hematopoyético, convirtiéndose en hepatocitos funcionales (Theise et al., 2000b; Korbling et al., 2002; Ishikawa et al., 2003; Terai et al., 2003); ii) fusión celular, donde una célula hematopoyética se fusionaría con un hepatocito endógeno, silenciándose el programa hematopoyético (Alvarez-Dolado et al., 2003; Vassilopoulos et al., 2003; Wang et al., 2003c; Camargo et al., 2004; Willenbring et al., 2004).

4.1. Implicación de la transdiferenciación o de la fusión celular en la generación de HDMO.

Para poder distinguir entre ambos posibles mecanismos, se realizó el mismo protocolo de análisis utilizando ahora donadores hembra y receptores macho (figura 23a). Así, si se identificaba un hepatocito EGFP⁺, originado por un mecanismo de transdiferenciación, la célula tendría dotación cromosómica de hembra y nunca poseería el Cr-Y. Sin embargo, si ese hepatocito EGFP⁺ presentase también el Cr-Y, indicaría que una célula hematopoyética EGFP⁺ procedente del donador hembra se habría fusionado con un hepatocito endógeno del receptor macho.

Se realizó un trasplante de 1×10^7 células procedentes de ratones hembra BDGF1, expresando constitutivamente la EGFP, en ratones macho P3D2F1 que habían recibido un acondicionamiento mieloablatoivo, consiguiéndose una repoblación hematopoyética de células EGFP⁺ del 89,1±0,9%. Una vez establecida la hematopoyesis a partir de las células exógenas, se les sometió a daño hepático seguido de movilización. Tras el sacrificio de los animales, se analizó la presencia del Cr-Y en HDMO. Para ello se desarrolló un protocolo para la combinación de técnicas de inmunofluorescencia, Y-FISH e inmunohistoquímica en secciones de hígado de ratones dañados con CCl₄ y movilizados durante tres semanas con G-CSF (n=6; analizados 2 secciones de dos lóbulos hepáticos diferentes por cada ratón).

Se detectó que el 74±7% de los HDMO encontrados en los ratones quiméricos (donador MO Cr-Y⁻/EGFP⁺, receptor MO Cr-Y⁺/EGFP⁻) eran simultáneamente Cr-Y⁺ y EGFP⁺, es decir los HDMO poseían el Cr-Y de un hepatocito endógeno y la expresión de EGFP de una célula hematopoyética (figura 23b). Para garantizar aún más la naturaleza hepática de estos HDMO (EGFP⁺/Cr-Y⁺), se identificó la expresión de citoqueratinas específicas (figura 23b₂ recuadro). Además, la mayoría de ellos poseía dos núcleos: uno grande, redondeado, con muchos nucleolos, característico del núcleo de un hepatocito, que era positivo para el Cr-Y; y el otro más pequeño y compacto, que era Cr-Y negativo. Ninguna señal de Cr-Y fue detectada en ninguno de los núcleos de las células hematopoyéticas infiltradas. Además cuando se analizó la sensibilidad de la técnica, se comprobó que se podía detectar de detectar el Cr-Y en el 81±4% de los hepatocitos de ratones macho (n=4). Al no existir diferencias significativas entre la resolución de la técnica (IF+FISH) y el porcentaje de HDMO que poseían el Cr-Y, podíamos asumir que los HDMO que éramos capaces de identificar fueron originados a través de un proceso de fusión celular. Es interesante indicar que a pesar de que se ha identificado fusión entre los citoplasmas, no parece que se produzca fusión entre núcleos. Finalmente, nuestros datos sugieren que

la aparición de HDMO inducido por el daño con CCl_4 e intensificado con la movilización con G-CSF, se debió principalmente a fenómenos de fusión entre células hematopoyéticas y hepatocitos.

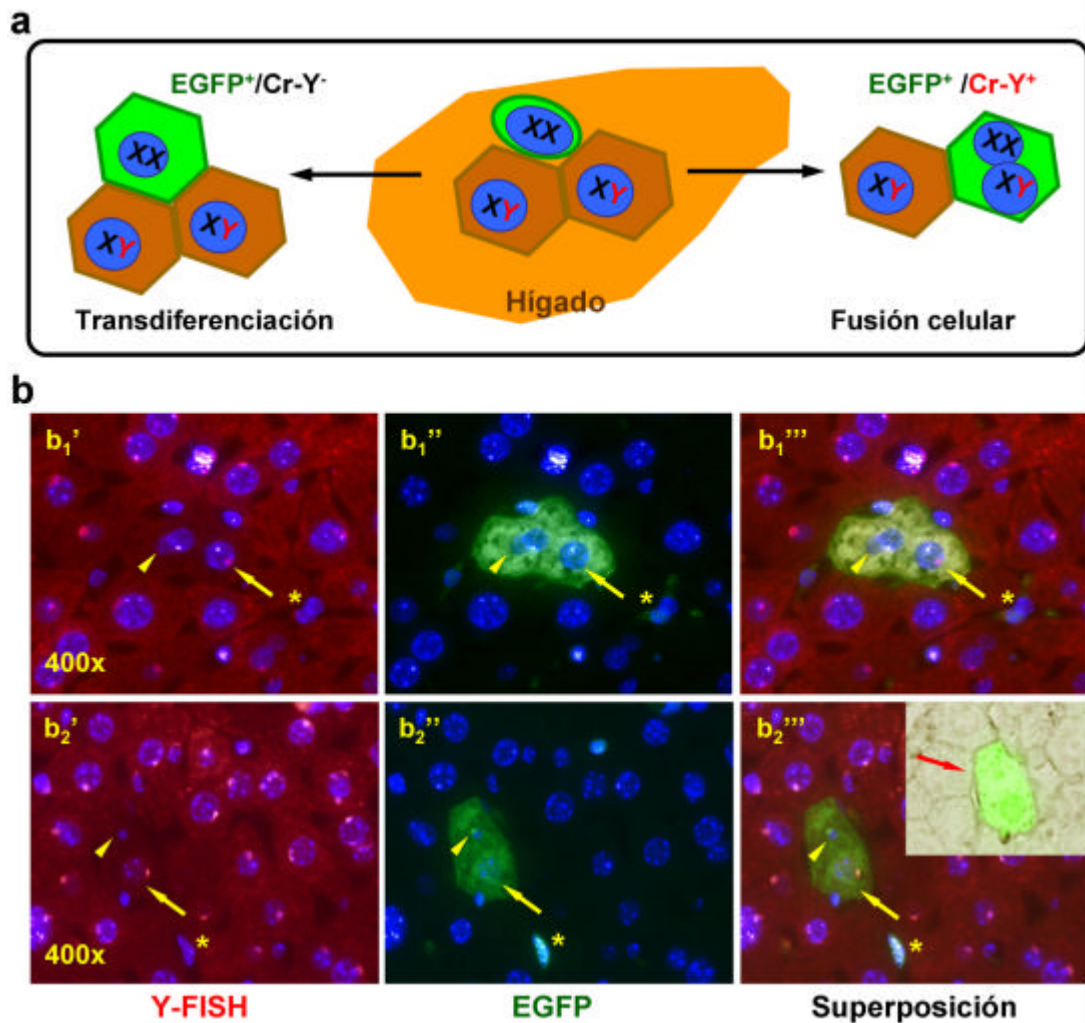


Figura 23. HDMO se originan mediante fusión celular. a) Diagrama mostrando como, gracias al trasplante de células EGFP⁺ procedentes de ratones BDGF1 hembras en ratones P3D2F1 macho, es posible identificar si el mecanismo de aparición de los HDMO transcurre mediante un proceso de transdiferenciación de células hematopoyéticas a hepatocitos, o por el contrario, es mediante un proceso de fusión celular entre células hematopoyéticas y hepatocitos endógenos. b) Dos diferentes ejemplos de HDMO con el Cr-Y y expresando EGFP (b₁' y b₂'); b', hibridación *in situ* fluorescente para el Cr-Y (rojo); b'', expresión de la EGFP (verde); b''', superposición de imágenes mostrando la presencia del Cr-Y en HDMO binucleados. Núcleo típico de hepatocito con el Cr-Y (flecha amarilla), núcleo más pequeño sin el Cr-Y (punta de flecha amarilla); núcleo de una célula hematopoyética sin Cr-Y (asterisco amarillo). Recuadro b₂''', Marcaje mediante inmunohistoquímica, identificando la distribución típica de citoqueratinas hepáticas en un HDMO (flecha roja).

La importancia biológica del proceso de fusión celular es notable. El hecho de que dos células sean capaces de fundirse en una sola para que finalmente predomine el fenotipo de una de ellas, abre importantes interrogantes sobre la estabilidad de estas células resultantes, así mismo sobre su capacidad de reprogramación y su aplicación como posibles terapias.

4.2. Mecanismo de la fusión celular *in vivo*.

Como hemos indicado, se había descrito que la fusión celular entre células hematopoyéticas, pertenecientes a la serie mielomonocíticas (Camargo et al., 2004), y hepatocitos endógenos, es la causante de la aparición de HDMO. Quisimos conocer la implicación de células mielomonocíticas en el proceso de plasticidad observado por nosotros, y más concretamente de los monocitos/macrófagos, cuyo número aumentaba en los animales dañados con CCl_4 y movilizados con G-CSF (figura 15). Para ello decidimos inhibir uno de los procesos de mayor importancia que desarrollan los monocitos/macrófagos, como es la fagocitosis, y utilizamos un inhibidor de la ruta fagocítica, como es el NH_4Cl , que impide la unión entre el endosoma y el lisosoma en el proceso de fagocitosis (Hart et al., 1983; Hart and Young, 1991). Recurriendo de nuevo a ratones quiméricos hembras P3D2F1, un grupo de animales fue sometido a un proceso de daño hepático, consistente en inyecciones semanales intraperitoneales de CCl_4 durante un periodo de cuatro semanas y simultáneamente a la mitad de estos animales se les administró tres ciclos semanales de G-CSF. A un segundo grupo de animales no se les dañó, pero sí se movilizó con tres ciclos de G-CSF. Finalmente, cinco días después del final del daño, se inyectó NH_4Cl a la mitad de los ratones de los diferentes grupos, y dos días más tarde fueron sacrificados y analizados (figura 24a).

Mediante análisis de inmunofluorescencia identificando las células CD45^+ y EGFP^+ , se determinó la infiltración hematopoyética presente en el hígado en los diferentes grupos de ratones. Se observó una fuerte presencia (más del 50%) de células hematopoyéticas presentes en el hígado (figura 24b y 24c). En anteriores experimentos se había alcanzado una infiltración hematopoyética en el hígado de algo más del 30%. Esta diferencia podría deberse a que analizamos el estado del hígado tan sólo una semana después del último tratamiento con CCl_4 . En cambio, en anteriores ocasiones, el momento del análisis fue un mes después del proceso de daño hepático, habiéndose reducido considerablemente la presencia de células hematopoyéticas en el hígado. Cuando se cuantificó la presencia de células hematopoyéticas en el hígado de los cuatro grupos de animales (figura 24c), apenas se apreció variación del porcentaje. En el grupo que se administró NH_4Cl la infiltración hematopoyética sufrió un leve incremento de hasta $59,66 \pm 1,83\%$, observándose una mayor presencia de células mielomonocíticas, fácilmente distinguibles por su morfología. El tratamiento con NH_4Cl no aumentó por lo tanto el porcentaje de infiltración hematopoyética en el hígado de los animales con daño hepático o sin él.

En todos los ratones de los diferentes grupos se identificó la presencia de HDMO, siguiendo los parámetros descritos previamente de fenotipo $\text{EGFP}^+/\text{CD45}^-$ y morfología hepática (figura 24d). Se observaron grandes diferencias en el número de HDMO identificados en cada grupo. La frecuencia de aparición en los ratones que sólo habían sido dañados fue la esperada, de $0,17 \pm 0,03$ HDMO por cada 1×10^4 hepatocitos (figura 24e), pero cuando además se le administró NH_4Cl , la frecuencia de HDMO se incrementó 4,6 veces ($0,81$ HDMO/ 1×10^4 hepatocitos). Comparando el efecto de la movilización conjuntamente con el daño hepático, se consiguió $1,23 \pm 0,20$ HDMO/ 1×10^4 hepatocitos, lo que se traducía en un aumento significativo ($p < 0,05$) de 7 veces con respecto al grupo tratado sólo con CCl_4 ; pero una mayor frecuencia de HDMO, $1,71 \pm 0,01$ HDMO/ 1×10^4 hepatocitos, se observó en el grupo que, además de ser movilizados junto con el daño, se les administró el inhibidor lisosomal, lo que era 9,7 veces superior al grupo solamente dañado.

Estos datos nos sugirieron que los procesos que intervienen en la función fagocítica del Inaje mielomonocítico, estarían interviniendo en los procesos de fusión celular entre células monomacrofágicas y hepatocitos endógenos.

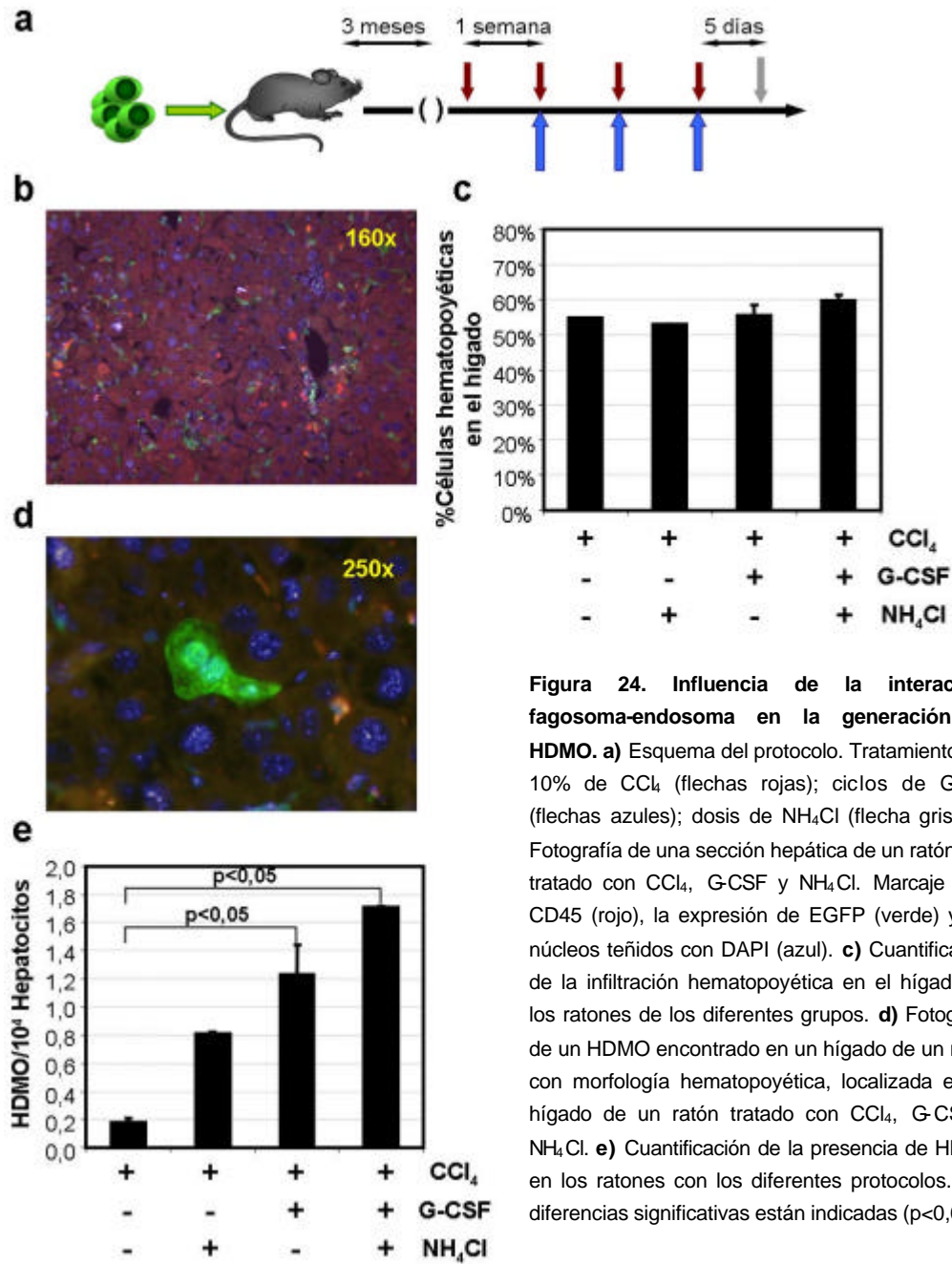


Figura 24. Influencia de la interacción fagosoma-endosoma en la generación de HDMO. **a)** Esquema del protocolo. Tratamiento con 10% de CCl₄ (flechas rojas); ciclos de G-CSF (flechas azules); dosis de NH₄Cl (flecha gris). **b)** Fotografía de una sección hepática de un ratón que tratado con CCl₄, G-CSF y NH₄Cl. Marcaje para CD45 (rojo), la expresión de EGFP (verde) y los núcleos teñidos con DAPI (azul). **c)** Cuantificación de la infiltración hematopoyética en el hígado de los ratones de los diferentes grupos. **d)** Fotografía de un HDMO encontrado en un hígado de un ratón con morfología hematopoyética, localizada en el hígado de un ratón tratado con CCl₄, G-CSF y NH₄Cl. **e)** Cuantificación de la presencia de HDMO en los ratones con los diferentes protocolos. Las diferencias significativas están indicadas ($p < 0,05$).

5. REPROGRAMACIÓN NUCLEAR.

La generación de líneas de células madre embrionarias y animales clonados mediante transferencia de núcleos somáticos, ha demostrado que el citoplasma de un oocito puede reprogramar el núcleo de una célula somática a un estado embrionario (Armstrong et al., 2006). En nuestros experimentos de plasticidad hemos demostrado que, en condiciones de daño, las células hematopoyéticas se fusionan con hepatocitos originando HDMO, los cuales expresan proteínas hepáticas específicas (albúmina, CEA, citoqueratina hepáticas) y dejan de expresar proteínas hematopoyéticas (CD45, F4/80). Para profundizar más en los fenómenos de reprogramación nuclear que tienen lugar en el núcleo hematopoyético de los HDMO, investigamos los cambios que sufrían éstos una vez que se había producido la fusión celular.

5.1. Morfología de los núcleos de los HDMO.

En procesos de formación de heterocariontes *in vitro*, se ha demostrado que el proceso de fusión celular es capaz de reprogramar uno de los núcleos de las células fusionadas, silenciando su programa de expresión para activar un programa de expresión similar al del núcleo dominante (Cowan et al., 2005; Terranova et al., 2006). A este proceso se le denomina reprogramación nuclear, y ocurre también en los procesos de transferencia nuclear (Armstrong et al., 2006).

Terranova y colaboradores, describen como durante la fusión entre células musculares y linfocitos B, se produce la reprogramación de los núcleos de los linfocitos B desde un programa de expresión hematopoyético a uno específico de células musculares, acompañado con un cambio de morfología de estos núcleos, asemejándose a los de las células musculares. El proceso de reprogramación de los núcleos de los linfocitos B transcurriría en dos etapas: la primera, de silenciamiento del programa de expresión hematopoyético y la segunda de activación del programa muscular; esto se produce gracias a modificaciones epigenéticas, como deacetilaciones en el caso de la inactivación de genes hematopoyéticos (Terranova et al., 2006). Quisimos conocer si en el proceso de fusión celular observado por nosotros, los núcleos de las células hematopoyéticas fusionadas en los HDMO, sufrían un proceso similar. Para ello nos basamos en el hecho de que la intensidad de fluorescencia de un núcleo teñido con DAPI depende, no sólo de la cantidad de ADN, sino también de la estructura de su cromatina. Las regiones donde la cromatina está muy compactada, corresponden a zonas donde los genes están inactivos. El DAPI se une al ADN preferentemente en regiones accesibles de la cromatina, como los nucleolos, que son zonas transcripcionalmente muy activas; por el contrario en regiones menos accesibles con genes inactivos, el DAPI dará una señal mucho menor. Podríamos así determinar, según la fluorescencia producida por el DAPI, el grado de activación o de inactivación de un núcleo (Darzynkiewicz et al., 1984; Myc et al., 1992; Mascetti et al., 2001).

Los HDMO poseían un número variable de núcleos, desde 1 hasta incluso 4; estos núcleos teñidos con DAPI presentaban un aspecto claramente distinguible (figura 25). Se establecieron tres grupos de núcleos diferentes, según su tamaño y el patrón de tinción que originaba el DAPI:

Tipo I: núcleos grandes con morfología de núcleo hepático, forma esférica y con numerosos nucleolos brillantes, identificados por una fluorescencia del DAPI brillante.

Tipo II: núcleos de tamaño mediano, morfología esférica, distribución de la cromatina homogénea, DAPI muy poco intenso en la mayor parte del núcleo, y con muy pocos nucleolos.

Tipo III: núcleos pequeños con morfología de núcleo de célula hematopoyética, distribución de la cromatina homogénea, con una señal intensa debida al DAPI, y pocos nucleolos.

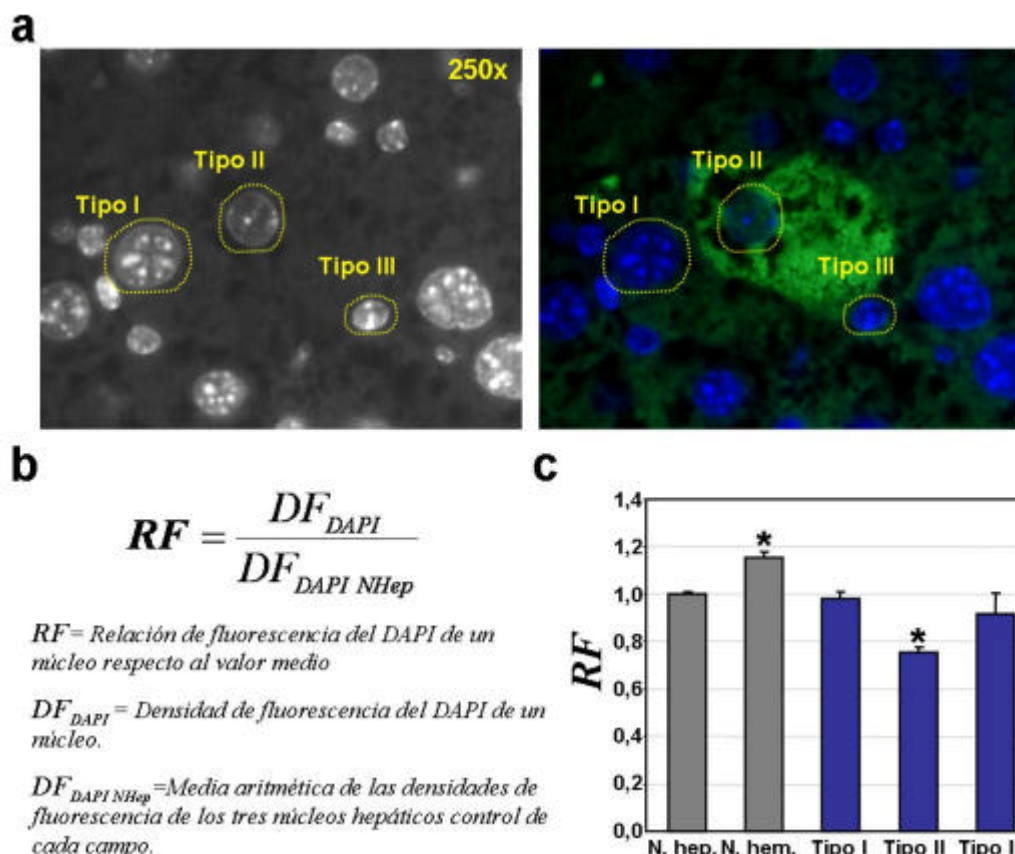


Figura 25. Morfología de los núcleos de HDMO: **a)** Fotografías de secciones hepáticas teñidas DAPI (izquierda), donde se indican tres ejemplos de los tres tipos de núcleos definidos: núcleo tipo I, núcleo tipo II y núcleo tipo III. Las zonas con una mayor fluorescencia corresponden a los nucleolos. Colocalización del marcaje con DAPI y la expresión de la EGFP (derecha). **b)** Fórmula matemática utilizada para el cálculo de RF. **c)** Cuantificación de los valores de RF de los distintos tipos de núcleos: núcleo de células hepáticas, núcleos hematopoyéticos y núcleos de los HDMO (tipo I, II y III). Se representan las diferencias significativas ($p < 0,05$, *).

Se localizaron 57 núcleos en un grupo de 35 HDMO (tabla 5), identificados en 21 secciones hepáticas de 7 animales distintos; 29 de estos núcleos (50,88% del total de núcleos de HDMO) se clasificaron como tipo I, 17 (29,82%) correspondían a núcleos tipo II y 11 (19,30%) eran núcleos tipo III.

Los núcleos de los HDMO tipo I y III presentaban una tinción con DAPI similar al de los núcleos de los hepatocitos endógenos o a los núcleos de células hematopoyéticas respectivamente, lo que indicaba que su nivel de condensación era similar; por el contrario la señal del DAPI de los núcleos tipo II era mucho menor tanto en los núcleos hepáticos como en los hematopoyéticos, indicándonos que su cromatina estaba mucho más condensada y que poseían muchos menos genes activos.

Para determinar la procedencia celular de los diferentes núcleos de los HDMO, se analizó por Y-CISH la presencia o no del Cr-Y. Mientras que los hepatocitos endógenos carecían de Cr-Y, al ser hembras los animales receptores, las células hematopoyéticas sí que poseían el Cr-Y en sus núcleos.

Siete HDMO fueron analizados por Y-CISH, identificándose en ellos un total de 15 núcleos de distintas morfologías (7 del tipo I, 6 del tipo II y 2 del tipo III); 6 núcleos del tipo I eran Y-Cr̄, indicándonos su presencia en los HDMO antes del proceso de fusión celular; por el contrario el resto de todos los núcleos, incluido un núcleo tipo I, sí que eran positivos para el Cr-Y, indicándonos que procedían de las células hematopoyéticas que se habían fusionado (figuras 26a y 27a).

Se quiso cuantificar el grado de condensación de los núcleos mediante el cálculo de sus densidades de fluorescencia emitidas por el DAPI (DF_{DAPI}), para lo que se utilizó el programa informático *Image Tool 3.00*. Se calculó DF_{DAPI} de cada núcleo de los diferentes HDMO, y de los núcleos de tres hepatocitos y de los núcleos de tres células hematopoyéticas en la misma imagen en la que estaba cada HDMO. Con los valores obtenidos, se calculó la relación de fluorescencia (RF) entre el valor de DF_{DAPI} de los diferentes núcleos (núcleos del HDMO, núcleos de las células hematopoyéticas control y núcleos de los tres hepatocitos control) respecto al valor medio de DF_{DAPI} de los tres núcleos de hepatocitos control que existía en cada campo donde se había localizado un HDMO (figura 25b). De las distintas imágenes donde existían HDMO se obtuvieron distintos valores constantes de RF para los núcleos de los hepatocitos, núcleos de las células hematopoyéticas y para los núcleos de los HDMO, tanto del tipo I, II o III. Si el valor de RF era mayor a 1, indicaba que existía una mayor densidad de fluorescencia debida al DAPI en un determinado núcleo respecto a sus núcleos controles hepáticos, y por lo tanto su cromatina estaba menos condensada y más activos sus genes; por el contrario si el RF era menor a 1, su DF era menor que la de los núcleos control al ser su cromatina más inaccesible al DAPI, indicando que estaba en un estado más inactivo. El valor de RF para los núcleos de los hepatocitos ($RF_{\text{N Hep}}$) fue $1,00 \pm 0,01$ ($n=105$); para los núcleos de las células hematopoyéticas ($RF_{\text{N Hem}}$) su valor de RF fue $1,16 \pm 0,02$ ($n=105$) y era significativamente superior al $RF_{\text{N Hep}}$ ($p < 0,05$). Los valores de RF para los núcleos de los HDMO fueron: $0,982 \pm 0,031$ para los tipo I ($n=29$), $0,75 \pm 0,03$ para los del tipo II ($n=17$) y $0,92 \pm 0,09$ para los del tipo III ($n=11$); sólo el $RF_{\text{tipo II}}$ era significativamente inferior al $RF_{\text{N Hep}}$ ($p < 0,05$), indicándonos que estos núcleos tipo II estaban más condensados y por lo tanto más inactivos (tabla 5 y figura 25c).

En resumen, nuestros datos indicaban que en el momento de la fusión celular, comienza un proceso de reprogramación celular en los núcleos de las células hematopoyéticas, que se manifiesta con un cambio en su morfología y una mayor condensación en su cromatina.

5.2. Pérdida del programa hematopoyético.

Para identificar el silenciamiento de genes hematopoyéticos, se comprobó la desaparición del factor nuclear PU.1, específico de tejido hematopoyético e implicado en el desarrollo y en la actividad tanto mielóide como linfóide, de los núcleos de origen hematopoyéticos presentes en HDMO. Se identificó conjuntamente, mediante técnicas de inmunofluorescencia, la expresión de EGFP y la presencia del factor nuclear hematopoyético PU.1 (figura 26a). De 13 HDMO identificados en las preparaciones en las que se localizaron EGFP y PU.1, tan solo en un núcleo de uno de los HDMO, estaba presente el factor nuclear hematopoyético PU.1. Este núcleo tenía una morfología muy similar a la de los núcleos de las células hematopoyéticas cercanas; en cambio el resto de los 20 núcleos analizados para identificación de PU.1 en los HDMO, carecían de él, al igual que los núcleos del resto de los hepatocitos, indicándonos que el programa hematopoyético se habría silenciado también a nivel de proteínas específicas nucleares.

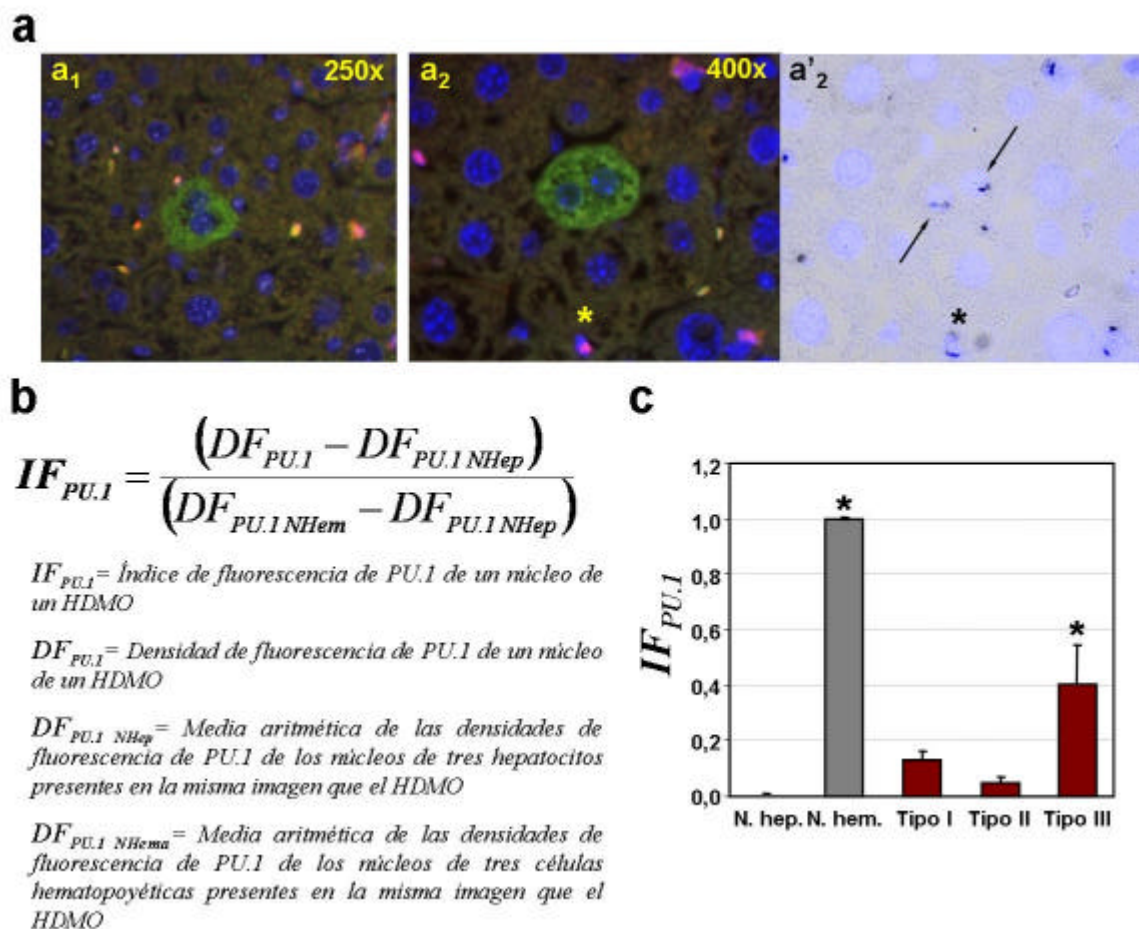


Figura 26. Análisis de la presencia de PU.1 en los núcleos de los HDMO: a) Fotografías de secciones hepáticas teñidas mediante inmunofluorescencia para visualizar: expresión de EGFP (verde), presencia de PU.1 (rojo) y núcleos (DAPI, azul). a₁ y a₂, dos ejemplos de HDMO donde no se detecta la presencia de PU.1 en sus núcleos; núcleo de célula hematopoyética PU.1⁺ (*). a'₂, detección del Cr-Y mediante Y-CISH; presencia de Cr-Y en los dos núcleos del HDMO (flechas negras) y en el núcleo de una célula hematopoyética PU.1⁺ (*). b) Fórmula matemática utilizada para el cálculo de $IF_{PU.1}$. c) Cuantificación de los valores de $IF_{PU.1}$ de los distintos tipos de núcleos: núcleo de células hepáticas, núcleos hematopoyéticos y núcleos de los HDMO (tipo I, II y III). Se representan las diferencias significativas ($p < 0,05$, *).

Se cuantificó la presencia de PU.1 en cada uno de estos núcleos, para lo cual se obtuvieron los valores de densidad de fluorescencia media de cada núcleo (DF), mediante el programa de análisis de imagen *Image Tool 3.00*, a partir de los cuales se definió el índice de fluorescencia (IF). El valor de IF para cada núcleo de un HDMO se calculó teniendo en cuenta los valores medios de DF tanto de los núcleos de los hepatocitos como el de los de las células hematopoyéticas de cada imagen, con lo que dicho valor DF es independiente de las condiciones de marcaje para cada preparación, y de la adquisición de la imagen. El valor de IF de un núcleo correspondía al valor resultante de extrapolar su valor de DF a la ecuación de una recta, definida por los valores de DF de los núcleos de las células controles de cada imagen y cuyos valores de IF de PU.1 ($IF_{PU.1}$), que serían de 1 para los núcleos hematopoyéticos, al ser los controles positivos para la presencia del marcador nuclear hematopoyético, y de 0 para los tres núcleos de hepatocitos por carecer de PU.1 (figura 26b).

Se representó el valor de $IF_{PU.1}$ de los diferentes núcleos (20 núcleos analizados para la expresión de PU.1, en 13 HDMO diferentes) conforme a la clasificación morfológica. Como se ve en la figura 26c, los núcleos localizados en los HDMO tipo III presentan una $IF_{PU.1}$ de $0,40 \pm 0,14$ (n=6), en cambio los tipo I y tipo II, presentan unos valores de $IF_{PU.1}$ significativamente inferiores ($p < 0,05$) de

0,13±0,03 (n=11) y 0,05±0,02 (n=3) respectivamente, muy semejante al valor 0 de los núcleos de los hepatocitos controles.

Con el fin de identificar el proceso de pérdida de factores nucleares hematopoyéticos en los núcleos de las células hematopoyéticas fusionadas, se estudió en los HDMO analizados por Y-CISH, la presencia de PU.1 en los núcleos Cr-Y⁺. De tres HDMO, se identificaron tres núcleos Cr-Y⁺; uno de ellos poseía una morfología tipo III y era positivo para PU.1 (IF_{PU.1}=1,00) indicándonos que tal vez correspondía a un estadio inicial en la fusión celular; los otros dos núcleos Cr-Y⁺ se localizaron en un mismo HDMO (figura 26a₂) y eran ambos del tipo II, con una baja presencia de PU.1 (valores de IF_{PU.1} de 0,02 y 0,09 respectivamente); estos núcleos habían sufrido un cambio en su morfología y en su expresión de marcadores nucleares hematopoyéticos durante el proceso de fusión celular. Los núcleos de los HDMO endógenos (Cr-Y⁻) carecían de PU.1, con unos valores de IF_{PU.1} similares al de los núcleos de los hepatocitos controles.

5.3. Ganancia del programa hepático.

De un modo similar al análisis de presencia de PU.1, se efectuó la localización de un factor nuclear hepático, que controlaba la expresión de numerosos genes hepáticos específicos, y que se expresaba en hepatocitos maduros, como es HNF-1. Se desarrolló un protocolo para detectar por IF la presencia de HNF-1 en los núcleos de las células presentes en cortes de hepáticos de 5µm. Como se muestra en la figura 27a se detectaron HDMO, cuyos núcleos poseían este factor de transcripción hepático. De un total de 22 HDMO localizados, con un número de 37 núcleos, en todos ellos se identificó el factor de transcripción HNF-1 (tabla 5).

Al igual que en el apartado anterior, se definió un IF de HNF-1 (IF_{HNF-1}), mediante el ajuste por una recta definida por los valores de DF de HNF-1 de los núcleos controles (figura 27b), siendo el valor de IF_{HNF-1} igual a 1 en los núcleos en los hepatocitos y 0 en los de las células hematopoyéticas.

Los valores calculados de IF_{HNF-1} se clasificaron según el tipo de morfología que poseyera el núcleo del HDMO (figura 27c), observándose, que los núcleos con una morfología más parecida a los núcleos hematopoyéticos (tipo III) presentaban un valor de IF_{HNF-1} igual a 0,64±0,11 (n=4), a diferencia de los núcleos tipo I o tipo II, cuyos valores de IF_{HNF-1} eran 0,99±0,13 (n=18) y 0,95±0,11 (n=13), valores que corresponden por completo a un hepatocito endógeno.

Como en el caso anterior, también se desarrolló la colocalización de EGFP, HNF-1 y del Cr-Y mediante la combinación de IF y Y-CISH. Se analizó la presencia del Cr-Y en 4 HDMO en un total de 10 núcleos: 4 de ellos carecían del Cr-Y además de ser del tipo I, indicando su presencia en los hepatocitos antes del proceso de fusión celular; los 6 restantes eran originarios de células hematopoyéticas, incluyendo un núcleo tipo I que además presentaba unos niveles altos de HNF-1 (IF_{HNF-1}=0,81) (figura 27a₃); se identificó un núcleo tipo III Cr-Y⁺ con presencia de HNF-1 (IF_{HNF-1}=0,49), que por su morfología semejante a los núcleos hematopoyéticos y aún sin poseer una gran cantidad de HNF-1, indicaría que estaba comenzando su reprogramación nuclear.

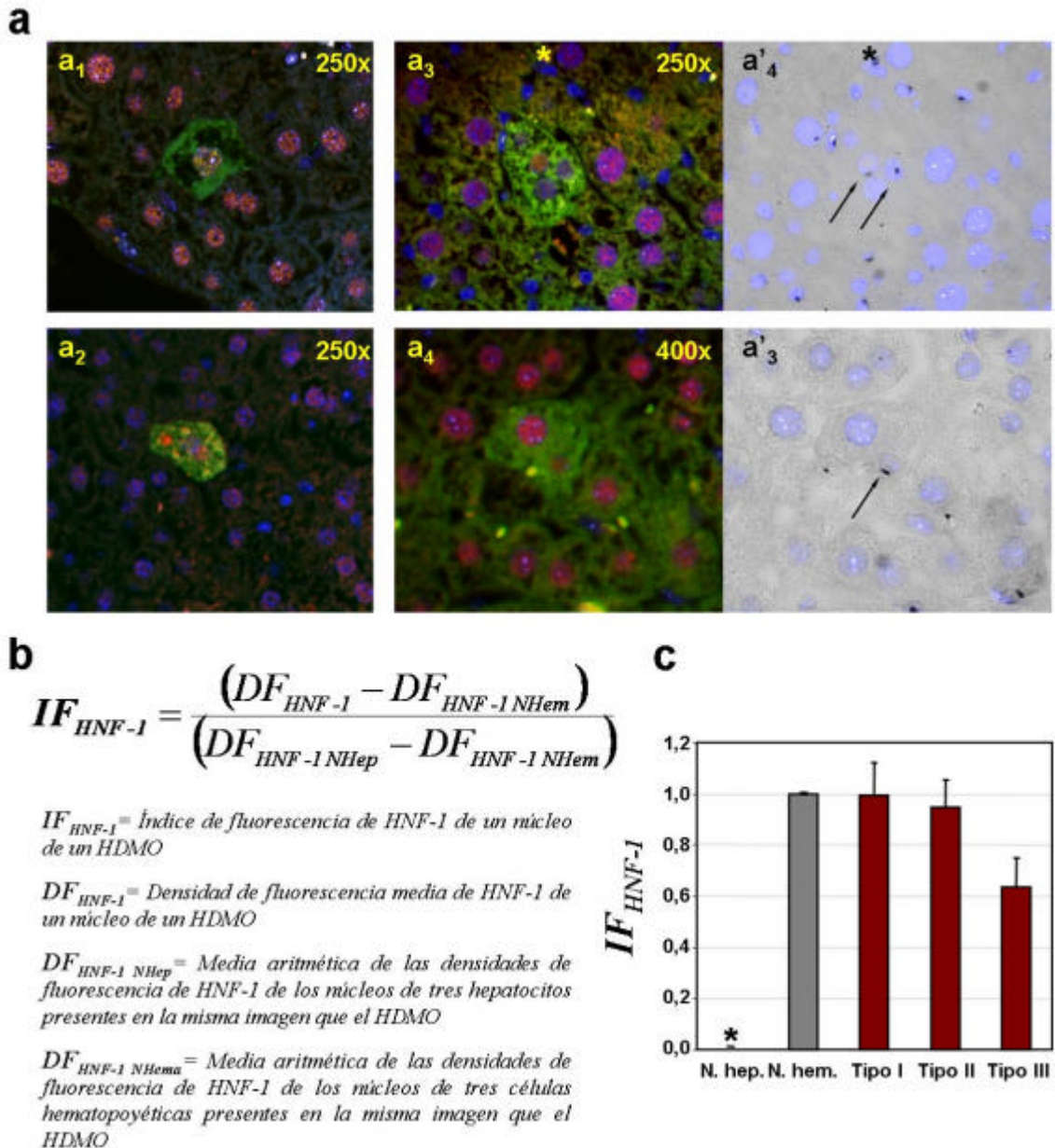
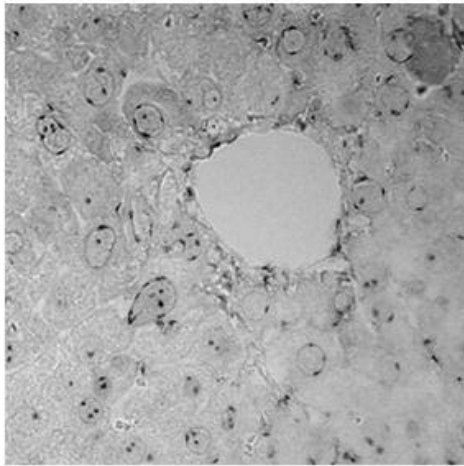


Figura 27. Análisis de la presencia de HNF-1 en los núcleos de los HDMO. a) Fotografías de secciones hepáticas teñidas mediante inmunofluorescencia para visualizar: expresión de EGFP (verde), presencia de HNF-1 (rojo) y núcleos (DAPI, azul). **a**₁, **a**₂, **a**₃ y **a**₄ ejemplos de HDMO donde se detecta la presencia de HNF-1 en sus núcleos; núcleo de célula hematopoyética HNF-1- (*) **a**'₃ y **a**'₄ se desarrolló la detección del Cr-Y mediante Y-CISH, presencia de Cr-Y en los núcleos de los HDMO (flechas negras) y en el núcleo de una célula hematopoyética HNF-1' (*). **b)** Fórmula matemática utilizada para el cálculo de IF_{HNF-1} . **c)** Cuantificación de los valores de IF_{HNF-1} de los distintos tipos de núcleos: núcleos de células hepáticas, núcleos hematopoyéticos y núcleos de los HDMO (tipo I, II y III). Se representan las diferencias significativas ($p < 0,05$, *).

	Núcleo tipo I				Núcleo tipo II				Núcleo tipo III		
	HDMO	Núcleo A	Núcleo B	Núcleo C	Núcleo D	Núcleo E			Núcleo F		
PU.1 Marcador hematopoyético	1	1,181	0,296						0,558	0,570	
	2	0,861	0,097						0,789	0,210	
	3	1,276	0,090	1,113	0,122						
	4	1,214	0,035								
	5								0,758	0,143	
	6	0,975	0,005								
	7	0,841	0,066								
	8	0,667	0,370						1,605	0,057	
	9	0,991	0,120						0,865	0,440	
	10					0,781	0,038				
	11	0,670	0,198								
	12					0,771	0,025	0,869	0,086		
	13	1,098	0,024						1,174	1,000	
HNF-1 Marcador hepático	14	0,981	0,770						0,861	0,403	
	15	0,922	0,846								
	16					0,852	0,888				
	17					0,796	0,950				
	18					1,006	1,394				
	19	1,033	0,402	1,105	1,139						
	20	0,890	0,521								
	21	0,951	1,914								
	22	0,912	1,211								
	23	1,388	1,541						1,125	0,782	
	24					0,760	1,723				
	25					0,633	1,060				
	26					0,633	1,000				
	27	1,012	1,123						0,705	0,877	
	28	1,010	0,559			0,707	0,966				
	29	0,935	1,431	0,920	2,255						
	39					0,663	0,348				
	31			0,972	0,257	0,887	1,029				
	32	1,204	1,245			0,752	0,714	0,545	0,245		
	33	0,750	0,557	0,826	0,771	0,815	0,814	0,620	1,071		
	34	0,954	0,541							0,836	0,492
	35					0,708	0,945				
RF		0,982±0,031 (n=29)			0,751±0,028 (n=17)			0,916±0,086 (n=11)			
IMF _{PU.1} (HDMO 1-13)		0,129±0,035 (n=11)			0,050±0,019 (n=3)			0,403±0,143 (n=6)			
IMF _{HNF-1} (HDMO 14-35)		0,994±0,127 (n=18)			0,940±0,106 (n=14)			0,638±0,113 (n=5)			
		RF			IMF _{PU.1}			IMF _{HNF-1}			
Núcleos hepáticos		1,000±0,010 (n=105)			0 (n=39)			1 (n=66)			
Núcleos hematopoyéticos		1,156±0,022 (n=105)			1 (n=39)			0 (n=66)			

Tabla 5. Análisis de la reprogramación nuclear: En cada fila se representan los valores de todos los núcleos encontrados por cada HDMO, clasificados atendiendo a su morfología (tipo I, tipo II o tipo III). Para cada núcleo se ha calculado su correspondiente valor de RF (números azules) y de F para los dos factores nucleares analizados (números rojos). La presencia del factor de transcripción hematopoyético, PU.1, se ha analizado en los núcleos de los HDMO desde el 1 hasta el 13. La presencia del factor nuclear hepático, HNF-1, se determinó en los núcleos de los HDMO desde el 14 al 35. Las últimas filas recogen los valores medios de los valores de RF e IF, para los núcleos de HDMO, hepatocitos y células hematopoyéticas.

VIII



- I. ÍNDICE
- II. ABREVIATURAS
- III. RESUMEN
- IV. INTRODUCCIÓN
- V. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS
- VI. MATERIALES Y MÉTODOS
- VII. RESULTADOS
- VIII. DISCUSIÓN**
- IX. CONCLUSIONES
- X. BIBLIOGRAFÍA
- XI. ANEXOS

1. MODELO DE DAÑO HEPÁTICO INDUCIDO POR CCl₄ Y MOVILIZACIÓN CON G-CSF.

1.1. Daño hepático inducido por el tratamiento continuado con CCl₄.

En la presente memoria nos hemos basado en un modelo muy utilizado para producir daño hepático, como es la administración de CCl₄. El mecanismo de acción del CCl₄ se debe principalmente a su activación a través de diversos citocromos presentes en los hepatocitos, gracias a los cuales se originan radicales capaces de oxidar ácidos grasos esenciales para el mantenimiento de la permeabilidad de las membranas celulares (Weber et al., 2003). Este tóxico provoca una serie de efectos, como son fibrosis, muerte hepatocelular o carcinogénesis.

En primer lugar, hemos reproducido esta toxicidad hepática mediante la administración continuada de una solución de CCl₄. Durante el tiempo de tratamiento con CCl₄ se observó una disminución en el peso de los animales y una alteración en los niveles plasmáticos de GPT, GOT y bilirrubina, indicativos de la función hepática. A diferencia de lo que ocurre con estos parámetros plasmáticos, cuyos valores retornan a niveles basales rápidamente, se ha observado que incluso un mes después de la administración de CCl₄, se aprecian múltiples diferencias estructurales en el parénquima hepático de los animales tratados. El hecho de que exista un mayor número de células ovas (reacción oval), indica una activación de la regeneración hepática a partir de los progenitores hepáticos y no sólo a partir de los hepatocitos preexistentes, efecto que también se produce en otros modelos de daño hepático (Kofman et al., 2005).

En el momento previo al comienzo de la administración de G-CSF se observó que los animales que habían recibido CCl₄, partían de unos valores de leucocitos totales y de CMHs en SP más altos que los ratones no dañados. Esta capacidad movilizador del CCl₄ se pone aún más de manifiesto al analizar el porcentaje de granulocitos, donde se aprecia que este compuesto hepatotóxico principalmente estimula el incremento de células monocíticas. Por otro lado, se aprecia una mayor presencia de infiltración hematopoyética en los cortes histológicos de los hígados de estos ratones dañados. Ya otros autores han descrito la capacidad de movilización del tejido hepático en condiciones de daño, debido a que secretan citoquinas, como SDF-1 (Dalakas et al., 2005; Kucia et al., 2005a) o el propio G-CSF (Krishnaswamy et al., 1999), capaces de reclutar células hematopoyéticas, especialmente células del sistema fagocítico mononuclear que intervienen en procesos inflamatorios (Hume, 2006). En nuestro caso, hemos demostrado que al producir un daño hepático, se produce un reclutamiento de células hematopoyéticas hacia la zona de lesión, produciéndose también un incremento de su número en SP.

Todos estos indicadores (reducción de peso, parámetros plasmáticos, aspecto histológico, células ovas y reclutamiento de células hematopoyéticas) nos garantizaban la efectividad del tratamiento continuado con CCl₄ para inducir daño hepático.

1.2. Movilización hematopoyética con la administración reiterada de G-CSF.

Se observó una respuesta desigual a los tres diferentes ciclos de movilización con G-CSF. Así, tanto en el primer ciclo de movilización, como en el segundo, se produjo un incremento en el número

total de leucocitos en SP. Este incremento con los dos primeros ciclos de G-CSF, también se observa teniendo en cuenta la proporción de granulocitos, monocitos y la población de células LSK presentes en SP. La disminución del porcentaje de células linfoides se debe al fuerte incremento de granulocitos y monocitos en SP con los ciclos de G-CSF. La movilización con un tercer ciclo de G-CSF no ejerció el efecto esperado y similar a los anteriores (figura 11). No se produjo un aumento en el número de leucocitos, ni aumentó la proporción de granulocitos en SP. Sin embargo, este tercer ciclo sí que mantuvo su capacidad movilizador de células LSK y de monocitos, aunque sus valores fueron menores que en ciclos anteriores (figuras 11e y f). La falta de efecto de G-CSF no se debió al agotamiento del compartimiento de CMHs, como se comprueba en el ensayo de repoblación competitiva (figura 12), ni a una posible desensibilización de las CMHs, ya que éstas sí respondieron correctamente al tercer tratamiento con G-CSF.

El mecanismo por el que G-CSF es capaz de movilizar células hematopoyéticas, se basa principalmente en que causa la proteólisis de diversas interacciones que retienen estas células en la MO (Petit et al., 2002; Semerad et al., 2005). También la acción del G-CSF, reduciendo la capa osteoblastos (Katayama et al., 2006) es decisiva para la eliminación de estas interacciones, como por ejemplo la mediada por el receptor CXCR-4 y su ligando SDF-1. Posiblemente, con dosis de G-CSF tan reiteradas, el sistema de retención de las células hematopoyéticas susceptibles a la acción del G-CSF, no tenga tiempo para restaurarse. También podría deberse a una desensibilización de los osteoblastos por la acción del G-CSF (Cancelas and Williams, 2006), con lo que no sería efectivo ningún nuevo ciclo de G-CSF. Esta saturación del sistema de liberación de la MO de células hematopoyéticas mediado por G-CSF, podría explicar también la diferencia observada en el número de leucocitos en SP de los ratones no dañados con respecto a los dañados con el segundo ciclo de G-CSF ya que, teniendo en cuenta que con el daño hepático también somos capaces de aumentar el número de leucocitos en SP, tal vez en los ratones dañados se tenga como punto de partida un sistema de movilización mediado por G-CSF más fácilmente saturable, que ya es visible en el segundo ciclo de G-CSF.

En el ensayo de repoblación competitiva, se valoró el contenido de progenitores en MO después del tratamiento con CCl_4 y los tres ciclos de G-CSF. Como se indicó anteriormente, todos los grupos fueron capaces de injertar y de mantener constante su participación en la hematopoyesis quimérica. Esto nos indicaba que el protocolo de daño hepático mediante CCl_4 y la posterior movilización con G-CSF no eran nocivos para el sistema hematopoyético.

2. ESTUDIO DE PROCESOS DE PLASTICIDAD DE CÉLULAS DE MO EN UN MODELO DE DAÑO HEPÁTICO EN RATÓN.

2.1. Expresión de EGFP en la mayoría de células derivadas de la MO.

Para la caracterización de los procesos de plasticidad de células de MO en el hígado, es requisito fundamental identificar todas las células derivadas de MO. Para ello, desarrollamos un modelo de ratones quiméricos, mediante el trasplante de MO proveniente de ratones transgénicos para la expresión de la EGFP bajo el control de un promotor ubicuo (β -actina). De esta forma se garantizaba que las células derivadas de la MO trasplantadas expresasen EGFP. Se observó que no todas las células hematopoyéticas exógenas de los animales quiméricos expresaban EGFP. También se observó esta variación en la expresión del transgén en los propios ratones donadores de MO donde existía, tanto en SP como en hígado, un 10-15% de las células que no expresaban el transgén. Consideramos que este porcentaje no invalidaría el modelo y que, en todo caso, iría en detrimento de nuestros posibles resultados.

2.2. Aumento de células hematopoyéticas infiltradas en el hígado.

El reclutamiento de leucocitos por parte del hígado en situaciones de daño es bien conocido. De hecho, los procesos de inflamación crónica que se producen en el hígado ocurren cuando los mecanismos que reclutan los leucocitos están afectados (Lalor and Adams, 1999). El proceso de reclutamiento de células hematopoyéticas al parénquima hepático ocurre en varias etapas: i) Los receptores de las células endoteliales capturan a los leucocitos del torrente sanguíneo; ii) Este anclaje activa a los leucocitos, fortaleciendo su retención en el endotelio hepático; iii) La secreción de citoquinas desde células de la sinusoide hepática, provoca cambios conformacionales en los leucocitos, reorganizando su citoesqueleto, lo que facilita su paso a través de la monocapa endotelial y su infiltración en el tejido; iv) Una vez dentro del parénquima hepático, los leucocitos son guiados a la zona de inflamación mediante gradientes de citoquinas.

En nuestro modelo de daño hepático inducido por CCl_4 se ha conseguido un aumento de células hematopoyéticas infiltradas en el hígado. En los animales control, el $15,2 \pm 1,4\%$ de las células presentes en el hígado fueron hematopoyéticas y en los ratones tratados con CCl_4 , se alcanzó el $22,7 \pm 1,2\%$. Se produce por tanto, un reclutamiento de leucocitos desde SP hasta el hígado, como consecuencia del daño. Cuando se movilizó con G-CSF al grupo con daño hepático, se observó una correlación entre el número de ciclos de movilización con G-CSF y el porcentaje de células hematopoyéticas presentes en el hígado, alcanzándose hasta un $33,2 \pm 1,8\%$ con tres ciclos de G-CSF.

Este mismo efecto se observó cuando se analizó la presencia de macrófagos en el hígado. Se observó que en el grupo control, el $10,5 \pm 0,2\%$ de las células eran macrófagos, incrementándose levemente en los animales con daño hasta el $12,3 \pm 0,4\%$. Sin embargo, cuando el grupo dañado fue movilizado durante tres semanas con G-CSF, este valor aumentó hasta el $20,2 \pm 2,9\%$. En cambio, en los ratones sin daño, la movilización no provocó esta fuerte presencia de macrófagos en el parénquima hepático.

El hecho de que G-CSF aumente el porcentaje de leucocitos en SP, tanto en los animales dañados como no dañados, pero que sólo haya una mayor presencia de células hematopoyéticas en el hígado en el grupo tratado con CCl₄, nos indica la existencia de un efecto de cooperación entre el aumento de células hematopoyéticas en SP debido al G-CSF y su reclutamiento al parénquima hepático, gracias a las señales que existen en el hígado dañado. Esto puede deberse simplemente al hecho de que la movilización con G-CSF aumente el número de leucocitos en SP, y por tanto posibilite un mayor reclutamiento al parénquima hepático dañado, ya que se secretan las citoquinas necesarias para ello. En conjunto, el modelo nos permitía aumentar y dirigir la presencia de células hematopoyéticas al hígado.

2.3. Modelo de plasticidad de MO a hígado.

El modelo experimental establecido nos ha permitido estudiar los procesos de plasticidad de células derivadas de MO hacia hepatocitos, comprobando la existencia de HDMO.

Para garantizar la identificación de células derivadas de MO como HDMO, se han seguido una serie de criterios: i) identificación como células derivadas de MO, gracias a su expresión de EGFP; ii) morfología de hepatocito: deben ser células grandes y poligonales con un citoplasma regular, poseer uno o varios núcleos grandes con nucleolos prominentes, y una razón núcleo/citoplasma baja o moderada; iii) integración dentro del entramado del parénquima hepático; iv) carencia de expresión de proteínas específicas de células hematopoyéticas, como por ejemplo CD45 (Thomas, 1989); v) expresión de marcadores específicos de funciones de los hepatocitos maduros, como son citoqueratinas hepáticas, proteínas necesarias para el transporte de ácidos biliares, producción y acumulación de albúmina y de glucógeno, o de factores nucleares como es el HNF-1.

Considerando estos requisitos, se ha conseguido identificar HDMO en el hígado de ratones tratados con CCl₄, aunque con una frecuencia muy baja (1 HDMO por cada 250.000 hepatocitos).

La presencia de HDMO ha sido ampliamente discutida, presentando una gran variabilidad (revisado en tabla 2 y en la referencia (Thorgeirsson and Grisham, 2006)). Parece claro que si el hígado ha sido dañado, la incidencia de HDMO aumenta (Petersen et al., 1999; Theise et al., 2000b; Terai et al., 2003; Jang et al., 2004). Nuestros datos sugieren que es necesario este daño para detectar HDMO, aunque su incidencia es muy baja.

Aunque resulte necesario dañar el hígado para la aparición de HDMO, no todos los tipos de daño son capaces de favorecer este fenómeno. Tal es el caso de la hepatectomía parcial, que es incapaz de favorecer los procesos de plasticidad (Fujii et al., 2002). En otros modelos similares al utilizado por nosotros, basado en daño hepático inducido por CCl₄, se consiguen frecuencias de HDMO similares a las nuestras (Wagers et al., 2002; Kanazawa and Verma, 2003; Abedi et al., 2004a; Cantz et al., 2004; Jang et al., 2004; Stadtfeld and Graf, 2005). No obstante, en el trabajo de Terai y colaboradores, basándose también en un protocolo de daño con CCl₄, se consiguieron hasta un 25% de contribución al hígado por parte de los HDMO (Terai et al., 2003). Estos investigadores identificaron las células de MO en el hígado mediante la adquisición de marcadores específicos del desarrollo hepático temprano (HNF-4 y Liv2). Por el contrario, los requisitos requeridos por nosotros para identificar células derivadas de MO como HDMO han sido mucho más restrictivos, como por ejemplo la expresión de marcadores

de hepatocitos maduros o una morfología similar a la de los hepatocitos vecinos. Esta diferencia puede ser la responsable de las diferencias de frecuencias de HDMO entre su modelo y el nuestro.

2.4. La movilización con G-CSF aumenta los HDMO en ratones con daño hepático.

Hemos descrito que el tratamiento con G-CSF incrementa la aparición de HDMO en el hígado de los ratones dañados con CCl₄. Se ha conseguido incrementar 17 veces la frecuencia de aparición de HDMO gracias a la acción de tres ciclos semanales de G-CSF (figura 17). Es de destacar que durante los tres ciclos de G-CSF, cada ciclo ejerció un aumento en el número de HDMO, cuyo efecto se vio acentuando a lo largo del tratamiento de movilización, indicando que se producía una acumulación del efecto de inducción de procesos de plasticidad debido a este factor de movilización hematopoyética. A lo largo de los ciclos de movilización con G-CSF, el aumento en la frecuencia de aparición de los HDMO no se corresponde con un incremento de igual magnitud de infiltración hematopoyética, indicando que G-CSF podría ejercer un efecto potenciador de la plasticidad, y que no limitándose al aumento de leucocitos infiltrados. Otros autores han descrito la capacidad del G-CSF de acelerar la recuperación hepática mediante la activación de programas de reparación endógenos y no a partir de HDMO (Yannaki et al., 2005). Aunque no podemos descartar este efecto en nuestro modelo, el G-CSF también produce el incremento en el número de HDMO.

Se pueden plantear distintas explicaciones sobre el papel que ejerce el G-CSF en el aumento de la frecuencia de HDMO: i) una vez finalizado el tratamiento con CCl₄, el hígado no es capaz de reclutar un mayor número de células hematopoyéticas y el incremento de los HDMO es efecto de su acumulación con los ciclos de movilización; ii) la población responsable de los procesos de plasticidad se moviliza más eficazmente con G-CSF que otras poblaciones hematopoyéticas; iii) la acción de G-CSF puede que no se limite a ejercer un efecto movilizador, sino que participe activamente en los procesos de plasticidad. En la actualidad se están llevando a cabo experimentos para determinar cual de estas posibilidades es válida.

A pesar de que G-CSF es capaz de incrementar la aparición de HDMO, su aplicación clínica para el tratamiento de lesiones hepáticas está aún muy lejana por la escasa incidencia de este fenómeno. Otros autores han constatado la capacidad de una participación de los HDMO en el hígado mucho mayor a la observada por nosotros. Por ejemplo, en el modelo de ratones deficientes en FAH, HDMO FAH^{+/+} fueron capaces de repoblar gran parte del hígado (Lagasse et al., 2000; Vassilopoulos et al., 2003; Willenbring et al., 2004). Ésto se debe a la presión selectiva que ejercen las células no deficientes sobre las endógenas en este modelo, en el que la recuperación hepática a partir de los hepatocitos FAH^{-/-} se encuentra muy desfavorecida. En nuestro modelo, donde el proceso de daño no afecta selectivamente a las células endógenas, no existe ninguna ventaja para seleccionar los HDMO y amplificar su contribución a la regeneración hepática. Sin embargo hay que señalar, que se localizaron parejas de HDMO adyacentes, lo que indicaría su capacidad proliferativa. Tal vez, en un modelo similar al de los ratones deficientes FAH, en el que la aparición y expansión de HDMO estuviera favorecida sobre los hepatocitos endógenos, la movilización con G-CSF induciría una frecuencia similar a la necesaria para el uso de los procesos de plasticidad con fines terapéuticos. En cualquier caso, hemos conseguido regular la frecuencia de HDMO por la acción de G-CSF en un modelo sin ninguna presión selectiva por parte de HDMO, demostrando que con G-CSF aumentan los HDMO, no por una ventaja proliferativa respecto a los endógenos, sino incrementando los eventos de plasticidad de las células de

MO. Se plantea así la posibilidad de utilizar G-CSF para el tratamiento eficaz de enfermedades hepáticas.

2.5. La concentración de CCl₄ no afecta la aparición de HDMO.

En un intento por aumentar las posibles señales de reclutamiento y generación de HDMO se incrementó la dosis del tóxico hepático. Con el aumento de la concentración empleada de CCl₄, no se consiguió aumentar la infiltración hematopoyética en el parénquima hepático. Los valores máximos de presencia de células hematopoyéticas fueron en torno al 30% en los ratones que fueron dañados con CCl₄, independientemente de la concentración de CCl₄ utilizada.

Como hemos visto, la frecuencia de HDMO en distintos modelos de ratón depende de la ventaja proliferativa que presenten estos HDMO frente a los hepatocitos endógenos durante un proceso de daño. Con un incremento en la concentración de CCl₄ se pretendió agotar la capacidad proliferativa de los hepatocitos con sucesivos ciclos de daño-regeneración, con el fin de que los HDMO formados fuesen capaces de superar el potencial de proliferación endógeno. Pero la frecuencia de HDMO, tanto en animales dañados con un 10% como con un 20% de CCl₄, fue semejante. Esto puede ser debido a que ambas concentraciones ejercían el mismo efecto sobre el potencial regenerativo del hígado y que tanto los hepatocitos endógenos como los HDMO, al ser igualmente expuestos al compuesto hepatotóxico, sufran los mismos efectos, con lo que ninguno de ellos tendría ninguna ventaja sobre el otro.

2.6. Efectos similares de la movilización con G-CSF o con G-CSF/TPO.

Aunque se ha descrito que la administración combinada de G-CSF/TPO reduce el tiempo de recuperación de ratones mielosuprimidos (Grossmann et al., 1996), la acción del TPO en ratones normales se limita al incremento de número de progenitores en MO y bazo, y no se traduce en un incremento en el número de células en SP (Kaushansky et al., 1996). Ésto explicaría la falta de diferencias en los valores de SP (leucocitos, hematíes y plaquetas) de los grupos de animales dañados y movilizados con G-CSF o con la combinación G-CSF/TPO. La infiltración hematopoyética en hígado y la generación de HDMO con ambos protocolos de movilización fue semejante, repitiéndose lo que ocurrió en SP.

Se ha descrito que el reclutamiento de células hematopoyéticas al hígado depende de una serie de parámetros (Lalor and Adams, 1999) (discutido en el apartado 2.2 de esta discusión). Uno de ellos la capacidad, por parte de los leucocitos circulantes, de unirse a moléculas de la superficie en las células endoteliales hepáticas. Es lógico pensar que el número de leucocitos en SP influiría directamente con su capacidad para ser reclutados dentro del hígado. A la vista de los datos obtenidos con la movilización G-CSF/TPO se puede concluir que TPO no afecta a la formación de HDMO, posiblemente debido a que no influye en el incremento las células hematopoyéticas ni en SP ni en hígado, y presumiblemente tampoco ejercería ningún efecto movilizador sobre la población responsable de la aparición de HDMO, ni actuaría activamente en el proceso de plasticidad.

3. ORIGEN HEMATOPOYÉTICO DEL PROCESO DE PLASTICIDAD.

Se ha descrito que células procedentes de MO son capaces de originar hepatocitos maduros en determinadas condiciones. Hemos comprobado que, al menos en nuestro modelo, estos procesos plásticos son originados por células hematopoyéticas originadas a partir de una población purificada y trasplantada de CMHs.

Con los distintos estudios llevados a cabo a partir de células purificadas de MO, hemos determinado la influencia de las posibles poblaciones de células madre residentes en MO. En primer lugar, al obtenerse HDMO en ratones cuya hematopoyesis estaba originada a partir de una población altamente enriquecida en CMHs, se demostraba que los procesos de plasticidad habían sido originados a partir de células hematopoyéticas. Esta misma conclusión ya había sido formulada por otros autores (revisado en tabla 2 y referencia (Thorgeirsson and Grisham, 2006)). En el modelo de ratones deficientes en FAH se consiguió que hasta el 30% del hígado estuviera repoblado por HDMO, después del trasplante de tan solo 50 células LSKT (Lagasse et al., 2000). Aunque de forma más modesta, otros autores observaron la aparición de HDMO en ratones trasplantados con una única CMH LSK (Wagers et al., 2002), de igual fenotipo que la población de CMHs utilizada por nosotros. Incluso con diferentes protocolos de selección de CMHs también se ha conseguido identificar procesos de plasticidad de estas CMHs a hepatocitos. Así, por ejemplo, después de reconstituir el sistema hematopoyético tras irradiación a partir de una única célula de fenotipo Fr25 Lin⁻ PKH26^{bright} se observaron HDMO (Krause et al., 2001) y también cuando se sometieron a daño con CCl₄ (Jang et al., 2004). Del mismo modo, también se han identificado HDMO a partir del trasplante de CMHs humanas (CD34⁺) en ratones inmunodeficientes (Danet et al., 2002; Wang et al., 2003b).

La frecuencia de aparición de HDMO en ratones que habían sido trasplantados con una población de MO total, fue equivalente a la obtenida en los ratones que fueron trasplantados con $5,6 \times 10^4$ células LSK (figura 21). Por lo tanto, el origen de los HDMO en nuestro modelo se debe a una población hematopoyética derivada de estas CMHs. Se ha descrito que otras poblaciones residentes en MO son capaces de originar HDMO, como puede ser el caso de las células madre mesenquimales (Sato et al., 2005) o de las MAPC (Jiang et al., 2002a; Schwartz et al., 2002), pero su contribución en nuestro modelo no ha parecido ser representativa.

Para estudiar la contribución directa de CMHs al proceso de plasticidad, nos basamos en el modelo de Terai y colaboradores (Terai et al., 2003), donde se trasplantaba una población de células de MO sin seleccionar en animales no acondicionados a nivel hematopoyético, las cuales eran capaces de producir HDMO. Por el contrario, cuando se trasplantaron CMHs, no obtuvimos ningún resultado positivo, quedando demostrado que bajo las condiciones de nuestro modelo, las CMHs no fueron capaces de inducir la formación de HDMO directamente. Hay que destacar que en estudios *in vitro* e *in vivo* a corto plazo, sí se ha visto que las CMHs, aisladas mediante un protocolo de purificación muy diferente al utilizado por nosotros, fueron capaces de originar HDMO (Jang et al., 2004). En nuestro caso hemos sido capaces de identificar HDMO a tiempos más largos, una vez que la población de CMHs ha conseguido reconstituir la hematopoyesis. Esto indicaría que en nuestro modelo existe la necesidad de un sistema hematopoyético bien establecido que sea capaz de originar los procesos de plasticidad.

Según algunos autores (Ratajczak et al., 2004), cabe la posibilidad de que la MO actúe de reservorio para células madre de tejidos no hematopoyéticos, desde donde son movilizados en situaciones de daño, gracias al juego CXCR-4/SDF-1. En estos trabajos, se describe que estas células madre específicas de tejidos no hematopoyéticos, presentan un fenotipo similar al de CMHs, lo que llevaría a purificar conjuntamente ambas poblaciones de células madre. Ésto conduciría a malinterpretar la capacidad de las CMHs para diferenciarse a células maduras de otros tejidos mediante procesos de plasticidad. Con nuestro estudio, no se puede excluir la existencia de estas poblaciones de células madre. Otros grupos, trabajando con animales cuya hematopoyesis había sido reconstituida con una única célula madre, sí que eliminaron esta posibilidad (Krause et al., 2001).

4. MECANISMO RESPONSABLE DE LA APARICIÓN DE HDMO.

Como ya se ha descrito en la introducción de esta tesis, se han propuesto una serie de mecanismos como los responsables de los procesos de plasticidad debida a células de MO. Estos pueden ser: i) la existencia en MO de células totipotentes capaces de originar distintos tipos celulares; ii) la función de la MO como reservorio para distintos tipos de células madre iii) la desdiferenciación hacia una célula más primitiva con una mayor totipotencia; iv) la transdiferenciación de células de MO hacia un tipo celular de otro tejido; v) fusión celular, en la cual células de MO son capaces de fusionarse con células de otros tejidos, adquiriendo el programa genético de estas.

4.1. Los HDMO se originan por fusión celular.

En nuestro modelo de daño hepático y movilización, hemos demostrado que los HDMO son producidos por un proceso de fusión *in vivo*, entre células de origen hematopoyético con hepatocitos endógenos.

El fenómeno de fusión celular por parte de células de MO, no es nuevo. Ya se han descrito numerosos ejemplos tanto *in vitro* (Terada et al., 2002; Ying et al., 2002) como *in vivo* (Alvarez-Dolado et al., 2003; Vassilopoulos et al., 2003; Wang et al., 2003c; Weimann et al., 2003; Camargo et al., 2004; Nygren et al., 2004; Willenbring et al., 2004; Kashofer et al., 2005). Se han demostrado fenómenos de fusión en músculo esquelético (Abedi et al., 2004b; Sherwood et al., 2004) y cardiaco (Nygren et al., 2004), en hígado (Alvarez-Dolado et al., 2003; Wang et al., 2003c; Camargo et al., 2004; Willenbring et al., 2004), y más sorprendentemente en neuronas de Purkinje (Alvarez-Dolado et al., 2003; Weimann et al., 2003), donde se encontraron células de este tipo neuronal expresando marcadores tanto del donador de MO como del receptor, y además presentaban dos núcleos y distintos orgánulos celulares procedentes de ambos tipos celulares fusionados. El modelo en el cual se han estudiado los procesos de fusión de células procedentes de MO más extensamente ha sido el de ratones deficientes en FAH. En este modelo, no sólo se ha descrito la capacidad por parte de células hematopoyéticas (Wang et al., 2002), y más concretamente, de células mielomonocíticas (Camargo et al., 2003; Vassilopoulos et al., 2003) de fusionarse con hepatocitos FAH^{-/-}, rescatándoles de esta deficiencia enzimática, sino que también son capaces de proliferar, repoblando gran parte del hígado. Incluso poseen la capacidad, al igual que los hepatocitos normales, de ser trasplantados en receptores secundarios e injertar en su hígado (Willenbring et al., 2004). Con estos trabajos, no sólo se ha demostrado que los HDMO generados como productos de fusión celular son funcionales, sino que también son capaces de proliferar de una manera normal.

En nuestro caso, el potencial de proliferación de nuestros HDMO no está del todo claro, ya que aunque hayamos localizado algunas parejas de HDMO que hipotéticamente provendrían de una división celular previa, no podemos garantizarlo. Una de las razones es la frecuencia con la que suceden los procesos de fusión (1HDMO cada 250.000 hepatocitos bajo condiciones de daño). Como ya se ha indicado anteriormente, los HDMO de nuestro modelo no presentan ninguna ventaja, frente a los hepatocitos endógenos, que les confiera una mayor capacidad de proliferación. El tratamiento con CCl₄ produce daño hepático tanto a los hepatocitos endógenos como a los HDMO. En el modelo de deficiencia en FAH, la fusión entre células hematopoyéticas FAH^{+/+} y hepatocitos FAH^{-/-}, rescata a éstos últimos de su enfermedad metabólica. En este modelo ya se observó que el trasplante de tan

solo 1.000 hepatocitos procedentes de ratones normales era capaz de repoblar el hígado afectado, e incluso cuando los propios hepatocitos FAH^{-/-} fueron corregidos con vectores retrovirales, también se rescataba a los animales de su enfermedad (Overturf et al., 1996). Además, la repoblación hepática de los HDMO en los ratones FAH^{-/-}, ocurre de manera oligoclonal (Lagasse et al., 2000). En un primer momento se originarían los primeros HDMO, que ante la activación del programa de regeneración hepática, proliferan en una mayor medida que los endógenos, formando nódulos de HDMO, y finalmente repoblando el hígado. Los autores de este trabajo, encontraron entre 50 y 200 nódulos de HDMO y cada uno de ellos proveniente de un único HDMO. Esto significa que la frecuencia de aparición de los primeros eventos de plasticidad es muy baja, pero que a pesar de ser escasa es suficiente para repoblar el hígado en las condiciones adecuadas. Cuando se tiene en cuenta solamente la incidencia de los primeros eventos de plasticidad del modelo de FAH, los HDMO se originarían tan sólo a partir de entre 50 a 200 fusiones producidas entre células hematopoyéticas FAH^{+/+} y hepatocitos FAH^{-/-}; lo que indicaría que sin tener en cuenta la ventaja proliferativa de los HDMO, la frecuencia de los primeros eventos de plasticidad es de una magnitud similar a lo descrito por otros autores (Alvarez-Dolado et al., 2003; Camargo et al., 2004; Stadtfeld and Graf, 2005) y por nosotros.

Hay que señalar que como producto de la fusión celular *in vivo*, se forman HDMO poliploides. Aunque la viabilidad de células poliploides pueda resultar insólita, no es raro que en el organismo existan numerosos tipos celulares multinucleados, como ocurre con las fibras musculares o los propios hepatocitos. La razón por la que de forma natural los hepatocitos presentan varios núcleos aún no está clara, pero se ha sugerido como un mecanismo para incrementar la síntesis de proteínas responsables para la desintoxicación del organismo (Guidotti et al., 2003). Por ello, el hecho de obtener HDMO con más de un solo núcleo podría constituir una alternativa biológica para favorecer este proceso.

Un último interrogante a responder es por qué en la fusión de una célula hematopoyética con un hepatocito, el núcleo hematopoyético silencia su programa tejido específico, y pasa a expresar el programa hepático o se queda inactivo dentro del HDMO.

En resumen, hemos identificado en nuestro modelo procesos de plasticidad por parte de células hematopoyéticas que, mediante fusión celular *in vivo*, originan HDMO con todas las características propias de los hepatocitos endógenos.

4.2. La fagocitosis como posible mecanismo responsable del origen de los HDMO.

El linaje mielomonocítico o sistema fagocítico mononuclear (Hume, 2006) comprende a los monocitos circulantes que, dentro de los tejidos constituyen los macrófagos, presentan capacidad de fagocitar partículas extrañas. En la literatura se ha descrito que los monocitos contribuyen a los procesos de regeneración hepática mediante fusión celular (Camargo et al., 2004; Willenbring et al., 2004).

Durante el proceso inflamatorio, las células fagocíticas migran a la zona dañada, donde se produce la opsonización, en la que la membrana plasmática del macrófago engloba a la partícula que se va a fagocitar, formándose el fago-endosoma, cuyo contenido será degradado, gracias a su fusión con lisosomas, formándose el fago-lisosoma (Douglas, 1970; Steinman et al., 1983; May and Machesky, 2001). Durante el estudio del proceso de fagocitosis en macrófagos, el NH₄Cl ha sido

ampliamente utilizado, debido a su actuación como inhibidor de la fusión entre el fago-endosoma y los lisosomas (Hart et al., 1983; Hart and Young, 1991).

En esta memoria hemos comprobado que la frecuencia de aparición de los HDMO se incrementa 4,6 veces con la administración de NH_4Cl en ratones con daño hepático. La acción del NH_4Cl en nuestro modelo no parece que se deba a un mayor daño hepático, ya que no se aprecia ninguna característica histológica diferente a las encontradas en los ratones que sólo recibieron CCl_4 , ni una mayor infiltración hematopoyética en el parénquima hepático. El NH_4Cl actuaría como inhibidor de los pasos iniciales de la fagocitosis, permitiendo la fusión entre los macrófagos y los hepatocitos, pero impidiendo la acción de las enzimas líticas presentes en el lisosoma, produciendo como resultado la formación de un HDMO. Esto mismo se aprecia en los ratones que además fueron movilizados con G-CSF, donde se observó una mayor frecuencia de HDMO en los animales en los que se inhibió el proceso de fagocitosis, además de dañarlos y movilizarlos.

Este resultado nos sugiere que los sistemas de fagocitosis, desarrollados por la población de monocitos-macrófagos, son los responsables de los procesos de plasticidad identificados en nuestro modelo, permitiendo que se desarrolle el proceso de fusión de membranas pero no así la etapa lítica de la fagocitosis. Ello sugiere que, posiblemente son los monocitos-macrófagos, las células hematopoyéticas responsables de la fusión por la que se originan HDMO. Queda por determinar si la fusión entre macrófagos-hepatocitos tiene una función biológica y qué consecuencias tiene para las células implicadas.

5. REPROGRAMACIÓN NUCLEAR EN EL PROCESO DE FUSIÓN CELULAR.

5.1. Silenciamiento y activación del programa hematopoyético y hepático en los HDMO.

Durante el proceso de plasticidad de células hematopoyéticas a hepatocitos se debe producir el silenciamiento del programa genético hematopoyético y la activación del programa hepático. Se ha demostrado, mediante técnicas de inmunofluorescencia, que los HDMO carecían de expresión de marcadores hematopoyéticos y que tenían proteínas específicas de hepatocitos. Al determinar que el proceso de plasticidad observado por nosotros se producía mediante fusión celular, se quiso investigar el grado de compromiso del núcleo hematopoyético al programa hepático en el HDMO.

Mediante el marcaje por inmunofluorescencia se identificó la presencia de factores nucleares (PU.1 y HNF-1) en los distintos núcleos presentes en los HDMO. Relacionamos la presencia del factor nuclear hematopoyético PU.1 en un núcleo, con un programa de expresión de genes hematopoyéticos activos; por el contrario, la presencia del factor nuclear hepático HNF-1, sería indicativo de un patrón de expresión hepática.

Cuando se analizó la presencia de HNF-1 en los núcleos de los HDMO, en todos ellos estaba presente el marcador nuclear hepático. También se analizó mediante Y-CISH, el origen endógeno o exógeno de los núcleos de los HDMO (recordemos que el trasplante era entre animales de distintos sexos). Como se indicó en la figura 27a, todos los núcleos de los HDMO, independientemente de la presencia o ausencia del Cr-Y, eran positivos para el marcaje con HNF-1. Por otro lado, en el análisis del marcador nuclear PU.1, sólo se identificó su presencia en un núcleo, que además poseía un tamaño y una morfología similar al de las células hematopoyéticas cercanas. Al determinar su origen mediante Y-CISH, claramente se identificó su origen exógeno. Todo ello nos estaría indicando que, cuando se produce el proceso de plasticidad mediado por fusión celular, el núcleo hematopoyético detiene su expresión de genes hematopoyéticos, y que factores presentes en el hepatocito actuarían sobre él activando la expresión del programa específico hepático.

Recientemente, Terranova y colaboradores han descrito un proceso similar en un modelo *in vitro*. En este trabajo, forzando la fusión celular entre linfocitos B humanos y una línea inducible de miotubos de ratón, se describen el silenciamiento del programa de expresión de los linfocitos y la activación de su programa de expresión muscular (Terranova et al., 2006).

Uno de los requisitos que debían satisfacer los HDMO era poseer un aspecto morfológico similar al del resto de hepatocitos, incluyendo su núcleo, que debería ser grande y con gran número de nucleolos. Como ya se ha descrito anteriormente, los hepatocitos pueden poseer varios núcleos. Durante la identificación de los HDMO se observó que éstos también poseían varios núcleos, no siempre con un aspecto semejante. Se pudo distinguir claramente tres tipos de núcleos en los HDMO: núcleos similares a los de los hepatocitos (tipo I), núcleos similares a los de las células hematopoyéticas (tipo III), y núcleos de tamaño intermedio y con muy pocos nucleolos (tipo II). Es razonable pensar que los núcleos de células hematopoyéticas cuando se fusionan con hepatocitos, sufran un proceso de reestructuración de su cromatina, que haga posible el silenciamiento y activación de genes específicos de ambos tipos celulares.

Hemos descrito el proceso de reprogramación de núcleos hematopoyéticos en los HDMO, como una transformación gradual, en el que pasan a convertirse en núcleos hepáticos a través de un estado de transición. Con el fin de cuantificar esta conversión génica, se utilizó el cálculo de los valores de fluorescencia de los factores nucleares PU.1 o HNF-1 como un indicativo numérico del predominio del programa de expresión hematopoyético o del hepático en cada núcleo de los HDMO. En la figura 26c se ve como los núcleos hematopoyéticos, cuyo valor de $IF_{PU.1}$ es 1, después de la fusión se reduce hasta $0,40 \pm 0,14$ en un primer momento (núcleos tipo III), llegando a casi 0 tanto en los núcleos tipo II como en los núcleos tipo I;. Hay que indicar que estos dos tipos de núcleos presentan un cierto valor de $IF_{PU.1}$, tal vez debido al PU.1 residual presente en el HDMO. La tendencia contraria se aprecia en la figura 27c, donde el valor de IF_{HNF-1} de los núcleos hematopoyéticos es 0, y cuando se han fusionado alcanza el valor de $0,64 \pm 0,14$ (tipo III), más cercano a 1, lo que se corresponde con el IF_{HNF-1} de los núcleos de los hepatocitos. El valor de IF_{HNF-1} de los núcleos tipo II es ligeramente menor al de los núcleos con morfología hepática (tipo I), lo que indicaría que se encuentra en un estado previo, pero muy cercano a convertirse en núcleos similares al de los hepatocitos.

5.2. La conversión del programa de expresión en los núcleos de los HDMO se desarrolla a través de un estado de mayor condensación de la cromatina.

Los procesos de activación o represión de genes, que se producen durante el desarrollo o durante la transferencia nuclear se basan en la remodelación de la estructura de la cromatina, nunca en la modificación de la secuencia genética que pueda comprometer al genoma. Los principales mecanismos implicados son los procesos en los que se modifican las histonas que estructuran a la cromatina, que permiten una mayor compactación o una descondensación del ADN, haciéndolo más o menos accesible a los factores de transcripción. Esta remodelación de la cromatina ya se ha descrito en los experimentos de transferencia de núcleos somáticos a oocitos enucleados, donde el núcleo somático es remodelado para revertir su patrón de expresión a un estado de totipotencia similar al del cigoto (Armstrong et al., 2006). Incluso en el trabajo de Terranova y colaboradores se describe un cambio morfológico en los núcleos de los linfocitos fusionados, en el que adquieren un aspecto similar al de los miotubos, y este cambio transcurre gracias a un proceso de desacetilación de la cromatina del linfocito (Terranova et al., 2006).

El uso de colorantes específicos para el ADN ha sido utilizado para determinar la ploidia de los núcleos hepáticos (Guidotti et al., 2003; Toyoda et al., 2005); pero también se ha empleado para estudiar el nivel de compactación de la cromatina. El grado de compactación del ADN no sólo influye en la accesibilidad de factores nucleares, sino que ciertos colorantes, como el DAPI, sufren los mismos impedimentos estéricos. Diversos trabajos se ha demostrado que la cantidad de DAPI en un núcleo, identificada por la intensidad de fluorescencia emitida, es proporcional al grado de compactación (Darzynkiewicz et al., 1984; Mascetti et al., 2001).

Se quiso determinar el grado de condensación de los distintos núcleos de los HDMO, mediante el cálculo de la cantidad de DAPI que había sido capaz de acceder a sus cromatinas. Se cuantificó la DF del DAPI para los núcleos de los HDMO y se definió un valor arbitrario, RF, con el que podíamos comparar valores de condensación en la cromatina. Se comprobó que este valor para los núcleos de células hematopoyéticas era superior al de los hepatocitos. Dado que los núcleos de las células hematopoyéticas tienen un tamaño menor que el de los núcleos de los hepatocitos, su ADN estaría a

una mayor concentración que en el núcleo de los hepatocitos, y por lo tanto presentarán una mayor concentración de DAPI.

Al calcular los valores de los RF de los diferentes núcleos presentes en HDMO, se observó que en los de tipo I, el valor de RF era semejante al de los núcleos de los hepatocitos, pero el RF de los núcleos de morfología tipo III era mucho menor al de los núcleos de las células hematopoyéticas. Al tener un tamaño semejante, esta diferencia no se podía atribuir a que el ADN estuviera más diluido en ellos, sino que había que recurrir al grado de compactación de la cromatina que la hiciera menos accesible para el DAPI. Estos núcleos estarían en un estadio de cromatina más condensada que la de los núcleos de las células hematopoyéticas. De igual forma, el valor de RF de los núcleos tipo II era el menor de todos, lo cual era previsible en comparación con los de morfología hematopoyética (tipo III), pero nunca menor que el de los núcleos de morfología de hepatocito (tipo I). Al igual que antes, esto se entendería si estuvieran en un estado de mayor condensación que el de los núcleos con morfología hepática.

En conjunto podríamos pensar que los tres tipos de núcleos diferentes estarían describiendo distintas etapas del proceso de reprogramación, en el que el núcleo hematopoyético (tipo III) al recibir señales de represión/activación de los programas de expresión hematopoyético y hepático, cambiase su morfología, originando núcleos de un tamaño un poco mayor (que hemos denominado como tipo II). Éstos finalmente se transformarían en núcleos totalmente hepáticos (tipo I). Teniendo en cuenta la distinción por morfología de estos tres tipos nucleares, se identificó que el origen de los núcleos tipo II y III era exógeno, al igual que un núcleo tipo I. Por el contrario, el resto de núcleos con morfología hepática correspondía a los propios núcleos endógenos de los hepatocitos fusionados. Por tanto, el proceso de reprogramación nuclear del núcleo de una célula hematopoyética dentro de un HDMO, transcurriría con un estado de mayor condensación en su cromatina, que llevaría asociado el silenciamiento del programa de expresión hematopoyético y concluiría con una descondensación, al activarse el programa de expresión hepático. Un proceso similar ha sido descrito por el grupo del Dr. R. Terranova, donde se concluye que la reprogramación de células fusionadas transcurre debido a un proceso de deacetilación (Terranova et al., 2006), el cual es indicativo de una mayor condensación de la cromatina.

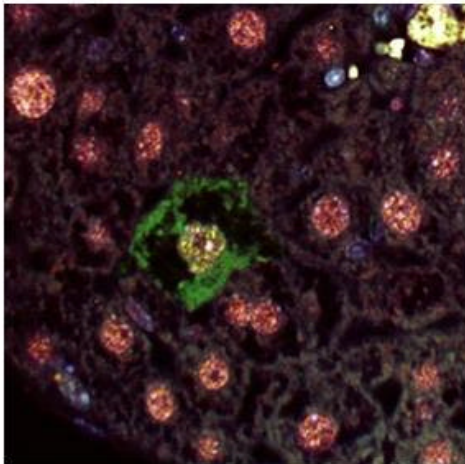
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.

En este trabajo se ha desarrollado un modelo de daño hepático en ratón, que ha permitido estudiar la contribución de las células de MO en la regeneración de un hígado dañado, identificándose HDMO. Estos HDMO se originan a partir de células hematopoyéticas, mediante un proceso de fusión celular, en el que están implicados mecanismos de endocitosis. Además, su generación ha podido ser fuertemente incrementada mediante el uso de factores de crecimiento hematopoyéticos, tales como G-CSF.

Modulando la aparición de HDMO mediante la administración de factores de crecimiento, se abre la posibilidad de utilizar los procesos de plasticidad para el tratamiento de enfermedades no hematopoyéticas. Aunque la movilización por G-CSF aplicada en nuestro modelo, aumenta los HDMO, su número sigue siendo bajo, pero permite el desarrollo de futuros tratamientos para aumentar su incidencia, que permitiría su potencial uso clínico.

Como ya se ha mencionado anteriormente (apartado 4.3 de la introducción), la proporción que deberían alcanzar en el hígado los HDMO para que ejerciesen un papel terapéutico, dependerá de cada afección hepática concreta. Por otro lado, el tratamiento de pacientes con factores de crecimiento hematopoyéticos y en particular con G-CSF (Cottler-Fox et al., 2003) está ampliamente aceptado en la práctica clínica. Así, el incremento de HDMO mediante factores de crecimiento podría ser empleado para el tratamiento de enfermedades fácilmente curables con una pequeña cantidad de hepatocitos sanos. Se sugeriría de este modo, un nuevo tratamiento para enfermedades hepáticas (como por ejemplo la tirosinemia hereditaria tipo I, la enfermedad de Wilson, hemocromatosis o la deficiencia en α 1-antitripsina) mediante terapia celular, en donde las células hematopoyéticas podrán ser utilizadas como vehículos para restaurar las funciones de los hepatocitos deficientes.

IX

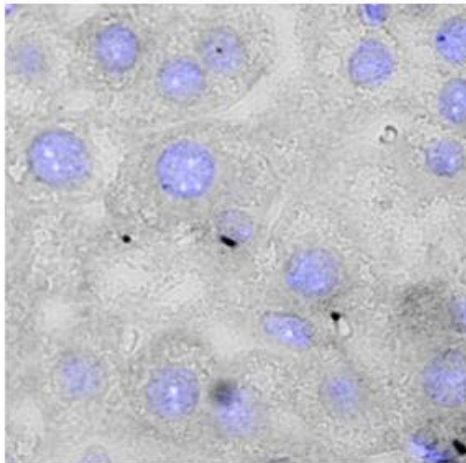


- I. ÍNDICE
- II. ABREVIATURAS
- III. RESUMEN
- IV. INTRODUCCIÓN
- V. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS
- VI. MATERIALES Y MÉTODOS
- VII. RESULTADOS
- VIII. DISCUSIÓN
- IX. CONCLUSIONES**
- X. BIBLIOGRAFÍA
- XI. ANEXOS

Se exponen a continuación las conclusiones resultantes de esta tesis doctoral, relacionadas con la plasticidad de células hematopoyéticas en un modelo de daño hepático en ratón:

1. Se ha establecido un modelo de daño hepático en ratón mediante el tratamiento con tetracloruro de carbono (CCl₄). Se observa que los animales dañados con CCl₄, presentan un proceso inflamatorio en hígado, caracterizado por un incremento de enzimas hepáticas en el plasma sanguíneo, una mayor infiltración de células hematopoyéticas en el hígado, alteraciones en el parénquima hepático, y una cierta proliferación de células ovas.
2. En los ratones con daño hepático se han identificado hepatocitos funcionales derivados de células de la médula ósea (HDMO). Estos hepatocitos son morfológicamente indistinguibles de los hepatocitos endógenos, expresan marcadores característicos hepáticos y pierden la expresión de proteínas específicas de células hematopoyéticas.
3. Se ha conseguido aumentar significativamente la generación de HDMO tras la movilización de células hematopoyéticas a sangre periférica, mediante la administración de factores de crecimiento hematopoyético, tales como el factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF).
4. El incremento de HDMO en ratones con daño hepático es dependiente de la dosis de G-CSF y no se ve aumentado por el tratamiento combinado con otros factores de crecimiento, como la trombopoyetina (TPO).
5. Las células responsables de la generación de HDMO son derivadas de células madre hematopoyéticas y necesitan de un injerto previo en la médula ósea para ejercer su función.
6. El mecanismo principal de generación de HDMO es la fusión entre células hematopoyéticas y hepatocitos del hígado dañado, interviniendo en este proceso funciones características de la actividad monocito-macrofágica.
7. El núcleo de la célula hematopoyética implicado en el proceso de fusión celular *in vivo*, sufre cambios en su morfología nuclear, silenciamiento de genes hematopoyéticos y la adquisición de marcadores hepáticos específicos.

X



- I. ÍNDICE
- II. ABREVIATURAS
- III. RESUMEN
- IV. INTRODUCCIÓN
- V. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS
- VI. MATERIALES Y MÉTODOS
- VII. RESULTADOS
- VIII. DISCUSIÓN
- IX. CONCLUSIONES
- X. BIBLIOGRAFÍA**
- XI. ANEXOS

- Abbas. (2004). Inmunología celular y molecular.
- Abe, S., Lauby, G., Boyer, C., Rennard, S. I. and Sharp, J. G. (2003). Transplanted BM and BM side population cells contribute progeny to the lung and liver in irradiated mice. *Cytotherapy* 5, 523-33.
- Abedi, M., Greer, D. A., Colvin, G. A., Demers, D. A., Dooner, M. S., Harpel, J. A., Pimentel, J., Menon, M. K. and Quesenberry, P. J. (2004a). Tissue injury in marrow transdifferentiation. *Blood Cells Mol Dis* 32, 42-6.
- Abedi, M., Greer, D. A., Colvin, G. A., Demers, D. A., Dooner, M. S., Harpel, J. A., Weier, H. U., Lambert, J. F. and Quesenberry, P. J. (2004b). Robust conversion of marrow cells to skeletal muscle with formation of marrow-derived muscle cell colonies: a multifactorial process. *Exp Hematol* 32, 426-34.
- Akashi, K., Kondo, M. and Weissman, I. L. (1998). Role of interleukin-7 in T-cell development from hematopoietic stem cells. *Immunol Rev* 165, 13-28.
- Aliotta, J. M., Keaney, P., Passero, M., Dooner, M. S., Pimentel, J., Greer, D., Demers, D., Foster, B., Peterson, A., Dooner, G. et al. (2006). Bone marrow production of lung cells: the impact of G-CSF, cardiotoxin, graded doses of irradiation, and subpopulation phenotype. *Exp Hematol* 34, 230-41.
- Alison, M. R., Poulos, R., Jeffery, R., Dhillon, A. P., Quaglia, A., Jacob, J., Novelli, M., Prentice, G., Williamson, J. and Wright, N. A. (2000). Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 406, 257.
- Alvarez-Dolado, M., Pardal, R., Garcia-Verdugo, J. M., Fike, J. R., Lee, H. O., Pfeffer, K., Lois, C., Morrison, S. J. and Alvarez-Buylla, A. (2003). Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425, 968-73.
- Ariosto, F., Riggio, O., Cantafora, A., Colucci, S., Gaudio, E., Mechelli, C., Merli, M., Seri, S. and Capocaccia, L. (1989). Carbon tetrachloride-induced experimental cirrhosis in the rat: a reappraisal of the model. *Eur Surg Res* 21, 280-6.
- Armstrong, L., Lako, M., Dean, W. and Stojkovic, M. (2006). Epigenetic modification is central to genome reprogramming in somatic cell nuclear transfer. *Stem Cells* 24, 805-14.
- Asakura, A. and Rudnicki, M. A. (2002). Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation. *Exp Hematol* 30, 1339-45.
- Badiavas, E. V., Abedi, M., Butmarc, J., Falanga, V. and Quesenberry, P. (2003). Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. *J Cell Physiol* 196, 245-50.
- Baum, C. M., Weissman, I. L., Tsukamoto, A. S., Buckle, A. M. and Peault, B. (1992). Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2804-8.
- Bittner, R. E., Schofer, C., Weipoltshammer, K., Ivanova, S., Streubel, B., Hauser, E., Freilinger, M., Hoger, H., Elbe-Burger, A. and Wachtler, F. (1999). Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol (Berl)* 199, 391-6.
- Bjornson, C. R., Rietze, R. L., Reynolds, B. A., Magli, M. C. and Vescovi, A. L. (1999). Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283, 534-7.
- Blakolmer, K., Jaskiewicz, K., Dunsford, H. A. and Robson, S. C. (1995). Hematopoietic stem cell markers are expressed by ductal plate and bile duct cells in developing human liver. *Hepatology* 21, 1510-6.
- Bodine, D. M., Seidel, N. E. and Orlic, D. (1996). Bone marrow collected 14 days after in vivo administration of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor to mice has 10-fold more repopulating ability than untreated bone marrow. *Blood* 88, 89-97.
- Bradley, T. R. and Metcalf, D. (1966). The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci* 44, 287-99.
- Brazelton, T. R., Rossi, F. M., Keshet, G. I. and Blau, H. M. (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290, 1775-9.
- Brittan, M., Braun, K. M., Reynolds, L. E., Conti, F. J., Reynolds, A. R., Poulos, R., Alison, M. R., Wright, N. A. and Hodivala-Dilke, K. M. (2005). Bone marrow cells engraft within the epidermis and proliferate in vivo with no evidence of cell fusion. *J Pathol* 205, 1-13.
- Brockes, J. P. and Kumar, A. (2005). Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine. *Science* 310, 1919-23.
- Camargo, F. D., Finegold, M. and Goodell, M. A. (2004). Hematopoietic myelomonocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners. *J Clin Invest* 113, 1266-70.
- Camargo, F. D., Green, R., Capetenaki, Y., Jackson, K. A. and Goodell, M. A. (2003). Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat Med* 9, 1520-7.
- Cancelas, J. A. and Williams, D. A. (2006). Stem cell mobilization by beta2-agonists. *Nat Med* 12, 278-279.
- Cantz, T., Sharma, A. D., Jochheim-Richter, A., Arseniev, L., Klein, C., Manns, M. P. and Ott, M. (2004). Reevaluation of bone marrow-derived cells as a source for hepatocyte regeneration. *Cell Transplant* 13, 659-66.
- Civin, C. I., Strauss, L. C., Brovall, C., Fackler, M. J., Schwartz, J. F. and Shaper, J. H. (1984). Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol* 133, 157-65.
- Constandinou, C., Henderson, N. and Iredale, J. P. (2005). Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods Mol Med* 117, 237-50.
- Corbel, S. Y., Lee, A., Yi, L., Duenas, J., Brazelton, T. R., Blau, H. M. and Rossi, F. M. (2003). Contribution of hematopoietic stem cells to skeletal muscle. *Nat Med* 9, 1528-32.
- Cornacchia, F., Fornoni, A., Plati, A. R., Thomas, A., Wang, Y., Inverardi, L., Striker, L. J. and Striker, G. E. (2001). Glomerulosclerosis is transmitted by bone marrow-derived mesangial cell progenitors. *J Clin Invest* 108, 1649-56.
- Cottler-Fox, M. H., Lapidot, T., Petit, I., Kollet, O., DiPersio, J. F., Link, D. and Devine, S. (2003). Stem cell mobilization. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, 419-37.
- Cowan, C. A., Atienza, J., Melton, D. A. and Eggan, K. (2005). Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 309, 1369-73.
- Craig, W., Kay, R., Cutler, R. L. and Lansdorp, P. M. (1993). Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 177, 1331-42.
- Dahlke, M. H., Popp, F. C., Bahlmann, F. H., Aselmann, H., Jager, M. D., Neipp, M., Piso, P., Klempnauer, J. and Schlitt, H. J. (2003). Liver regeneration in a retrorsine/CCl4-induced acute liver failure model: do bone marrow-derived cells contribute? *J Hepatol* 39, 365-73.
- Dalakas, E., Newsome, P. N., Harrison, D. J. and Plevris, J. N. (2005). Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury. *Faseb J* 19, 1225-31.
- Danet, G. H., Luongo, J. L., Butler, G., Lu, M. M., Tenner, A. J., Simon, M. C. and Bonnet, D. A. (2002). C1qRp defines a new human stem cell population with hematopoietic and hepatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10441-5.

- Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Kapuscinski, J., Staiano-Coico, L. and Melamed, M. R. (1984). Accessibility of DNA in situ to various fluorochromes: relationship to chromatin changes during erythroid differentiation of Friend leukemia cells. *Cytometry* **5**, 355-63.
- de Haan, G., Ausema, A., Wilkens, M., Molineux, G. and Dontje, B. (2000). Efficient mobilization of haematopoietic progenitors after a single injection of pegylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in mouse strains with distinct marrow-cell pool sizes. *Br J Haematol* **110**, 638-46.
- Deb, A., Wang, S., Skelding, K. A., Miller, D., Simper, D. and Caplice, N. M. (2003). Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation* **107**, 1247-9.
- Donnelly, D. S., Zelterman, D., Sharkis, S. and Krause, D. S. (1999). Functional activity of murine CD34+ and CD34- hematopoietic stem cell populations. *Exp Hematol* **27**, 788-96.
- Douglas, S. D. (1970). Analytic review: disorders of phagocyte function. *Blood* **35**, 851-66.
- Dreyfus, P. A., Chretien, F., Chazaud, B., Kirova, Y., Caramelle, P., Garcia, L., Butler-Browne, G. and Gherardi, R. K. (2004). Adult bone marrow-derived stem cells in muscle connective tissue and satellite cell niches. *Am J Pathol* **164**, 773-9.
- Drize, N., Gan, O. and Zander, A. (1993). Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor treatment of mice on spleen colony-forming unit number and self-renewal capacity [see comments]. *Exp Hematol* **21**, 1289-93.
- Fausto, N. (2001). Liver regeneration: from laboratory to clinic. *Liver Transpl* **7**, 835-44.
- Fernandes, K. J., McKenzie, I. A., Mill, P., Smith, K. M., Akhavan, M., Barnabe-Heider, F., Biernaskie, J., Junek, A., Kobayashi, N. R., Toma, J. G. et al. (2004). A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat Cell Biol* **6**, 1082-93.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G. and Mavilio, F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* **279**, 1528-30.
- Ferrebee, J. W., Lochte, H. L., Jr., Jaretzki, A., 3rd, Sahler, O. D. and Thomas, E. D. (1958). Successful marrow homograft in the dog after radiation. *Surgery* **43**, 516-20.
- Fleming, W. H., Alpern, E. J., Uchida, N., Ikuta, K. and Weissman, I. L. (1993). Steel factor influences the distribution and activity of murine hematopoietic stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3760-4.
- Fuchs, E. and Segre, J. A. (2000). Stem cells: a new lease on life. *Cell* **100**, 143-55.
- Fujii, H., Hirose, T., Oe, S., Yasuchika, K., Azuma, H., Fujikawa, T., Nagao, M. and Yamaoka, Y. (2002). Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol* **36**, 653-9.
- Fujio, K., Evarts, R. P., Hu, Z., Marsden, E. R. and Thorgeirsson, S. S. (1994). Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, during liver regeneration from putative stem cells in adult rat. *Lab Invest* **70**, 511-6.
- Fukada, S., Miyagoe-Suzuki, Y., Tsukihara, H., Yuasa, K., Higuchi, S., Ono, S., Tsujikawa, K., Takeda, S. and Yamamoto, H. (2002). Muscle regeneration by reconstitution with bone marrow or fetal liver cells from green fluorescent protein-gene transgenic mice. *J Cell Sci* **115**, 1285-93.
- Gatti, R. A., Meuwissen, H. J., Allen, H. D., Hong, R. and Good, R. A. (1968). Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* **2**, 1366-9.
- Godfraind, C., Langreth, S. G., Cardellicchio, C. B., Knobler, R., Coutelier, J. P., Dubois-Dalq, M. and Holmes, K. V. (1995). Tissue and cellular distribution of an adhesion molecule in the carcinoembryonic antigen family that serves as a receptor for mouse hepatitis virus. *Lab Invest* **73**, 615-27.
- Gregory, C. J. and Eaves, A. C. (1978). Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood* **51**, 527-37.
- Grimm, P. C., Nickerson, P., Jeffery, J., Savani, R. C., Gough, J., McKenna, R. M., Stern, E. and Rush, D. N. (2001). Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. *N Engl J Med* **345**, 93-7.
- Grompe, M. (2005). Bone marrow-derived hepatocytes. *Novartis Found Symp* **265**, 20-7; discussion 28-34, 92-7.
- Grossmann, A., Lenox, J., Deisher, T. A., Ren, H. P., Humes, J. M., Kaushansky, K. and Sprugel, K. H. (1996). Synergistic effects of thrombopoietin and granulocyte colony-stimulating factor on neutrophil recovery in myelosuppressed mice. *Blood* **88**, 3363-70.
- Gschnait, F., Konrad, K., Honigsmann, H., Denk, H. and Wolff, K. (1975). Mouse model for protoporphyria. I. The liver and hepatic protoporphyrin crystals. *J Invest Dermatol* **65**, 290-9.
- Guidotti, J. E., Bregerie, O., Robert, A., Debey, P., Brechot, C. and Desdouets, C. (2003). Liver cell polyploidization: a pivotal role for binuclear hepatocytes. *J Biol Chem* **278**, 19095-101.
- Gupta, S., Verfaillie, C., Chmielewski, D., Kim, Y. and Rosenberg, M. E. (2002). A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure. *Kidney Int* **62**, 1285-90.
- Gussoni, E., Bennett, R. R., Muskiewicz, K. R., Meyerrose, T., Nolte, J. A., Gilgoff, I., Stein, J., Chan, Y. M., Lidov, H. G., Bonnemant, C. G. et al. (2002). Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *J Clin Invest* **110**, 807-14.
- Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C. D., Buzney, E. A., Khan, M. K., Flint, A. F., Kunkel, L. M. and Mulligan, R. C. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* **401**, 390-4.
- Harris, R. G., Herzog, E. L., Bruscia, E. M., Grove, J. E., Van Arnem, J. S. and Krause, D. S. (2004). Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science* **305**, 90-3.
- Hart, P. D. and Young, M. R. (1991). Ammonium chloride, an inhibitor of phagosome-lysosome fusion in macrophages, concurrently induces phagosome-endosome fusion, and opens a novel pathway: studies of a pathogenic mycobacterium and a nonpathogenic yeast. *J Exp Med* **174**, 881-9.
- Hart, P. D., Young, M. R., Jordan, M. M., Perkins, W. J. and Geisow, M. J. (1983). Chemical inhibitors of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages also inhibit saltatory lysosomal movements. A combined microscopic and computer study. *J Exp Med* **158**, 477-92.
- Hematti, P., Sloand, E. M., Carvallo, C. A., Albert, M. R., Yee, C. L., Fuehrer, M. M., Blancato, J. K., Kearns, W. G., Barrett, J. A., Childs, R. W. et al. (2002). Absence of donor-derived keratinocyte stem cells in skin tissues cultured from patients after mobilized peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol* **30**, 943-9.
- Hess, D., Li, L., Martin, M., Sakano, S., Hill, D., Strutt, B., Thyssen, S., Gray, D. A. and Bhatia, M. (2003). Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol* **21**, 763-70.
- Hirschi, K. K. and Goodell, M. A. (2002). Hematopoietic, vascular and cardiac fates of bone marrow-derived stem cells. *Gene Ther* **9**, 648-52.
- Howard J. Worman, M. D. (2003). Diseases of the Liver. <http://cpmcnet.columbia.edu/dept/qi/disliv.html>.
- Hume, D. A. (2006). The mononuclear phagocyte system. *Curr Opin Immunol* **18**, 49-53.

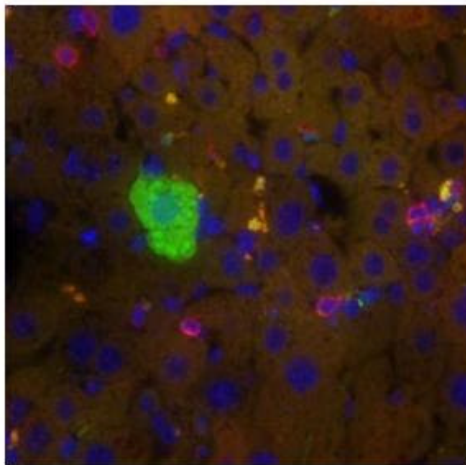
- Ianus, A., Holz, G. G., Theise, N. D. and Hussain, M. A. (2003). In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* **111**, 843-50.
- Imasawa, T., Utsunomiya, Y., Kawamura, T., Zhong, Y., Nagasawa, R., Okabe, M., Maruyama, N., Hosoya, T. and Ohno, T. (2001). The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* **12**, 1401-9.
- Ishikawa, F., Drake, C. J., Yang, S., Fleming, P., Minamiguchi, H., Visconti, R. P., Crosby, C. V., Argraves, W. S., Harada, M., Key, L. L., Jr. et al. (2003). Transplanted human cord blood cells give rise to hepatocytes in engrafted mice. *Ann N Y Acad Sci* **996**, 174-85.
- Ito, T., Suzuki, A., Imai, E., Okabe, M. and Hori, M. (2001). Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. *J Am Soc Nephrol* **12**, 2625-35.
- Jackson, K. A., Majka, S. M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C. J., Majesky, M. W., Entman, M. L., Michael, L. H., Hirschi, K. K. and Goodell, M. A. (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* **107**, 1395-402.
- Jackson, K. A., Mi, T. and Goodell, M. A. (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14482-6.
- Jang, Y. Y., Collector, M. I., Baylin, S. B., Diehl, A. M. and Sharkis, S. J. (2004). Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* **6**, 532-9.
- Jang, Y. Y. and Sharkis, S. J. (2004). Metamorphosis from bone marrow derived primitive stem cells to functional liver cells. *Cell Cycle* **3**, 980-2.
- Jiang, Y., Henderson, D., Blackstad, M., Chen, A., Miller, R. F. and Verfaillie, C. M. (2003). Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 1**, 11854-60.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M. et al. (2002a). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41-9.
- Jiang, Y., Vaessen, B., Lenvik, T., Blackstad, M., Reyes, M. and Verfaillie, C. M. (2002b). Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* **30**, 896-904.
- Kale, S., Karihaloo, A., Clark, P. R., Kashgarian, M., Krause, D. S. and Cantley, L. G. (2003). Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J Clin Invest* **112**, 42-9.
- Kanazawa, Y. and Verma, I. M. (2003). Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 1**, 11850-3.
- Kashofer, K., Siapati, E. K. and Bonnet, D. (2005). In vivo formation of unstable heterokaryons following liver damage and HSC/Progenitor transplantation. *Stem Cells*.
- Katayama, Y., Battista, M., Kao, W. M., Hidalgo, A., Peired, A. J., Thomas, S. A. and Frenette, P. S. (2006). Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* **124**, 407-21.
- Kaushansky, K., Broudy, V. C., Sitnicka, E., Lofton-Day, C., Grossmann, A. and Sprugel, K. (1996). Do the preclinical effects of thrombopoietin correlate with its in vitro properties? *Stem Cells* **14 Suppl 1**, 108-11.
- Kitano, T., Matsumura, S., Seki, T., Hikida, T., Sakimura, K., Nagano, T., Mishina, M., Nakanishi, S. and Ito, S. (2004). Characterization of N-methyl-D-aspartate receptor subunits involved in acute ammonia toxicity. *Neurochem Int* **44**, 83-90.
- Kocher, A. A., Schuster, M. D., Szabolcs, M. J., Takuma, S., Burkhoff, D., Wang, J., Homma, S., Edwards, N. M. and Iescu, S. (2001). Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* **7**, 430-6.
- Kofman, A. V., Morgan, G., Kirschenbaum, A., Osbeck, J., Hussain, M., Swenson, S. and Theise, N. D. (2005). Dose- and time-dependent oval cell reaction in acetaminophen-induced murine liver injury. *Hepatology* **41**, 1252-61.
- Kollet, O., Shvitiel, S., Chen, Y. Q., Suriawinata, J., Thung, S. N., Dabeva, M. D., Kahn, J., Spiegel, A., Dar, A., Samira, S. 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**, 160-9.
- Korbling, M., Katz, R. L., Khanna, A., Ruifrok, A. C., Rondon, G., Albitar, M., Champlin, R. E. and Estrov, Z. (2002). Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* **346**, 738-46.
- Kotton, D. N., Ma, B. Y., Cardoso, W. V., Sanderson, E. A., Summer, R. S., Williams, M. C. and Fine, A. (2001). Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* **128**, 5181-8.
- Kouro, T., Kumar, V. and Kincade, P. W. (2002). Relationships between early B- and NK-lineage lymphocyte precursors in bone marrow. *Blood* **100**, 3672-80.
- Krause, D. S. (2002). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther* **9**, 754-8.
- Krause, D. S., Ito, T., Fackler, M. J., Smith, O. M., Collector, M. I., Sharkis, S. J. and May, W. S. (1994). Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* **84**, 691-701.
- Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S. and Sharkis, S. J. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* **105**, 369-77.
- Krishnaswamy, G., Kelley, J., Yerra, L., Smith, J. K. and Chi, D. S. (1999). Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. *J Interferon Cytokine Res* **19**, 91-104.
- Kucia, M., Ratajczak, J. and Ratajczak, M. Z. (2005a). Bone marrow as a source of circulating CXCR4+ tissue-committed stem cells. *Biol Cell* **97**, 133-46.
- Kucia, M., Reza, R., Jala, V. R., Dawn, B., Ratajczak, J. and Ratajczak, M. Z. (2005b). Bone marrow as a home of heterogeneous populations of nonhematopoietic stem cells. *Leukemia* **19**, 1118-27.
- LaBarge, M. A. and Blau, H. M. (2002). Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* **111**, 589-601.
- Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I. L. and Grompe, M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* **6**, 1229-34.
- Lagasse, E., Shizuru, J. A., Uchida, N., Tsukamoto, A. and Weissman, I. L. (2001). Toward regenerative medicine. *Immunity* **14**, 425-36.
- Lalor, P. F. and Adams, D. H. (1999). Adhesion of lymphocytes to hepatic endothelium. *Mol Pathol* **52**, 214-9.
- Lanzkron, S. M., Collector, M. I. and Sharkis, S. J. (1999). Hematopoietic stem cell tracking in vivo: a comparison of short-term and long-term repopulating cells. *Blood* **93**, 1916-21.
- Lee, W. M. (1993). Review article: drug-induced hepatotoxicity. *Aliment Pharmacol Ther* **7**, 477-85.
- Lemmer, E. R., Shepard, E. G., Blakolmer, K., Kirsch, R. E. and Robson, S. C. (1998). Isolation from human fetal liver of cells co-expressing CD34 haematopoietic stem cell and CAM 5.2 pancytokeratin markers. *J Hepatol* **29**, 450-4.
- Lyman, G. H. (2005). Pegfilgrastim: a granulocyte colony-stimulating factor with sustained duration of action. *Expert Opin Biol Ther* **5**, 1635-46.

- Majka, S. M., Jackson, K. A., Kienstra, K. A., Majesky, M. W., Goodell, M. A. and Hirschi, K. K. (2003). Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration. *J Clin Invest* **111**, 71-9.
- Mallet, V. O., Mitchell, C., Mezey, E., Fabre, M., Guidotti, J. E., Renia, L., Coulombel, L., Kahn, A. and Gilgenkrantz, H. (2002). Bone marrow transplantation in mice leads to a minor population of hepatocytes that can be selectively amplified in vivo. *Hepatology* **35**, 799-804.
- Mascetti, G., Carrara, S. and Vergani, L. (2001). Relationship between chromatin compactness and dye uptake for in situ chromatin stained with DAPI. *Cytometry* **44**, 113-9.
- May, R. C. and Machesky, L. M. (2001). Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **114**, 1061-77.
- McLeod, D. L., Shreve, M. M. and Axelrad, A. A. (1976). Induction of megakaryocyte colonies with platelet formation in vitro. *Nature* **261**, 492-4.
- Medvinsky, A. and Dzierzak, E. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* **86**, 897-906.
- Metcalfe, D. (1989). The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature* **339**, 27-30.
- Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A. and McKecher, S. R. (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* **290**, 1779-82.
- Michalopoulos, G. K. and DeFrances, M. C. (1997). Liver regeneration. *Science* **276**, 60-6.
- Molineux, G., Kinstler, O., Briddell, B., Hartley, C., McElroy, P., Kerzic, P., Sutherland, W., Stoney, G., Kern, B., Fletcher, F. A. et al. (1999). A new form of Filgrastim with sustained duration in vivo and enhanced ability to mobilize PBPC in both mice and humans. *Exp Hematol* **27**, 1724-34.
- Molineux, G., Pojda, Z., Hampson, I. N., Lord, B. I. and Dexter, T. M. (1990). Transplantation potential of peripheral blood stem cells induced by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **76**, 2153-2158.
- Nakeff, A. and Daniels-McQueen, S. (1976). In vitro colony assay for a new class of megakaryocyte precursor: colony-forming unit megakaryocyte (CFU-M). *Proc Soc Exp Biol Med* **151**, 587-90.
- Newsome, P. N., Johannessen, I., Boyle, S., Dalakas, E., McAulay, K. A., Samuel, K., Rae, F., Forrester, L., Turner, M. L., Hayes, P. C. et al. (2003). Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroenterology* **124**, 1891-900.
- Norol, F., Merlet, P., Isnard, R., Sebillon, P., Bonnet, N., Caillot, C., Carrion, C., Ribero, M., Charlotte, F., Pradeau, P., Mayol, J.F., Peinnequin, A., Drouet, M., Safsafi, K., Vernant, J.P., Herodin, F. (2003). Influence of mobilized stem cells on myocardial infarct repair in a nonhuman primate model. *Blood* **102**, 4361-4368.
- Nygren, J. M., Jovinge, S., Breitbart, M., Sawen, P., Roll, W., Hescheler, J., Taneera, J., Fleischmann, B. K. and Jacobsen, S. E. (2004). Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* **10**, 494-501.
- Okamoto, R., Yajima, T., Yamazaki, M., Kanai, T., Mukai, M., Okamoto, S., Ikeda, Y., Hibi, T., Inazawa, J. and Watanabe, M. (2002). Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med* **8**, 1011-7.
- Omori, N., Omori, M., Evarts, R. P., Teramoto, T., Miller, M. J., Hoang, T. N. and Thorgeirsson, S. S. (1997). Partial cloning of rat CD34 cDNA and expression during stem cell-dependent liver regeneration in the adult rat. *Hepatology* **26**, 720-7.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M. et al. (2001a). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**, 701-5.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Limana, F., Jakoniuk, I., Quaini, F., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A. and Anversa, P. (2001b). Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10344-9.
- Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H. and Nakauchi, H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* **273**, 242-5.
- Overturf, K., Al-Dhalimy, M., Tanguay, R., Brantly, M., Ou, C. N., Finegold, M. and Grompe, M. (1996). Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nat Genet* **12**, 266-73.
- Pang, W. (2000). Role of muscle-derived cells in hematopoietic reconstitution of irradiated mice. *Blood* **95**, 1106-8.
- Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S. and Goff, J. P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* **284**, 1168-70.
- Petersen, B. E., Goff, J. P., Greenberger, J. S. and Michalopoulos, G. K. (1998). Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. *Hepatology* **27**, 433-45.
- Petit, I., Szyper-Kravitz, M., Nagler, A., Lahav, M., Peled, A., Habler, L., Ponomaryov, T., Taichman, R. S., Arenzana-Seisdedos, F., Fujii, N. et al. (2002). G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* **3**, 687-94.
- Ploemacher, R. E. (1997). Stem cells: characterization and measurement. *Baillieres Clin Haematol* **10**, 429-44.
- Pluznik, D. H. and Sachs, L. (1965). The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J Cell Physiol* **66**, 319-24.
- Poulsom, R., Forbes, S. J., Hodivala-Dilke, K., Ryan, E., Wyles, S., Navaratnarajah, S., Jeffery, R., Hunt, T., Alison, M., Cook, T. et al. (2001). Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol* **195**, 229-35.
- Priller, J., Flugel, A., Wehner, T., Boentert, M., Haas, C. A., Prinz, M., Fernandez-Klett, F., Prass, K., Bechmann, I., de Boer, B. A. et al. (2001a). Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med* **7**, 1356-61.
- Priller, J., Persons, D. A., Klett, F. F., Kempermann, G., Kreutzberg, G. W. and Dirnagl, U. (2001b). Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J Cell Biol* **155**, 733-8.
- Quaini, F., Urbanek, K., Beltrami, A. P., Finato, N., Beltrami, C. A., Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Leri, A. and Anversa, P. (2002). Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* **346**, 5-15.
- Ratajczak, M. Z., Kucia, M., Reza, R., Majka, M., Janowska-Wieczorek, A. and Ratajczak, J. (2004). Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia* **18**, 29-40.
- Rhim, J. A., Sandgren, E. P., Palmiter, R. D. and Brinster, R. L. (1995). Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4942-6.
- Rietze, R. L., Valcanis, H., Brooker, G. F., Thomas, T., Voss, A. K. and Bartlett, P. F. (2001). Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature* **412**, 736-9.
- Ryan, D. H., Nuccie, B. L., Ritterman, I., Liesveld, J. L., Abboud, C. N. and Insel, R. A. (1997). Expression of interleukin-7 receptor by lineage-negative human bone marrow progenitors with enhanced lymphoid proliferative potential and B-lineage differentiation capacity. *Blood* **89**, 929-40.

- Sanchez, M. J., Holmes, A., Miles, C. and Dzierzak, E. (1996). Characterization of the first definitive hematopoietic stem cells in the AGM and liver of the mouse embryo. *Immunity* **5**, 513-25.
- Sato, Y., Araki, H., Kato, J., Nakamura, K., Kawano, Y., Kobune, M., Sato, T., Miyanishi, K., Takayama, T., Takahashi, M. et al. (2005). Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* **106**, 756-63.
- Schwartz, R. E., Reyes, M., Koodie, L., Jiang, Y., Blackstad, M., Lund, T., Lenvik, T., Johnson, S., Hu, W. S. and Verfaillie, C. M. (2002). Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* **109**, 1291-302.
- Semerad, C. L., Christopher, M. J., Liu, F., Short, B., Simmons, P. J., Winkler, I., Levesque, J. P., Chappel, J., Ross, F. P. and Link, D. C. (2005). G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow. *Blood* **106**, 3020-7.
- Sheahan, K., O'Brien, M. J., Burke, B., Dervan, P. A., O'Keane, J. C., Gottlieb, L. S. and Zamcheck, N. (1990). Differential reactivities of carcinoembryonic antigen (CEA) and CEA-related monoclonal and polyclonal antibodies in common epithelial malignancies. *Am J Clin Pathol* **94**, 157-64.
- Sherwood, R. I., Christensen, J. L., Weissman, I. L. and Wagers, A. J. (2004). Determinants of skeletal muscle contributions from circulating cells, bone marrow cells, and hematopoietic stem cells. *Stem Cells* **22**, 1292-304.
- Shi, Q., Rafii, S., Wu, M. H., Wijelath, E. S., Yu, C., Ishida, A., Fujita, Y., Kothari, S., Mohle, R., Sauvage, L. R. et al. (1998). Evidence for circulating bone marrow -derived endothelial cells. *Blood* **92**, 362-7.
- Spangrude, G. J., Heimfeld, S. and Weissman, I. L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* **241**, 58-62.
- Stadtfeld, M. and Graf, T. (2005). Assessing the role of hematopoietic plasticity for endothelial and hepatocyte development by non-invasive lineage tracing. *Development* **132**, 203-13.
- Stamm, C., Westphal, B., Kleine, H. D., Petzsch, M., Kittner, C., Klinge, H., Schumichen, C., Nienaber, C. A., Freund, M. and Steinhoff, G. (2003). Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* **361**, 45-6.
- Starzl, T. E., Fung, J., Tzakis, A., Todo, S., Demetris, A. J., Marino, I. R., Doyle, H., Zeevi, A., Warty, V., Michaels, M. et al. (1993). Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet* **341**, 65-71.
- Steinman, R. M., Mellman, I. S., Muller, W. A. and Cohn, Z. A. (1983). Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J Cell Biol* **96**, 1-27.
- Tavassoli, M. (1994). Embryonic origin of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* **22**, 7.
- Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D. M., Nakano, Y., Meyer, E. M., Morel, L., Petersen, B. E. and Scott, E. W. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* **416**, 542-5.
- Terai, S., Sakaida, I., Yamamoto, N., Omori, K., Watanabe, T., Ohata, S., Katada, T., Miyamoto, K., Shinoda, K., Nishina, H. et al. (2003). An In Vivo Model for Monitoring Trans-Differentiation of Bone Marrow Cells into Functional Hepatocytes. *J Biochem (Tokyo)* **134**, 551-558.
- Terranova, R., Pereira, C. F., Du Roure, C., Merckenschlager, M. and Fisher, A. G. (2006). Acquisition and extinction of gene expression programs are separable events in heterokaryon reprogramming. *J Cell Sci*.
- Theise, N. D., Badve, S., Saxena, R., Henegariu, O., Sell, S., Crawford, J. M. and Krause, D. S. (2000a). Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* **31**, 235-40.
- Theise, N. D., Henegariu, O., Grove, J., Jagirdar, J., Kao, P. N., Crawford, J. M., Badve, S., Saxena, R. and Krause, D. S. (2002). Radiation pneumonitis in mice: a severe injury model for pneumocyte engraftment from bone marrow. *Exp Hematol* **30**, 1333-8.
- Theise, N. D., Nimmakayalu, M., Gardner, R., Illei, P. B., Morgan, G., Teperman, L., Henegariu, O. and Krause, D. S. (2000b). Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* **32**, 11-6.
- Theise, N. D. and Wilmut, I. (2003). Cell plasticity: flexible arrangement. *Nature* **425**, 21.
- Thomas, M. L. (1989). The leukocyte common antigen family. *Annu Rev Immunol* **7**, 339-69.
- Thorgeirsson, S. S. and Grisham, J. W. (2006). Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence. *Hepatology* **43**, 2-8.
- Till, J. E. and Mc, C. E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* **14**, 213-22.
- Toma, J. G., Akhavan, M., Fernandes, K. J., Barnabe-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D. R. and Miller, F. D. (2001). Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* **3**, 778-84.
- Toyoda, H., Bregerie, O., Vallet, A., Nalpas, B., Pivert, G., Brechot, C. and Desdouets, C. (2005). Changes to hepatocyte ploidy and binuclearity profiles during human chronic viral hepatitis. *Gut* **54**, 297-302.
- Tse, H. F., Kwong, Y. L., Chan, J. K., Lo, G., Ho, C. L. and Lau, C. P. (2003). Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* **361**, 47-9.
- Uchida, N., Tsukamoto, A., He, D., Frieria, A. M., Scollay, R. and Weissman, I. L. (1998). High doses of purified stem cells cause early hematopoietic recovery in syngeneic and allogeneic hosts. *J Clin Invest* **101**, 961-6.
- Varas, F., Bernad, A. and Bueren, J. A. (1996). Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes into peripheral blood the complete clonal repertoire of hematopoietic precursors residing in the bone marrow of mice. *Blood* **88**, 2495-501.
- Vassilopoulos, G., Wang, P. R. and Russell, D. W. (2003). Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* **422**, 901-4.
- Verfaillie, C. M. (2005). Multipotent adult progenitor cells: an update. *Novartis Found Symp* **265**, 55-61; discussion 61-5, 92-7.
- Volwier W., W. R. A. L. A. M., Ostrow J.D., . (2006). The liver and biliary system. http://www.uvgi.org/gut/liver_03.aspThe gut course.
- Wagers, A. J., Sherwood, R. I., Christensen, J. L. and Weissman, I. L. (2002). Little Evidence for Developmental Plasticity of Adult Hematopoietic Stem Cells. *Science* **5**, 5.
- Wang, X., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M. and Grompe, M. (2003a). The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100 Suppl 1**, 11881-8.
- Wang, X., Ge, S., McNamara, G., Hao, Q. L., Crooks, G. M. and Nolte, J. A. (2003b). Albumin expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice transplanted with highly purified human hematopoietic stem cells. *Blood*.
- Wang, X., Montini, E., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M. and Grompe, M. (2002). Kinetics of liver repopulation after bone marrow transplantation. *Am J Pathol* **161**, 565-74.
- Wang, X., Willenbring, H., Akkari, Y., Torimaru, Y., Foster, M., Al-Dhalimy, M., Lagasse, E., Finegold, M., Olson, S. and Grompe, M. (2003c). Cell fusion is the principal source of bone-marrow -derived hepatocytes. *Nature* **422**, 897-901.
- Weber, L. W., Boll, M. and Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* **33**, 105-36.

- Weimann, J. M., Johansson, C. B., Trejo, A. and Blau, H. M.** (2003). Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nat Cell Biol* **5**, 959-66.
- Weissman, I. L.** (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* **100**, 157-68.
- Willenbring, H., Bailey, A. S., Foster, M., Akkari, Y., Dorrell, C., Olson, S., Finegold, M., Fleming, W. H. and Grompe, M.** (2004). Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. *Nat Med* **10**, 744-8.
- Willis, F. and Pettengell, R.** (2002). Pegfilgrastim. *Expert Opin Biol Ther* **2**, 985-92.
- Wolf, N. S., Kone, A., Priestley, G. V. and Bartelmez, S. H.** (1993). In vivo and in vitro characterization of long-term repopulating primitive hematopoietic cells isolated by sequential Hoechst 33342-rhodamine 123 FACS selection. *Exp Hematol* **21**, 614-22.
- Yannaki, E., Athanasiou, E., Xagorari, A., Constantinou, V., Batsis, I., Kaloyannidis, P., Proya, E., Anagnostopoulos, A. and Fassas, A.** (2005). G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp Hematol* **33**, 108-119.
- Yin, A. H., Miraglia, S., Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A. G., Olweus, J., Kearney, J. and Buck, D. W.** (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* **90**, 5002-12.
- Ying, Q. L., Nichols, J., Evans, E. P. and Smith, A. G.** (2002). Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* **416**, 545-8.
- Yoshimoto, M., Chang, H., Shiota, M., Kobayashi, H., Umeda, K., Kawakami, A., Heike, T. and Nakahata, T.** (2005). Two different roles of purified CD45+c-Kit+Sca-1+Lin- cells after transplantation in muscles. *Stem Cells* **23**, 610-8.

XI



- I. ÍNDICE
- II. ABREVIATURAS
- III. RESUMEN
- IV. INTRODUCCIÓN
- V. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS
- VI. MATERIALES Y MÉTODOS
- VII. RESULTADOS
- VIII. DISCUSIÓN
- IX. CONCLUSIONES
- X. BIBLIOGRAFÍA
- XI. ANEXOS

La División de Hematopoyesis del Centro de Investigaciones Energéticas Medio Ambientales y Tecnológicas (Ciemat) tiene una dilatada experiencia en el estudio de las células madre productoras de la sangre. La posible utilización de este tipo de células madre adultas, denominadas hematopoyéticas, en los campos de terapia celular y en medicina regenerativa ha hecho que el equipo de investigación del Ciemat dedique un esfuerzo importante en la definición de sus capacidades plásticas, en comparación con las células madre embrionarias, y de la combinación de terapias innovadoras, como la terapia génica, con éstas.

■ **por J.C. Segovia, O. Quintana-Bustamante, R. Yáñez, M.L. Lamana y J.A. Bueren, división de hematopoyesis. departamento de investigación básica (ciemat).**



Laboratorio de Biología Celular del Ciemat. A la izquierda, cabinas de flujo laminar para la realización de trabajos con células eucariotas en esterilidad.

La División de Hematopoyesis del Ciemat cuenta con una dilatada experiencia en este campo

Las células madre,

El objetivo principal que se plantea en la investigación con células madre es el uso de células sanas para paliar y, si es posible, curar enfermedades cuyo origen es un daño celular, tisular u orgánico que no es abordable mediante fármacos convencionales. Enfermedades que cumplen estos requerimientos son, por ejemplo, la diabetes, las enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer, enfermedades cardiovasculares en las que tras un infarto se produce la muerte de parte de las células musculares del corazón, etcétera. Por sus



De izquierda a derecha, O. Quintana-Bustamante, R. Yáñez, J.A. Bueren, J.C. Segovia y M.L. Lamana, autores de este artículo.

características intrínsecas, las células madre son firmes candidatas a ser utilizadas para estos fines. Éstas tienen

capacidad de automantenimiento, es decir, pueden dividirse originando células idénticas a sí mismas, y tienen capacidad de dar lugar (diferenciarse) a células de cualquier tejido u órgano del individuo. Por su origen, se han distinguido dos grandes grupos de células madre, las células madre embrionarias y las células madre adultas.

Uno de los fenómenos más apasionantes de la vida de los animales es el desarrollo embrionario, conjunto de procesos por los cuales a partir de una única célula embrionaria se origina un organismo multicelular y multiorgánico, funcio-

nal y autónomo. Durante este desarrollo embrionario se produce una gran proliferación celular y una especialización de las células resultantes, tanto espacial como funcionalmente. Todos y cada uno de los pasos necesarios están finamente regulados por la expresión ordenada y sucesiva de múltiples productos génicos encargados de su control.

La célula totipotente por excelencia es el cigoto, la célula resultante de la fecundación del óvulo por un espermatozoide. En los animales vertebrados este cigoto experimenta un número preciso de duplicaciones que supone una gran producción de células y una primera especialización con un grupo de células llamado blastocisto, que está formado por una membrana celular externa, que dará lugar principalmente a la placenta y una masa celular interna que es la que originará el embrión. Es precisamente de esta masa celular interna de la que se obtienen las *células madre embrionarias* (figura 1). Estas son células madre totipotentes. Pueden ser cultivadas *in vitro*, expandidas, manipu-

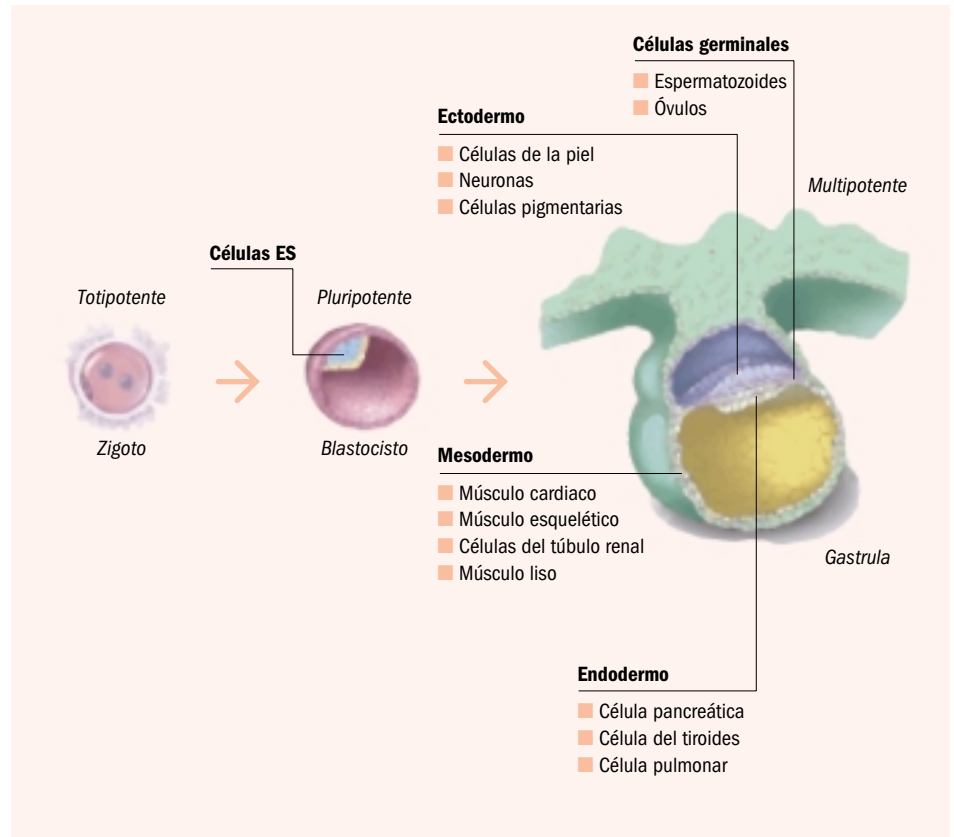


Figura 1. Diagrama representando los diferentes orígenes de las células madre. Modificado de *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. NIH Report.*

un nuevo arsenal terapéutico en desarrollo

ladas y vueltas a implantar en blastocistos, en donde contribuirán en mayor o menor medida a todos los tejidos adultos.

Una vez formado el nuevo individuo, diferentes órganos mantienen una pequeña población de células, residentes en el propio tejido, que tiene la capacidad de generar todos los tipos celulares del órgano en el que se encuentran. Estas son las llamadas *células madre adultas*, que son células madre multipotentes y cuya función es la de regenerar el tejido en el que residen debido a su desgaste o en situaciones de daño tisular. Todos estos procesos de proliferación y deter-

minación hacia uno u otro tejido o tipo celular específico están regulados de manera altamente específica mediante la expresión de genes reguladores que, poco a poco, van siendo identificados. No obstante, todavía son desconocidos muchos de los genes y de las interacciones que dan lugar a algo tan increíblemente complejo y perfecto como es un pez, un ratón o un hombre.

En términos de medicina regenerativa, se podría pensar en tres posibles líneas de actuación: i) la utilización de células embrionarias y de su capacidad totipotente para la obtención de células o

tejidos completos de interés a partir de ellas; ii) la obtención de células madre adultas del tejido u órgano a tratar; iii) la manipulación de los procesos de regulación para la regeneración de las células / tejidos dañados a partir de algún otro tipo de celular del propio individuo o de células vecinas al lugar dañado. A continuación describiremos de forma más detallada cada uno de estas posibilidades, así como las principales ventajas e inconvenientes.

Las células madre embrionarias

Llamamos células madre embrionarias a las células que durante las primeras fases

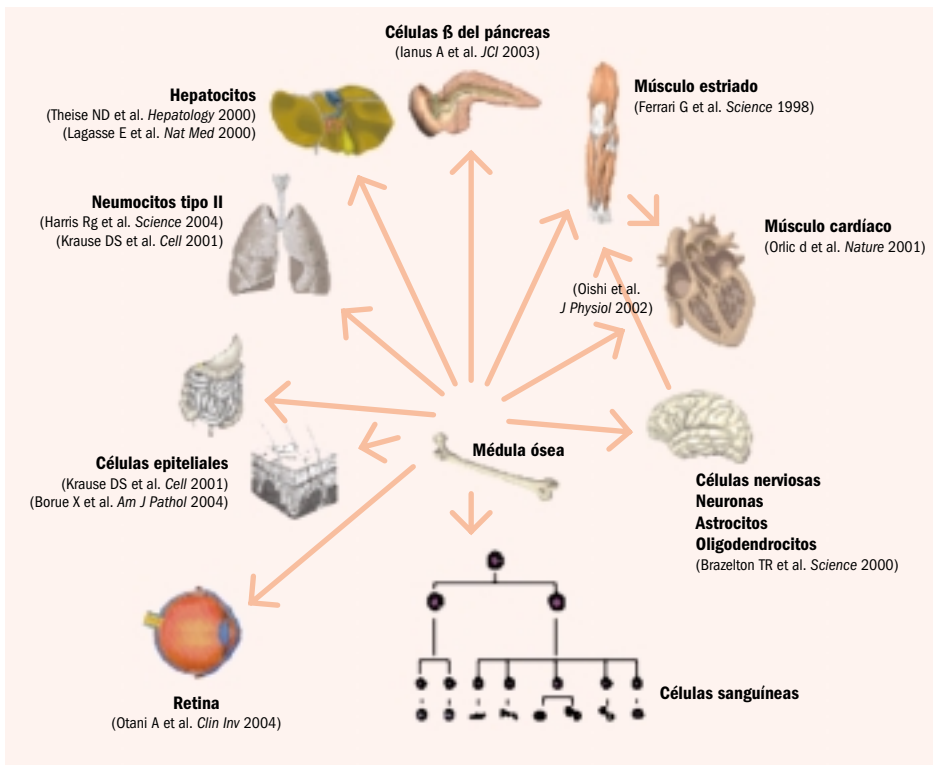


Figura 2. Representación de los diferentes tipos celulares que se han originado a partir de la médula ósea. En cada caso se indica referencia bibliográfica en la que se ha descrito.

narias con la información genética del paciente a tratar y que no serían, por tanto, rechazadas. Esta técnica tiene un gran inconveniente que es la baja eficiencia con la que se generan éstas.

— Por último, la utilización de células madre embrionarias ha abierto toda una discusión ética y social, siendo rechazada por una importante fracción de la sociedad, y cuyo principal impedimento reside en la necesidad de destruir un embrión para la obtención de las células madre embrionarias. Si este embrión es ya un ser humano o no, es la discusión que subyace en uno u otro punto de vista.

Células madre adultas

Se denominan células madre adultas a células residentes en los órganos adultos que poseen la capacidad de diferenciarse hacia los diferentes tipos celulares (linajes) del tejido en el que se encuentran. Las principales funciones de estas células madre adultas son la renovación del tejido, fruto de la necesidad de recambio celular o de deterioro del tejido y la reparación de éste. Tejidos clásicos en los que se ha estudiado esta población de células madre adultas son el tejido hematopoyético y la epidermis, aunque se han identificado células madre adultas en músculo, hígado, cerebro, etcétera. Tomando un ejemplo, el sistema hematopoyético evidencia con claridad la función de las células madre hematopoyéticas en la regeneración del sistema. En un día, el cuerpo humano necesita generar por cada kilogramo de peso corporal del orden de 1.000 millones de granulocitos, encargados de la defensa del organismo contra infecciones, 2.500 millones de eritrocitos, encargados del transporte de gases por el organismo, y un número similar de plaquetas, necesarias para la reparación continua de vasos sanguíneos. Todas estas células se generan a partir de una pequeña población de células madre, residentes en la médula ósea (MO) y que supone entre el 0,01-0,05% del total de las

del desarrollo embrionario mantienen la capacidad de poderse diferenciar hacia cualquier tipo celular del organismo adulto. Poseen una altísima capacidad de proliferación. De hecho, pueden ser mantenidas en cultivo *in vitro*, expandidas e incluso manipuladas genéticamente sin perder sus propiedades de totipotencia. En ratones, su manipulación ha dado lugar, por ejemplo, a la generación de animales en los que se ha eliminado un determinado gen o se ha modificado específicamente para reproducir en este animal una determinada enfermedad humana (los llamados ratones *knock-out* y *knock-in*). La generación y cultivo *in vitro* de células embrionarias humanas ha sido mucho más difícil y solo recientemente se han conseguido mantener en condiciones adecuadas. No obstante, las células madre embrionarias presentan una serie de inconvenientes a la hora de su utilización:

— Son teratogénicas, es decir, trasplantadas *in vivo* no responden a las señales celulares del adulto y generan teratomas, tumores de una gran agresividad y que están formados por células de múltiples tejidos diferentes.

— Son inmunogénicas ya que poseen su propia firma genética inmunológica y van a ser reconocidas como extrañas por

un organismo diferente. En un principio se pensó que dada la primitividad de estas células, los genes que codifican las proteínas encargadas del reconocimiento inmunológico, los llamados antígenos de histocompatibilidad, no se habían empezado a expresar. Sin embargo, se ha demostrado que esto no es así y que estos genes ya se expresan en células madre embrionarias. Para paliar este problema se han propuesto varias alternativas. Una de ellas es la creación de un banco de células madre embrionarias gigante que pudiese cubrir todas las posibles combinaciones. Sin embargo, esto supondría disponer de al menos 12 billones de tipos de células madre embrionarias diferentes, sólo para la raza caucásica y sin tener en cuenta los fenómenos de recombinación somática, mutaciones puntuales y conversión genética. Esto es algo impensable de realizar. Otra propuesta ha sido la de generar células embrionarias a las que se les eliminase precisamente los genes de histocompatibilidad. Pero estos genes son también necesarios para otras funciones celulares, pudiendo comprometerse su funcionamiento. Una tercera posibilidad es la tan discutida clonación terapéutica. Siguiendo técnicas de transferencia de núcleos, se podrían generar células embrio-



A la izquierda, una de las investigadoras del grupo de hematopoyesis, genotipando ratones deficientes en genes que originan enfermedades humanas. A la derecha, arriba, uno de los técnicos del laboratorio de citometría manejando cultivos celulares. Abajo, instalaciones para el mantenimiento de animales inmunodeficientes.

células presentes en ella. Estas células, por sucesivos eventos de proliferación y diferenciación, generan un grupo de células, denominadas precursores comprometidos, que siguen manteniendo capacidades proliferativas, pero que ya no pueden automantenerse, es decir, no pueden dar lugar a células iguales a sí mismas al dividirse, sino que generan células más diferenciadas. Una gran proliferación de estos precursores comprometidos es la que genera el total de células diferenciadas funcionales finales, necesarias para la vida diaria del individuo. La identificación, purificación y demostración funcional de la capacidad de regeneración de esta pequeña población ha sido ampliamente demostrada y utilizada. La identificación de células con capacidades similares en el resto de tejidos y órganos adultos ayudaría al abordaje de terapias regenerativas específicas.

Sin embargo, recientemente se han obtenido datos que rompen el dogma de que una célula madre adulta está restringida al órgano en el que se aloja y que han hecho que el interés por las células madre adultas haya crecido. Como ya hemos expuesto, uno de los primeros eventos en el desarrollo embrionario de los animales vertebrados es la especificación de las tres

capas germinales embrionarias: ectodermo, que dará lugar a la piel y sistemas neurales; mesodermo, que dará lugar a las células sanguíneas, hueso, músculo, cartílago y tejido adiposo; y el endodermo, que originará al aparato respiratorio y el tracto digestivo y sus órganos (ver figura 1 en página 21). Aunque el momento preciso en el que una célula se compromete hacia un determinado linaje o capa embrionaria no es bien conocido, existía la noción de que esta especificación era irreversible y se mantenía a lo largo de toda la vida del individuo. Se pensaba que las células madre adultas también cumplían esta premisa, de manera que éstas eran las encargadas de generar todas las células del órgano en el que residían y sólo de ese órgano. Sin embargo, múltiples evidencias obtenidas recientemente han demostrado que bajo determinadas circunstancias, células pertenecientes a un determinado órgano pueden dar lugar a células funcionales de otro órgano, aún cuando éste procediera de una diferente capa embrionaria. A este fenómeno se le ha denominado "transdiferenciación" y se ha definido como la capacidad de células pertenecientes a un determinado tejido u órgano de dar lugar a células funcionales de otro tejido. La evidencia de que determinadas poblaciones

celulares pueden transdiferenciar ha creado el concepto de plasticidad de las células madre, que propone que la determinación embrionaria de las células madre específicas de linaje no es tan estricta y que puede ser modulada en respuesta a posibles señales regenerativas emitidas por el microambiente de un tejido u órgano dañado. Este concepto de regeneración no es nuevo y ya fue postulado por los propios escritores del *Génesis* al crear a Eva a partir de un tejido adulto, la costilla de Adán. De hecho, estos fenómenos ocurren en el reino animal. Así en equinodermos y en urodelos anfibios, la pérdida de una parte del cuerpo (pata, cola, ojo, mandíbula, estructuras cardíacas) es regenerada gracias a la plasticidad inducida en determinadas células adultas.

La médula ósea se ha revelado como la población con mayor potencial de transdiferenciación. La demostración de que células de la médula ósea, productoras de las células sanguíneas, pueden contribuir a generar células funcionales de multitud de tejidos no hematopoyéticos se ha llevado a cabo marcando las células productoras de la sangre, las células madre hematopoyéticas, y toda su progenie y analizando después esa marca en células pertenecientes a órganos

no hematopoyéticos. Así, se han encontrado células marcadas en la piel, epitelio pulmonar, epitelio intestinal, epitelio renal, parénquima hepático, páncreas, músculo esquelético, endotelio, miocardio, retina y neuronas del sistema nervioso central en el cortex y cerebelo (ver figura 2 en página 22). La incidencia de este fenómeno es muy variable, desde menos del 0,1% a casi el 20% de células del total del tejido analizado. En la mayor parte de los casos ha sido necesario que existiera daño tisular en los tejidos diana para que se observaran estos fenómenos, que en algunas ocasiones han llegado a rescatar enfermedades generadas por el malfuncionamiento del órgano diana.

En nuestro laboratorio hemos establecido un modelo murino de cirrosis hepática y hemos demostrado que en este modelo se produce también una contribución de células derivadas de la médula ósea en el tejido hepático dañado. También hemos demostrado que esta contribución puede aumentarse mediante tratamientos que aumentan el número de células sanguíneas en el organismo. Estas evidencias abren la puerta a una posible modulación de los procesos de plasticidad de células adultas y de su posible utilización terapéutica en medicina regenerativa (figura 3).

Otro tipo de células madre adultas y también residentes en la médula ósea son las células mesenquimales (MSC), también llamadas células madre estromales. Fueron descritas por primera vez en 1976 por A. Friedenstein en la antigua Unión Soviética. Son progenitores no-hematopoyéticos multipotentes con capacidad de autorrenovación. Las células mesenquimales son capaces de diferenciarse hacia tejidos de linaje mesodérmico, como el tejido óseo, el tejido cartilaginoso y el tejido adiposo. Trabajos más recientes han demostrado que estos progenitores se pueden diferenciar hacia miocitos, hepatocitos y células gliales, lo que sugiere la posibilidad de que estas células puedan comportarse como células madre pluri-potenciales. Se han aislado principalmente en médula ósea adulta donde representan un 0,01-0,001% del total de las células. Otras fuentes de obtención de células

mesenquimales han sido la sangre periférica, los lipoaspirados, el cordón umbilical, la placenta, y el hígado fetal. Estas células son atractivas candidatas para su uso clínico, porque se expanden rápidamente en cultivo y también, por su carácter multipotente y por su susceptibilidad a la manipulación genética. Se han empleado en ensayos clínicos para el tratamiento de la osteogénesis imperfecta y de enfermedades metabólicas como el síndrome de Hurler y la leucodistrofia metacromática, así como para prevenir y tratar la enfermedad de la reacción inmunológica del injerto contra el huésped en el trasplante alogénico de médula ósea.

La utilización de células madre adultas plantea una serie de ventajas respecto a las células embrionarias. Carece de las implicaciones éticas que supone la obtención de células madre embrionarias. Minimiza los riesgos de crecimiento incontrolado, con posible generación de tumores, de las células primitivas. El trasplante de células madre adultas lleva muchos años aplicándose en la clínica, como es el caso del trasplante de médula ósea en enfermedades hematológicas. Por último, al obtenerse las células del mismo paciente, la información genética es la misma, evitándose así todos los posibles problemas de rechazo o de reconocimiento del receptor como extraño por parte de las células trasplantadas. Por el contrario, la potencialidad de las células madre adultas para producir cualquier tipo celular no está claramente demostrada, hecho que si lo está en el caso de las células madre embrionarias.

Otro problema a resolver deriva de la posible inestabilidad genética de las células que necesitan ser cultivadas durante largos periodos de tiempo para la producción de un número suficiente de células para su aplicación. Éste era un problema que parecía que las células madre adultas más indiferenciadas no presentaban, ya que se pensaba que tenían mecanismos específicos para evitarlos. Sin embargo, recientemente se han obtenido evidencias que demuestran que esto ocurre en determinados casos, hecho que obligará a un continuo seguimiento de las poblaciones en cultivo que fuesen a ser posteriormente infundidas en pacientes.

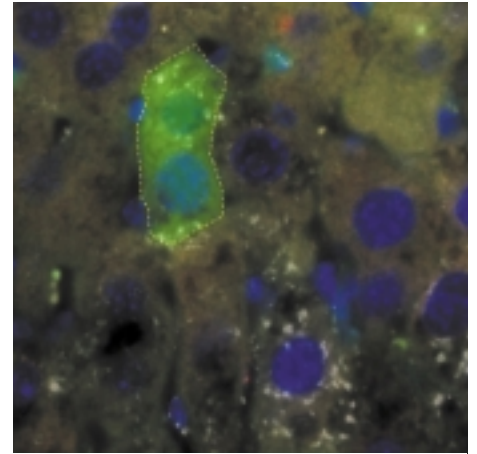


Figura 3. Ejemplo de células hepáticas expresando la proteína verde fluorescente, marcador que indica su procedencia de células de la médula ósea. Se puede ver un hepatocito binucleado (azul), delimitado por la línea discontinua amarilla, expresando la albúmina (blanco), proteína que se expresa exclusivamente en hepatocitos, y la proteína verde fluorescente (verde).

Por otro lado, el hecho de poder mantener en cultivo durante un tiempo más o menos largo a estas poblaciones celulares permitirá la combinación de las tecnologías de terapia celular y medicina regenerativa con otras tecnologías como la terapia génica. De esta forma, se podrán manipular las células a trasplantar para que expresen proteínas que mejoren la patología a tratar (figura 4). De hecho, terapia celular con células madre hematopoyéticas se lleva haciendo desde hace más de 35 años mediante trasplantes de médula ósea. En la actualidad, la transducción de células madre hematopoyéticas con vectores virales está muy desarrollada y hay ya ensayos clínicos avanzados de terapia génica con células madre hematopoyéticas para el tratamiento de enfermedades hematológicas hereditarias. La combinación de las propiedades plásticas de las células madre hematopoyéticas con protocolos de terapia génica podría facilitar la expresión de genes de interés en órganos diana no hematopoyéticos, de más difícil acceso o en los que es más difícil introducir genes.

Manipulación de los procesos de regulación de la expresión génica

Ya hemos comentado que el desarrollo embrionario está estrictamente regulado por la expresión ordenada de toda una

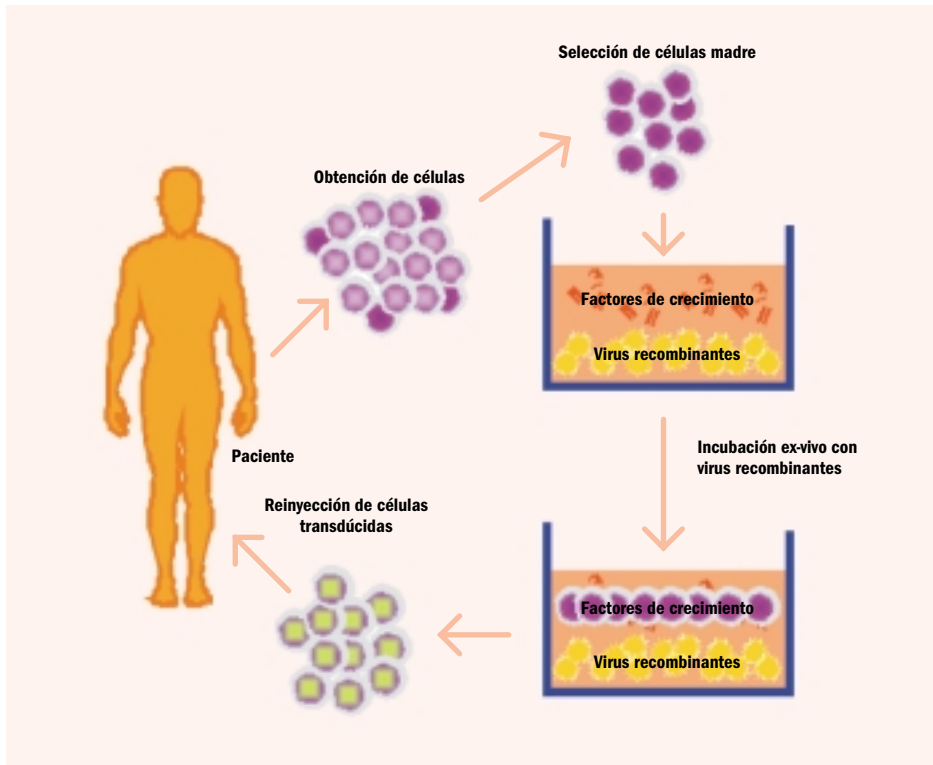


Figura 4. Esquema de un protocolo de terapia génica. Las células madre de interés son purificadas en infectadas *ex vivo* con vectores virales portando los genes de interés. Las células que han incorporado el transgén son posteriormente reinfundidas en el paciente que puede haber sido acondicionado para favorecer el implante de las células manipuladas.

serie de genes. También hemos expuesto que durante los fenómenos de transdiferenciación se silencia un determinado programa genético de un tejido y se induce la expresión de un programa genético nuevo. El conocimiento de los genes implicados en esta regulación y del papel que desempeñan permitiría su utilización para el encendido o apagado del programa genético de interés. Como ejemplo, hace algunos años el grupo de J.C. Ispizua-Belmonte consiguió que un embrión de pollo desarrollara una extremidad ectópica por efecto de la sobreexpresión de un gen regulador del desarrollo embrionario en células en las que no se expresaba de manera natural. De esta forma, el tratamiento localizado con factores determinados podría inducir la desdiferenciación o transdiferenciación de células vecinas a la lesión para regenerar la zona dañada.

La industrialización de las células madre
Con todas estas expectativas, el interés de la industria farmacéutica por estas tecnologías es muy importante. Para hacer-

nos una idea de la dimensión del fenómeno, si escribimos "stem cells" en el buscador Google™, nos aparecen más de 6 millones de entradas. En términos económicos, podemos citar el caso del estado de California que aprobó en 2004 un presupuesto de 3.000 millones de dólares para la investigación con células madre embrionarias.

Algo similar ocurre con la posible utilización de las células madre adultas mesenquimales. Por ejemplo, la empresa San Diego-based Macropore Biosurgery está desarrollando un procedimiento para la extracción e inmediata reinfusión de células madre derivadas de lipoaspirados (CMDL) para el tratamiento de infarto de miocardio. Otra compañía, en este caso japonesa, está intentando utilizar esta misma fuente de células en cirugía plástica para aumento de pecho e incluso para reconstrucción tras mastectomía. Osiris Therapeutics (Baltimore, USA), una compañía pionera en el uso de células madre mesenquimales lleva ya más de seis años trabajando en la utilización de estas célu-

las para regenerar hueso, cartilago y otros tejidos.

En España, el desarrollo de empresas biotecnológicas basadas en la utilización de algún tipo de célula madre es muy incipiente. La empresa Cellerix del grupo Genetrix es pionera en España y en toda Europa en la utilización de células mesenquimales derivadas de lipoaspirados, siendo los proveedores de un ensayo clínico para el tratamiento y ayuda a la cicatrización de fistulas relacionadas con enfermedad de Crohn. Este ensayo clínico, en estos momentos en fase II sobre un grupo de 50 personas constituye, posiblemente, la primera aplicación directa sobre humanos de las células mesenquimales derivadas de lipoaspirados.

Uno de los problemas a solventar para la utilización masiva de las células madre en clínica deriva de la posibilidad de patentar su uso. En este sentido, aún cuando las células en sí no pueden ser objeto de patente, sí podría serlo una aplicación concreta. En otros casos, lo que podría ser objeto de patente sería un tipo de manipulación *in vitro* mediante procedimientos determinados y medios de cultivo precisos. En un caso, la aplicación, y en el otro, el procedimiento podrían ser sujetos a patente.

En definitiva, es de esperar en los próximos años una auténtica avalancha de posibles aplicaciones de las células madre, de diferentes desarrollos y de nuevas empresas que hagan que la llamada terapia regenerativa pase a ser una auténtica especialidad médica que nos permita abordar enfermedades incurables en la actualidad. ■

■ Bibliografía relevante

- Bueren J.A., Guenechea G., Casado J.A., Lamana M.L., Segovia J.C. *Genetic modification of hematopoietic stem cells: recent advances in the gene therapy of inherited diseases*. Arch Med Res. 2003;34:589-599.
- Sell S. *Stem Cells Handbook*. New Jersey, USA: Humana Press Inc.; 2004
- *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*. NIH Report. <http://stemcells.nih.gov>.
- Wagers A.J., Weissman I.L. *Plasticity of adult stem cells*. Cell. 2004;116:639-648.

Methods and Findings

in Experimental and Clinical Pharmacology

Volume 27, Suppl. 1, 2005



PROUS SCIENCE
BARCELONA · PHILADELPHIA

Efecto de la movilización de precursores hematopoyéticos en la generación de hepatocitos

O. Quintana-Bustamante¹, A. Álvarez-Barrientos², I. Fabregat³, J.A. Bueren¹ y J.C. Segovia¹

¹Programa de Terapia Génica de la Hematopoyesis, CIEMAT, Madrid; ²Unidad de Citometría, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid; ³Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

RESUMEN

Recientemente se ha descrito que bajo determinadas condiciones de daño tisular, la médula ósea, aparte de generar y mantener las células sanguíneas, tiene la capacidad de generar células funcionalmente activas de otros tejidos no hematopoyéticos, tales como el hígado, corazón, músculo o pulmón. La producción de células hematopoyéticas está finamente regulada por diversos factores de crecimiento hematopoyéticos e interacciones con el estroma medular. Algunos de estos factores de crecimiento tienen la capacidad de aumentar el número de células hematopoyéticas en el torrente sanguíneo, movilizando también células madre hematopoyéticas. En el presente trabajo hemos investigado si la movilización de células de la médula ósea mediante factores de crecimiento hematopoyéticos puede incrementar la generación de hepatocitos derivados de la médula ósea. Para su estudio se indujo cirrosis crónica mediante inyección semanal de tetracloruro de carbono en ratones cuyas células derivadas de la médula ósea expresaban la proteína verde fluorescente (EGFP). En los ratones tratados se observó un marcado desbalance en los parámetros hepáticos plasmáticos y una estructura hepática alterada. El tratamiento con G-CSF de estos ratones aumentó de dos a tres veces el número de células hematopoyéticas infiltradas en el hígado. La identificación de hepatocitos derivados de la médula ósea se realizó mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. En los animales cirróticos, el porcentaje de hepatocitos derivados de la médula ósea fue de 1/250.000 hepatocitos totales. Sin embargo, la movilización con G-CSF causó un aumento de unas 15 veces en el porcentaje de hepatocitos derivados de la médula ósea. Estos resultados demuestran que la movilización de células desde la médula ósea a sangre periférica incrementa significativamente la presencia de hepatocitos derivados de la médula ósea en hígados dañados.

INTRODUCCIÓN

Se han definido las células madre, o células *stem*, como células con capacidad de autorrenovación, multidiferenciación y mantenimiento a lo largo de toda la vida del individuo. En el organismo adulto, diferentes tejidos mantienen una pequeña población de estas células con capacidad de proliferar y diferenciar hacia los diversos tipos celulares del tejido al que pertenecen. Su misión es regenerar el órgano o tejido conforme las células que lo componen mueren o tras sufrir daño tisular (1). Tejidos clásicos en los cuales se ha estudiado esta población son el tejido hematopoyético y la epidermis, aunque se han identificado células madre en músculo, hígado, cerebro, etc. Sin embargo, recientemente se han obtenido datos que rompen el dogma de que una célula madre adulta está restringida al órgano en que se aloja. Así, se ha descrito que células pertenecientes a un determinado tejido u órgano que expresan marcadores de dicho tejido son capaces, bajo determinadas circunstancias, de dar lugar a células de otro tejido, completamente distinto, con pérdida de marcadores específicos del tejido original, y adquisición de marcadores y funciones del nuevo tejido. A este fenómeno se le ha denominado transdiferenciación o plasticidad de células madre (2).

La médula ósea se ha revelado como la población con un mayor potencial de transdiferenciación. La demostración de que células de médula ósea pueden contribuir a generar células funcionales de multitud de tejidos no hematopoyéticos se ha llevado a cabo después de transferir células madre hematopoyéticas a huéspedes letalmente irradiados, y a menudo dañados en el tejido a estudiar (2, 3). Así, se ha descrito la expresión de marcadores genéticos derivados del donante de las células madre hematopoyéticas en células no hematopoyéticas de la piel (4, 5), epitelio pulmonar (4, 6), epitelio intestinal (4), epitelio renal (7), parénquima hepático (4, 8-11), páncreas (12),

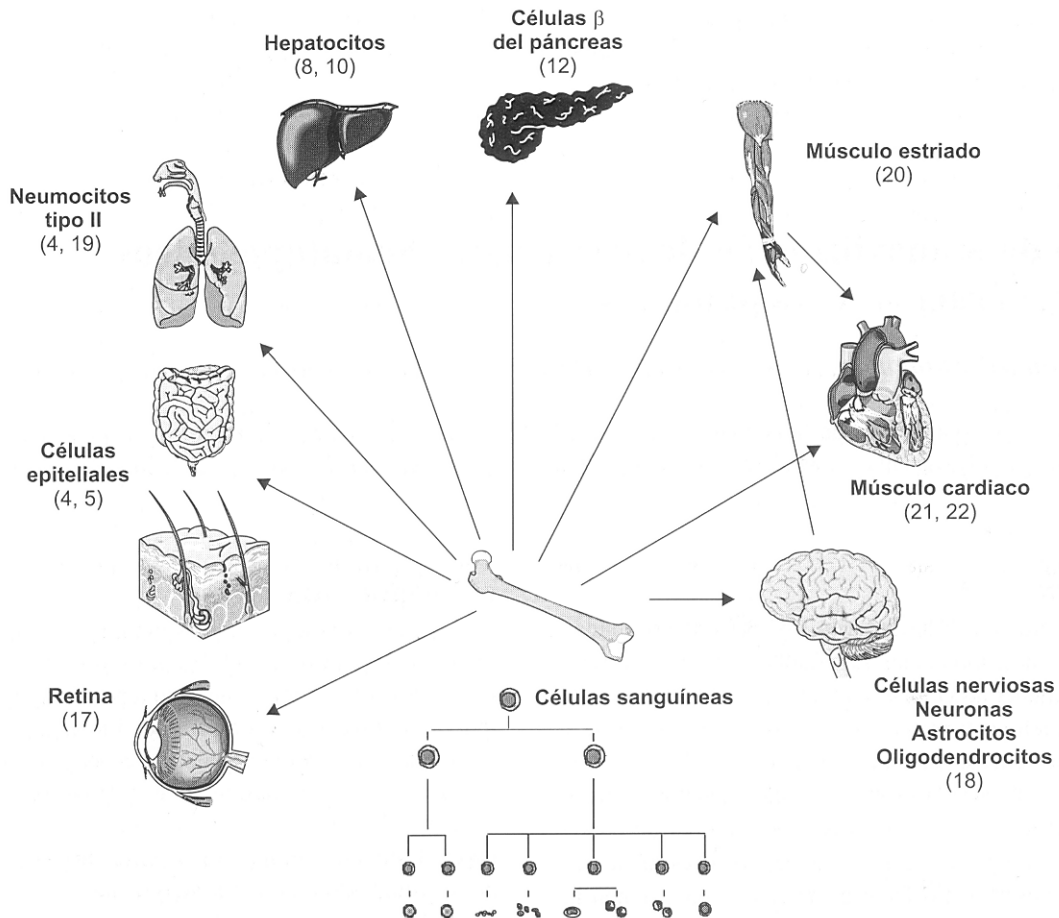


FIG. 1. Esquema de los diferentes órganos no hematopoyéticos en los que se ha descrito contribución de células derivadas de la médula ósea a su regeneración. Entre paréntesis, citas bibliográficas en las cuales se describe su caracterización.

músculo esquelético (13, 14), endotelio (15), miocardio (16), retina (17) y neuronas del sistema nervioso central en el córtex y cerebelo (18) (Fig. 1). La incidencia de este fenómeno es muy variable, desde menos del 0,1% a casi el 20% de células transdiferenciadas del total del tejido diana (2, 3). En la mayor parte de los casos ha sido necesario que existiera daño en los tejidos diana para que se observaran fenómenos de transdiferenciación (8), que en algunas ocasiones han llegado a rescatar enfermedades generadas por el mal funcionamiento del órgano hacia el que las células se han transdiferenciado (8, 23, 24).

Las primeras evidencias sobre la existencia de fenómenos de plasticidad se llevaron a cabo en el tejido hepático. El análisis de los hígados de ratones hembra letalmente irradiados y trasplantados con células de médula ósea procedente de ratones macho singénicos reveló la presencia de hepatocitos con el cromosoma Y en su genoma (10). Estos resultados fueron corroborados posteriormente en humanos que habían sido sometidos a trasplante de médula ósea como tratamiento de enfermedad hema-

tológica (25). Sucesivos planteamientos demostraron que una población altamente purificada de células madre hematopoyéticas no sólo reconstituía la hematopoyesis de ratones letalmente irradiados y defectivos en una enzima hepática—fumaril acetoacetato hidrolasa (FAH)—necesaria para la vida del animal, sino que además repoblaba el hígado enfermo y restauraba valores normales de transaminasas (8). Esta repoblación del tejido hepático también se ha demostrado en otros modelos de lesión hepática (9, 26, 27).

Estudios posteriores han explicado estos procesos como resultado de fusión *in vivo* entre células exógenas hematopoyéticas normales y endógenas enfermas, con silenciamiento del programa de expresión génica hematopoyético y expresión del programa del órgano diana (28, 29). En estos casos, la población de monocitos se ha descrito como la causante de los fenómenos de fusión (30). De cualquier modo, se han abierto grandes expectativas sobre la posibilidad de utilizar células procedentes de la médula ósea, de fácil obtención y de las que se dispone

de un gran conocimiento sobre su manipulación, cultivo *in vitro* y modo de trasplante, para el tratamiento tanto de enfermedades hematológicas como no hematológicas.

Es bien conocido que el tratamiento sistémico con determinados fármacos o con factores de crecimiento hematopoyético produce una movilización de progenitores hematopoyéticos y células madre hematopoyéticas de la médula ósea a la sangre periférica, con un incremento significativo del número de células hematopoyéticas totales circulantes (31). De todos, el factor de crecimiento hematopoyético G-CSF es el mejor conocido y más utilizado en la práctica clínica. Estos tratamientos se han utilizado extensivamente para la obtención de productos hematopoyéticos para trasplante. También se emplean tratamientos con factores de crecimiento para paliar determinadas anemias y leucocitopenias, inducidas como resultado de un trasplante de médula ósea o debidas a enfermedades hematológicas, como displasias, anemia crónica... En el presente estudio nos preguntamos si el incremento en el número de células circulantes producido por el tratamiento con G-CSF incrementaría la contribución de células derivadas de la médula ósea en la recuperación de un daño hepático, similar a una cirrosis crónica. Hemos demostrado que la movilización con G-CSF se correlaciona con un incremento en la presencia de hepatocitos procedentes de la médula ósea.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desarrollo de un modelo murino de cirrosis crónica en ratones con células de la médula ósea marcadas genéticamente

Para el estudio de los fenómenos de transdiferenciación/fusión desarrollamos un modelo en que todas las células hematopoyéticas y las descendientes de éstas estaban marcadas genéticamente. En la Fig. 2 se muestra un esquema del protocolo experimental seguido. Ratones que expresaban el marcador panleucocitario murino Ly-5.1 fueron letalmente irradiados y trasplantados con 10^7 células totales de médula ósea procedentes de ratones que expresaban el marcador panleucocitario Ly-5.2 y transgénicos expresando la proteína verde fluorescente

(EGFP) bajo el promotor de la β -actina, activo en todas las células del organismo. De esta forma, se generaron ratones quiméricos donde todas las células derivadas de la médula ósea, tanto hematopoyéticas como no hematopoyéticas, eran identificables por la expresión de la EGFP. Tres meses después del trasplante, los animales mostraban una hematopoyesis estable y positiva para el marcador hematopoyético exógeno (Ly-5.1) y para la EGFP, con más del 90% de la hematopoyesis procedente de las células trasplantadas.

La inducción de daño hepático se llevó a cabo mediante la administración intraperitoneal continuada (una vez por semana durante tres meses) de tetracloruro de carbono (CCl_4) (32). Al final del protocolo se evaluaron parámetros plasmáticos y se comprobó una alteración respecto a valores normales de transaminasa glutámico pirúvica (89,8 frente a 6,17; $p < 0,05$), enzima transaminasa glutámico oxalacética (197,55 frente a 49,33; $p < 0,05$) y bilirrubina (0,309 frente a 0,138; $p < 0,05$). El análisis histológico de los hígados mostró grandes células con inclusiones citoplásmicas, incremento de infiltración linfocitaria y áreas de inflamación y pérdida de glucógeno celular. En conjunto, se demostraba que el tratamiento a los ratones trasplantados con CCl_4 inducía un daño hepático grave que se asemejaba a una enfermedad cirrótica crónica.

Identificación de células hematopoyéticas infiltradas en los hígados enfermos

Nuestro siguiente objetivo fue identificar células hematopoyéticas en los hígados de los ratones cirróticos. Para ello, cortes de tejido hepático fueron marcados con anticuerpos que reconocían células hematopoyéticas y la proteína transgénica EGFP. Se observó una cantidad de células exógenas muy elevada, en torno al 30%, debido fundamentalmente a los procesos de necrosis hepática e inflamatorios asociados. Estas células hematopoyéticas en el hígado de los ratones cirróticos aumentó hasta un 50% las células del hígado cuando los ratones fueron sometidos a un protocolo de movilización utilizando el factor de crecimiento G-CSF, comprobándose que el incremento de células y precursores hematopoyéticos circulantes se re-

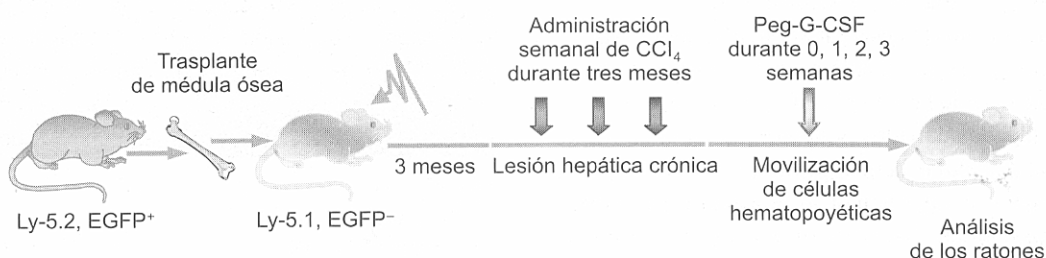


FIG. 2. Diagrama de protocolo experimental utilizado.

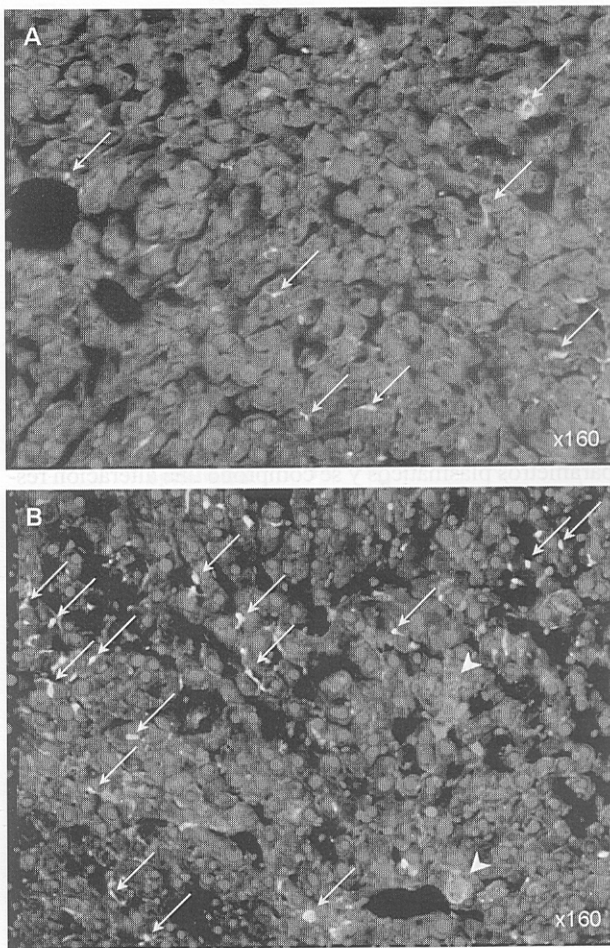


FIG. 3. Presencia de células hematopoyéticas derivadas de las células trasplantadas en el hígado de ratones tratados con CCl₄ y no movilizados (A) o movilizados durante tres semanas con G-CSF (B). Criocortes analizados mediante inmunofluorescencia para la identificación de EGFP, Ly-5 (CD45 murino) y núcleos celulares (tinción con DAPI). (Flechas finas: células hematopoyéticas infiltradas expresando el marcador EGFP; cabezas de flecha gruesas: focos de infiltración hematopoyética con acúmulos de células hematopoyéticas.)

flejaba en un claro incremento de las células hematopoyéticas infiltradas en los hígados dañados (Fig. 3).

Identificación de hepatocitos funcionales procedentes de células de la médula ósea

Dadas las evidencias descritas sobre la capacidad plástica de las células de la médula ósea nos propusimos estudiar la presencia de hepatocitos derivados de la médula ósea en los hígados dañados, y determinar si el aumento en el número de células hematopoyéticas influía también en la aparición de células hepáticas procedentes de la médula ósea trasplantada. Para contabilizar una célula como transdiferenciada se establecieron los siguientes requisitos: 1) expresar el transgén EGFP (analizado por inmu-

nofluorescencia); 2) poseer morfología de hepatocito (células grandes con un citoplasma regular, núcleos grandes y en ocasiones varios núcleos); 3) no expresar marcadores de diferenciación hematopoyética tales como el antígeno panleucocitario CD45 (analizado por inmunofluorescencia); 4) poseer funcionalidad hepática, tal como la capacidad de almacenar glucógeno (analizado por tinción con PAS) o expresar proteínas específicas de hepatocitos (Fig. 4). Siguiendo estas condiciones encontramos que en los hígados dañados la presencia de hepatocitos derivados de la médula ósea era muy baja, en torno a 1/250.000 hepatocitos. Estos datos están en consonancia con los reportados por otros autores (33) y confirman que, aunque existente, la generación de hepatocitos derivados de la médula ósea es un suceso de muy baja frecuencia. Cuando se analizaron los animales tratados con G-CSF se observó un incremento de hepatocitos derivados de la médula ósea directamente proporcional al número de semanas de tratamiento con el factor de crecimiento. Estos resultados sugieren que la movilización de células madre hematopoyéticas a la circulación favorece la aparición de hepatocitos derivados de la médula ósea. En la actualidad se está analizando si los hepatocitos generados en este modelo experimental son fruto de la capacidad plástica de las células madre hematopoyéticas o se deben a fenómenos de fusión *in vivo*.

Aunque las conclusiones aquí obtenidas revelan que la aportación a la regeneración tisular de los hepatocitos derivados de la médula ósea es pequeña, estos resultados sugieren que los procesos de transdiferenciación/fusión podrían ser modulados. La utilización de procesos biológicos que den lugar a células funcionales de un tejido no



FIG. 4. Identificación de hepatocitos derivados de la médula ósea. Criocorte analizado como en la Fig. 3 en el que se observa un hepatocito cumpliendo los requisitos seguidos para su identificación (expresión de EGFP, no expresión de Ly-5 [CD45], morfología poligonal, núcleo grande, relación núcleo/citoplasma baja).

hematopoyético a partir de células de la médula ósea se revela como una posible arma terapéutica de gran potencialidad. El desarrollo de protocolos de potenciación de estos procesos podría facilitar la regeneración tisular en situaciones en que los mecanismos propios de reparación del tejido dañado *per se* se hubiesen agotado. Además, se permitiría la aplicación a órganos de difícil manipulación de tecnologías ya desarrolladas y de aplicación en el sistema hematopoyético, como sería el caso de la introducción de genes terapéuticos (terapia génica), pudiéndose facilitar la expresión de proteínas de interés en hígado o en cualquier otro tejido al que pudiesen derivarse las células madre hematopoyéticas.

AGRADECIMIENTOS

Óscar Quintana Bustamante es becario predoctoral del Programa de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

BIBLIOGRAFÍA

- Kaji, E.H., Leiden, J.M. *Gene and stem cell therapies*. JAMA 2001; 285: 545-550.
- Wagers, A.J., Weissman, I.L. *Plasticity of adult stem cells*. Cell 2004; 116: 639-648.
- Herzog, E.L., Chai, L., Krause, D.S. *Plasticity of marrow-derived stem cells*. Blood 2003; 102: 3483-3493.
- Krause, D.S. y cols. *Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell*. Cell 2001; 105: 369-377.
- Borue, X. y cols. *Bone marrow-derived cells contribute to epithelial engraftment during wound healing*. Am J Pathol 2004; 165: 1767-1772.
- Theise, N.D. y cols. *Radiation pneumonitis in mice: A severe injury model for pneumocyte engraftment from bone marrow*. Exp Hematol 2002; 30: 1333-1338.
- Kale, S. y cols. *Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule*. J Clin Invest 2003; 112: 42-49.
- Lagasse, E. y cols. *Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo*. Nat Med 2000; 6: 1229-1234.
- Petersen, B.E. y cols. *Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells*. Science 1999; 284: 1168-1170.
- Theise, N.D. y cols. *Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation*. Hepatology 2000; 31: 235-240.
- Wang, X. y cols. *Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells*. Blood 2003; 101: 4201-4208.
- Ianus, A., Holz, G.G., Theise, N.D., Hussain, M.A. *In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion*. J Clin Invest 2003; 111: 843-850.
- LaBarge, M.A., Blau, H.M. *Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury*. Cell 2002; 111: 589-601.
- Brazelton, T.R., Nystrom, M., Blau, H.M. *Significant differences among skeletal muscles in the incorporation of bone marrow-derived cells*. Dev Biol 2003; 262: 64-74.
- Grant, M.B. y cols. *Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization*. Nat Med 2002; 8: 607-612.
- Jackson, K.A. y cols. *Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells*. J Clin Invest 2001; 107: 1395-1402.
- Otani, A. y cols. *Rescue of retinal degeneration by intravitreally injected adult bone marrow-derived lineage-negative hematopoietic stem cells*. J Clin Invest 2004; 114: 765-774.
- Brazelton, T.R., Rossi, F.M., Keshet, G.I., Blau, H.M. *From marrow to brain: Expression of neuronal phenotypes in adult mice*. Science 2000; 290: 1775-1779.
- Harris, R.G., Herzog, E.L., Bruscia, E.M., Grove, J.E., Van Arnam, J.S., Krause, D.S. *Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia*. Science 2002; 305: 90-93.
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M. y cols. *Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors*. Science 1998; 279: 1528-1530.
- Oishi, K., Ogawa, Y., Gamoh, S., Uchida, M.K. *Contractile responses of smooth muscle cells differentiated from rat neural stem cells*. J Physiol 2002; 540: 139-152.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S. y cols. *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium*. Nature 2001; 410: 701-705.
- Gussoni, E. y cols. *Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation*. Nature 1999; 401: 390-394.
- Davidoff, A.M. y cols. *Bone marrow-derived cells contribute to tumor neovasculature and, when modified to express an angiogenesis inhibitor, can restrict tumor growth in mice*. Clin Cancer Res 2001; 7: 2870-2879.
- Theise, N.D. y cols. *Liver from bone marrow in humans*. Hepatology 2000; 32: 11-16.
- Terai, S. y cols. *An in vivo model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes*. J Biochem (Tokyo) 2003; 134: 551-558.
- Jang, Y.Y. y cols. *Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion*. Nat Cell Biol 2004; 6: 532-539.
- Wang, X. y cols. *Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes*. Nature 2003; 422: 897-901.
- Vassilopoulos, G., Wang, P.R., Russell, D.W. *Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion*. Nature 2003; 422: 901-904.
- Camargo, F.D., Finegold, M., Goodell, M.A. *Hematopoietic myelomonocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners*. J Clin Invest 2004; 113: 1266-1270.
- Molineux, G., Pojda, Z., Dexter, T.M. *A comparison of hematopoiesis in normal and splenectomized mice treated with granulocyte colony-stimulating factor*. Blood 1990; 75: 563-569.
- Rudolph, K.L. y cols. *Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery*. Science 2000; 287: 1253-1258.
- Kanazawa, Y., Verma, I.M. *Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver*. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100(Suppl. 1): 11850-11853.

Hematopoietic Mobilization in Mice Increases the Presence of Bone Marrow–Derived Hepatocytes Via *In Vivo* Cell Fusion

Oscar Quintana-Bustamante,¹ Alberto Alvarez-Barrientos,² Alexander V. Kofman,³ Isabel Fabregat,⁴ Juan A. Bueren,¹ Neil D. Theise,³ and José C. Segovia

The mechanisms for *in vivo* production of bone marrow–derived hepatocytes (BMDHs) remain largely unclear. We investigated whether granulocyte colony–stimulating factor (G-CSF)–mediated mobilization of hematopoietic cells increases the phenomenon. Recurrent liver injury in mice expressing green fluorescent protein (EGFP) in all hematopoietic-derived cells was produced by 3 months of carbon tetrachloride (CCl₄) injections. Histologically, there were necrotic foci with histiocyte-rich infiltrates, but little oval cell proliferation. Subsequently, some animals were mobilized with G-CSF for 1, 2, or 3 weeks. Animals were sacrificed 1 month after growth factor treatment. BMDH percentages were lower than previously reported, though G-CSF mobilization significantly augmented BMDH production in injured livers. BMDHs originating from *in vivo* fusion were evaluated by transplanting female EGFP⁺ cells into male mice. Binucleated, EGFP⁺ hepatocytes with one Y chromosome, indicating fusion, were identified. **In conclusion**, (1) mobilization of hematopoietic cells increases BMDH production and (2) as with the FAH-null model, the first model demonstrating hematopoietic/hepatocyte fusion, recurring CCl₄-induced injury has macrophage-rich infiltrates, a blunted oval cell response, and a predominantly *in vivo* fusion process for circulating cell engraftment into the liver. These findings open the possibility of using hematopoietic growth factors to treat nonhematopoietic degenerative diseases. *Supplementary material for this article can be found on the HEPATOLOGY website (<http://interscience.wiley.com/jpages/0270-9139/suppmat/index.html>). (HEPATOLOGY 2006;43:108-116).*

During recent years, the central tenet of developmental biology—that origin in the three embryonic germ layers rigidly determines subsequent differentiation—has been questioned as the result of a newly demonstrated potential of adult cells commonly

referred to as *cellular plasticity*. Plasticity describes the conversion of a cell from one tissue lineage to a completely different one, with a loss of specific markers and of previous functionality in the original tissue, and with the acquisition of markers and functions related to the new lineage.^{1,2} Bone marrow (BM) cells have extensively demonstrated this capability. This has been studied in lethally irradiated and transplanted hosts that were damaged in the target tissues.^{2,3} Expression of specific markers from BM donors has been described for nonhematopoietic cells in a broad range of tissues.^{1,4}

The incidence of plasticity has been shown to be very variable, from extremely rare events to between 20% and 40% of the tissue.² In the liver, different models of hepatic damage have been applied to demonstrate plasticity of hematopoietic cells to hepatocytes, with heterogeneous results.^{5,6} It is also clear that BM cells may help restore hepatic degenerative diseases.^{7,8} Hepatic⁹ and hematopoietic^{10,11} growth factors have been proved to increase the regenerative process after carbon tetrachloride (CCl₄) hepatic injury. Although the treatment can be beneficial, the contribu-

Abbreviations: BMDH, bone marrow–derived hepatocyte; G-CSF, granulocyte colony–stimulating factor; EGFP, expressing green fluorescent protein; BM, bone marrow; PBS, phosphate-buffered saline; DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; Y-ch, Y chromosome.

From the ¹Hematopoietic Gene Therapy Division, CIEMAT/M, Botín Foundation, Madrid, Spain; the ²Cytometry Unit, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain; the ³Liver and Stem Cell Research Laboratory, Beth Israel Medical Center, New York, NY; and ⁴IDIBELL-Institut de Recerca Oncològica (IRO), L'Hospitalet, Barcelona, Spain.

Received July 15, 2005; accepted October 19, 2005.

Supported in part by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia and Fondo de Investigaciones Sanitarias and National Institutes of Health Grant 5 R01 DK58559-04 (to N. D. T. and A. V. K.). O. Q.-B. is a predoctoral fellow of the Programa de Formación de Personal Investigador of the Ministerio de Educación y Ciencia.

Address reprint requests to: José C. Segovia, Hematopoietic Gene Therapy Program, CIEMAT, Av. Complutense, 22, 28040 Madrid, Spain. E-mail: jc.segovia@ciemat.es; fax: (34)-91-346-6484.

Copyright © 2005 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/hep.21005

Potential conflict of interest: Nothing to report.

tion of bone marrow–derived hepatocytes (BMDHs) to the injury repair is not completely understood.

Two primary mechanisms for the generation of non-hematopoietic tissues from circulating marrow–derived cells have been demonstrated: direct differentiation into mature cells of different tissues following engraftment and fusion between hematopoietic cells and differentiated cells of the target nonhematopoietic tissue. In either case, modulation of the hepatic potential of some BM-derived populations might be a useful means of treating liver disease and is therefore worth exploring for the development of alternative treatments of hepatic disorders in human patients.

Many different soluble factors regulate the proliferation and differentiation of the hematopoietic cells.¹² Some of these factors have the ability to mobilize hematopoietic progenitors and hematopoietic stem cells from the BM to the periphery, increasing the total number of circulating hematopoietic cells. In particular, granulocyte colony–stimulating factor (G-CSF) was the first factor described with this property.^{13–15} G-CSF mobilization of hematopoietic progenitors is widely used for hematopoietic transplantation.¹⁶ Very recently, it has been described that G-CSF treatment can speed the recovery after liver damage with CCl₄ in mice via endogenous hepatic mechanisms without contribution of BMDH.^{11,17}

In the present study, we show that treatment of CCl₄-hepatic damaged animals with G-CSF significantly increases the presence of hepatocytes derived from BM cells. Moreover, we demonstrate that in our model, the generation of these BMDHs occurs via *in vivo* cell fusion events between endogenous hepatocytes and hematopoietic cells.

Materials and Methods

Animals and Bone Marrow Transplants. Eight- to ten-week-old C57BL/6JxDBA/2 F1 mice (B6D2F1; CD45.2 phenotype) or B6.SJL-*Ptprc*^{a/b}*Pep*^{3b}/BoyJxDBA/2 female mice (P3D2F1; CD45.1 phenotype) were used as recipients of BM cells. Breeding pairs were bred at the CIEMAT animal facility. The F1 male mice of C57BL/6J-*βactinEGFP* (kindly provided by Dr. M. Okabe, Osaka, Japan) xDBA/2 (BDGF1; CD45.2 EGFP⁺ phenotype) were used as donors of BM cells. Recipients of BM transplants were irradiated with Philips MG324 X ray equipment (Philips, Hamburg, Germany). For *in vivo* fusion studies, the sex of donors and recipients were switched to facilitate the identification of the BMDH origin.

Recurring Hepatic Damage and Hematopoietic Cell Mobilization. Chimeric mice were treated with 10

mL of 10% CCl₄ (Fluka, Buchs, Switzerland) in olive oil per kilogram of body weight or with phosphate-buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) via intraperitoneal injection once a week over 3 months. Hepatic damage was confirmed via analysis of serum hepatic parameters with a Konelab 20 equipment (Termo Clinical LabSystems, Vataa, Finland).

For G-CSF treatment, 50 μg/mouse of pegylated G-CSF (Neulasta, Amgen, Breda, The Netherlands) in PBS/0.1% bovine serum albumin was administered weekly via subcutaneous injection. One weekly injection of pegylated G-CSF induces the same effect of a 12-hour injection for 5 days' protocol using nonpegylated G-CSF.^{18,19}

Tissue Collection. Animals were transcardially perfused with 10 mL cold PBS/20 mmol/L EDTA, followed by 25 mL cold 4% paraformaldehyde (Merck, Darmstadt, Germany)/PBS. Livers were excised and one part of each liver lobe was additionally fixed in 4% paraformaldehyde/PBS at 4°C. Samples were then incubated in 30% sucrose/PBS at 4°C overnight and kept in Optimal Cutting Temperature (OCT) solution (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Netherlands) at –70°C. The rest of each liver lobe was fixed in 4% formaline and paraffin-embedded.

Histological and Immunohistological Analysis. For liver histological studies, 5 μm paraffin-embedded sections were stained with hematoxylin-eosin. For immunohistochemistry in frozen tissue, 12–15 μm frozen sections were fixed in acetone, blocked with 5% fetal calf serum (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) in PBS, incubated with rabbit anti-GFP antibody (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) and a biotinylated rat anti-mouse CD45 (clone 30-F11; BD Bioscience Pharmingen, San Jose, CA), and washed and incubated with goat anti-rabbit labeled with FITC (Jackson Immunoresearch Laboratories, Cambridgeshire, UK) and avidin Texas Red (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Albumin and carcinoembryonic antigen were detected as indicated in supplemental material. Finally, sections were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and mounted in Mowiol solution.

To detect the presence of hepatocellular glycogen, periodic acid-Schiff staining (Merck, Darmstadt, Germany) was performed according to manufacturer's recommendations.

To identify oval cell reaction, staining for biliary-type cytokeratins was performed using broad spectrum rabbit anti-cow cytokeratin antibodies (panK; DakoCytomation, Carpinteria, CA) on paraffin-embedded, fixed tissue using standard techniques, and coloring with diaminobenzidine and Mayer's hematoxylin. The number of oval cells per portal tract were counted around the 25 smallest

portal tracts in each tissue section examined according to established protocol.²⁰

Fluorescence In Situ Hybridization. Five-micrometer slides were hybridized for Y chromosome identification according to the STARFISH manufacturer's protocol (Cambio, Cambridge, UK) (see supplemental material for details).

Quantification of BMDHs. Tissue sections were analyzed with an Axioplan 2 imaging fluorescent microscope (Zeiss, Jena, Germany) or with a Bio-Rad Radiance 2100 confocal microscope system (Zeiss). Quantification of BMDHs was performed by counting all the cells accomplishing the required characteristics (see Results) in each tissue section. At least four different tissue sections from two different lobes of each analyzed liver were evaluated. To estimate the total number of hepatocytes and infiltrating hematopoietic cells in each liver section, 5 to 8 random $\times 100$ images were counted and extrapolated to the total tissue section by multiplying by the total number of $\times 100$ images obtained per slide. The percentage of BMDHs was then obtained using the following formula: total number of BMDHs per tissue section/estimated number of total hepatocytes per tissue section.

Statistical Analysis. Data are expressed as the mean \pm SEM. Significance of differences was determined via nonparametric Wilcoxon Mann-Whitney W test and Kruskal Wallis test using Statgraphics software (Manugistics Inc., Rockville, MD).

Results

Evaluation of Damage With Continued CCl₄ Administration to Study the Contribution of BM Cells to the Regeneration of the Liver. For the development of a mouse model of hepatic damage (Fig. 1A), CD45.1 female mice were lethally irradiated and transplanted with 10⁷ total BM cells from male CD45.2 congenic mice, which also express EGFP under the control of the β -actin ubiquitous promoter. Exogenous hematopoietic engraftment was analyzed 1 and 3 months after BM transplantation. The percentage of blood donor cells (CD45.2⁺ and GFP⁺) was analyzed by flow cytometry. A mean percentage of $96.15 \pm 0.73\%$ CD45.2⁺ was observed in the recipient mice, indicating almost complete regeneration of the hematopoiesis from the exogenous cells. When the percentage of EGFP cells was analyzed, $79.36 \pm 0.72\%$ of total cells were EGFP⁺. Variations of EGFP expression were also confirmed in the liver of the donor animals, where 10% to 15% of hepatocytes did not express the transgene.

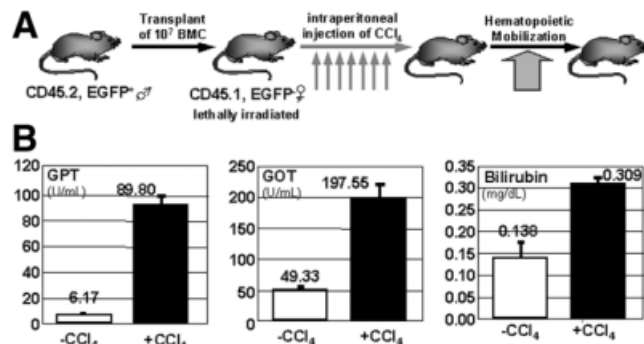


Fig. 1. Liver damage induced by continuous treatment with CCl₄. (A) Scheme of the experimental protocol used to induce chronic liver failure. (B) Hepatic parameters in plasma of untreated (white bars) and CCl₄-treated (black bars) at the end of chronic liver damage. BMC, bone marrow cells; EGFP, enhanced green fluorescent protein; GPT, glutamic-pyruvic aminotransferase; GOT, glutamic-oxaloacetic aminotransferase.

To induce an ongoing liver damage, 10 mL of 10% (v:v) CCl₄/kg of body weight was injected intraperitoneally every week for 3 months. Different plasma parameters such as glutamic-pyruvic aminotransferase, glutamic-oxaloacetic aminotransferase, and bilirubin were analyzed. As shown in Fig. 1B, glutamic-pyruvic aminotransferase values in CCl₄-treated mice were approximately 15 times higher than in nontreated mice, glutamic-oxaloacetic aminotransferase values increased nearly four times, and bilirubin values increased two times. Histological evaluation of hepatic slides (Fig. 2) showed that in contrast to nontreated mice, in which all hepatocytes had a similar size and there were few hematopoietic cells infiltrating the liver parenchyma (Fig. 2A), the livers of CCl₄-treated mice showed hepatocellular regeneration with prominent anisonucleosis and focal, scattered necrotic foci within the parenchyma without obvious zonal distribution (Fig. 2B). Cellular infiltrates in these foci were predominantly clustered histiocytes expressing the EGFP protein (Fig. 2C-D). No significant scarring or nodularity was present, thus a transition to cirrhosis was not observed.

Prominent oval cell reactions as are seen in many acute injury models like acetaminophen toxicity,²⁰ were not identified in response to CCl₄. Here, the highest number of oval cells per portal tract was twice normal, though not statistically significant (data not shown).

G-CSF Mobilization Increases the Number of Hematopoietic Cells Infiltrating the Liver Structure. To study whether the increase of total hematopoietic cells and hematopoietic stem cells in the circulation could increase the number of exogenous hematopoietic cells in the liver, groups of nontreated or CCl₄-treated animals were additionally treated with G-CSF for 1, 2, or 3 weeks. Between 3 and 6 animals/group were studied. In all mobilized animals, blood cell numbers increased 4 to 10

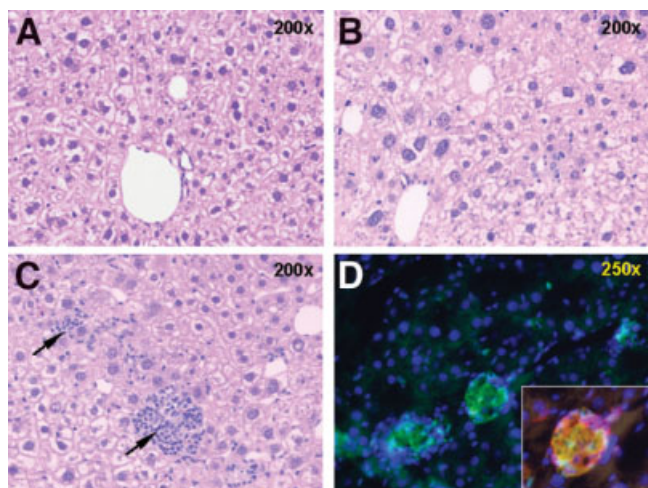


Fig. 2. Histological features induced by CCl_4 treatment. The micrographs show hematoxylin-eosin-stained liver sections from (A) untreated and (B-C) CCl_4 -treated animals. Large cells with (B) high nuclear variability and (C) hematopoietic infiltrations (arrows) can be seen. (D) EGFP (green) and DAPI nuclei staining (blue). Inset: CD45 (red) and EGFP plus CD45 expression (yellow) detected in the histiocytic nodules. Original magnification is shown in each panel.

times depending on the number of weeks with G-CSF treatment. One week after the last injection, animals were sacrificed, and the presence of hematopoietic cells in the liver was detected via immunofluorescence using anti-CD45 and anti-EGFP antibodies. To minimize the contamination with hematopoietic cells present in liver sinusoids, animals were extensively perfused with saline solution before fixation. In non-G-CSF-treated, as well as in mobilized animals, we observed the presence of EGFP⁺ cells (Figs. 2D, 3A, green). The majority of these cells were also CD45⁺ (Fig. 2A, yellow indicating colocalization of EGFP and CD45) demonstrating that they were hematopoietic cells. Clusters of these cells, probably macrophages by morphology, were also observed in the injured liver of CCl_4 -treated mice (Fig. 2D).

When we compared nontreated versus CCl_4 -treated animals, the level of hematopoietic cells (evaluated as CD45⁺ [red] cells/total liver cells) in damaged livers was increased (Fig. 3B). This hematopoietic infiltration was distributed mainly as cell groups, predominantly macrophages positive for the F4/80 monoclonal antibody (not shown), in necrotic areas in the CCl_4 -treated group, probably recruited from circulating monocytic precursors as part of the inflammatory response. In the nonmobilized group, the cells were distributed regularly, primarily in the liver sinusoids. When the animals were treated with G-CSF for 1, 2, or 3 weeks, a progressive increase of hematopoietic cells in the liver was observed that directly correlated with the number of weeks of G-CSF treatment (Fig. 3A-B).

Functional Hepatocytes Derived From the BM Are Detected in the Liver of CCl_4 -Treated Mice.

Due to the reported plasticity phenomena of hematopoietic cells, we next looked for BMDHs in the different groups. In the livers of CCl_4 -treated animals, we detected EGFP⁺ cells, which were large, polygonal, single, or multiple round nuclei often with prominent nucleoli and a moderate to low nucleus/cytoplasm ratio (*i.e.*, the typical morphology of hepatocytes). These cells appeared integrated into hepatocellular trabeculae and had an appearance identical to surrounding hepatocytes. They did not express the CD45 hematopoietic antigen (Fig. 4A). To confirm the complete absence of hematopoietic marker expression on these cells, we took confocal image sequences of these cells along the z-axis all the way through the tissue section

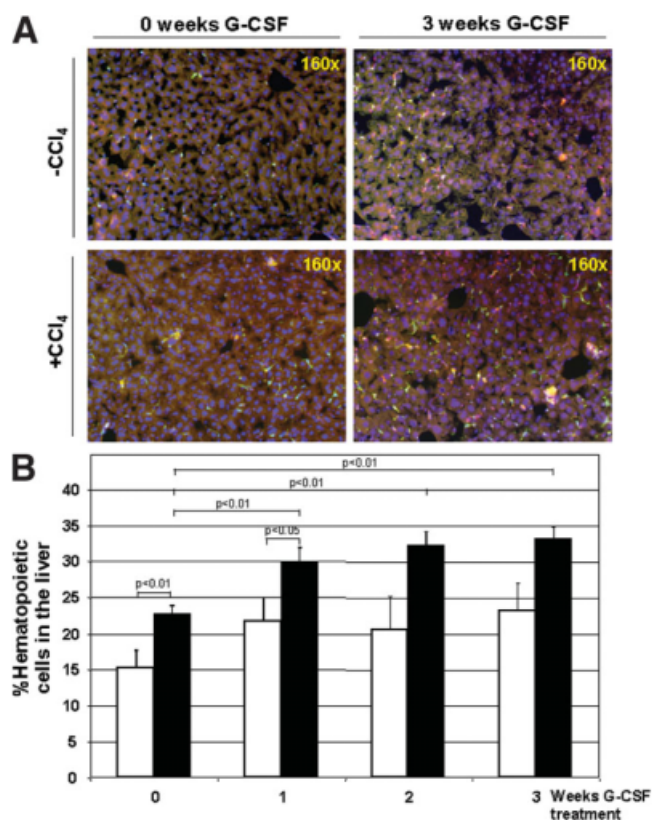


Fig. 3. G-CSF mobilization induces hematopoietic liver infiltration in untreated and CCl_4 -treated mice. (A) Triple-staining for EGFP (green), CD45 (red), and nuclei (blue) of liver cryosections from untreated and CCl_4 -treated animals mobilized with G-CSF or not for 3 weeks. Livers were extracted 1 week after the last dose of pegylated G-CSF; nuclei were stained with DAPI (blue); colocalization is represented in yellow. Negative and positive controls of the immunostaining are provided in the supplemental material. (B) Quantification of the presence of hematopoietic cells in livers after 0, 1, 2, and 3 weeks of pegylated G-CSF treatment. See Materials and Methods for details of quantification. Statistically significant differences between untreated (white bars) and CCl_4 -treated (black bars) animals and between CCl_4 -treated and nonmobilized ($n = 9$) or mobilized for 2 ($n = 4$) or 3 ($n = 10$) weeks with G-CSF are represented (Mann-Whitney test, $P < .05$ and $P < .01$ as indicated). G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor.

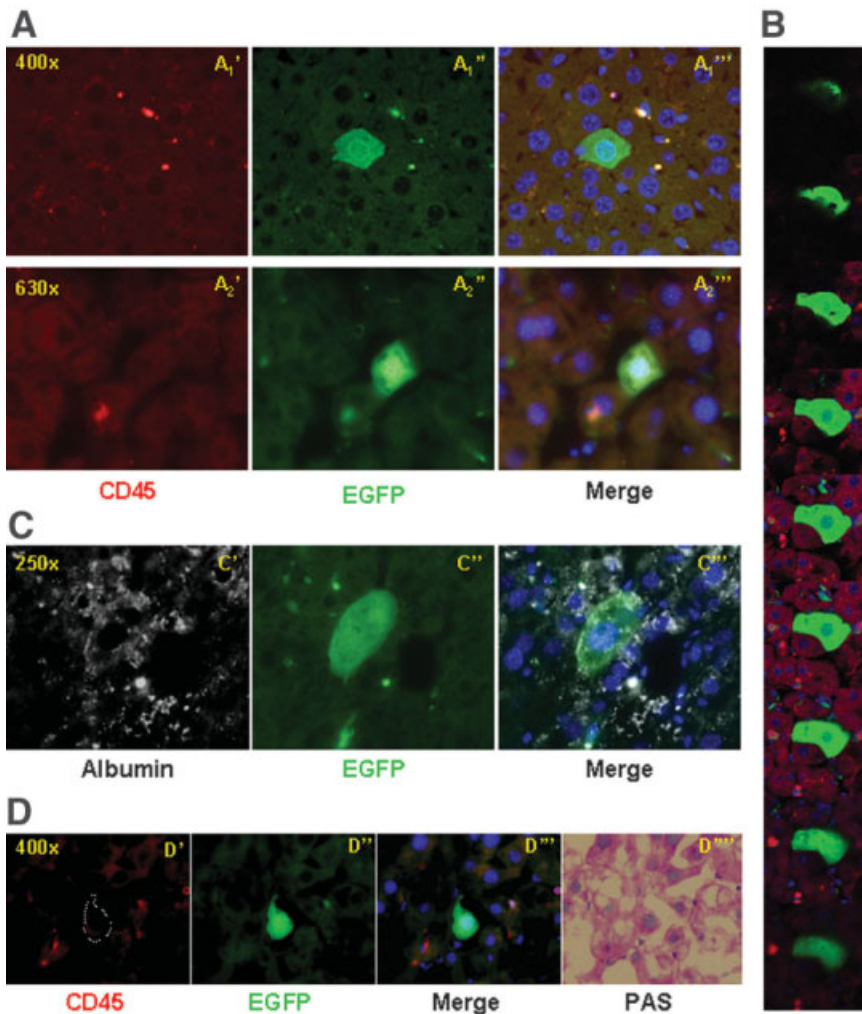


Fig. 4. Identification of BMDHs. (A) Two different examples (A_1 , A_2) of cells accomplishing the conditions defining a BMDH. A_1 , $CD45^-$ (red negative); A_1' , $EGFP^+$ (green), hepatocyte-like nucleus, and cytoplasm; A_1'' , merged images. (B) Confocal microscopy Z-axis analysis of a BMDH to demonstrate the nonexpression of CD45 antigen. Images correspond to successive $0.25\text{-}\mu\text{m}$ thick sections separated by $1\ \mu\text{m}$; (C) Expression of specific hepatocyte proteins by BMDHs. C' , albumin expression (white); C'' , EGFP expression (green); C''' , merged images together with DAPI staining (blue). (D) Periodic acid-Schiff staining to demonstrate the capacity to accumulate glycogen of BMDHs. D' , $CD45^-$; D'' , $EGFP^+$; D''' , merged image of D' , D'' , and DAPI; D'''' , periodic acid-Schiff $^+$ staining of the selected cell. EGFP, enhanced green fluorescent protein; PAS, periodic acid-Schiff.

(12–15 μm thick). CD45 expression was never seen in any confocal section of these polygonal cells (Fig. 4B). However, when we observed other small cells, identified as hematopoietic cells, EGFP and CD45 expressions were colocalized in the same section or alternated in consecutive sections. Thus, we assumed that there were BM-derived cells that were negative for hematopoietic markers (CD45) and had hepatocyte morphology (Fig. 4A–B). The majority of these BMDHs were located as isolated cells, although pairs of cells were also observed.

To determine if BMDHs had hepatocyte functionality, we analyzed the expression of specific hepatic proteins. The expression of albumin, biliary glycoprotein 1 (as specifically identified via its cross-reaction with rabbit polyclonal anti-carcinoembryonic antigen²¹) and hepatocyte-type cytokeratins was analyzed via immunofluorescence on paraffin-embedded sections. Albumin expression, which is heterogeneously expressed in endogenous hepatocytes and is detected as cytoplasmic granules, was clearly observed in $EGFP^+$ cells (Fig. 4C). The hepatocyte-specific CEA antigen

was also positive in BMDHs (not shown). Hepatocytes accumulate glycogen in their cytoplasm due to their gluconeogenesis metabolic function. We also analyzed glycogen storage using periodic acid-Schiff analysis and confirmed that BMDHs accumulate glycogen (Fig. 4D). Other characteristics of hepatocytes, such as positive cytochrome staining or characteristic high red autofluorescence due to the presence of porphyrins,²² were also observed in these cells (data not shown). In conclusion, we demonstrated that BMDHs are fully functional by morphological and functional parameters. Interestingly, BMDHs ($GFP^+/CD45^-$) were only detected in damaged livers. Their frequency was very low (1 BMDH per 250,000 hepatocytes), suggesting that CCl_4 damage was required to induce the presence of BMDHs in the liver, though at a low level.

G-CSF Mobilization Significantly Increases the Appearance of BMDH in the Livers of CCl_4 -Treated Animals. Next, we investigated if G-CSF treatments would also increase the number of BMDHs. The analysis of the damaged and mobilized mice revealed a direct cor-

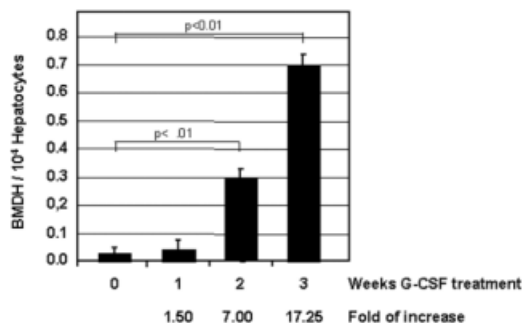


Fig. 5. G-CSF increases the percentage of BMDHs in a dose-dependent manner. The number of BMDHs present in the livers of animals treated with CCl_4 for 3 months and then with pegylated G-CSF for 0, 1, 2, or 3 weeks are shown. See Material and Methods for details of counting. The fold of increase with respect to no G-CSF treatment is shown. Statistically significant differences between CCl_4 -treated and nonmobilized ($n = 6$) mice or mice mobilized for 1 ($n = 3$), 2 ($n = 4$), or 3 ($n = 5$) weeks with G-CSF are represented (Mann-Whitney test, $P < .01$). BMDH, bone marrow-derived hepatocytes; G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor.

relation between the number of weeks with G-CSF treatment and the number of BMDHs present in the livers. Increments of 1.5-, 7-, and 17-fold were observed after 1, 2, and 3 weeks of G-CSF treatment, respectively (Fig. 5).

Although strongly significant, the number of BMDHs in the liver was very low, even after 3 weeks of G-CSF (1 BMDH versus 18 BMDHs per 250,000 hepatocytes; average of 5 and 6 animals analyzed, respectively; $P < .05$). Thus, a significant contribution of the BMDH in the recovery of the liver function would not be expected. In fact, we could not observe any shortening in the recovery to normal levels of the serum hepatic parameters after G-CSF treatment (data not shown).

BM-Derived Hepatocytes Were Originated by Cellular Fusion. Finally, we investigated whether BM hepatocytes originated from a direct differentiation process in which cells from BM directly change their hematopoietic fates to a hepatic program upon entry into the liver and engraftment, or whether they were generated by an *in vivo* fusion process between endogenous hepatocytes and hematopoietic cells infiltrating the liver. We transplanted BM cells from female BDGF1 mice (constitutively expressing EGFP) into irradiated male P3D2F1 animals and then applied the $\text{CCl}_4 + 3\text{w-G-CSF}$ protocol. In this design, if an EGFP^+ hepatocyte originated from a direct differentiation process, it would express the EGFP marker but would not have any male marker (Y chromosome [Y-ch]). On the contrary, if BMDHs resulted from an *in vivo* fusion event, they would also have the recipient's Y-ch (Fig. 6A). Thus, we analyzed the colocalization of Y-ch signal, EGFP, and cytokeratin expression using simultaneous fluorescence *in situ* hybridization, immunofluorescence, and immunohistochemistry in liver sections

of CCl_4 -treated and G-CSF-mobilized animals ($n = 6$; two sections from two different lobes per animal). We found that $74 \pm 7\%$ BMDHs were simultaneously EGFP^+ and Y-ch^+ . Moreover, BMDHs expressed hepatic cytokeratins (inner box in Fig. 6B^{'''}), and the majority of them contained two nuclei: one large, round, and positive for the Y-ch, and the other one smaller, more condensed, and Y-ch-negative (Fig. 6B). As an internal control, we also analyzed the presence of Y-ch in CD45^+ cells and endogenous hepatocytes. No Y-ch signal was detected in the nuclei of hematopoietic cells infiltrating the liver tissue, and $81 \pm 4\%$ ($n = 4$) of the endogenous hepatocytes had a Y-ch signal. Because no statistical significance was observed between Y-ch^+ BMDHs and Y-ch^+ endogenous hepatocytes, we assumed that BMDHs originated through cell fusion. Interestingly, the observation of these two nuclei with very different structure suggested that cytoplasmic but not nuclear fusion had occurred. These data strongly suggest that the emergence of EGFP^+ BMDHs induced by CCl_4 treatment and aug-

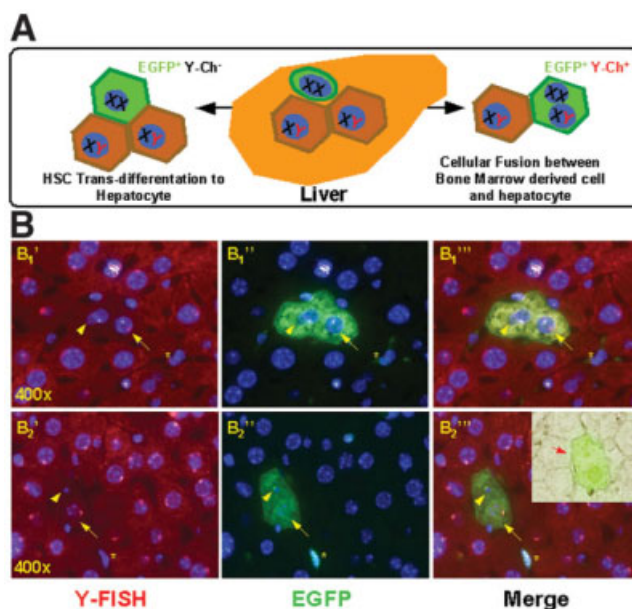


Fig. 6. BMDHs originate via *in vivo* fusion events. (A) Diagram showing the read-out of the presented experiment to distinguish the two possibilities of BMDH generation. (B) Two different examples of male hepatocytes (Y-ch^+) expressing the EGFP protein are shown (B_1 , B_2). B_1' , fluorescence *in situ* hybridization (red) and DAPI staining (blue); B_2'' , EGFP stain (green) and DAPI (blue); B_1''' , merged images showing the presence of the Y-ch^+ in one nucleus of the binucleated cells. Typical hepatocyte nuclei positive for the Y-ch^+ are shown indicating the receptor origin (arrows), smaller nuclei from donor BM (arrowheads) in BMDHs, and hematopoietic cells (asterisks). Inset: cytokeratin staining using panK polyclonal antibody visualized with a peroxidase conjugated secondary antibody merged with the EGFP staining. The characteristic pericytoplasmic staining of this antigen (red arrow) is observed in $\text{Y-ch}^+/\text{EGFP}^+$ cells. EGFP, enhanced green fluorescent protein; Y-ch, Y chromosome; FISH, fluorescence *in situ* hybridization.

mented by G-CSF mobilization is mainly due to *in vivo* fusion events between BM-derived cells and endogenous hepatocytes.

Discussion

In the present study, we show that G-CSF treatment of mice with chronic liver damage increases the number of hematopoietic cells infiltrating the liver as well as the number of BMDHs. Moreover, we demonstrate that the principal mechanism accounting for the production of BMDHs occurs via *in vivo* cell fusion between resident hepatocytes and hematopoietic cells.

To study the plastic properties of BM cells, we used an established protocol of ongoing liver damage through the periodic injection of a chemical compound, CCl₄, over 3 months.^{6,11,23-25} The data clearly demonstrate liver injury in the treated animals with necrotic areas, regenerative hepatocytes, and increase of infiltrated hematopoietic cells.

G-CSF treatment has been described to increase the number of peripheral blood cells and to mobilize progenitors and stem cells from the BM to the periphery.^{13-15,18,26} Increase in liver infiltration of primitive hematopoietic cells has been described after G-CSF treatment,²⁷ and it has been observed that G-CSF treatment accelerates liver recovery by at least 1 week after acute CCl₄ damage.¹¹ Our results indicate that the continuous treatment of recipients with G-CSF increases the number of hematopoietic cells infiltrating the liver in normal as well as liver-injured animals. This increase is directly related to the number of weeks of G-CSF treatment and is strongly increased in CCl₄-treated animals. However, we have not detected any amelioration in the recovery of liver parameters (data not shown). Considering that we studied all the animals more than 1 month—instead of 2 to 5 days—after the last CCl₄ injection,¹¹ the endogenous liver repair potential would have restored normal liver functions in all groups.

To identify BMDHs, we looked for cells that showed the following features: (1) hepatocyte morphology (large polygonal cells with a regular cytoplasm, single or multiple large nuclei with prominent nucleoli, and a moderate to low nucleus/cytoplasm ratio); (2) integration into the normal trabecular architecture; (3) expression of the EGFP donor reporter protein; (4) no expression of hematopoietic markers (*e.g.*, CD45 antigen) on their surfaces; (5) expression of markers of hepatocyte-specific function (*e.g.*, production of albumin, canalicular staining with pCEA, hepatocyte-type cytokeratin expression). Observing these characteristics, we found that the presence of BMDH was clearly detectable, although very low, in the CCl₄-damaged liver (1 BMDH/250,000 total hepato-

cytes). However, no BMDHs were identified in non-treated animals.

The presence of BMDHs has been extensively discussed, and data indicating from very low to very high BM contribution to the liver parenchyma have been reported (reviewed in Masson et al.²⁸). It seems clear that if the liver has been injured, the incidence of BMDHs is increased.^{26,29-31} However, this phenomenon does not appear to occur after partial hepatectomy.³² Our data support the idea that liver damage is needed for the contribution of BM cells to the formation of hepatocytes. However, the contribution of BMDHs is very low, in agreement with data previously reported^{5,6} and in contrast with reports that describe up to 20% BM contribution.²⁶ Differences in liver damage protocols and in the way BMDHs are defined probably account for these discrepancies. Another explanation for our lower incidence of BMDHs could be the differences in the timing selected in our protocol set-up. We analyzed animals between 2 and 4 weeks after the last liver insult. Similarly, Kanazawa and Verma⁶ analyzed CCl₄-damaged animals and found very similar data to those reported here. Others have analyzed animals earlier and have found much higher numbers of BMDHs.^{11,29} A “short-term engraftment” of BMDH, analogous to that recognized in marrow transplantation of hematopoietic progenitors, that could function as a transient population would explain these differences. This could perhaps relate to a limited life span in BMDHs or a reduced ability to replicate (though the presence of occasional doublets suggests otherwise).

We report that treatment of the damaged animals with G-CSF increases the presence of BMDHs in the injured liver. This effect is observed only in CCl₄-damaged animals and not in non-CCl₄-treated mice, suggesting a specific effect of G-CSF treatment in the CCl₄-damaged liver. Interestingly, CCl₄ treatment alone induces a transient leukocytosis (data not shown). Other authors have also described an increase in the presence of BMDHs after treatment with G-CSF.¹¹ Furthermore, we have observed a clear relationship between the levels of BMDHs and the duration of G-CSF treatment (up to 3 weeks), indicating that this factor potentiates the contribution of BMDHs to the hepatic structure.

Finally, we demonstrate that in our murine model of CCl₄ damage and G-CSF mobilization, BMDHs originate through *in vivo* fusion mechanisms. *In vivo* fusion has been extensively described in FAH-null mice,^{7-9,33} in which the selective advantage of fused cells strongly amplifies its contribution to the liver. Stadtfeld and Graf,³⁴ using a very elegant transgenic approach, have suggested—although not formerly demonstrated—that BMDHs could derive from fusion events. We have

demonstrated that endogenous hepatocytes and cells derived from BM fused together in a murine liver damage model in which no selective advantage has been shown.

Interestingly, this form of CCl_4 -induced injury is known to be endothelial-toxic,³⁵ has shown a predominantly macrophage infiltration in areas of hepatic necrosis with local expansion of the infiltrated sinusoids, and has failed to show a prominent oval-cell proliferative response. These features are also seen in the FAH-null model.³⁶ Thus, we may speculate that this constellation of injuries favors engraftment by fusion, by increasing the number of fusogenic macrophages in the liver, obliterating the endothelial barrier between hepatocytes and macrophages. Moreover, irradiation has also been described to increase engraftment via cell fusion.³⁷ Thus, irradiation could also be involved in the process. Additionally, in a model of exogenous BM engraftment into muscle cells, it has been demonstrated that exogenous-fused nuclei, though integrated, do not express muscle-specific proteins.³⁷ In the present study, although BMDHs functioned as normal hepatocytes and expressed donor-derived proteins (EGFP), we did not address the reprogramming of the donor-fused nuclei (experiments in that direction are now underway). Finally, it has been described that one of the characteristics of the FAH model is nuclear instability with high rates of aneuploidy even before the animals are taken off of NTBC (2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione). This fact, which was not addressed in our model, should facilitate nucleus/nucleus fusion in that model. Although we cannot exclude the possibility of nuclear fusion followed by reduction division, though no mononucleated GFP positive hepatocytes were found, this would result in 100% resolution of tetraploid-fused nuclei into two separate diploid nuclei, which would be possible but not expected.

In conclusion, using a hematopoietic growth factor (G-CSF), we have been able to modulate generation of BMDHs in a growth factor dose-dependent manner and in the absence of any exogenous selective cellular advantage. In this model, the plasticity observed was very limited and was lower than previously described in other models of injury or with other analytic approaches in the same model. In particular, this protocol involved analysis months after the final insult, perhaps representing a true end point of the postinjury repair process. Additionally, we have demonstrated that the main source of plasticity in our experimental conditions is the *in vivo* cellular fusion, presumably related to injury/repair mechanisms that invoke prominent infiltration of the liver by macrophages, endothelial injury, and a blunted, endogenous oval-cell response. Furthermore, fusion itself can be seen in low level injury as well as in the more prominent effects dem-

onstrated previously in the FAH-null model; failure to expand is likely due to the absence of the strong selective advantage of that model.

Acknowledgment: The authors would like to acknowledge Dr. D. Krause for careful reading of the manuscript; E. López, A. de la Cal, and M. D. López for their assistance; S. García for careful irradiation of the animals; I. Orman for his expert flow cytometry assistance; A. Fontanellas, for his help with senc parameter's analyses; N. Meza for his comments and discussions; and Gayle Olton for organizing Dr. Quintana's time at Beth Israel Medical Center. We also acknowledge Dr. M. Okabe for providing us with EGFP transgenic mice.

References

1. Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther* 2002;9:754-758.
2. Theise ND, Wilmot I. Cell plasticity: flexible arrangement. *Nature* 2003;425:21.
3. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003;102:3483-3493.
4. Graf T. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood* 2002;99:3089-3101.
5. Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002;297(5590):2256-2259.
6. Kanazawa Y, Verma IM. Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(Suppl 1):11850-11853.
7. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* 2000;6:1229-1234.
8. Willenbring H, Bailey AS, Foster M, Akkari Y, Dorrell C, Olson S, et al. Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. *Nat Med* 2004;10:744-748.
9. Wang X, Ge S, McNamara G, Hao QL, Crooks GM, Nolta JA. Albumin expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice transmitted with highly purified human hematopoietic stem cells. *Blood* 2003;101:4201-4208.
10. De Silvestro G, Vicarioto M, Donadel C, Menegazzo M, Marson P, Corsini A. Mobilization of peripheral blood hematopoietic stem cells following liver resection surgery. *Hepatology* 2004;39:805-810.
11. Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari A, Constantinou V, Batsis I, Kaloyanidis P, et al. G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp Hematol* 2005;33:108-119.
12. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:387-403.
13. Molineux G, Pojda Z, Dexter TM. A comparison of hematopoiesis in normal and splenectomized mice treated with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1990;75:563-569.
14. Molineux G, Kinstler O, Briddell B, Hartley C, McElroy P, Kerzic P, et al. A new form of Filgrastim with sustained duration *in vivo* and enhanced ability to mobilize PBPC in both mice and humans. *Exp Hematol* 1999;27:1724-1734.
15. Varas F, Bernad A, Bueren JA. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes into peripheral blood the complete clonal repertoire of hematopoietic precursors residing in the bone marrow of mice. *Blood* 1996;88:2495-2501.

16. Cottler-Fox MH, Lapidot T, Petit I, Kollet O, DiPersio JF, Link D, et al. Stem cell mobilization. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* Jan 2003;2003:419-437.
17. Cantz T, Sharma AD, Jochheim-Richter A, Arseniev L, Klein C, Manns MP, et al. Reevaluation of bone marrow-derived cells as a source for hepatocyte regeneration. *Cell Transplant* 2004;13:659-666.
18. de Haan G, Ausema A, Wilkens M, Molineux G, Dontje B. Efficient mobilization of haematopoietic progenitors after a single injection of pegylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in mouse strains with distinct marrow-cell pool sizes. *Br J Haematol* 2000;110:638-646.
19. Molineux G. The design and development of pegfilgrastim (PEG-rmetHuG-CSF, Neulasta). *Curr Pharm Des* 2004;10:1235-1244.
20. Kofman AV, Morgan G, Kirschenbaum A, Osbeck J, Hussain M, Swenson S, Theise ND. Dose- and time-dependent oval cell reaction in acetaminophen-induced murine liver injury. *HEPATOLOGY* 2005;41:1252-1261.
21. Sheahan K, O'Brien MJ, Burke B, Dervan PA, O'Keane JC, Gottlieb LS, et al. Differential reactivities of carcinoembryonic antigen (CEA) and CEA-related monoclonal and polyclonal antibodies in common epithelial malignancies. *Am J Clin Pathol* 1990;94:157-164.
22. Gschnait F, Konrad K, Honigsmann H, Denk H, Wolff K. Mouse model for protoporphyria. I. The liver and hepatic protoporphyrin crystals. *J Invest Dermatol* 1975;65:290-299.
23. Rudolph KL, Chang S, Millard M, Schreiber-Agus N, DePinho RA. Inhibition of experimental liver cirrhosis in mice by telomerase gene delivery. *Science* 2000;287:1253-1258.
24. Abraham P, Wilfred G, Cathrine SP. Oxidative damage to the lipids and proteins of the lungs, testis and kidney of rats during carbon tetrachloride intoxication. *Clin Chim Acta* 1999;289:177-179.
25. Terai S, Sakaida I, Yamamoto N, Omori K, Watanabe T, Ohata S, et al. An *in vivo* model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J Biochem (Tokyo)* 2003;134:551-558.
26. Christopherson KW II, Cooper S, Broxmeyer HE. Cell surface peptidase CD26/DPPIV mediates G-CSF mobilization of mouse progenitor cells. *Blood* 2003;101:4680-4686.
27. Szumilas P, Barcew K, Baskiewicz-Masiuk M, Wiszniewska B, Ratajczak MZ, Machalinski B. Effect of stem cell mobilization with cyclophosphamide plus granulocyte colony-stimulating factor on morphology of haematopoietic organs in mice. *Cell Prolif* 2005;38:47-61.
28. Masson S, Harrison DJ, Plevris JN, Newsome PN. Potential of hematopoietic stem cell therapy in hepatology: a critical review. *Stem Cells* 2004;22:897-907.
29. Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol* 2004;6:532-539.
30. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168-1170.
31. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, et al. Liver from bone marrow in humans. *HEPATOLOGY* 2000;32:11-16.
32. Fujii H, Hirose T, Oe S, Yasuchika K, Azuma H, Fujikawa T, et al. Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol* 2002;36:653-659.
33. Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003;422:901-904.
34. Stadtfeld M, Graf T. Assessing the role of hematopoietic plasticity for endothelial and hepatocyte development by non-invasive lineage tracing. *Development* 2005;132:203-213.
35. Laskin DL. Sinusoidal lining cells and hepatotoxicity. *Toxicol Pathol* 1996;24:112-118.
36. Grompe M, Lindstedt S, al-Dhalimy M, Kennaway NG, Papaconstantinou J, Torres-Ramos CA, et al. Pharmacological correction of neonatal lethal hepatic dysfunction in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nat Genet* 1995;10:453-460.
37. Lapidos KA, Chen YE, Earley JU, Heydemann A, Huber JM, Chien M, et al. Transplanted hematopoietic stem cells demonstrate impaired sarcoglycan expression after engraftment into cardiac and skeletal muscle. *J Clin Invest* 2004;114:1577-1585.