



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

OPTIMIZACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA
INMORTALIZAR Y OBTENER HEPATOCITOS
FUNCIONALES CON TRANSPOSONES PIGGYBAC

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

KAREN IVETTE DE LEÓN BARRERA

DIRECTORES D E TESIS:

DR. LUIS FERNANDO COVARRUBIAS
ROBLES

DRA. CELINA GARCÍA MELÉNDREZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.,2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, proyecto de Ciencia básica No. 239891), del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA IA200915, DGAPA IN209813 y DGAPA IN213416), así como con una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, proyecto 131031).

Quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México por ofrecer preparación de excelencia a jóvenes como yo, deseando que cada día sea mejor y dé oportunidad a mucha más gente de formarse dentro de ésta. También agradezco a la Facultad de Ciencias, UNAM, por darme bases sólidas para mi vida en general y sobre todo mi vida profesional.

Agradezco al Instituto de Biotecnología, UNAM, por ser un gran lugar para aprender ciencia y para hacerla. Igualmente agradezco al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada por su excelente asesoría, y a la Unidad de Bioterio por su gran servicio.

A mi tutor, el Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles, por brindarme su asesoría y apoyo durante el desarrollo del proyecto, por darme la oportunidad y confianza de pertenecer a su grupo de trabajo.

A mi tutora, la Dra. Celina García Meléndrez por su asesoría y apoyo invaluable. Agradezco todo el tiempo que dedicó a instruirme en el laboratorio y su infinita paciencia.

Al grupo de trabajo del Dr. Luis Covarrubias, Verónica, Sergio, Karen, Gladys, por siempre darme su apoyo cuando lo necesité.

A mis sinodales, la Dra. Mayra Furlan Magaril, el Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez y la Dra. María Luisa Escobar Sánchez por tomarse el tiempo de leer mi trabajo y por sus apreciables observaciones.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mi familia, por estar siempre ahí, porque gracias a la educación y amor que me dieron he logrado concluir esta etapa.

A Teresita, por ser mi pilar, mi ejemplo a seguir, porque siempre has buscado la manera de darme todo lo que he necesitado y has sabido entenderme. A Alex por todo el apoyo y por haberme exigido, ya que así yo he luchado siempre por llegar más lejos. A Axel por siempre escucharme y apoyarme. A mi tía Yiyis y a Pablito por apoyarme tanto durante la carrera. Los quiero muchísimo a todos.

Te agradezco Ale, por todo el apoyo, la comprensión y el amor. Porque vivimos juntas todo el proceso de la tesis y lo logramos juntas. Y vamos por más.

A mis amigos, porque son una parte importante de mi vida y sin ustedes, sin sus consejos, sin los buenos ratos, no sería la Karen de hoy. Gracias Osvaldo, Tatty, Bren, Maru, Eli, Karen “mala” y Diego.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	1
I. RESUMEN.....	2
II. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Generalidades del hígado	3
2.2. Características de los hepatocitos.....	6
2.3. Modelos de cultivo de hepatocitos <i>in vitro</i>	7
2.4. Inmortalización de hepatocitos.....	7
2.5. Oncogenes E6/E7	8
2.6. Métodos de transfección.....	9
2.7. Liberación hidrodinámica de genes.....	10
2.8. Transposones.....	11
III. ANTECEDENTES.....	13
3.1. Inmortalización de hepatocitos humanos con E6/E7.....	13
3.2. Transfección <i>in vivo</i> con transposones PiggyBac	14
IV. JUSTIFICACIÓN.....	15
V. HIPÓTESIS.....	16
VI. OBJETIVOS	16
6.1. Objetivo general	16
6.2. Objetivos particulares.....	16
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	17
7.1. Transposones y plásmidos.....	17
7.2. Ratones.....	18
7.3. Inyección hidrodinámica.....	18
7.4. Eficiencia de transfección <i>in vivo</i>	18
7.5. Determinación de bioluminiscencia en diferentes órganos	19
7.6. Cortes histológicos de hígado	19

7.7.	Análisis de las proteínas reporteras en cortes de hígado	20
7.8.	Aislamiento y cultivo de hepatocitos	20
7.9.	Aislamiento y cultivo de células ductales biliares.....	22
VIII.	RESULTADOS.....	23
8.1.	Eficiencia de transfección del hígado <i>in vivo</i>	23
8.2.	Porcentaje y localización de células transfectadas en cortes histológicos.....	25
8.3.	Evaluación de la integración de los transposones y tiempo que permanecen en las células hepáticas.....	28
8.4.	Estandarización de un protocolo para cultivar células hepáticas	34
8.5.	Aislamiento y cultivo de ductos biliares	40
IX.	DISCUSIÓN	46
9.1.	Porcentaje de transfección y co-transfección	46
9.2.	Duración de las células transfectadas <i>in vivo</i>	47
9.3.	Cultivo de células hepáticas	50
9.4.	Aislamiento de células ductales y condiciones de cultivo.....	52
X.	CONCLUSIONES	56
XI.	PERSPECTIVAS	57
XII.	REFERENCIAS	58
XIII.	ANEXO.....	62
	Anexo 1. Soluciones utilizadas en este trabajo	62

ABREVIATURAS

AFP: α -fetoproteína
cHS4: sitio hipersensitivo de pollo-4
CK8: citoqueratina 8
CK18: citoqueratina 18
CYP450: citocromo P450
EGF: factor de crecimiento epidérmico
EGFP: proteína verde fluorescente potenciada
EYFP: proteína amarilla fluorescente potenciada
HGF: factor de crecimiento de hepatocitos
HITI: integración dirigida independiente de homología
HNF4: factor nuclear de hepatocito 4
HPV: virus del papiloma humano
hTERT: telomerasa transcriptasa inversa humana
Luc2: gen de la luciferasa de luciérnaga *Photinus pyralis*
MEK: proteína cinasa activada por mitógenos
OSM: oncostatina M
PFA: paraformaldehído
Rb: proteína retinoblastoma
rtTA: transactivador reverso de tetraciclina
SB: *Sleeping beauty*
STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3
SV40 Tag: antígeno T grande del simio 40
TGF α : factor de crecimiento transformante α
TIR: repetición terminal invertida
TSD: duplicaciones del sitio blanco
U0126: 1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis[2-aminofeniltio] butadieno, inhibidor de MEK1 y MEK2

I. RESUMEN

El hígado es un órgano encargado de funciones vitales para el organismo como el procesamiento de nutrientes, producción de proteínas, desintoxicación, entre otras. Debido a la gran variedad de procesos en los que está involucrado y la importancia de éstos, las enfermedades hepáticas resultan en gran morbilidad y mortalidad. Las funciones que lleva a cabo el hígado son realizadas por la unidad funcional que son los hepatocitos, células epiteliales con características particulares que las hacen altamente especializadas y que difícilmente proliferan en condiciones normales.

El estudio del hígado puede hacerse mediante modelos de hepatocitos *in vitro*, sin embargo, la baja disponibilidad y variabilidad observada en cultivos primarios supone un gran obstáculo para la investigación. Con la finalidad de superar las limitaciones de utilizar cultivos primarios se han desarrollado líneas celulares provenientes de tumores o mediante la transfección de genes transformantes, dichas líneas celulares conservan diferentes características específicas de hepatocitos. Sin embargo, en las líneas reportadas actualmente no se ha encontrado la actividad de la enzima catalasa y el peroxisoma.

En el presente trabajo se propuso establecer un sistema que permita inmortalizar células hepáticas de ratón, precursoras o diferenciadas, con el uso de un transposón que contiene los genes E6/E7 del virus del papiloma humano usando un sistema inducible que permite regular los niveles de los genes, por tanto, la proliferación, de esta manera una vez amplificada la población se puedan diferenciar hepatocitos que conserven características específicas de sus contrapartes *in vivo*.

II. INTRODUCCIÓN

El hígado es considerado un centro regulador que se encarga del procesamiento de nutrientes, entre los que destacan las grasas, la producción de proteínas, la homeostasis energética y la desintoxicación. Todas estas funciones son esenciales para la homeostasis del organismo, por tanto, ante la falla de alguna de ellas, se ocasionan enfermedades hepáticas que a menudo resultan en una gran morbilidad y mortalidad (Miyajima et al., 2014).

Dentro de las enfermedades hepáticas, las más prevalentes son hepatitis viral B, hepatitis viral C y hepatopatías alcohólicas, las cuales son extremadamente costosas en términos de sufrimiento humano, visitas al médico/hospital y pérdida prematura de productividad (HEPAMAP). Por ejemplo, la cirrosis como resultado de hepatopatía alcohólica en 2010 fue responsable de 493, 300 muertes a nivel mundial (Rhem et al., 2013). Por otro lado, la hepatitis viral mata alrededor de 1.4 millones de personas en el mundo cada año (World Health Organization, 2016-2021).

2.1. Generalidades del hígado

El hígado de ratón abarca la región subdiafragmática entera, a diferencia de la localización en los humanos que sólo abarca el lado derecho de la cavidad abdominal. Los cuatro lóbulos que lo conforman en ambas especies son denominados como derecho, medio, izquierdo y caudado. A diferencia de los humanos, en el ratón los ligamentos que atraviesan y delimitan los lóbulos no son evidentes (**Figura 1a y 1b**; Rogers et al., 2012).

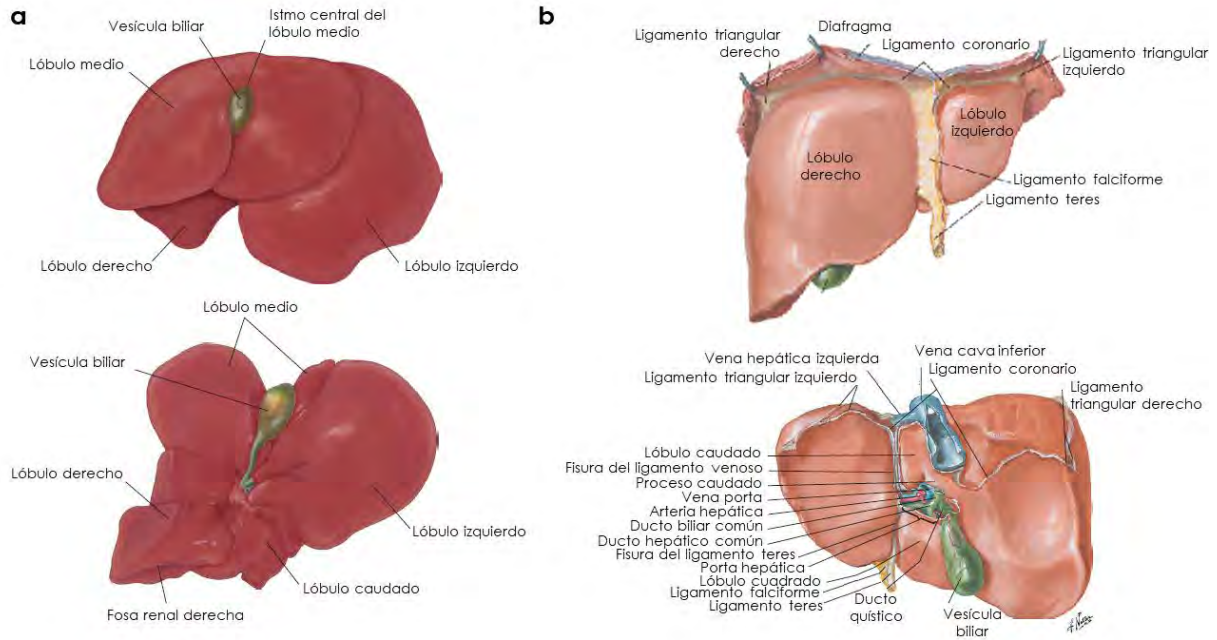


Figura 1. Anatomía del hígado. El hígado de ratón (a) tiene cuatro lóbulos: izquierdo, derecho, medio y caudado. La vesícula biliar se localiza debajo del istmo central del lóbulo medio. El hígado humano (b) también está formado por cuatro lóbulos: derecho, izquierdo, cuadrado, y caudado. Además, se pueden distinguir varios ligamentos asociados a la superficie (Modificado de Rogers et al., 2012).

El hígado tiene una estructura tridimensional compleja formada de varios tipos celulares. En general, pueden clasificarse como células parenquimales y células no parenquimales. Los hepatocitos son las células parenquimales que forman la parte estructural del hígado y componen la mayoría de la masa celular del hígado. Las células no parenquimales incluyen otros tipos celulares como las células Kupffer, células endoteliales, sinusoidales, células estrelladas, fibroblastos periportales y células dendríticas hepáticas (**Figura 2a**; Tsung et al., 2011).

La unidad funcional que compone al hígado se conoce como lobulillo hepático. Un lobulillo tiene forma hexagonal y está formado por placas de hepatocitos, las cuales irradian de la vena central en el centro del hexágono. Los hepatocitos que se encuentran adyacentes están unidos por uniones estrechas. Además, las uniones estrechas delimitan el canaliculo biliar. Los hepatocitos en una placa están expuestos en ambos lados a capilares, llamados sinusoides. En

cada vértice del lobulillo está la tríada portal, compuesta de una arteria, una vena y un ducto biliar rodeado de tejido conectivo (**Figura 2b**; Godoy et al., 2013).

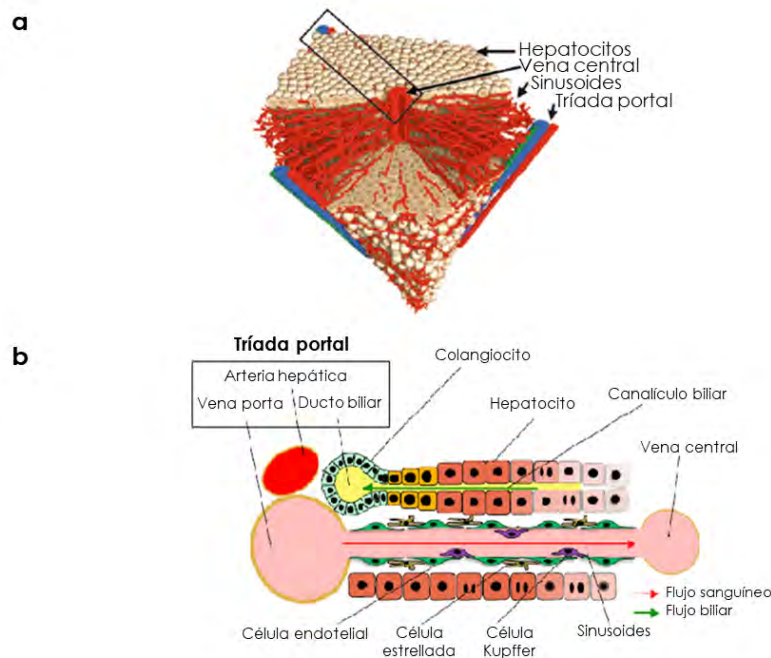


Figura 2. Esquema del lobulillo hepático. Estructura tridimensional del lobulillo hepático. El lobulillo hepático está centrado alrededor de una ramificación de la vena centrilobular, y está limitado por triadas portales formadas de una ramificación de la vena porta, la arteria hepática, y el ducto biliar (a) (Modificado de Colnot y Perret, 2011). La tríada portal formada de la vena hepática, arteria hepática, y el ducto biliar. El flujo sanguíneo de la vena porta y la arteria hepática se dirige hacia la vena central a través de los sinusoides que se encuentran entre las placas de hepatocitos, los sinusoides se forman de células endoteliales sinusoidales fenestradas. La bilis producida por los hepatocitos es colectada en los ductos biliares a través de los canalículos biliares. Las células Kupffer se localizan en el lado luminal de los sinusoides, mientras las células estrelladas se encuentran cercanas a las células endoteliales (b) (Modificado de Miyajima et al., 2014).

La dirección del flujo sanguíneo en cada lobulillo se da de la periferia al centro. En el lobulillo pueden distinguirse tres zonas, de acuerdo con el suministro de oxígeno y nutrientes que recibe cada una. La zona 1 es el área periportal donde la sangre de las arterias hepáticas y las venas portales entra, la zona 3 es el área central del lobulillo localizada alrededor de la vena central,

donde la oxigenación es pobre, y la zona 2 está localizada entre la zona 1 y 3 (Tsung et al., 2011).

Los hepatocitos son las células que llevan a cabo las funciones metabólicas del hígado, por lo que éstas se especializan en función de su posición a lo largo del eje porto-central del lobulillo hepático (Colnot et al., 2011).

2.2. Características de los hepatocitos

Los hepatocitos tienen una topología única: su dominio apical (membrana plasmática canalicular) forma un sistema tubular por la conexión de dos hepatocitos mediante uniones estrechas, este sistema es llamado canalículo y representa las ramificaciones de los canales biliares (Godoy et al., 2013).

El dominio basolateral de los hepatocitos está formado por la membrana plasmática sinusoidal y lateral. En el lado sinusoidal, los hepatocitos están en contacto directo con el plasma sanguíneo pues los capilares sinusoidales son fenestrados y rodeados por una lámina basal discontinua. En la membrana lateral, los hepatocitos están en contacto con hepatocitos vecinos a través de desmosomas y uniones comunicantes. Esta arquitectura permite que la membrana basolateral participe en un intenso intercambio de solutos con el plasma sanguíneo (Godoy et al., 2013).

En el hígado de una rata la poliploidización inicia después del destete. En ratas adultas, alrededor del 10% de los hepatocitos son diploides, 70% son tetraploides, y 20% son octaploides. De la porción poliploide de hepatocitos, entre el 20-30% son binucleados (ya sea $2 \times 2n$ o $2 \times 4n$).

La poliploidización es una estrategia general de crecimiento celular que permite un incremento en el rendimiento metabólico, masa celular, y tamaño de la célula, siendo una alternativa a la división celular.

Se ha sugerido que un genoma poliploide puede dar protección contra la expresión dominante de oncogenes mutados, como una medida de seguridad que puede ser útil para un órgano involucrado en la desintoxicación de drogas como lo es el hígado (Guidotti et al., 2013). Además, la presencia de poliploidía avanzada es generalmente considerada un indicativo de diferenciación terminal con una disminución proliferativa (Celton-Morizur et al., 2010).

2.3. Modelos de cultivo de hepatocitos *in vitro*

Los modelos de cultivo de hepatocitos *in vitro* son sistemas de gran utilidad en la investigación fundamental y en varias áreas de aplicación. En particular los hepatocitos primarios aparecen como el modelo más cercano al del hígado *in vivo*. Los hepatocitos recién aislados exhiben la estructura típica y la mayoría de las funciones de sus contrapartes *in vivo*, sin embargo, pierden sus dominios membranales especializados, así como las uniones intercelulares y sus canalículos biliares, cuando se encuentran en suspensión, llevando a su muerte al paso de algunas horas. Cuando son sembrados en condiciones convencionales de cultivo, éstos forman agregados y reconstituyen estructuras similares a los canalículos biliares, pero exhiben alteraciones fenotípicas y sobreviven solamente algunos días. Además, para el caso del humano, su disponibilidad es escasa e impredecible y se acompaña de variabilidad entre cultivos (Guguen-Guillouzo y Guillouzo, 2010).

Para superar las limitaciones de los cultivos de hepatocitos primarios, se han usado líneas celulares en ensayos de hepatotoxicidad. Las líneas celulares se caracterizan por su tiempo de vida ilimitado, fenotipo estable, alta disponibilidad y fácil manejo (Godoy et al., 2013).

Algunas líneas provenientes de hepatomas retienen en parte un fenotipo diferenciado, lo cual las hace potencialmente apropiadas para la investigación. Por ejemplo, las líneas BC2 y HepaRG poseen la capacidad de diferenciar de manera reversible *in vitro* cuando han llegado a confluencia, en este estado “diferenciado” las células poseen características comparables con los hepatocitos primarios (Castell et al., 2006).

Desafortunadamente, incluso las células de hepatoma diferenciadas más prometedoras no constituyen un sistema ideal para el estudio de hepatotoxicidad, además de otros procesos llevados en el hígado, por lo que se han explorado enfoques alternativos para la obtención de hepatocitos inmortalizados que no provengan de hepatocarcinomas (Godoy et al., 2013).

2.4. Inmortalización de hepatocitos

Dado que los hepatocitos normalmente poseen un potencial de crecimiento limitado cuando son cultivados *in vitro*, se han desarrollado estrategias de inmortalización incluyendo la transformación celular con genes virales u oncogenes, células híbridas obtenidas por la fusión

de hepatocitos con líneas celulares inmortalizadas o la generación de líneas celulares hepáticas a partir de animales transgénicos (Godoy et al., 2013).

Widman y colaboradores (1979) obtuvieron híbridos con la fusión de hepatocitos de rata normales y células de hepatoma de rata, algunos de estos híbridos adquirieron funciones específicas de hígado, no presentes en las células provenientes de hepatoma, como la expresión de la enzima ornitina carbamil transferasa.

En cuanto a la generación de líneas celulares hepáticas obtenidas a partir de animales transgénicos Bulera y colaboradores (1997) generaron varias líneas celulares hepáticas provenientes de ratas transgénicas producidas por microinyección de óvulos fertilizados con el gen antígeno T grande del virus del simio 40 (SV40 Tag, por sus siglas en inglés) bajo el control del promotor del gen de albumina. Las líneas celulares obtenidas muestran morfología similar a la de los hepatocitos *in vivo*, sin embargo, ya que la línea transgénica fue desarrollada con la finalidad de estudiar el desarrollo de carcinomas hepatocelulares presenta características de células transformadas.

Oncogenes codificados en genomas virales como los genes adenovirales E1A/E1B (Woodworth et al., 1987), el SV40 Tag (Watanabe et al., 2004; Li et al., 2005) y los genes E6/E7 del virus del papiloma humano tipo 16 han sido utilizados para establecer líneas celulares derivadas de hepatocitos tanto humanos, como murinos (Clayton et al., 2005).

En general, la mayoría de las líneas celulares derivadas de hepatocitos no son tumorigénicas, pero muestran funcionalidad específica del hígado limitada o reducida (Ramboer et al., 2014).

2.5. Oncogenes E6/E7

Los oncogenes E6 y E7 se encuentran codificados en el genoma de varios tipos del virus del papiloma humano (HPV, por sus siglas en inglés “human papilloma virus”). El virus del papiloma humano es un grupo de virus de DNA de doble cadena, que carece de envoltura, poseen una cápside icosaédrica, infectan células epiteliales y son altamente prevalentes en poblaciones humanas. Los miembros de este grupo de virus cuentan con ocho o nueve marcos de lectura abierta, que codifican genes necesarios para la replicación del virus dentro de la

célula. E6 y E7 son oncogenes conocidos por su actividad en el bloqueo de la división normal de la célula hospedera.

La proteína E7, es crucial en la desregulación del ciclo celular, debido a que tiene como blanco a miembros de la familia de proteínas retinoblastoma (Rb), causando su degradación, lo que resulta en la liberación y activación del factor de transcripción E2F que dirige la expresión de genes de la fase S, permitiendo la proliferación de las células.

Mientras que la proteína E6 inhibe a p53 mediante su degradación por la vía de ubiquitinación. E6 se une a la proteína celular ubiquitina ligasa E6AP y forma un complejo trimérico con p53, llevando a la ubiquitinación y degradación proteosomal de p53. Este fenómeno evita la inhibición del crecimiento celular (Sano et al., 2016).

Debido a las características antes mencionadas, E6 y E7 han sido utilizados para la generación de líneas celulares provenientes de distintos linajes celulares. Observando que la transfección de los genes E6 y E7 provenientes de HPV tipo 16 en varios tipos celulares, permite tener líneas celulares establecidas que retienen la mayoría de los patrones de diferenciación vistos en sus tejidos de origen.

2.6. Métodos de transfección

La transfección es un procedimiento mediante el cual se introduce un ácido nucleico ajeno a las células, con el fin de producir células modificadas genéticamente. El material genético puede residir en la célula de manera estable o transitoria.

La transfección estable, se da cuando el material genético introducido se integra al genoma de la célula hospedera y la expresión del transgén se mantiene incluso después de la replicación celular. Por el contrario, los genes transfectados transitoriamente permiten la expresión de los transgenes por un periodo de tiempo limitado. Los métodos de transfección pueden ser clasificados en biológicos, químicos y físicos.

El método biológico más usado es la transfección mediada por virus, también conocida como transducción. Este método es altamente eficiente y permite alcanzar fácilmente una expresión sostenible del transgén. Sin embargo, puede resultar poco ventajoso debido a la

immunogenicidad y citotoxicidad que puede causar, además del tamaño limitado de cargo que puede transfectarse.

Entre los métodos de transfección químicos más usados se encuentran los polímeros catiónicos, el fosfato de calcio, los lípidos y los aminoácidos catiónicos. Todos estos métodos tienen un principio similar, ya que la sustancia cargada positivamente forma un complejo con el ácido nucleico, este complejo que tiene una carga positiva neta puede unirse a la membrana celular para posteriormente introducirse en la célula. La eficiencia de estos métodos se ve afectada por múltiples factores como, por ejemplo, el pH de la solución o las condiciones de la membrana celular, por lo que generalmente la eficiencia es baja.

Los métodos físicos incluyen microinyección, biolística, electroporación y transfección basada en láser. Siendo la electroporación el método físico usado más ampliamente (Kim et al., 2010).

2.7. Liberación hidrodinámica de genes

La liberación hidrodinámica de genes es un método físico que combina el uso de DNA desnudo y la presión hidrodinámica generada por la inyección rápida de un volumen grande de fluido en los vasos sanguíneos con la finalidad de liberar material genético en células parenquimales.

La aplicación más exitosa del principio de liberación hidrodinámica se ha visto en la transfección de hepatocitos murinos. El procedimiento estándar involucra una inyección en la vena lateral de la cola con un volumen de solución fisiológica equivalente al 8-10% del peso del roedor en un tiempo de entre 5-7 segundos.

Mecánicamente, una inyección con un gran volumen de solución con DNA que entra directamente en la vena cava inferior estira las fibras del miocardio más allá de la longitud óptima para la contracción, lo cual induce una congestión cardíaca, y dirige la solución inyectada al hígado de manera retrograda. Se ha visto en estudios microscópicos que las células impactadas por este método son principalmente las que se localizan en la región cercana a la vena central del lobulillo hepático (Suda et al., 2007).

2.8. Transposones

Los elementos transponibles son secuencias de DNA capaces de moverse de una localización a otra dentro de un genoma (Muñoz-López et al., 2010). Un transposón que se inserta en un gen funcional puede causar una mutación o mal funcionamiento de dicho gen (Zhao et al., 2016).

Se han identificado transposones en todos los organismos, procariotas o eucariotas. Se clasifican en dos clases: retrotransposones y transposones de DNA, de acuerdo con su mecanismo de transposición (Zhao et al., 2016).

Los retrotransposones (clase I), se copian a sí mismos, primero de DNA a ARN por medio de transcripción, después por medio de transcripción reversa de ARN a DNA otra vez, y la copia de DNA es insertada en el genoma en una nueva posición a través de un mecanismo de “copiar y pegar” (Zhao et al., 2016).

Por otro lado, los transposones de DNA se mueven mediante un mecanismo de “cortar y pegar” mediante el cual el transposón es cortado de una posición y reintegrado en otro sitio. Los transposones de DNA están formados por un gen de transposasa que está flanqueado por dos repeticiones terminales invertidas (TIRs, por sus siglas en inglés). La transposasa reconoce las TIRs para llevar a cabo la escisión del transposón de DNA, el cual es insertado en una nueva localización genómica. Una vez que se insertó el transposón, el sitio blanco de DNA puede ser duplicado, resultando en Duplicaciones del Sitio Blanco (TSDs, por sus siglas en inglés), estas duplicaciones son características de los transposones de DNA (Muñoz-López et al., 2010).

Los transposones de DNA se encuentran agrupados en familias por sus diferentes secuencias TIRs y TSDs. Un ejemplo, es la superfamilia *Tc1/mariner* con una amplia distribución en la naturaleza. Los elementos *Tc1/mariner* tienen un largo de entre 1 y 5 kb, y codifican una transposasa de 282 a 345 aminoácidos flanqueados por dos TIRs con una longitud de entre 17 y 1100 pb (Muñoz-López et al., 2010).

Por otro lado, se encuentra la superfamilia *piggyBac*, una familia de transposones con características biológicas similares a los elementos *Tc1/mariner*. Los elementos *piggyBac* tienen una longitud de 2.4 kb, contienen TIRs de 13 pb y repeticiones invertidas internas localizadas

asimétricamente con respecto a las terminales. Su sitio blanco de inserción son secuencias TTAA (Muñoz-López et al., 2010).

Los transposones pueden ser usados para integrar transgenes en cromosomas de la célula hospedera, o para caracterizar la función específica de genes mediante la disrupción de la función génica. Además, una de las características de los transposones es que la secuencia de la transposasa puede ser separada del transposón a través de ingeniería genética. Generando un sistema de transposición binario (Zhao et al., 2016)

Los elementos como *Sleeping Beauty* (SB) pertenecientes a la familia Tc1/*mariner* son usados como herramientas genéticas gracias al sistema de transposición binario (Muñoz-López et al., 2010). También el elemento *piggyBac* es usado como herramienta genética, teniendo ciertas ventajas sobre el sistema SB, ya que tiene una actividad de transposición más alta, mayor capacidad de carga (aproximadamente 9.1-14.3 kb) y al ser cortado del sitio de inserción no deja huellas genéticas (Zhao et al., 2016).

III. ANTECEDENTES

3.1. Inmortalización de hepatocitos humanos con E6/E7

En estudios previos, se han descrito líneas celulares obtenidas de hepatocitos primarios humanos. Tsuruga y cols. (2008) obtuvieron dos líneas -HHE6E7T-1 y HHE6E7T-2- de células transducidas con los genes E6/E7 y el gen de la telomerasa transcriptasa inversa de humanos (hTERT, por sus siglas en inglés), dichas líneas proliferaron por más de 200 duplicaciones de población sin arresto del crecimiento. La línea HHE6E7T-1 duplicó su población cada 38.4 horas y la línea HHE6E7T-2 cada 39.6 horas.

Se analizó la expresión de genes enriquecidos en hepatocitos maduros. La expresión de albumina y el factor nuclear de hepatocito 4 (HNF4, por sus siglas en inglés) fueron detectados hasta la duplicación 100 en las células HHE6E7-1 y hasta el 50 en las células HHE6E7T-2. La expresión de citoqueratina 18 (CK18) fue detectada en todo el tiempo de cultivo, mientras que la expresión de α -fetoproteína (AFP), un marcador de cultivos indiferenciados no fue detectada. Además, se probó su capacidad de secreción de albumina, siendo mayor en las líneas HHE6E7T en comparación a la encontrada en la línea celular de carcinoma humano, HepG2. Sin embargo, en la duplicación 200 de ambas líneas la secreción de albumina no fue detectada. Esta evidencia sugiere que es posible inmortalizar exitosamente hepatocitos humanos que conservan ciertas características de hepatocitos maduros.

Más tarde, Burkard y colaboradores (2012) a través de la tecnología upcyte®, inmortalizaron hepatocitos de humano, obteniendo la primera generación de células Upcyte, caracterizadas por presentar expresión constitutiva de E6/E7.

Estas células presentaron un crecimiento lineal, alcanzando entre 25 y 35 duplicaciones de población en alrededor de 65 días, con un tiempo aproximado de 48h entre cada duplicación.

Se probó la expresión de marcadores específicos de hepatocitos diferenciados en las células upcyte® en diferentes etapas del cultivo y se comprobó que éstos mostraron señal positiva para CK8, CK18, y α -1-antitripsina. Además, se probó su capacidad para sintetizar y almacenar glucógeno. Por otro lado, se caracterizó la actividad de enzimas citocromo P450 (CYP450) basal

e inducible, teniendo actividad comparable con la observada en hepatocitos primarios de humano. Burkard y colaboradores (2012) destacan que con su metodología pueden generarse 11×10^9 hepatocitos upcyte® a partir de un solo vial con 5 millones de hepatocitos.

Finalmente, en 2015, Levy y colaboradores, encontraron que la expresión de E6 y E7 en hepatocitos primarios de humano inducen la expresión del receptor de oncostatina M (OSM), gp130 (codificado por IL6ST). El tratamiento de las células con OSM permite la selección de colonias proliferantes que expresan E6 y E7 a bajos niveles y requieren de la activación de STAT3 para proliferar. Sin embargo, esta vía promueve transición epitelio-mesénquima y puede bloquearse con el inhibidor de MEK1 y MEK2, U0126. Después de retirar OSM, los hepatocitos con capacidad proliferativa diferencian en células con perfiles transcripcionales, metabólicos y de toxicidad similares a los hepatocitos primarios. Los autores concluyen que con este enfoque se lograron expandir hepatocitos humanos funcionales, generando 10^{13} - 10^{16} células de cada aislado; destacando la efectividad de un enfoque de inmortalización inducible.

3.2. Transfección *in vivo* con transposones PiggyBac

Saridey y colaboradores (2009) utilizaron transposones *PiggyBac* para tener un sistema de expresión inducible con tetraciclina tanto *in vivo* como *in vitro*. Para ello usaron diferentes transposones que permitieron evaluar si una misma célula puede integrar múltiples transposones, obteniendo un resultado positivo. Posteriormente, probaron si este sistema permite la expresión inducible de genes, después de una transfección múltiple.

Además, mediante inyección hidrodinámica de la vena lateral de la cola, probaron la integración y expresión constitutiva de luciferasa posterior a la integración múltiple de transposones. Finalmente probaron que la expresión inducible de luciferasa *in vivo* puede mantenerse por hasta 120 días cuando las células logran retener los transposones pT-TetOn y pT-tight-Luc, esto gracias a la actividad de la transposasa.

IV. JUSTIFICACIÓN

El hígado es el principal órgano regulador del metabolismo, donde los hepatocitos constituyen el mayor componente celular. Hasta ahora el entendimiento de su funcionamiento se ha limitado por la dificultad de los estudios tanto *in vivo*, como *in vitro* dada la pobre disponibilidad de hepatocitos que mantengan plenamente sus funciones. En este trabajo se propuso establecer un sistema que permita inmortalizar células hepáticas de ratón, precursoras o diferenciadas, con el uso de un transposón que contiene los genes E6/E7 usando un sistema inducible. Este sistema permite regular los niveles de los oncogenes, por tanto, la proliferación y, una vez amplificada la población, los hepatocitos podrán continuar su diferenciación, después de reducir la expresión de los oncogenes en un medio adecuado. La expectativa es que estos hepatocitos diferenciados mantengan sus funciones metabólicas fundamentales.

V. HIPÓTESIS

La expresión inducible por transposición de los oncogenes E6 y E7 del virus del papiloma humano en hepatocitos de ratón promoverá su inmortalización, además de ser fuente de hepatocitos funcionales.

VI. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Implementar un sistema de transferencia de genes *in vivo* usando transposones PiggyBac que permita obtener una población de hepatocitos de ratón inmortalizados metabólicamente funcionales.

6.2. Objetivos particulares

1. Transfectar el hígado de ratones C57 BL/6N con los oncogenes E6/E7 del virus del papiloma humano y la transposasa Hyper mediante inyección hidrodinámica de la vena lateral de la cola.
 - Determinar la eficiencia de transfección de células hepáticas al realizar la inyección hidrodinámica y la localización de éstas en el tejido.
 - Establecer la cantidad de transposasa requerida para que se dé la integración de los transposones PiggyBac en el genoma de las células hepáticas *in vivo*, sin generar efectos tóxicos.
 - Determinar la cantidad mínima de DNA necesaria para transfectar células hepáticas *in vivo*.
2. Establecer un cultivo primario de hepatocitos convencional o a partir de ductos biliares de ratones transfectados y evaluar su inmortalización.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Transposones y plásmidos

Transposón PB-E6/E7: Brevemente, los oncogenes E6/E7 del virus del papiloma humano tipo 16 se encuentran dentro del transposón Piggybac denominado PB-E6/E7 (generado por el M. en C. Sergio Eliezer López) que contiene 7905 pb. El transposón PiggyBac está constituido de la siguiente manera: ITR-TRE-E6/E7-PGK-Venus-IRES-rtTA-ITR y tiene dos modalidades de expresión: una basal y una inducible. Cuando el vector se introduce en las células, el reportero Venus y el transactivador reverso de tetraciclina (rtTA) se expresan de forma basal dirigidos por el promotor PGK, permitiendo que el rtTA pueda ser activado por la doxiciclina, un análogo de la tetraciclina (modalidad inducible). Una vez activada la transcripción de rtTA este se une al promotor TRE, que dirige la expresión de E6/E7. Además, la activación del promotor TRE produce más rtTA.

Transposones reporteros: Además del plásmido que contiene al transposón PB-E6/E7, se utilizaron dos plásmidos que contienen genes reporteros distintos. El primer plásmido contiene los genes que codifican para dos proteínas, la luciferasa de luciérnaga *Photinus pyralis* (Luc2) que en presencia del sustrato luciferina emite bioluminiscencia, y una fluorescente, mCherry. Dicho transposón está conformado por las secuencias: ITR-CAG-Luc2-IRES-mCherry-ITR (PB-CAG-Luc2mCherry; generado por el Dr. Álvaro Marín). Nótese que en este caso la expresión de los genes reporteros está dirigida por el promotor CAG. El segundo plásmido codifica para la proteína fluorescente Venus fusionada a la proteína Luc2, y para la proteína mCherry bajo el control del promotor CAG, teniendo las secuencias: ITR-CAG-VenusLuc2-IRES-mCherry-ITR (PB-CAG-ffLuc; generado por la LG. Mayra Luisa Ruiz).

Plásmido Hyper: Para que los genes de interés (E6/E7, Luc2, mCherry o VenusLuc2) puedan incorporarse al genoma de las células hepáticas, utilizamos un plásmido que contiene el gen de la transposasa Hyperactive (pCAG-HyPBase, generado por el M en C. José Ángel Martínez). En este plásmido la expresión de la transposasa es dirigida por el promotor CAG.

7.2. Ratones

Se utilizaron ratones macho de la cepa C57 BL/6N de 2 a 4 meses de edad, los cuales fueron obtenidos de la Unidad de Bioterio del Instituto de Biotecnología, UNAM. Los ratones se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas cada uno, con acceso libre a comida y agua.

Nota: Todos los protocolos utilizados fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

7.3. Inyección hidrodinámica

La transfección de las células hepáticas de ratón *in vivo* se hizo mediante la inyección hidrodinámica de la vena lateral de la cola -derecha o izquierda-, inyectando de 1-15 μ g de plásmido contenido en 2ml de solución salina 0.9% (ver **Anexo 1**). Para ello, los ratones fueron inmovilizados físicamente introduciéndolos en un tubo de 50 ml de la marca CORNING con agujeros en el fondo y en la tapa. Por el lado de la tapa se sujetó la cola, se expuso a una lámpara con luz incandescente para dilatar las venas, se limpió con etanol al 70% y se procedió a inyectar los 2 ml de solución utilizando una jeringa de 3 ml de con aguja 27 G en un tiempo aproximado de 5-7 segundos. Al terminar se hizo presión sobre el sitio de inyección para detener el sangrado.

7.4. Eficiencia de transfección *in vivo*

Para corroborar la eficiencia de transfección del hígado *in vivo*, utilizamos los plásmidos reporteros PB-CAG-Luc2mCherry o PB-CAG-ffLuc como referencia. La determinación de la actividad de luciferasa (Luc2) o la emisión de las proteínas fluorescentes se hizo en el equipo In-Vivo Xtreme de Bruker el cual está ubicado en el Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada del Instituto de Biotecnología, UNAM. 72 horas después de la inyección de los plásmidos, los ratones fueron inyectados vía intraperitoneal con D-luciferina (150 mg/kg) (marca, GOLDBIO) y anestesiados con Isoflurano al 1% (Sofloran Vet PiSA Agropecuaria), 10 minutos después de haberlos inyectado, se capturaron dos imágenes: la primera de reflectancia con un tiempo de exposición de 17 s, y la segunda de luminiscencia con un tiempo de exposición de 3 minutos, en 12 cm de campo de visión, usando un 'binning factor' de 4, 'f/stop' de 1.1 y el filtro abierto.

Con el mismo equipo también se observó la actividad de proteínas fluorescentes *in vivo*, para ello se configuró en el software Bruker Molecular Imaging la longitud de onda de excitación máxima y la longitud de onda de emisión, en el caso de mCherry estas longitudes son 587 nm y 610 nm, y para el caso de Venus 515nm y 528nm, respectivamente.

Los casos en los que el ratón muestra señal bioluminiscente o fluorescente en la región subdiafragmática fueron considerados exitosos, es decir, la inyección/transfección fue correcta.

7.5. Determinación de bioluminiscencia en diferentes órganos

Se inyectó al ratón a través de la vena lateral de la cola como previamente se describió y 72 horas después de la inyección se analizó la bioluminiscencia en el ratón vivo, una vez que se confirmó la señal bioluminiscente el ratón fue sacrificado por dislocación cervical, se abrió la cavidad abdominal y se extrajeron el hígado, el bazo, los riñones, los pulmones y el corazón. Todos los órganos fueron lavados con PBS 1X (ver **Anexo 1**) y puestos de forma individual en una placa de 6 pozos en 1ml de PBS 1X en presencia de luciferina 1mM.

La placa de 6 pozos que contiene los tejidos se introdujo en el equipo In-Vivo Xtreme de Bruker y se capturan dos imágenes: la primera de reflectancia con un tiempo de exposición de 17 s, y la segunda de luminiscencia con un tiempo de exposición de 3 minutos, en 12 cm de campo de visión, usando un 'binning factor' de 4, 'f/stop' de 1.1 y el filtro abierto.

7.6. Cortes histológicos de hígado

Una vez corroborada la transfección del hígado mediante el análisis de la bioluminiscencia *in vivo*, el ratón fue sacrificado por dislocación cervical, una vez hecho esto se abrió la cavidad abdominal, se extrajo el hígado completo, se separaron los lóbulos (derecho, izquierdo, caudado y medio) y estos se cortaron en secciones de aproximadamente 3 mm³ para ponerlos en tubos para microcentrífuga que contenían paraformaldehído (PFA) 4%, mismos que fueron puestos en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente, una vez pasado este tiempo se lavaron con PBS 1X, 5 veces durante 10 minutos. Al terminar, el tejido se puso en sacarosa al 30% y se dejó en agitación toda la noche, posteriormente se incubaron a 4°C hasta que éste fue cortado.

Una vez fijado el tejido se realizaron los cortes histológicos de cada lóbulo con el uso de un criostato (modelo CM1850, Leica), para ello los tejidos se pusieron sobre un porta espécimen, embebidos en Tissue tek y congelados en hielo seco, una vez que el tejido se congeló fue introducido en el criostato y se realizaron cortes de 10 μm de espesor, estos fueron puestos en portaobjetos tratados gelatina de piel de porcino (G1890, SIGMA) al 0.7% (ver **Anexo 1**).

Para la observación de los cortes histológicos en campo claro se realizó tinción con hematoxilina-eosina, primero post-fijaron los cortes puestos en portaobjetos incubándolos con PFA 4% durante 20 min a temperatura ambiente, se hicieron 3 lavados con PBS 1X de 10 min cada uno, una vez lavados se inició la tinción. Para ello se introdujeron los portaobjetos en agua corriente durante 5 min, posteriormente se introdujeron en hematoxilina 5 min, se lavaron 5 min en agua destilada y 5 min en agua corriente, para introducir los portaobjetos en eosina, previamente se introdujeron en etanol 50% durante 3 minutos y en etanol 70% 3 min, después de esto se introdujeron en eosina durante 1 min, se procedió a deshidratar los cortes, introduciendo los portaobjetos en etanol 96% durante 5 min y en etanol absoluto durante 3 min, se dejaron secar los portaobjetos y se introdujeron en xileno durante 5 min, una vez deshidratada la muestra se montó un cubreobjetos utilizando una solución 50% glicerol y 50% PBS 1X.

7.7. Análisis de las proteínas reporteras en cortes de hígado

Los cortes histológicos del hígado se post-fijaron, incubando con PFA 4% durante 20 min a temperatura ambiente, posteriormente se hicieron tres lavados con PBS 1X de 10 min cada uno, después se incubaron con DAPI 1:2000 durante 5 min., se volvió a lavar con PBS 1X y se montó el cubreobjetos con una mezcla que contenía 50% de glicerol y 50% de PBS 1X.

Las muestras se observaron con el microscopio Zeiss Observer Z1, los filtros usados permiten detectar las proteínas fluorescentes, Venus (Excitación 515nm, emisión 528), mCherry (Excitación 587nm, emisión 610nm) y DAPI (Excitación 345nm, emisión 458nm).

7.8. Aislamiento y cultivo de hepatocitos

Para aislar los hepatocitos del ratón transfectado, éste se anestesió con una solución de avertina (45 μg /gr de peso corporal). Una vez anestesiado, se abrió la pared del abdomen y el peritoneo para colocar una sutura sin apretar alrededor de la vena cava inferior debajo del corazón y en la

parte abdominal, en la vena cava inferior se introdujo un catéter (24G x 3/4) el cual se conectó una bomba peristáltica (Masterflex C/L de Cole-Parmer) mediante la cual se perfundieron 40 ml de solución HBSS 1X (ver **Anexo 1**) a 37°C a una tasa de 1.5ml/min, inmediatamente se apretaron las suturas y se cortó la vena porta para drenar el líquido, además de la sangre que circula dentro del hígado. Posteriormente se perfundieron 40 ml de solución de colagenasa tipo 1 (Whorthington Biochemical Corporation) 0.1% (ver **Anexo 1**) a 37°C a una tasa de 1.5ml/min. Al terminar de perfundir se removió el hígado y se puso en un caja de Petri estéril a la cual se agregaron 10 ml de medio de adhesión (ver **Anexo 1**), se disgregó el tejido para enseguida pasarlo por un filtro con tamaño de poro 100µm (Falcon), luego la suspensión celular se centrifugó durante 5 minutos a 800 rpm y el sobrenadante se descartó, mientras que la pastilla se resuspendió en 10 ml de medio de adhesión, a continuación se transfirieron las células a un tubo con 10 ml de solución de Percoll isotónica (170891-01,GE/Healthcare) y se mezcló por inversión, se volvió a centrifugar durante 7 minutos a 1200 rpm, el sobrenadante se descartó y la pastilla se resuspendió nuevamente en 10 ml de medio de adhesión. De la suspensión final se tomaron 10µl para determinar la viabilidad con el uso de azul de tripano.

Una vez que se determinó el número de células viables se procedió a sembrarlas en cajas de 12 pozos cubiertas con colágena tipo 1 a una densidad celular de 1×10^5 células por pozo en 1ml de medio de adhesión o medio modificado (ver **Anexo 1**). Una vez sembradas las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 horas.

A las 24 horas se retiró el medio de cultivo y se añadió medio fresco para retirar las células muertas. Posteriormente se observaron en el microscopio de fluorescencia (Zeiss Observer Z1) para determinar la eficiencia de transfección mediante la detección de las proteínas reporteras (Venus y mCherry).

Ya que confirmamos la transfección de las células se añadieron diferentes dosis de doxiciclina (D9891, SIGMA) (15-1500 ng/ml de medio de cultivo) para promover la activación de la transcripción de los oncogenes E6/E7. Además, el medio se cambió cada 2 días por medio fresco.

7.9. Aislamiento y cultivo de células ductales biliares

El ratón se sacrificó por dislocación cervical, se abrió la cavidad abdominal y se extrajo el hígado completo, se cortó el tejido en pedazos de 0.5 mm^3 , los pedazos se transfirieron a un tubo de 15 ml y se le adicionaron 10 ml de medio de lavado (ver **Anexo 1**) frío. Se pipeteo la muestra con una pipeta de 10 ml con la finalidad de remover la sangre y grasa, una vez que el tejido se sedimentó se retiraron 7.5 ml de sobrenadante. Este proceso se repitió una vez más, al terminar se retiró todo el medio de lavado para adicionar 10 ml de solución de digestión (ver **Anexo 1**) precalentada a 37°C . Se incubó durante 90 minutos en agitación a 37°C . Al pasar este tiempo el sobrenadante se transfirió a un tubo, donde se agregó medio de lavado frío hasta tener 15 ml de volumen, se centrifugó a 500 rpm durante 5 minutos, posteriormente se descartó el sobrenadante y se repitió el proceso. La pastilla de células obtenida se resuspendió en 5 ml de medio de lavado frío y se transfirió a una caja de Petri de 100 mm. Usando un microscopio de campo claro se identificaron y colectaron ductos biliares usando una pipeta de 200 μl , que se transfirieron a un tubo con 10 ml de medio de adhesión. Una vez obtenidos los ductos se sembraron (50 ductos por 1.9cm^2) (Broutier et al., 2016).

VIII. RESULTADOS

8.1. Eficiencia de transfección del hígado in vivo

Iniciamos este estudio determinando la eficiencia de transfección del hígado en ratones vivos; para lo cual inyectamos 10 µg del plásmido reportero PB-CAG-Luc2mCherry en 2 ml de solución salina 0.9% mediante inyección hidrodinámica en la vena de la cola. 72 h después de la inyección, analizamos la bioluminiscencia emitida por la enzima luciferasa (en presencia de luciferina) en ratones anestesiados en el equipo In-Vivo Xtreme de Bruker. Consideramos como casos exitosos de transfección hepática, aquellos en los que se observó señal bioluminiscente en la región subdiafragmática del ratón. En la **Figura 3a** se puede apreciar la sobreposición de dos fotografías, una de reflectancia y otra de bioluminiscencia de un ratón transfectado correctamente, pues la bioluminiscencia en la región subdiafragmática es coincidente con la zona en donde se localiza el hígado. Por otro lado, en la **Figura 3b** se muestra un caso donde no se logró la transfección, pues la señal bioluminiscente se localiza en la cola, esto puede deberse a que el plásmido no llegó al hígado, ya sea porque no se inyectó el volumen completo o porque la inyección no se hizo con la rapidez necesaria (5-7 segundos).

De 10 ratones inyectados, en 8 tuvimos señal bioluminiscente en la zona subdiafragmática del ratón. Por lo tanto, la eficiencia de transfección hepática que logramos fue del 80%.

Además, dado que nuestro plásmido reportero también contiene la secuencia para la proteína fluorescente mCherry, decidimos explorar la presencia de dicha señal en los casos de transfección hepática correcta. Desafortunadamente, la señal de la proteína fluorescente mCherry, no se detectó (datos no mostrados). Creemos que la nula detección de la señal se debe a que la intensidad de emisión de mCherry no es muy alta, y a que, tejidos como la grasa, la piel y el pelo del ratón no permiten que sea detectada por el equipo In-Vivo Xtreme.

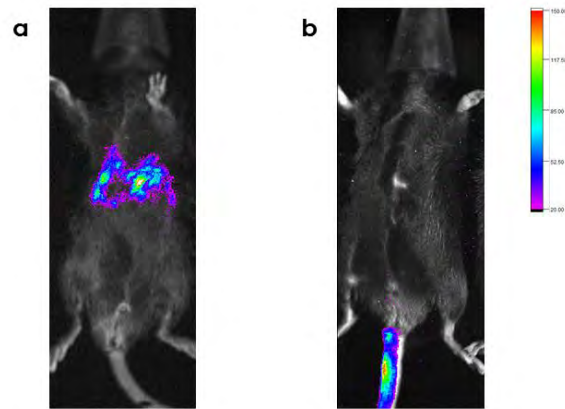


Figura 3. Análisis de la eficiencia de transfección hepática en ratones vivos mediante la actividad de la enzima luciferasa. Sobreposición de imágenes de reflectancia y bioluminiscencia en ratones anestesiados, obtenidas 72 h después de la inyección con el transposón reportero PB-CAG-Luc2mCherry. (a) La señal bioluminiscente se observa en la zona subdiafragmática del cuerpo del ratón, coincidente con la localización del hígado, considerada esta señal como un caso exitoso de transfección hepática. (b) La señal bioluminiscente se muestra en la cola y no en la zona subdiafragmática, consideramos éste como un caso fallido de transfección hepática.

Para confirmar que la señal bioluminiscente observada en la zona subdiafragmática del ratón, realmente proviene del hígado y no de otros órganos localizados en la cavidad abdominal o torácica, sacrificamos el ratón y disecamos el hígado, el bazo, los riñones, los pulmones y el corazón. Analizamos la señal bioluminiscente en todos los órganos y confirmamos que el único órgano que emite señal es el hígado (**Figura 4**). Además, encontramos que, pese a que todo el órgano presenta señal bioluminiscente, esta es más intensa en los bordes, tal vez porque el acceso al sustrato luciferina es mayor en esta zona.

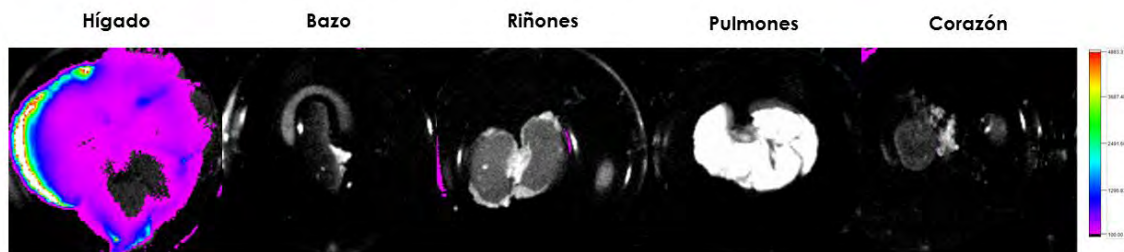


Figura 4. Determinación de la bioluminiscencia emitida por la actividad de la enzima luciferasa en diferentes órganos provenientes de un ratón con transfección hepática. Sobreposición de imágenes de reflectancia y bioluminiscencia del hígado, bazo, riñones, pulmones y corazón provenientes de un ratón inyectado con el plásmido PB-CAG-Luc2mCherry 72 h antes, e incubadas en una solución de PBS 1X en presencia de 1mM de luciferina. El hígado es el único órgano que presenta señal bioluminiscente.

8.2. Porcentaje y localización de células transfectadas en cortes histológicos

Se inyectó un ratón con 10 μg totales de DNA, los plásmidos PB-CAG-Luc2mCherry y PB-E6/E7 se inyectaron en una relación de 1:5 (2 μg y 8 μg , respectivamente). Posteriormente se comprobó en el equipo In-Vivo Xtreme que la transfección fue exitosa. A continuación, se extrajo el hígado del ratón para hacer cortes histológicos, se separaron los lóbulos principales y se analizaron preparaciones provenientes de los cuatro lóbulos: lóbulo derecho, lóbulo medio, lóbulo izquierdo y lóbulo caudado.

Se tomaron fotografías de distintas preparaciones y con la detección de las proteínas fluorescentes mCherry y Venus, además del marcador nuclear, DAPI se identificaron las células transfectadas (**Figura 5, b-d**), a partir de este análisis se obtuvieron los siguientes datos. En los diferentes lóbulos, entre el 11-31% de las células presentó fluorescencia, ya sea de mCherry o Venus. La internalización de ambos plásmidos en una misma célula ocurrió en el 62 al 89% de los casos, ya que se observó co-localización de ambas señales.

En los diferentes lóbulos, el porcentaje de células con señal de mCherry fue de entre 12-25%, mientras que el porcentaje de células con señal de Venus se encontró entre el 11 y 31%.

Con los datos obtenidos podríamos decir que hasta un 31% de las células del hígado pueden ser transfectadas mediante el método de inyección hidrodinámica por la vena lateral de la cola,

además puede esperarse que, en caso de inyectar dos plásmidos diferentes al mismo tiempo, hasta un 89% de las células transfectadas podría internalizar ambos plásmidos. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que se observó una gran variación en los porcentajes de transfección en las fotografías analizadas por lo que la eficiencia de transfección no será igual en los organismos, ni la transfección será igual en todas las células.

Las imágenes de campo claro de las tinciones con hematoxilina y eosina (**Figura 5a**) nos permitieron identificar los sitios principales de transfección. En las imágenes se observa que cerca de la vena central se localiza una mayor cantidad de células transfectadas, en estas imágenes no se pueden observar claramente estructuras como la tríada portal, formada de la vena porta, la arteria hepática ni los ductos biliares pues cerca de estas zonas no se encontraron células fluorescentes, por lo que podría decirse que la población propensa a ser transfectada es la cercana a la vena central dentro de cada lobulillo, pues conforme aumenta la distancia a la vena central, hay menor densidad de células fluorescentes datos que coinciden con estudios previos del mecanismo de liberación de plásmidos por inyección hidrodinámica (Suda et al., 2007; Budker et al., 2006).

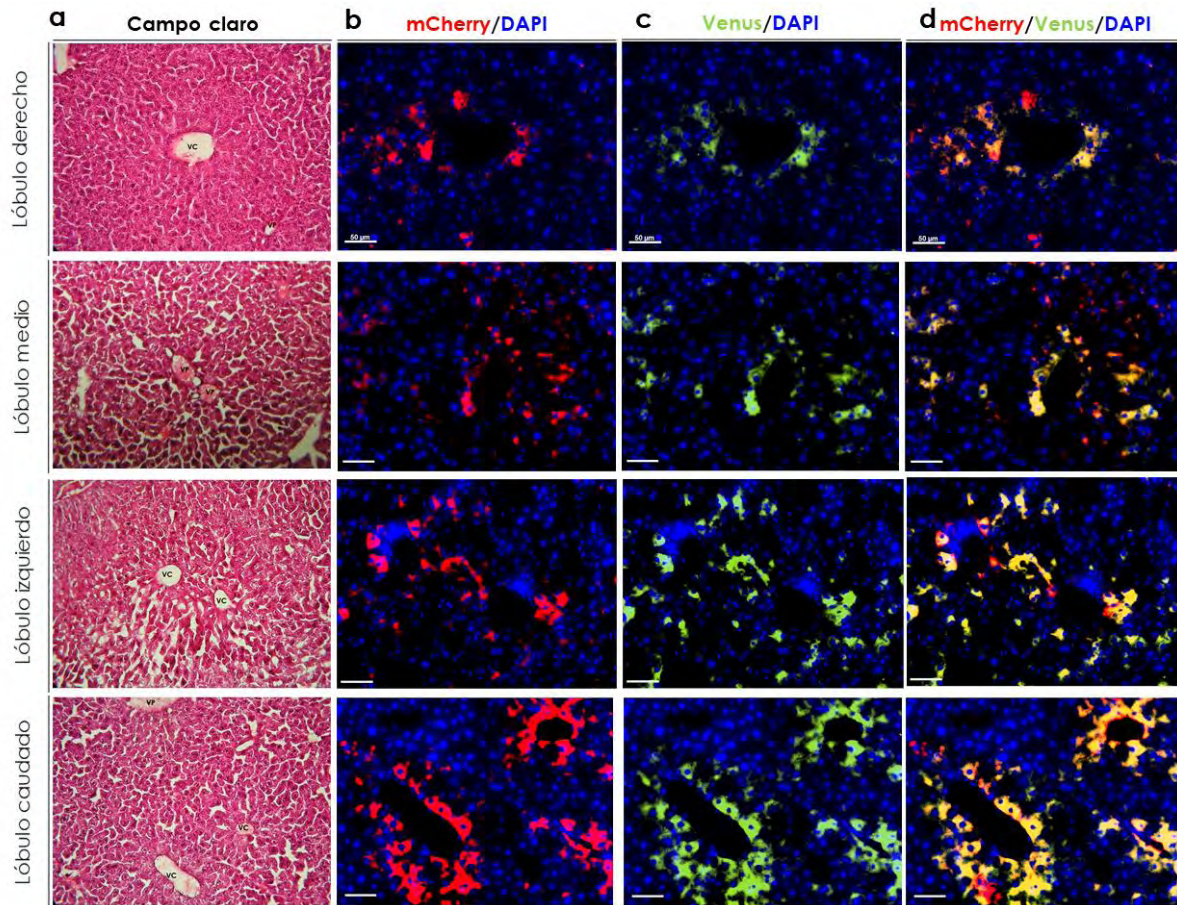


Figura 5. Localización de células transfectadas en cortes histológicos del hígado obtenido de un ratón inyectado con 2 μg de PB -CAG-Luc2mCherry y 8 μg PB-E6/E7 (relación 1:5). En la columna de campo claro podemos observar fotografías de los cuatro lóbulos (derecho, medio, izquierdo y caudado) teñidos con hematoxilina y eosina, en las que pueden distinguirse, la vena central (VC) y vena porta (VP) *La fotografía del lóbulo medio no corresponde con las micrografías de epifluorescencia. En las columnas restantes se muestran micrografías de epifluorescencia donde se resaltan células con señal de mCherry y los núcleos teñidos con DAPI, células con señal de Venus y núcleos con DAPI, y la combinación de las tres señales (Venus, mCherry y DAPI). En todos los lóbulos se observan células con señal de Venus o mCherry. Las células que presentan fluorescencia se encuentran cercanas ya sea a la vena central o a la vena porta, en las regiones más alejadas de los vasos sanguíneos hay menor número de células fluorescentes. Barra de escala 50 μm

8.3. Evaluación de la integración de los transposones y tiempo que permanecen en las células hepáticas

Una vez confirmado que el hígado es el principal órgano transfectado y que las células cercanas a la vena central son las transfectadas al realizar la inyección hidrodinámica de la vena lateral de la cola, nos propusimos determinar la cantidad de transposasa requerida para llevar a cabo la integración de los transposones en el genoma de las células hepáticas *in vivo*.

Realizamos experimentos en los que probamos plásmidos reporteros (PB-CAG-Luc2mCherry y PB-CAG-ffLuc) solos o en combinación, con diferentes diluciones (1:50, 1:10 y 1:2) de plásmido pCAG-HyPBase, que contiene a la transposasa.

Inicialmente, se realizaron inyecciones con 10 µg totales de DNA y se observó a los ratones en el equipo In-Vivo Xtreme cada semana para conocer el tiempo que se conservan los plásmidos en las células hepáticas. En la **Figura 6a** podemos observar la señal bioluminiscente proveniente del ratón que fue inyectado con el plásmido PB-CAG- Luc2mCherry en los días 3,10 y 17, sin embargo, ésta desaparece en el día 24 posterior a la inyección. Mientras que en el ratón que fue inyectado con el plásmido reportero PB-CAG- ffLuc, todavía es posible observar señal bioluminiscente inclusive en los días 29 y 33, aunque ésta fue más débil, a juzgar por la escala que se muestra en el lado derecho de cada imagen (**Figura 7**). Es posible que con este plásmido detectamos señal al día 33, debido a que la fusión de la proteína Venus con la Luciferasa permite una mayor intensidad en la luminiscencia (Hara-Miyauchi *et al*, 2012) permitiendo su detección, aunque el número de células que internalizaron el plásmido pudiera ser reducido.

Cuando probamos el plásmido PB-CAG-Luc2mCherry en combinación con el plásmido pCAG-HyPBase en una relación 1:50 encontramos señal en los días 3, 10 y 17, sin embargo, esta desaparece al día 24 posterior a la inyección (**Figura 6b**). El hecho de que la señal bioluminiscente desaparezca con la misma cinética observada en el ratón al que no se le inyectó el plásmido pCAG-HyPBase (**Figura 6a**), sugiere que la cantidad de transposasa utilizada no fue suficiente para permitir la integración del transposón reportero en el genoma de las células hepáticas. Con el fin de examinar si el plásmido reportero se había integrado en las células hepáticas por acción de la transposasa, sacrificamos al ratón al día 41 después de la inyección y

evaluamos la bioluminiscencia del hígado disecado, no encontrando señal en este órgano (Figura 6c).

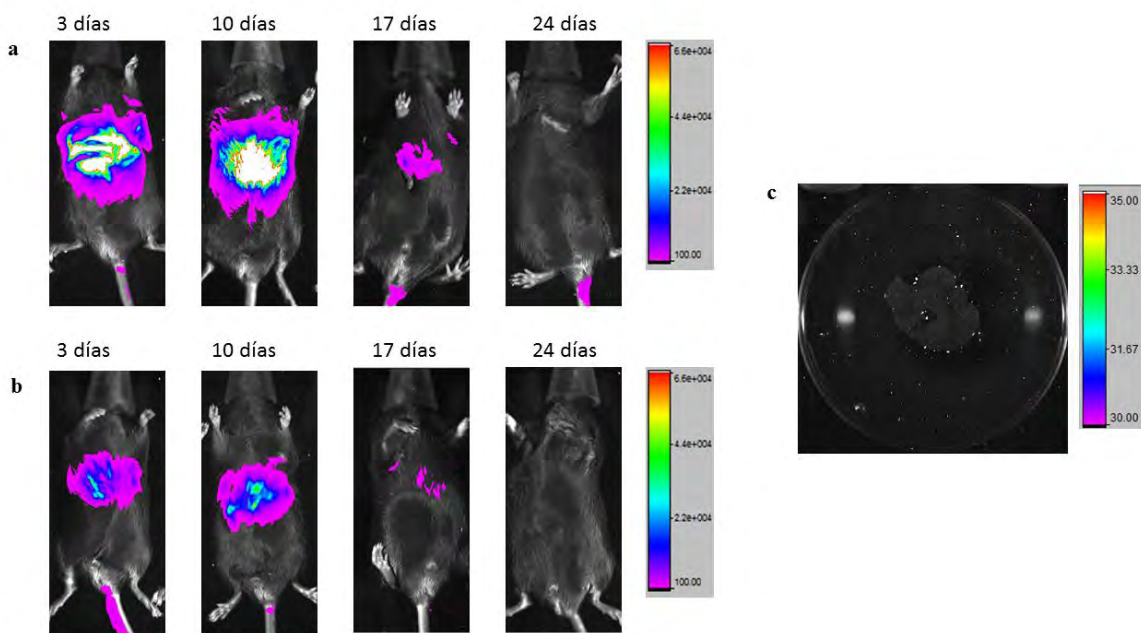


Figura 6. Determinación de la bioluminiscencia de la enzima luciferasa para estimar la integración de los transposones reporteros en las células hepáticas en ratones vivos. Sobreposición de imágenes de reflectancia y bioluminiscencia en ratones inyectados con 10 µg de plásmido PB-CAG-Luc2mCherry (a) o con 9.8 µg de PB-CAG-Luc2mCherry + 0.2 µg de pCAG HyPBase (1:50) (b) obtenidas a lo largo del tiempo. En ambos casos la señal bioluminiscente desaparece del hígado al día 24 después de la inyección. A los 41 días se extrajo el hígado del ratón inyectado en b, éste se observó en el equipo In-vivo Xtreme, sin detectar señal bioluminiscente (c).

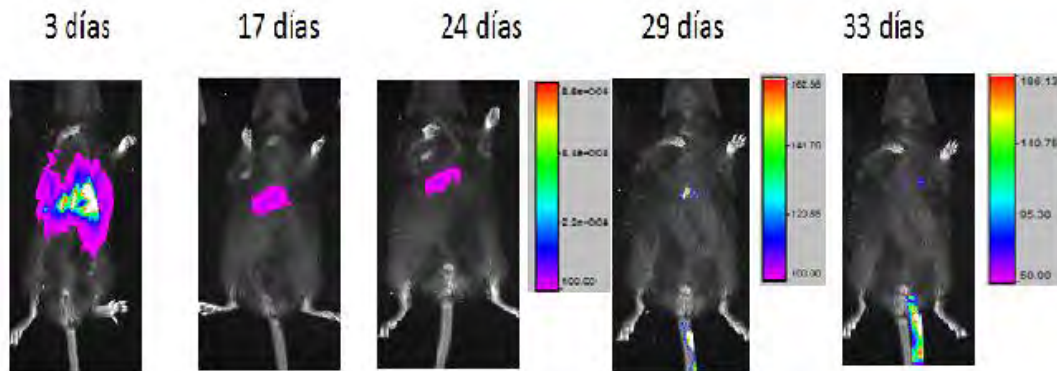


Figura 7. Determinación de la bioluminiscencia de la enzima luciferasa para estimar la integración de los transposones reporteros en las células hepáticas en ratones vivos. Sobreposición de imágenes de reflectancia y bioluminiscencia de un ratón inyectado con 10 µg de transposón PB-CAG-ffLuc. La señal de bioluminiscencia fue determinada los días que se indican en la parte superior de la figura, siendo detectada hasta el día 33 después de la inyección.

Debido a que no hubo integración del transposón PB-CAG-Luc2mCherry en las células hepáticas en presencia del plásmido pCAG-HyPBase (1:50), decidimos aumentar la cantidad del plásmido que contiene a la transposasa, considerando en esta ocasión una relación 1:10 de plásmido pCAG-HyPBase, en relación con los transposones PB-CAG-ffLuc y PB-E6/E7, con el fin de permitir la integración de los transposones a las células hepáticas.

Con la expectativa de que la relación 1:10 sería suficiente para transponer los transposones, decidimos al día 17 después de inyectar, comenzar a administrar doxiciclina (D9891, SIGMA) (0.5mg/ml) en el agua de beber, para probar el efecto de la inducción de los oncogenes E6/E7 en la proliferación de las células hepáticas en el ratón vivo. La **Figura 8** muestra que sí hubo una extensión de los días en que se detectó la señal bioluminiscente comparando con las imágenes observadas en la **Figura 7**. Sin embargo, pese a la administración de doxiciclina, la señal bioluminiscente disminuye a lo largo del tiempo, desapareciendo al día 66, lo que sugiere que la transposasa sigue siendo insuficiente para que se dé la transposición, o bien que la dosis de doxiciclina es insuficiente para promover la expresión de los transgenes E6/E7 tal que permitan la expansión de las células hepáticas que incorporaron los plásmidos reporteros, en el supuesto de que las células que integraron el transposón reportero, también integraron el transposón PB-E6/E7.

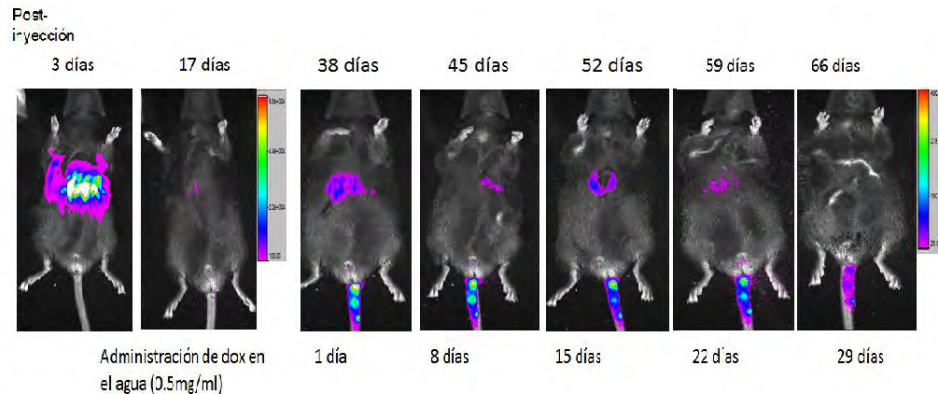


Figura 8. Determinación de la bioluminiscencia de la enzima luciferasa para estimar la integración de los transposones reporteros en las células hepáticas en ratones vivos. Sobreposición de imágenes de reflectancia y bioluminiscencia de un ratón inyectado con los siguientes plásmidos, PB-CAG-ffLuc (1.8 μ g) PB-E6/E7 (7.2 μ g) y pCAG-HyPBase (1 μ g), este último plásmido en relación 1:10 al que además se le administró doxiciclina (dox, 0.5mg/ml en el agua de beber) a partir del día 17 después de la inyección. La señal bioluminiscente desaparece del hígado al día 66 después de la inyección.

Al no observar el mantenimiento de la señal bioluminiscente por periodos prolongados de tiempo, decidimos aumentar aún más la cantidad del plásmido que contiene la transposasa, quedando la relación 1:2 con respecto al transposón reportero PB-CAG-Luc2mCherry. Además, inyectamos una mayor cantidad de plásmido total.

Inyectamos un total de 15 μ g de plásmido, siendo 5 μ g del plásmido pCAG-HyPBase y 10 μ g de PB-CAG-Luc2mCherry. Contrario a lo esperado, en la **Figura 9** se puede ver que al día 10 después de la inyección la señal en la región subdiafragmática disminuye notablemente comparada con el día 3, mientras que para el día 17 ya no es percibida.

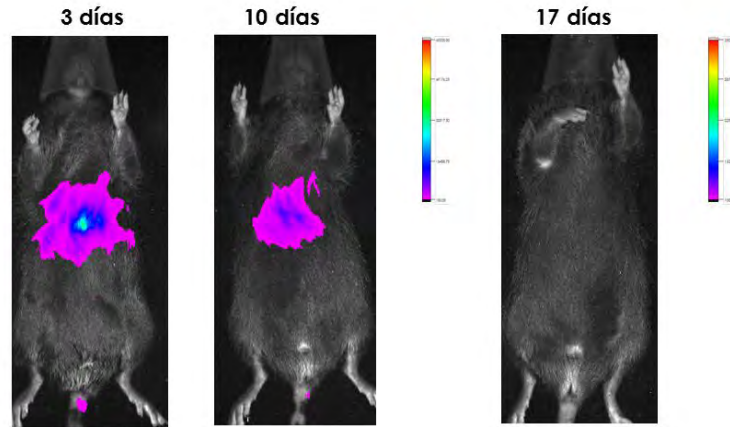


Figura 9. Determinación de la bioluminiscencia de la enzima luciferasa para estimar la integración de los transposones reporteros en las células hepáticas en ratones vivos. Sobreposición de imágenes de reflectancia y bioluminiscencia de ratones inyectados con 15 μg de plásmido (10 μg de PB-CAG-Luc2mCherry + 5 μg de pCAG-HyPBase) relación (1:2) obtenidas a lo largo del tiempo. La señal bioluminiscente desaparece del hígado al día 17 después de la inyección.

La pérdida de señal en un tiempo tan corto pudo deberse a la genotoxicidad que puede generar la expresión persistente de la transposasa, pudiendo ser letal para las células que internalizaron varias copias del plásmido o bien, a que la cantidad de plásmido total es demasiada. Con el fin de evitar este último posible efecto, redujimos la dosis de DNA total, inyectando 10 μg , conservando la relación 1:2 de transposasa con respecto al plásmido reportero PB-CAG-Luc2mCherry.

En la **Figura 10** se observan fotografías de dos ratones inyectados con 10 μg totales de plásmido (3.3 μg de pCAG-HyPBase y 6.7 μg de PB-CAG-Luc2mCherry), se puede ver que en ambos casos en el día 3 después de la inyección se observa la señal bioluminiscente en la zona subdiafragmática. En el primer ratón (**Figura 10a**) la actividad de la luciferasa es más alta en el día 10 versus el día 3 y a partir del día 17 se observa una disminución gradual permaneciendo detectable hasta el día 66 después de la inyección, aunque para el día 73 ya no es percibida.

Mientras que para el segundo ratón (**Figura 10b**) la señal solamente es percibida hasta el día 24. La diferencia en la permanencia de la señal bioluminiscente en ambos ratones puede deberse a varias razones, en principio variaciones al momento de realizar la inyección hidrodinámica.

La observación de un ratón que mantiene la señal hasta 66 días nos lleva a pensar que 10 μg de plásmido total y una relación de transposasa 1:2 con respecto al transposón reportero, permite la integración de los transposones en las células hepáticas *in vivo*.

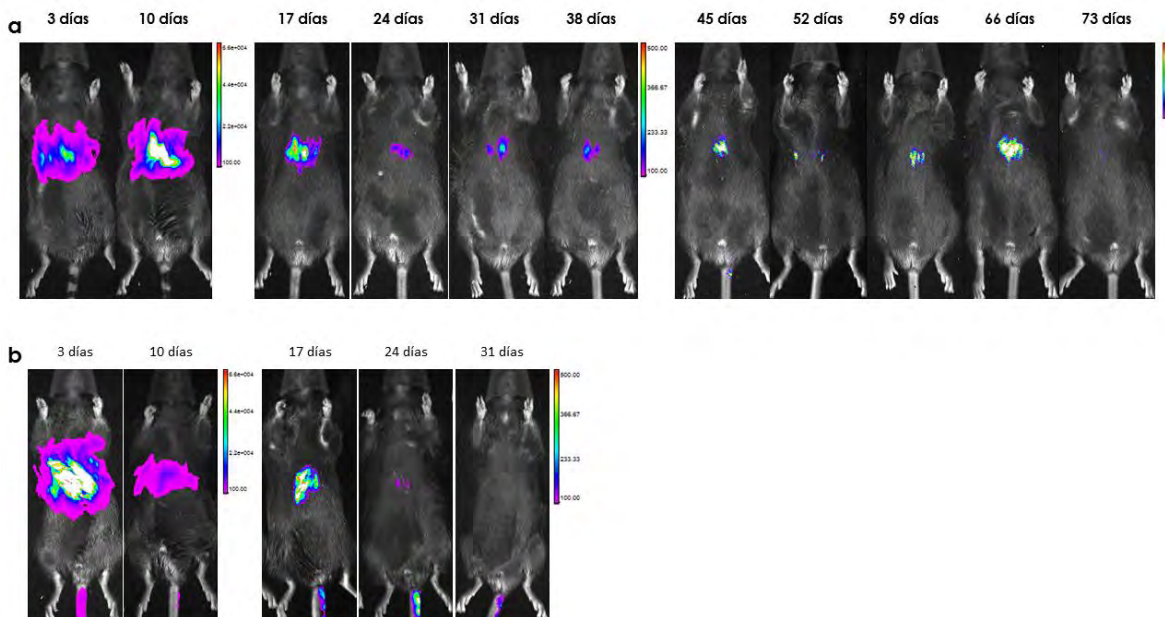


Figura 10. Determinación de la bioluminiscencia de la enzima luciferasa para estimar la integración de los transposones reporteros en las células hepáticas en ratones vivos. Sobreposición de imágenes de reflectancia y bioluminiscencia de ratones inyectados con 10 μg de plásmido (6.7 μg de PB-CAG-Luc2mCherry + 3.3 μg de pCAG-HyPBase, relación [1:2]) obtenidas a lo largo del tiempo. En (a) la señal se mantiene hasta el día 66 después de la inyección, mientras que en (b) la señal sólo se percibe hasta el día 24.

Una vez observado lo anterior, probamos disminuir la cantidad de plásmido inyectado hasta 1 μg , esperando que fuera posible detectar la señal bioluminiscente debida a la actividad de la luciferasa, además de reducir la posible toxicidad que la expresión persistente de la transposasa pudiera generar.

En la **Figura 11** se muestran fotografías de dos ratones inyectados con 0.33 μg de pCAG-HyPBase y 0.67 μg de PB-CAG-Luc2mCherry. En los dos, se puede ver desde el día 3 una señal bioluminiscente en la zona subdiafragmática que presenta una intensidad similar a la encontrada cuando se inyectan 15 o 10 μg de plásmido total. En el primer ratón mostrado (**Figura 11a**) la

señal es detectada hasta el día 66 después de la inyección. En una repetición de este experimento (**Figura 11b**) la señal dejó de ser percibida en el día 38 después de la inyección. Con estos resultados mostramos que 1 μg de plásmido inyectado en una relación 1:2, puede ser suficiente para mantener actividad de luciferasa *in vivo*, y la integración de los transposones en células hepáticas. Si bien al reducir la cantidad de plásmido total no se alarga el tiempo que la señal permanece activa, si podría evitarse que las células integren un gran número de copias del transposón en su genoma, mismas que podrían llegar a ser tóxicas para las células hepáticas.

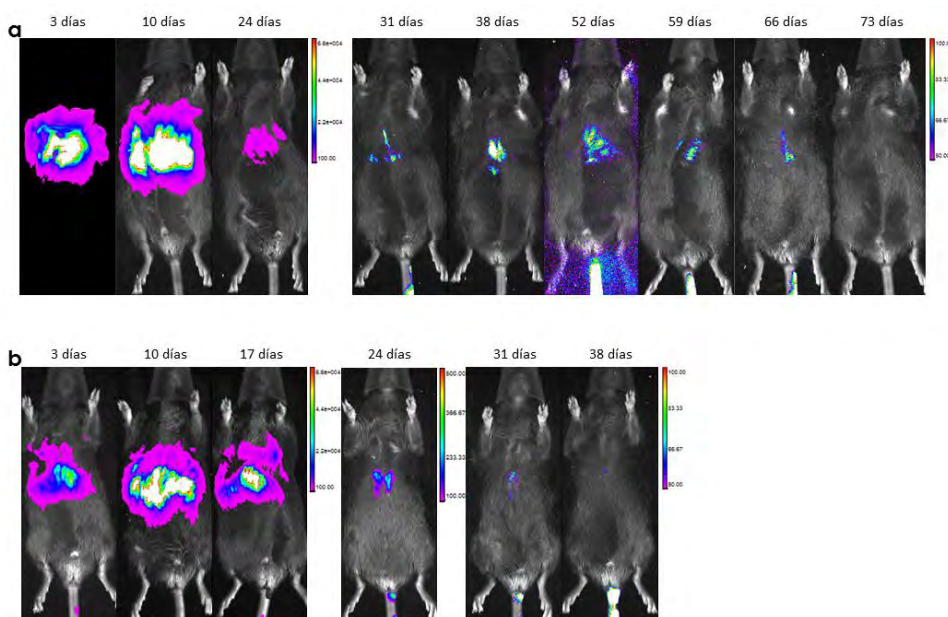


Figura 11. Determinación de la bioluminiscencia de la enzima luciferasa para estimar la integración de los transposones reporteros en las células hepáticas en ratones vivos.

Sobreposición de imágenes de reflectancia y bioluminiscencia de ratones inyectados con 1 μg de plásmido (0.67 μg de PB-CAG-Luc2mCherry + 0.33 μg de pCAG-HyPBase, relación (1:2)) En (a) la señal se observa hasta el día 66 post-inyección, mientras que en (b) sólo se detecta hasta el día 31.

8.4. Estandarización de un protocolo para cultivar células hepáticas

Con el fin de obtener células hepáticas de ratón con capacidad proliferativa, además de ser metabólicamente funcionales, se estandarizó la obtención de éstas, así también se exploraron las condiciones de cultivo más apropiadas.

En la Tabla 1 se muestra un resumen de los casos en los que se logró obtener un cultivo de hepatocitos que fueron previamente transfectados.

Tabla 1. Cultivos de células hepáticas transfectadas

* Casos descritos con mayor detalle en el texto

Caso	Plásmidos transfectados	Relación de transposasa	Se observó proliferación	Duración (días)	No. de pasajes	Razón por la que se detuvo el cultivo
1*	PB-E6/E7, PB-CAG-Luc2mCherry, pCAG-HyPBase	1:50	No	10	1	Al realizar pase las células no sobrevivieron
2	PB-E6/E7, PB-CAG-Luc2mCherry, pCAG-HyPBase	1:10	No	7	0	Las células presentaban una morfología alargada
3	PB-E6/E7, PB-CAG-Luc2mCherry, pCAG-HyPBase	1:10	No	5	0	Las células se congelaron y al resembrar no sobrevivieron
4*	PB-E6/E7, PB-CAG-Luc2mCherry, pCAG-HyPBase	1:10	Sí	47	4	Las células presentaban una morfología alargada, con citoplasma extenso
5	PB-E6/E7, PB-CAG-Luc2mCherry, pCAG-HyPBase	1:10	No	5	0	No se observó proliferación y las células tenían morfología alargada

A continuación se describen con mayor detalle el caso 1 y 4. Para el caso 1, las células hepáticas se obtuvieron de un ratón previamente inyectado con 11.76 µg de PB-E6/E7, 2.94 µg de PB-CAG-Luc2mCherry y 0.3 µg de pCAG-HyPBase, con una relación de transposasa 1:50. Fueron sembradas 2x10⁵ células por pozo en placas de 12 pozos y 24 horas después se les añadió doxiciclina a diferentes concentraciones (15ng/ml, 75ng/ml, 150ng/ml y 1.5 µg/ml de medio)

con la finalidad de definir la concentración requerida para activar la transcripción de los oncogenes E6 y E7, y que permitiera a las células sobrevivir y proliferar. En la **Figura 12a** se muestran fotografías en campo claro de las células expuestas a las diferentes concentraciones de doxiciclina al día 5 de estar en cultivo, mientras la **Figura 12c** muestra imágenes del día 10. La **Figura 12b** y **d** corresponden a imágenes tomadas en epifluorescencia en el día 5 y 10 respectivamente tratadas con 15ng/ml de doxiciclina, en estas imágenes se observan células que expresan las proteínas reporteras de los dos transposones transfectados (mCherry y Venus), es decir, que una misma célula puede internalizar más de un transposón cuando es transfectada. En el día 15 se realizó un pase dividiendo a la mitad la población de cada pozo, a lo cual las células no sobrevivieron, probablemente debido a que no integraron el transposón PB-E6/E7 en su genoma de forma estable, o bien las dosis de doxiciclina utilizadas no fueron óptimas para expresar a los transgenes.

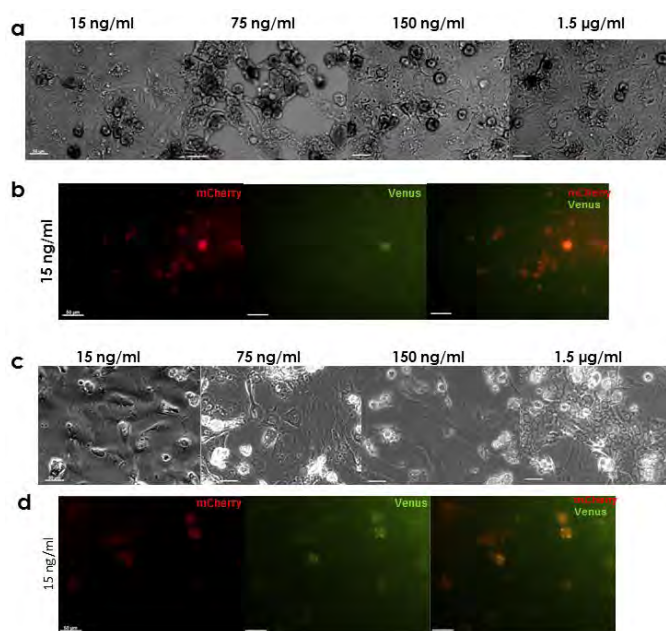


Figura 12. Imágenes de células hepáticas obtenidas de un ratón inyectado con 11.76µg de PB-E6/E7, 2.94µg del plásmido reportero PB-CAG-Luc2mCherry y 0.3 µg pCAG-HypBase. Micrografías de campo claro de células hepáticas cultivadas a los 5 (a) o 10 (c) días de haber sido sembradas y tratadas con diferentes dosis de doxiciclina. Expresión de la proteína mCherry y Venus en células hepáticas expuestas a 15 ng/ml de doxiciclina durante 5 (b) o 10 (d) días. Barra de escala 50 µm

En el caso 4, se obtuvieron células hepáticas de un ratón inyectado con 10.8µg de PB-E6/E7, 2.7 µg de PB-CAG-Luc2mCherry y 1.5 µg de pCAG-HyperBase que fueron sembradas, del total de pozos sembrados a la mitad de ellos se les administró 1.5 µg/ml doxiciclina a las 6, 24 y 30 horas después de haber sido sembradas (**Figura 13a**). Las fotografías tomadas 30 horas posteriores al sembrado y 6 horas después de la administración de doxiciclina muestran que las células tienen una morfología definida; además, a este tiempo se corroboró mediante la emisión de las proteínas fluorescentes mCherry y Venus la presencia de células transfectadas con los dos transposones PB-E6/E7 y PB-CAG-Luc2mCherry (**Figura 13b**). Del campo observado en la **Figura 13a** el 12% de las células presentó señal de Venus (**Figura 13b, centro**), un 15% de las células presentó señal de mCherry (**Figura 13b, lado izquierdo**) y de estas células un 67% presentó ambas señales (**Figura 13b, lado derecho**).

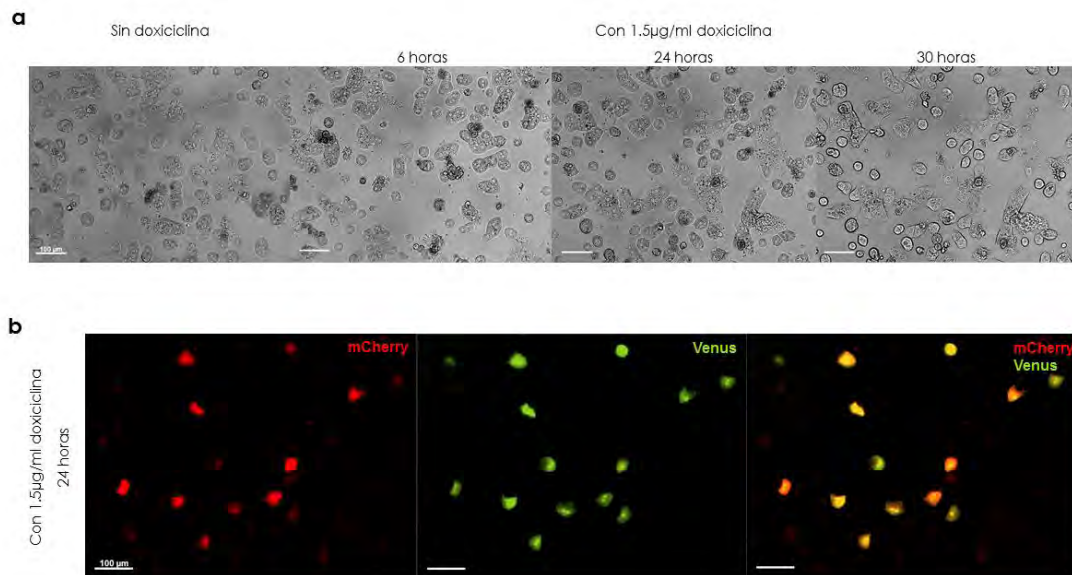


Figura 13. Imágenes de células hepáticas obtenidas de un ratón inyectado con 10.8µg de PB-E6/E7, 2.7 µg de PB-CAG-Luc2mCherry y 1.5 µg de pCAG HyperBase. Imágenes de campo claro a las 30 horas de haber sido sembradas, sin doxiciclina o expuestas a doxiciclina 1.5 µg/ml de medio luego de 6, 24 y 30 horas de sembradas (a). Expresión de mCherry y Venus en células hepáticas expuestas a 1.5 µg/ml de doxiciclina desde 24 horas en cultivo (b). 12% de las células presentaron señal de Venus, 15% presentaron mCherry y el 67% presentó ambas señales, es decir, internalizó ambos plásmidos. Barra de escala 100 µm

Las células a las que se les adicionó doxiciclina a las 6 y 24 horas de haberlas sembrado proliferaron hasta llegar a confluencia, pudiendo realizar cuatro pases consecutivos. Mientras que las células a las que se administró a las 30 horas después de ser sembradas no mostraron capacidad proliferativa, además perdieron la morfología inicial, por lo que no se realizaron pases de éstas.

Un mes después de tener en cultivo las células tratadas con 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de doxiciclina (adicionada a las 6 o 24 horas), conservaron su morfología (campo claro), así como la expresión de las proteínas reporteras mCherry y Venus (epifluorescencia) sugiriendo que el transposón PB-E6/E7 y PB-CAG-Luc2mCherry se integraron al genoma de las células (**Figura 14a**). Para probar si la proliferación era causada por la transcripción de los genes E6 y E7, a una porción de las células se les retiró la doxiciclina, pudiendo observar que las células perdieron la morfología inicial 4 días después de haber retirado la doxiciclina (**Figura 14b**). Lo que permite suponer que la proliferación de las células era debida a la acción ejercida por los oncogenes E6/E7.

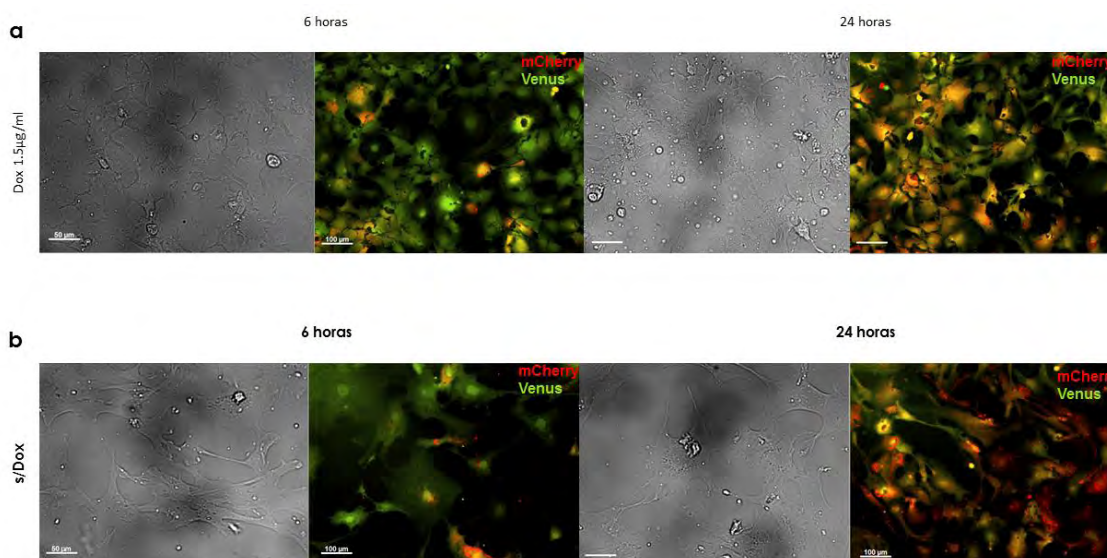


Figura 14. Imágenes de células hepáticas expuestas o no a doxiciclina en cultivo. Imágenes de campo claro y epifluorescencia de células de un mes de cultivo, luego de adicionarles 1.5 μg de doxiciclina por mililitro de medio a las 6 y 24 horas de haber sido sembradas (a). Imágenes de campo claro y epifluorescencia de células a los 4 días después de que se les retiró la

doxiciclina (b). Las células a las que se les retiro la doxiciclina dejaron de proliferar. Barra de escala para campo claro 50µm; barra de escala para epifluorescencia 100 µm.

Aunque las células expuestas a doxiciclina llegaban a confluencia, cada que el medio se reemplazaba por medio fresco se encontraba una gran cantidad de células con forma redondeada flotando en el medio, aparentemente muertas. Creímos que la mortalidad se debía a la sobreexpresión de los oncogenes E6 y E7, por lo que se decidió administrar concentraciones más bajas de doxiciclina, dividiendo la población en cinco grupos con las siguientes concentraciones: 0ng/ml, 15ng/ml, 75ng/ml, 150ng/ml y 1.5µg/ml, esperando que las células con concentraciones más bajas siguieran proliferando y la mortalidad disminuyera. No obstante, a los 47 días en cultivo las células de todos los grupos mencionados perdieron la morfología inicial y dejaron de proliferar (**Figura 15a**). A pesar de conservar la expresión de las proteínas fluorescentes mCherry y Venus (**Figura 15b**).

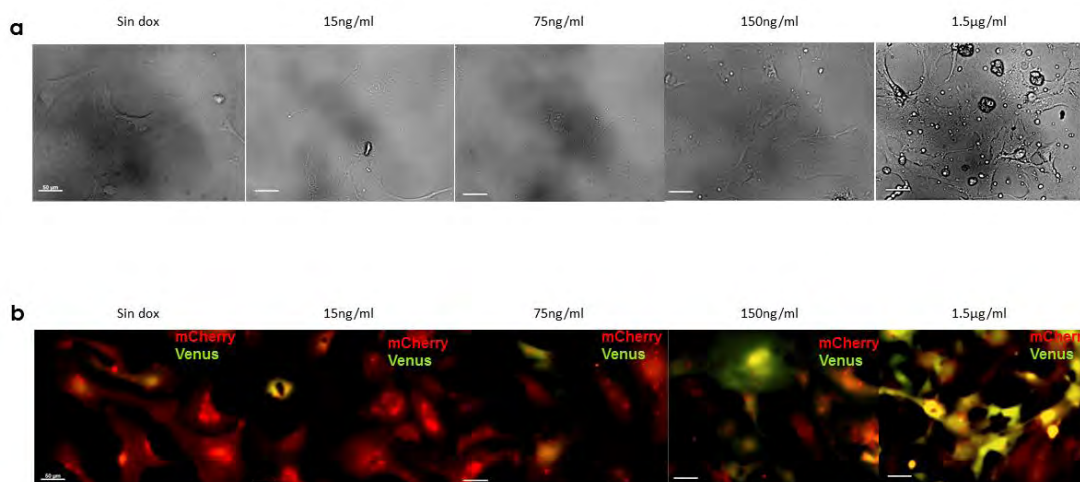


Figura 15. Imágenes de células hepáticas expuestas o no a diferentes dosis de doxiciclina en cultivo. Imágenes de campo claro (a) o epifluorescencia (mCherry y Venus) (b) de células expuestas o no a 15, 75, 150 ng/ml o 1.5 µg/ml de doxiciclina por mililitro de medio luego de 47 días de haber sido sembradas. Todas las células tratadas o no con doxiciclina dejaron de proliferar. Barra de escala 50 µm

8.5. Aislamiento y cultivo de ductos biliares

Debido a que los casos ya mencionados de cultivos de hepatocitos no nos permitieron obtener una población de células con características semejantes a los hepatocitos primarios y con capacidad proliferativa, decidimos modificar el blanco, buscando ahora obtener células ductales, ya que se ha probado su capacidad proliferativa y de diferenciar a hepatocitos o colangiocitos *in vitro* (Huch *et al*, 2015).

Además, probamos distintas condiciones de cultivo, recubrimos las cajas con colágena tipo 1 o adicionamos nuevos componentes en el medio (dexametasona 10 μ M, insulina-transferrina-selenito de sodio 1X), con la finalidad de generar un ambiente más propicio para la proliferación de estas células.

En la Tabla 2 se muestra un resumen de los casos en los que se logró obtener un cultivo mediante la metodología para aislar células ductales.

No. caso	Duración	Se observó proliferación	No. de pasajes	Condiciones de cultivo	Razón por la que se detuvo el cultivo
1	38 días	Sí	3 *únicamente células mantenidas en medio modificado	Recubierto con colágena-medio normal Recubierto con colágena-medio modificado Sin recubrir-medio normal Sin recubrir-medio modificado	Dejaron de proliferar y presentaron una morfología alargada.
2	20 días	No	1	Recubierto con colágena-medio normal Recubierto con colágena-medio modificado	Las células no llegaron a confluencia y cerca del día 20 su morfología era alargada.

En el primer ensayo no logramos enriquecer el cultivo de ductos biliares, ya que el tejido no pudo digerirse completamente, sin embargo, se sembró la suspensión de células que se obtuvo al final del procedimiento. En la **Figura 16** se pueden observar células a los 2, 6 y 10 días de cultivo, bajo cuatro condiciones distintas: cajas recubiertas con colágena en medio normal o modificado (modificaciones mencionadas anteriormente), o bien en cajas sin recubrimiento con medio normal o modificado. En todas las condiciones se observa un aumento considerable en el número de células, respecto a los cultivos de células hepáticas transfectadas anteriormente. Además, en el día 10 cuando las células llegaron a confluencia, estas conservaron una morfología redondeada con bordes definidos.

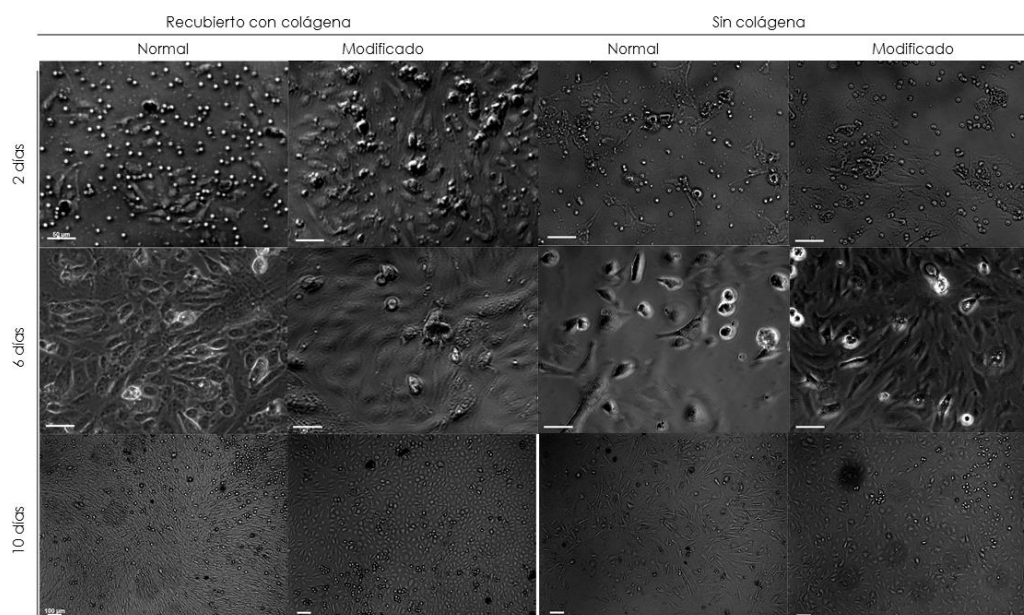


Figura 16. Imágenes de células hepáticas obtenidas mediante un protocolo para aislamiento de ductos biliares. Imágenes de campo claro de células hepáticas tomadas a los 2, 6 y 10 días después de haber sido sembradas, bajo cuatro condiciones distintas: cajas recubiertas con colágena en medio normal o modificado y cajas sin recubrir con medio normal o modificado. A los 10 días en cultivo, las células llegaron a confluencia en las cuatro condiciones señaladas, conservando una morfología definida y redondeada. Barra de escala: 2 y 6 días en cultivo 50 μ m, 10 días en cultivo 100 μ m.

Se hizo un pase de estas células, esperando permanecieran viables, y observamos que 6 días después de hacer el pase, las células crecidas en cajas recubiertas con colágena en medio normal o crecidas en cajas sin recubrir en medio modificado mantuvieron una morfología similar a la observada inicialmente, es decir morfología redondeada y bordes definidos (**Figura 17**). Las dos condiciones restantes: recubierto con colágena en medio modificado y sin colágena con medio normal, se perdieron, ya que, al hacer un cambio de medio, los pozos correspondientes a éstas se dejaron sin medio por error.

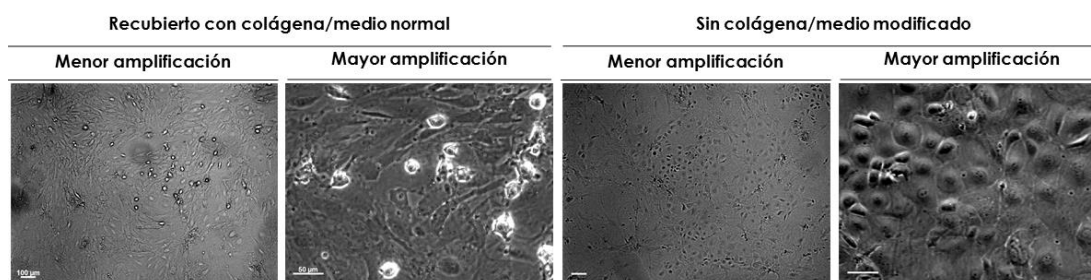


Figura 17. Imágenes de células hepáticas obtenidas mediante un protocolo para obtener ductos biliares en el pase 1. Imágenes de campo claro de células hepáticas tomadas 6 días después de hacer un pase, crecidas en cajas recubiertas con colágena en medio normal o en cajas sin recubrir con medio modificado. Para cada condición se muestra una imagen con menor amplificación (Barra de escala: 100 μ m) y otra con mayor amplificación (Barra de escala 50 μ m) del mismo campo. Las células tuvieron la capacidad de llegar a confluencia y conservar una morfología definida en las dos condiciones de cultivo en las que se mantuvieron.

A los 14 días cuando las células llegaron a confluencia, una vez más se hizo un pase para tratar de recuperar las cuatro condiciones iniciales: cajas recubiertas con colágena con medio normal o con medio modificado y cajas sin recubrir con medio normal o modificado. En la **Figura 18** se muestran imágenes tomadas en campo claro (lado izquierdo) y contraste de fases (lado derecho) 10 días después de hacer el segundo pase, podemos ver que las células mantenidas en el medio modificado presentan morfología más definida, sin importar si crecieron en cajas recubiertas o no con colágena, mientras las células mantenidas en medio normal ya perdieron la morfología inicial, mostrando una apariencia alargada.

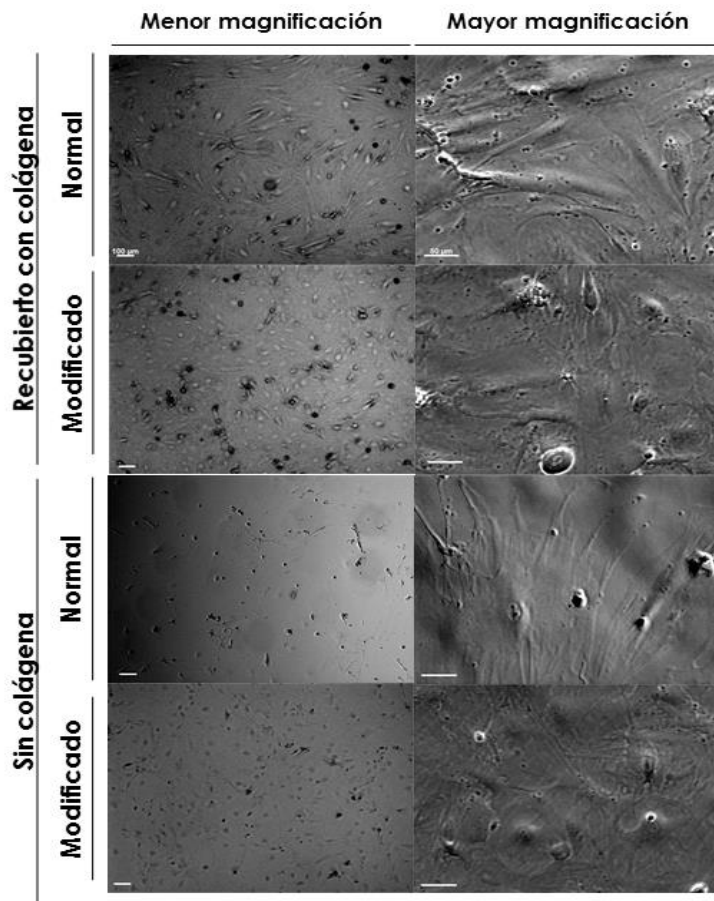


Figura 18. Imágenes de células hepáticas obtenidas mediante un protocolo para obtener ductos biliares en el pase 2. Imágenes de campo claro (lado izquierdo) y contraste de fases (lado derecho) de células hepáticas tomadas 10 días después de hacer el segundo pase, crecidas en cajas recubiertas con colágena en medio normal o modificado y en cajas sin recubrir en medio normal o modificado. Para cada condición se muestra una imagen con menor amplificación y otra con mayor amplificación dentro del mismo campo. Barra de escala para imágenes con menor amplificación: 100 μm . Barra de escala para imágenes con mayor amplificación: 50 μm .

E6/E7 hecho anteriormente. Lo que nos lleva a pensar que el enriquecimiento del cultivo con ductos biliares nos permitirá acceder a células que aún conservan capacidad proliferativa, y si

Las células mantenidas en medio modificado en cajas con o sin colágena, llegan a confluencia, por lo que se realizó al día 14 después de hacer el segundo pase, hicimos un último pase, esperando conservaran la capacidad proliferativa, sin embargo, las células no proliferaron y perdieron la morfología, deteniendo el cultivo en el pase 3 (datos no mostrados).

En el caso de las células mantenidas en medio normal, no se realizó el pase ya que como puede verse en la **Figura 18** las células no llegaron a confluencia y presentaron una morfología alargada.

A pesar de que este cultivo se detuvo en el pase 3, puede destacarse que aun siendo células provenientes de un ratón al que no se modificó genéticamente tuvo una duración similar a un cultivo de hepatocitos transfectados con

transfectamos esta población con los oncogenes E6/E7 posiblemente podríamos extender el tiempo que estas células pueden proliferar *in vitro*, pero para probar esto, primero debe estandarizarse el cultivo enriquecido en ductos biliares.

En un segundo ensayo, logramos obtener un cultivo más homogéneo, ya que se aislaron manualmente los ductos biliares, se sembraron las estructuras completas en dos condiciones diferentes: con medio normal y medio modificado, ya que no se logró obtener una cantidad alta de ductos biliares, se decidió sembrar solamente en cajas recubiertas con colágena pues como observamos antes, las células sembradas en esta condición conservan una morfología más definida.

A pesar de haber sido sembrados a una densidad muy baja ($\sim 50/3.8\text{cm}^2$) se logró establecer un cultivo. En la **Figura 19a** se muestran imágenes de los cultivos a 10 días de ser sembrados, se muestran zonas del pozo en donde las células se encuentran agrupadas. Se puede ver que, las estructuras tubulares que se sembraron inicialmente se disociaron y formaron una monocapa. Tanto en el medio normal como en el modificado, las células muestran una morfología redondeada con un núcleo relativamente grande, estas poblaciones celulares se podían observar en ciertas zonas de la caja sin llegar a cubrir toda el área.

Después de 20 días en cultivo las células presentaron una morfología más alargada y no llegaron a confluencia, por lo que este cultivo no se continuó (**Figura 19b**).

Con estos resultados, podemos proponer que las células ductales pueden mantenerse en cultivo en monocapa, sin embargo, dado que no observamos proliferación, creemos que esto se debe a la baja densidad a la que se sembraron, evitando que las células emitieran señales que promovieran la supervivencia y proliferación.

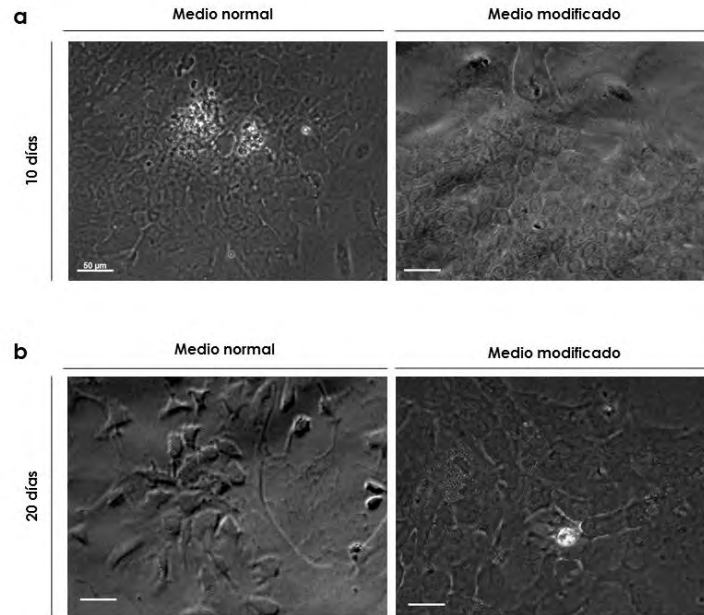


Figura 19. Imágenes de células hepáticas obtenidas de ductos biliares. Imágenes de contraste de fases de células hepáticas a los 10 días (a) y 20 días (b) de haber sido sembradas en medio normal o en medio modificado. Los ductos biliares se disociaron y formaron una monocapa, dichas células conservan una forma redondeada y con bordes definidos incluso hasta los 20 días, sin embargo, no llegan a confluencia a este tiempo. Barra de escala: 50 μm.

IX. DISCUSIÓN

El entendimiento del funcionamiento del hígado, así como la contribución de su mal funcionamiento al desarrollo de enfermedades se ve limitado por la poca disponibilidad de fuentes donadoras de células, así como la dificultad de mantenimiento de éstas en cultivo, por ello el desarrollo de una línea celular de ratón que pueda proliferar y además generar células diferenciadas que lleven a cabo las funciones normales de un hepatocito parece ser una estrategia adecuada para sortear estas dificultades.

En el presente trabajo se buscó estandarizar la transfección por medio de inyección hidrodinámica, la cantidad de DNA, así como la proporción de enzima transposasa para obtener una expresión regulada de los oncogenes E6/E7. Por otro lado, se probaron el método de aislamiento y las condiciones de cultivo que sostuvieran la proliferación de las células hepáticas. Logrando obtener resultados que podrían facilitar el posterior desarrollo de una línea celular con las características ya mencionadas.

9.1. Porcentaje de transfección y co-transfección

Para el análisis del porcentaje de células transfectadas y la localización de éstas en el tejido hepático, se inyectó un ratón con 10µg totales de DNA, los cuales correspondían a 2 µg de PB-CAG-Luc2mCherry y 8 µg de PB-E6/E7. El porcentaje de células que expresó las proteínas reporteras en los diferentes lóbulos del hígado fue de 12-25% para mCherry, mientras que para Venus fue de 11-31%. De acuerdo con la relación que se inyectó de los plásmidos, podría esperarse ver un porcentaje mayor de células con la señal de Venus, ya que el plásmido PB-E6/E7 se encontraba en mayor proporción. En algunas de las muestras analizadas, este patrón sí correspondió; sin embargo, en otros casos se observó que la proporción de células que expresaron mCherry era mayor a las que expresaban Venus. La razón por la que se obtuvieron estos datos pudo deberse a que en el plásmido PB-E6/E7, la expresión de Venus es dirigida por el promotor PGK. En un estudio realizado con ratones se vio que al transfectar el hígado con un plásmido en el que la expresión del transgén es dirigida por PGK, se da una expresión muy baja comparada con la observada cuando promotores como hCMV y CAG dirigen la expresión (Nguyen et al, 2008); por otro lado, la detección de la proteína Venus pudo ser ineficiente, ya que el filtro con el que se observaron las muestras, permite la detección de proteínas verde

fluorescente (Alexa 488, excitación 493nm- emisión 418 nm) por lo que células con una baja expresión de Venus pudieron no ser detectadas.

A pesar de obtener porcentajes diferentes a los esperados, puede destacarse que con el protocolo que se siguió de inyección hidrodinámica para transfectar el hígado se puede transfectar hasta un 31% de los hepatocitos, estos resultados son similares a los ya reportados en donde cerca del 40% de los hepatocitos en determinadas áreas del hígado captan moléculas de DNA (Sebestyén et al., 2006; Liu et al., 1999). Además, el porcentaje de co-transfección con dos plásmidos puede alcanzar un 89%, porcentaje similar al observado por Sebestyén y colaboradores (2006), quienes reportan que 24 h después de co-transfectar con DNA lineal de 200 pb marcado con un fluoróforo y un vector de expresión de la proteína fluorescente amarilla potenciada (EYFP, por sus siglas en inglés) el 91% de las células observadas muestran la presencia de ambos ácidos nucleicos. Este alto porcentaje sugiere que al realizar la inyección las células se vuelven competentes y pueden internalizar con mayor facilidad fragmentos grandes de DNA, como plásmidos.

9.2. Duración de las células transfectadas *in vivo*

Los experimentos realizados para determinar la cantidad de DNA y la proporción de transposasa necesaria para que se dé la integración de los plásmidos de interés en las células hepáticas *in vivo* nos permitieron observar señal bioluminiscente hasta 66 días después de realizar la inyección hidrodinámica, esto fue observado en casos de inyección de 10 µg y 1 µg de plásmido total, con una proporción de transposasa de 1:2 con respecto al plásmido reportero. A pesar de que previamente Saridey y colaboradores (2009) reportaron un caso en el que la expresión inducible de luciferasa se mantuvo hasta 127 días después de la inyección, se puede sugerir que las condiciones establecidas en nuestro estudio también permiten la integración de los transposones inyectados, pues en el trabajo mencionado se muestra el seguimiento de la expresión en otros ratones donde la expresión no se sostiene más allá de los 60 días.

La variación en el tiempo que se puede mantener la expresión de genes transfectados puede deberse al principio en que se basa esta estrategia de transferencia génica, en donde una buena eficiencia de distribución se obtiene al realizar la inyección de un volumen equivalente al 8-10% del peso del animal en un tiempo entre 5-7s (Suda et al., 2015).

Suda y cols. (2007) compararon los cambios estructurales en el hígado al realizar la inyección hidrodinámica en un tiempo de 5 s y de 60 s, notando en ambos casos que existe una expansión del hígado, pero para el caso de la inyección lenta se observa un menor aumento del volumen. Con respecto a la presión intravascular observaron que posterior a la inyección hidrodinámica realizada en 5 s y 60 s se presenta un aumento de la presión en la vena cava inferior, siendo también menos notorio este aumento cuando la inyección se hace en un tiempo más largo. Estas diferencias mencionadas pueden estar relacionadas con la eficiencia de transfección, pues si al hacer la inyección en un mayor tiempo el volumen de solución con DNA que llega al hígado es menor, se esperaría que un menor número de células internalice moléculas de DNA. Esto coincide con lo observado por Liu y cols. (1999), al realizar experimentos en donde variaron el volumen total de solución con DNA la expresión del gen reportero luciferasa incrementó conforme el volumen de solución con DNA fue mayor.

Por otro lado, la manera en que reacciona cada organismo al ser inyectado puede ser diferente, pudiéndose generar una reacción inmune a causa de la inyección y de la presencia de DNA ajeno a la célula, esta reacción puede ser influenciada por numerosos factores tales como la naturaleza del producto que se transfiere, el vector, la célula blanco, el microambiente local, así como el fondo genético e inmunológico del hospedero (Han et al., 2008).

En los cortes analizados en este trabajo no se observa inflamación notoria, sin embargo, no descartamos la posibilidad de que existiera tal, pues Wu y cols. (2015) examinaron los cambios que se generan al realizar la transferencia hidrodinámica de genes y aunque no observaron daño histológico obvio en el tejido, se encontró un incremento en los porcentajes de infiltración células del sistema inmune tanto en el hígado como en el bazo, además de la activación de células T y NK durante los primeros cuatro días después de la transferencia hidrodinámica de genes. También, se incrementaron los niveles en suero de citocinas como IFN- γ e interleucina-6 después de la transferencia. Igualmente, se han identificado epítopes de células T para algunos genes reporteros, como la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP, por sus siglas en inglés) (Han et al., 2008) y Luc2 (Limberis et al., 2009). Esta evidencia sugiere que en algunos ratones pudo haberse generado una reacción inmune ante la inyección o la expresión de los genes reporteros como Luc2, causando la muerte de células que internalizaron los transposones. Para determinar si esto sucedió tendrían que realizarse ensayos posteriores en donde se analice

la infiltración de células T y NK, así como la expresión de citocinas tanto en ratones inyectados como no inyectados.

Adicionalmente, debe considerarse el vehículo que se usa para distribuir los ácidos nucleicos. En este estudio se utilizó solución salina 0.9% empleada para este procedimiento, pero en el estudio de Saridey y colaboradores (2009) se utilizó la solución Transit-QR, cuyos fabricantes destacan tiene una menor toxicidad comparada con la solución salina, y que para casos en donde se espera el mantenimiento de la expresión, el uso de una solución que disminuya el efecto de la inyección podría permitir la supervivencia de las células que reciben la solución.

También debe considerarse la posibilidad de que en las células que internalizaron e integraron los transposones haya ocurrido un silenciamiento de los transgenes, esto debido al sitio cromosómico en el que éstos se insertaron, aunque se ha reportado que los transposones *PiggyBac* tienden a insertarse en regiones cercanas a sitios de inicio de la transcripción (Wilson et al., 2007) es posible que el uso de elementos regulatorios pueda mantener la expresión estable de transgenes por un mayor tiempo. Un tipo de elemento regulatorios en *cis* que es comúnmente usado en la estabilización de transgenes son los insulators, Mossine y cols. (2013) reportaron que el uso transposones *PiggyBac* que contienen al menos una secuencia del insulator cHS4 (del inglés chicken hypersensitive site-4) permiten una expresión más alta de los transgenes de interés, así como una expresión estable por hasta 4 meses; cabe que destacar que los transposones utilizados en este trabajo no cuentan con ningún elemento de este tipo por lo que podría ser de utilidad evaluar la expresión de transgenes *in vivo* con el uso de insulators, desde otro punto vista podría considerarse también el uso de herramientas que nos permitan insertar las secuencias de los oncogenes así como de genes reporteros en sitios cromosómicos que se encuentren transcripcionalmente activos en células de hígado.

Retomando la cantidad de DNA necesaria para que se dé una transfección adecuada, previamente se ha descrito que la transfección con 10 µg de plásmido vía inyección hidrodinámica permiten una expresión sustancial de los genes evaluados (Zhang et al., 1999). Por otra parte, el nivel de luciferasa aparentemente alcanzó una saturación aproximadamente a los 5 µg de plásmido por ratón, pues a pesar de la adición de hasta 25 µg de plásmido, no se observó un incremento significativo en el nivel de proteínas en órganos como el hígado, el pulmón, el corazón y el bazo (Liu et al., 1999). Por lo anterior, podría suponerse que incluso 1

μg de plásmido permite una eficiencia de transfección buena, pues si se compara la intensidad de la bioluminiscencia observada en las **figuras 10 y 11** es muy similar, aunado a esto, como ya se había mencionado anteriormente, la inyección con estas cantidades de DNA y con la proporción de luciferasa 1:2 permiten un mantenimiento de la señal por un tiempo más prolongado. Usar esta cantidad de plásmido total puede ser ventajoso en cuanto a que se usaría menor cantidad de plásmido por evento, y se reduciría considerablemente la cantidad de plásmido Hyper (que codifica la proteína transposasa) transfectado, esto es importante porque al usar un sistema con transposones se busca que la transposasa sea suministrada transitoriamente con la finalidad de prevenir la removilización de los elementos transponibles ya integrados en el genoma de las células blanco, o la posible integración de la misma secuencia que codifica para la enzima generando la expresión persistente de ésta, lo cual puede estar asociado con genotoxicidad (Huang et al., 2010; Galla et al., 2011). No obstante, es necesario realizar más estudios, tanto *in vivo* como *in vitro* para determinar si esta cantidad de DNA y proporción de transposasa realmente permiten integración de los transposones de interés.

9.3. Cultivo de células hepáticas

Con relación al cultivo celular, ya que las células hepáticas en condiciones normales tienen una capacidad proliferativa disminuida (Celton-Morizur et al., 2010), los casos mencionados en la **Tabla 1** corresponden a cultivos de células de hígado de ratones que fueron previamente transfectados con los oncogenes E6/E7 esperando con éstos identificar las condiciones necesarias para sostener la proliferación de células hepáticas. El caso 4 es destacable pues se pudo mantener 47 días durante los cuales se realizaron 4 pases, en este tiempo las células mantuvieron la expresión de las proteínas fluorescentes mCherry y Venus, lo cual nos dice que portaban los transposones PB-E6/E7 y PB-CAG-Luc2mCherry. Además, ya que al medio se le adicionó doxiciclina, se esperaría que también los oncogenes E6/E7 se expresaran cuando las células se mantuvieron en esta condición. La expresión tanto de las proteínas fluorescentes como de los oncogenes E6/E7 por un tiempo tan prolongado sugiere también que los transposones se integraron en el genoma de la célula, pues normalmente el periodo de expresión de genes transfectados transitoriamente oscila entre 24 y 72 horas, sin embargo, dependiendo de la construcción usada los transgenes pueden ser detectados hasta 7 días después de la transfección (Recillas-Targa, 2006).

La explicación que le damos a la duración de este cultivo y la aparente proliferación es que la expresión de los oncogenes E6/E7 permitió a los hepatocitos entrar en ciclo celular, debido a que las proteínas E6 y E7 inhiben proteínas celulares como p53 y Rb, respectivamente (Sano et al., 2016). Esto se sustenta en el hecho de que al retirar la doxiciiclina (**Figura 14b**) y por lo tanto detener la expresión de E6 y E7, las células no lograron llegar a confluencia y adquirieron una morfología alargada. Por lo tanto, podría decirse que las células fueron inmortalizadas. No obstante, como se mencionó en los resultados, la presencia de células aparentemente muertas en el medio probablemente fue debida a que la expresión de E6 y E7 era tan alta que pudo resultar tóxica.

Levy y cols. (2015) mencionan que la sobreexpresión de E6 y E7 libera a los hepatocitos del arresto celular sin llevar a la inmortalización, sin embargo, las células son alteradas rápidamente perdiendo la expresión de marcadores de hepatocitos como CYP450 y su función conforme el cultivo progresa, y su proliferación es descontrolada por lo que es conveniente expresar de manera controlada a E6 y E7. Tomando en cuenta esto, se dividieron las células para tener poblaciones con distintas concentraciones de doxiciiclina, de manera que, si la sobreexpresión de los oncogenes E6/E7 resultaba tóxica para las células, la reducción en la concentración de doxiciiclina llevaría también a una menor inducción de la expresión de los oncogenes y a la supervivencia de las células. No pudimos comprobar que esto realmente pasaba en nuestro cultivo debido a que las células dejaron de dividirse y perdieron su morfología probablemente debido a la baja densidad fueron sembradas. Además, como ya se había discutido anteriormente, existe la posibilidad de que la cantidad de DNA con la que se transfectó, llevó a la integración de un alto número de transposones en el genoma de la célula, que permitiera una alta expresión de los oncogenes; o a una actividad constante de la transposasa que pudo haber tenido efectos genotóxicos en la célula. Estudios posteriores podrán establecer si algo de lo anterior ocurrió, para así realizar ensayos controlando las concentraciones de doxiciiclina desde el inicio del cultivo o ajustando la cantidad de DNA y/o de transposasa, permitiéndonos obtener una expresión finamente regulada de los oncogenes E6 y E7.

Por otra parte, en la **figura 13a** se muestran hepatocitos en cultivo a los cuales se les añadió doxiciiclina a una concentración de 1.5 $\mu\text{g/ml}$ después de 6, 24 o 30 horas de haber sido sembrados, esto con la finalidad de determinar el tiempo en el que la expresión de los genes E6

y E7 puede promover la proliferación de los hepatocitos. Como se mencionó, las células a las que se les añadió doxiciclina a las 6 y 24 horas pudieron posteriormente mantenerse en cultivo debido a su aparente capacidad proliferativa, mientras que las células a las que se les añadió a las 30 horas no llegaron a confluencia y perdieron su morfología inicial.

Durante el proceso de perfusión de colagenasa para el aislamiento de hepatocitos, los niveles de RNA mensajero de proto-oncogenes como *c-Jun* y *c-Fos* se incrementan, sugiriendo que la disociación enzimática del hígado dispara la transición de la fase G0/G1 en el ciclo celular (Loyer et al., 1996; Etienne et al., 1988). Así como el incremento de otros proto-oncogenes como JunB, JunD, *c-Myc*, p53 y c-Ki-ras cuando los hepatocitos son sembrados, señala que éstos pueden avanzar hasta la fase G1 tardía (Loyer et al., 1996). La progresión hacia la fase G1/S del ciclo celular solo puede darse después de la estimulación con los factores de crecimiento apropiados que permitan superar el punto de restricción de la fase G1 tardía dependiente de mitógenos, el cual es regulado por el supresor de tumores Rb (Loyer et al., 1996; Corlu et al., 2012; Ramboer et al. 2014). Por esta razón, la estimulación de la expresión de E6 y E7 con doxiciclina preferentemente tendría que hacerse al tiempo en que los hepatocitos son sembrados, pues de esta manera se puede superar el punto de restricción de la fase G1 tardía. Probablemente las células a las que se les dio el estímulo a las 30 horas regresaron a un estado de quiescencia y por ello no pudo verse el efecto de los oncogenes.

9.4. Aislamiento de células ductales y condiciones de cultivo

El sistema biliar es una red compleja de ductos interconectados compuesto de ductos biliares intrahepáticos, ductos biliares, ductos interlobulares, ductos septales y segmentales, así como ductos biliares extrahepáticos. Existe la hipótesis de que en el hígado el área periportal es un sitio probable de localización de células troncales, capaz de originar tanto hepatocitos como colangiocitos (Furuyama et al., 2011; Cardinale et al., 2012; Miyajima et al., 2014).

Los colangiocitos son las células epiteliales que recubren a los ductos biliares, se han caracterizado dos poblaciones diferentes: los colangiocitos grandes y pequeños; se cree que los colangiocitos pequeños están comprometidos a progenitores biliares, éstos son células diploides con una morfología cúbica y una proporción núcleo-citoplasma alta (Cardinale et al., 2012). Las células cercanas al área periportal, con características como las que los colangiocitos

pequeños presentan, son de interés cuando se busca obtener una población de células hepáticas con capacidad proliferativa y que bajo ciertos estímulos puedan generar hepatocitos. Como se mencionó anteriormente, los hepatocitos son células altamente especializadas que sufren un proceso de poliploidización, el cual está relacionado con una disminución proliferativa (Celton-Morizur et al., 2010).

Basándonos en el protocolo de Broutier y cols. (2016,) buscamos estandarizar el aislamiento de ductos biliares de hígado de ratón, con la finalidad de realizar cultivos en monocapa de células ductales. Durante el proceso de aislamiento se presentaron dificultades con las disociación del tejido por lo que inicialmente no se logró enriquecer el cultivo con ductos biliares (**Figura 16**). No obstante, se sembró la suspensión de células que se obtuvo después del proceso de aislamiento e inesperadamente se observó proliferación de dichas células, aunque no hicimos pruebas para identificar marcadores celulares que nos permitieran saber qué tipo de células obtuvimos, este experimento nos permitió saber que el protocolo de aislamiento de ductos biliares permite acceder a poblaciones celulares que mediante el proceso para aislar hepatocitos se pierden, esto puede deberse a la filtración que se hace al disociar el tejido después de la digestión con colagenasa, así como a la centrifugación en gradiente de densidad que se hace posteriormente.

En un segundo caso de aislamiento, se logró enriquecer manualmente el cultivo con ductos biliares (**figura 19**). Se sembraron aproximadamente 50 ductos en 3.8 cm², siendo una densidad baja comparada con la recomendada en Broutier y cols. (2016) y logramos observar que los ductos biliares se disociaron y formaron monocapas, sin embargo, no se observó proliferación y después de 20 días se detuvo el cultivo pues las células mostraron una morfología más alargada.

Para comprobar la capacidad proliferativa de las células que rodean a los ductos biliares, es necesario optimizar el procedimiento de aislamiento de manera que pueda aislarse una mayor cantidad de ductos. Por otra parte, el protocolo de Broutier y cols. (2016) está adaptado para el establecimiento de organoides en cultivo, en éste se sugiere que para una mejor formación de los organoides, los ductos biliares deben sembrarse íntegros, de lo contrario se recomienda sembrar las células en presencia de factores de crecimiento específicos, pero para el caso de cultivos en monocapa la disociación de los ductos podría darnos un mejor resultado, pues como

se mencionó al sembrarlos completos se observó la disociación de éstos y la aparición de parches de células distantes entre sí. La obtención de una suspensión celular nos permitiría sembrar de manera uniforme, esto es importante porque la densidad celular tiene un efecto considerable en la supervivencia, crecimiento y función de las células en cultivo; un número mínimo de células por placa es requerido para el acondicionamiento del medio, lo cual ocurre debido a la acumulación de intermediarios metabólicos, moléculas desintoxicantes, y factores endógenos que estimulan el crecimiento y desarrollo (Honegger, 1999).

Adicionalmente, si deseamos aislar una población de células hepáticas con capacidad de proliferar, el medio seleccionado debe soportar tanto la supervivencia como la proliferación celular. Un medio de cultivo típico contiene una mezcla de aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, glucosa y suero como fuente de factores de crecimiento. También, las células animales a diferencia de las células bacterianas crecen generalmente unidas a una superficie sólida, debido a la importancia que tienen las proteínas de superficie, que las células usan para unirse a otras células y a componentes de la matriz extracelular, tales como colágena, laminina o fibronectina y por ello en algunos cultivos, la superficie de crecimiento es recubierta con alguna proteína de matriz extracelular (Lodish et al., 2016). Para el caso de hepatocitos, se han descrito como factores de crecimiento críticos el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, por sus siglas en inglés), el factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés), el factor de crecimiento transformante alfa ($TGF\alpha$), entre otros (Ramboer et al., 2014).

De acuerdo con lo anterior, nosotros buscamos optimizar las condiciones de cultivo de manera que pudiéramos conservar durante un período largo células hepáticas capaces de proliferar. Se hicieron modificaciones al medio de cultivo utilizado normalmente para cultivos primarios de hepatocitos (William's E sin glutamina suplementado con BSA 0.02%, D-galactosa 1g/L, Prolina 150mg/10ml, piruvato de sodio 100mM, HEPES 1M, glutamina 200mM, GPS 1X, FBS 10%), el cual es llamado medio modificado en el escrito, a este medio se le suplementó con BSA 0.02%, HEPES 1M, glutamina 200mM, GPS 1X y FBS 10% de acuerdo al medio de referencia, pero además se adicionó dexametasona 10 μ M e insulina-transferrina-selenito de sodio 1X, estos dos componentes fueron adicionados pues son comunes en protocolos para mantenimiento de hepatocitos inmortalizados (Tsoruga et al., 2008; Levy et al., 2015) o células troncales hepáticas (Tanaka et al., 2012). También se recubrió con colágena tipo I el fondo de

las placas donde se sembraron las células. En las **figuras 16-19** se puede observar la morfología de las células en medio modificado y cajas recubiertas con colágena, en general puede decirse que observamos que las células en estas condiciones llegaron a confluencia en un menor tiempo que las células con medio normal y cajas sin recubrir, y en cuanto a la morfología de las células se puede ver una morfología más redondeada y tamaño reducido, esto sugiere que las modificaciones en las condiciones de cultivo permiten conservar de mejor manera los cultivos, es necesario hacer ensayos posteriores una vez que el aislamiento se haya optimizado para comprobar que las condiciones son apropiadas, y de no ser así probar si la adición de factores de crecimiento (como HGF y/o EGF) mantiene a las células en un mejor estado.

Poder acceder a las poblaciones progenitoras dentro del hígado adulto tiene gran relevancia pues estas células tienen la capacidad intrínseca de auto-renovación y de diferenciar a los tipos celulares presentes en los tejidos adultos manteniendo su integridad genética y compromiso a su tejido de origen (Huch et al., 2015). Una vez estandarizado el protocolo de aislamiento y las condiciones de cultivo podría intentarse la transfección de los oncogenes E6 y E7 a estas células con la finalidad de inmortalizarlas y así obtener una fuente de células progenitoras de hepatocitos. El procedimiento de transfección debería reconsiderarse pues con la inyección hidrodinámica como se vio, las células blanco son las que se encuentran cercanas a la vena central de cada lobulillo hepático, una región distante de las poblaciones progenitoras que rodean a los ductos biliares. Finalmente, después obtener células progenitoras y poder mantenerlas en cultivo deberán identificarse las condiciones adecuadas para que se puedan obtener hepatocitos diferenciados. Los genes y vías moleculares que regulan el desarrollo embrionario del hígado incluyen las vías de FGF, HGF, Wnt, BMP, RA y TGF β que promueven la proliferación, migración y supervivencia de las células (Broutier et al., 2016), por lo que la adición de ciertos factores relacionados a estas vías podría promover la diferenciación hepática, en protocolos de diferenciación de células es común la adición de FGF y BMP al medio de cultivo (Ishikawa et al., 2012) por lo que podría considerarse el uso de tales factores; además, en caso de que se decida transfectar a las células con el transposón PB-E6/E7 para que se permita la diferenciación celular se tendría que dejar de inhibir la expresión de los oncogenes para evitar que las células sigan proliferando. Y una vez llevado a cabo un protocolo de diferenciación se tendría que evaluar la expresión de marcadores de hepatocitos maduros y las actividades características de estas células, en específico la actividad de catalasa y del peroxisoma.

X. CONCLUSIONES

Logramos transfectar mediante inyección hidrodinámica de la vena lateral de la cola los oncogenes E6 y E7 de HPV tipo 16 y se logró cuantificar la proporción aproximada de células que introducen los plásmidos inyectados. Se encontró que alrededor de un 31% de hepatocitos puede ser transfectado después de la inyección, y hasta un 89% de las células pueden introducir al menos dos plásmidos a la vez. También se observó que las regiones cercanas a la vena central en el lobulillo hepático contienen una mayor proporción de células transfectadas.

La transfección con 1 μ g de plásmido total (plásmido reportero + plásmido con transposasa) permitió monitorear la presencia de los plásmidos por 66 días, sugiriendo que una menor cantidad de DNA permite también la transfección del hígado y posiblemente también la integración de los transposones en el genoma de las células hepáticas.

Igualmente observamos que al transfectar con una proporción 1:2 (plásmido reportero: plásmido con transposasa) es posible monitorear los plásmidos por un período más largo, sugiriendo que el aumento de la proporción de plásmido con transposasa favorece la integración de los transposones.

En cuanto a la obtención de hepatocitos inmortalizados, en este estudio pudimos observar que la transfección con los oncogenes E6 y E7, sí promueve la proliferación de los hepatocitos, sin embargo, no logró mantenerse una población de hepatocitos hasta obtener una línea celular

XI. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos y presentados en esta tesis se tienen diferentes perspectivas de trabajo.

En primer lugar, con las observaciones sobre la cantidad de DNA y proporción de plásmido con transposasa, podrían realizarse más ensayos de transfección para estudiar si menores cantidades de DNA total y mayores proporciones de transposasa permiten la integración del transposón con E6 y E7 en el genoma de las células hepáticas.

Una vez realizada la transfección mediante inyección hidrodinámica de la vena lateral de la cola podría inducirse la expresión de los oncogenes *in vivo*, administrando doxiciclina al ratón antes de obtener células para cultivo *in vitro* lo cual podría permitir que las células que integraron los oncogenes proliferen y así tener una proporción mayor de éstas al aislarlas para su cultivo.

Por otra parte, las células progenitoras hepáticas una vez aisladas podrían transfectarse *in vitro* con los plásmidos de interés (PB-E6/E7 y plásmido Hyper) pudiendo obtener eficiencias mayores de transfección y con ello mayor probabilidad de obtener células hepáticas inmortalizadas.

Con el fin de permitir la expresión estable de los oncogenes E6/E7 en las células hepáticas se podría considerar el uso de herramientas de edición de genoma que permitan la inserción de estos genes en una región del genoma que se encuentre transcripcionalmente activa, debido a que el potencial de crecimiento de las células hepáticas es limitado, se buscaría utilizar herramientas de edición que funcionen más eficientemente en células que no se encuentran en división, como la estrategia HITI (del inglés homology-independent targeted integration) recientemente descrita la cual es de gran interés pues aprovecha el sistema CRISPR/Cas9 para promover la inserción de secuencias de interés mediante una vía de reparación que se encuentra activa en todo tipo de células (la vía de unión de extremos no homólogos) (Suzuki et al., 2017).

Una vez propagadas las células progenitoras se buscaría permitir su diferenciación a hepatocitos maduros y probar su funciones metabólicas, en específico evaluar la presencia de peroxisomas y la actividad de enzima catalasa.

XII. REFERENCIAS

- Broutier, L., Andersson-Rolf, A., Hindley, C., Boj, S., Clevers, H., Koo, B., Huch, M. (2016) Culture and establishment of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation. *Nature Protocols*, 11 (9), 1724-1743
- Budker, V. G., Subbotin, V. M., Budker, T., Sebestyen, M. G., Zhang, G., and Wolff, J. A., (2006) Mechanism of plasmid delivery by hydrodynamic tail vein injection. II. Morphological studies. *The Journal of Gene Medicine*. 8, 874-888.
- Bulera, S. J., Haas, M. J., Sattler, C. A., Li, Y. and Pitot, H. (1997) Cell lines with heterogeneous phenotypes result from a single isolation of albumin-sv40 T-antigen transgenic rat hepatocytes. *Hepatology*, 25(5), 1192-1203
- Burkard, A., Dähn, C., Heinz, S., Zutavern, A., Sonntag-Buck, V., Maltman, D., Przyborski, S., Hewitt, N. and Braspenning, J. (2012) Generation of proliferating human hepatocytes using upcyte® technology: characterisation and applications in induction and cytotoxicity assays, *Xenobiotica*, 42(10), 939-956
- Cardinale, V., Wang, Y., Carpino, G., Mendel, G., Alpini, G., Gaudio, E., Reld, L. M. and Alvaro, D. (2012) The biliary tree—a reservoir of multipotent stem cells. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 9, 231-240
- Cascio, S. (2001) Novel strategies for immortalization of human hepatocytes. *Artificial Organs*, 25 (7), 529-538
- Castell, J. V., Jover, R., Martinez-Jimnez, C. P. and Gmez-Lechn, M. J. (2006) Hepatocyte cell lines: their use, scope and limitations in drug metabolism studies. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2(2), 183-212
- Celton-Morizur, S. and Desdouets, C. (2010) Polyploidization of liver cells. In Poon R. Y. (Editor), *Polyploidization and Cancer* (pp. 123-135), USA, Springer New York.
- Colnot, S. and Perret, C. (2011) Liver zonation. In Monga, S. (Editor), *Molecular Pathology of Liver Disease*. (pp. 7-16) USA, Springer US.
- Corlu, A. and Loyer, P. (2012) Regulation of the G1/S transition in hepatocytes: involvement of the cyclin-dependent kinase Cdk1 in the DNA replication. *International Journal of Hepatology*, 2012, 17.
- Etienne, P.L., Baffet, G., Desvergne, B., Boissard-Rissel, M.m Glaise, D., Guguen-Guillouzo, C. (1988) Transient expression of c-fos and constant expression of c-myc in freshly isolated and cultured normal adult rat hepatocytes. *Oncogene Research*, 3 (3), 255-262.
- Furuyama, K., Kawaguchi, Y., Akiyama, H., Horiguchi, M., Kodama, S., Kuhara, T., et al. (2011) Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nature Genetics*, 43, 34-41
- Godoy, P., Hewitt, N. J., Albrecht, U., Andersem, M. E., Ansari, N., Bhattacharya, S., et al. (2013) Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in

- investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Archives of Toxicology* (Vol. 87).
- Guguen-Guillouzo, C. y Guillouzo, A. (2010) General review on in-vitro hepatocyte models and their applications. En Maurel, P. (Editor), *Methods and Protocols*. 1-40. USA, Human press
- Han, W. G., Unger, W. W., Wauben M. H. (2008) Identification of the immunodominant CTL epitope of EGFP in C57BL/6 mice. *Gene Therapy*, 15, 700-701.
- HEPAMAP. A roadmap for hepatology research in Europe: An overview for policy makers. Disponible en: http://www.easl.eu/medias/EASLimg/News/3f9dd90221ef292_file.pdf. Último acceso: abril 2018
- Honegger, P. (1999) Overview of cell and tissue culture techniques. *Current Protocols in Pharmacology*, 12, 12. 1. 1-12.1.12
- Huch, M. and Koo, B. K. (2015) Modeling mouse and human development using organoid cultures. *Development*, 142, 3113-3125.
- Ishikawa, T., Hagiwara, K. and Ochiya, T. (2012) Generation and Hepatic differentiation of human iPS cells. In Ochiya, T. (Editor) *Liver Stem Cells. Methods and Protocols*, (pp. 103-114), USA, Springer.
- Levy, G., Bomze, D., Heinz, D., Ramachandran, S. D., Noerenberg, A., Cohen, M., Shibolet, O., Sklan, E., Braspenning, J. and Nahmias, Y. (2015) Long-term culture and expansión of primary human hepatocytes. *Nature biotechnology*, 33(12), 1264-1271.
- Li, J., Li, L. J., Cao, H.C., Sheng, G.P., Yu, H.-T., Xu, W. and Sheng, J.F. (2005) Establishment of highly differentiated immortalized human hepatocyte line with simian virus 40 large tumor antigen for liver based cell therapy. *American Society of Artificial Internal Organs Journal*, 51, 262-268
- Limberis, M. P., Bell, C. L., and Wilson, J. M. (2009) Identification of the murine firefly luciferase-specific CD8 T-cell epitopes. *Gene Therapy*, 16, 441-447.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher A., Ploegh, H., Amon, A., Martin, K. (2016) *Molecular Cell Biology*, USA, W. H. Freeman and Company
- Loyer, P., Cariou, S., Glaise, D., Bilodeau, M., Baffet, G., y Guguen-Guillouzo, C. (1996) Growth factor dependence of progression through G1 and S phases of adult rat hepatocytes *in vitro*. Evidence of a mitogen restriction point in mid-late G1. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 11484-11492.
- Miyajima, A., Tanaka, M. and Itoh, T. (2014) Stem/Progenitor Cells in Liver Development, Homeostasis, Regeneration, and Reprogramming. *Cell Stem Cell*. 14, 561-574
- Mossine, V. V., Waters, J. K., Hannink, M. and Mawhinney, T. P. (2013) *piggyBac* transposon plus insulators overcome epigenetic silencing to provide for stable signaling pathway reporter cell lines. *Plos One*, 8(12),1-12.
- Muñoz-López, M. and García-Pérez, J. L. (2010) DNA transposons: nature and applications in genomics. *Current Genomics*, 11, 115-128.

- Ramboer, E., De Craene, B., De Kock, J., Vanhaecke, T., Berx, B., Rogiers, V. and Vinken, M. (2014) Strategies for immortalization of primary hepatocytes. *Journal of Hepatology*, 61, 925-943
- Recillas-Targa, F. (2006) Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. *Molecular Biotechnology*, 34, 337-354.
- Rhem J., et al. (2013) Global burden of alcoholic liver diseases. *Journal of Hepatology*. 59, 160-168.
- Rogers, A. B. and Dintzis, R. Z. (2012) Liver and gallbladder. In Treuting, P. M. and Dintzis, S. M. (Editors), *Comparative Anatomy and Histology. A mouse and human atlas.* (pp.193-201), USA, Academic Press.
- Saridey, S., Liu, L., Doherty, J., Kaja, A., Galvan, D., Fletcher, B., and Wilson, M. (2009) *PiggyBac* transposon-based inducible gene expression *in vivo* after somatic cell gene transfer. *Molecular Therapy*. 17 (12), 2115-2120
- Sebestyén, M. G., Budker, V. G., Budker, T., Subbotin, V. M., Zhang, G., Monahan, S., Lewis, D. L., Wong, S. C., Hagstrom, J. E., Wolff, J. A. (2006) Mechanism of plasmid delivery by hydrodynamic tail vein injection. I. Hepatocyte uptake of various molecules. *The Journal of Gene Medicine*. 8, 852-873
- Suda, T., Gao, X., Stolz, D. B., Liu, D. (2007) Structural impact of hydrodynamic injection on mouse liver. *Gene Therapy*, 14, 129-137.
- Suda, T. and Liu, D. (2007) Hydrodynamic Gene Delivery: Its Principles and Applications. *The Molecular Therapy*. 15 (12), 2063-2069
- Tanaka, M. and Miyajima, A. (2012) Identification and isolation of adult liver stem/progenitor cells. En Ochiya, T. (Editor), *Liver Stem Cells. Methods and protocols* (pp. 25-32), USA, Human Press.
- Tsoruga, Y., Kiyono, T., Matsushita, M., Takahashi, T., Kasai, H., Matsumoto, S. and Todo, S. (2008) Establishment of immortalized human hepatocytes by introduction of HPV16 E6/E7 as cell sources for liver cell-based therapy. *Cell Transplantation*. 17, 1083-1094
- Tsung, A. and Geller, D. (2011) Gross and cellular anatomy of the liver. En Monga, S. (Editor), *Molecular Pathology of Liver Disease.* (pp. 3-6) USA, Springer US.
- Watanabe, N., Odagiri, H., Totsuka, E. and Sasaki, M. (2004) A new method to immortalize primary cultured rat hepatocytes. *Transplantation Proceedings*, 36, 2457-2461
- Widman, L. E., Golden J. J. and Chasin L. A. (1979) Immortalization of normal liver functions in cell culture: rat hepatocyte-hepatoma cell hybrids expressing ornithine carbamoyltransferase activity. *Journal of Cellular physiology*, 100, 391-400
- Wilson, M. H., Coates, C. J. and George Jr, A. L. (2007) *PiggyBac* transposon-mediated gene transfer in human cells. *Molecular Therapy*, 15 (1), 139-145
- Woodworth, C. D. and Isom, H. (1987) Transformation of differentiated rat hepatocytes with adenovirus and adenovirus DNA. *Journal of Virology*, 61(11), 3570-3579
- World Health Organization. Cancer. Disponible en:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Último acceso: abril 2018.

Wu, Y., Ma, S., Liu, Y., Lei, L., Hu, B., Liu, H. (2015) The dynamic impact of hydrodynamic gene transfer on the immune system. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8 (6), 8540-8550.

Zhao, S., Jiang, E., Chen, S., Gu, Y., Shangguan, A. J., Lv, T., Luo, L. and Yu, Z. (2015) PiggyBac transposon vectors: the tools of the human gene encoding. *Translational lung cancer research*, 5 (1), 120-125.

XIII. ANEXO

Anexo 1. Soluciones utilizadas en este trabajo

Solución salina 0.9%

Para 100 ml

- NaCl 0.9 g

Aforar a 100 ml con agua destilada

Esterilizar y filtrar con filtro de 0.22µm

Gelatina 0.7%

Para 100 ml

- Gelatina de piel de porcino 0.7 g

Calentar para disolver

Aforar a 100 ml con agua destilada

PBS 1X pH 7.4

Para 1L (g/L)

- NaCl 8
- KCl 0.2
- Na₂HPO₄ 1.44
- KH₂PO₄ 0.24

Aforar a 1L con agua destilada

HBSS 1X

Para 1L (g/L)

- KCl 0.4
- KH₂PO₄ 0.06
- NaHCO₃ 0.35

- NaCl 8
- Na₂HPO₄ 0.046
- D-Glucosa 0.5

Solución de colagenasa 0.1%

Para 100ml

- HEPES 1M pH 7.4 1ml
- Colagenasa tipo 1 2.7x10⁴ U 0.1g

Aforar a 100 ml con medio William's E sin glutamina

Filtrar con filtro 0.45µm

Medio de adhesión

Para 100ml

- HEPES 1M pH 7.4 1.8ml
- BSA 0.02% 20mg
- D-galactosa 1g/L 100mg
- Prolina 150mg/10ml 200µl
- Glutamina 200mM 1ml
- GPS 1X 1ml
- Suero fetal bovino 10% 10ml

Aforar a 150ml con medio William's E sin glutamina.

Medio modificado

Para 100 ml

- BSA 0.02% 20mg
- HEPES 1M 1.8ml
- Glutamina 200mM 1ml
- GPS 1X 1ml
- Suero fetal bovino 10% 10ml
- Dexametasona 10µM 100µl
- Insulina-transferrina-selenito de sodio 1X 1ml

Aforar a 100 ml con medio William's E sin glutamina

Solución de Percoll isotónica

Para 10 ml

- HBSS 10X 1ml
- Solución de Percoll (GE/Healthcare) 9ml

Medio de lavado

Para 100 ml

- Suero fetal bovino 1% 1ml
- GPS 1% 1ml

Aforar a 100 ml con medio William's E sin glutamina

Solución de digestión

Para 10ml

- Colagenasa 1.25mg/ml 12.5mg
- Dispasa II 1.25mg/ml 12.5mg
- DNasa I 0.1mg/ml 1mg

Aforar a 10 ml con medio de lavado