

Universidad Austral Facultad de Ciencias Biomédicas

Contribución de la cresta neural y de células estromales de la médula ósea con el hígado sano y enfermo: su posible movilización sistémica y su rol en la fibrogénesis y regeneración hepáticas

Tesis doctoral

Lic. Romina Sierra

IIMT-CONICET Universidad Austral Facultad de Ciencias Biomédicas

Contribución de la cresta neural y de células estromales de la médula ósea con el hígado sano y enfermo: su posible movilización sistémica y su rol en la fibrogénesis y regeneración hepáticas

Tesis doctoral

Lic. Romina Sierra

Director: Dr. Jorge Aquino

Laboratorio de Biología del Desarrollo y Medicina Regenerativa

En memoria de Carolina Borth, amiga y miembro del DB&RM

Dedicado a mis padres

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a la Universidad Austral, La Facultad de Ciencias Biomédicas y al Instituto de Investigaciones en Medicina Traslacional (IIMT) por concederme el espacio para realizar el doctorado.

Al CONICET por haberme seleccionado para la beca doctoral que me permitió poder llevar a cabo este doctorado.

Al doctor Jorge Aquino, por incorporarme al laboratorio de Biología de Desarrollo y Medicina Regenerativa, por su buena predisposición para ayudarme en lo que fuera necesario, su humildad y generosidad para enseñarme y permitirme crecer en la investigación. Así como por tantas charlas estimulantes acerca de los proyectos y experimentos que me impulsaron a terminar este doctorado. Finalmente, agradecer el buen trato y la buena relación que hemos tenido a lo largo de estos años de trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de Biología de Desarrollo y Medicina Regenerativa, a los que están y los que se fueron. Siempre es bueno trabajar en un lindo ambiente de grupo. A Vicky, que con su tesina despertó mi interés en la enseñanza, que me ayudó tanto haciendo PCR, y encargándose de mantener el bioterio en orden cuando me operé. Gra, gracias por tu buena predisposición, por escucharme, por las charlas y siempre proponer buenas ideas y consejos. A Maxi, la nueva incorporación del grupo, gracias por la buena voluntad para colaborar siempre, por los mates de la mañana y por todo lo compartido. Gracias a Esteban, por toda tu contribución desde el comienzo, por tu buena predisposición para enseñarme, ayudarme a plantear experimentos. Gracias por los consejos, los tips, acompañarme durante todo este proceso.

A los chicos del bioterio, por mantener mis de líneas de ratones y ayudar a resolver todos los problemas asociados a eso siempre de la mejor manera. Guille y Franco, gracias por estar siempre listos para ayudarme en todo el trabajo, desde marcar colitas y otras actividades más.

A mis amigos y compañeros del IIMT, con los que compartimos los altos y bajos de cada día en el laboratorio. Todas las salidas, los asados siempre es divertido pasarlos juntos.

A Marce, aprendimos juntos incluso en las dificultades, siempre ayudándonos y divirtiéndonos. Compartimos todos los días en el laboratorio y en danza, y donde más se pueda. Gracias por tu amistad, los mates, las risas, charlas. Gracias por las horas de planificación de experimentos, idear nuevos planes, la ayuda con Photoshop, Power Point. Gracias, por sobretodas las cosas, por estar en mis peores momentos, ayudarme siempre en todo, y formar parte de "mi séquito".

Tucu, gracias por tu amistad, gracias por las salidas. Gracias por acompañarme, por escucharme, por las risas y las estadías en tu casa. Gracias por estar en mis momentos de crisis con temas del doctorado y de la vida.

Mai, gracias por los momentos compartidos, por alegrarme la oficina. Gracias por las charlas de experimentos, ayudarme a planificar cosas nuevas. Gracias por ayudarme siempre con la extracción de las médulas.

Paulita, gracias por tu aporte como técnica del laboratorio, por estar siempre atenta a todo y disponible para ayudar. Gracias por compartir conmigo dentro y fuera del laboratorio.

Rodri, gracias por tu aporte y el buen humor que mejora cualquier día gris. Agos, gracias por compartir las charlas y las clases de Histología. Gracias a mis compañeros del laboratorio, con los que compartimos horas, almuerzos, mates y que colaboran con el bienestar dentro del instituto. Pablo, gracias por haberme acompañado durante gran parte de mi doctorado, gracias por las ideas de experimentos. Gracias por la ayuda que me diste todo este tiempo.

A mis amigos de la vida, que siempre me acompañan y se hacen presentes.

Sofi, gracias por el apoyo incondicional, por la ayuda de todos los cultivos y todos los experimentos. Tu ayuda fue indispensable para alcanzar esta meta, especialmente en el último tramo. Gracias por tantas sugerencias y consejos. Gracias además por ser una gran amiga, por nuestras charlas de la vida, las risas, los abrazos, por hacerte presente en todos los momentos.

Facu, gracias por acompañarme en este proceso. Gracias por estar siempre que te necesito.

Gracias a las indias, Bel, Lu, Mili, Meli, Cande, Gigi, Tef y Natu, que son todo en mi vida, mis hermanas, mis compañeras. En principio, les agradezco por apoyarme, sobretodo en estos últimos tiempos de crisis y dificultades, siempre puede contar con ustedes. Gracias por preocuparse y hacerse presentecada vez que las necesito. Gracias por hacerse las que me entienden cuando hablo de ciencia. A mi familia, gracias a mis tíos y a mis primos por acompañarme siempre y apoyarme. A mi abu, por ser incondicional, por el amor y apoyo. Gracias por todo lo que me diste e hiciste por mí. Esta tesis también te la dedico a vos, que para mi sos un ejemplo de mujer trabajadora, sencilla, humilde. A mi papá, por acompañarme siempre en todas mis decisiones, por apoyarme para que yo pueda hacer lo que más me gusta y por el amor que siempre me das, sos un sostén en mi vida. A mi mamá, gracias por todo el amor que siempre me das, por tu apoyo, tu incondicionalidad, por estar siempre, por ayudarme a atravesar este largo proceso. Gracias por ser mi ejemplo a seguir, gracias por guiarme enseñarme y estar siempre cerca de mí, todo lo que soy es gracias a vos.

Resumen

La fibrosis hepática resulta de ciclos repetidos de daño hepático y cicatrización. La cresta neural es una estructura embrionaria de notable plasticidad, que contribuye con una gran variedad de linajes celulares. Las células de la cresta neural (NCCs) emergen tempranamente del techo del tubo neural y presentan una notable motilidad, contribuyendo con diversos tejidos a distancia. Se desconoce en gran medida la contribución de células derivadas de la cresta neural (NCCs) y de células de la médula ósea con células presentes en el hígado, en la salud y en la enfermedad.

El objetivo de este trabajo fue analizar el rol de las NCDCs y de pericitos de la médula ósea durante la fibrogénesis y la regeneración hepáticas, empleando diversas cepas de ratones doble-transgénicos que permiten hacer trazado de linajes celulares *in vivo* (sistema Cre-LoxP). En estos animales un gen reportero (YFP -proteína verde fluorescente- o Tom tomato-) se expresa únicamente cuando el promotor de un gen específico se activa en algún momento del desarrollo. Se generaron dos modelos de fibrosis hepática y un modelo de regeneración hepática.

En animales controles (naïve) de diversas cepas que permiten trazar NCDCs se detectó contribución con células de Schwann no mielinizantes residentes en el hígado. En el hígado fibrótico se observó un incremento en la incidencia de estas células de Schwann y las mismas presentaron una mayor complejidad en el número y longitud de sus procesos, lo que es indicativo de gliosis.

En ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* se observó además una presencia rara de células Tom⁺ con fenotipo de hepatocitos (HLCs) y de células endoteliales. La fibrogénesis indujo un aumento

significativo en la incidencia HLCs y células endoteliales, distribuidas en diversos focos dentro del parénquima hepático. Estos datos sugieren un origen extrahepático de dichas células. Nuestros estudios de trazado de linaje en estadíos embrionarios y postnatales utilizando diversas cepas de ratones transgénicos permitirían concluir que las HLCs y células endoteliales Tom⁺ halladas en el hígado fibrótico no derivarían de la cresta neural sino de células estromales (pericitos) Wnt1⁺ presentes en la médula ósea a estadíos postnatales tempranos.

En la médula ósea de animales adultos $Wnt1^{Cre}$; $Rosa26^{Tom}$, la mitad de las células trazadas correspondieron a células estromales, tanto de tipo perisinusoidal (más abundantes) como periarteriolar. Estas células expresaron Fibronectina, Desmina, Vimentina, GLAST y sólo las periarteriolares fueron α -SMA⁺.

Se analizó la expresión de GLAST en el linaje glial de NCCs. Además, en ratones *GLAST^{CreERT2};Rosa26^{Tom}* se caracterizó la contribución de células Tom⁺ con células en la médula ósea y el hígado. En la médula ósea, sólo hubo contribución de células trazadas con células estromales perisinusoidales o periarteriolares, aunque con una incidencia 10 veces superior a la observada en animales *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}*. En el hígado fibrótico de estos animales, células estromales de la médula ósea que a día postnatal 2 (P2) expresan GLAST contribuyen con un número similar de HLCs y células endoteliales Tom⁺ al encontrado en ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}*. Estos datos sugieren que los pericitos Wnt1⁺ presentes en la médula ósea constituyen una subpoblación de aquellos GLAST⁺ y durante la fibrogénesis tendrían la capacidad de movilizarse por la sangre hacia el hígado y diferenciarse en HLCs y células endoteliales.

Estos pericitos CD44⁺ GLAST⁺ trazados con Wnt1 mostraron tener propiedades de células mesenquimales formadoras de colonias (CFU-Fs) y movilizarse desde la médula ósea hacia el torrente sanguíneo durante la fibrogénesis hepática. Resultados similares, en relación con la movilización y contribución de pericitos con HLCs y células endoteliales Tom⁺, fueron hallados en ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* y/o *GLAST^{CreERT2};Rosa26^{Tom}* (Tx P2) sometidos a una hepatectomía parcial. Las HLCs Tom⁺ coexpresaron diversos marcadores estromales. Asimismo, pudimos confirmar el reclutamiento de pericitos GLAST⁺ Wnt1⁺ hacia el hígado y su diferenciación en HLCs y células endoteliales mediante el trasplante de células mononucleares de médula ósea (BMMCs) de ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* en ratones atímicos hepatectomizados.

En ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* la aplicación *in vivo* del oligodesoxinucleótido (ODN) IMT504 indujo un aumento en la proporción de CFU-Fs Tom⁺. La incubación de células madre mesenquimales (MSCs), provenientes de colonias Tom⁺, con IMT504 resultó en un aumento en su capacidad de proliferación y de movilización. Finalmente, la aplicación *in vivo* del ODN resultó en un mayor reclutamiento e incidencia de HLCs y/o células endoteliales en el hígado de ratones atímicos hepatectomizados.

En resumen, en el hígado NCDCs sólo contribuirían con células de la glía dando lugar a una gliosis durante la fibrogénesis hepática. Una subpoblación de pericitos GLAST⁺, trazados con Wnt1, presentes en la médula ósea contribuyen con mecanismos regenerativos en el hígado lesionado, pudiendo originar HLCs y células endoteliales. Este hallazgo podría permitir futuras estrategias terapéuticas en medicina regenerativa.

Abstract

Liver fibrosis results from repeated cycles of liver damage and scarring. The neural crest is an embryonic structure of remarkable plasticity, which contributes to a wide variety of cell lineages. Neural crest cells (NCCs) emerge early from the roof of the neural tube and have remarkable motility, contributing to various tissues at a distance. The contribution of cells derived from the neural crest (NCDCs) and bone marrow cells with the liver, in health and disease, is largely unknown.

The objective of this work was to analyze the role of NCDCs and some bone marrow pericytes during hepatic fibrogenesis and regeneration, using various strains of doubletransgenic mice that allow cell types to be traced in vivo (Cre-LoxP system). In these animals a reporter gene (YFP -green fluorescent protein- or Tom -tomato-) is expressed only when a specific gene promoter is activated at some point in development. Two models of liver fibrosis and a model of liver regeneration were herein applied.

In control (naïve) animals of various strains that allow tracing NCDCs, contribution with liver non-myelinating Schwann cells was found. An increase in the incidence of Schwann cells was observed in the fibrotic liver and these cells showed a greater complexity in the number and length of their processes, which is indicative of gliosis. In *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* mice, a rare presence of traced cells with hepatocyte (HLCs) and endothelial cells phenotypes was also observed. Fibrogenesis induced a significant increase in the incidence of these cell types, distributed in various foci within the hepatic parenchyma. These data suggest an extrahepatic origin of these cells. Our lineage tracing studies at different embryonic and postnatal stages made in various transgenic mice strains allowed us to conclude that Tom⁺ HLCs and endothelial cells found in the fibrotic liver would not derive from the neural crest but from Wnt1⁺ stromal cells present in the bone marrow at early postnatal stages.

In the adult bone marrow of $Wnt1^{Cre}$; $Rosa26^{Tom}$ animals, half of the traced cells consisted of perisinusoidal (more abundant) or periarteriolar stromal cells. These stromal cells expressed Fibronectin, Desmina, Vimentin, GLAST and only the periarteriolar pericytes were α -SMA⁺.

GLAST expression in the glial lineage of NCCs was analyzed. In addition, the contribution of GLAST⁺ cells with cells in the bone marrow and liver was characterized using *GLAST^{CreERT2};Rosa26^{Tom}* mice. In the bone marrow, there was only contribution of Tom⁺ cells with perisinusoidal or periarteriolar stromal cells, although with an incidence 10 times higher than that observed in *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* animals. In the fibrotic liver of these animals, our results suggest that bone marrow stromal cells that express GLAST on postnatal day 2 (P2) contribute with a similar number of Tom⁺ HLCs and endothelial cells than the bone marrow constitute a subpopulation of GLAST⁺ stromal cells and would have the ability to move towards the liver through peripheral blood and differentiate into HLCs and endothelial cells, during fibrogenesis.

Moreover, in the fibrotic liver of $GLAST^{CreERT2}$; $Rosa26^{Tom}$ (Tx P2) mice a similar increase was found in the contribution of traced cells with HLCs and Tom⁺ endothelial cells of parenchymal localization to that found in $Wnt1^{Cre}$; $Rosa26^{Tom}$.

These CD44⁺ GLAST⁺ pericytes traced with Wnt1 were shown to have properties of colonyforming unit-fibroblasts (CFU-Fs) and to be mobilized from the bone marrow into the bloodstream during hepatic fibrogenesis. Similar results, in relation to the mobilization and contribution of pericytes with HLCs and Tom⁺ endothelial cells, were found in *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* and/or *GLAST^{CreERT2};Rosa26^{Tom}* (Tx P2) mice subjected to partial hepatectomy. HLCs coexpressed various stromal markers. The recruitment of GLAST⁺ Wnt1⁺ pericytes to the liver and their differentiation into HLCs and endothelial cells was confirmed in experiments of transplantation of bone marrow mononuclear cell (BMMCs) from *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* mice into hepatectomized athymic mice.

The *in vivo* application of the oligodeoxynucleotide (ODN) IMT504 induced an increase in the proportion of CFU-Fs Tom⁺. Incubation with IMT504 of mesenchymal stem cells (MSCs) obtained from a fraction of Wnt1⁺ pericytes resulted in an increase in their proliferation and mobilization capacity. Finally, the *in vivo* application of the ODN resulted in an increase in the incidence of HLCs and/or Wnt1-traced endothelial cells in the liver of hepatectomized athymic mice.

In summary, NCDCs would only contribute to liver glia cells leading to a gliosis in the fibrotic liver. A subpopulation of bone marrow GLAST⁺ pericytes, traced with Wnt1, contribute to regenerative mechanisms in the injured liver, originating HLCs and endothelial cells. These findings might allow future therapeutic strategies in regenerative medicine.

Publicaciones

Durante el desarrollo de esta tesis se lograron las siguientes publicaciones:

- Aquino JB, Sierra R. 2018. Schwann cell precursors in health and disease. *Glia*.
 66(3):465-476. doi: 10.1002/glia.23262
- Sierra R, Gómez Bustillo S, Kameneva P, Fiore EJ, Mazzone GL, Borda M, Blanco MV, Usuardi C, Furlan A, Ernfors P, Alaniz L, Montaner A, Adameyko I, Aquino JB. 2020.
 Contribution of neural crest and GLAST+ Wnt1+ bone marrow pericytes with liver fibrogenesis and/or regeneration. Liver Int. 2020 Feb 3. doi: 10.1111/liv.14401.
- Fiore E, Malvicini M, Bayo J, Peixoto E, Sierra R, Atorrasagasti C, Rodriguez M, Gomez Bustillo S, Garcia MG, Aquino JB, Mazzolini G. 2016. Involvement of hepatic macrophages in the antifibrotic effect of IGF-I overexpressing mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther.* 7(1):172.
- Sierra R, Gómez Bustillo S, Fiore EJ, Borda M, Mazzone G, Montaner A, Aquino JB.
 IMT504 induces proliferation and movilization of a subpopulation of GLAST+ Wnt1+
 bone marrow stromal progenitor cells with high developmental potential. *In preparation*

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFP	Alfa feto proteína
ANOVA	Análisis de la varianza
APC	allopycocyanin (fluorocromo)
a-SMA	actina de músculo liso
BMPs	proteínas morfogénicas del hueso
BSA	albumina de suero bovino
Ca ²⁺	calcio
CD	cluster de diferenciación
CEH	célula estrellada hepática
CFU-F	unidad formadora de colonia fibroblástica
CRE	CRE recombinasa
DMEM	modificación de Dulbeco del medio mínimo esencial
E	día embrionario
EGF	factor de crecimiento epidérmico
EMT	transición epitelio mesenquimal
ER	receptor estrogénico humano
FGF	factor de crecimiento de fibroblastos
FMO	sistema monoxigenasa conteniendo flavinas
G	guanina
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
GFP	green fluorescent protein
GLAST	transportador de glutamato aspartato
HCC	hepatocarcinoma
HGF	factor de crecimiento de hepatocitos
HLCs	hepatocyte like cells
HSP	heat shock protein
IL-6	interleuquina 6
ір	intraperitoneal
LacZ	gen de la betagalactosidasabacteriana
LoxP	sitio del bacteriofago P1
MEC	matriz extracelular
MSCs	célula madre mesenquimal
Ν	nucleótido
NC	cresta neural
NCC	célula de la cresta neural
NCDCs	célula derivada de cresta neural
NCD-Ps	pericito derivado de cresta neural
ОСТ	optimal cutting temperature compund

ODN	oligodesoxinucleótido
ON	over night
P2	día post natal 2
PBS	buffer fosfato salino
PDGFRa	recepto del factor de crecimiento derivado de plaqueta
PE	phycoeritrina (fluorocromo)
PFA	paraformaldehído
PLP1	proteolipid protein 1
Ру	pirimidina
Rosa26	Rosa 26 locus
rpm	revoluciones por minuto
S100	proteína de unión al calcio
SCPs	precursores de células de Schwann
Sox10	sex-determining region Y-box 10
т	Timidina
ΤΑΑ	tioacetamida
TAE	tris acetato EDTA
TNF	factor de necrosis tumoral
Tom	td-Tomato
Tuj1	tubulina
Тх	tamoxifeno
W	semana
Wnt1	wingless type 1 integration site
YFP	yellow fluorescent protein

Índice

Índice

1.	INTRODU	JCCIÓN	21
1.1	1. El hí	ígado	21
	1.1.1.	Anatomía	21
	1.1.2.	Histología	25
	1.1.3.	Fisiología	26
1.2	2. Fibr	osis y cirrosis hepática	29
	1.2.1.	Fibrosis	29
	1.2.2.	Cirrosis	33
	1.2.3.	Regeneración hepática	34
	1.2.4.	Tratamientos	35
	1.2.5.	Modelos animales de fibrosis	35
1.3	3. Нер	atectomía	36
1.4	4. Cres	sta neural	37
	1.4.1.	Características y contribución con tejidos	37
	1.4.2.	Células derivadas de la cresta neural, células mesenquimales y fibrosis	39
1.5	5. Célu	Ilas madre mesenquimales	40
	1.5.1.	Caracterización	40
1.6	6. Célu	ılas de Schwann	41
	1.6.1.	Origen	41
	1.6.2.	Precursores de células de Schwann	42
1.7	7. Peri	citos	43
1.8	8. Traz	zado de linaje	44
	1.8.1.	Metodología de trazado de linaje	45
	1.8.2.	Característica de un trazador de linaje	46
	1.8.3.	Marcación celular por recombinación genética	46
	1.8.1.	Wnt ^{Cre}	50
	1.8.2.	Nestina ^{Cre}	50
	1.8.3.	Glast CreERT2	50
	1.8.4.	PLP ^{CreERT/2}	50
	1.8.5.	Sox10 ^{CreERT2}	51
	1.8.6.	Cepas reporteras	51
1.9	9. Olig	onucleótido IMT504	52
2.	HIPOTES	IS	54

3.	OBJ	JETIVOS	56
	3.1.	Objetivo general	56
	3.2.	Objetivos específicos	56
4.	MA	ATERIALES Y METODOS	59
	4.1.	Cepas de ratón utilizadas	59
	4.2.	Cruzas realizadas para el trazado de linaje	59
	4.2.	.1. Inducción con tamoxifeno	61
	4.2.	.2. Genotipificación	62
	4.3.	Desarrollo de modelos de fibrosis	63
	4.4.	Perfusión de animales y preparación de muestras	65
	4.5.	Tejido embrionario	66
	4.6.	Tratamiento con el oligonucleótido IMT504	66
	4.7.	Inmunofluorescencia	67
	4.8.	Citometría de flujo	70
	4.8.	1. Células no parenquimáticas	70
	4.8.	.2. Células parenquimáticas	71
	4.8.	.3. Células mononucleares de medula ósea	72
	4.8.	.4. Células mononucleares de sangre periférica	73
	4.9.	Ensayos de células mesenquimales formadoras de colonias (CFU-Fs)	74
	4.10.	Hepatectomía	75
	4.11.	Tinciones histológicas	76
	4.12.	Diferenciación in vivo de células Wnt⁺de la médula ósea en HLCs y células endotelia	les 77
	4.13.	Proliferación de células de médula ósea Wnt inducidas con IMT504	78
	4.14.	Ensayo de Herida de células de médula ósea Wnt inducidas con IMT504	78
	4.15. <i>Wnt1^c</i>	Ensayo de inducción de Wnt1 en cultivos primarios de pericitos trazados de ratones ^{Cre} ;Rosa26 ^{Tom} mediante empleo de IMT504	s 79
	4.16.	Análisis estadístico	79
5.	RES	SULTADOS	81
	5.1.	Desarrollo del modelo de la fibrosis hepática	81
	5.2. fibrosi	Contribución de células Wnt1 ⁺ a la fracción de células no parenquimaticas durante sis hepática	la 82
	5.3.	Contribución de células Wnt1 ⁺ a la fracción de células parenquimáticas en el hígado)
	fibróti	ico	89
	5.4.	Contribución de células Wnt1 ⁺ a la médula ósea	93
	5.5.	Pericitos GLAST ⁺ de médula ósea, una fuente de células endoteliales y de HLCs	95

	5.6.	Contribución de células trazadas con GLAST a la médula ósea	100
	5.7. GLAST	Las células Wnt1 ⁺ de la médula ósea movilizadas por sangre periférica son pericitos ⁺ con propiedades de células progenitoras	102
	5.8. hepate	Pericitos trazados con Wnt1 en la médula ósea se movilizan en un modelo de ectomía parcial	105
	5.9. hepate	Contribución de pericitos GLAST⁺ al perfil celular del hígado en un modelo de ectomía parcial	109
	5.10. hepato	Diferenciación <i>in vivo</i> de pericitos de la médula ósea trazados con Wnt1 en células tipo ocitos y células endoteliales	o- 111
	5.11. con W	Efecto del oligonucleótido IMT504 sobre los pericitos GLAST ⁺ de la médula ósea trazac 'nt1	dos 117
	5.12. con W	Efecto de IMT504 sobre la proliferación de MSCs obtenidas a partir de pericitos trazac 'nt1	dos 120
	5.13. con W	Efecto de IMT504 sobre la movilización de MSCs obtenidas a partir de pericitos trazad 'nt1	los 123
	5.14. ósea n	Efecto del IMT504 sobre la activación del promotor de Wnt1 en pericitos de la médula no trazados previamente	a 124
	5.15. con W	Efecto de IMT504 sobre la diferenciación <i>in vivo</i> de pericitos de la médula ósea trazad Int1 en células tipo-hepatocitos y células endoteliales	os 125
6.	DIS	CUSIÓN	131
6. 7.	DISC	CUSIÓN	131 144
6. 7.	DISC CON 7.1. desarr	CUSIÓN NCLUSIONES Contribución de células trazadas con Wnt1 al perfil celular del hígado durante el rollo	131 144 144
6. 7.	DISC CON 7.1. desarr 7.2. del híg	CUSIÓN NCLUSIONES Contribución de células trazadas con Wnt1 al perfil celular del hígado durante el rollo Contribución de células trazadas con Wnt1 con la fracción de células no parenquimáti gado durante la fibrogénesis hepática	131 144 144 cas 144
6. 7.	DISC CON 7.1. desarr 7.2. del híg 7.3. hepáti	CUSIÓN NCLUSIONES Contribución de células trazadas con Wnt1 al perfil celular del hígado durante el rollo Contribución de células trazadas con Wnt1 con la fracción de células no parenquimáti gado durante la fibrogénesis hepática Contribución de células trazadas con Wnt1 a la fracción de células parenquimáticas icas durante la fibrogénesis hepática	131 144 144 cas 144 145
6. 7.	DISC CON 7.1. desarr 7.2. del híg 7.3. hepáti 7.4.	CUSIÓN NCLUSIONES Contribución de células trazadas con Wnt1 al perfil celular del hígado durante el rollo Contribución de células trazadas con Wnt1 con la fracción de células no parenquimáti gado durante la fibrogénesis hepática Contribución de células trazadas con Wnt1 a la fracción de células parenquimáticas icas durante la fibrogénesis hepática Contribución de células trazadas con Wnt1 con células de la medula ósea	131 144 144 cas 144 145 145
6. 7.	DISC CON 7.1. desarr 7.2. del híg 7.3. hepáti 7.4. 7.5.	CUSIÓN NCLUSIONES Contribución de células trazadas con Wnt1 al perfil celular del hígado durante el rollo Contribución de células trazadas con Wnt1 con la fracción de células no parenquimáti gado durante la fibrogénesis hepática Contribución de células trazadas con Wnt1 a la fracción de células parenquimáticas icas durante la fibrogénesis hepática Contribución de células trazadas con Wnt1 con células de la medula ósea Pericitos GLAST ⁺ de médula ósea, una fuente de células endoteliales y de HLCs	131 144 144 cas 144 145 145 145
6. 7.	DISC CON 7.1. desarr 7.2. del híg 7.3. hepáti 7.4. 7.5. 7.6. propie	CUSIÓN NCLUSIONES Contribución de células trazadas con Wnt1 al perfil celular del hígado durante el rollo Contribución de células trazadas con Wnt1 con la fracción de células no parenquimáti gado durante la fibrogénesis hepática Contribución de células trazadas con Wnt1 a la fracción de células parenquimáticas icas durante la fibrogénesis hepática Contribución de células trazadas con Wnt1 con células de la medula ósea Pericitos GLAST ⁺ de médula ósea, una fuente de células endoteliales y de HLCs Las células trazadas con Wnt1 movilizadas de la médula ósea son pericitos GLAST ⁺ con	131 144 144 144 145 145 145 145
6. 7.	DISC CON 7.1. desarr 7.2. del híg 7.3. hepáti 7.4. 7.5. 7.6. propie 7.7. un mo	CUSIÓN NCLUSIONES Contribución de células trazadas con Wnt1 al perfil celular del hígado durante el rollo Contribución de células trazadas con Wnt1 con la fracción de células no parenquimáti gado durante la fibrogénesis hepática Contribución de células trazadas con Wnt1 a la fracción de células parenquimáticas icas durante la fibrogénesis hepática Contribución de células trazadas con Wnt1 con células de la medula ósea Pericitos GLAST ⁺ de médula ósea, una fuente de células endoteliales y de HLCs Las células trazadas con Wnt1 movilizadas de la médula ósea son pericitos GLAST ⁺ con edades de células mesenquimales formadoras de colonias Contribución de pericitos de la médula ósea trazados con Wnt1 con células del hígado idelo de hepatectomía parcial	131 144 144 cas 144 145 145 145 145 146 0 en 146
6. 7.	DISC CON 7.1. desarr 7.2. del híg 7.3. hepáti 7.4. 7.5. 7.6. propie 7.7. un mo 7.8.	CUSIÓN NCLUSIONES Contribución de células trazadas con Wnt1 al perfil celular del hígado durante el rollo Contribución de células trazadas con Wnt1 con la fracción de células no parenquimáti gado durante la fibrogénesis hepática Contribución de células trazadas con Wnt1 a la fracción de células parenquimáticas icas durante la fibrogénesis hepática Contribución de células trazadas con Wnt1 con células de la medula ósea Pericitos GLAST ⁺ de médula ósea, una fuente de células endoteliales y de HLCs Las células trazadas con Wnt1 movilizadas de la médula ósea son pericitos GLAST ⁺ con edades de células mesenquimales formadoras de colonias Diferenciación <i>in vivo</i> de pericitos trazados con Wnt1 en HLCs y células endoteliales	131 144 144 145 145 145 145 145 146 0 en 146 147
6.	DISC CON 7.1. desarr 7.2. del híg 7.3. hepáti 7.4. 7.5. 7.6. propie 7.7. un mo 7.8. 7.9. con W	CUSIÓN CONTRIBUCIÓN de células trazadas con Wnt1 al perfil celular del hígado durante el rollo Contribución de células trazadas con Wnt1 con la fracción de células no parenquimáti gado durante la fibrogénesis hepática Contribución de células trazadas con Wnt1 a la fracción de células parenquimáticas icas durante la fibrogénesis hepática Contribución de células trazadas con Wnt1 con células de la medula ósea Contribución de células trazadas con Wnt1 con células de la medula ósea Pericitos GLAST ⁺ de médula ósea, una fuente de células endoteliales y de HLCs Las células trazadas con Wnt1 movilizadas de la médula ósea son pericitos GLAST ⁺ con redades de células mesenquimales formadoras de colonias Contribución de pericitos de la médula ósea trazados con Wnt1 con células del hígado delo de hepatectomía parcial Diferenciación <i>in vivo</i> de pericitos trazados con Wnt1 en HLCs y células endoteliales Efecto del oligonucleótido IMT504 sobre células estromales de la médula ósea trazada rt1.	131 144 144 145 145 145 145 145 145 146 0 en 146 147 147

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El hígado

1.1.1. Anatomía

El hígado es la glándula más voluminosa del organismo (corresponde al 2,5% del peso corporal de un adulto) y es de suma importancia por su diversa actividad metabólica. Produce una sustancia denominada bilis que contiene desechos de eritrocitos y algunas sales que permiten la digestión de lípidos al nivel del intestino delgado, donde es liberada. Entre las funciones principales del hígado se encuentran el almacenamiento y/o producción de energía para el organismo a través del metabolismo de lípidos, proteínas e hidratos de carbono, y la detoxificación y eliminación de moléculas nocivas. Está ubicado en la parte superior del abdomen, en el hipocondrio derecho, debajo del diafragma, protegido por la parrilla costal. Se sitúa por encima del estómago, riñón derecho e intestino delgado. Está recubierto por una cápsula de tejido conjuntivo fibroso, llamada cápsula de Glisson y posee una cubierta serosa, denominada peritoneo visceral, que rodea la cápsula, excepto en los sitios donde la glándula se encuentra en contacto con otros órganos ^{1,2}.

El hígado esta dividido anatómicamente en dos lóbulos principales (anterior derecho e izquierdo), separados por el ligamento falciforme, y dos lóbulos más pequeños (cuadrado y caudado), ubicados en la parte dorsal. Es un órgano muy irrigado, con sangre aportada por la vena porta y la arteria hepática. En cortes histológicos, estas estructuras, junto con los conductillos biliares, pueden ser observadas en los espacios portales. El mayor caudal sanguíneo del tejido hepático proviene de la vena porta, que transporta sangre desde el tracto intestinal, con compuestos absorbidos durante el proceso de digestión y una baja

concentración de oxígeno. La arteria hepática, por otra parte, contribuye con sangre oxigenada ³ (Figura 1).



Figura 1: Estructura anatómica del hígado (obtenido de <u>https://www.saludalia.com/atlas/aparato-</u> <u>digestivo</u>)

Los lóbulos hepáticos están divididos en lobulillos, que son las unidades estructurales y funcionales del hígado. Tienen un aspecto hexagonal, en los que los hepatocitos, células parenquimáticas que contribuyen con el 70% de las células del órgano, se distribuyen en fascículos orientados radialmente hacia el centro, donde se encuentra la vena central o centrolobulillar. Las venas centrolobulillares confluyen dando lugar a las venas hepáticas que terminan drenando su contenido en la vena cava inferior. Los distintos fascículos de hepatocitos están separados entre sí por capilares sinusoidales, que son perfundidos desde la periferia de los lobulillos hepáticos hacia la vena central. La sangre rica en nutrientes de la absorción intestinal y pancreática (aportada por la vena porta) y la sangre más oxigenada (de la arteria hepática) se mezclan en los sinusoides hepáticos. Los hepatocitos se unen

entre sí mediante uniones estrechas que delimitan los canalículos biliares. Los hepatocitos liberan la bilis hacia la luz de los canalículos. Esta luz se continúa, hacia la periferia de los lobulillos, en los conductillos biliares que se encuentran recubiertos por células epiteliales llamadas colangiocitos. Los conductillos biliares confluyen en conductos biliares de mayor diámetro y finalmente en el tracto biliar extrahepático. Este tracto se une al conducto cístico que proviene de la vesícula biliar y juntos forman el conducto colédoco, que desemboca en el duodeno⁴.

Durante el desarrollo embrionario, el hígado se origina como una evaginación endodérmica de la pared del intestino anterior (Figura 2). El primordio del hígado aparece en la primera mitad de la tercera semana del desarrollo en el humano. Dicha evaginación o prominencia, denominada divertículo hepático, está compuesta por células en rápida proliferación que penetran en el tabique transverso. Las células del divertículo dan origen a los hepatocitos. Las células hematopoyéticas (presentes en el hígado durante el desarrollo embrionario), las células de Kupffer (macrófagos específicos del hígado que integran la pared del sinusoide, originados en el saco vitelino) y las células de tejido conectivo se desplazan a través del mesodermo del tabique transverso. El pedículo original del divertículo se convierte en el conducto biliar común (colédoco) y un brote de éste da origen al divertículo cístico del que se forman la vesícula biliar y el conducto cístico.



Figura 2: Embrión humano. El hígado se expande caudalmente hacia el interior de la cavidad abdominal (tomado de Sadler TW, 1988⁵).

En la décima semana del desarrollo, el hígado contribuye con el 10% del peso corporal total: esto se debe en primer lugar al desarrollo de los sinusoides y en segundo, a su función hematopoyética. Focos de células hematopoyéticas en proliferación se localizan entre los hepatocitos y las paredes de los vasos. La actividad hematopoyética hepática desaparece de manera gradual en los últimos dos meses de vida intrauterina, quedando al momento del nacimiento pequeños islotes hematopoyéticos.

Hacia la semana doce de gestación, el hígado comienza a producir la bilis. A esa altura del desarrollo embrionario, tanto el conducto gastrointestinal como la vesícula biliar y el conducto cístico se encuentran desarrollados y este último se encuentra unido con el conducto hepático, conformando el conducto colédoco⁵.

1.1.2. Histología

Entre los componentes estructurales del hígado se encuentran los siguientes:

Parénquima: consiste en trabéculas de hepatocitos bien organizadas, que en el adulto normalmente tienen una sola célula de espesor, separadas por sinusoides. En los niños de hasta 6 años los hepatocitos se distribuyen en trabéculas de dos células de espesor.

Estroma de tejido conjuntivo: se continúa con la cápsula fibrosa de Glisson. En el estroma conjuntivo se encuentran vasos sanguíneos, nervios, vasos linfáticos y conductos biliares.¹

Capilares sinusoidales (sinusoides): son los vasos sanguíneos situados entre las trabéculas hepáticas. Presentan fenestraciones y membrana basal discontinua: proteínas y gotas lipídicas pasan libremente, a través de estos poros, hacia y desde el espacio perisinusoidal.¹

Espacio perisinusoidal (espacio de Disse): región situada entre el endotelio sinusoidal y los hepatocitos. Allí se localizan microvellosidades de los hepatocitos y las células de Ito o **células estrelladas hepáticas (HeSCs)**, de origen mesodérmico.¹

El lobulillo hepático clásico es la unidad estructural y funcional del hígado. Posee una estructura hexagonal y se organiza alrededor de la vena central. En sus vértices se localizan los espacios porta, formados típicamente por la arteria hepática, la vena porta y el conducto biliar (Figura 3).

El parénquima hepático, localizado entre los espacios porta y la vena centrolobulillar, está conformado principalmente por hepatocitos. Los hepatocitos llevan a cabo la mayoría de las funciones metabólicas y biosintéticas y eliminan las sustancias tóxicas en circulación. Dentro del espacio de Disse, las células de Ito o células estrelladas hepáticas, cumplen

funciones relacionadas con el almacenamiento y metabolismo de la vitamina A. En el contexto de un daño e inflamación tisulares, estas células se diferencian en miofibroblastos, cumpliendo un rol clave en el proceso de fibrosis. Además, formando parte de la pared de los sinusoides se encuentran las células de Kupffer, o macrófagos hepáticos, que tienen como función la eliminación de células envejecidas y proteínas de la sangre. Las células de Kupffer se asocian a respuestas inmunológicas y están involucradas en mecanismos proinflamatorios, jugando un rol importante en el proceso de fibrosis⁶.



Figura 3: Microarquitectura hepática. Representación estructural del hígado, y las células que lo componen (modificado de Mandana Khalili & Blaire Burman⁷)

1.1.3. Fisiología

El hígado es un órgano clave en el metabolismo corporal y cumple muy diversas funciones.

Algunas de las más importantes son¹:

- Intercambio de moléculas con la sangre y regulación de la presión coloidosmótica.
- Funciones vasculares: el hígado actúa como reservorio de sangre, ya que almacena

el 10 % del volumen de sangre total. Puede captar sangre si la volemia fuese alta, o

suplirla si fuera baja.

- Metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas, grasas, hormonas y compuestos químicos extraños:
 - 1. Metabolismo de carbohidratos: El hígado es el principal responsable de la homeostasia de los hidratos de carbono. Cuando la concentración de glucosa en sangre se incrementa, el hígado remueve el exceso por la vía de la síntesis de glucógeno, glicólisis y lipogénesis. Cuando se produce un déficit de glucosa en sangre, el hígado incrementa la glucemia por la vía de la glucogenólisis y gluconeogénesis.
 - 2. Metabolismo proteico: Tras la alimentación, el hígado capta aminoácidos de la circulación portal y los cataboliza para su posterior utilización en la síntesis de proteínas estructurales y plasmáticas. Asimismo, es capaz de llevar a cabo la deaminación de los aminoácidos a fin de utilizar las proteínas como fuentes de energía. Por otra parte, también sintetiza urea a partir del amoníaco generado tanto en los riñones como en las bacterias intestinales, para su posterior excreción.
 - Metabolismo de los lípidos. Aunque el metabolismo de las grasas puede ocurrir en casi todas las células, algunos de sus procesos se producen con mayor rapidez en las células hepáticas.
- Formación de bilis: principal vía de excreción de bilirrubina, colesterol y otros productos del metabolismo orgánico. Las sales biliares permiten la digestión de grasas y su adsorción junto con vitaminas liposolubles.

- Depósito de hierro y vitaminas
- Síntesis de factores de coagulación.

El sistema de sinusoides hepáticos transporta una mezcla de sangre proveniente de la vena porta (70%) y de la arteria hepática (30%) hacia la vena central. Posee un elevado flujo sanguíneo y resistencia vascular reducida. Esta víscera posee un flujo linfático considerable debido al pasaje libre de plasma sanguíneo hacia el intersticio del espacio de Disse. Por lo tanto, la linfa drenada por el hígado contiene una concentración de proteínas próxima a 6 g/dl, ligeramente menor a la plasmática (80% de su concentración)⁸.

El hígado tiene una gran capacidad regenerativa, incluso después de una pérdida importante de masa hepática funcional, luego de una hepatectomía parcial o una lesión hepática aguda. La hepatectomía parcial, de hasta el 70% de la masa hepática, hace que los lóbulos restantes se expandan hasta que el hígado recupera rápidamente su tamaño original⁹. Durante este proceso, los hepatocitos entran nuevamente en ciclo celular y proliferan hasta alcanzar la masa parenquimática requerida para las funciones metabólicas del organismo; con posterioridad, estas células vuelven a su estado de quiescencia. En los mecanismos regenerativos existe también contribución de las células madre hepáticas o células ovales.

Los hepatocitos tienen también la capacidad de eliminar y depurar fármacos, hormonas y otras sustancias¹⁰.

1.2. Fibrosis y cirrosis hepática

1.2.1. Fibrosis

La fibrosis es consecuencia de diversos ciclos de cicatrización, como consecuencia de repetidas lesiones hepáticas, y resulta en un significativo remodelado tisular. Se caracteriza por la acumulación excesiva de matriz extracelular (MEC), caracterizado por la presencia de abundantes fibras colágenas (Figura 4). La cirrosis es el estadío final de la fibrosis hepática, siendo la primera causa de transplante hepático. No existe ningún otro tratamiento médico alternativo que sea eficaz para esta enfermedad, siendo limitado el número de donantes de órganos⁶. Una de las complicaciones más frecuentes asociadas a esta patología es el hepatocarcinoma, el 5º tipo de cáncer más común y la 2º causa de muerte por cáncer a nivel mundial¹¹. La cirrosis es la causa más creciente de morbilidad y mortalidad en países desarrollados, siendo la causa 14º de muerte a nivel mundial y 4º en Europa central. El gran desafío en la actualidad es evitar la necesidad del transplante hepático¹².

Si el estímulo de la lesión hepática es eliminado tempranamente se activa un mecanismo de fibrinólisis, caracterizado por la degradación de esta matriz¹³. Sin embargo, cuando el agente causante de las lesiones persiste, se estimula nuevamente la inflamación la que es seguida posteriormente por un proceso de fibrogénesis¹⁴. El daño crónico termina por afectar la microestructura del parénquima hepático, lo que evoluciona hacia el desarrollo de la cirrosis, caracterizado por la formación de numerosos anillos fibróticos completos alrededor de los lobulillos hepáticos.

El sitio de acumulación de MEC depende del estímulo que causa el daño: en la fibrosis causada por el alcohol, el aumento de MEC se observa principalmente en los sinusoides

hepáticos; mientras que en la fibrosis no alcohólica, es observado principalmente en cercanía de las venas centrolubulillares y en la cirrosis biliar (o causada por infecciones con virus de la hepatitis), se localiza preferentemente en la zona periportal¹⁵. La acumulación de matriz impide el correcto paso de nutrientes desde los sinusoides a los hepatocitos y viceversa, generando una disfunción hepática.



Figura 4: Evolución de la fibrosis. Lesiones hepáticas repetidas llevan al reemplazo de tejido funcional por tejido conectivo y acumulación de fibras colágenas. La cirrosis se caracteriza por la presencia de nódulos de regeneración, rodeados por anillos completos fibrosos. Adaptado de <u>https://hepatitis2000.org/</u>

En el proceso fibrogénico, una lesión hepática se caracteriza por la inducción de la apoptosis/necrosis de hepatocitos¹⁶. La muerte hepatocitaria induce posteriormente un proceso proinflamatorio. Ante una apoptosis masiva de hepatocitos, la capacidad de las células fagocíticas para eliminar de manera efectiva y rápida las células muertas se ve superada, por lo que sus restos se acumulan y posteriormente tiene lugar una autólisis de cuerpos apoptóticos, con liberación de sus contenidos proinflamatorios. Además, se ha demostrado que la absorción de cuerpos apoptóticos por las células de Kupffer, los principales fagocitos en el hígado, aumenta la expresión de los ligandos de muerte, especialmente del ligando de Fas y de la citoquina proinflamatoria TNF- α , acelerando así la

apoptosis de hepatocitos y estimulando la inflamación¹⁷. Aunque su capacidad absortiva es menor que la de las células de Kupffer, las células estrelladas hepáticas están anatómicamente mejor situadas para fagocitar cuerpos apoptóticos que las células de Kupffer. La activación persistente de las células de Kupffer da como resultado la exacerbación de la apoptosis de los hepatocitos, la inflamación hepática, la activación sostenida de células estrelladas hepáticas y la progresión a cirrosis hepática (Figura 5).



Figura 5: Representación esquemática de los mecanismos moleculares implicados en el modelo propuesto que vincula la apoptosis de hepatocitos y la fibrosis hepática (tomado de Guicciardi & Gores, 2005).

A su vez, las células estrelladas hepáticas activadas secretan quimioquinas inflamatorias que activan a las células de Kupffer, induciendo en estas últimas la expresión de moléculas de adhesión y/o estimulando el sistema inmunológico, mediante secreción de moléculas proinflamatorias y mecanismos de presentación antigénica. Por lo tanto, existe un circuito de retroalimentación positiva a través de que las células inflamatorias y fibrogénicas se estimulan mutuamente para amplificar la fibrosis.

En condiciones normales, las células estrelladas hepáticas representan alrededor de un 8% del parénquima hepático. Su principal función es la de reservorio de vitamina A y retinoides y de recambio de la MEC¹⁸. En el contexto de desarrollo de fibrosis, estas células pierden las inclusiones de vitamina A y adquieren propiedades de miofibroblastos, aumentando la expresión de proteínas con funciones contráctiles (como la alfa-actina de músculo liso, α -SMA), inflamatorias, proliferativas, migratorias y profibrogénicas. Las células estrelladas hepáticas activadas migran hacia el sitio de lesión y aumentan la producción de colágeno y de otros componentes de la MEC. El desarrollo crónico de este proceso, genera la inhibición del proceso de degradación de colágeno^{19–21} (Figura 6).



Figura 6: Cambios fenotípicos que tienen lugar en el parénquima hepático durante la fibrogénesis. Se observan sucesivamente los siguientes procesos: muerte hepatocitaria, infiltrado leucocitario y activación de HeSCs y de células de Kupffer. Como consecuencia, se incrementa la MEC en el espacio perisinusoidal, el endotelio pierde sus fenestraciones y los hepatocitos pierden sus microvellosidades usualmente extendidas hacia el espacio de Disse (adaptado de Bataller & Brenner, 2005⁶).

1.2.2. Cirrosis

La cirrosis hepática se asocia con un aumento significativo en la resistencia al flujo sanguíneo. Luego de ciclos progresivos de lesión y cicatrización, y en un estado avanzado de la enfermedad, los hepatocitos proliferan generando nódulos en regeneración, rodeados por anillos de tejido cicatricial característicos de la cirrosis. Se produce entonces un aumento en la resistencia al flujo de sangre portal que resulta de la combinación de desequilibrios estructurales asociados con la enfermedad hepática avanzada, tales como algunas anormalidades funcionales endoteliales y un tono vascular hepático aumentado. Se produce también vasodilatación esplácnica como una respuesta adaptativa a los cambios en la hemodinamia hepática. Esto ocurre como un intento de corregir la hipertensión portal¹². Esta descripción general del proceso es común a las distintas etiologías que causan la fibrosis/cirrosis, tales como la hepatitis, el consumo crónico de alcohol o el exceso de acumulación de grasas en el hígado y la posterior inflamación hepática denominada esteatohepatitis no alcohólica¹⁰.

La cirrosis suele presentarse en pacientes entre 40 y 70 años de edad y, en general, los pacientes suelen permanecer en este estado asintomático durante meses o incluso años (cirrosis hepática compensada)²². En ocasiones, su diagnóstico es casual ante hallazgos como hepatomegalia, ictericia, esplenomegalia, estigmas cutáneos de hepatopatía crónica o alteraciones de los valores de laboratorio (descenso del valor de plaquetas o alteraciones en las pruebas de coagulación, entre otras). A medida que la función hepática se deteriora, se pueden presentar una o más complicaciones mayores (cirrosis hepática descompensada). Estas complicaciones consisten en la presencia de ascitis, hemorragia por varices esófago-gástricas, encefalopatía hepática o hepatocarcinoma (HCC).

Particularmente, el riesgo de padecer HCC aumenta considerablemente en pacientes con cirrosis. Algunos trabajos, muestran un incremento de más de 20 veces en la incidencia del HCC luego de establecida la cirrosis, por lo que el HCC se posiciona como la principal causa de muerte en pacientes con cirrosis²³.

Históricamente, la fibrosis hepática se consideró un proceso pasivo e irreversible, causado por el colapso del parénquima hepático y su sustitución por tejido rico en colágeno. Hacia el año 1970, algunos reportes clínicos comenzaron a sugerir que la fibrosis hepática podría ser reversible. En 1980 se descubrió que las células estrelladas hepáticas, descriptas en 1876 por von Kupffer, son las principales responsables de la producción y deposición de las fibras colágenas en el hígado fibrótico. Otras células, tales como miofibroblastos portales y células originadas en la médula ósea, han también demostrado potencial fibrogénico⁶.

1.2.3. Regeneración hepática

El hígado se caracteriza por una capacidad singular para regular su tamaño. Esta propiedad biológica es especialmente notable ya que los hepatocitos son células completamente diferenciadas/especializadas y están en quiescencia (en G₀, fuera del ciclo celular). Además, tienen una baja tasa de recambio y un tiempo de vida prolongado. La masa hepática se caracteriza por una relación constante con respecto al tamaño corporal del individuo. Las disminuciones de la masa funcional hepática producidas, por ejemplo, por una hepatectomía parcial (ablación de uno o varios lóbulos) o lesiones hepáticas se corrigen rápidamente mediante la replicación de los hepatocitos. La regeneración también requiere de la restauración de la MEC necesaria para la orientación de los hepatocitos. Algunos de

los factores tróficos identificados como de importancia para la regeneración del hígado son el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el de crecimiento hepatocitario (HGF)¹.

1.2.4. Tratamientos

El trasplante hepático es la primera opción de tratamiento, con frecuencia la única, de pacientes con falla hepática aguda, enfermedad hepática terminal y hepatocarcinoma. El trasplante no suele curar la enfermedad de base, y en porcentajes variables de pacientes es frecuente la recurrencia de la enfermedad. Por lo tanto, la decisión de colocar a un paciente en la lista de espera para trasplante debe analizarse minuciosamente considerando diferentes parámetros que refieren a los beneficios potenciales. La presencia de cirrosis no es causa suficiente para proceder a un trasplante. Generalmente, éste se indica si el paciente ha sufrido una hipertensión portal o manifiesta signos de compromiso de la función hepática. En Argentina existen 7,96 donantes por cada millón de habitantes, y unas 7682 personas se encuentran en lista de espera para un trasplante, número que crece a medida que surgen nuevos pacientes susceptibles de ser trasplantados (INCUCAI, 2018). Por lo tanto, se requiere el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para tratar y prevenir la cirrosis hepática.

1.2.5. Modelos animales de fibrosis

Los modelos animales de fibrosis permiten entender la fisiopatología de la fibrogénesis hepática y son herramientas útiles para determinar la efectividad de nuevos tratamientos. Debido a la diversidad de enfermedades hepáticas que resultan en una fibrosis y al no existir un único modelo animal que reproduzca exactamente lo que ocurre en humanos, la aplicación de diversos modelos permite la obtención de información complementaria. Un
modelo murino utilizado de toxicidad crónica es el inducido por tioacetamida (TAA). La TAA es conocida como un potente agente hepatotóxico. Una vez administrado, este compuesto es bioactivado por el citocromo p450 y/o por el sistema monoxigenasa conteniendo flavinas (FMO) que lo convierte en TAA-S-óxidos, los cuales generan la necrosis hepatocitaria²⁴. Su efecto sobre los hepatocitos se debe, en parte, a la inducción de cambios en la permeabilidad celular, incremento de los niveles de Ca²⁺ e inhibición de la actividad mitocondrial en el hepatocito²⁵. La aplicación crónica de TAA induce una fibrosis preferentemente pericentral con eventual formación de puentes entre venas centrales y porto-portales^{26,27}.

Otro modelo experimental de fibrogénesis hepática ampliamente empleado es el de la ligadura del conducto colédoco. En este modelo se produce, mediante compresión continua con hilo de sutura, una obstrucción quirúrgica extra-hepática del flujo de bilis hacia el duodeno. Entre los mecanismos de daño hepático en este modelo se cuenta la acumulación de ácidos biliares que estimulan la apoptosis y la necrosis de los hepatocitos, afectando primeramente a colangiocitos²⁸. Asimismo, se ha demostrado que los ácidos biliares estimulan el estrés oxidativo y aumentan la producción de TGF-β1 y colágeno²⁹. El daño se produce principalmente en el área periportal. En ratón, luego de unos 16 días puede observarse una fibrosis periportal con formación de puentes de fibrosis porto-portales³⁰.

1.3. Hepatectomía

La capacidad de los hepatocitos para ingresar al ciclo celular y regenerar el hígado después de la pérdida de tejido proporciona un modelo *in vivo* para estudiar la regulación de la

proliferación y la regeneración de órganos. La extensión de la proliferación de hepatocitos es directamente proporcional a la cantidad de tejido hepático extraído³¹.

La sorprendente capacidad de regeneración del hígado se demuestra más claramente con el modelo experimental de hepatectomía parcial de dos tercios en ratas, que fue iniciado por Higgins y Anderson en 1931³². En este modelo, el 70% del hígado se extirpa quirúrgicamente en ratas o ratones. Los lóbulos hepáticos residuales restauran la masa hepática original aproximadamente una semana después de la cirugía, aunque los lóbulos resecados nunca vuelvan a crecer³³.

1.4. Cresta neural

1.4.1. Características y contribución con tejidos

La cresta neural (NC) es una población transitoria de células multipotentes con alta capacidad migratoria que se delaminan del techo del tubo neural durante el desarrollo. La NC se caracteriza por su notable plasticidad (capacidad para originar células de muy diversos linajes) y su alta motilidad (capacidad migratoria, que le permite contribuir con tejidos presentes en sitios muy distantes al de su origen). La NC se origina en los márgenes laterales de la placa neural, como resultado de la inducción mediada por factores producidos por la placa neural y por el ectodermo no neural adyacente y el mesodermo subyacente. Durante el desarrollo, conforme el surco neural se profundiza, y los pliegues se fusionan dorsalmente, las células de la NC sufren una transición epitelio-mesenquimal (EMT) y se delaminan del techo del neuroepitelio (Figura 7) una vez que el tubo neural se cierra. Proteínas de la MEC y factores solubles liberados por tejidos adyacentes inducen la expresión de factores de transcripción específicos que causan su transformación de epitelial

a mesenquimal y su emigración del epitelio neural. La diversidad de linajes que pueden originarse a partir de estas células se explicaría principalmente por la localización de esta estructura en la interfase de diversas estructuras, durante la inducción neural⁵.

Las células de la cresta neural (NCCs) originan los siguientes fenotipos celulares en el sistema nervioso periférico: neuronas (sensitivas y del sistema nervioso autónomo), células de la glia (células satélites en los ganglios nerviosos, y células de Schwann mielinizantes y no mielinizantes), y fibroblastos endoneurales. La especificación de los diversos linajes de NCDCs en los nervios está regulada por neuregulinas, ligandos de Notch y proteínas morfogénicas del hueso (BMPs)³⁴. Las NCCs contribuyen también con tejidos tales como: corazón y vasos sanguíneos (originando casi toda la pared de los vasos del cuello, salvo el endotelio), huesos (casi todas las piezas óseas del cráneo), oído, ojos (la córnea), piel, dientes (dan lugar a células mesenquimales de los dientes, que recambian la capa de odontoblastos luego del nacimiento), meninges, músculo esquelético y glándula suprarrenal (originan las células cromafines de la médula ósea)³⁶. Existen también reportes que sugieren que NCDCs obtenidas de la médula ósea de ratones transgénicos pueden ser crecidas como esferas y comportarse como células madre neurales³⁷. También se ha demostrado que las NCDCs originan una subpoblación de células Nestina⁺ en la médula ósea que contribuye con cultivos de células madre mesenquimales (MSCs)³⁸. Finalmente, se ha reportado que las MSCs pueden originar hepatocitos in vitro, los que expresan varios de sus marcadores celulares específicos y presentan sus características funcionales típicas^{39,40}. Sin embargo, hasta el momento no existen reportes que hayan analizado la posibilidad de que NCDCs u otras células estromales presentes en la médula ósea puedan originar in vivo hepatocitos luego de una lesión hepática.



Figura 7: *La cresta neural es una población celular multipotente. (A) El desarrollo de la cresta neural* comienza en la etapa de la gástrula, con la especificación de células epiteliales presentes en los bordes de la placa neural. (B) A medida que la placa neural se cierra para formar el tubo neural, los progenitores de la cresta neural se especifican en la parte dorsal de los pliegues neurales. (C) Después de la especificación, las células de la cresta neural sufren EMT y se delaminan del tubo neural. (D) Las células migratorias de la cresta neural siguen rutas estereotipadas alcanzando diversos destinos, donde darán lugar a los diversos derivados. (E) Se incluyen entre los mismos células mesenquimales, neurales, secretoras y pigmentadas. Tomada con modificaciones de Simoes-Costa & Bronner, 2015³⁵.

1.4.2. Células derivadas de la cresta neural, células mesenquimales y fibrosis

Se han podido identificar poblaciones de miofibroblastos originados en sitios distantes, tales como fibrocitos derivados de la médula ósea, además de fibroblastos portales y células parenquimáticas que sufrirían EMT. Consistentemente, en situaciones de estrés tisular, diversos tipos celulares pueden ser hallados en sangre periférica, incluyendo MSCs, progenitores endoteliales, células madre ovales hepáticas, fibrocitos y progenitores de músculo esquelético⁴¹.

Entre los estadíos embrionarios E12 a E14, se ha descripto en el ratón la presencia de NCDCs en la circulación periférica, por lo que se ha propuesto la posible contribución de esta vía a diversos órganos, incluyendo el hígado y la médula ósea^{42–44}. Por lo tanto, esas células reclutadas durante el desarrollo embrionario podrían contribuir con una subpoblación de MSCs en el adulto. Alternativamente, precursores de células de Schwann (SCPs) podrían originar células estromales en la médula ósea a través del proceso de inervación durante la osificación endocondral, pudiendo ser también fuente de MSCs⁴⁵.

1.5. Células madre mesenquimales

Las MSCs son una población heterogenea de células progenitoras, principalmente de origen mesodérmico aunque una subpoblación en los cultivos tiene origen en la NC. Estas células poseen propiedades anti-inflamatorias e inmunosupresoras, capacidad de ser movilizadas y reclutadas hacia sitios de injuria o que sufren remodelación⁴⁶.

1.5.1. Caracterización

Las MSCs, para ser consideradas como tales, deben cumplir con los siguientes criterios:

- capacidad de adherirse al plástico, en cultivo
- diferenciación a adipocitos, osteocitos y condrocitos
- expresión de ciertos marcadores moleculares en superficie: CD105,CD44,CD73 y
 CD90
- ausencia de marcadores de linaje hematopoyéticos, como: CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 y CD19.

Por otro lado, aunque diversos resportes sugieren la posible diferenciación de MSCs en células tipo-hepatocitos (HLCs), sigue siendo motivo de controversia que las MSCs puedan diferenciarse en otros tipos celulares, como endotelio, cardiomiocitos y neuronas, por ejemplo^{47–50} Suelen formar colonias en plástico, en ensayos de CFU-Fs.

1.6. Células de Schwann

1.6.1. Origen

Las células de Schwann son células de la glía localizadas en el sistema nervioso periférico, que comprende principalmente los nervios del organismo no localizados dentro del encéfalo y médula espinal. Entre sus diversas funciones se encuentran: sostén mecánico y fisiológico de neuronas, producción de una vaina de mielina (en uno de sus fenotipos) y fagocitosis de detritos celulares. Los dos tipos de glía principales, derivados de la NC, son las células satélite (en contacto con los somas neuronales, en los ganglios nerviosos) y las células de Schwann (Figura 8). Asimismo, las células del perineuro pueden ser también consideradas como células de la glía⁵¹. Las células de Schwann son células de soporte en contacto con axones neuronales, con capacidad de producir una vaina de mielina que, rodeando los axones, los aísla y facilita una mayor velocidad de conducción de los impulsos nerviosos. Como en otros tejidos inervados, en los órganos viscerales pueden encontrarse células de Schwann; en el hígado, corresponden principalmente al fenotipo de células de Schwann no mielinizantes y expresan GFAP y S100β. Las células de la glía periférica al diferenciarse conservan la expresión del factor de transcripción Sox-10¹.



Figura 8: Células de Schwann. En la fotografía se muestran núcleos circundando axones que corresponden en su mayoría a células de Schwann (flechas negras) (Adaptada de Ross y Pawlina, 2015).



Figura 9: Resumen esquemático de los estadíos de diferenciación de las células de Schwann durante el desarrollo. Los precursores de células de Schwann (A) rodean los haces de axones (B), para luego segregar un solo axón de gran diámetro y dividirse (C). Una célula hija mieliniza el axón segregado (F, G), mientras que el otro permanece asociado con el haz axonal en desarrollo. Esta segregación de los axones y la división celular continúan hasta que los axones comienzan a ser mielinizados (G) o forman parte de las fibras de Remak (E) (Tomado de Trapp et al, 2004).

1.6.2. Precursores de células de Schwann

Las células de Schwann derivan embriológicamente de la cresta neural. Estas células al entrar en contacto con axones adquieren el fenotipo de SCPs, que migran y proliferan a lo largo de tractos de axones periféricos en crecimiento. Los SCPs que mantienen el contacto con axones progresan en su diferenciación hacia células de Schwann inmaduras. Luego, adquieren el fenotipo de células de Schwann mielinizantes (cuando están en contacto con axones de diámetro mayor) o no mielinizantes (Figura 9). El grosor de la capa de mielina también dependerá del diámetro del axón y es directamente proporcional a la velocidad de conducción de los impulsos nerviosos. Las fibras más delgadas y de conducción lenta se disponen en grupos, y cada uno de ellos es envuelto por una célula de Schwann no mielinizante⁵².

1.7. Pericitos

Los pericitos son células mayormente de origen mesodérmico que forman asociaciones cercanas con las células endoteliales, con funciones esenciales en el mantenimiento de los vasos sanguíneos de pequeño calibre (capilares y vénulas postcapilares) así como en la angiogénesis⁵³ (Figura 10 A). Además, se ha demostrado que los pericitos desempeñan un papel en el mantenimiento de nichos de células madre hematopoyéticas en la médula ósea⁵⁴. Se ha sugerido que son los tipos celulares que presentan propiedades de MSCs *in vitro*¹.

Estas células son heterogéneas. Por ejemplo, han sido descriptas en el sistema nervioso central dos poblaciones de pericitos. Los pericitos de tipo A expresan GLAST, mientras que los de tipo B son α SMA⁺ (alfa actina de músculo liso) y desmina⁺ (Figura 10 B). Ambos tipos expresan los isoformas α y β de los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR α y β) y CD13⁵⁵. En la médula ósea se hallan descriptos dos tipos de pericitos que forman parte y regulan nichos de células hematopoyéticas: las células estromales perisinusoidales, que son las más abundantes, expresan el receptor de Leptina

y niveles moderados de Nestina y son α -SMA⁻, y las células estromales periarteriolares, que se comunican entre sí por uniones comunicantes y expresan α -SMA y altos niveles de Nestina⁵⁶.



Figura 10: Pericitos. (A) Representación de un pericito alrededor de un endotelio. (B) microfotografía coloreada de los dos tipos de pericitos descriptos en el sistema nerviosos central. El pericito tipo A, coloreado en verde y el pericito tipo B coloreado en violeta. Así mismo las células endoteliales están coloreadas en rojo y un astrocito en cyan. *marca la luz del capilar. Adaptado de Goritz et al. 2011 y https://docplayer.com.br/20986965-Sistema-circulatorio-rio.html

1.8. Trazado de linaje

El trazado de linaje es un abordaje experimental que permite identificar toda la progenie de un tipo celular específico. Se trata de la metodología más utilizada actualmente y la estrategia experimental privilegiada (*gold standard*) para identificar el fenotipo y las propiedades de células progenitoras. Permite comprender mejor los mecanismos involucrados en el desarrollo de tejidos, homeostasis y enfermedad, especialmente al combinar esta estrategia con la manipulación experimental de señales que regulan el destino celular. Para este fin se cuenta con modelos genéticos desarrollados en ratones doble-transgénicos, basados en la actividad de recombinasas en modelos condicionales (se sintetiza la enzima recombinasa específicamente en un tipo celular) y también eventualmente inducibles (empleando constructos que permitan dicha transcripción únicamente mientras se encuentre presente en el organismo una sustancia, como el tamoxifeno). Para aplicar esta estrategia se deben cruzar dos cepas de ratones: una de ellas otorga la especificidad, ya que permite la expresión de la enzima recombinasa bajo un promotor correspondiente a un gen activo en el tipo celular de interés, y la otra expresa un gen reportero que emite luz fluorescente o su expresión puede ser revelada por una reacción enzimática (gen de la beta-galactosidasa bacteriana; lacZ). Sólo cuando se obtiene una recombinación de estos transgenes, se expresa el gen reportero. El cruzamiento de ambas cepas permite identificar linajes celulares, una estrategia útil para avanzar en el conocimiento de mecanismos involucrados en la biología del desarrollo.

1.8.1. Metodología de trazado de linaje

En el trazado de linaje basado en la marcación celular por recombinación genética, como los transgenes están incorporados en el genoma celular, es posible identificar toda la progenie de un tipo celular dependiendo del grado de penetración y recombinación de los transgenes. Por lo tanto, esta estrategia provee información sobre los diversos tipos celulares originados a partir de una célula progenitora, su localización y/o su estadio de diferenciación. La expresión del gen reportero permite también su aislamiento por citometría de flujo con separador de fracciones, o sistemas de beads cargadas con anticuerpos específicos y columnas magnéticas: es posible así obtener una subpoblación celular con alto grado de pureza para su posterior caracterización fenotípica (perfil de expresión) o su uso experimental.

1.8.2. Característica de un trazador de linaje

Como características principales que deberían tenerse en cuenta al analizar el trazado de linajes celulares se incluyen: la expresión del transgen no debería cambiar las propiedades de la célula a estudiar, ni la de su progenie o entorno; la marca debe ser heredada sólo y a toda la progenie de la célula fundadora, y debe ser retenida a lo largo del tiempo y nunca debe ser transferida a células vecinas no relacionadas.

1.8.3. Marcación celular por recombinación genética

La recombinación genética se ha utilizado para el trazado de linaje desde 1990, y es hoy en día una de las estrategias de preferencia para la mayor parte de los estudios de este tipo. Con frecuencia consiste en incorporar en las células de un ratón el gen de la enzima CRE recombinasa (Cre) bajo regulación de un promotor que se activa de forma específica en una célula de interés. Este animal es cruzado con otro animal transgénico, que contiene en su genoma un gen reportero, el que sólo será expresado en presencia de la enzima Cre. De esta manera, se logra la marcación genética permanente de toda la progenie de células en las que se expresa, en algún momento del desarrollo, la enzima Cre. Este sistema de recombinación sitio-específica Cre-LoxP, derivado del bacteriófago P1 es empleado en combinación con diferentes genes reporteros⁵⁷ (Figura 11).

Como la enzima Cre se expresa bajo el control de un promotor específico de una célula o tejido este tipo de modelos genéticos de trazado de linaje son condicionales, ya que únicamente cuando se activa el promotor elegido se expresará la enzima. Como se mencionó más arriba, esta cepa es cruzada con una segunda cepa, en la cual un gen reportero se encuentra precedido por el promotor de un gen con expresión ubicua seguido

por una construcción loxP-STOP-loxP (*floxed-Stop sequence*). En animales en los que ambas construcciones transgénicas están presentes, Cre corta la molécula de ADN y la recombina a nivel de los sitios loxP, liberando el codón STOP, lo que resulta en la activación específica del gen reportero en todas las células en las que Cre está expresada.

Usualmente, los genes reporteros se expresan bajo el locus *Rosa26*. Uno de los genes reporteros más comúnmente utilizados es *td-Tomato* (Tom) por la intensidad de su marca fluorescente^{58,59}.

En ratones con construcciones reporteras *Rosa26CAG^{tdTomato}* (*Rosa26^{Tom}*), la expresión de la proteína *Tom* es dirigida por el locus Rosa26, que permite la inserción de un promotor fuerte exógeno, como CAG, lo que resulta en una expresión incrementada del gen reportero⁶⁰. Pueden también incluirse elementos de regulación post-transcripcional. Los ratones *Rosa26^{Tom}* pueden ser criados en homocigosis. Otra ventaja es que *Tom* posee epifluorescencia que puede ser fácilmente visualizada⁶¹, incluso mediante visualización directa sin necesidad de microscopio cuando es expresada por la mayor parte de las células de un tejido determinado.



Figura 11: Recombinación sitio-específica, mediante el sistema Cre-loxP. La enzima CRE recombinasa se expresa constituvamente bajo el control de un promotor específico, de un tipo celular de interés. En esas células, Cre puede recombinar sitios loxP que flanquean a un sitio de STOP de la transcripción génica, aguas arriba de un gen reportero. Al recombinarse, el sitio STOP es removido y el promotor específico facilita la expresión del gen reportero (Adaptado de Kretzschmar y Watt, 2012).

La actividad de Cre puede ser controlada por recombinación inducible. Esto es útil, por ejemplo, para activar Cre selectivamente en ratones adultos por medio de un promotor que también se expresa durante el desarrollo embrionario, o viceversa. Cre puede ser fusionada al receptor estrogénico humano (ER). En ausencia de ligando, que puede ser por ejemplo tamoxifeno (2-[4-[(Z)-1,2-difenilbut-1-enil]fenoxi]-N,N-dimetiletanamina) o su metabolito activo 4-hidroxi-tamoxifeno (4-OHT), la proteína de fusión CreER se mantiene en el citoplasma gracias a proteínas de shock térmico (HSP). Luego de la aplicación de tamoxifeno o 4-OHT, el ligando difunde a través del citoplasma y se une al receptor de estrógeno ER, en la proteína CreER. El receptor cambia su conformación, liberando entonces las chaperonas

HSP. El CreER activado se trasloca al núcleo, donde Cre puede recombinar los sitios loxP^{62,63} (Figura 12).

Para prevenir la activación endógena, se han creado mutantes de CreER, como CreERTAM⁶⁴ y CreERT (inducibles solo a altas cantidades de tamoxifeno, con algunos efectos de toxicidad)⁶⁵ y también CreERT2 (de segunda generación; que se induce a niveles bajos de tamoxifeno y no es inducible por el 17b-estradiol endógeno)⁶⁵.



Figura 12: Ejemplo de recombinación sitio-específica con el sistema CreERT2 y LacZ como reportero, en una célula madre expresando CreERT2 y GFP. (A) La CreER (proteína de fusión) se mantiene inactiva en el citoplasma unida a HSP90. (B) Al aplicarse el tamoxifeno o 4-OHT, éste se une al receptor estrogénico y CreERT2 se libera de la chaperona HSP90 y se trasloca al núcleo. (C) Cre recombina entre sitios loxP, liberando el casette STOP y promoviendo la expresión de LacZ. (D) Toda la progenie de esa célula madre GFP+/LacZ+ expresará lacZ como marcador genético (Adaptado de Kretzschmar y Watt, 2012).

1.8.1. Wnt ^{Cre}

Estas cepas expresan Cre bajo el promotor Wnt1, específico de células de la cresta neural⁶⁶. El gen Wnt1 tiene también otras importantes funciones durante el desarrollo de un organismo; por ejemplo, en la formación del límite cerebro medio-cerebro posterior, en la regulación del tamaño del cerebro medio y en la generación de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio ventral.

1.8.2. Nestina Cre

Esta cepa expresa Cre bajo el promotor y enhancer Nestina, en el sistema nervioso central y periférico, incluyendo precursores neuronales y de célula de la glía⁶⁷. También marca una subpoblación de células endoteliales.

1.8.3. Glast CreERT2

Esta cepa transgénica expresa Cre bajo el control del promotor GLAST (Glutamate Aspartate Transporter) y ligado al receptor estrogénico (ER^{T2}), lo que lo hace inducible por tamoxifeno. GLAST es un marcador de glía, que en el sistema nervioso periférico se expresa específicamente en células de Schwann del linaje mielinizante⁶⁸, y también de una subpoblación de pericitos⁵⁵. Se desconoce su patrón de expresión en la médula ósea y en el hígado. Estos ratones permiten también trazar precursores de astrocitos y células de la glía radial, aunque se desconoce su expresión en el proceso de diferenciación de células de Schwann.

1.8.4. PLP CreERT/2

Estas cepas de ratones poseen un transgen que permite la expresión de Cre al activarse el

promotor de PLP1, proceso que al inyectarse tamoxifeno a E12.5 permite trazar SCPs. Se expresa en el linaje glial de NCCs a partir del estadio de SCPs tempranos y también en NCCs migratorias craneales. En estos ratones se induce recombinación también en el linaje de células de Schwann , en oligodendrocitos mielinizantes maduros y en precursores de oligodendrocitos^{69,70}.

1.8.5. Sox10 CreERT2

Esta cepa contiene un transgen que permite la expresión inducible de Cre recombinasa en células que derivan de la NC luego de la emigración del tubo neural. La expresión de este gen se mantiene en el linaje de células de la glía⁷¹.

1.8.6. Cepas reporteras

Las cepas reporteras frecuentemente utilizadas contienen un transgen que incluye el promotor de Rosa26, con expresión en todas las células del ratón, seguido río abajo por una señal de STOP flanqueada por sitios LoxP, y luego por la secuencia que codifica para la expresión de Tom (proteína roja fluorescente) o YFP (una variante de la proteína verde fluorescente). Por lo tanto, en ausencia de Cre el codón de STOP previene la expresión del gen reportero. Al cruzarse esta cepa con ratones que expresan Cre bajo un promotor específico y producirse la recombinación en la cría, se remueve ese codón en las células en que ese promotor específico está activo: de esta manera, todas las células que de ellas deriven expresarán la proteína fluorescente⁶⁰.

1.9. Oligonucleótido IMT504

El oligodesoxinucleótido (ODN) sintético IMT504 es el prototipo de la familia PyNTTTGT, por su sitio activo; donde Py es Pirimidina (Citosina o Timidina), y N puede ser cualquier nucleótido (Adenina, Timidina, Citosina o Guanina), T es Timidina y G es Guanina. La utilización de IMT504 *in vitro* sobre MSCs de rata aumenta considerablemente el número de células mesenquimales formadoras de colonias (CFU-Fs), se ha reportado también que la estimulación con IMT504 no afecta la capacidad de las MSCs de originar los linajes osteogénicos y adipogénicos⁷². La aplicación *in vivo* del IMT504 se ha visto que induce la movilización de MSCs hacia la sangre periférica, lo que se asocia a un cambio de respuesta inmune hacia una de tipo anti-inflamatoria. Consistentemente, el trasplante de MSCs ha sido beneficioso en modelos animales de dolor neuropático, osteoporosis, diabetes y sepsis. Por lo cual, el uso clínico del IMT504 podría ser altamente beneficioso en la mejora de eficiencia de los mecanismos de regeneración de tejidos⁷³.

Los oligodesoxinucleótidos inmunoestimuladores son moléculas sintéticas que estimulan diferentes tipos de células del sistema inmunitario de los animales. Se agrupan en dos clases principales: a) los ODN CpG, caracterizados por la presencia de al menos un sitio activo que lleva un CpG no metilado en un contexto dado⁷⁴, y b) los ODN PyNTTTTGT, que tienen al menos un sitio activo que lleva esa secuencia⁷⁵.

Hipótesis

2. HIPOTESIS

- En el desarrollo embrionario, NCDCs contribuirían con células de Schwann, células endoteliales y HLCs en el hígado. Alternativamente, en estadíos postnatales una subpoblación de células estromales (pericitos) GLAST+ Wnt1+ presentes en la médula ósea tendría propiedades de células mesenquimales formadoras de colonias y un alto potencial de diferenciación.
- En el hígado fibrótico, aumentaría la incidencia de células de la glía. Estas podrían presentar además signos de activación tales como un aumento en la complejidad y extensión de sus procesos celulares.
- La contribución de la cresta neural y/o de pericitos Wnt1⁺ GLAST⁺ con células presentes en el hígado aumentaría luego de una lesión hepática.
- En modelos de fibrogénesis o luego de una hepatectomía parcial, NCDCs y/o células derivadas de una subpoblación de pericitos GLAST⁺ presentes en la médula ósea, con propiedades de células progenitoras mesenquimales, se movilizarían a través del torrente sanguíneo hacia el hígado y se diferenciarían en HLCs y/o células endoteliales.
- La aplicación del ODN IMT504 estimularía la proliferación y/o movilización de NCDCs y/o células derivadas de pericitos Wnt1⁺ GLAST⁺ presentes en la médula ósea, hacia el sitio de daño, con un aumento en la incidencia de HLCs y células endoteliales de ese origen.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

El objetivo de este trabajo de tesis fue analizar si NCDCs y/o células derivadas de pericitos Wnt1⁺GLAST⁺ presentes en la médula ósea podrían contribuir con el desarrollo de la fibrosis y/o con la regeneración, luego de lesiones hepáticas. Con este fin se utilizaron diversas cepas de ratones doble-transgénicos y se analizó el fenotipo de las células Tom⁺ presentes en el hígado sano o lesionado. Asimismo, se analizó el efecto de la aplicación del ODN IMT504 sobre dicha contribución.

3.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos de esta tesis fueron:

- Analizar la contribución con células presentes en el hígado de NCDCs y/o de células derivadas de pericitos Wnt1⁺ GLAST⁺ de la médula ósea.
- Investigar posibles cambios en la incidencia hepática de células de la glía y de otras células parenquimáticas y no parenquimáticas de posible origen en NCDCs o en pericitos Wnt1⁺ GLAST⁺ con la progresión de la fibrosis hepática.
- Caracterizar la expresión de GLAST durante el desarrollo embrionario y en el adulto.
- En las cepas de ratón en que se observe contribución de células Tom⁺ con células del hígado de tipo no neurales (neurona, glía o miofibroblasto), analizar el fenotipo de las células trazadas en la médula ósea que pudieran movilizarse por sangre periférica y originarlas.

- Estudiar las propiedades de CFU-Fs y la posible movilización de células Tom⁺ presentes en la médula ósea de ratones Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom} que pudieran contribuir con el hígado sano o lesionado.
- Cuantificar la incidencia de hepatocitos y células endoteliales, derivados de NCDCs
 o de pericitos Wnt1⁺ GLAST⁺ de la médula ósea, en un modelo de regeneración hepática.
- Analizar el efecto del ODN IMT504 sobre pericitos GLAST⁺ trazados con Wnt1 presentes en la médula ósea, su reclutamiento hacia el hígado fibrótico y su potencial de diferenciación.

Materiales y Métodos

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Cepas de ratón utilizadas

Se utilizaron ratones *Wnt1^{Cre}* (dos cepas; una adquirida a The Jackson Laboratory y la otra facilitada por el Prof. Patrik Ernfors, Instituto Karolinska, Estocolmo, Suecia), *GLAST^{CreERT2}* (gentileza del Dr. Guillermo Lanuza, Fundación Instituto Leloir), *Nestina^{Cre}* (gentileza del Dr. Lanuza) y *PLP1^{CreERT}* (gentileza de la Dra. Lorena Rela, IFIBIO Houssay), *Rosa26^{Tom}* (background C57, enviado por el Prof. Patrik Ernfors); background CD1 gentileza del Dr. Lanuza) y se establecieron colonias de los mismos en el bioterio del IIMT CONICET-Universidad Austral para la realización de estos estudios. Los análisis de estadíos embrionarios fueron parcialmente realizados en colaboración con los Dres. Igor Adameyko y Patrik Ernfors (Instituto Karolinska, Suecia), con excepción del análisis realizado en ratones Wnt1. En la cría, manejo y experimentos con animales se siguieron las normas establecidas por el NIH (EE. UU) y protocolos aprobados por el CICUAL de la Facultad de Ciencias Biomédicas de la Universidad Austral (CICUAL 17/06 y 19/03).

4.2. Cruzas realizadas para el trazado de linaje

El sistema de recombinación Cre-loxP se usa ampliamente como una herramienta genética para lograr la expresión génica condicional (porque sólo cuando se activa el promotor de un gen específico se expresa un gen reportero) y para trazar linajes celulares. Con este fin, deben cruzarse dos cepas de ratones, de las que una es la línea que otorga especificidad y expresa la enzima Cre bajo un promotor específico, y la otra es la línea reportera (como por ejemplo *Rosa26^{Tom}*) (Figura 13). El sistema de recombinación Cre-loxP es muy adecuado para el análisis de la expresión de determinado gen en un tipo celular y para analizar su linaje. Para este último fin y mediante el sistema Cre-LoxP, en nuestro laboratorio se realizaron los siguientes apareos: *Wnt1^{Cre} x Rosa26^{Tom}*; *Nestina^{Cre} x Rosa26^{Tom}*; *PLP1^{CreERT} x Rosa26^{Tom}*, y *GLAST^{CreERT2} x Rosa26^{Tom}*.



Figura 13: Esquema de la estrategia utilizada para el trazado de linaje.

En la Figura 14 se puede observar un esquema de las cepas utilizadas en nuestro laboratorio para el trazado de linaje. Asimismo, en la Tabla 1 (sección Discusión), se aportan datos más precisos de los ratones doble-transgénicos empleados en estos estudios.



Figura 14: Esquema de las cepas utilizadas para trazado de linaje. (A) Especificidad de promotores (Ilustración adaptada de Knecht y Bronner-Fraser 2002). (B) GLAST se expresa en una subpoblación de pericitos (Goritz et al. 2011). (C) Cepas utilizadas y expresión específica correspondiente.

4.2.1. Inducción con tamoxifeno

Como se mencionó anteriormente, la actividad de Cre puede ser controlada por recombinación inducible. Las cepas inducibles utilizadas para el presente trabajo fueron *Glast^{CreERT2}, PLP1^{CreERT}, PLP1^{CreERT2} y Sox10^{CreERT2}*. Para la inducción con tamoxifeno (T-5648; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), se prepararon soluciones stock de esta sustancia (20 mg/ml en aceite de maíz; C-8627; Sigma-aldrich). En estadíos postnatales, la inducción fue realizada a estadío postnatal 2 (P2) o a P60. Para la inoculación de animales a P2, se inyectaron 50 µl de solución madre de Tamoxifeno por animal, por vía subcutánea. A P60 o en hembras preñadas, se aplicaron 100 µl de solución madre de tamoxifeno por animal, por

vía intraperitoneal (ip). Únicamente fueron incluidos en los diversos estudios animales con una eficiencia de recombinación cercana al 100%, para evitar la dispersión de los datos y poder obtener reproducibilidad en las cuantificaciones.

4.2.2. Genotipificación

Los ratones fueron identificados, mediante marca en la oreja, al momento del destete y se tomaron muestras de la cola para su genotipificación. El material fue degradado siguiendo el protocolo de proteinasa y para visualizar la presencia (o ausencia) del transgen se llevaron a cabo las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando *primers* específicos. Los *primers* utilizados fueron: *Rosa26*, forward: 5'-AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT-3' y reverse: 5'-GGAGCGGGAGAAATGGATATG-3'; *Tom*, forward: 5'-GGACGGCACGCTGATCTA-3' y reverse: 5'- CTGTTCCACGATGCTGTAGT-3'; *Wnt1^{Cre2}*, forward: 5'- ATTCTCCCACGTCAGTACG-3' y reverse: 5'-CGTTTCTGGAGCATACCTGCA-3', y *Cre* (genérico, utilizado para *Glast^{CreERT2}*), forward: 5'-GCGGTCTGGC AGTAAAAACTATC-3' y reverse: 5'-TAATCGCCATCTTCCAGCAG-3'. Para llevar a cabo la amplificación del ADN se realizó la MasterMix correspondiente en volumen calculado según la cantidad de animales a genotipificar. La composición de la MasterMix fue la siguiente: primers reverse 10µM y forward 10µM, dNTPs 2,5mM, Taq polimerasa (GoTaq polymerase Promega), buffer GoTaq 5X (Promega) y agua Milli-Q. Se agregó 1µl de la muestra a la MasterMix y se llevó a un volumen final de 13µl.

La amplificación fue realizada en una termocicladora SimpliAmpTM Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) en las siguientes condiciones: 95°C durante 3 minutos; 35 ciclos de: 95°C durante 30 segundos, temperatura específica de *annealing* para los *primers* utilizados, 30 segundos y 72°C durante 1 minuto; 72°C por 5 minutos y se mantuvo a una temperatura

final de 4°C. Luego se sembró cada muestra junto a un control negativo (sin muestra) y un control positivo (muestra positiva para el gen buscado) en un gel de agaRosa al 1%. El gel fue preparado con buffer TAE y 1% de agaRosa, y se le agregaron 5µl de Bromuro de Etidio (Bromuro de 2,7- diamino-10-etil-6-fenilfenantridinio). Se efectuó la electroforesis en una cuba por 1 hora a 110V y se procedió a su posterior revelado en transiluminador ultravioleta.

4.3. Desarrollo de modelos de fibrosis

Para el establecimiento de la cirrosis hepática se utilizaron dos modelos: la aplicación crónica de tioacetamida y la ligadura del conducto colédoco (Figura 15).



Ligadura conducto colédoco 2 semanas

Figura 15: Esquema de los modelos utilizados de fibrosis hepática.

La **tioacetamida** (**TAA**; etanotioamida) se aplica como modelo químico de inducción de fibrosis hepática. Ésta requiere de la activación metabólica para tener un efecto hepatotóxico⁷⁶. El proceso involucrado consiste en un daño oxidativo severo asociado con muerte de hepatocitos, inflamación y activación de células estrelladas hepáticas. El

protocolo aplicado incluyó la inyección ip de 200 mg/kg de TAA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por dosis y por animal, tres veces por semana, durante 1 (1W), 2 (2W), 4 (4W) u 8 (8W) semanas.

La ligadura del conducto colédoco (BDL) corresponde a otra etiología de la fibrosis hepática: causa un daño colestásico y posterior fibrosis biliar periportal⁷⁶. Este modelo de fibrosis/cirrosis hepática se estableció primeramente en ratas y luego en ratones^{77,78}. La BDL consiste en la realización de dos ligaduras en el conducto colédoco⁷⁹. Este tipo de lesiones resulta en la proliferación de células epiteliales biliares y aumento de marcadores fibrogénicos⁸⁰, e involucra la generación de radicales libres. Sin embargo, en el modelo de BDL la fibrosis se desarrolla más rápidamente y afecta fundamentalmente a zonas de los espacios portales. Luego de 10 días de la cirugía existe una mortalidad del 20% en ratones, por lo que la posibilidad de sobrevida es limitada⁸¹⁻⁸³ Para efectuar el procedimiento quirúrgico, se coloca al animal en una cámara de anestesia, regulando el ingreso de isofluorano (1-cloro-2,2,2-trifluoroetil difluorometil éter) al 5% y el flujo de oxígeno a 0.5-1.0 l/min. Una vez dormido, el animal es retirado de la cámara y se le deja respirando a través de un tubo conectado con la provisión de anestesia. Luego, se realiza la apertura de la cavidad peritoneal, la que es mantenida abierta con un blefaróstato pediátrico. Se levanta el hígado del animal dejándose ver su cara inferior, lo que permite la clara identificación del conducto colédoco, y se realizan en éste dos ligaduras utilizando hilo de sutura Vicryl Plus (Ethicon Endo-Surgery, Inc.) de tipo reabsorbible. Se debe tener sumo cuidado de evitar la perforación o corte de la arteria hepática, que se encuentra muy cercana al conducto biliar. Luego, se cierra la cavidad abdominal del animal y se lo coloca en almohadilla de calor para su recuperación.

4.4. Perfusión de animales y preparación de muestras

Estos procedimientos fueron empleados para preservar el tejido de forma rápida y uniforme, con fines de análisis histológicos mediante microscopía. La ventaja de perfundir directamente el fijador a través de la aorta ascendente es que el químico llega rápida y eficientemente hasta el nivel tisular-celular, a través de la red de capilares sanguíneos.

Para ello, se anestesió previamente el animal con hidrato de cloral (2,2,2-tricloroetano-1,1diol) 400 mg/kg, por vía i.p. (dosis subletal). Se produjo una incisión en la cavidad torácica, se generó un corte en el diafragma y las costillas para exponer el corazón. Se ingresó una aguja (conectado con una tubuladura) en el corazón (ventrículo izquierdo), se realizó una incisión en la aurícula derecha y se activó una mini-bomba para el pasaje de PBS 1x (10 ml, durante 5 minutos), a través de la tubuladura, seguido de la solución fijadora (paraformaldehido -PFA- 4%; 60 ml, durante 30 minutos). Luego, se extrajo el hígado y se colocó en PFA 4% durante 90 minutos, seguido por dos cambios de sacarosa 20% en 0.2 M buffer fosfato. Por último, se disecaron los cuatro lóbulos, los que fueron incluidos en OCT (Optimal Cutting Temperature compound) y se guardaron a -20°C hasta su sección mediante criostato. También se obtuvieron muestras de huesos de las extremidades posteriores: luego de la postfijación en PFA 4%, ese material fue desmineralizado, mediante empleo de una solución de EDTA 10% en PBS1x durante 10 días, y posteriores pasajes en sacarosa 20% e inclusión en OCT.

Se realizaron cortes de 12 micrones de espesor en criostato HM525 NX Cryostat (Thermo Fisher Scientific) a -25°C, que fueron montados en portaobjetos previamente gelatinizados. Los preparados fueron guardados a -20°C hasta su uso.

4.5. Tejido embrionario

Para la caracterización de la expresión de GLAST durante estadios embrionarios, se generaron apareos de ratones CD1 durante una noche: de esa manera fue posible controlar el estadio de gestación. Una vez alcanzado el desarrollo embrionario requerido, se sacrificó la hembra preñada mediante dislocación cervical. Luego se generó una incisión peritoneal exponiendo el útero, que fue subsecuentemente disecado. Con tijeras se liberaron los embriones de la placenta, en placas de Petri con PBS 1x. Luego, los embriones fueron colocados en PFA 4% durante una noche a 4ºC. Después de dos cambios de sacarosa 20% (realizado el primero durante la mañana y el segundo a última hora de la tarde), los embriones fueron incluidos en OCT y congelados a -20ºC.

Se realizaron cortes de 12 micrones de espesor en criostato HM525 NX Cryostat (Thermo Fisher Scientific) a -25°C, que fueron montados en portaobjetos previamente gelatinizados. Los preparados fueron guardados a -20°C hasta su uso.

4.6. Tratamiento con el oligonucleótido IMT504

Con el fin de analizar el efecto de IMT504 sobre la proliferación y movilización de pericitos trazados con Wnt1, esta sustancia fue aplicada por vía subcutánea (30 µl/g por animal a P60), 2 horas después de la aplicación de la última dosis de TAA. Luego de 18 horas, para análisis de citometría de flujo y/o ensayos CFU-F, algunos animales fueron anestesiados con dosis sub-letal de hidrato de cloral y se obtuvo sangre del seno venoso orbital y, luego de una dislocación cervival, se disecaron los huesos de las extremidades posteriores y se extruyó la médula ósea. El IMT504 (solución stock) fue aportado por el Dr. Alejandro D. Montaner, de la fundación Pablo Cassará.

4.7. Inmunofluorescencia

Cortes de tejido hepático, proveniente de animales previamente perfundidos, fueron secados a temperatura ambiente en oscuridad durante 30 minutos. Posteriormente, fueron incubados en 5% suero normal de burro en BSA (Albúmina de Suero Bovino) 0.25%, NaN3 (Azida de Sodio) 0,1% y Tritón-X100[®] (4-(1,1,3,3-Tetrametilbutil)fenil-polietilen glicol) 0,15% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en PBS 1X, durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda a oscuridad, para el bloqueo de pegado inespecífico del anticuerpo secundario. Posteriormente, se escurrió la solución de bloqueo y se incubó con anticuerpo primario en el mismo diluyente, durante 12 horas a 4ºC. Se emplearon los siguientes anticuerpos primarios: monoclonal anti-Albúmina hecho en ratón (1/100 en diluyente primario; Santa Cruz Biotechnology sc-374670), monoclonal anti-alfa Fetoproteína hecho en ratón (AFP; 1/200; R&D, mab1368), monoclonal anti-alfa Actina de Músculo Liso hecho en ratón (αSMA; 1/300; Sigma, clone 1A4), policional anti-alfa Actina de Músculo Liso hecho en conejo (1/200; abcam ab5694), monoclonal anti-beta III Tubulina hecho en ratón (Tuj1; 1/1000; Promega G7121), , monoclonal anti-CD31 hecho en rata (1/200; BD Pharmingen 553370), monoclonal anti-Citoqueratina18 hecho en ratón (1/500; abcam ab668), policional anti-Desmina hecho en conejo (1:250; abcam ab8592), policional anti-Fibronectina hecho en conejo (1/250; Sigma F3648), policional anti-GLAST hecho en conejo (1/150; abcam ab416), policional anti-Proteína Acídica Fibrilar Glial (GFAP; 1/1000; DAKO Z0334), policional anti-Green Fluorescent Protein hecho en cabra (YFP; 1/500; abcam ab6662), monoclonal anti-HNF4 α hecho en ratón (1/100; Santa Cruz Biotechnology, sc-374229), monoclonal anti-Nestina hecho en ratón (1/400; abcam 6142), policional anti-Protein General Peptide 9.5 hecho en conejo (PGP9.5; 1/500; Cederlane CL95101),

policional anti-S100β hecho en conejo (1/750; DAKO Z0311), policional anti-SOX2 hecho en conejo (1/500; abcam ab97959), policional anti-Tirosina Hidroxilasa hecho en conejo (TH; 1/1000; Millipore) y monocional anti-Vimentin hecho en ratón (1/150; BD 550513).

Posteriormente, se realizaron varios lavados en PBS1x (4 lavados, durante 45 minutos) y para la detección de los anticuerpos primarios el tejido fue incubado durante 2 horas a temperatura ambiente en anticuerpos secundarios de burro conjugados con Alexa-488 (1:200 en diluyente secundario, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific), y/o FITC y/o rodamina (1:100, Jackson ImmunoResearch). Diluyente secundario fue: BSA 0,25%, NaN₃ 0,1% y Tritón-X100[®] 0,015% en PBS 1X. Luego se lavó extensamente en PBS1x (5 veces, por 1 hora). En reemplazo del segundo lavado, se incubó por 15 minutos en una solución de Hoechst 33258 1/1000 en PBS1x con el objeto de marcar los núcleos celulares. Se montó el tejido con cubre-objetos, utilizando glicerina 85% en PBS1x como medio de montaje. Los portaobjetos fueron colocados a 4 °C hasta observación mediante microscopía de fluorescencia.

Para la identificación de las células endoteliales, las secciones fueron incubadas durante 12 horas con la lectina *Lycopersicon esculentum* (tomato) acoplada a fluoresceína (Vector Laboratories, FL-1171; 1/400), en BSA 0.1%, NaN₃ 0,1% y Tritón 0,15% in PBS 1X, a 4°C. Luego de varios lavados en PBS1x, las secciones fueron incubadas con Hoechst 33258 o DAPI durante 15 minutos y lavadas nuevamente y montadas en glicerol 80% en PBS1x. La colocalización de lectina en los diversos tipos celulares trazados con Tom fue analizada mediante el análisis de mapeo de pixeles colocalizados de imágenes RGB (M1, blanco: Tom; M2, rojo: lectina) utilizando los coeficientes de Manders, calculados con los *plugins* de

ImageJ (NIH; células endoteliales: 4,353±0,591 promedio/área, 0,873±0,061 M1, 0,743±0,039 M2; vs. glia: 0,672±0,258 promedio/área, 0,943±0,008 M1, 0,638±0,063 M2).

Para la inmunomarcación de la suspensión celular, 125000 células/muestra correspondientes a una fracción enriquecida en hepatocitos (células obtenidas decantadas por 30 minutos a partir de la suspensión de células hepáticas; ver debajo) fueron incubadas con solución de bloqueo (5% suero normal de cabra o suero fetal bovino, 5% BSA y 0,03% Triton-X100 en 1xPBS) por 1 hora, seguido por centrifugación (5 minutos, 1000 rpm) e incubación con anticuerpo primario (100 µl; 12 horas, 4ºC). Luego de varios lavados, las células fueron resuspendidas en una solución de anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a AlexaFluor 488° (1/200) e incubado por 2 horas a temperatura ambiente. Luego de lavados extensivos, las células fueron colocadas en vidrios y secadas a 37ºC durante 5 minutos, montados en solución de DABCO y observados bajo microscopio de fluorescencia. Las imágenes fueron obtenidas utilizando microscopios confocales Zeiss LSM700, Zeiss LSM780 y Olympus IX-83-DSU. La incidencia de las células Tom⁺ correspondientes a los distintos fenotipos fue cuantificada a 400x (salvo que se indique algo diferente) bajo microscopio fluorescente. Ello se realizó por observación directa en el microscopio, considerando todos los campos en al menos 4 secciones por cada lóbulo hepático por animal incluido. Únicamente se tuvieron en cuenta células cuya inmunomarcación y/o morfologías general, y la forma de su núcleo fueran compatibles con ese tipo celular. En el caso de células de la glia, se excluyeron aquellas células situadas alrededor de venas porta cuyo tamaño superaba el del campo de microscopio o presentes en la cápsula de Glisson.

4.8. Citometría de flujo

4.8.1. Células no parenquimáticas

Algunos ratones Wnt1^{Cre}; Rosa26^{Tom} o GLAST^{CreERT2}; Rosa26^{Tom} tratados con TAA durante 2 semanas o sometidos a hepatectomía del 70% o control, fueron perfundidos con colagenasa a través de la vena porta hepática. Con este fin, los animales fueron anestesiados con hidrato de cloral (400 mg/kg; ip). Luego, se procedió a una incisión peritoneal y canulación de la vena porta hepática. A través de la cánula, se perfundió con buffer de lavado (1:25 PBC (NaCl, KCl, HEPES, NaOH) y agua destilada, EDTA 0,4 mM) hasta un volumen de 40 ml por animal y se cambió la perfusión a solución de Colagenasa tipo-4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 30 ml (0.5 mg/ml) por animal. Luego, se extrajo el hígado perfundido y se lo colocó en solución fisiológica. Se disgregó el tejido de manera mecánica y se pasó por un colador de nylon estéril (cell strainer; espesor de poro: 40 µm), dejándose luego decantar durante 30 minutos y realizándose 2 ciclos de centrifugación (5 minutos, 1000 rpm). Mediante este paso de decantación es posible obtener dos fracciones de células hepáticas: parenquimáticas (hepatocitos) y no parenquimáticas. La fracción enriquecida en células no parenquimáticas fue resuspendida en solución fisiológica y se hizo un recuento de células, generando alícuotas de 1x10⁶ células totales. Posteriormente se realizó un bloqueo de pegado inespecífico del anticuerpo, con buffer FACS (BSA 1% en PBS 1X). Las células fueron fijadas en PFA 4%. Las células fueron lavadas nuevamente con 1 ml de buffer FACS (BSA 1% en PBS 1X), mediante centrifugación por 5 minutos a 1000 rpm y resuspensión del pellet. Posteriormente fueron incubadas con 100 μ l de una solución de anticuerpo primario, por ejemplo policional anti-vimentina (1/100; Sigma, V4630) en buffer FACS y 0.1% saponina,

durante 45 minutos en oscuridad. Luego, se lavó dos veces con buffer FACS. Se descartó el sobrenadante, y se incubó la suspensión celular con 100 µl del anticuerpo secundario AlexaFluor 488[®] burro anti-conejo (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 1/100 en buffer FACS y 0.1% saponina, por 45 minutos en oscuridad. Nuevamente se lavó dos veces con buffer FACS y las células fueron fijadas nuevamente con PFA 4%. Luego de nuevos lavados, las células fueron mantenidas en 100µl PBS 1X hasta su análisis por citometría de flujo empleando un citómetro BD FACSaria II (BD Biosciences) en las instalaciones del Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo INIGEM (UBA-CONICET). Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el software FlowJo (LLC, Ashland, Oregon, USA).

4.8.2. Células parenquimáticas

La fracción parenquimática obtenida como se describe en el ítem anterior fue incubada, por ejemplo, durante 45 minutos con anticuerpo primario monoclonal ratón anti-HNF4 α (abcam, K9218, 1/100, o Santa Cruz Biotechnology, sc-374229; que marca hepatocitos) en buffer FACS y 0.1% saponina, en oscuridad. Luego, se lavó dos veces con buffer FACS, centrifugando a cada paso de lavado durante 5 minutos a 1000 rpm. Se descartó el sobrenadante, y se incubó con 100 µl del anticuerpo secundario AlexaFluor 488^{*} burro antiratón (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 1/100 en buffer FACS y 0.1% saponina, durante 45 minutos en oscuridad. Nuevamente se lavó dos veces con buffer FACS y las células fueron fijadas nuevamente en PFA 4%. Luego de nuevos lavados, las células fueron mantenidas en 100µl PBS 1X hasta su análisis por citometría de flujo.
4.8.3. Células mononucleares de medula ósea

Para estos estudios se utilizaron ratones adultos *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* a los que se les generó fibrosis (y/o se les aplicó IMT504) o fueron sometidos a hepatectomía o dejados sin tratar (controles naïve). Estos animales fueron sacrificados por dislocación cervical y sus patas posteriores fueron disecadas. Se procedió a la extrusión con solución fisiológica de la medula ósea a partir de la tibia y el fémur.

Mediante un gradiente de Ficoll (Ficoll-Paque PlusTM, 1.077 g/ml, GE Healthcare-Amersham Biosciences), obtenido centrifugando la muestra durante 30 minutos a 450 x g, se obtuvo la interfase conteniendo la fracción mononuclear. Mediante uso del colorante Trypan Blue (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y empleo de cámara de Neubauer, se realizó el recuento de las células viables, obteniéndose usualmente un total de aproximadamente 1x10⁶ células por muestra. Para la inmunomarcación, las células fueron fijadas en PFA 4% durante 20 minutos a 4ºC. Luego, se realizaron lavados con 1 ml de buffer FACS (BSA 1% en PBS 1X), mediante centrifugación por 5 minutos a 1000 rpm y resuspensión del pellet. Posteriormente, las células fueron incubadas, por ejemplo, en 100 µl del anticuerpo primario monoclonal de rata anti-CD44 acoplado al fluoróforo APC (BD Pharmingen; 1/100 en buffer FACS; que marca células estromales) por 45 minutos, seguida por una nueva fijación con 4%, lavados y una segunda incubación utilizando un anticuerpo policional conejo anti-GLAST (abcam; 1/100) en buffer FACS y 0.1% saponina, durante 45 minutos en oscuridad. Se empleó saponina cuando las marcaciones eran para el análisis de proteínas cuyos antígenos no se localizaban en la cara extracelular. Luego, se lavó dos veces con buffer FACS, centrifugando a cada paso de lavado por 5 minutos a 1000 rpm. Se descartó el

sobrenadante, y se incubó con 100 µl del anticuerpo secundario AlexaFluor 488[®] burro anticonejo (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA; 1/100)1/100 en buffer FACS y 0.1% saponina, durante 45 minutos en oscuridad. Luego de nuevos lavados, las células fueron fijadas en PFA 4%. Tras nuevos lavados, las células fueron mantenidas en 100µl PBS 1X hasta su análisis por citometría de flujo. Mediante citometría de flujo se cuantificó, por ejemplo, la fracción de células GLAST⁺ CD44⁺ Tom⁺, en las condiciones descriptas anteriormente.

4.8.4. Células mononucleares de sangre periférica

Para estos estudios se utilizaron ratones adultos *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* a los que se les generó fibrosis (y/o se les aplicó IMT504) o fueron sometidos a hepatectomía o quedaron sin tratar (controles naïve). Estos animales fueron anestesiados profundamente con hidrato de cloral y se les extrajeron los globos oculares para la obtención de sangre periférica, la cual fue colocada en un tubo Eppendorf 1.5 ml con heparina. La muestra obtenida fue diluida 1:2 en solución fisiológica. Mediante un gradiente de Ficoll, se separó la fracción mononuclear. Se realizó el recuento de células viables, obteniéndose usualmente un total de aproximadamente 1x10⁶ células viables por muestra. Se realizaron las inmunomarcaciones para CD44 y GLAST y se realizaron las determinaciones en citómetro de flujo como se describe anteriormente. Posteriormente a la extracción de sangre, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se obtuvieron muestras de hígado y médula ósea.

4.9. Ensayos de células mesenquimales formadoras de colonias (CFU-Fs)

Para la obtención de las células mononucleares de médula ósea (BMMCs), ratones adultos Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom} fueron eutanasiados mediante dislocación cervical. Se disecaron las extremidades posteriores y se las colocó en solución fisiológica con 1 ml de suero fetal bovino (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Luego, fueron colocadas durante 20 minutos en etanol 70%. En condiciones estériles y bajo campana de flujo laminar, se limpiaron bien los huesos y se cortaron las epífisis proximales y distales de fémures y tibias. Luego, utilizando una jeringa de 10 ml, con aguja 26G, cargada de medio DMEM de baja concentración de glucosa (1 g/l) con 10% de suero fetal bovino, se introdujo la punta de la aguja en el hoyuelo dejado por la extracción de las epífisis óseas y se pasó el líquido, dejando salir la médula ósea por el hoyuelo contrario. Se realizó un lavado de las células con el mismo medio y posteriormente se procedió al recuento en cámara de Neubauer, con colorante Trypan Blue (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA). Las células fueron sembradas (2x10⁶) en botellas T25 (Nunc, Rochester, NY), utilizando medio D-MEM baja glucosa suplementado con 100 IU/ml gentamicina (Larjan, Buenos Aires, Argentina), 2.5 ug/ml anfotericina B (PAA Laboratories, Linz, Austria), 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich) y 20 % suero fetal bovino (Gibco). Las botellas fueron incubadas a 37ºC en una atmósfera de 5% dióxido de carbono. Luego de 7 días de cultivo, se realizó cambio de medio por uno fresco. Al día 14, las células fueron lavadas dos veces con PBS1x y luego fueron fijadas con metanol 100% durante 15 minutos y teñidas con una solución de Azur Eosin Methylene Blue (Giemsa; Merck & Co., White-house Station, NY). Las colonias fueron cuantificadas utilizando un microscopio invertido óptico (Nikon Eclypse NiE, Melville, NY, USA) Se definió

una colonia como un grupo de mínimo 50 células con una disposición circular. Los resultados fueron mostrados como número total de CFU-F por 2x10⁶ BMMCs sembradas.

En algunos en botellas T25 (Nunc, Rochester, NY), se sembraron BMMCs a una densidad de 5x10⁵ células/cm² en DMEM baja glucosa completo suplementado con suero fetal bovino 10%. Se realizaron cambios de medio cada 72 h hasta obtener una confluencia del 90%. Se realizó el pasaje celular por tripsinización (tripsina 0,25% + EDTA 1mM): las células fueron re-sembradas a una densidad de 5x10³ células/cm² en el mismo medio de cultivo. De esta manera, se llegaron a realizar hasta 4 pasajes celulares. Antes del primer pasaje, se seleccionaron específicamente las colonias cuyas células expresaban el gen reportero (Tom): empleando microscopio de fluorescencia (Nikon Eclypse NiE, Melville, NY, USA), se marcaron los límites de las colonias Tom⁺ en el plástico, en la cara inferior de la placa. Eso permitió expandir por separado las colonias Tom⁺ y Tom⁻.

4.10. Hepatectomía

El objetivo principal de la hepatectomía experimental es generar una resección parcial del hígado y analizar luego los mecanismos regenerativos de este órgano. Para ello se requiere que el animal se encuentre bajo anestesia durante toda la operación. Una vez anestesiado utilizando isofluorano al 5% con flujo de oxígeno a 0.5-1.0 l/min, se generó una incisión en la cavidad peritoneal manteniendo abierta la misma con un blefaróstato pediátrico. Con la ayuda de hisopos y pinzas, se separó el lóbulo izquierdo, dejando ver su cara inferior, para colocar el hilo de sutura Vicryl Plus (Ethicon Endo-Surgery, Inc.) según se indica en la Figura 16. Luego se colocó el lóbulo nuevamente en su lugar y utilizando ambos extremos del hilo se generaron dos nudos tratando de que los mismos pasen por el extremo (origen) del

lóbulo izquierdo. Una vez colocado el nudo en su lugar, con una tijera, se procedió a cortar la mayor parte posible del tejido de lóbulo izquierdo, sin desprender el nudo. Este mismo procedimiento se repitió con el lóbulo derecho, dejando únicamente los lóbulos cuadrado y caudado. De esta manera fue posible obtener una resección de aproximadamente el 70% del hígado. Terminado este procedimiento se cerró mediante suturas la incisión abdominal previamente realizada en el animal y se dejaron reposar a los animales sobre una almohadilla caliente hasta su recuperación del efecto de la anestesia.



Figura 16: Dibujo esquemático de la anatomía del hígado del ratón y la colocación de hilos de seda para realizar los nudos. (a) El hilo para el primer nudo debe colocarse entre el caudado y los lóbulos laterales izquierdos en la base de este último. (b) El segundo nudo se debe atar dentro del área discontinua, por encima de la vesícula biliar, pero no muy cerca de la vena cava suprahepática. La punta del lóbulo derecho se puede utilizar como punto de referencia para colocar el nudo. Imagen tomada de Mitchell & Willenbring, 2008⁸⁴.

4.11. Tinciones histológicas

Se empleó la técnica de tinción con Rojo Sirio, que permite la marcación del colágeno fibrilar. Secciones de hígado procedentes de ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* fueron lavadas en PBS1x y deshidratadas en alcoholes de concentración creciente (70%, 96% y 100%) y luego inmersas en xilol durante 1 minuto. Luego fueron rehidratadas en alcoholes decrecientes y

posteriormente inmersas en PBS1x durante 5 minutos. Terminada la rehidratación los vidrios fueron incubados durante 1 hora con Picro Sirius Red (rojo sirio 0,1 % m/v; Sigma Aldrich 365548; en ácido pícrico saturado). Se lavaron dos veces en ácido acético glacial al 0,005% en agua destilada y el exceso de líquido fue removido. Luego se procedió a la deshidratación, mediante incubación con etanol 100 %, y aclaramiento con Xilol, durante 1 minuto en cada paso. Se realizó el montaje de cubreobjetos empleando bálsamo de Canadá.

4.12. Diferenciación in vivo de células Wnt⁺de la médula ósea en HLCs y células endoteliales

Para analizar la capacidad de diferenciación de células de médula ósea Wnt1⁺, se obtuvieron células mononucleares de la médula ósea de animales adultos *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* habiendo sido o no inducidos previamente durante 4 horas con el oligonucleótido IMT504. Estas células fueron inyectadas por vía sistémica (vena de la cola; 5x10⁵ células/animal) en animales LAEN:NIH(S)-FOXN1 (nude; athymic), algunos de los cuales habían sido hepatectomizados 6 días antes. A los días 1 o 5 post-transplante se obtuvieron las fracciones de células parenquimatosas y no parenquimatosas a partir de los hígados de los animales hepatectomizados o control (naïve). Se analizó la contribución de células trazadas con HLCs, células endoteliales y gliales mediante citometría de flujo. Las muestras correspondientes a la fracción parenquimatosa fueron inmunomarcadas para el análisis de la coexpresión con Tom de diversas combinaciones de marcadores: CD44 y Vimentina, CD44 y Albúmina y CD31 y CD44 y S100.

4.13. Proliferación de células de médula ósea Wnt inducidas con IMT504

Para analizar un posible efecto de IMT504 sobre la proliferación de las células de médula ósea trazadas con Wnt1, se emplearon MSCs a P4, obtenidas a partir de pericitos Tom⁺ obtenidos de ratones Wnt1. Estas células fueron sembradas en placas de 24 pocillos. Las células fueron incubadas con IMT504 (0.5µg/ml) durante dos horas. Posteriormente, se lavaron los cultivos y se procedió a levantar las células de diversos pocillos (uno por día, durante 5 días) para el recuento de células viables y el cálculo del tiempo de duplicación in vitro (doubling-time assay): consiste en determinar el tiempo que necesita una población celular para doblar su tamaño o valor.

Cálculo del tiempo de duplicación:

T: tiempo (1: inicial; 2: final)

N: número de células (1: inicial; 2: final).

Otras muestras fueron fijadas con PFA 4% para citometría de flujo utilizando el marcador de proliferación Ki67.

4.14. Ensayo de Herida de células de médula ósea Wnt inducidas con IMT504

Para determinar el efecto del IMT504 sobre la capacidad de migración en lámina de las MSCs trazadas con Wnt1, se realizó un ensayo de herida. Estas células fueron sembradas en placas de 6 pocillos. Las células fueron incubadas con IMT504 (0.5µg/ml) durante dos horas y luego se realizó una raspadura en la placa. Se tomaron fotografías de los pocillos de

cada condición (inducidas o no con IMT504) luego de la herida, como tiempo 0 y posteriormente a las 8, 12 y 16 horas. Se cuantificó el % de la herida abierta para cada tiempo y cada una de las condiciones.

4.15. Ensayo de inducción de Wnt1 en cultivos primarios de pericitos

trazados de ratones Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom} mediante empleo de IMT504

Para determinar si el ODN IMT504 induce la activación *de novo* de Wnt1 en MSCs derivadas de pericitos trazadas con Wnt1 provenientes de la médula ósea, se utilizaron células mononucleares de médula ósea obtenidas de animales *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}*. Estas células fueron plaqueadas en placas de 6 posillos hasta la formación de colonias. Al ser obtenidas las colonias (día 0), se tomaron fotografías de las placas y se realizó el recuento de las colonias totales y de aquellas que eran positivas o negativas para Tom. Se agregó IMT504 (0.5µg/ml) al medio de cultivo durante dos horas. En los siguientes dos días, una vez por día, se realizó la cuantificación de las colonias totales, y de aquellas Tom⁺ o Tom⁻. Se calcularon los porcentajes de colonias que contenían algunas células Tom⁺ luego de la inducción con IMT504.

4.16. Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron repetidos al menos 3 veces con un tamaño de muestra mínimo de 5. Los valores fueron expresados como media ± SEM. Se aplicaron diferentes métodos estadísticos según el número de grupos a comparar por experimento y el tipo de distribución de los datos (normal o no). Un valor de p <0,05 fue considerado como significativo. Se utilizó el software Prism (GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.).

Resultados

5. RESULTADOS

5.1. Desarrollo del modelo de la fibrosis hepática

Con el objetivo de analizar la contribución de NCDCs y/o pericitos GLAST⁺ con el hígado sano y fibrótico, primeramente, se pusieron a punto dos modelos de fibrogénesis: 1) de aplicación crónica de tioacetamida (TAA; 3 aplicaciones intraperitoneales/semana, 1 a 8 semanas), y 2) de ligadura del conducto colédoco (con una sobrevida de 2 semanas). En ambos modelos, se observó que los animales de las distintas cepas analizadas desarrollaron una fibrosis establecida. Para confirmarlo, se realizaron tinciones de rojo sirio. En el modelo de TAA, luego de 8 semanas de tratamiento, la fibrosis no sólo fue importante en la zona perilobulillar, ya que también se formaron puentes fibróticos entre espacios portales y venas centrolobulillares (Figura 17A) y con frecuencia fue observada marcación de rojo sirio en la zona parenquimática, entre hepatocitos. En el modelo de BDL, 2 semanas post-cirugía, se observó desarrollo de fibrosis en los espacios porta y presencia de puentes fibróticos porta-portales (Figura 17). En los animales sin daño, se encontró escasa tinción limitada a los contornos de algunas venas porta hepáticas.

Se emplearon las mismas secciones para cuantificar la deposición de colágeno fibrilar empleando el programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java; NIH), mediante análisis del área de tinción con rojo sirio (Figura 17). En los dos modelos de lesión aplicados encontrándose un aumento significativo en el grado de fibrosis hepática.



Figura 17: Modelos de fibrosis hepática. Arriba: Microfotografías representativas en campo claro de secciones de hígado teñidas con el colorante rojo sirio, de ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* control o luego del tratamiento con tioacetamida por ocho semanas (TAA 8W) o ligadura del conducto colédoco (BDL). Note la presencia de marcación con rojo sirio en el parénquima de animales TAA 8w, lo que es señal de un grado avanzado de fibrosis. Abajo: Comparación estadística del área marcada con rojo sirio. *p<0.05; ***p<0.001; vs. Ctrl; prueba de comparaciones múltiples de Tukey; n=5.

5.2. Contribución de células Wnt1⁺ a la fracción de células no

parenquimaticas durante la fibrosis hepática

Al analizar posibles cambios en los fenotipos de las células Tom⁺ presentes en el hígado fibrótico de esos animales y en su incidencia relativa buscamos primero caracterizar la fracción no parenquimatosa del hígado. En animales control naïve se encontró contribución de NCDCs con la glía periférica. Las células trazadas coexpresaron marcadores típicos de células de Schwann no mielinizantes, tales como S100, GFAP y Vimentina (Figuras 18 A,B y 19 B,D,E). Éstas se encuentraron principalmente localizadas en los alrededores de las venas porta hepáticas (Figuras 18 A y 19 E). En secciones de ratones *PLP1^{CreERT};Rosa26^{Tom}* pudimos observar que en estadíos perinatales el hígado es colonizado por SCPs, durante el proceso de inervación del órgano. Las células de Schwann residentes del hígado usualmente presentan dos largos procesos que siguen la orientación de las paredes de las venas porta hepáticas (Figura 18 C).

En el contexto de fibrosis hepática, la incidencia de células gliales aumentó significativamente, en más de dos veces, luego del tratamiento de TAA durante 8 semanas o luego de la ligadura del colédoco (Figura 18B). En algunos casos, numerosas células de la glía fueron localizadas en puentes de fibrosis, así como entre hepatocitos dentro del parénquima hepático (Figura 19A).

Para confirmar estos datos y analizar la frecuencia relativa de células de la glía en la fracción de células no parenquimáticas del hígado, se realizaron ensayos de citometría de flujo. Consistentemente con los datos anteriores, el porcentaje de células Vimentina⁺ Tom⁺ fue significativamente mayor en hígados con estadíos tempranos de fibrogénesis, tras 2 semanas de tratamiento con TAA (Figura 19B,C). En el modelo de ligadura del conducto colédoco, también mediante citometría de flujo se analizó la fracción positiva de células GFAP⁺ Tom⁺ presentes en el hígado luego de 2 semanas de la cirugía, observándose un aumento significativo de la fracción doble positiva con respecto al control (Figura 20A).



Figura 18: Contribución de células Wnt1⁺ con células no parenquimáticas en hígados sanos y fibróticos. (A) Microfotografías representativas de secciones de hígados control (Ctrl), TAA 8 semanas (TAA) o ligadura del conducto colédoco (BDL) provenientes de ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}*. Escala: 20 μm. (B) Gráfico de barra mostrando comparaciones estadísticas del número de células de glía por campo de microscopio, Kruskal-Wallis con prueba de Dunn para comparaciones múltiples. (C) Análisis de Sholl de los procesos gliales en hígados sanos o fibróticos (TAA 8 semanas y BDL 2

semanas); ANOVA de 2 factores y prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. (D) Gráfico de barras mostrando comparaciones estadísticas de la longitud de los procesos gliales. Kruskal-Wallis con prueba de Dunn para comparaciones múltiples. (E) Microfotografía mostrando endotelio marcado con Lectin en animales *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* TAA 8 semanas. Escala: 10 μm. Inset: imagen RGB de mapa de pixeles de colocalización. M1, blanco, Tom, M2 rojo, Lectina, coeficiente de Manders, calculado con Image J. (F) Gráfico de barras mostrando comparaciones estadísticas en el número de células endoteliales por campo, control vs. TAA 8 semanas, Mann-Whitney test. (G) Gráfico de barras mostrando comparaciones estadísticas en el número de células endoteliales por campo, control vs. BDL 2 semanas. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001; vs. Ctrl; Mann-Whitney. n=7.



Figura 19: Contribución de la cresta neural con la glía en animales control y con fibrosis, modelo de TAA. (A) Microfotografías representativas de secciones de hígados fibróticos mostrando células de glía trazadas dentro de un puente de fibrosis en animales *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* tratados con TAA por 8 semanas. (B-C) Gráficos de puntos representativos de análisis de citometría de flujo de células no parenquimáticas hepáticas, marcadas con Vimentina obtenidas de animales sanos o tratados con TAA durante 2 semanas. (D) Gráfico de barras con la comparación estadística de los porcentajes de células Vimentina⁺ trazadas con Wnt en animales sanos vs. dañados con TAA 2 semanas. *p<0.05; t-student; vs. Ctrl; n=3. (E) Microfotografías representativas de secciones de hígados mostrando células de glía trazadas con Wnt que expresan GFAP. Escalas: A, 50 μm; E, 40 μm.

El aumento en la incidencia de células de la glía fue confirmado en ratones *PLP^{CreERT};Rosa26^{Tom}*, inyectados con tamoxifeno a P2 o a P60 (Figura 21A,B), y en ratones *Nestina^{Cre};Rosa26^{Tom}*, luego de 8 semanas de tratamiento con TAA (Figura 21C). En los casos de estas dos cepas, se cuantificó el número de células no parenquimáticas presentes por campo de microscopio de 200x. No se excluyeron células presentes alrededor de venas porta de gran tamaño ni en la cápsula de Glisson. En estos animales, fueron también trazadas células mesenquimáticas y otra subpoblación de células endoteliales localizadas en puentes de fibrosis, respectivamente. En estas tres cepas de ratones doble-transgénicos, la única población celular trazada en común fue la de células de la glía, cuya incidencia aumenta en el hígado fibrótico. Este resultado nos permite concluir que las NCDCs sólo contribuirían con células de la glía en el hígado.



Figura 20: Contribución de células Wnt1⁺ con células de la glía y células endoteliales en animales control y con fibrosis, modelo de BDL. (A-B) Dot plot representativo de análisis de citometría de flujo de células no parenquimáticas hepáticas, marcadas con GFAP (A) o CD31 (B). Derecha, Gráfico de barras con la comparación estadística de los porcentajes de células trazadas con Wnt en animales sanos vs. BDL 2 semanas. *p<0.05; vs. Ctrl; t-student; n=3.



Figura 21: Contribución de células trazadas con PLP1 o Nestina con células no parenquimáticas trazadas en el hígado fibrótico. (A, B) Gráficos de barras que muestran las comparaciones estadísticas del número de células no parenquimáticas presentes en el hígado que fueron trazadas en ratones *PLP^{CreERT};Rosa26^{Tom}* mediante inyección tamoxifeno a P2 (A) o P60 (B), luego de 8 semanas de tratamiento con TAA o en animales control. (C) Gráfico de barras que muestra la comparación estadística del número de células no parenquimáticas trazadas en el hígado de animales *Nestina^{Cre};Rosa26^{Tom}* tratados con TAA por 8 semanas o control. Los lóbulos hepáticos fueron analizados separadamente: cuadrado (Q), caudado (C), lóbulo derecho (R), y lóbulo izquierdo (L). *,^{σ,δ,τ}p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; vs. Ctrl; Mann-Whitney; n=3.

El aumento en la incidencia de células de la glía puede ser indicador de activación celular. Para confirmar esta posibilidad, se realizó un análisis de Sholl, que permite estudiar cambios en la complejidad de las proyecciones celulares, en hígados de ratones *Wnt1^{cre};Rosa26^{Tom}*. Las células de la glía residentes en hígados fibróticos presentaron una mayor ramificación de sus procesos en comparación que aquellas del grupo control. Asimismo, se observó un aumento significativo en la longitud total de los procesos, los que duplicaron su tamaño normal luego del daño por BDL (Figura 18A,C,D). Estos resultados nos permiten concluir que durante la fibrogénesis hepática se induce la activación de células de la glía.

Interesantemente, en los hígados fibróticos de animales *Wnt1^{cre};Rosa26^{Tom}* se observó otro tipo celular que expresaba Tom. Estas células tenían aspecto aplanado y fueron encontradas preferentemente tapizando luces correspondientes a capilares sanguíneos de zonas parenquimáticas. Si bien en ocasiones se observó un aumento en su incidencia en algunas de esas regiones en cortes sucesivos, generalmente su distribución fue heterogenea y aleatoria en los diversos lóbulos hepáticos. Estas células pudieron ser caracterizadas como Lectina⁺ CD31⁺ S100⁻ GFAP⁻ Desmina⁻, correspondiendo por tanto a células endoteliales (Figuras 19E, 20B).

En algunos animales tratados con TAA, las células endoteliales Tom⁺ fueron incluso más abundantes que las células de la glía. Sin embargo, en animales sanos muy raramente pudieron observarse células endoteliales Tom⁺, localizadas preferentemente en las paredes de las venas porta hepáticas (Figuras 18F,G, 20B). En animales tratados con TAA o BDL, el número de células endoteliales fue significativamente mayor que en los hígados no lesionados (Figuras 18F y 20B). Teniendo en cuenta lo anterior, podemos concluir que en un hígado sano las células Wnt1⁺ contribuyen con células gliales y raramente con células endoteliales. En una situación de daño crónico, como la fibrogénesis hepática, las células de la glía sufren un proceso de activación, con un aumento en su incidencia y una mayor complejidad de sus procesos celulares. Asimismo, durante el proceso fibrogénico se induce un aumento en el número de células endoteliales trazadas con Wnt1.

5.3. Contribución de células Wnt1⁺ a la fracción de células parenquimáticas en el hígado fibrótico

Al analizar el tejido hepático adulto de animales *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* se observó una rara incidencia de células trazadas HNF4 α^+ Albumina⁺ CK18⁺ Desmina ⁻ Vimentina⁻, que corresponden a un fenotipo de células tipo-hepatocitos (HLCs) (Figura 22A,B,E,F,I,J). Cuando se analizaron muestras hepáticas de animales fibróticos, se encontró un aumento significativo en el número de HLCs Tom⁺ (Figura 22C-J). Este aumento fue más notable en el modelo de hepatotoxicidad por TAA, en que el número de HLCs trazados fue diez veces superior al encontrado en animales sanos (Figura 22E). Cuando se analizaron por citometría muestras de la fracción parenquimática de hígados con una fibrosis temprana (tratamiento de TAA 2 semanas), se observó un aumento significativo en el porcentaje de células HNF4 α^+ Tom⁺ en comparación con el control (Figura 22I,J). En la mayoría de las secciones provenientes de hígados fibróticos, las HLCs se encontraron dispersas en el parénquima, más frecuentemente en grupos de 2 o 3 células y en ocasiones formando grupos o clusters celulares.

Nos preguntamos entonces si estos HLCs podrían ser trazados a partir de SCPs, un tipo celular que presenta un notable grado de plasticidad celular. Como fue mencionado anteriormente, no se encontró contribución con HLCs de células trazadas en ratones adultos *PLP1^{CreERT};Rosa26^{Tom}* a los que se aplicó tamoxifeno a P2. Ello sugiere que las HLCs no se originarían a partir de SCPs que colonizan el hígado durante el proceso de inervación de ese órgano.



Figura 22: Contribución de células Wnt1⁺ con células parenquimáticas en el hígado sano y fibrótico. (A-D) Microfotografías representativas de secciones de hígado de ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* control (A, B), TAA 8 semanas (C) y BDL 2 semanas (D). (E) Gráfico de barras mostrando comparaciones estadísticas del número de HLCs por campo (control vs TAA; Mann Whitney). (F) Gráfico de barras mostrando comparaciones estadísticas del número de HLCs por campo (control vs BDL; t-student). (G, H). Microfotografías representativas de células parenquimáticas marcadas en suspensión con

HNF4a (G) y Albumina (H). (I) Histogramas representativos de análisis de citometría de flujo de células parenquimáticas Tom⁺ marcadas con HNF4a. (J) Gráfico de barras mostrando el porcentaje de células doble positivas (control vs TAA2w, t-student). *p<0.05; ****p<0.0001; vs. Ctrl; n=5.

Luego quisimos analizar la posibilidad de que SCPs pudieran contribuir con HLCs durante estadíos embrionarios. Con este fin, se aplicó tamoxifeno a hembras preñadas portando embriones *PLP1^{CreERT2};Rosa26^{YFP}* en estadío embrionario 12,5 (E12,5), lo que permite trazar precursores de Schwann tempranos. Los embriones fueron recolectados en estadíos E15,5 y E17,5 para analizar el fenotipo de las células trazadas presentes en el hígado. Se observaron varias células YFP⁺ dispersas en el parénquima, especialmente en regiones dorsales y posteriores/caudales del hígado (Figura 23A,B). Las células YFP⁺ no expresaron marcadores de células estrelladas hepáticas como Desmina y Vimentina, pero raramente coexpresaron marcadores del linaje de hepatocitos, como alfa-Fetoproteína (AFP) (Figura 23C-K). Estos resultados sugerirían que SCPs podrían raramente originar HLCs durante estadíos embrionarios.

Para confirmar estos datos, en un experimento control se realizó la inducción de la recombinación en los mismos animales inyectando tamoxifeno a E15,5 y los animales fueron analizados a E17,5, no pudiéndose encontrar células YFP⁺ que no estuvieran en contacto con axones neuronales. Ese dato nos permite concluir que células presentes en el hígado no expresan PLP1 a E15,5 ni existe contribución de SCPs o células de Schwann inmaduras con células no neurales en el hígado durante estadíos embrionarios. Considerando que la inervación del hígado tiene lugar durante estadíos embrionarios posteriores y que la distribución de las células AFP YFP⁺ no está asociada a fibras nerviosas, podemos concluir que estas células serían reclutadas a través del torrente sanguíneo.



Figura 23: Contribución de células trazadas con PLP1 con HLCs durante estadíos embrionarios. (A-B) Microfotografías representativas de hígados embrionarios E15,5 obtenidos de ratones *PLP1^{CreERT2};Rosa26^{YFP}* mostrando células trazadas. Las hembras preñadas fueron inyectadas i.p. con tamoxifeno a E12,5. (C-K) Microfotografías representativas de hígados embrionarios E17,5 *PLP1^{CreERT2};Rosa26^{YFP}* mostrando algunas células trazadas inmunomarcadas con AFP. Las muestras provienen de embriones de hembras preñadas inyectadas con tamoxifeno a E12,5. (D-K) Imágenes con mayor magnificación obtenidas de las áreas indicadas por los recuadros con líneas de puntos en (C). Escala: 50 μm. n=3.

Se buscó confirmar esos datos en otras cepas de ratón. Una línea inducible de ratones conocida por su especificidad en trazar NCDCs es *Sox10^{CreERT2}*. Sin embargo, cuando

hembras preñadas fueron inyectadas con Tx a E9,5, algunas células estromales fueron trazadas en regiones dorsales del hígado en una porción minoritaria de los embriones *Sox10^{CreERT2};Rosa26^{Tom}* analizados a E17,5. Un resultado similar fue hallado en ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* a E16 en una localización similar (en 3 de 9 embriones).

En muestras de sangre periférica obtenidas de embriones *PLP1^{CreERT2};Rosa26^{YEP}* provenientes de hembras tratadas con Tx a E12,5 se encontraron cantidades significativas de células trazadas con PLP1, en comparación con muestras de embriones correspondientes a la condición Tx E15,5. Como el proceso de inervación hepática es posterior en el tiempo, a partir de estos resultados podemos concluir que, en una fracción minoritaria de animales, a E12,5-E15,5 células estromales PLP1⁺ Sox10⁺ y/o Wnt1⁺, de probable origen no neural, podrían ser reclutadas hacia el hígado a través de sangre periférica. Por lo tanto, la rara incidencia de HLCs trazadas en ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* se debería más probablemente a la activación *de novo* del promotor en células no neurales. El hecho de que SCPs reclutados hacia el hígado durante su inervación no contribuyan con HLCs favorecería también esta hipótesis (ver más arriba). Finalmente, se encontró un mayor número de HLCs trazadas con Wnt1 en el hígado fibrótico en comparación con animales naïve, lo que sugeriría una capacidad regenerativa más competitiva de estos HLCs en comparación con otros hepatocitos residentes.

5.4. Contribución de células Wnt1⁺ a la médula ósea

En los estudios realizados en ratones *Wnt1Cre;Rosa26^{Tom}* se observó una rara incidencia de HLCs y de células endoteliales trazadas. Sin embargo, un notable aumento de células Tom⁺ presentando esos dos mismos fenotipos fue encontrado en el hígado fibrótico. Además, en

hígados lesionados se observó que las HLCs y las células endoteliales trazadas se hallaban distribuidas en distintos focos, generalmente de una o pocas células, a lo largo de secciones hepáticas. Estas evidencias sugieren un origen extrahepático de ambos tipos celulares. Esas células podrían por tanto derivar de progenitores presentes en la médula ósea, los que se movilizarían hacia la sangre periférica y podrían ser posteriormente reclutados hacia el sitio de lesión.

Para verificar esta hipótesis, se analizó el fenotipo de las células trazadas en la médula ósea adulta en ratones *Wnt1Cre;Rosa26^{Tom}* (Figura 24). Aproximadamente la mitad de las células Tom⁺ consistieron en células de Schwann no mielinizantes GFAP⁺ S100⁺ Nestina⁺ α SMA⁻, con diferentes morfologías, en contacto con axones Tuj1⁺ TH⁺ (Figura 24A-C,E). Sin embargo, la otra mitad de las células trazadas fueron células estromales Fibronectina⁺ Desmina⁺ GLAST⁺ Vimentina⁺ GFAP⁻, de tipo perisinusoidal (α -SMA⁻) o periarteriolar (α -SMA⁺) (Figura 24D,E).



Figura 24. Contribución de las células trazadas con Wnt1 con la médula ósea. (A-D) Imágenes que muestran células de Schwann no mielinizantes GFAP⁺ Nestina⁺ trazadas en la médula ósea adulta de

ratones $Wnt1^{Cre}$; $Rosa26^{Tom}$. Estas células generalmente integran fibras nerviosas, son cercanas a un vaso sanguíneo (recuadro A, B) y cambian su morfología en áreas periféricas de la médula ósea (C). Además, otras células trazadas carecen de la expresión de GFAP y expresan Fibronectina (B, D). (E) Gráficos que muestran la contribución relativa de diferentes subpoblaciones celulares trazadas con Wnt1. Barras de escala: A, 50 µm; B, D, 20 µm; C, 40 µm; n=3.

Nos preguntamos entonces si las células estromales trazadas con Wnt1 podrían originarse en la cresta neural. Con este objetivo, hembras preñadas que portaban embriones *Sox10^{CreERT2};Rosa26^{YEP}* fueron inyectadas en Tx a E9,5 y los embriones fueron recolectados a 17,5. Se encontraron muy raramente células YFP⁺ de tipo estromal en la médula ósea. Resultados similares fueron hallados en ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* a E16. Únicamente a día postnatal 6 (P6) se observaron consistentemente algunas células estromales trazadas en estos últimos ratones. En conjunto, estos datos sugieren que algunas células estromales en la médula ósea adulta pueden ser trazadas con Wnt1 a partir de estadíos postnatales; estas células, muy probablemente de origen mesodérmico, podrían ser movilizadas y reclutadas hacia el hígado durante la fibrogénesis.

5.5. Pericitos GLAST⁺ de médula ósea, una fuente de células endoteliales y de HLCs

Quisimos entonces confirmar algunos de los resultados obtenidos en otra cepa de ratón. Gracias a la generosidad del Dr. Guillermo Lanuza (Fundación Instituto Leloir), tuvimos oportunidad de conseguir ratones *GLAST^{CreERT2}*. Esta proteína se expresa en células de la glia radial⁸⁵ y en células de Schwann mielinizantes⁶⁸, pero hasta el momento se desconocía su patrón de expresión en el linaje de células gliales periféricas. Más interesante aún fue el hecho de que GLAST fue descripto como marcador de una subpoblación de pericitos, que carece de la expresión de α -SMA⁵⁵. Ello sugería la posibilidad de que una gran parte de los pericitos Wnt1⁺ presentes en la médula ósea coexpresara GLAST.

En primer término, se investigó el patrón de expresión de GLAST en el linaje de células de Schwann, mediante inmunofluorescencia. Se utilizaron secciones provenientes de ratones CD1 a E13.5 y de nervios adultos de ratones GLAST^{CreERT2};Rosa26^{Tom} inducidos con tamoxifeno a P60. Se confirmó la expresión de GLAST en células de la glía radial Nestina⁺ Sox2⁺, cuyo soma se localiza en la zona ventricular del tubo neural embrionario; en este tejido, se observó una reducción gradual en la expresión de GLAST cuando esas células quedan especificadas al linaje neuronal (Figura 25A,B,D,E). Asímismo, pudimos confirmar la expresión de GLAST a nivel proteico en algunas células de Schwann S100⁺ en el nervio ciático adulto (Figura 26A). Por primera vez pudimos constatar expresión de GLAST en células de cresta neural Nestina⁺ presentes en las células del capuchón limítrofe de la cresta neural (boundary cap neural crest cells), que son multipotentes y pueden generar neuronas y glía (Figura 25C,F). También expresó este marcador una subpoblación de SCPs y/o células de Schwann inmaduras Nestina⁺ presentes en las raíces nerviosas del tubo neural y en los rami communicantes (Figura 25F). Finalmente, la mayoría de los axones de nervios craneales en secciones de cerebro fueron GLAST⁺ (Figura 26B).



Figura 25: Patrón de expresión GLAST en el linaje de células de Schwann. Imágenes que muestran la expresión de GLAST (verde) en secciones de embriones CD1 a E13.5 correspondientes a los niveles del tronco, en secciones co-inmunoteñidas con Tuj1 (A-C) o Nestina (D-E) (rojo). (B-C) Imágenes magnificadas de (A), correspondientes a aspectos ventrales (B) o a la raíz dorsal del tubo neural (C), respectivamente. (E) Imagen magnificada de una región de (D). (F) Imágenes que muestran la expresión GLAST en células Nestina⁺ del capuchón limitante (boundary cap) ventral (flecha discontinua) y en precursores de células de Schwann/células de Schwann inmaduras, dentro de un nervio espinal (flechas). Barras de escala: A, D, 100 μ m; B, E, F, 20 μ m; C, 10 μ m; n=3.



Figura 26: Patrón de expresión de GLAST en células de Schwann adultas y en el cerebro embrionario. A. Imagen representativa de un nervio ciático de animales *GLAST^{CreERT2};Rosa26^{Tom}* inyectados con tamoxifeno a P2 e inmunomarcado con S100 (verde). B. Imagen representativa de la expresión de GLAST (verde) en una sección coronal de cerebro de embrión E13,5 CD1, inmunomarcado con Tuj1. A. 25 µm; B 20 µm; n=3.

Teniendo en cuenta que en el linaje de las células de Schwann se expresa GLAST, se analizó el hígado de ratones *GLAST^{CreERT2};Rosa26^{Tom}*, los que fueron previamente inyectados con tamoxifeno, a P2 o P60. Sin embargo, las células de la glia residentes en el hígado no fueron trazadas en estos animales, incluso luego de lesiones hepáticas.

Sin embargo, en las secciones de hígados provenientes de animales control inyectados con tamoxifeno a P2, se observaron células endoteliales (Figura 27C) y HLCs (Figura 27E,H) Tom⁺ en números similares a los encontrados en los hígados de ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}*. Por otra parte, cuando se aplicó tamoxifeno a P60 no pudieron observarse células endoteliales trazadas (Figura 27D) y se encontraron HLCs trazados aunque en número aún más reducido que cuando se indujo la recombinación a P2 (Figura 27I,L).

Al analizarse los hígados fibróticos de animales tratados con TAA durante 1 semana se encontró una tendencia a un aumento en la incidencia de células endoteliales (Figura 27A,C) y de HLCs (Figura 27F,H) Tom⁺. Estas diferencias se hicieron significativas cuando se

extendió el tratamiento por 8 semanas, tanto para las células endoteliales (Figura 27B,C) como para las HLCs (Figura 27G,H). A esta sobrevida, la incidencia alcanzada por ambos tipos celulares fue similar a la observada en ratones Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom} a los que se les aplicó similar tratamiento. Finalmente, en el caso de los animales inducidos con tamoxifeno a P60 y lesionados por TAA, se constató un aumento en el número de células endoteliales (Figura 27D) y de HLCs (Figura 27J-L) Tom⁺, con un patrón similar al observado en animales inducidos a etapa temprana postnatal, aunque con una menor incidencia total de las células trazadas. Para excluir la posibilidad que una activación de novo del promotor por efecto de la lesión, animales no inducidos con tamoxifeno fueron tratados con TAA durante 4 semanas y se procedió a la cuantificación de células positivas de la misma manera. Solo fueron trazadas 0,005±0,002 HLCs/campo (vs. 0,123 ± 0,043 células/campo, TAA 4W Tx P2; vs. 0,052 ± 0,008 células/campo, TAA 4W Tx P60; p <0.01; Kruskall-Wallis con prueba de comparaciones múltiples de Dunn), y ningún otro tipo de células Tom⁺ fue observado en estas muestras. Además, cuando ratones GLAST^{CreERT2};Rosa26^{Tom} fueron tratados con TAA durante 1 (n = 3) o 4 semanas (n = 3) y se inyectó Tx 12 horas después de la última aplicación de TAA y los animales fueron sacrificados 48 horas más tarde, no se hallaron células endoteliales Tom⁺ y solo fueron trazados 0,007±0,002 y 0,009±0,004 HLCs/campo, respectivamente. Esto puede explicarse por las propiedades hipomórficas de los pericitos trazados con Wnt1 de la médula ósea después de la lesión (ver más abajo). Estos datos sugieren fuertemente que el aumento en la incidencia de células endoteliales y de HLCs Tom⁺ observados en el hígado fibrótico de ratones GLAST^{CreERT2};Rosa26^{Tom} se debería al aporte de células no residentes, que podrían consistir en pericitos GLAST⁺ situados en la médula ósea los que se movilizarían luego de la lesión y serían reclutados en el hígado.



Figura 27: Contribución de pericitos GLAST⁺ con el hígado sano y fibrótico. (A-B) Microfotografías representativas mostrando células endoteliales (CEs) trazadas (flechas en B) en animales *GLAST^{CreERT2};Rosa26^{Tom}* inducidos con tamoxifeno a P2 y tratados con TAA durante 1 (A) u 8 (B) semanas. (C,D) Gráfico de barras que muestra comparaciones estadísticas de la incidencia de células endoteliales Tom⁺ en animales inducidos con Tx a P2 (C) o P60 (D); Kruskal-Wallis con pruebas de comparaciones múltiples de Dunn. (E-G; I-K) Microfotografías representativas mostrando HLCs trazados en animales *GLAST^{CreERT2};Rosa26^{Tom}* inducidos a P2 (E-G) o p60 (I-K), correspondientes a animales control (E,I) o tratados con TAA durante 1 (F,J) u 8 (G,K) semanas. (H,L) Gráficos de barras mostrando comparaciones estadísticas de incidencia de HLCs en animales inducidos con tamoxifeno a P2 (H) o P60 (L); pruebas de comparaciones múltiples de Tukey.*,^σp<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. *vs. control; ^σvs. TAA 1W. Escalas: 20 μm. n=5.

5.6. Contribución de células trazadas con GLAST a la médula ósea

Considerando la posibilidad de que pericitos GLAST⁺ presentes en la médula ósea pudieran contribuir con células endoteliales y HLCs luego de una lesión hepática, se analizó el fenotipo de las células trazadas en la médula ósea adulta de animales *GLAST^{CreERT2};Rosa26^{Tom}* inducidos con tamoxifeno a P2. De modo similar a lo observado en el hígado, no fueron trazadas las células de la glía residentes. Sólo se encontró expresión de Tom en células estromales perisinusoidales Fibronectina⁺ Desmina⁺ Vimentina⁺ α -SMA⁻ CD31⁻ y en células estromales periarteriolares Fibronectina⁺ Desmina⁺ Vimentina⁺ α -SMA⁺ CD31⁻ (Figura 28). Por lo tanto, en estos animales fueron trazadas células estromales similares a las halladas en ratones Wnt1, solo que en una frecuencia 10 veces mayor. Interesantemente, en animales *Nestina^{Cre};Rosa26^{Tom}* tratados con TAA durante 8 semanas no se observó contribución de células trazadas con HLCs. Considerando que, a diferencia de los pericitos perisinusoidales, las células estromales periarteriolares expresan altos niveles de Nestina⁸⁶, este resultado sugeriría que una subpoblación de células perisinusoidales sería la que contribuiría con algunas células del parénquima hepático y células endoteliales en el contexto de una lesión hepática.



Figura 28: Contribución de pericitos GLAST⁺ con la médula ósea. (A-E) Imágenes representativas de células trazadas con GLAST en animales *GLAST^{CreERT2};Rosa26^{Tom}* inducidos con tamoxifeno a P2, con inmunomarcación para: (A) CD31 (cabezas de flecha: células estromales perisinusoidales CD31⁻; flechas: células estromales periarteriolares CD31⁻, rodeando células endoteliales CD31⁺); (B) Fibronectina (izquierda, células estromales perisinusoidales, derecha células estromales periarteriolares); (C) Desmina; (D) Vimentina (imagen principal y el recuadro, células estromales

periarteriolares; recuadro abajo derecha, células estromales perisinusoidales), o (E) α -SMA (células estromales periarteriolares). (F) Gráfico de barra mostrando la contribución relativa de las distintas subpoblaciones de células trazadas con GLAST en la médula ósea. Escalas: 20 μ m. n=3.

5.7. Las células Wnt1⁺ de la médula ósea movilizadas por sangre periférica

son pericitos GLAST⁺ con propiedades de células progenitoras

Con el objetivo de estudiar si las células estromales trazadas con Wnt1 de la médula ósea tienen la capacidad de movilizarse hacia la sangre periférica durante la fibrogénesis, realizamos un ensayo de citometría de flujo a partir de las fracciones mononucleares de médula ósea (BMMCs) y de sangre periférica (PBMCs) obtenidas de animales *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}*. Con este fin se generaron dos modelos de daño, mediante la aplicación de TAA o BDL, con sobrevidas de dos semanas en ambos casos. Se observó que virtualmente todas las células Tom⁺ de las fracciones de BMMCs y PBMCs coexpresaron CD44 y GLAST. Este resultado nos permite concluir que las células trazadas con Wnt1 incluyendo aquellas movilizadas por sangre, tanto en animales control como en el contexto de fibrosis hepática, presentarían un fenotipo de pericitos GLAST⁺. Asimismo, luego del daño se observó en ambos modelos de lesión una reducción en dicha subpoblación celular en la médula ósea y un aumento en sangre periférica, en comparación con animales control (Figura 29A-C). Ello sugiere fuertemente que la lesión hepática induciría la movilización de células trazadas con Wnt1.

Con el objeto de caracterizar aún más esta subpoblación de pericitos, se analizó si los mismos tenían propiedades de células progenitoras, para ello se realizó un ensayo de células mesenquimales formadoras de colonias (CFU-F), utilizando muestras de BMMCs de ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}*, con o sin tratamiento con TAA por dos semanas. Se obtuvieron

colonias de células fibroblásticas, algunas de las cuales contenían células Tom⁺ (Figura 29D-K). Asimismo y en concordancia con el resultado de citometría de flujo, se encontró que el número de colonias formadas era menor en muestras obtenidas de ratones con una fibrogénesis temprana. Aunque el porcentaje relativo de las colonias Tom⁺ no fue afectada específicamente por la lesión, se observó una reducción en la densidad celular en las colonias Tom⁺ a partir de muestras de animales tratados con TAA, en comparación con el control. Estos resultados nos permiten concluir que pericitos GLAST⁺ CD44⁺ trazados con Wnt1 presentes en la médula ósea adulta son las únicas células trazadas que se movilizan por sangre periférica y que tienen propiedades de células progenitoras.



Figura 29: Células trazadas con Wnt1 se movilizan por sangre periférica a partir de la médula ósea y consisten en pericitos GLAST⁺ con propiedades de CFU-Fs. (A) Gráficos de puntos representativos de análisis de citometría de flujo de BMMCs y PBMCs obtenidas de ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* control o tratados con TAA o BDL (por 2 semanas), inmunomarcadas con CD44 y GLAST. (B-C) Gráficos de barras mostrando comparaciones estadísticas de porcentajes de células triple-positivas en la médula ósea (B) y sangre periférica (C). (D-E) Fotografías representativas de frascos luego de

ensayos CFU-Fs. (F-G) Gráficos de barras mostrando comparaciones estadísticas del Nº de células mesenquimales formadoras de colonia cada 2,5x10⁶ BMMCs (F) y el porcentaje de colonias Tom⁺ (G), entre control y TAA 2W. (H-K) Microfotografías representativas de colonias Tom⁺, obtenidas a partir de muestras de animales control (H-I) o TAA 2W (J-K). *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ***p<0.001; vs. Ctrl; t-student; n=6.

5.8. Pericitos trazados con Wnt1 en la médula ósea se movilizan en un

modelo de hepatectomía parcial

Para analizar si los pericitos GLAST⁺ CD44⁺ trazados con Wnt1 de la médula ósea pueden contribuir con la regeneración hepática, se estableció un modelo de hepatectomía parcial (mediante la remoción del 70% de la masa de ese órgano). Primeramente se buscó analizar una posible movilización de células de la médula ósea adulta en este nuevo contexto experimental, independiente de estímulos de toxicidad o muerte hepatocitaria. Se utilizaron nuevamente los animales *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* y se analizó por citometría de flujo la incidencia relativa de la subpoblación de pericitos trazados con Wnt1 en las fracciones BMMCs y PBMCs. Como habíamos supuesto, en los animales sometidos a esta cirugía se redujo la proporción de células CD44⁺ GLAST⁺ Tom⁺ en la fracción de BMMCs y la misma aumentó en la fracción de PBMCs (Figura 30A,B). Estos cambios fueron más notables que los observados en los modelos de fibrogénesis hepática.

Posteriormente, se buscó descartar la posible contribución de células trazadas con Wnt1 con otras poblaciones originadas en la médula ósea, no correspondientes al compartimento de células estromales, en animales control o hepatectomizados, a partir de muestras de ambas fracciones (BMMCs Y PBMCs), mediante el análisis de marcadores específicos.



Figura 30: Pericitos trazados con Wnt1 se movilizan luego de una hepatectomía parcial. Izquierda, gráficos de puntos representativos de análisis de citometría de flujo de BMMCs (A) o PBMCs (B) obtenidas de animales *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* inmunomarcadas para CD44 y GLAST. Derecha, gráficos de barras mostrando comparaciones estadísticas de los porcentajes de células triple-positivas en médula ósea (A) o sangre periférica (B). *p<0.05; vs. Ctrl; t-student; n=3.

En ningún caso, las células trazadas expresaron marcadores de células hematopoyéticas (CD45 y Sca-1), progenitores endoteliales (CD31 y CD11b), de precursores de granulocitosmonocitos (CD11b y c-Kit) o de células del linaje mieloide/linfoide (Sca-1) (Figuras 31 y 32). Sin embargo, consistente con una contribución significativa de células trazadas con Wnt1 con células estromales, un gran porcentaje celular expresó Fibronectina, principalmente en la muestra de células presentes en la sangre periférica en animales hepatectomizados (Figura 33).



Figura 31: Los pericitos Wnt1⁺ de la médula ósea y sangre periférica no expresan marcadores de tipos celulares no estromales de médula ósea. Análisis de citometría de flujo mostrando que Tom no colocaliza con CD45 (A, izquierda), CD31 (A, derecha), CD11b (B, izquierda) ni c-Kit (B, derecha) en muestras de BMMCs y PBMCs de animales *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* control y hepatectomizados. n=3.


Figura 32: Las células trazadas con Wnt1 en la médula ósea o sangre periférica no contribuyen con células Sca-1⁺. Análisis de citometría de flujo de células Tom⁺ de las fracciones BMMCs y PBMCs de animales *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* control y hepatectomizados que muestra que las células Tom⁺ no expresan Sca-1. n=3.



Figura 33: Las células trazadas con Wnt1 expresan fibronectina. Izquierda: gráficos de puntos correspondientes a citometrías de flujo que muestran que la mayor parte de las células movilizadas expresan ese marcador estromal. Derecha: gráficos de barras que muestran que el porcentaje relativo de células Fibronectina⁺ trazadas con Wnt1 disminuyen en médula ósea y aumentan en sangre periférica en ratones hepatectomizados. *p<0.05; vs. Ctrl; t-student; n=3.

5.9. Contribución de pericitos GLAST⁺ al perfil celular del hígado en un modelo de hepatectomía parcial

Con el objetivo de determinar una posible contribución de los pericitos GLAST⁺ de la médula ósea con HLCs en un modelo de hepatectomía, analizamos mediante citometría de flujo la posible incidencia de HLCs HNF4 α^+ Tom⁺ en ratones *GLAST^{CreERT2};Rosa26^{Tom}* inducidos con Tx a P2, en la fracción de células parenquimatosas del hígado. Como se muestra en la Figura 34, esta fracción aumentó significativamente en los hígados regenerados en comparación con el grupo control, a los 7 días post-cirugía. Además, las HCLs trazadas con GLAST mantuvieron la expresión de varios marcadores típicos de pericitos como CD44, fibronectina, vimentina y desmina tras su diferenciación en hepatocitos (Figura 35).



Figura 34: Los pericitos GLAST⁺ de médula ósea se movilizan luego de un modelo de hepatectomía y contribuyen con HCLs CD44⁺. Izquierda, análisis de citometría de flujo de HCLs que expresan CD44 y HNF4 α de animales control y hepatectomizados de animales *GLAST^{CreERT2} Rosa26^{Tom}* inducidos con tamoxifeno a P2. Derecha, gráfico de barras mostrando la comparación estadística de las subpoblaciones del hígado entre animales control y hepatectomizados. *p<0.05; vs. Ctrl; t-student; n=3.



Figura 35: Las HLCs derivadas de pericitos GLAST⁺ de la médula ósea presentes en el hígado regenerado coexpresan marcadores estromales. Izquierda, análisis de citometría de flujo mostrando que la incidencia de células Tom⁺ que coexpresan CD44⁺, fibronectina (arriba), vimentina (medio), y desmina (abajo), en células de la fracción parenquimática del hígado, tanto en animales *GLAST^{CreERT2} Rosa26^{Tom}* (TX P2) control como hepatectomizados. Derecha, gráficos de barras mostrando la comparación estadística de las subpoblaciones del hígado entre las dos condiciones experimentales. *p<0.05; vs. Ctrl; Mann-Whitney; n=3.

También se analizó la fracción no parenquimatosa a partir de muestras de hígados de los mismos animales y se realizó la inmunomarcación para CD31 (marcador de células endoteliales). Se encontró un aumento significativo de las células CD31⁺trazados con GLAST en comparación con el control (Figura 36).



Figura 36: Los pericitos trazados con Wnt1 se movilizan luego de una hepatectomía parcial y contribuyen con células endoteliales. (A-B) izquierda, dot plots representativos de análisis de citometría de flujo de células de la fracción no parenquimática del hígado obtenidas de animales *GLAST^{CreERT2};Rosa26^{Tom}*, inmunomarcadas con CD31. Derecha, gráfico de barras mostrando comparaciones estadísticas a partir de estos análisis entre los grupos experimentales. *p<0.05; vs. Ctrl; t-student; n=3

5.10. Diferenciación in vivo de pericitos de la médula ósea trazados con

Wnt1 en células tipo- hepatocitos y células endoteliales

Con el objetivo de analizar si los pericitos trazados con Wnt1 tienen la capacidad de ser reclutados hacia el sitio de lesión y de diferenciarse en HLCs, se obtuvieron BMMCs provenientes de ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* las que fueron aplicadas por vía sistémica en ratones nude previamente hepatectomizados. El trasplante celular fue realizado a los 6 días de la cirugía y los animales nude fueron sacrificados 1 o 5 días después del tratamiento.

Para la obtención de la muestra se perfundió el hígado con colagenasa y se separaron las fracciones parenquimatosa y no parenquimatosa. Mediante citometría de flujo, se analizó la incidencia de células Tom⁺ en la fracción parenquimatosa, tanto de animales control como hepatectomizados. Se encontró un mayor reclutamiento de las células trazadas hacia el hígado hepatectomizado en comparación con el control, en las dos sobrevidas (Figuras 37A y 38A). Al día siguiente al trasplante, las células Tom⁺ contribuyeron con el 10% de las células del hígado, de las que un 10% fueron CD44⁺ Albúmina⁺, y un 20% CD44⁺ Fibronectina⁺ (Figura 37B,C). Los hígados animales sacrificados a los 5 días post-trasplante presentaron cerca de un 3% de células Tom⁺, de las que el 20% co-expresaron Albúmina, Fibronectina y Vimentina (Figura 38B-D). La reducción en el porcentaje de células parenquimáticas trazadas, entre 1 y 5 días post-trasplante (p<0,0001; t-student), muy posiblemente se deba a que con el tiempo sólo quedarían integradas al tejido un porcentaje de las mismas. El hecho de que luego de 5 días, el porcentaje de células CD44⁺ Albúmina⁺ coincida aproximadamente con el de las fracciones de células CD44⁺ Fibronectina⁺ y CD44⁺ Vimentina⁺ sugeriría que, en la fracción parenquimatosa, los pericitos Tom⁺ con propiedades de células progenitoras estarían representados por las HLCs. Asimismo, este resultado es consistente con resultados previos que sugieren que estas células una vez diferenciadas en HLCs mantienen la expresión de marcadores estromales. El aumento del 100% en la fracción de HLCs entre 1 y 5 días podría deberse al proceso de diferenciación en HLCs, con adquisición gradual de la expresión de Albúmina, o a que una subpoblación de células Tom⁺ podría re-movilizarse hacia otras zonas del hígado o morir.

Posteriormente, a partir de las muestras correspondientes a la fracción de células no parenquimatosas obtenidas de los mismos animales se analizó mediante citometría de flujo

la incidencia relativa de células Tom⁺. Se encontró un aumento de más del doble en la proporción de células Tom⁺ en los animales hepatectomizados, en comparación con los animales control tanto en los días 1 y 5 posteriores al trasplante (Figura 39A y 40A). De modo similar a lo observado en la fracción parenquimática, se redujo significativamente el número de células trazadas en el hígado en la sobrevida mayor (p<0,0005; t-student), probablemente por re-movilización y/o muerte celular. A 1 y 5 días post-trasplante, la incidencia relativa de células endoteliales CD44⁺ Tom⁺ aumentó también al doble en los animales hepatectomizados, en comparación con los animales control y se mantuvo entre 15 y 20% (Figura 40B).

En la Tabla 1 se describen las principales cepas de ratón utilizadas en estos estudios y se describen los principales resultados obtenidos.



Figura 37: Pericitos Wnt1⁺ se diferencian in vivo en células tipo-hepatocitos. Izquierda, gráficos de puntos representativos de análisis de citometría de flujo obtenidos a partir de muestras correspondientes a la fracción parenquimática del hígado de animales nude control o hepatectomizados, trasplantados un día antes con BMMCs de ratones Wnt1. En (A) se indica, con una línea de trazo continuo, la nube de células Tom⁺ cuyo perfil de expresión se muestra en (B-C). Derecha, gráficos de barras y análisis estadísticos de comparaciones entre animales control y hepatectomizados. *p<0.05; vs. Ctrl; t-student; n=3.



Figura 38: HLCs diferenciadas a partir de pericitos Wnt1⁺ coexpresan marcadores de células estromales. Izquierda, gráficos de puntos representativos de análisis de citometría de flujo obtenidos a partir de muestras correspondientes a la fracción parenquimática del hígado de animales nude control o hepatectomizados, trasplantados con BMMCs de ratones Wnt1. (A) Se indica, con una línea de trazo continuo, la nube de células Tom⁺ cuyo perfil de expresión se muestra en (B-D). Note que la fracción de células que expresa CD44 junto con Albúmina, Fibronectina y Vimentina es similar. Derecha, gráficos de barras y análisis estadísticos de comparaciones entre animales control y hepatectomizados. *p<0.05; vs. Ctrl; t-student; n=3.



Figura 39: Diferenciación in vivo de pericitos Tom⁺ en células endoteliales. Izquierda, gráficos de puntos representativos de análisis de citometría de flujo de células de la fracción no parenquimática del hígado obtenidas de animales atímicos control o hepatectomizados, que fueron trasplantados el día anterior con BMMCs obtenidas de ratones Wnt1. (A) Se indica con una línea de trazo continuo la fracción de células Tom⁺. (B) Caracterización de las diversas poblaciones de células hepáticas Tom⁺ en relación con su expresión de CD44 y CD31. Derecha, gráficos de barras con la comparación estadística entre los grupos experimentales. *p<0.05; vs. Ctrl; t-student; n=3.



Figura 40: Diferenciación in vivo de pericitos Tom⁺ en células endoteliales. Izquierda, gráficos de puntos representativos de análisis de citometría de flujo de células de la fracción no parenquimática

del hígado obtenidas de animales atímicos control o hepatectomizados, que fueron trasplantados 5 días antes con BMMCs obtenidas de ratones Wnt1. (A) Se indica con una línea de trazo continuo la fracción de células Tom⁺. (B) Caracterización de las diversas poblaciones de células hepáticas Tom⁺ en relación con su expresión de CD44 y CD31. Derecha, gráficos de barras con la comparación estadística entre los grupos experimentales. *p<0.05; vs. Ctrl; t-student; n=3.

5.11. Efecto del oligonucleótido IMT504 sobre los pericitos GLAST⁺ de la

médula ósea trazados con Wnt1

Nuestros datos sugieren que células progenitoras estromales GLAST⁺ de la médula ósea trazados con Wnt1 son movilizados por sangre periférica después de una lesión hepática y son reclutados en el hígado, diferenciándose posteriormente en células endoteliales o HLCs. Asimismo, pudimos constatar que un daño hepático prolongado y repetitivo genera un fenotipo hipomórfico en los pericitos GLAST⁺ trazados con Wnt1 que persisten en la médula ósea, los que crecen formando colonias con una densidad celular menor a la normal, probablemente a causa de una menor capacidad de proliferación.

Nos preguntamos entonces si sería posible inducir mediante tratamiento con moléculas pequeñas una mayor capacidad de proliferación y movilización de esos pericitos en el contexto lesiones hepáticas. De esta manera podría ser posible repoblar la médula ósea con pericitos pro-regenerativos y realizar un mayor aporte de esas células para la regeneración tisular. Con este fin, se aplicó el ODN IMT504, con conocido efecto movilizador de MSCs a partir de la médula ósea, en animales *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* tratados con TAA durante dos semanas.

Cepas	Célula de origen	Contribución con médula ósea	Contribución con el hígado sano	Contribución con el hígado enfermo/Movilización	
				Fibrosis	Hepatectomía
Wnt1 ^{Cre} (Jackson #003829 and 022501) x Rosa26 ^{tdTomato} (Jackson #007909)	Cresta neural	Células de Schwann no mielinizantes	Células de Schwann no mielinizantes	↑ células de Schwann no mielinizantes; ↑ complejidad de los procesos	ND
Wnt1 ^{Cre} (Jackson #003829) x Rosa26 ^{tdTomato} (Jackson #007909)	ND	ND	 Raras HLCs Raras células endoteliales en el parénquima 	 ↑↑ HLCs ↑↑ células endoteliales en el parénquima 	ND
Wnt1 ^{Cre} (Jackson #022501) x Rosa26 ^{tdTomato} (Jackson	Progenitores estromales de médula ósea, en estadíos tempranos postnatales	 Abundantes células estromales perisinusoidales Menos abundantes células estromales periarteriolares 	 Raras HLCs Raras células endoteliales en el parénquima 	 ↑ movilización de células estromales de la médula ósea hacia sangre periférica 	 ↑ HLCs ↑ movilización de células estromales de la médula ósea hacia sangre periférica
#007909) GLAST ^{CreERT2} (Mori et al., 2006) x Rosa26 ^{tdTomato} (Jackson #007908) (Tx P2)				 ↑↑ HLCs ↑↑ células endoteliales en el parénquima 	
GLAST ^{CreERT2} (Mori et al., 2006) x Rosa26 ^{tdTomato} (Jackson #007908) (Tx P60)	Células estromales de la medulla ósea adulta	ND	 Aún más raras HLCs Ausencia de células endoteliales en el parénquima 	 ↑ HLCs ↑ células endoteliales en el parénquima 	ND
GLAST ^{CreERT2} (Mori et al., 2006) x Rosa26 ^{tdTomato} (Jackson #007908) (No Tx)	ND	ND	ND	 Raras HLCs No hay contribución con células endoteliales en el parénquima 	ND
PLP1 ^{CreERT} (Doerflinger et al., 2003) x Rosa26 ^{tdTomato} (Jackson #007908) (Tx P2)	Células de Schwann tempranas postnatales y/o precursores de células de Schwann	ND	Células de Schwann no mielinizantes	 ↑ células de Schwann no mielinizantes No hay contribución con HLCs ni células endoteliales en el parénquima 	ND
Nestin ^{Cre} (Jackson #003771) x Rosa26 ^{tdTormato} (Jackson #007908)	Cresta neural y progenitores de células progenitoras endoteliales	ND	Células de Schwann no mielinizantes y células endoteliales	 ↑ células de Schwann no mielinizantes y células endoteliales en puentes fibróticos No hay contribución con HLCs ni células endoteliales en el parénquima 	ND
PLP1 ^{CreERT2} (Leone et al., 2003) x Rosa26 ^{YFP} (Srinivas et al., 2001) (Tx E12.5)	Células circulantes por sangre periférica (embriones)	Contribución esporádica con células estromales (embriones)	Contribución esporádica con células estromales y rara con HLCs (embriones)	ND	ND
Sox10 ^{CreERT2} (Laranjeira et al., 2011) x Rosa26 ^{YFP} (Srinivas et al., 2001) (Tx E9.5)	Cresta neural	Contribución esporádica con células estromales (embriones)	Contribución esporádica con células estromales (embriones)	ND	ND

Tabla 1: Cepas utilizadas y principales resultados de nuestros estudios de trazado de linaje. BM: medulla ósea. ND: no determinado. ↑: aumento en la incidencia.

Unas 18 horas más tarde se obtuvieron las fracciones de BMMCs y PBMCs y se cuantificaron cambios en la incidencia de las células trazadas. Interesantemente, se observó un aumento de 20 veces en la proporción de pericitos GLAST⁺ trazados con Wnt1 tanto en sangre periférica como en médula ósea, en animales tratados o no con TAA (Figura 41A). Como no es posible que un tipo celular se divida 20 veces en tan sólo 18 horas, estos resultados sugieren una activación de novo del promotor de Wnt1 en células no previamente trazadas. Como la vía de señalización de Wnt1 suele asociarse a proliferación y/o a la movilización de células progenitoras, aplicamos un ensayo de CFU-Fs empleando la fracción de BMMCs de ratones Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom} en similares condiciones experimentales. Nuestros resultados sugieren que IMT504 induce un aumento significativo en el número de CFU-F Tom⁺ (Figura 41B). También IMT504 indujo un aumento en la incidencia de colonias Tom⁻ pero únicamente animales tratados con TAA 2w + IMT504 en comparación con animales TAA 2w. Interesantemente, por efecto del ODN se observó un aumento en la proporción de colonias Tom⁺ en los frascos analizados, en comparación con aquellos en los que fueron sembradas muestras obtenidas de animales Control o TAA 2w (Figura 41C). Esto podría sugerir un efecto inductor específico de IMT504 sobre la proliferación de progenitores trazados con Wnt1 y/o una activación de novo del promotor de Wnt1 en células progenitoras que empezarían a ser trazadas debido al efecto del tratamiento. Alternativamente, otra subpoblación de células previamente trazadas con Wnt1 podría adquirir la capacidad de formar colonias. Los resultados de estudios de citometría de flujo sugieren estas dos últimas posibilidades.

Interesantemente, como se muestra en la Figura 41D, el tratamiento con IMT504 permitiría recuperar la capacidad de formar de colonias densas a partir de pericitos Tom⁺ de la médula

ósea, lo que podría ser relevante para posibles aplicaciones futuras pro-regenerativas de tejidos dañados. Estos datos nos permiten concluir que el ODN IMT504 induce un aumento en la capacidad de proliferación de células mesenquimales formadoras de colonias, e implicaría entre estos mecanismos una posible señalización mediada por Wnt1.

5.12. Efecto de IMT504 sobre la proliferación de MSCs obtenidas a partir de pericitos trazados con Wnt1

Aunque el hecho de que IMT504 permita recuperar la capacidad de los pericitos trazados con Wnt1 de formar colonias mesenquimales densas sugiera una mayor capacidad de proliferación de estas células progenitoras, nos propusimos verificar esa hipótesis aplicando ensayos de proliferación sobre MSCs a P4 obtenidas a partir de colonias de pericitos Tom⁺. Estas células fueron o no incubadas con IMT504 durante 2 horas. El pre-tratamiento con IMT504 redujo en un 300% el tiempo de duplicación celular en comparación con el grupo control (Figura 42).

Este efecto pro-proliferativo de IMT504 sobre las MSCs Tom⁺ fue también confirmado mediante análisis de la expresión del marcador de proliferación Ki67. Notablemente, a diferencia del control la mayor parte de las células inducidas fueron Ki67⁺ (Figura 43). El aumento en la proporción de células en ciclo celular explicaría al menos en parte la reducción del tiempo de duplicación de las MSCs.



Figura 41: Efecto de IMT504 sobre pericitos trazados con Wnt1 en la médula ósea y en sangre periférica. (A) Gráfico de barras mostrando comparaciones estadísticas entre el porcentaje de pericitos Tom⁺ en ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* en las fracciones de BMMCs y PBMCs en animales control naïve, TAA 2 semanas, naïve inyectados con IMT504 y TAA 2 semanas e inyectados con IMT504. *p<0.05; ^{σσ}p<0.01; ***,^{σσσ,δδδ}p<0.001; ****,^{σσσ,δδδδ}p<0.0001; prueba de comparaciones múltiples de Tukey. N=3 (B) Gráfico de barras mostrando comparaciones estadísticas entre el número de CFU-Fs en los mismos grupos experimentales de A. (C) Gráfico de barras mostrando comparaciones estadísticas entre la fracción de las CFU-F Tom⁺. (B,C) ^σp<0.05; **,^{σσ}p<0.01; ****,^{σσσσ,δδδδ}p<0.0001; prueba de comparaciones multiples de Dunn. En (B) las comparaciones estadísticas para cada condición fueron hechas para las colonias Tom⁺ y Tom⁻, por separado. (D) Microfotografías de colonias representativas de colonias Control, TAA 2w y TAA 2w + IMT504. Barra de escala: 50 μm. n=6.



Figura 42: Efecto de IMT504 sobre el tiempo de duplicación de MSCs Tom⁺. MSCs fueron derivadas a partir de colonias Tom⁺ obtenidas a partir de muestras de BMMCs de ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}*. Gráfico de barras mostrando comparaciones estadísticas entre células inducidas o no con IMT504. *p<0.05; vs. Ctrl; Mann-Whitney; n=3.



Figura 43: Efecto de IMT504 sobre la expresión de Ki67 en MSCs de la médula ósea trazadas con Wnt1. Histogramas representativos de análisis de citometría de flujo de P4 MSCs trazadas con Wnt1 marcadas con Ki67, y gráfico de barras mostrando comparaciones estadísticas a partir de estos análisis entre los grupos experimentales. **p<0.01; vs control; t-student; n=6.

5.13. Efecto de IMT504 sobre la movilización de MSCs obtenidas a partir de pericitos trazados con Wnt1

Para determinar el efecto de IMT504 sobre la movilización de células derivadas de pericitos de médula ósea trazados con Wnt1, se realizó un ensayo de herida. Este ensayo es empleado para estudiar fenómenos de migración en lámina. Las MSCs Tom⁺ inducidas con IMT504 tuvieron una mejor capacidad de cerrar la herida que en el control desde las 8 horas post-raspaje, con una herida abierta del 40% de la superficie original (Figura 44A). Mientras que en el caso de las células no tratadas, el porcentaje de herida abierta se mantuvo alrededor del 60% en todos los tiempos analizados (Figura 44B).



Figura 44: Efecto de IMT504 sobre la movilización de MSCs de la médula ósea trazadas con Wnt1. (A) Microfotografías representativas de MSCs trazadas con Wnt a tiempo 0, en el momento del raspaje, tiempo 8, 12 y 16 horas luego del daño. (B) Gráfico de barras mostrando comparaciones estadísticas del porcentaje de herida abierta entre los grupos experimentales. ****p<0.0001; vs. Control; prueba de comparaciones múltiples de Tukey; n=6.

5.14. Efecto del IMT504 sobre la activación del promotor de Wnt1 en pericitos de la médula ósea no trazados previamente

Nuestros resultados previos sugieren que IMT504 tiene un efecto inductor de la activación de Wnt1 sobre BMMCs. Nos preguntamos entonces si este ODN podría estimular la actividad del promotor de Wnt1 en pericitos Tom⁻ presentes en colonias de cultivos primarios de BMMCs. Con ese fin, BMMCs de ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* fueron sembradas en placas de 6 pocillos y luego de formarse las colonias se cuantificaron las colonias totales, distinguiendo aquellas que contenían o no células Tom⁺. Posteriormente se incubaron los cultivos durante dos horas con IMT504. Durante los siguientes dos días, se cuantificaron a diario las colonias utilizando el mismo criterio. En esas condiciones, no se observó un cambio significativo en el porcentaje de colonias Tom⁺ (Figura 45).



Figura 45: Efecto de IMT504 sobre la fracción de colonias con células que expresan Tom. Gráfico de barras mostrando comparaciones estadísticas del porcentaje de colonias Tom⁺ en cultivos de BMMCs obtenidas de ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* previo a la inducción con IMT504 y a 1 y 2 días post-inducción, los datos fueron normalizados a día 0. No se observaron diferencias significativas; n=6.

Este resultado nos permite concluir que IMT504 no induciría la activación de Wnt1 en células progenitoras formadoras de colonias que no habían sido previamente trazadas con ese marcador. Por lo tanto, es probable que este ODN actúe sobre otra subpoblación celular presente en la fracción de BMMCs que, en condiciones control, carecería de las propiedades de células progenitoras mesenquimales.

5.15. Efecto de IMT504 sobre la diferenciación *in vivo* de pericitos de la médula ósea trazados con Wnt1 en células tipo-hepatocitos y células endoteliales

Con el objetivo de analizar si el ODN IMT504 podría inducir un mayor reclutamiento de pericitos trazados con Wnt1 hacia el sitio de lesión hepática y por lo tanto un aumento en la incidencia de HLCs Tom⁺, se obtuvieron BMMCs provenientes de ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* de animales a los que se aplicó o no IMT504 unas 2 horas antes. Estas BMMCs fueron aplicadas por vía sistémica en ratones nude previamente hepatectomizados y los animales fueron sacrificados al día siguiente del tratamiento. Mediante citometría de flujo, se analizó la incidencia de células Tom⁺ en la fracción parenquimatosa. Se encontró un aumento en la proporción relativa de células Tom⁺ en los hígados de animales hepatectomizados, siendo esta diferencia aún mayor que la encontrada en animales trasplantados con BMMCs que no fueron previamente inducidas con el oligo (Figura 46A). No se encontró diferencia significativa en la proporción relativa de células CD44⁺ Albúmina⁺ Tom⁺ entre las muestras de animales que recibieron BMMCs pre-tratadas o no *in vivo* con IMT504; sin embargo, la fracción de células CD44⁺ Fibronectina⁺ Tom⁺ en la condición del ODN aumentó un 50% en relación con el control (Figura 46B,C). Este resultado sugiere que

de seguir diferenciándose los pericitos en HLCs, estos probablemente aumentarían en una proporción similar.

Luego se analizaron también por citometría de flujo muestras correspondientes a la fracción de células no parenquimatosas. Se encontró un aumento de más del doble en la proporción de células Tom⁺ en los animales hepatectomizados, en comparación con los animales control (Figura 47A). De la fracción Tom⁺ se analizó la coexpresión con marcadores endoteliales y se observó que en los animales hepatectomizados, la fracción doble positiva fue significativamente mayor en la condición en que se utilizó el ODN (Figura 47B). Estos datos sugieren que el oligonucleótido IMT504 estimula un mayor reclutamiento hacia el hígado de pericitos trazados con Wnt1 y una mayor contribución con células parenquimáticas y/o no parenquimáticas en un modelo de regeneración hepática.



Figura 46: Efecto in vivo del IMT504 sobre el reclutamiento y la diferenciación en HLCs de pericitos Wnt1⁺. Izquierda, gráficos de puntos representativos de análisis de citometría de flujo obtenidos a partir de muestras correspondientes a la fracción parenquimática del hígado de animales atímicos control o hepatectomizados, trasplantados el día anterior con BMMCs de ratones Wnt1 inducidos o no con IMT504. (A) Se indica, con una línea de trazo continuo, la nube de células Tom⁺ cuyo perfil de expresión se muestra en (B-C). Derecha, gráficos de barras y análisis estadísticos de comparaciones entre animales control y hepatectomizados. *p<0.05; ***,^{σσσ}p<0.001; ****,^{σσσσ,δδδδ}p<0.0001. *vs. Ctrl; ^σvs. HEP Ctrl; ^δvs. IMT504. (A) Prueba de comparaciones múltiples de Dunn; (B,C) Prueba de comparaciones múltiples de Tukey. n=3.



Figura 47: Efecto de IMT504 sobre el reclutamiento y la diferenciación en células endoteliales de pericitos Wnt1⁺. Izquierda, gráficos de puntos representativos de análisis de citometría de flujo de células de la fracción no parenquimática del hígado obtenidas de animales atímicos control o hepatectomizados, que fueron trasplantados el día anterior con BMMCs obtenidas de ratones Wnt1 inducidos o no con IMT504 durante dos horas. (A) Se indica con una línea de trazo continuo la fracción de células Tom⁺. (B) Proporción relativa de células Tom⁺ en relación con su expresión de CD44 y CD31. Derecha, gráficos de barras con la comparación estadística entre los grupos experimentales. *,^σp<0.05; **,^{σσ}p<0.01; ****,^{σσσσ,δδδδ}p<0.0001. *vs. Ctrl; ^σvs. HEP Ctrl; ^δvs. IMT504. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey; n=3.

Discusión

6. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, mediante el empleo de diversas cepas de ratones doble-transgénicos y modelos de lesión hepática, se analizó la contribución con ese órgano de la cresta neural y de pericitos GLAST⁺ Wnt1⁺ movilizados a partir de la médula ósea. Por primera vez, se muestran evidencias de que durante la fibrogénesis tiene lugar un proceso de gliosis. La activación de células de la glía residentes, que corresponden al fenotipo de células de Schwann no mielinizantes, quedó evidenciada tanto por un aumento en su incidencia como también en la complejidad de sus procesos celulares; esto último fue asociado con un aumento en la longitud total de los mismos.

Asimismo es de destacar que nuestros estudios realizados durante estadíos embrionarios sugieren que la cresta neural no contribuiría con otras células en el hígado y en la médula ósea que no sean células de la glía residentes. Durante el proceso de inervación de esos órganos, en estadíos perinatales del desarrollo, SCPs invaden los mismos facilitando el crecimiento de axones. Más tempranamente en el desarrollo, observamos que células que a E12,5 expresan PLP1 (un marcador de SCPs) pueden ser localizadas en el torrente sanguíneo de algunos animales, así como también en el hígado y la médula ósea. Un fenómeno similar fue previamente reportado por el grupo de Hideyuki Okano en otras cepas reporteras de la cresta neural⁴⁴. Sin embargo, un análisis meticuloso (utilizando embriones heterocigotas para el transgen que incluye la secuencia Cre) y el empleo de diversas cepas de ratones nos permitió comprobar que la contribución de células trazadas con la médula ósea o el hígado durante estadíos embrionarios fue rara y esporádica,

encontrándose células con aspecto estromal en la minoría de los animales analizados de cada cepa.

Por otra parte, la literatura actual sugiere que en relación con las NCDCs sólo las SCPs mantendrían propiedades de células progenitoras *in vivo* luego del nacimiento. Como nuestros resultados de trazado de SCPs, en ratones PLP1 y Nestina, mostraron no haber contribución de células trazadas con HLCs o células endoteliales presentes en zonas del parénquima, se descartaría por lo tanto un origen neural de esos tipos celulares *in vivo*.

Como se mencionó anteriormente, en este trabajo se muestran por primera vez evidencias de activación de células de la glía residente hepática durante el desarrollo de la fibrosis. Este aspecto no pudo ser dilucidado anteriormente debido a que las células de glía comparten muchos marcadores con las células estrelladas hepáticas, que poseen un origen mesenquimal⁸⁷ y ejercen un rol fundamental en el desarrollo de la fibrosis⁶. En nuestros estudios pudimos constatar que las células gliales residentes del tejido hepático carecen de expresión de Desmina, un tipo de filamentos intermedios característico de células estrelladas hepáticas.

Entre los signos de activación de células de la glía, se observó un incremento en la incidencia de células de Schwann no mielinizantes que únicamente puede deberse a proliferación de las mismas células de la glía hepáticas, ya que pericitos GLAST⁺ presentes en la médula ósea no son origen de las mismas. Por otro lado, mediante análisis de Sholl y cuantificación de la extensión total de los procesos de las células de la glía pudimos constatar un aumento en la ramificación de estas células. Estos signos permiten confirmar alteraciones en células de la glía, como consecuencia de su reacción frente a estímulos fibrogénicos.

El tejido hepático está inervado por el plexo celíaco (simpático) y el nervio vago (parasimpático)^{88,89}. Mientras que en humanos las terminales nerviosas alcanzan el espacio Disse, en el ratón se encuentran principalmente alrededor de la vena porta y no entran en proximidad con los hepatocitos. Se demostró que la actividad nerviosa en el hígado regula el volumen y el flujo sanguíneo, el flujo de bilis y el metabolismo de los carbohidratos y los lípidos. Durante la fibrogénesis hepática, la inervación se altera aunque los procesos implicados permanecen en gran parte desconocidos⁸⁸. En hígados pre-cirróticos y cirróticos humanos se observa una prominente inervación en los tractos portales y septos fibróticos, mientras que la inervación parenquimatosa se reduciría en los hígados pre-cirróticos y estaría ausente en los nódulos regenerativos que caracterizan a una cirrosis establecida⁹⁰. Varios informes sugieren que la actividad nerviosa simpática aumenta la liberación de glucosa y lactato, así como el flujo y la secreción biliar, y su hiperactividad ha sido asociada con la gravedad de la cirrosis^{88,89,91,92}. En los puentes fibróticos se ha reportado un aumento en la densidad de las fibras colinérgicas⁹³, y esta característica estaría involucrada en la activación de células estrelladas hepáticas y en la inducción de la fibrogénesis⁹⁴. Nuestros datos muestran un aumento en la incidencia de células de Schwann no mielinizantes en los hígados fibróticos: las mismas fueron encontradas con mayor densidad en algunos puentes fibróticos e invadiendo zonas periféricas del parénguima hepático. La activación de la glía estaría probablemente involucrada en la remodelación del sistema nervioso del hígado y con la hiperactividad nerviosa descrita durante la fibrogénesis: por ejemplo, su proliferación y migración podría inducir un recrecimiento axonal dentro de los puentes fibróticos, y su cambio en el fenotipo podría estar relacionado con su funcionalidad, por ejemplo mediante la secreción de citoquinas proinflamatorias que podrían inducir la hiperactividad axonal⁹⁵.

Una mejor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la activación y proliferación de células presentes en el hígado, como la glía, que puedan modular el proceso de síntesis y acumulación de la MEC sería relevante para una eficiente reparación hepática.

Aún más interesante resultó el hecho de que en el hígado fibrótico de animales *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* se encontraron HLCs y células endoteliales Tom⁺, de origen extrahepático. Consistentemente, en estadíos postnatales tempranos de ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* algunas células estromales no neurales expresaron el gen reportero. Y en la médula ósea adulta se encontró contribución de células Tom⁺ con células de Schwann no mielinizantes y con dos tipos de pericitos, previamente involucrados en la regulación de nichos de células madre hematopoyéticas: células estromales perisinusoidales (mucho más abundantes) y células estromales periarteriales⁸⁶. Asimismo, por primera vez reportamos la presencia en el torrente circulatorio del adulto de células estromales trazadas con Wnt1, tanto en animales sin tratar como en aquellos en los que se indujeron lesiones hepáticas. Estas células expresaron los siguientes marcadores: GLAST, CD44, Fibronectina, Desmina y Vimentina.

En los dos modelos *in vivo* de fibrogénesis hepática pudimos constatar una reducción de la incidencia de estos pericitos GLAST⁺ CD44⁺ Fibronectina⁺ Desmina⁺ Vimentina⁺ trazados con Wnt1 en la médula ósea, y un aumento proporcional en sangre periférica, lo que sugiere su movilización hacia la sangre. Asimismo, tanto en ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* como en otros que permiten analizar la contribución de células derivadas de pericitos GLAST⁺ (*GLAST^{CreERT2};Rosa26^{Tom}*), se observó una incidencia y patrón de localización similar, común a ambos casos, de células endoteliales intralobulillares y de HLCs. Mientras que en hígados

sanos estas dos poblaciones celulares presentaron una incidencia rara, la misma aumentó muy significativamente con el desarrollo de la fibrosis hepática. Se localizaron en diversas áreas dentro de un mismo corte, con una distribución aleatoria en distintos lóbulos hepáticos. Estas evidencias, junto con nuestros datos que sugerirían la movilización de pericitos GLAST⁺ CD44⁺ por sangre periférica sugieren que estas células endoteliales y las HLCs trazadas en el hígado fibrótico derivarían de esos pericitos presentes en la médula ósea.

El análisis del fenotipo de las células trazadas con GLAST (TxP2) en la médula ósea adulta resultó exclusivamente en el trazado de células estromales, tanto perisinusoidales como periarteriales, en la frecuencia esperada. Este resultado es similar al encontrado en ratones Wnt1, con la excepción de que en los animales GLAST las células de glía no resultaron trazadas. Sin embargo, la incidencia de células trazadas en animales *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* fue 10 veces menor a aquella obtenida en ratones GLAST. Este resultado, junto al dato de la incidencia similar de HLCs y células endoteliales intralobulillares encontrada en los hígados fibróticos de ratones *Wnt1 constituirían una subpoblación de las células que resultaron* trazadas en ratones GLAST. Por lo tanto, ambas cepas permitirían identificar las mismas subpoblaciones celulares en los hígados lesionados.

La posibilidad de que una misma población de pericitos originara fenotipos tan distantes embriológicamente (HLCs vs. células endoteliales; endodermo vs. mesodermo) sugeriría que esas células estromales debieran tener propiedades de células progenitoras. Y como era esperable el ensayo de CFU-Fs nos permitió constatar que células estromales trazadas

en ratones Wnt1 tienen la capacidad de formar colonias, confirmando sus propiedades de células progenitoras: entre las BMMCs, las células trazadas constituyeron entre un 10 y un 15% de las colonias obtenidas en esos ensayos. Por otra parte, el hecho de que en el hígado fibrótico la incidencia de HLCs y células endoteliales Tom⁺ sea mayor a la encontrada en el control sugiere que las células que las originan tienen una mayor capacidad proliferativa y/o presentan una mayor capacidad de contribuir con células hepáticas que la de los propios hepatocitos endodérmicos, lo que sería esperable en células progenitoras. Algo similar fue observado en ratones sometidos a hepatectomías, en un contexto que no involucra alteraciones debidas a efectos tóxicos sobre los hepatocitos y/o las células endoteliales.

Según se conoce actualmente por la literatura las células endoteliales se originan habitualmente en células endoteliales progenitoras. Nuestros resultados evidencian que estas últimas células no son trazadas en ratones Wnt1, sino que las células movilizadas tienen el fenotipo de pericitos GLAST⁺. Ya anteriormente Ubil *et al.* sugieron un origen mesenquimal de algunas células endoteliales después de una lesión⁹⁶. Por otra parte, como fue revisado recientemente por Chopra y colaboradores, BM-MSC incubadas en condiciones de cultivos de células endoteliales trazadas con Wnt1 y GLAST en el hígado y su notorio aumento después de una lesión crónica, sugieren su origen en una subpoblación de pericitos trazados con Wnt1 presentes en la médula ósea.

Otra evidencia de que las HLCs y células endoteliales trazadas con Wnt1 después de una lesión hepática se originan en pericitos de la médula ósea es el hecho de que ambos tipos celulares mantienen la expresión de marcadores estromales aún después de su

diferenciación. En este sentido, nuestros datos podrían constituir una pieza clave para comprender la abundante literatura que demuestra la capacidad de diferenciación de MSCs en hepatocitos^{37,98}. Podríamos estar estudiando una subpoblación de pericitos trazados con Wnt1 que presentaría una gran plasticidad del desarrollo, muy posiblemente conservada evolutivamente en vertebrados, pudiendo quizá ser capaces de contribuir con distintos tipos celulares según el tipo de señales proveniente de los tejidos afectados por una lesión significativa y/o en remodelación, hacia los que serían reclutados. Queda aún por ser analizado si estos pericitos coinciden constituyen el mismo tipo celular cuya movilización a partir de la médula ósea fue previamente descripta en condiciones de estrés⁴¹ y que las células progenitoras multipotentes adultas⁹⁹, aunque el hecho de no expresar Sca-1 sugiere que se trataría de subpoblaciones diferentes.

Pudimos confirmar la capacidad de los pericitos GLAST⁺ trazados con Wnt1 de ser reclutados hacia el hígado lesionado y diferenciarse en HLCs y células endoteliales mediante experimentos de trasplante de BMMCs obtenidas de ratones Wnt1 en ratones atímicos hepatectomizados. En esos experimentos, se obtuvo un aumento de más de 10 veces en la contribución de células trazadas que coexpresan Albúmina y marcadores estromales (y una contribución significativamente mayor de células endoteliales que en animales control). Estos datos nos permiten concluir que pericitos trazados con Wnt1 se reclutan hacia el hígado lesionado pudiendo contribuir con esas distintas poblaciones celulares.

Algunos estudios, no basados en estrategias de trazado de linaje y por lo tanto poco concluyentes, sugieren que células neuroectodérmicas circulantes por la sangre periférica de pacientes adultos promoverían la fibrosis hepática y el cáncer¹⁰⁰. Sin embargo, nuestros

resultados sugieren que en una fibrosis hepática establecida las células trazadas con Wnt1 o GLAST no contribuyen con miofibroblastos. Esto no descarta que aquello pudiera suceder en estadíos muy avanzados de fibrosis o cirrosis, y/o específicamente en humanos. En ratones, algunos de los miofibroblastos que contribuyen con la fibrogénesis hepática podrían derivar de pericitos GLAST⁻ y/o Wnt1⁻ presentes en la médula ósea¹⁰⁰. Por lo tanto, nuestros resultados permiten, por primera vez, descartar una contribución significativa de pericitos GLAST⁺ con miofibroblastos en el desarrollo de la fibrosis hepática¹⁰¹. Queda pendiente de analizar la posibilidad de que pericitos Wnt1⁺ GLAST⁺ contribuyan con el cáncer.

Estudios previos sugieren que derivados de origen neuroectodérmico (cresta neural) como otros de origen mesodérmico contribuirían con células en los cultivos de MSCs^{38,42}. Teniendo en cuenta el potencial de diferenciación de precursores de células de Schwann (SCPs)⁶⁹, uno de los linajes de NCDCs, que pueden colonizar diversos órganos durante el proceso de inervación y diferenciarse en glia, melanocitos¹⁰², neuronas parasimpáticas¹⁰³, neuronas entéricas¹⁰⁴, células estromales de los dientes y/o eventualmente de médula ósea, con capacidad de generar cultivos de MSCs¹⁰⁵ y la notable plasticidad de células de la cresta neural¹⁰⁶, habíamos previamente hipotetizado que la capacidad hepatogénica de los cultivos de MSCs podría deberse más a la presencia de NCDCs en los mismos que a células de origen mesodérmico¹⁰⁷. Además, otros investigadores habían obtenido células AFP⁺ en cultivos de células del nervio ciático¹⁰⁸. Sin embargo, el hecho de que en las médulas óseas de embriones de ratones Sox10 y Wnt1 con buen índice de recombinación, en estadíos de desarrollo significativos, se observara una rara y esporádica contribución con células

resultados sugieren que los SCPs, que son reclutados en la médula ósea y el hígado durante el proceso de inervación de esos órganos, no contribuyen con HLCs ni células endoteliales luego de lesiones hepáticas. Por lo tanto, la evidencia presente sugiere la existencia de una subpoblación de pericitos GLAST⁺ en la médula ósea que expresa de modo consistente (en todos los animales analizados) y *de novo* Wnt1 en estadíos tempranos postnatales. Sería esta subpoblación de células estromales las que muy probablemente origine posteriormente las células correspondientes a los dos tipos de células estromales (perisinusoidales y periarteriolares) previamente descriptas en la médula ósea. Por otro lado, el hecho de que no haya habido contribución de células trazadas con Nestina con HLCs o células endoteliales en hígados fibróticos sugeriría que sólo las células estromales perisinusoidales podrían contribuir con el hígado luego de una lesión. Para llegar a esta conclusión nos basamos en que las células estromales periarteriales expresan niveles mucho más altos de Nestina que las células perisinusoidales⁵⁶ y por lo tanto estarían trazadas en los ratones *Nestina^{Cre};Rosa26^{Tom}*.

Ha sido previamente reportado que algunas poblaciones de células de la médula ósea participan en la regeneración del hígado. Nuestros resultados sugieren la existencia de una fuente nueva e independiente de células de la médula ósea con esa funcionalidad, que depende de la fracción estromal. Los pericitos GLAST⁺ trazados con Wnt1 obtenidos de la médula ósea o la sangre periférica de ratones no lesionados y hepatectomizados no coexpresaron marcadores de progenitores de granulocitos y monocitos, los que se sabe que pueden fusionarse con hepatocitos en una situación de estrés¹⁰⁹. También fueron negativos para los marcadores de células madre hematopoyéticas, de las que se reportó previamente

su reclutamiento en el hígado y contribución con otras subpoblaciones de HLC en el contexto de la regeneración del hígado¹¹⁰.

Aunque la incidencia de HLCs Tom⁺ observada en ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* y *GLAST^{CreERT2};Rosa26^{Tom}* en el hígado fibrótico y en el hígado regenerado sea limitada, el hecho de que pericitos GLAST⁺ de la médula ósea trazados con Wnt1 puedan expandirse y que gracias a la aplicación de IMT504 y/o de otras sustancias similares pueda recuperarse la capacidad de proliferación propia de esas células progenitoras sugiere que de por sí dichas células podrían ejercer un efecto anti-fibrótico y contribuir significativamente con la regeneración tisular a largo plazo. De hecho, en diversos trabajos se ha visto que la aplicación de MSCs reduce y/o previene la progresión de la fibrosis hepática en diversas especies de vertebrados^{107,111}.

Finalmente, en ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* se observó que la aplicación de IMT504 indujo un aumento notable en la fracción de células estromales Tom⁺ tanto en la médula ósea como en sangre periférica, lo que estaría asociado a la inducción de la actividad del promotor de Wnt1 en células que no habían expresado previamente este marcador. Estas células no tendrían el fenotipo de células progenitoras aunque algunas de ellas podrían adquirirlo. Datos de los ensayos de CFU-Fs sugieren una mayor proliferación de células progenitoras estromales trazadas con Wnt1, las que contribuyen con un mayor porcentaje de las colonias en ensayos de CFU-Fs y recuperan la capacidad de formar colonias densas. Por otro lado, IMT504 indujo una reducción significativa del tiempo de duplicación de MSCs obtenidas a partir de pericitos GLAST⁺ trazados con Wnt1 y un aumento considerable en la proporción de células en división celular. Asimismo, se observó que el tratamiento con

IMT504 induce un aumento en la movilización de estas mismas MSCs. Ambos fenómenos podrían estar asociados con una posible inducción en la expresión de Wnt1 específicamente en células estromales progenitoras GLAST⁺ Wnt1⁺. Por último, en modelos de regeneración se observó que la inducción de IMT504 sobre células de médula ósea de animales *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* indujo un mayor reclutamiento de células Tom⁺ hacia el hígado lesionado y un aumento en la incidencia de células endoteliales trazadas, al día siguiente al trasplante. Asimismo, nuestros datos sugieren que podría darse un aumento de hasta un 50% en la incidencia de HLCs debida al efecto de IMT504 sobre pericitos trazados con Wnt1.

En resumen, este trabajo de tesis sugiere que durante la fibrogénesis hepática tiene lugar un proceso de gliosis, el que muy posiblemente influya en la evolución de esta patología. Asimismo, sugieren que luego de una lesión hepática células progenitoras estromales GLAST⁺ de la médula ósea trazadas con Wnt1 se movilizarían por sangre periférica y originarían células endoteliales y HLCs, pero no miofibroblastos. Estrategias que induzcan la movilización y repoblación de esos progenitores estromales en la médula ósea, como la utilización de IMT504, podrían resultar en mecanismos que promuevan la regeneración tisular en lugar de su cicatrización, mejorando así la funcionalidad del tejido. Además, nuestros resultados sugieren que estos pericitos pueden ser cultivados como MSCs *in vitro*, lo que haría posible expandir un *pool* de células hepatogénicas y generar hepatocitos con mayor eficiencia, con posibles aplicaciones futuras en terapias de regeneración tisular.

Eventos similares podrán ser analizados a futuro en el contexto de otras patologías que podrían causar la movilización de estas células derivadas de pericitos Wnt1⁺ GLAST⁺ de la médula ósea. El empleo de IMT504 podría servir también para promover también

fenómenos pro-regenerativos en diversos tipos de traumatismos tales como lesiones de médula espinal o infartos de miocardio. De confirmarse estos hallazgos en otros modelos y especies, nos encontraríamos posiblemente ante un mecanismo que habría sido establecido evolutivamente y conservado en mamíferos, en que un tipo celular presente en la médula ósea podría responder a diversas señales ambientales pudiendo su diferenciación ser dirigida hacia linajes celulares relevantes funcionalmente.

Conclusiones
7. CONCLUSIONES

7.1. Contribución de células trazadas con Wnt1 al perfil celular del hígado durante el desarrollo

Entre E12 y E14, algunas células trazadas con PLP1 son reclutadas hacia el hígado por vía sistémica y allí contribuyen principalmente con células estromales y raramente con HLCs. En el mismo lapso de tiempo, algunas células trazadas con Wnt1 y Sox10 contribuyen esporádicamente con células estromales en el hígado. Estas células no tienen su origen en la cresta neural.

En estadíos perinatales, SCPs colonizan el hígado y contribuyen únicamente con células de la glía residentes. En el ratón adulto, normalmente persisten pocas células de la glía en ese órgano y se localizan alrededor de venas porta hepáticas.

En el hígado adulto de animales *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}*, raramente células Tom⁺ presentan un fenotipo de HLCs o de células endoteliales.

7.2. Contribución de células trazadas con Wnt1 con la fracción de células no parenquimáticas del hígado durante la fibrogénesis hepática

En el hígado fibrótico, independientemente de la etiología, aumenta la incidencia de células de la glía y sus procesos celulares ganan en complejidad y longitud, todas señales que permiten hablar de un proceso de gliosis. Esta activación de células de la glía podría influir sobre el avance del proceso fibrogénico.

Asimismo, la incidencia de células endoteliales trazadas con Wnt1, de origen extrahepático y no neural, aumenta significativamente con la fibrogénesis y su localización preferencial cambia hacia zonas del parénquima hepático.

SCPs postnatales no contribuyen con células endoteliales en el hígado fibrótico.

7.3. Contribución de células trazadas con Wnt1 a la fracción de células parenquimáticas hepáticas durante la fibrogénesis hepática

En el hígado fibrótico de animales $Wnt1^{Cre}$; $Rosa26^{Tom}$ aumenta la incidencia de HLCs trazadas, de origen extrahepático. Estas HLCs expresan HNF4 α y Albúmina y son morfológicamente indistinguibles de hepatocitos de origen endodérmico.

SCPs postnatales no contribuyen con HLCs durante la fibrogénesis hepática.

7.4. Contribución de células trazadas con Wnt1 con células de la medula

ósea

En la médula ósea adulta, la mitad de las células trazadas con Wnt1 son células estromales perisinusoidales (la gran mayoría de ellas) o periarteriolares, de origen no neural.

7.5. Pericitos GLAST⁺ de médula ósea, una fuente de células endoteliales y de HLCs

El transportador de glutamato y aspartato GLAST se expresa en el linaje de las células de la glía periférica. Sin embargo, en el hígado fibrótico las células trazadas con GLAST durante estadíos postnatales no contribuyen con células de la glía ni con células en el hígado.

En la médula ósea, células trazadas con GLAST contribuyen con células estromales de los mismo tipos y en proporción similar, aunque con una incidencia 10 veces mayor, a la encontrada en animales *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}*.

En el hígado fibrótico, células trazadas con GLAST contribuyen con HLCs y con células endoteliales Tom⁺ de localización parenquimática, en un número similar al encontrado en ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}*. Por lo tanto, en el hígado fibrótico los animales *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* y *GLAST^{CreERT2};Rosa26^{Tom}* permitirían trazar la misma población celular.

7.6. Las células trazadas con Wnt1 movilizadas de la médula ósea son pericitos GLAST⁺ con propiedades de células mesenquimales formadoras de colonias

Durante la fibrogénesis temprana, células estromales CD44⁺ GLAST⁺ trazadas con Wnt1 presentes en la médula ósea se movilizan hacia la sangre periférica.

Durante el desarrollo postnatal, pericitos Wnt1⁺ de origen no neural contribuyen con una subpoblación de progenitores con propiedades de células mesenquimales formadoras de colonias. El tratamiento con TAA reduce el número de CFU-Fs en la médula ósea, que aún son capaces de formar colonias pero menos densas.

7.7. Contribución de pericitos de la médula ósea trazados con Wnt1 con

células del hígado en un modelo de hepatectomía parcial

Luego de una hepatectomía parcial, pericitos trazados con Wnt1 se movilizan desde la médula ósea hacia la sangre periférica. Los mismos presentan marcadores de pericitos y no expresan marcadores de células hematopoyéticas o de progenitores endoteliales. En el

hígado de ratones *GLAST^{CreERT2};Rosa26^{Tom}* hepatectomizados aumenta 20 veces la incidencia de HLCs trazadas, las que en su mayor parte coexpresan diversos marcadores estromales (CD44, Fibronectina, Desmina y Vimentina), lo que también sugiere su origen en pericitos.

7.8. Diferenciación *in vivo* de pericitos trazados con Wnt1 en HLCs y células endoteliales

BMMCs obtenidas de animales *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* y trasplantadas en ratones atímicos hepatectomizados son reclutadas en mayor número que en animales control y contribuyen con una mayor proporción de HLCs y células endoteliales Tom⁺. Estos HLCs Tom⁺ coexpresan marcadores estromales de médula ósea como CD44, Vimentina y/o Fibronectina.

7.9. Efecto del oligonucleótido IMT504 sobre células estromales de la médula ósea trazadas con Wnt1

La aplicación del ODN IMT504 induciría la activación de novo de Wnt1 en pericitos presentes en la médula ósea y en sangre periférica. Sin embargo, este ODN no induce la activación de Wnt1 en CFU-Fs Tom⁻ obtenidas a partir de ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}*. Por otra parte, IMT504 induce una mayor proliferación de pericitos trazados con Wnt1 con propiedades de células mesenquimales formadoras de colonias. Su aplicación en animales con fibrogénesis hepática temprana permite recuperar la propiedad de generar colonias estromales densas en CFU-Fs trazadas con Wnt1. *In vitro*, IMT504 induce una mayor proliferación y migración de MSCs obtenidas a partir de pericitos trazados con Wnt1. Consistentemente, BMMCs obtenidas de ratones *Wnt1^{Cre};Rosa26^{Tom}* previamente tratados

con IMT504 resulta en una mayor reclutamiento de células Tom⁺hacia el hígado de ratones atímicos hepatectomizados y en una mayor contribución de HLCs y/o células endoteliales Tom⁺ que en controles no tratados con este ODN.

En resumen (Figura 48), la fibrogénesis induce un proceso de gliosis, afectando a la población de células de Schwann no mielinizantes residente del hígado. La lesión hepática, tanto en distintos modelos de fibrosis hepática como en una hepatectomía parcial, induce la movilización y reclutamiento hacia el hígado de una subpoblación de pericitos GLAST⁺ de la médula ósea trazados con Wnt1. En el hígado, estas células, que son también trazadas en ratones *GLAST^{CreERT2}; Rosa26Tom*, se diferencian en HLCs y células endoteliales intralobulillares. El ODN IMT504 podría inducir una reactivación del promotor de Wnt1 en pericitos de la médula ósea lo que explicaría al menos en parte su mayor capacidad proliferatoria y de movilización celular. El aumento en el número de CFU-Fs y un efecto sobre su movilización, reclutamiento y diferenciación en HLCs y/o células endoteliales podría tener relevancia terapéutica para la fibrosis hepática.



Figura 48: Resumen gráfico de los resultados obtenidos. Esquema con los principales datos sobre la gliosis observada en el hígado fibrótico y sobre la contribución de pericitos Wnt1⁺ GLAST⁺ de la médula ósea con el hígado adulto sano o en modelos de fibrosis o regeneración; con análisis del efecto del tratamiento con el ODN IMT504.

Bibliografía

8. BIBLIOGRAFÍA

- 1. Pawlina, W. Ross. Histología: texto y atlas. 7ª ed. Lippincott Williams and Wilkins. Wolters Kluwer Health, Baltimore. 2015.
- 2. Brobeck JR. Best and Taylor's Physiological basis of medical practice. 13th Edition. Lippincott Williams and Wilkins, San Diego. 2012.
- 3. Tortora GJ, Derrickson B. Principles of Anatomy and Physiology. 13th ed. Wiley, Edwardsville. 2012.
- 4. Porth C. Fisiopatología salud-enfermedad: Un enfoque conceptual. 7^{ma} ed. Editorial Panamericana, Buenos Aires. 2006.
- 5. Sadler TW. Langman's Medical Embryology. 1st edition. Lippincott Williams and Wilkins. Wolters Kluwer Health, Baltimore. 2012.
- 6. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. J Clin Invest. 2005;115(2):209-218.
- Khalili M, Burman BE. Enfermedad del hígado | Fisiopatología de la enfermedad. 7th ed. McGraw-Hill Interamericana Editores SA, México. 2015.
- 8. Ohtani O, Ohtani Y. Lymph circulation in the liver. *Anat Rec (Hoboken)*. 2008;291(6):643-652.
- 9. Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(10):836-847.
- 10. Hall JE. Guyton E Hall Tratado De Fisiologia Médica. *Elsevier*. 2011.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
- 12. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK. Liver cirrhosis. In: *The Lancet*. 2014; 383(9930):1749-61.
- 13. Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, et al. CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med*. 2006;12(6):671-676.
- 14. Pinzani M, Rombouts K. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. *Dig Liver Dis*. 2004;36(4):231-242.
- 15. Wu C-S, Piao X-X, Piao D-M, Jin Y-R, Li C-H. Treatment of pig serum-induced rat liver fibrosis with Boschniakia rossica, oxymatrine and interferon-alpha. *World J Gastroenterol*. 2005;11(1):122-126.
- 16. Hui AY, Friedman SL. Molecular basis of hepatic fibrosis. *Expert Rev Mol Med*. 2003;5(5):1-23.
- 17. Guicciardi ME, Gores GJ. Apoptosis: A mechanism of acute and chronic liver injury. *Gut*. 2005; 54(7):1024-33.

- 18. Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut*. 2002;50(4):571-581.
- 19. Kent G, Gay S, Inouye T, Bahu R, Minick OT, Popper H. Vitamin A-containing lipocytes and formation of type III collagen in liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73(10):3719-3722.
- 20. Lieber CS. Pathogenesis and treatment of alcoholic liver disease: progress over the last 50 years. *Rocz Akad Med Bialymst*. 2005;50:7-20.
- 21. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem*. 2000;275(4):2247-2250.
- 22. Heidelbaugh JJ, Bruderly M. Cirrhosis and chronic liver failure: part I. Diagnosis and evaluation. *Am Fam Physician*. 2006;74(5):756-762.
- 23. Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH. The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. *J Clin Pathol*. 1978;31(5):395-414.
- 24. Ambrose AM, DeEDS F, Rather LJ. Toxicity of thioacetamide in rats. *J Ind Hyg Toxicol*. 1949;31(3):158-161.
- 25. Neal RA, Halpert J. Toxicology of thiono-sulfur compounds. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1982;22(1):321-339.
- 26. Oren R, Dotan I, Papa M, et al. Inhibition of experimentally induced cirrhosis in rats by hypothyroidism. *Hepatology*. 1996;24(2):419-423.
- 27. Li X, Benjamin IS, Alexander B. Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. *J Hepatol*. 2002;36(4):488-493.
- 28. Miyoshi H, Rust C, Roberts PJ, Burgart LJ, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. *Gastroenterology*. 1999;117(3):669-677.
- 29. Matsubara T, Tanaka N, Sato M, et al. TGF-β-SMAD3 signaling mediates hepatic bile acid and phospholipid metabolism following lithocholic acid-induced liver injury. *J Lipid Res*. 2012;53(12):2698-2707.
- 30. Palmeira CM, Rolo AP. Mitochondrially-mediated toxicity of bile acids. *Toxicology*. 2004;203(1-3):1-15.
- 31. Mitchell C, Willenbring H. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nat Protoc*. 2008;3(7):1167-1170.
- 32. Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol.* 1931;12: 186–202.

- 33. Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(10):836-847.
- 34. Joseph NM, Mukouyama Y-S, Mosher JT, et al. Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to Schwann cells. *Development*. 2004;131(22):5599-5612.
- 35. Simoes-Costa M, Bronner ME. Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development*. 2015; 142(2):242-5.
- 36. Le Lièvre CS, Le Douarin NM. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *J. Embryol Exp Morphol.* 1975;34(1):125-54.
- 37. Morikawa S, Mabuchi Y, Niibe K, et al. Development of mesenchymal stem cells partially originate from the neural crest. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;379(4):1114-1119.
- 38. Wislet-Gendebien S, Laudet E, Neirinckx V, et al. Mesenchymal stem cells and neural crest stem cells from adult bone marrow: characterization of their surprising similarities and differences. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(15):2593-2608.
- 39. Prasajak P, Leeanansaksiri W. Developing a new two-step protocol to generate functional hepatocytes from Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells under hypoxic condition. *Stem Cells Int*. 2013;2013:1-10.
- 40. Puglisi MA, Tesori V, Lattanzi W, et al. Therapeutic implications of mesenchymal stem cells in liver injury. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:860578.
- 41. Kucia MJ, Wysoczynski M, Wu W, Zuba-Surma EK, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood. *Stem Cells*. 2008;26(8):2083-2092.
- 42. Takashima Y, Era T, Nakao K, et al. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell*. 2007;129(7):1377-1388.
- 43. Mendes SC, Robin C, Dzierzak E. Mesenchymal progenitor cells localize within hematopoietic sites throughout ontogeny. *Development*. 2005;132(5):1127-1136.
- 44. Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, et al. Ontogeny and multipotency of neural crestderived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell*. 2008;2(4):392-403.
- 45. Gomez C, Burt-Pichat B, Mallein-Gerin F, et al. Expression of Semaphorin-3A and its receptors in endochondral ossification: Potential role in skeletal development and innervation. *Dev Dyn.* 2005;234(2):393-403.
- 46. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001;226(6):507-520.
- 47. Krampera M, Marconi S, Pasini A, et al. Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone*. 2007;40(2):382-390.

- 48. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147.
- 49. Sato Y, Araki H, Kato J, et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*. 2005;106(2):756-763.
- 50. Silva G V., Litovsky S, Assad JAR, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*. 2005;111(2):150-156.
- 51. Clark JK, O'keefe A, Mastracci TL, Sussel L, Matise MP, Kucenas S. Mammalian Nkx2.2+ perineurial glia are essential for motor nerve development. *Dev Dyn*. 2014;243(9):1116-1129.
- 52. Mirsky R, Woodhoo A, Parkinson DB, Arthur-Farraj P, Bhaskaran A, Jessen KR. Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. In: *Journal of the Peripheral Nervous System*. ; 2008.
- 53. Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Madrid JF, et al. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol Histopathol*. 2009;24(7):909-969.
- 54. Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, et al. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*. 2013;502(7473):637-643.
- 55. Goritz C, Dias DO, Tomilin N, Barbacid M, Shupliakov O, Frisen J. A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science* 2011;333(6039):238-242.
- 56. Asada N, Kunisaki Y, Pierce H, et al. Differential cytokine contributions of perivascular haematopoietic stem cell niches. *Nat Cell Biol*. 2017;19(3):214-223.
- 57. Kretzschmar K, Watt FM. Lineage Tracing. Cell. 2012;148(1-2):33-45.
- 58. Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, Li L, Luo L. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis*. 2007;45(9):593-605.
- 59. Zong H, Espinosa JS, Su HH, Muzumdar MD, Luo L. Mosaic analysis with double markers in mice. *Cell*. 2005;121(3):479-492.
- 60. Madisen L, Zwingman TA, Sunkin SM, et al. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci*. 2010;13(1):133-140.
- 61. Kretzschmar K, Watt FM. Lineage Tracing. Cell. 2012;148(1-2):33-45.
- 62. Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;237(3):752-757.
- 63. Metzger D, Ali S, Bornert J-M, Chambon P. Characterization of the amino-terminal transcriptional activation function of the human estrogen receptor in animal and

yeast cells. J Biol Chem. 1995;270(16):9535-9542.

- 64. Littlewood TD, Hancock DC, Danielian PS, Parker MG, Evan GI. A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res.* 1995;23(10):1686-1690.
- 65. Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;237(3):752-757.
- 66. Lewis AE, Vasudevan HN, O'Neill AK, Soriano P, Bush JO. The widely used Wnt1-Cre transgene causes developmental phenotypes by ectopic activation of Wnt signaling. *Dev Biol*. 2013;379(2):229-234.
- 67. Mantamadiotis T, Lemberger T, Bleckmann SC, et al. Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nat Genet*. 2002;31(1):47-54.
- 68. Carozzi V, Marmiroli P, Cavaletti G. Focus on the role of Glutamate in the pathology of the peripheral nervous system. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2008;7(4):348-360.
- 69. Aquino JB, Sierra R. Schwann cell precursors in health and disease. *Glia*. 2018;66(3):465-476.
- 70. Doerflinger NH, Macklin WB, Popko B. Inducible site-specific recombination in myelinating cells. *genesis*. 2003;35(1):63-72.
- 71. Aquino JB, Hjerling-Leffler J, Koltzenburg M, Edlund T, Villar MJ, Ernfors P. In vitro and in vivo differentiation of boundary cap neural crest stem cells into mature Schwann cells. *Exp Neurol*. 2006;198(2):438-449.
- 72. Hernando Insúa A, Montaner AD, Rodriguez JM, et al. IMT504, the prototype of the immunostimulatory oligonucleotides of the PyNTTTTGT class, increases the number of progenitors of mesenchymal stem cells both in vitro and in vivo: potential use in tissue repair therapy. *Stem Cells*. 2007;25(4):1047-1054.
- 73. Zorzopulos J, Opal SM, Hernando-Insúa A, et al. Immunomodulatory oligonucleotide IMT504: Effects on mesenchymal stem cells as a first-in-class immunoprotective/immunoregenerative therapy. *World J Stem Cells*. 2017;9(3):45.
- 74. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol*. 2002;20(1):709-760.
- 75. Elias F, Flo J, Lopez RA, Zorzopulos J, Montaner A, Rodriguez JM. Strong cytosineguanosine-independent immunostimulation in humans and other primates by synthetic oligodeoxynucleotides with PyNTTTTGT motifs. *J Immunol*. 2003;171(7):3697-704.
- 76. Crespo Yanguas S, Cogliati B, Willebrords J, et al. Experimental models of liver fibrosis. *Arch Toxicol*. 2016;90(5):1025-1048.
- 77. Miyoshi H, Rust C, Roberts PJ, Burgart LJ, Gores GJ. Hepatocyte apoptosis after bile

duct ligation in the mouse involves Fas. *Gastroenterology*. 1999;117(3):669-677.

- 78. Rodríguez-Garay EA, Agüero RM, Pisani G, Trbojevich RA, Farroni A, Viglianco RA. Rat model of mild stenosis of the common bile duct. *Res Exp Med (Berl)*. 1996;196(2):105-116.
- 79. Rodríguez-Garay EA, Agüero RM, Pisani G, Trbojevich RA, Farroni A, Viglianco RA. Rat model of mild stenosis of the common bile duct. *Res Exp Med (Berl)*. 1996;196(2):105-116.
- 80. Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, et al. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *Br J Surg.* 2008;95(5):646-656.
- 81. Chang M-L, Yeh C-T, Chang P-Y, Chen J-C. Comparison of murine cirrhosis models induced by hepatotoxin administration and common bile duct ligation. *World J Gastroenterol*. 2005;11(27):4167-4172.
- 82. Iwaisako K, Jiang C, Zhang M, et al. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(32):E3297-E3305.
- 83. Park KC, Park JH, Jeon JY, et al. A new histone deacetylase inhibitor improves liver fibrosis in BDL rats through suppression of hepatic stellate cells. *Br J Pharmacol*. 2014;171(21):4820-4830.
- 84. Mitchell C, Willenbring H. A reproducible and well-tolerated method for 2/3 partial hepatectomy in mice. *Nat Protoc*. 2008;3(7):1167-1170.
- 85. Mori T, Tanaka K, Buffo A, Wurst W, Kühn R, Götz M. Inducible gene deletion in astroglia and radial glia-A valuable tool for functional and lineage analysis. *Glia*. 2006;54(1):21-34.
- 86. Asada N, Kunisaki Y, Pierce H, et al. Differential cytokine contributions of perivascular haematopoietic stem cell niches. *Nat Cell Biol*. 2017;19(3):214-223.
- 87. Asahina K, Tsai SY, Li P, et al. Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development. *Hepatology*. 2009;49(3):998-1011.
- 88. Baik SJ, Kim TH, Yoo K, et al. Decreased S100B expression in chronic liver diseases. *Korean J Intern Med*. 2017;32(2):269-276.
- 89. Jensen KJ, Alpini G, Glaser S. Hepatic nervous system and neurobiology of the liver. *Compr Physiol*. 2013;3(2):655-665.
- 90. Lee JA, Ahmed Q, Hines JE, Burt AD. Disappearance of hepatic parenchymal nerves in human liver cirrhosis. *Gut*. 1992;33(1):87-91.
- 91. Ruddell RG, Mann DA, Ramm GA. The function of serotonin within the liver. *J Hepatol*. 2008;48(4):666-675.
- 92. Henriksen JH, Møller S, Ring-Larsen H, Christensen NJ. The sympathetic nervous system in liver disease. *J Hepatol*. 1998;29(2):328-341.

- 93. Akiyoshi H, Terada T. Mast cell, myofibroblast and nerve terminal complexes in carbon tetrachloride-induced cirrhotic rat livers. *J Hepatol*. 1998;29(1):112-119.
- Lam H-B, Yeh C-H, Cheng K-C, Hsu C-T, Cheng J-T. Effect of cholinergic denervation on hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *Neurosci Lett*. 2008;438(1):90-95.
- 95. Campana WM. Schwann cells: activated peripheral glia and their role in neuropathic pain. *Brain Behav Immun*. 2007;21(5):522-527.
- 96. Ubil E, Duan J, Pillai ICL, et al. Mesenchymal-endothelial transition contributes to cardiac neovascularization. *Nature*. 2014;514(7524):585-590.
- 97. Chopra H, Hung MK, Kwong DL, Zhang CF, Pow EHN. Insights into Endothelial Progenitor Cells: Origin, Classification, Potentials, and Prospects. *Stem Cells Int*. 2018;2018:9847015.
- 98. Piryaei A, Valojerdi MR, Shahsavani M, Baharvand H. Differentiation of bone marrowderived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells on nanofibers and their transplantation into a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model. *Stem Cell Rev.* 2011;7(1):103-118.
- 99. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002;418(6893):41-49.
- 100. Labat ML, Milhaud G, Pouchelet M, Boireau P. On the track of a human circulating mesenchymal stem cell of neural crest origin. *Biomed Pharmacother*. 2000;54(3):146-162.
- 101. Greenhalgh SN, Iredale JP, Henderson NC. Origins of fibrosis: pericytes take centre stage. *F1000Prime Rep.* 2013;5:37.
- 102. Adameyko I, Lallemend F, Aquino JB, et al. Schwann Cell Precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell*. 2009;139(2):366-379.
- Dyachuk V, Furlan A, Shahidi MK, et al. Neurodevelopment. Parasympathetic neurons originate from nerve-associated peripheral glial progenitors. *Science*. 2014;345(6192):82-87.
- 104. Uesaka T, Nagashimada M, Enomoto H. Neuronal differentiation in Schwann cell lineage underlies postnatal neurogenesis in the enteric nervous system. J Neurosci. 2015;35(27):9879-9888.
- 105. Kaukua N, Shahidi MK, Konstantinidou C, et al. Glial origin of mesenchymal stem cells in a tooth model system. *Nature*. 2014;513(7519):551-554.
- 106. Dupin E, Le Douarin NM. The neural crest, a multifaceted structure of the vertebrates. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2014;102(3):187-209.
- 107. Fiore EJ, Mazzolini G, Aquino JB. Mesenchymal stem/stromal cells in liver fibrosis: recent findings, old/new caveats and future perspectives. *Stem Cell Rev Reports*. 2015;11(4):586-597.

- 108. Widera D, Heimann P, Zander C, et al. Schwann cells can be reprogrammed to multipotency by culture. *Stem Cells Dev*. 2011;20(12):2053-2064.
- 109. Willenbring H, Bailey AS, Foster M, et al. Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. *Nat Med*. 2004;10(7):744-748.
- 110. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*. 2000;6(11):1229-1234.
- 111. Aquino JB, Bolontrade MF, García MG, Podhajcer OL, Mazzolini G. Mesenchymal stem cells as therapeutic tools and gene carriers in liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Gene Ther*. 2010;17(6):692-708.