

◆ MANUSCRITO ORIGINAL

Aislamiento de células ovas de hígado fetal en condiciones fisiológicas a partir de su nicho natural

José Torres-Fuenzalida,¹ Cynthia Castronuovo,¹ Alejandra Hidalgo,¹ Luis A Parada,² Alicia Lorenti¹

¹ Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental, Hospital Italiano de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

² Instituto de Patología Experimental, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Salta, Salta, Argentina.

Acta Gastroenterol Latinoam 2011;41:36-46

Resumen

El hígado se caracteriza por poseer una notable capacidad de proliferar y autorregenerarse. En la situación de daño hepático leve o moderado la regeneración es llevada a cabo por los hepatocitos. Sin embargo, cuando el daño hepático es demasiado extenso y el número de hepatocitos maduros residuales no es suficiente como para producir la regeneración o cuando su proliferación está inhibida, la regeneración hepática depende de la activación de células troncales hepáticas, que dan origen a las células ovas. La población de células troncales hepáticas es escasa en el hígado normal y se considera que apenas supera el 1% del total de células en el hígado fetal. Por esta razón es necesario aislarlas y enriquecerlas para su estudio. Se han desarrollado con este fin modelos de daño hepático que permiten aislar células ovas luego de la inducción de daño hepático masivo. En este trabajo presentamos una metodología simple que permite aislar células ovas a partir de hígado fetal de rata sin previa inducción de daño hepático. El uso del antígeno específico de células ovas 2 (OC2) y antígeno específico de células ovas 3 (OC3) como marcadores moleculares permitió la caracterización altamente específica de esta población celular. Por otra parte, el cultivo *in vitro* en presencia de HGF condujo a un sustancial enriquecimiento de la población de células ovas.

Palabras claves. Células ovas, regeneración hepática, células troncales hepáticas.

Correspondencia: Alicia Lorenti

Dirección actual: Unidad de Traducción Clínica -Ingeniería de Tejidos-, Universidad Austral, Presidente Perón 1500 (CP 1635), Pilar, Argentina
E-mail: alicia.lorenti@gmail.com

Isolation of fetal liver oval cells in physiologic conditions from their natural niche

Summary

The liver is characterized by a remarkable ability to proliferate and self-renew. In the situation of mild or moderate liver damage, hepatocytes carry out regeneration. Nevertheless, when liver damage is far too much extensive and the number of residual mature hepatocytes is not enough to accomplish regeneration, or likewise when mature hepatocyte proliferation is inhibited, hepatic regeneration depends on the activation of liver stem cells that give rise to oval cells. The population of liver stem cells is scant in normal liver. It is considered that in fetal liver this population is just over 1% of the cells. For this reason, it is necessary to isolate and enrich them for their study. With this goal several models of hepatic damage that permit the isolation of oval cells after the induction of massive hepatic injury have been developed. Here we present a simple methodology that allows the isolation of oval cells from rat fetal liver without prior induction of liver damage. The use of oval cell 2 (OC2) and oval cell 3 (OC3) antigens as molecular markers allowed the highly precise characterization of this cell population. Furthermore, the *in vitro* culture in presence of HGF yielded a substantial enrichment of the oval cell population.

Key words. Oval cells, hepatic regeneration, liver stem cells.

Abreviaturas.

TGF- β : factor de crecimiento transformante.

HGF: factor de crecimiento de hepatocitos.

OC2: antígeno específico de células ovas 2.

OC3: antígeno específico de células ovas 3.

El hígado de los vertebrados se desarrolla a partir del endodermo del intestino anterior.¹ Cuando el endodermo hepático está diferenciado y el brote hepático comienza a crecer, las células troncales hepáticas dan origen a los denominados hepatoblastos.² Estos, a su vez, tienen la capacidad de diferenciarse en los dos linajes epiteliales del hígado: hepatocitos y colangiocitos, las células de los ductos biliares.³ Diversos estímulos moleculares participan en el proceso de embriogénesis y diferenciación celular, por ejemplo las señales emanadas de la vía *Notch/Jagged*⁴ y/o factores de crecimiento tales como TGF- β (factor de crecimiento transformante) y HGF (factor de crecimiento de hepatocitos). Estas moléculas y sus receptores celulares regularían el destino de diferenciación que tendrían las células epiteliales hepáticas, integrando de este modo un sistema de regulación que controla la bipotencialidad.^{5,6} Las células troncales hepáticas en el adulto se han encontrado asociadas a la zona de transición entre el epitelio hepático y el epitelio biliar, en los llamados conductos de Hering,^{7,8} constituyendo éste su nicho natural en el hígado adulto.

El hígado es, por otro lado, el principal órgano hematopoyético durante el período embrionario. Una vez que el divertículo hepático emerge a partir del tubo intestinal en desarrollo, las células hematopoyéticas migran allí desde el saco vitelino y proliferan formando islotes sanguíneos, dando lugar al comienzo de la segunda fase de la hemopoyesis, conocida como fase hepática.^{9,10} Cerca del nacimiento, las células hepáticas alcanzan su madurez y adquieren un estado quiescente, mientras que la hemopoyesis es exportada a la médula ósea y otros órganos linfoides, dejando agotados los nichos hematopoyéticos hepáticos.¹¹

El hígado se caracteriza por poseer una notable capacidad de proliferar y autorregenerarse.¹² En la situación de daño hepático leve o moderado la regeneración es llevada a cabo por los hepatocitos maduros y todos los otros tipos celulares hepáticos diferenciados y no depende, al menos directamente, de la existencia de células progenitoras o células troncales.¹²⁻¹⁴ Sin embargo, cuando el daño hepático es demasiado extenso y el número de hepatocitos maduros residuales no es suficiente como para producir la regeneración, o bien cuando su proliferación está inhibida, como ocurre en presencia de carcinógenos, hepatotoxinas y/o infecciones virales, la regeneración hepática depende de la activación de células troncales hepáticas, que dan origen a las llamadas

células ovales.^{15,16} Éstas deben su nombre a la morfología ovoide de su núcleo, son células pequeñas (7-10 μm), con citoplasma escaso y basófilo, nucleolos visibles y alta relación núcleo/citoplasma.¹⁷⁻²¹ Tienen alta capacidad clonogénica y son bipotenciales, generando los dos tipos de células principales del hígado: hepatocitos y colangiocitos.²²⁻²⁵ Las células ovales expresan una variedad de marcadores, muchos de ellos compartidos con las células progenitoras hemopoyéticas (CD117/c-kit, CD133 y Thy-1), con las células ductales (citoqueratina 19, dipeptidil-peptidasa IV) y con los hepatocitos (albúmina, glucosa-6-fosfatasa y α 1-antitripsina). La presencia o ausencia de algunos de estos marcadores está relacionada con la especie animal de donde provienen las células.²⁶ Se han desarrollado anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos que distinguen entre hepatocitos y células ovales. Los más reconocidos son OC2, OC3 (antígenos específicos de células ovales 2 y 3, respectivamente)¹⁹ y OV6.²⁷ Durante la regeneración hepática, las células ovales se originan en la región periportal (alrededor de los canales de Hering) e invaden el parénquima por completo, dando lugar a hepatocitos maduros como producto de su diferenciación.^{28,29}

La regeneración hepática recapitula muchos de los eventos que caracterizan el proceso de organogénesis, desde los cambios observados en la arquitectura hepática³⁰ hasta el perfil de expresión de genes.³¹⁻³⁴ Dentro de este contexto, planteamos la hipótesis según la cual existe esencialmente una única población de células troncales hepáticas que sería responsable tanto de la organogénesis hepática, como de la respuesta al daño hepático grave o reiterado. Esta población, que da origen a las células ovales, es escasa en el hígado normal, y se considera que en el hígado fetal apenas supera el 1% del total de células.²

Para estudiar las características y explorar las capacidades de las células ovales es necesario aislarlas y enriquecerlas. Para ello es importante, no solo contar con un método sencillo de aislamiento, sino también seleccionar el estadio fetal en el que la población de células hematopoyéticas que acompañan a la población de células ovales sea el menor posible. El objetivo de este trabajo es presentar una metodología que permite aislar células ovales a partir de hígado fetal de rata sin previa inducción de daño hepático. Además, el estudio de la evolución de la hemopoyesis en el hígado fetal en este trabajo permite seleccionar el estadio fetal más apropiado para optimizar aún más el aislamiento. El uso de OC2 y

OC3 como marcadores moleculares permite la caracterización altamente específica de células ovas, y el cultivo *in vitro* en presencia de HGF conduce a un sustancial enriquecimiento de esta población.

Métodos

Animales utilizados

Se realizaron 18 experimentos de aislamiento de células ovas con la totalidad de los fetos de sendas ratas Wistar preñadas (18-21 dpc). Para estudiar la evolución de la fase hepática de la hemopoiesis, se utilizaron fetos de ratones hembras C57BL/6 preñadas en distintos tiempos de gestación y neonatos de un día.

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

Evolución de la hematopoyesis en el hígado fetal

Para estimular el crecimiento de células hemopoyéticas, tanto eritroides como granulocíticas-macrofágicas, las fracciones se cultivaron en medio de cultivo semi-sólido: IMDM (*Gibco*, Maryland, EE.UU.) con 30% de suero fetal bovino (*Gibco*), 5ng/ml de PIXY (proteína de fusión de GM-CSF, IL-3) (gentilmente donado por el Dr Messner, Toronto, Canadá), 1 U/ml de eritropoyetina (*Sidus*, Argentina) y 0,3% de Bacto agar (*Difco Laboratories*, Michigan, EE.UU.), durante 10 días.

Aislamiento de células

Los hígados de todos los fetos de una misma rata se procesaron en forma conjunta. Una vez obtenidos, los hígados fetales fueron lavados dos veces con HBSS (*Gibco*) y digeridos con Colagenasa I 0,05% (*Gibco*) durante 1 hora con agitación, a 37 °C (Figura 1). Previa eliminación de los glóbulos rojos con ácido acético 4% (dilución 1/10), se realizó un recuento de las células totales y de las viables mediante el método de exclusión con azul tripan. Además, se determinó la proporción de glóbulos rojos remanentes en la muestra de células aisladas.

Separación de células

La separación de los distintos tipos celulares presentes en la suspensión de células totales obtenida se

hizo mediante centrifugación diferencial. Las células se depositaron sobre un gradiente discontinuo de Percoll (50 y 60%) (*Amersham Biosciences AB*, *Uppsala, Suecia*) y se centrifugaron a 680 g durante 30 minutos. Las distintas fracciones obtenidas se recuperaron en tubos separados y se utilizaron para su caracterización inmunofenotípica y/o cultivo *in vitro* (Figura 1).

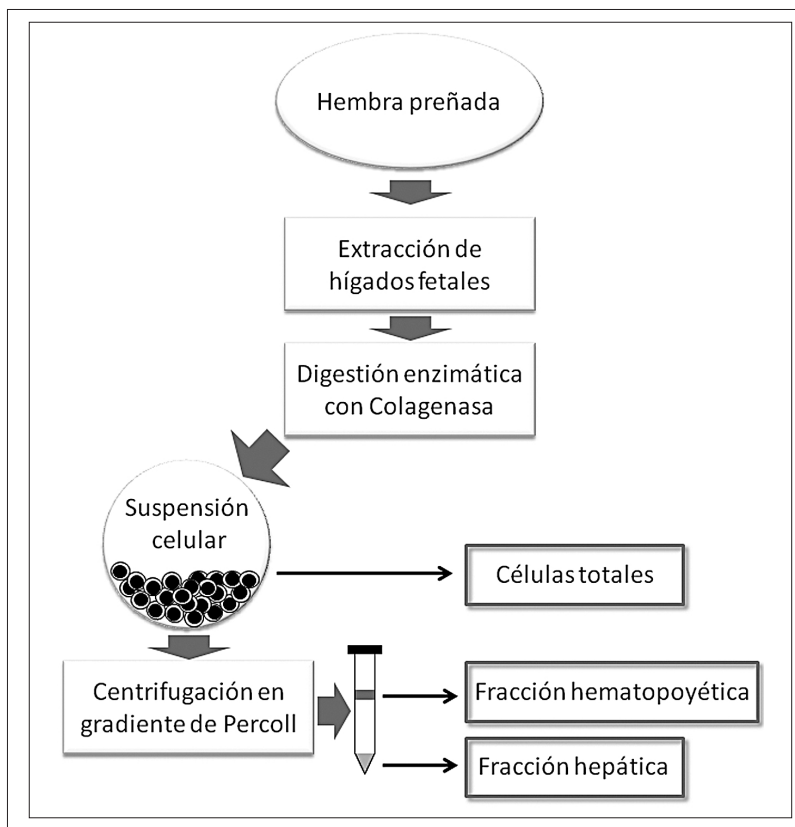
Cultivo de células

La suspensión de células totales recién aisladas y la fracción inferior del *pellet* del gradiente de Percoll se sembraron a razón de $1,5 \times 10^5$ células/cm² en placas de cultivo de 35 mm y fueron cultivadas en medio E de Williams (*Gibco*) suplementado con 25mM de *buffer* de ácido hidroxietil-piperazina-etanosulfónico (HEPES) (*Gibco*), 20% de suero fetal bovino (*Gibco*), antibióticos-antimicóticos (100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 0,25 µg/ml de anfotericina B) (*Gibco*), 50 mg/ml de L-glutamina (*Gibco*), 1 mM de piruvato de sodio (*Gibco*), 5 µg/ml de insulina (*Gibco*), 0,4 µg/ml de hidrocortisona (*Sigma*, Missouri, EE.UU.), 5 µg/ml de transferrina (*Gibco*), 5 mg/ml de selenito de sodio (*Gibco*) y 5 ng/ml de EGF (*Gibco*), en incubadora a 37 °C y 5% de CO₂. Los cultivos de células de la fracción inferior del gradiente de Percoll fueron suplementados con 2,5 ng/ml de HGF (*Abcam*, Massachusetts, EE.UU.). Eventualmente, las colonias celulares fueron subcultivadas individualmente utilizando cilindros de clonado (*Sigma*), según indicaciones del fabricante.

Inmunocitoquímica e inmunofluorescencia

Para la identificación del tipo celular, las células presentes en las distintas fracciones se cultivaron directamente sobre cubreobjeto. Los preparados celulares se lavaron en PBS y fueron fijados con formaldehído 4% en PBS. Posteriormente se permeabilizaron en PBS 0,1% Tritón X-100 durante 10 minutos y se incubaron con una solución del anticuerpo primario (ver lista de anticuerpos más abajo) durante 1 hora en cámara húmeda a 37 °C. Transcurrido este período las preparaciones se lavaron con PBS, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente y se revelaron colorimétricamente con DAB (*Dako*, California, EE.UU.) o con anticuerpos o proteínas unidos a FITC o *Texas Red*, según cada caso, en tampón PBS durante 60 minutos en cámara húmeda a 37 °C. Finalmente se lavaron en PBS durante 5 minutos y se montaron con Vectashield

Figura 1. Esquema del método utilizado para el aislamiento y fraccionamiento de células: a partir de hígados fetales se obtiene una suspensión de células aisladas y mediante centrifugación en un gradiente de Percoll se separan dos fracciones.



(Vector Laboratories Inc, California, EE.UU.) La observación de las preparaciones e imágenes de 8 bits por canal se realizaron con un microscopio Nikon eclipse E400 equipado con lámpara de mercurio y filtros correspondientes. En todos los casos se realizaron controles en paralelo realizando el mismo protocolo pero reemplazando el anticuerpo primario por PBS. Para identificar los núcleos celulares se utilizó hematoxilina o Hoechst (Sigma).

Se utilizaron los siguientes grupos de anticuerpos:

1. Las células totales recién aisladas sin cultivar y ambas fracciones obtenidas luego del gradiente de Percoll fueron sometidas a tinciones con un pool de anticuerpos anti-células progenitoras hematopoyéticas (CD5, CD45R, CD11b, *Myeloid Differentiation Antigen* Gr-1, TER 119, 7/4) (Stem Cell Technologies Inc, Vancouver, Canadá, dilución 1/50) y también con un anticuerpo dirigido contra un marcador citoplasmático específico para hepatocitos maduros "hepatocyte" (clon OCH1E5, Dako Corporation, California, EE.UU., dilución 1/25).

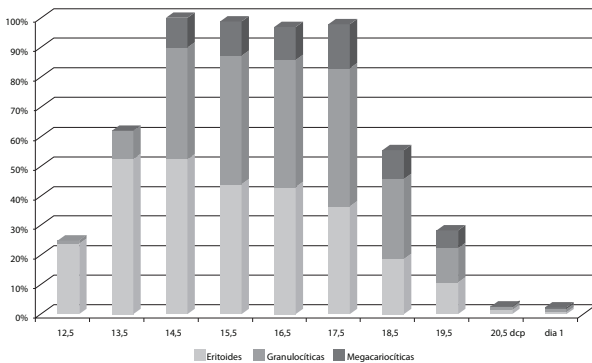
2. Las células totales cultivadas y la fracción inferior (células ovas) del gradiente también cultivada, fueron teñidas con anticuerpos anti-OC2 y OC3 (donación del Dr Hixson, Rhode Island, EE.UU., dilución 1/100). La fracción inferior obtenida del gradiente fue además identificada con un anticuerpo anti Thy-1 (clon H-110, Santa Cruz Biotechnology, California, EE.UU., dilución 1/10).

Resultados

Debido a que las células ovas y las células troncales hematopoyéticas comparten características fenotípicas (similar expresión de algunos marcadores), funcionales (alta capacidad proliferativa) y de localización (dentro del hígado fetal durante el desarrollo), fue imprescindible estudiar la fase hepática de la hematopoyesis para poder identificar el momento del desarrollo donde ésta decae y de esta manera tener una suspensión de células inicial con la menor cantidad de células progenitoras hematopoyéticas posible. Los experimentos realizados en ratones per-

mitieron estudiar la fase hepática de la hemopoyesis mediante el análisis de las colonias obtenidas a partir de células hematopoyéticas derivadas de hígados fetales de distintos tiempos de gestación. Esto permitió observar que existe una primera fase eritroide, luego otra granulocítica y finalmente una megacariocítica, determinándose que la hematopoyesis en el hígado de roedores alcanza su máximo entre los días 14,5 y 17,5 de gestación y luego comienza a decaer. (Figura 2)

Figura 2. Evolución de la hematopoyesis en el hígado fetal de ratones: porcentaje UFCs pertenecientes a cada linaje, normalizado al número mayor de colonias totales (189 colonias en 14,5dpc).



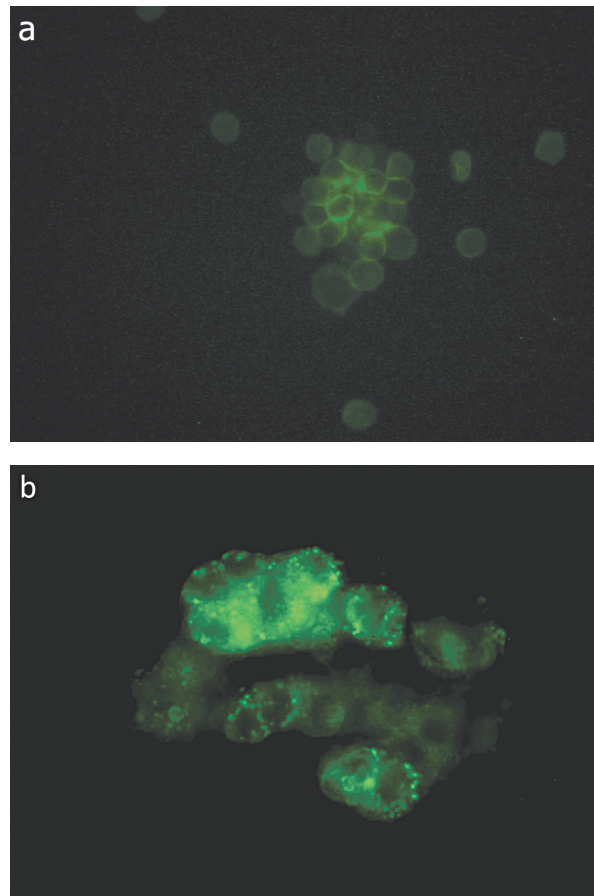
Sobre la base de los resultados mencionados, y con el objetivo de obtener una suspensión de células hepáticas con el menor contenido posible de células hematopoyéticas, se emplearon fetos de rata de 18 a 21 días de gestación. Se extrajeron 6 a 14 fetos en cada experimento y de éstos se procesaron la totalidad de los hígados de acuerdo al protocolo descrito anteriormente.

El análisis citométrico reveló que los glóbulos rojos constituían 65,34% del total de células presentes en la suspensión inicial. Por lo tanto, descontando los glóbulos rojos, se obtuvieron en promedio $5,63 \times 10^7$ células totales por hígado fetal (rango: $1,34 \times 10^7$ a $1,18 \times 10^8$). La viabilidad de las células totales aisladas osciló, en todos los experimentos, entre un 96% y un 100%.

Con el objeto de identificar y caracterizar las distintas subpoblaciones presentes, se realizaron inmunomarcaciones sobre las células totales y las distintas fracciones obtenidas por centrifugación diferencial. Así, la inmunofluorescencia realizada sobre las células totales recién aisladas, muestra que esa suspensión contenía tanto células positivas para el *pool* de anticuerpos "anti-célula progenitora hematopoyética" como para el marcador específico de hepatocitos

maduros "hepatocyte" (Figura 3 a y b).

Figura 3. Células totales del hígado fetal de rata. La suspensión de células obtenida luego de la digestión enzimática posee tanto células positivas para el *pool* de anticuerpos anti-célula progenitora hematopoyética (a) como para "hepatocyte" (b) (aumento 400x).



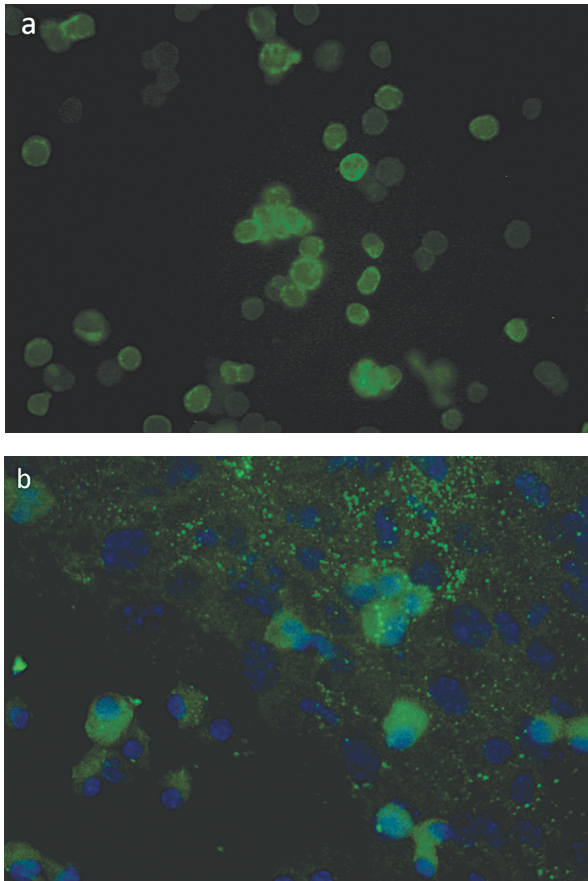
La fracción colectada de la interfase del gradiente de Percoll contenía células positivas para el *pool* de anticuerpos "anti-célula progenitora hematopoyética", pero no células hepáticas (fracción "hepatocyte^{NEG}"), y la denominamos "fracción hematopoyética" (Figura 4 a).

La fracción inferior del gradiente contenía las células "hepatocyte^{POS}", no encontrándose células positivas para los marcadores de progenitoras hematopoyéticas en esta fracción, y la denominamos "fracción hepática" (Figura 4 b).

Enriquecimiento de la fracción hepática

Las células de la fracción hepática fueron cultivadas durante 4 días y al cabo de ese tiempo se observó una monocapa de células con morfología característica de hepatocitos maduros sobre la cual se ubica-

Figura 4. Inmunofenotipado de las subpoblaciones celulares. La suspensión celular fue sometida a una centrifugación en un gradiente discontinuo de Percoll. Se obtuvieron dos fases: la superior contiene células positivas para el pool de anticuerpos "anti-célula progenitora hematopoyética" (a), pero no células "hepatocyte" positivas, las cuales se encuentran en la fase inferior del gradiente (b) (aumento 400x).



ron células positivas para los marcadores de células ovals OC2 y OC3. A su vez, rodeando a estas células se encontraron colonias de células más pequeñas con morfología similar a la de las células ovals, pero negativas para los marcadores OC2 y OC3, que denominamos "células tipo ovals" (Figura 5 a y b). Dentro de esta fracción también se hallaron células similares en tamaño y morfología a las células OC2/OC3^{POS} y que resultaron positivas para el otro marcador de células ovals, Thy-1 (Figura 6 a). Incluso algunas de estas células mostraron doble marcación para OC2 y para Thy-1 (Figura 6 b).

Cuando las células de esta fracción hepática fueron cultivadas en el mismo medio de cultivo pero con el agregado de HGF se observó un importante aumento en la cantidad de células OC2/OC3^{POS} co-

mo también de las células más pequeñas tipo ovals (Figura 7, OC3^{POS} no mostradas).

Los cultivos de la fracción hepática se prolongaron hasta los 6 días. Este procedimiento resultó en la formación de colonias (acúmulos celulares) (Figura 8 a), que fueron subcultivadas utilizando cilindros de clonado. Estas células subcultivadas fueron capaces de adherirse al sustrato y mantuvieron la expresión de OC2 durante 14 días, aunque no mostraron signos de proliferación (Figura 8 b).

Cabe ser destacado que en los cultivos de las células totales sin fraccionar se encontraron sólo escasas células positivas para los marcadores OC2 y OC3 (Figura 9). En este caso el agregado de HGF al medio de cultivo no tuvo el mismo efecto sobre las células ovals, ya que prácticamente no se observaron células "tipo ovals" alrededor, a diferencia de los cultivos de la fracción hepática.

Figura 5. Fracción hepática. Luego de 4 días de cultivo se observan sobre una monocapa de hepatocitos, células OC2 (a) y OC3 (b) positivas (flechas) rodeadas de células "tipo ovals" (puntas de flechas). Núcleos teñidos con hematoxilina [aumentos (a) 400x, (b) 1000X].

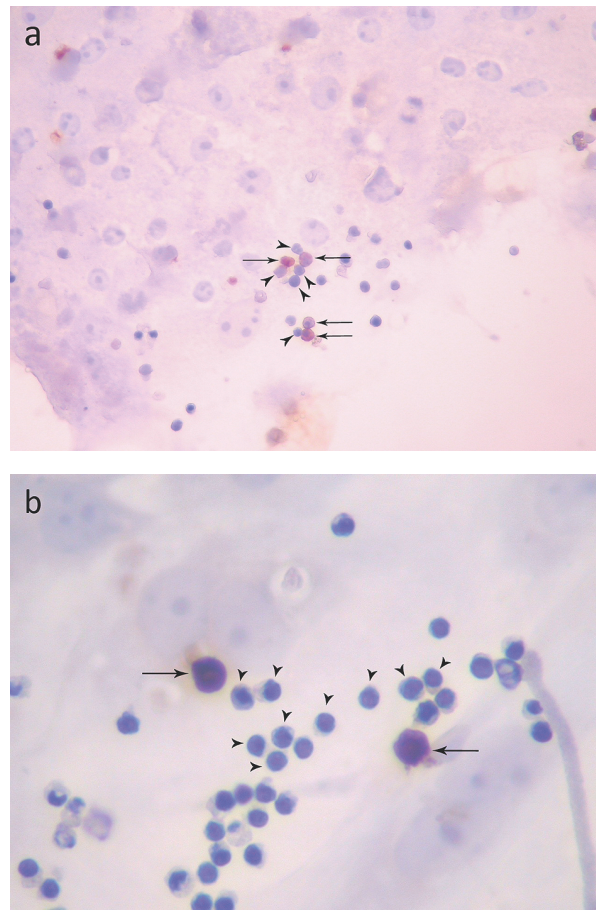


Figura 6. Las células ovasales de la fracción hepática co-expresan Thy-1. En la fracción hepática cultivada durante 4 días observamos tanto células que expresan Thy-1 [(a), verde] como células que co-expresan OC2 (verde) y Thy-1 (rojo) (b) (aumento 400x).

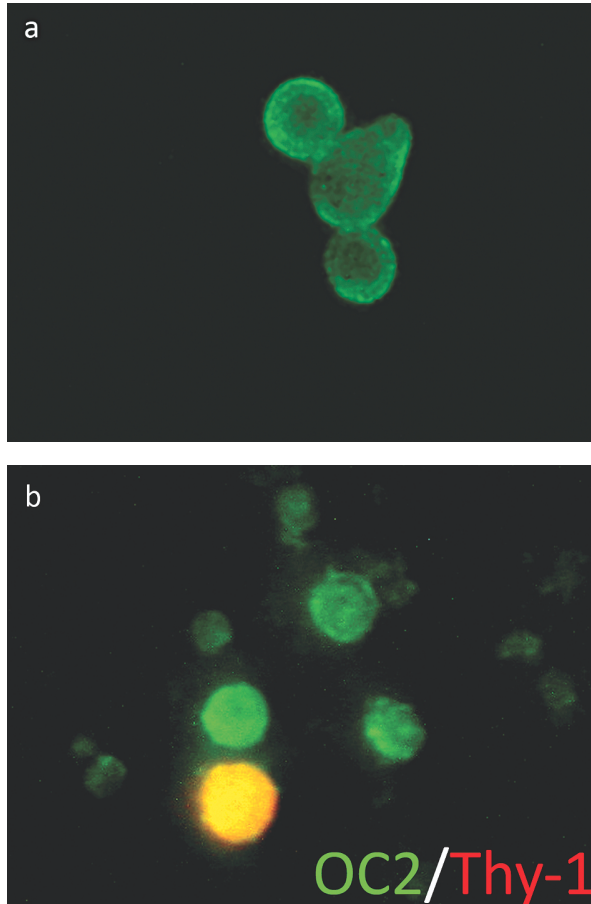


Figura 8. Formación de acúmulos de células OC2^{pos}. Al cabo de 6 días en cultivo las células forman acúmulos (a). Luego de subcultivar estos acúmulos observamos que se mantiene la expresión de OC2 (b) (flechas) [aumentos (a) 200x, (b) 1000x].

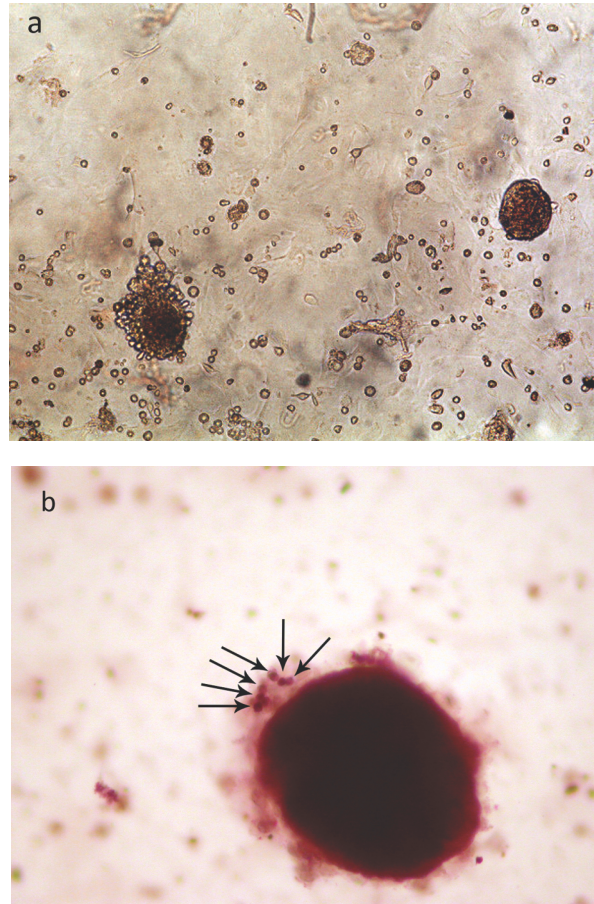


Figura 7. Las células ovasales de la fracción hepática proliferan en presencia de HGF. Luego de cultivar la fracción hepática durante 4 días con HGF observamos un enriquecimiento tanto de células ovasales (OC2^{pos}, flechas) como de células tipo ovasales (puntas de flechas) (aumento 400x).

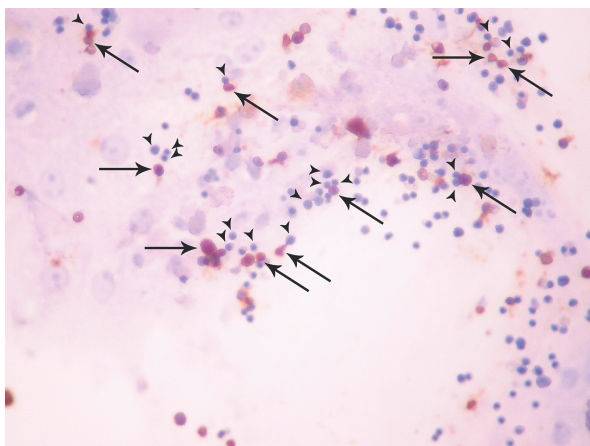
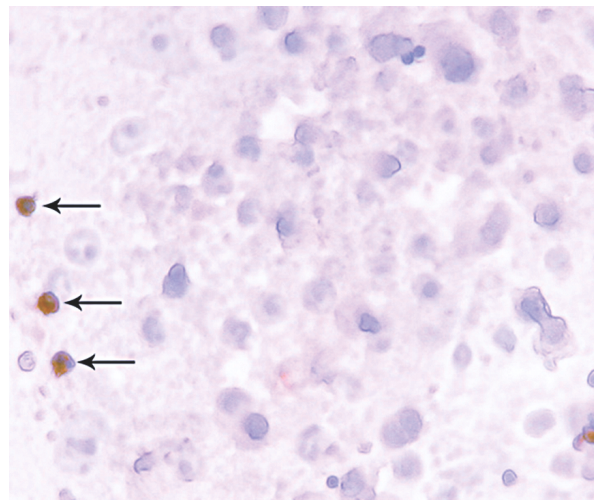


Figura 9. Células totales sin fraccionar. No se observan células "tipo ovasales" alrededor de células OC3^{pos} (flechas) cultivadas durante 4 días en presencia de HGF (aumento 400x).



Discusión

Las células troncales hepáticas a través de su progenie, las células ovales, son capaces de participar en los procesos de regeneración del hígado que siguen a un daño hepático severo. Por tal motivo, el conocimiento de su biología es sumamente atractivo, y podría tener importantes derivaciones en el campo de la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa. Sin embargo, su aislamiento y enriquecimiento no es sencillo. En la bibliografía existen numerosas publicaciones en las que se informa sobre el aislamiento de células ovales luego de la inducción de daño hepático masivo, sea por hepatectomías parciales reiteradas, y/o por el uso de tóxicos que inhiben la proliferación de los hepatocitos maduros al mismo tiempo que se genera un daño hepático.^{21,22} En este trabajo conseguimos aislar células ovales a partir de hígados fetales normales de rata, sin inducción de daño hepático. A pesar de que la cantidad fue limitada, las células ovales obtenidas pudieron ser cultivadas y enriquecidas en presencia de HGF.

Uno de los desafíos al procedimiento empleado es que el hígado fetal es un órgano hematopoyético en las primeras etapas de su ontogenia^{9,10} y las células troncales hematopoyéticas y las troncales hepáticas, además de tener ambas una notable capacidad proliferativa, comparten algunos marcadores de membrana.³⁵ Por lo tanto se vuelve imprescindible separar ambas poblaciones. La estrategia fue, por una parte utilizar nuestros resultados y los de otros autores en cuanto a la evolución de la etapa hepática de la hematopoyesis en ratones,³⁶ y por la otra, la purificación por centrifugación en un gradiente discontinuo de Percoll y cultivo en un medio especialmente formulado para el mantenimiento de células hepáticas. Hemos utilizado hígados de embriones de 18 a 21 días de gestación, lo que nos permitió obtener células hepáticas libres de progenitoras hematopoyéticas (Figura 3 b y datos no mostrados).

El protocolo que aplicamos nos permitió obtener dos fracciones disjuntas para los marcadores utilizados, que denominamos: a) fracción hematopoyética que contenía células positivas para el *pool* de anticuerpos anti-células progenitoras hematopoyéticas; y b) fracción hepática que contenía células "*hepatocyte*^{POS}", sin células positivas para el *pool* de anticuerpos "anti-célula progenitora hematopoyética".

Las células ovales en proliferación comprenden una población heterogénea de células que incluyen células en tránsito o progenitoras con distintos gra-

dos de diferenciación y que podrían ser incluidas como conjunto dentro del concepto de compartimiento de células ovales.²⁵ Según Potten, este concepto se aplica si se considera una población en la que coexiste un número variable de tipos celulares, y donde sólo el comportamiento promedio es el foco de interés, no siendo relevantes ni la variabilidad individual ni las fluctuaciones menores.³⁷ Así es como el "compartimiento de células ovales" comprende a las células ovales propiamente dichas y otros tipos celulares en transición, con diferentes grados de diferenciación y características morfológicas y funcionales intermedias entre células troncales y células hepáticas maduras (hepatocitos y colangiocitos).³⁸ Fueron obtenidas células positivas para los marcadores de células ovales OC2 y OC3, tanto en la suspensión de células totales como también en la fracción hepática, ambas cultivadas durante cuatro días. Es interesante destacar que solo en la fracción hepática cultivada se observó el desarrollo de otro tipo celular, las llamadas células "tipo ovales", ubicadas alrededor de las células ovales, formando colonias pero de menor tamaño y con morfología similar a ellas. A pesar de ser muy semejantes a las ovales, estas células "tipo ovales" no expresaban los marcadores OC2 y OC3.

Si bien aún existen controversias en cuanto a la nomenclatura de los distintos estadios de las células troncales hepáticas y sus descendientes,^{2,11,35,39-42} podemos distinguir tres estadios:

1. Célula troncal hepática: corresponde a las células troncales propiamente dichas en el hígado adulto, tienen todos los atributos funcionales de las células troncales somáticas descritos por CS Potten (indiferenciadas, capaces de proliferar, de auto-mantener la población, de producir un gran número de progenies diferenciadas y funcionales, y de regenerar el tejido luego del daño).³⁷ Si bien tienen un alto potencial proliferativo, en condiciones normales se encuentran en estado quiescente en el canal de Hering y se activan ante estímulos de daño hepático grave o reiterado.
2. Compartimiento de células ovales: equivalentes a las llamadas transient amplifying cell population. Son células con alta capacidad proliferativa, capacidad de automantenimiento limitada y estadio de diferenciación intermedio.
3. Células hepáticas inmaduras: corresponden a los estadios más diferenciados aunque inmaduros aún. Su capacidad proliferativa es baja.

Estas células "tipo ovales" aisladas pertenecerían

al compartimiento de las células ovasales que, o bien no han alcanzado aún el estadio en el cual expresan estos marcadores, o, por el contrario, están en un estadio de diferenciación más avanzado en el que ya no expresan estos marcadores. Hixson y col, estudiando la organogénesis hepática, relacionaron la aparición del marcador OC2 *in vivo*, con un fenotipo migratorio de células troncales hepáticas tempranas, antes de la aparición de los ductos biliares. Estos autores observaron que estas células perdían el marcador antes de tomar contacto con el mesénquima portal, hecho que las conduciría a células ductales biliares.⁴¹ Esto explicaría la activación/desactivación del marcador OC2 en células con fenotipos de transición *in vivo*. La aparición *in vitro* de células OC2^{NEG}, formando colonias rodeando a las células OC2^{POS} y que derivarían de ellas durante el cultivo, se explicaría similarmente por cambios fenotípicos como resultado de las condiciones de cultivo, particularmente por el uso de HGF como suplemento del medio de cultivo.⁴¹

En este trabajo el aumento diferencial en el número de células tipo ovasales hallado durante el período de cultivo ensayado (4 días) en presencia de HGF estaría indicando un efecto estimulador de dicho factor de crecimiento. El HGF fue descubierto en estudios de regeneración hepática a través de su participación en numerosos caminos de señalización, favoreciendo la activación de las células troncales hepáticas y la proliferación de las células ovasales. En condiciones patológicas su concentración plasmática se incrementa de 15 a 25 veces.⁴³ También en pacientes en falla hepática fulminante, los niveles sanguíneos de HGF están incrementados, indicando en estos casos un importante papel en la regeneración hepática. En este trabajo la utilización de HGF para el cultivo *in vitro* podría asemejar las condiciones de cultivo al microambiente que se genera en el hígado con posterioridad a un daño.

Aunque estas células tipo ovasales pudieron ser amplificadas significativamente durante el cultivo en presencia de HGF, no pudieron ser propagadas cuando las colonias fueron separadas del medio ambiente de siembra original en el que muy probablemente coexistían varias poblaciones celulares. Esto indicaría que tanto las células ovasales como las tipo-ovales requieren la presencia de señales paracrina provenientes de la población mixta, siendo éste un factor crítico para la supervivencia celular.⁴⁴ Esto sustenta el concepto de nicho como compartimiento heterogéneo de poblaciones celulares que expre-

san diferentes marcadores.⁴⁵

La Thy-1 es una proteína de 25–37 kDa involucrada, mediante la participación en múltiples cascadas de señalización, en la activación de células T, apoptosis, supresión de tumores, cicatrización y fibrosis. En este trabajo han sido halladas muy escasas células Thy-1^{POS} en la fracción hepática cultivada durante 4 días, aunque siempre presentando doble marcación para OC2. Ha sido demostrado que células que expresan el marcador Thy-1 están presentes en el nicho de células ovasales *in vivo*. Yovchev y col hallaron una población de células mesenquimales activadas después de un daño hepático, aunque también presentes en el hígado normal, que se diferenciaron de las células *stellate*, miofibroblastos y ovasales residentes, pero se ubicaron rodeando a estas últimas. Estos autores atribuyeron a las células Thy-1^{POS} la capacidad de producir señales inductivas y factores de crecimiento dentro del nicho de células ovasales.⁴⁶

La respuesta proliferativa que se produce después de un daño hepático, en general, responde a una situación de "uno u otro", es decir, si se activa el compartimiento de células troncales (daño severo), se inhibe la activación de las células hepáticas diferenciadas (daño leve o moderado). Distintos trabajos han proporcionado evidencia de que diversos factores de crecimiento y citoquinas, como HGF, TGF- α , EGF, FGF, TNF- α , IL-6 y LIF, modulan la proliferación de las células ovasales durante la regeneración hepática post-injuria masiva.⁴⁷⁻⁴⁹ No obstante, estos factores también participan en la regulación de la proliferación de los hepatocitos en respuesta a una injuria leve a moderada.⁵⁰

Concluimos que el aislamiento y caracterización de células ovasales motiva considerable interés no solo para el estudio de la biología de las células troncales hepáticas, sino también por su potencial terapéutico, que incluye el trasplante celular, el desarrollo de sistemas bioartificiales de soporte hepático y, en general, las nuevas tecnologías asociadas a la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos. Este potencial podría ser útil para el tratamiento de enfermedades hepáticas crónicas o agudas, proveyendo quizás una solución a la severa escasez de hígados donados. Los protocolos más utilizados para el aislamiento de células ovasales contemplan la activación del compartimiento de células ovasales por inducción de daño hepático. Debido a que las principales características de las células troncales radican en su potencialidad y su plasticidad, la manipulación de és-

tas implica sin dudas un sesgo. La tecnología presentada en este trabajo nos permitió aislar células ovales en condiciones fisiológicas sin inducción del daño hepático. El desarrollo de este protocolo permite capturar células ovales en el momento de su génesis, antes de anidar en su nicho donde permanecerán durante toda la vida adulta. Éste puede ser un paso hacia la comprensión de la biología de las células troncales que permita futuras aplicaciones en el campo de la medicina regenerativa.

Agradecimientos. *Deseamos agradecer las generosas donaciones de los anticuerpos anti-OC2 y OC3 por el Dr Hixson (Rhode Island, EE.UU.) y de la proteína PIXY (proteína de fusión de GM-CSF, IL-3) por el Dr Messner (Toronto, Canadá).*

Sostén financiero. *La realización de este proyecto contó con la financiación de la Sociedad Italiana de Beneficencia y la Fundación para el desarrollo de Ciencias Básicas (FUCIBA). José Torres-Fuenzalida y Cynthia Castronuovo poseen becas de post-grado del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) de Argentina.*

Referencias

- Zaret KS. Hepatocyte differentiation: from the endoderm and beyond. *Curr Opin Genet Dev* 2001;11:568-574.
- Schmelzer E, Wauthier E, Reid LM. The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. *Stem Cells* 2006;24:1852-1858.
- Shiojiri N, Inujima S, Ishikawa K, Terada K, Mori M. Cell lineage analysis during liver development using the spf(ash)-heterozygous mouse. *Lab Invest* 2001;81:17-25.
- Kohler C, Bell AW, Bowen WC, Monga SP, Fleig W, Michalopoulos GK. Expression of Notch-1 and its ligand Jagged-1 in rat liver during liver regeneration. *Hepatology* 2004;39:1056-1065.
- Lemaigre F, Zaret KS. Liver development update: new embryo models, cell lineage control, and morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2004;14:582-590.
- Suzuki A, Iwama A, Miyashita H, Nakauchi H, Taniguchi H. Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells. *Development* 2003;130:2513-2524.
- Alison MR, Golding MH, Sarraf CE. Pluripotential liver stem cells: facultative stem cells located in the biliary tree. *Cell Prolif* 1996;29:373-402.
- Theise ND, Saxena R, Portmann BC, Thung SN, Yee H, Chiriboga L, Kumar A, Crawford JM. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 1999;30:1425-1433.
- Ema H, Nakauchi H. Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo. *Blood* 2000;95:2284-2288.
- Ema H, Douagi I, Cumano A, Kourilsky P. Development of T cell precursor activity in the murine fetal liver. *Eur J Immunol* 1998;28:1563-1569.
- Minguet S, Cortegano I, Gonzalo P, Martinez-Marin JA, de Andres B, Salas C, Melero D, Gaspar ML, Marcos MA. A population of c-Kit(low)(CD45/TER119)- hepatic cell progenitors of 11-day postcoitus mouse embryo liver reconstitutes cell-depleted liver organoids. *J Clin Invest* 2003;112:1152-1163.
- Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997;276:60-66.
- Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000;32(Suppl 1):19-31.
- Oertel M, Shafritz DA. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochim Biophys Acta* 2008;1782:61-74.
- Faris RA, Konkin T, Halpert G. Liver stem cells: a potential source of hepatocytes for the treatment of human liver disease. *Artif Organs* 2001;25:513-521.
- Lorenti AS. Hepatic stem cells. *Medicina (B. Aires)* 2001;61:614-620.
- Sell S. Is there a liver stem cell? *Cancer Res* 1990;50:3811-3815.
- Fausto N. Hepatocyte differentiation and liver progenitor cells. *Curr Opin Cell Biol* 1990;2:1036-1042.
- Hixson DC, Faris RA, Thompson NL. An antigenic portrait of the liver during carcinogenesis. *Pathobiology* 1990;58:65-77.
- Zhang Y, Bai XF, Huang CX. Hepatic stem cells: existence and origin. *World J Gastroenterol* 2003;9:201-204.
- He ZP, Tan WQ, Tang YF, Zhang HJ, Feng MF. Activation, isolation, identification and in vitro proliferation of oval cells from adult rat livers. *Cell Prolif* 2004;37:177-187.
- Dabeva MD, Shafritz DA. Activation, proliferation, and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration. *Am J Pathol* 1993;143:1606-1620.
- Golding M, Sarraf CE, Lalani EN, Anilkumar TV, Edwards RJ, Nagy P, Thorgeirsson SS, Alison MR. Oval cell differentiation into hepatocytes in the acetylaminofluorene-treated regenerating rat liver. *Hepatology* 1995;22:1243-1253.
- Gordon GJ, Butz GM, Grisham JW, Coleman WB. Isolation, short-term culture, and transplantation of small hepatocyte-like progenitor cells from retrorsine-exposed rats. *Transplantation* 2002;73:1236-1243.
- Fausto N. Liver stem cells. En: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter DA, Shafritz DA, eds. *The liver: biology and pathobiology*. 3a ed. New York: Raven Press, Ltd, 1994:1501-1518.
- Grompe M, Finegold M. Liver stem cells. En: Marshak D, Gardner R, Gottlieb D, eds. *Stem cell biology*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001:550.
- Dunsford HA, Sell S. Production of monoclonal antibodies to preneoplastic liver cell populations induced by chemical carcinogens in rats and to transplantable Morris hepatomas. *Cancer Res* 1989;49:4887-4893.

28. Lemire JM, Shiojiri N, Fausto N. Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. *Am J Pathol* 1991;139:535-552.
29. Yoon BI, Choi YK, Kim DY. Differentiation processes of oval cells into hepatocytes: proposals based on morphological and phenotypical traits in carcinogen-treated hamster liver. *J Comp Pathol* 2004;131:1-9.
30. Papp V, Dezso K, Laszlo V, Nagy P, Paku S. Architectural changes during regenerative and ontogenic liver growth in the rat. *Liver Transpl* 2009;15:177-183.
31. Nakatsuka R, Taniguchi M, Hirata M, Shiota G, Sato K. Transient expression of bone morphogenic protein-2 in acute liver injury by carbon tetrachloride. *J Biochem* 2007;141:113-119.
32. Kelley-Loughnane N, Sabla GE, Ley-Ebert C, Aronow BJ, Bezerra JA. Independent and overlapping transcriptional activation during liver development and regeneration in mice. *Hepatology* 2002;35:525-534.
33. Kano J, Ishiyama T, Iijima T, Morishita Y, Murata S, Hisakura K, Ohkohchi N, Noguchi M. Differentially expressed genes in a porcine adult hepatic stem-like cell line and their expression in developing and regenerating liver. *Lab Invest* 2008;88:132-143.
34. Jochheim-Richter A, Rudrich U, Koczan D, Hillemann T, Tewes S, Petry M, Kispert A, Sharma AD, Attaran F, Manns MP, Ott M. Gene expression analysis identifies novel genes participating in early murine liver development and adult liver regeneration. *Differentiation* 2006;74:167-173.
35. Crosby HA, Kelly DA, Strain AJ. Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium. *Gastroenterology* 2001;120:534-544.
36. Fujikura Y, Kuniki H, Fukumoto T. Analysis of hemopoietic cells in rat bone marrow and fetal liver with monoclonal antibody. *Dev Comp Immunol* 1990;14:121-129.
37. Potten CS. *Stem cells*. Cambridge: Academic Press, 1997.
38. Sarraf C, Lalani EN, Golding M, Anilkumar TV, Poulosom R, Alison M. Cell behavior in the acetylaminofluorene-treated regenerating rat liver. Light and electron microscopic observations. *Am J Pathol* 1994;145:1114-1126.
39. Sahin MB, Schwartz RE, Buckley SM, Heremans Y, Chase L, Hu WS, Verfaillie CM. Isolation and characterization of a novel population of progenitor cells from unmanipulated rat liver. *Liver Transpl* 2008;14:333-345.
40. Herrera MB, Bruno S, Buttiglieri S, Tetta C, Gatti S, De-regibus MC, Bussolati B, Camussi G. Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells* 2006;24:2840-2850.
41. Hixson DC, Chapman L, McBride A, Faris R, Yang L. Antigenic phenotypes common to rat oval cells, primary hepatocellular carcinomas and developing bile ducts. *Carcinogenesis* 1997;18:1169-1175.
42. Dan YY, Riehle KJ, Lazaro C, Teoh N, Haque J, Campbell JS, Fausto N. Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:9912-9917.
43. Zarnegar R, Michalopoulos GK. The many faces of hepatocyte growth factor: from hepatopoiesis to hematopoiesis. *J Cell Biol* 1995;129:1177-1180.
44. Corcelle V, Stieger B, Gjinovci A, Wollheim CB, Gauthier BR. Characterization of two distinct liver progenitor cell subpopulations of hematopoietic and hepatic origins. *Exp Cell Res* 2006;312:2826-2836.
45. Cimica V, Batusic D, Chen Y, Hollemann T, Pieler T, Ramadori G. Transcriptome analysis of rat liver regeneration in a model of oval hepatic stem cells. *Genomics* 2005;86:352-364.
46. Yovchev MI, Zhang J, Neufeld DS, Grozdanov PN, Dabeva MD. Thymus cell antigen-1-expressing cells in the oval cell compartment. *Hepatology* 2009;50:601-611.
47. Nagy P, Bisgaard HC, Santoni-Rugiu E, Thorgeirsson SS. In vivo infusion of growth factors enhances the mitogenic response of rat hepatic ductal (oval) cells after administration of 2-acetylaminofluorene. *Hepatology* 1996;23:71-79.
48. Evarts RP, Hu Z, Fujio K, Marsden ER, Thorgeirsson SS. Activation of hepatic stem cell compartment in the rat: role of transforming growth factor alpha, hepatocyte growth factor, and acidic fibroblast growth factor in early proliferation. *Cell Growth Differ* 1993;4:555-561.
49. Omori N, Evarts RP, Omori M, Hu Z, Marsden ER, Thorgeirsson SS. Expression of leukemia inhibitory factor and its receptor during liver regeneration in the adult rat. *Lab Invest* 1996;75:15-24.
50. Michalopoulos GK, DeFrances M. Liver regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2005;93:101-134.