



Trabajo Fin de Máster

Generación de ductos biliares *in vitro* en organoides hepáticos 3D de bioingeniería

Autora

Iris Pla Palacín

Director

Pedro Baptista

Escuela de Ingeniería y Arquitectura
2014

Generación de ductos biliares *in vitro* en organoides hepáticos 3D de bioingeniería

RESUMEN

Debido a la existencia de escasos modelos *in vitro* para el estudio de ductos biliares y a su reducida representatividad de la fisiología humana, hay una necesidad creciente de generar nuevos modelos 3D *ex vivo* que permitan estudiar la biología y fisiología biliar. Así, el objetivo de este proyecto es desarrollar un modelo 3D *in vitro* que contenga alguno de los elementos celulares del hígado humano y que permita la generación de ductos biliares *in situ*.

Se ha recurrido al uso de las tecnologías de bioingeniería de tejidos y de órganos, trabajando con la capacidad de auto-organización de las células que componen el ducto biliar una vez sembradas en agregados celulares y usando matriz extracelular descelularizada de hígado de rata para generar la tridimensionalidad.

Para tal fin, se han utilizado colangiocitos adultos y hepatoblastos fetales humanos para generar ductos biliares y caracterizar su interacción con otras células no parenquimales [endotelio y células madre mesenquimales (MSC)] en la formación de dichos ductos. También se ha caracterizado el crecimiento celular de los colangiocitos humanos, células endoteliales y MSC.

A pesar de haber obtenido algunas estructuras celulares prometedoras, no se ha podido conseguir generar ductos maduros con estas técnicas y poblaciones celulares empleadas. Sin embargo, este proyecto ha podido crear las bases para la creación de estos organoides en laboratorio a partir de células exclusivamente humanas.

Palabras clave: ingeniería tisular, medicina regenerativa, ductos biliares

ÍNDICE

ABREVIATURAS	4
INTRODUCCIÓN	5
MATERIAL Y MÉTODOS	10
Obtención de células.....	10
Generación de matriz extracelular de hígado de rata	11
Siembra de organoides biliares.....	12
Procesado de las muestras	16
RESULTADOS	18
Análisis del crecimiento celular durante la expansión	18
Generación y análisis de organoides	20
En <i>scaffold</i>	20
En plástico	20
En sándwiches	21
Análisis histológico e inmunofluorescencia	21
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIÓN	25
BIBLIOGRAFÍA	26
Anexo I. Medios de cultivo empleados para los distintos tipos celulares	29

ABREVIATURAS

- BSA: *bovine serum albumine*
- DMEM: *Dulbeco's modified eagle medium*
- EGF: *epidermal growth factor*
- FBS: *fetal bovine serum*
- FGF-2: *fibroblast growth factor 2*
- IGF1: *insulin growth factor 1*
- PBS: *phosphate buffered saline*
- P/S: *penicillin/streptomycin*
- VEGF: *vascular endotelial growth factor*

INTRODUCCIÓN

Según la mitología griega, el titán Prometeo robó el fuego del Monte Olimpo y se lo dio a la humanidad. Esto provocó la ira de Zeus, que lo castigó encadenándole a una roca y enviando un águila para que se comiera su hígado. Éste crecía cada día, y el águila volvía a comérselo cada noche.

Esta leyenda supone un símbolo apropiado para la medicina regenerativa. Hoy en día, investigadores científicos y doctores esperan que el concepto mítico de la regeneración pueda ser realidad, desarrollando terapias para regenerar pérdida, daño o envejecimiento de células y tejidos del cuerpo humano.

Así, surgen la ingeniería de tejidos y la medicina regenerativa, dos campos bastante amplios que combinan moléculas biológicamente activas, células y *scaffolds* para crear tejidos funcionales, recopilando ideas o teorías que restauren, mantengan o mejoren tejidos dañados u órganos completos.¹

En los últimos 20 años, muchos órganos y tejidos han sido generados en laboratorio utilizando estas técnicas. Tejidos como la vejiga urinaria², uretra³, vagina⁴, vasos sanguíneos⁵, tráquea⁶, piel⁷, hueso⁸, cartílago⁹, etc., han sido ya trasplantados con éxito en pacientes. Muchas terapias similares a éstas ya están en fase de ensayos clínicos, procurando dar nuevas soluciones de regeneración y cura de enfermedades degenerativas que todavía no cuentan con soluciones médicas efectivas.

El hígado constituye la glándula de mayor peso del cuerpo, con un peso aproximado de 1,2-1,5kg en el adulto, ocupando el segundo lugar después de la piel como órgano más grande. También constituye uno de los órganos más importantes del cuerpo, debido a las múltiples funciones que realiza, tanto metabólicas como hormonales. Entre ellas: síntesis de proteínas plasmáticas, producción de bilis (necesaria para la digestión y absorción de grasas), función detoxificante, almacén de vitaminas y glucógeno.

Está anatómicamente dividido en ocho segmentos vascularmente independientes entre sí, y su unidad morfológica funcional es el lobulillo hepático, de forma hexagonal

(según la descripción clásica) y organizada alrededor de la vena central. Su interior está constituido por cordones de hepatocitos dispuestos radialmente alrededor de la vena central y entre dichos cordones se localizan los sinusoides hepáticos. En los vértices del lobulillo se localiza la tríada portal (constituida por una arteria hepática, una vena porta y un conducto biliar). Repeticiones de esta unidad funcional constituyen el tejido hepático (Fig. 1)

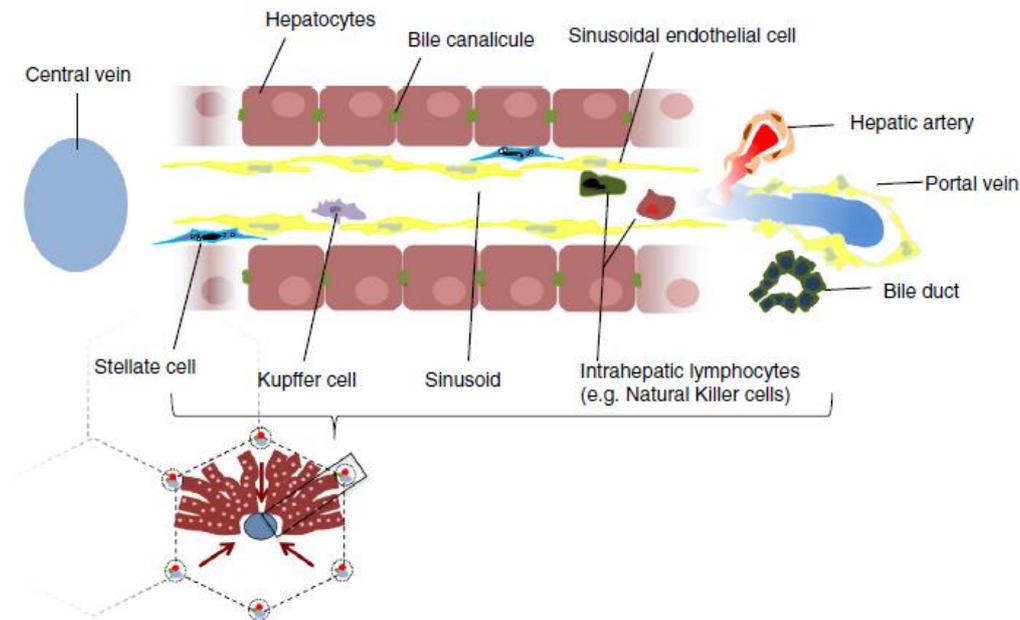


Figura 1. Acino hepático (Extraído de Ebrahimkhani MR et al., 2014)

Estudios recientes demuestran la importante necesidad de reproducir la estructura y fisiología del hígado observada *in vivo*, para reproducir de la manera más exacta posible todas sus funciones *in vitro*, intentando representar el microambiente celular en el laboratorio. Dicho microambiente (nicho celular) juega un papel muy importante en la regulación de la supervivencia, renovación y diferenciación de las células madre, así como en el mantenimiento y función de las células adultas que constituyen el tejido hepático. Los componentes clave de este nicho que modulan el crecimiento celular incluyen los factores de crecimiento (ya sean añadidos al medio de cultivo o secretado por las células), el contacto célula-célula y las adhesiones célula-matriz.¹⁰

Hoy en día no se tiene muy claro cuál es el nicho celular del hígado. Por un lado, los Canales de Hering (Fig.2) donde se van generando hepatocitos continuamente en el área portal y van madurando en su camino hacia la vena central. Dichos hepatocitos, junto a

linajes biliares, son producto de la diferenciación de células madre presentes en estos canales.¹¹

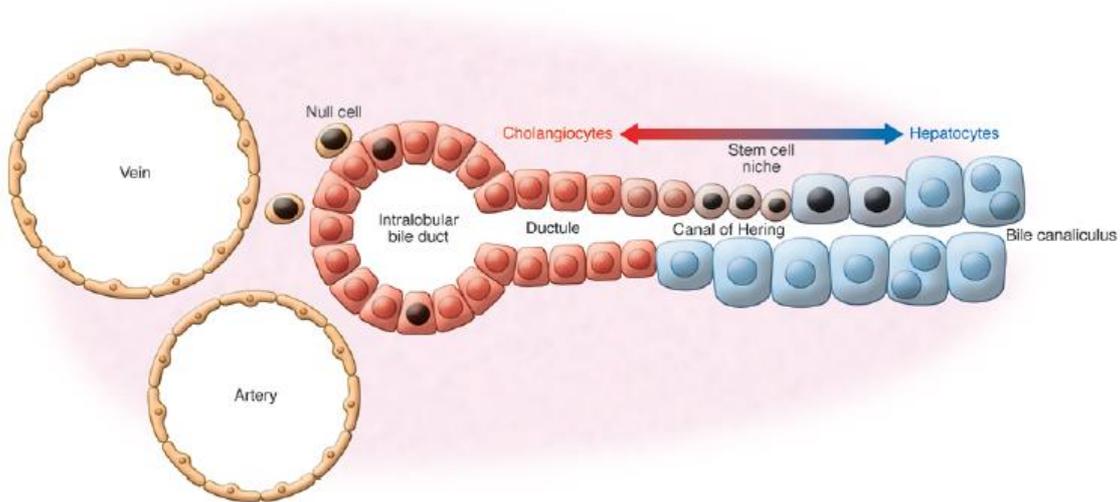


Figura 2. Modelo del nicho hepático en el canal de Hering. Las células denominadas *null cells* son aquellas que no presentan marcadores hepatobiliares, pero pueden representar células madre extrahepáticas, originadas por células madre de médula ósea circulantes, las cuales se ha visto que contribuyen a la regeneración hepática (Extraído de Kordes y Häussinger, 2013)

Pero, además de los Canales de Hering, hay otras áreas del hígado que pueden ser nichos de células madre de modo pasajero: espacio de Disse (Fig. 3). Aquí habitan las células estelares, las cuales parecen poseer características de células madre: expresan genes asociados a células madre/progenitoras y tienen el potencial de diferenciarse a hepatocitos *in vitro*.^{12,13} A pesar de que hay evidencias experimentales de que estas células estelares puedan ser células madre, su contribución en la reparación de tejidos permanece en discusión.

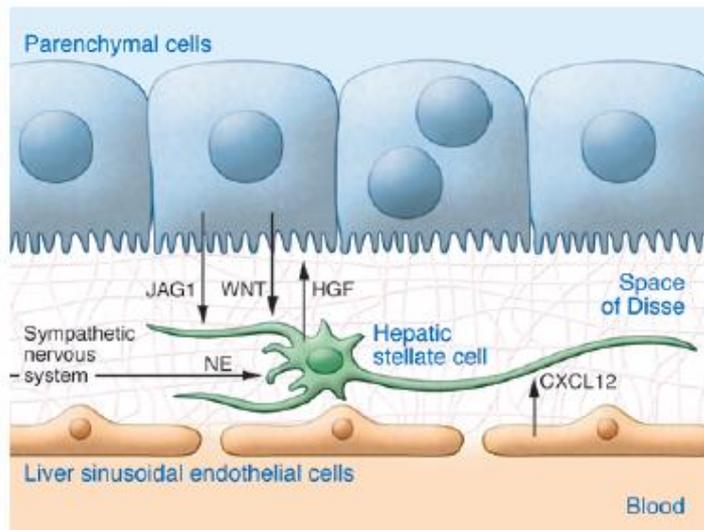


Figura 3. Modelo de nicho hepático en el espacio de Disse. Las células estelares son atraídas por las células endoteliales, que liberan al medio CXCL12, y por las células parenquimales, que liberan ligandos como JAG1 y WNT. Por su parte, las células estelares liberan HGF, un factor de crecimiento de hepatocitos (Extraído de Kordes y Häussinger, 2013)

A pesar de que en los dos nichos se pueden encontrar células madre, hay una diferencia fundamental entre ellos: la exposición directa de la célula madre hepática a altas concentraciones de ácidos biliares en el canal de Hering, lo que no ocurre en el espacio de Disse. Se ha demostrado que los ácidos biliares no sólo actúan como emulgentes de lípidos, sino también como moléculas de señalización que permiten la regeneración hepática cuando hay elevados niveles, y que la inhiben cuando son bajos.^{14, 15}

La matriz extracelular representa un gran componente de este microambiente celular. No sólo proporciona un marco estructural, sino también juega un papel crítico en la adhesión y migración y regula la diferenciación, reparo y desarrollo de las células, así como el mantenimiento de su fenotipo y función.¹⁶ Sus propiedades bioquímicas y mecánicas transmiten señales que regulan el desarrollo del órgano, el fenotipo y la función celular. Por esta razón, el proceso de descelularización juega un papel muy importante. Es necesario preservar la matriz lo más intacta posible. Es por ello que en este estudio se ha empleado tritón X-100 como detergente e hidróxido de amonio, los cuales permiten una rápida y constante eliminación de los componentes celulares de dicho tejido, preservando intactos la red vascular y muchos elementos de la matriz extracelular, a diferencia de lo que ocurre con otros detergentes más agresivos como el SDS.¹⁷⁻¹⁹

Existe la hipótesis de que las interacciones entre colangiocitos y proteínas de la matriz extracelular son importantes para la morfogénesis de ductos biliares.²⁰ También se ha visto que algunas señales solubles paracrinas liberadas por células no epiteliales (como las estelares, endoteliales, células madre mesenquimales, fibroblastos portales y células madre hematopoyéticas) han demostrado ser críticas para el mantenimiento y diferenciación de células progenitoras en hepatocitos y colangiocitos.²¹⁻²³ Es por esto que cuanto mejor se pueda reproducir este nicho *in vitro*, estableciendo equivalentes funcionales, mejores resultados se podrán obtener. Sin embargo, hoy en día se desconocen los mecanismos específicos y las rutas implicadas en este proceso de maduración hepática.²⁴

Hasta hace poco, se contaba con cultivos *in vitro* bidimensionales (2D) o *in vivo* en modelos animales (roedores, perros, cerdos y monos) para realizar diversos estudios de toxicología, trasplante de órganos, estudios con células madre, enfermedades infecciosas, metabolismo de drogas, etc., con el inconveniente de que no mostraban un desarrollo del tejido o del proceso fisiológico que se observa en el cuerpo humano.

Estas deficiencias llevaron a la creación de modelos hepáticos “humanizados” tridimensionales (3D) que pueden reproducir algunas funciones metabólicas o interacciones patógeno-hospedador humanas. Estos modelos 3D presentan la ventaja de que proporcionan a las células un ambiente en el que pueden organizarse, permitiendo el estudio de esta organización y diferenciación celular. Sin embargo, hoy en día los modelos que existen tienen una reducida representatividad de la fisiología y biología humana; son capaces de mostrar funciones hepáticas robustas²⁵ pero no son capaces de mostrar un desarrollo completo del tejido hepático (no desarrollan ductos biliares). Es por ello que existe una necesidad creciente de generar nuevos modelos 3D que permitan estudiar los procesos del desarrollo hepático o la biología asociada a su generación.

El objetivo de este proyecto consiste en desarrollar un modelo 3D *in vitro* que contenga los elementos celulares del hígado humano y que permita la generación de ductos biliares, comparando el uso de células primarias adultas (colangiocitos) con células fetales no diferenciadas (hepatoblastos), los cuales tienen un enorme potencial en

medicina regenerativa debido a su alta capacidad de expansión y diferenciación a hepatocitos y epitelio biliar.²⁶

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de células

Para el experimento con células hepáticas adultas, en primer lugar se han empleado tres tipos celulares: células biliares (BEC, recubren los ductos biliares), endoteliales de vena de cordón umbilical (hUVEC, recubren los vasos sanguíneos) y mesenquimales (hMSC, células madre mesenquimales).

Las dos primeras fueron obtenidas gracias a la donación de dos investigadores colaboradores; las mesenquimales a partir de grasa humana procedente de lipoaspirados de pacientes sometidos a operaciones de cirugía estética (con consentimiento informado concedido por el paciente y con el protocolo de investigación clínica aprobado por la Comisión Ética de Investigación Científica de Aragón).

Para el aislamiento de hMSC, se ha digerido la muestra de grasa con Colagenasa tipo I (Sigma-Aldrich) a 37°C durante 30 min en agitación. A continuación se ha centrifugado 10 minutos a 1200g, se ha resuspendido el pellet en medio de cultivo (DMEM/F12 + 1%P/S + 10%FBS) (Life technologies) y se ha vuelto a centrifugar 5 min a 400g.

Una vez aisladas, se ha procedido con la expansión celular hasta conseguir el número deseado (12 millones de células). Se han expandido también las hBEC y hUVEC hasta conseguir cerca de 12 millones de células de cada tipo.

Antes de sembrar las células en las placas, es necesario hacer un recubrimiento de las mismas con colágeno I (50 mg/L) (Coming) en el caso de las hBEC o de gelatina (al 0.02%) (Sigma-Aldrich) en el caso de las hUVEC y hMSC, para mejorar su adhesión y crecimiento celular.

Para permitir el crecimiento de las células *in vitro*, se han preparado tres medios de cultivo distintos, en función de las características y singularidades de cada tipo celular. Las fórmulas de cada medio se recogen en el Anexo I.

En el caso del experimento empleando células hepáticas fetales, se han obtenido hepatoblastos fetales humanos (y también células endoteliales y de estroma en co-aislamiento) a partir de la digestión de hígado de 20 semanas procedente de abortos terapéuticos (con consentimiento informado firmado por el paciente y con el protocolo de investigación clínica aprobado por la Comisión Ética de Investigación Científica de Aragón y del Biobanco del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona).

De aquí se han obtenido directamente, en un mismo cultivo, los tres tipos celulares, con la diferencia de que esta vez, en lugar de tener colangiocitos diferenciados (hBEC), obtenemos hepatoblastos fetales humanos, que son las células progenitoras que dan origen a los hepatocitos y colangiocitos del hígado.

Una vez recibido el tejido fetal, se ha troceado previamente y se ha digerido con Colagenasa tipo I (Sigma-Aldrich). Se ha dejado en agitación a 350rpm 30 minutos a 37°C. A continuación se ha inactivado la actividad enzimática añadiendo medio de cultivo (DMEM/F12 + 10%FBS + 1%P/S) (Life Technologies). Posteriormente se han hecho 3 lavados (centrifugaciones a 150rpm a 5°C), se ha filtrado la muestra sucesivamente con tamices celulares de 100 y 40µm (BD Falcon), se ha resuspendido el pellet en el medio de cultivo diseñado para los hepatoblastos y se han sembrado en placas de cultivo de 10 cm² con un recubrimiento de colágeno IV (62,5 µg/mL) (Sigma Aldrich).

Generación de matriz extracelular de hígado de rata

Para generar matriz extracelular, sobre la que se sembrarán las células, se han usado hígados de rata (Sprague-Dawley de 4-9 meses de edad).

Para ello, se ha extraído dicho órgano y se ha canulado la vena porta con una cánula de 18-20G, ajustada al diámetro del vaso.

A continuación se ha procedido con su descelerización, con ayuda de una bomba peristáltica, que permite la circulación, en primer lugar, de 2L de agua destilada a una velocidad de 4mL/min a través del órgano. Cuando se ha completado el ciclo, se ha cambiado el agua destilada por una solución de detergente (Tabla 1), y se han dejado circular 4L a la misma velocidad.

Para finalizar el proceso, se ha hecho un lavaje con 8L de agua destilada, para asegurar así que todo el detergente ha sido eliminado.

Solución de detergente (4L)	
Reactivo	Volumen (mL)
Agua destilada	4000
Tritón X100	40 (1%)
Hidróxido de amonio	4 (0.1%)

Tabla 1. Solución de detergente para descelularización

Una vez descelularizado el hígado, se han cortado los distintos lóbulos y se han preparado bloques de OCT (Leica) para cortarlos con un criostato (Leica CM1950). La temperatura ideal del criostato para la generación de discos de matriz extracelular descelularizada de hígado de rata es de -8°C . Primero se han hecho cortes longitudinales del bloque, y de cada corte se han realizado discos (*scaffolds*), con ayuda de un *punch* de biopsias dérmicas (Kai Medical) de 8mm de diámetro.

Cada *scaffold* se coloca directamente en una placa multipocillo (48 pocillos). A continuación se dejan secar y se hacen lavados sucesivos con PBS (Hyclone) para eliminar todo el OCT.

Una vez limpios, se han esterilizado exponiendo la placa multipocillo descubierta en la cabina de flujo laminar con luz UV durante 2h. Transcurrido este tiempo, se ha rellenado cada pocillo con 500 μL de PBS estéril y se ha guardado a 4°C hasta el día de la siembra.

Siembra de organoides biliares

Para el experimento con células hepáticas adultas, una vez obtenido el número necesario de cada tipo celular, se han establecido distintas condiciones experimentales. En primer lugar se han hecho controles experimentales en placas multipocillo sin *scaffold*, es decir, la siembra se ha hecho directamente sobre el plástico de la placa. Las condiciones de ensayo han sido sembrar los tres tipos celulares individualmente, hUVEC, hMSC y hBEC (n=1), y los tres tipos celulares mezclados, hUVEC+hMSC+hBEC (n=2).

En la placa que contiene los *scaffolds*, las condiciones experimentales son similares: se han sembrado las células hUVEC, hMSC y hBEC individualmente (n=1), las combinaciones hUVEC+hBEC, hMSC+hBEC y hUVEC+hMSC (n=2) y también la combinación hUVEC+hMSC+hBEC (n=3), como se puede observar en la siguiente tabla:

<i>Scaffolds</i>	Plástico
hUVEC (x2) (1)	hUVEC+hMSC+hBEC (x2) (0.33 + 0.33 + 0.33)
hMSC (x2) (1)	hMSC (x1) (0.8)
hBEC (x2) (0.8)	hUVEC (x1) (0.8)
hUVEC+hMSC+hBEC (x3) (0.33 + 0.33 + 0.33)	hBEC (x1) (0.8)
hUVEC+hBEC (x2) (0.4 + 0.4)	
hMSC+ hBEC (x2) (0.4 + 0.4)	
hUVEC+hMSC (x2) (0.5 + 0.5)	

Tabla 2. Disposición de las células en la placa multipocillo. Los números entre paréntesis son los millones de cada tipo celular que se han sembrado. Se ha sembrado BEC p10 y 12, hUVEC p9 y 10 y hMSC p10

Ha sido necesario también diseñar un medio de cultivo que sea compatible con los tres tipos celulares. Así, se ha preparado un volumen de 180mL, y sus componentes se recogen en la siguiente tabla:

Medio de cultivo *scaffolds* (180mL)

Reactivo	Volumen (mL)
<i>Advanced DMEM F12</i>	171
<i>Vitamin solution</i>	1.8 (1%)
<i>MEM-non essential aminoacids</i>	1.8 (1%)
<i>P/S</i>	1.8 (1%)
<i>Lipid mixture</i>	1.8 (1%)
<i>FBS</i>	3.6 (2%)
Concentración	
<i>VEGF</i>	10 ng/mL
<i>IGF1</i>	20 ng/mL
<i>FGF2</i>	10 ng/mL
<i>EGF</i>	25 ng/mL
<i>T3</i>	3,4 µg/mL
<i>Dexametazone</i>	10 ⁻⁷ M
<i>Taurocholic acid</i>	50mM

Tabla 3. Medio de cultivo común diseñado para los tres tipos celulares

Las células se han sembrado en agregados celulares, formando pequeñas aglomeraciones que han sido colocadas lo más céntricamente en el *scaffold*. De esta manera se evita que se desparramen por el plástico de la placa y crezcan ahí en lugar de dentro del disco. A continuación se ha añadido 1mL de medio de cultivo definido para los tres tipos celulares y se ha dejado en la incubadora a 37°C con 5% de CO₂ durante 7 y 14 días, cambiándoles el medio cada día.

Aparte de las placas multipocillo con y sin *scaffold*, se ha hecho otro experimento en el cual se han puesto 3 discos en la superficie de una placa de 10 cm de diámetro (separados entre sí) y se ha sembrado cada *scaffold* con una combinación de los tres tipos celulares. A continuación se ha cubierto con otros discos, a modo de sándwich, para ver si hay diferencias en la organización celular con respecto a los *scaffolds* en mono-capa.

Transcurrida la primera semana, se han extraído las muestras de la mitad de los pocillos de cada condición experimental y se han fijado en formaldehído 3,7- 4% tamponado a pH 7,4. Se ha repetido la operación transcurridos los 14 días, extrayendo en este tiempo los sándwiches.

Debido a que el cultivo de células progenitoras fetales es más sensible a la diferenciación, no se puede estar mucho tiempo en expansión, por lo que es conveniente sembrarlas lo antes posible (en pase 0).

Se han sembrado los *scaffolds* (n=4) con 575.000 células, siguiendo el mismo procedimiento al citado anteriormente y se han dejado incubar durante 14 días.

En este caso, el medio de cultivo difiere del anterior. (Tabla 4)

Medio de cultivo <i>scaffolds</i> (500mL)	
Reactivo	Cantidad
<i>RPMI</i>	500 mL
<i>P/S</i>	5 mL
<i>Free fatty acids</i>	38 µL
<i>BSA</i>	0.5 gr
<i>Niacinamide</i>	0.270 gr
	Concentración
<i>L-glutamine</i>	2mM
<i>Insuline</i>	5 µg/mL
<i>Transferrin</i>	10 µg/mL
<i>Selenium</i>	52 pg/mL
<i>Hydrocortisone</i>	$8.28 \cdot 10^{-8}$ M
<i>Beta-mercaptoethanol</i>	$5 \cdot 10^{-5}$ M
<i>Zinc sulfate heptahidrate</i>	$1 \cdot 10^{-10}$ M
<i>EGF</i>	50ng/mL
<i>IGF-1</i>	20ng/mL
<i>Thiazovivine</i>	10µM
<i>CHIR</i>	$5 \cdot 10^{-10}$ M

Tabla 4. Medio de cultivo diseñado para *scaffolds* con hepatoblastos

Debido a la sensibilidad de los hepatoblastos, a la hora del despegue de las células de la superficie de la placa no se ha usado tripsina como en el caso de las células adultas, sino una solución que contiene 5mM de EDTA.

Posteriormente, se ha hecho un recuento de viabilidad celular.

La siguiente figura recoge de manera esquemática todo el proceso descrito, desde la obtención del hígado de rata hasta la siembra de *scaffolds*.

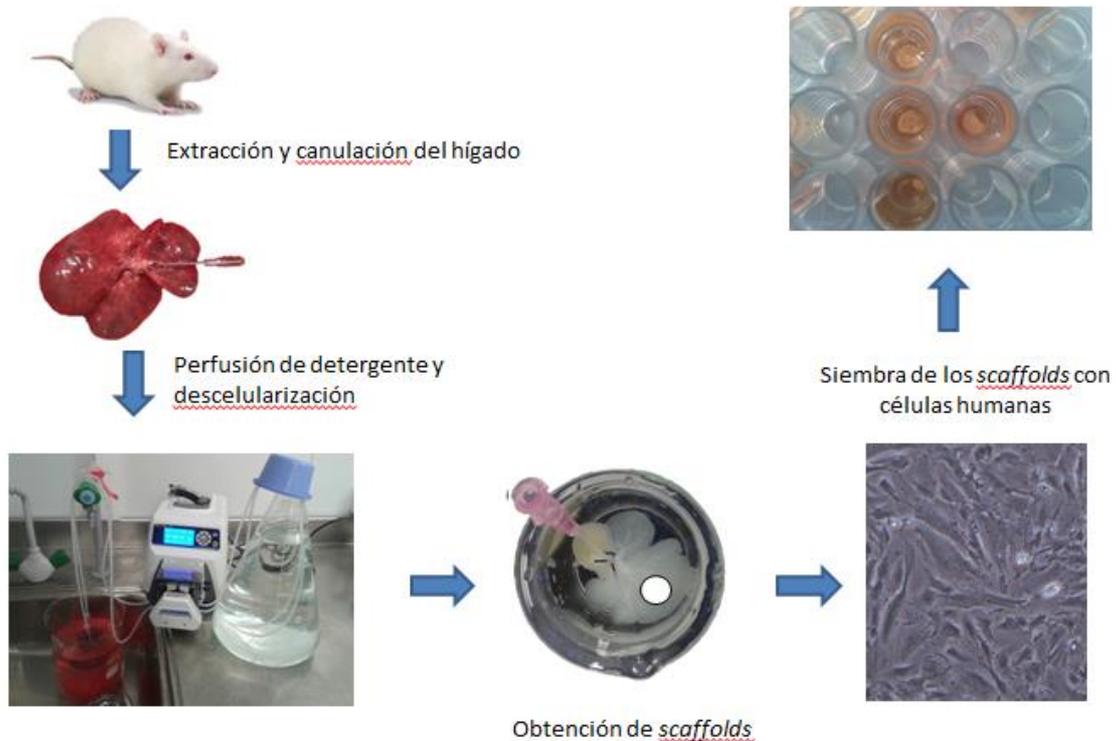


Figura 4. Proceso de descelularización del hígado y siembra de los *scaffolds*

Procesado de las muestras

Cada muestra ha sido fijada e incluida en moldes de parafina (Tissue-tek Xpress X50 Sakura). A continuación se hicieron cortes consecutivos de 5 μ m de grosor. En cada portaobjetos se han dejado dos cortes sucesivos. Se han teñido el primer y el décimo portaobjetos con hematoxilina y eosina (H&E) y se ha mirado al microscopio óptico para determinar si ha habido crecimiento celular y si se han formado estructuras celulares relevantes.

Las muestras sospechosas de contener ductos han sido posteriormente tratadas con técnicas de inmunotinción.

Para ello, primero se han desparafinado para poder marcarlas con anticuerpos. Tras desparafinar, en primer lugar, se han dejado las muestras en una solución *antigen*

unmasking a 95°C durante 20 min. Se ha dejado enfriar a temperatura ambiente y luego se ha cambiado por una solución de lavado durante 5 min. Se han añadido después 100µL de solución bloqueante y se ha incubado 1h.

A continuación se han añadido los anticuerpos primarios al control positivo y solución de lavado a los controles negativos. Se ha dejado incubar toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo, se han lavado las muestras tres veces en la solución de lavado y se han añadido los anticuerpos secundarios, dejando incubar 1h en oscuridad a temperatura ambiente.

Finalmente, se han lavado las muestras y se han añadido 50 µL de DAPI (5µg/mL) y se ha dejado actuar 10 minutos. Finalmente, se han puesto 50 µL de medio de montaje en cada muestra, se han cubierto con cubreobjetos y se han sellado.

Se han recogido los resultados de la inmunotinción con el microscopio invertido (Olimpus IX81) y con el software Cell D.

Ac primario	Fuente Ac primario	Ac secundario
Vimentina (SP20)	Conejo	Goat anti-rabbit alexa fluor 488
CD31/PECAM-1 (JC/70A)	Ratón	Goat anti-mouse alexa fluor 488
CK 19 (BA19)	Ratón	Goat anti-mouse alexa fluor 488

Tabla 5. Anticuerpos primario y secundario empleados. Vimentina para marcar las células mesenquimales (hMSC); CK19 para las células del ducto biliar (hBECs) y CD31 para las endoteliales (hUVEC)

RESULTADOS

Análisis del crecimiento celular durante la expansión

Durante la expansión celular se pudo apreciar que las células epiteliales del ducto biliar (BECs), a diferencia de los otros dos tipos (hMSC y hUVEC), a partir del pase 7-8 no sólo empiezan a disminuir la tasa de crecimiento, sino que también empiezan a sufrir un cambio en la morfología (Fig. 5).

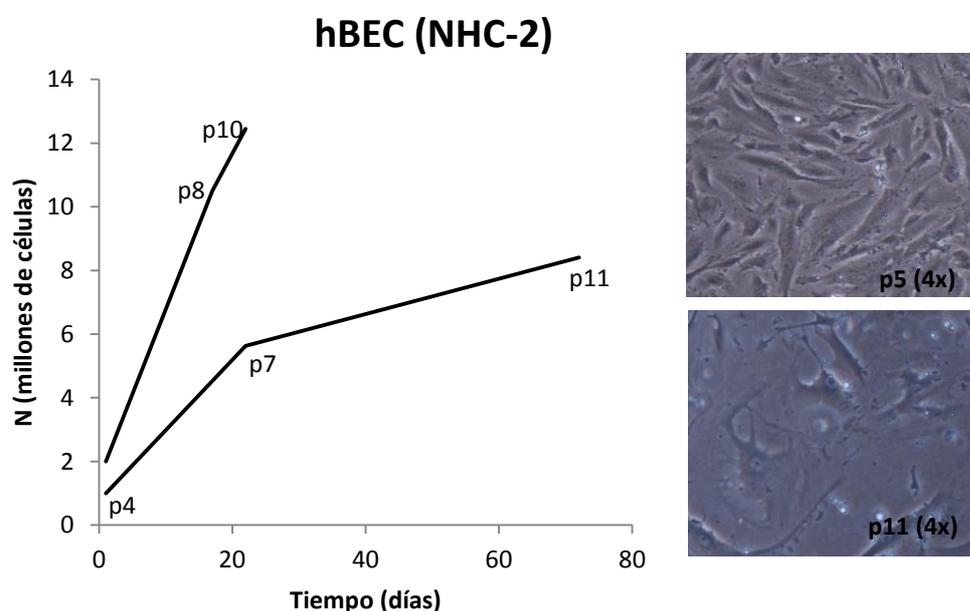


Figura 5. Curva de crecimiento de BEC (NHC-2)

Estas células en pases bajos son pequeñas, dispuestas formando agregados o colonias y de crecimiento activo. A partir del pase 7-8 se empiezan a deformar, presentando proyecciones citoplasmáticas. A medida que se van pasando, estas proyecciones se vuelven mucho más evidentes, y se pueden detectar células con varios nucléolos, células binucleadas y su ritmo de crecimiento es mucho más lento (senescencia celular). Los otros dos tipos celulares presentaban una tasa de crecimiento muy activa y sin señales de senescencia hasta pases más elevados. (Fig. 6 y 7)

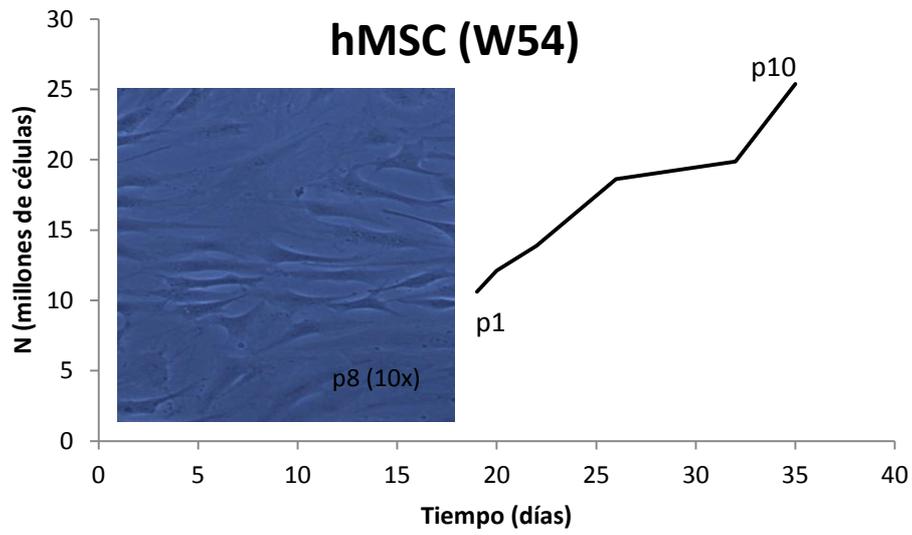


Figura 6. Curva de crecimiento de hMSC

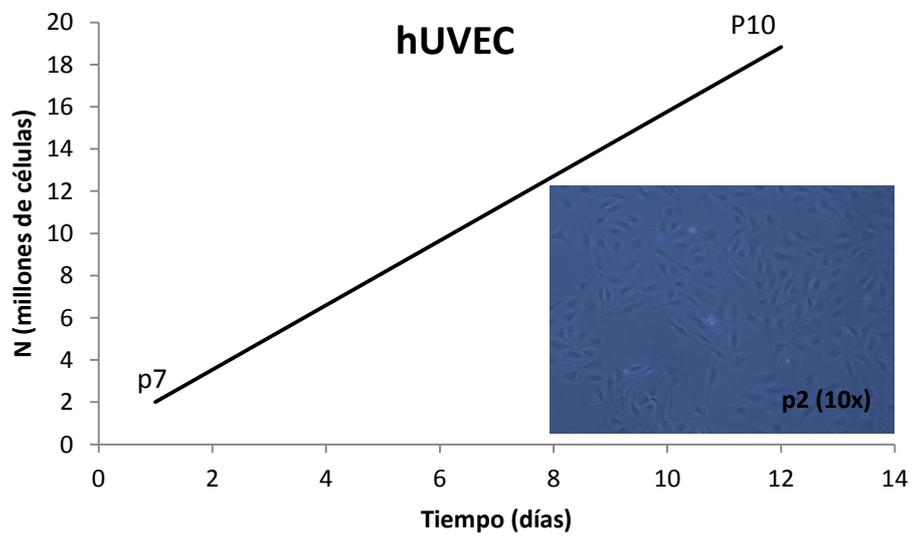


Figura 7. Curva de crecimiento de hUVEC

Durante la expansión de hepatoblastos, las células presentaron buen crecimiento y morfología: células pequeñas y próximas entre sí, divididas en muchas colonias (Fig. 8E). Tras despegar las células con 5mM EDTA, el recuento celular fue de un 70%, un valor relativamente bajo para estas células fetales, que ha podido indicar un daño celular por exposición prolongada al EDTA.

Generación y análisis de organoides

En scaffold

Transcurridas 24h tras la siembra de las células adultas se puede apreciar claramente un viraje de color del medio de cultivo en determinados pocillos (sobre todo aquellos en los que hay dos o tres tipos celulares). En lugar de tener el color rojizo/rosáceo normal del medio de cultivo a pH neutro, éste se torna de color anaranjado, incluso amarillento debido a la gran actividad metabólica que ocurre, con acidificación del medio, provocando el viraje de color. Los que están sembrados solo con hUVEC no presentan variación en la coloración y al microscopio óptico se detecta muerte celular.

Al tercer día ya se detecta un organoide en uno de los pocillos sembrados con los 3 tipos celulares. A partir del quinto día se comienza a apreciar que algunos discos empiezan a plegarse por alguno de sus bordes, pero no han terminado de formarse organoides transcurridos los 14 días. (Fig.8A)

Durante el transcurso del experimento con hepatoblastos, se puede apreciar muerte celular en las afueras del *scaffold*. Al cabo de dos semanas no se detecta plegamiento, ni tampoco formación de organoides.

En plástico

Los pocillos sembrados con hUVEC también presentan muerte celular. A partir del cuarto día aparecen agregados celulares en el resto de pocillos (correspondientes a hMSC, hBEC y hUVEC+hMSC+hBEC). En la figura se muestra un agregado de células hBEC a simple vista (Fig. 8B) y un detalle de ese agregado a 10x. (Fig. 8C)

En sándwiches

Se aprecia buen crecimiento celular alrededor de los mismos, aunque no es posible inferir qué ocurre en su interior. (Fig.8D)

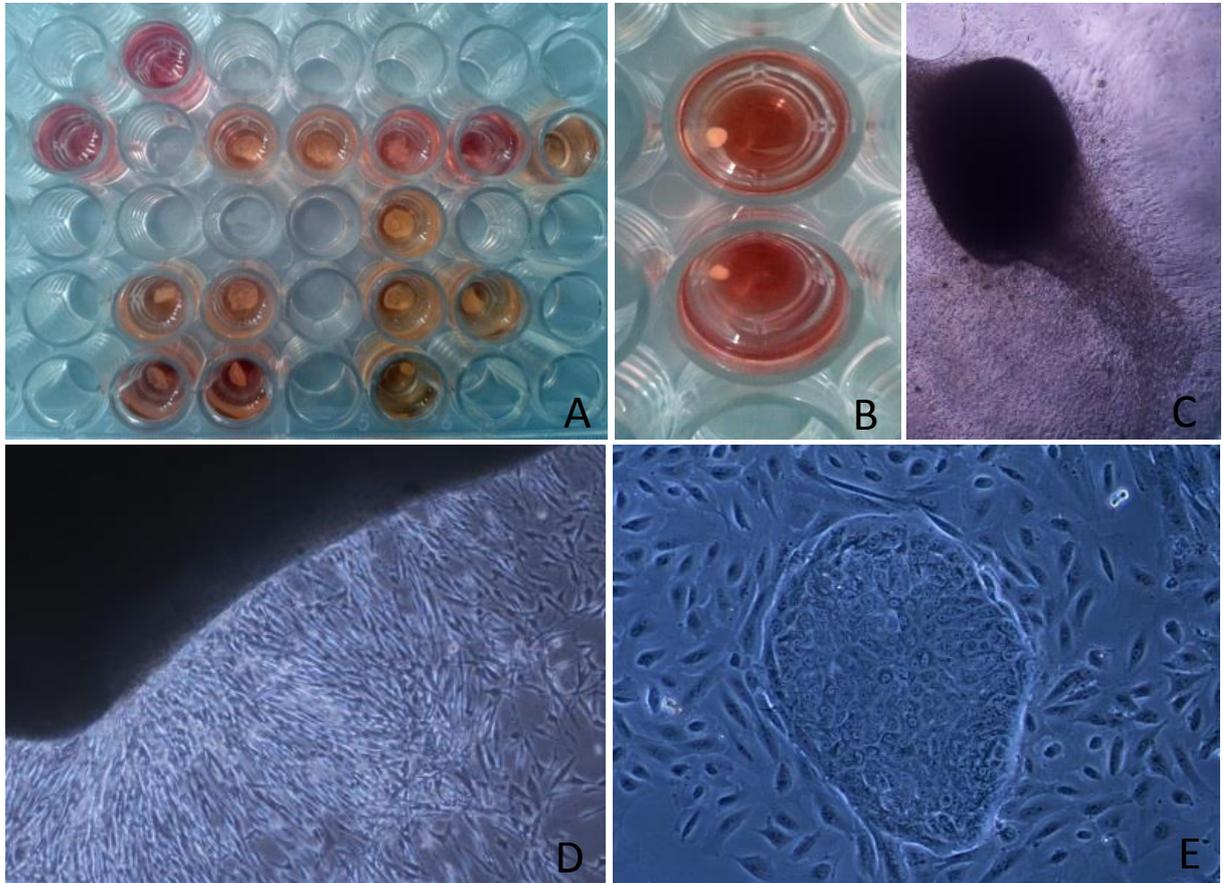


Figura 8. Evolución celular durante el experimento

Análisis histológico e inmunofluorescencia

En el experimento con células hepáticas adultas, de todas las muestras analizadas, sólo dos presentan estructuras sospechosas de ser ductos (Fig. 9A y 9B) sobre las que se realizaron posteriormente las pruebas de inmunotinción. Se puede apreciar la existencia de un “lumen” delimitado por células.

En el caso del experimento con las células fetales, al observar las tinciones con H&E al microscopio óptico se detecta muy poca supervivencia celular en los *scaffolds*. (Fig. 9C)

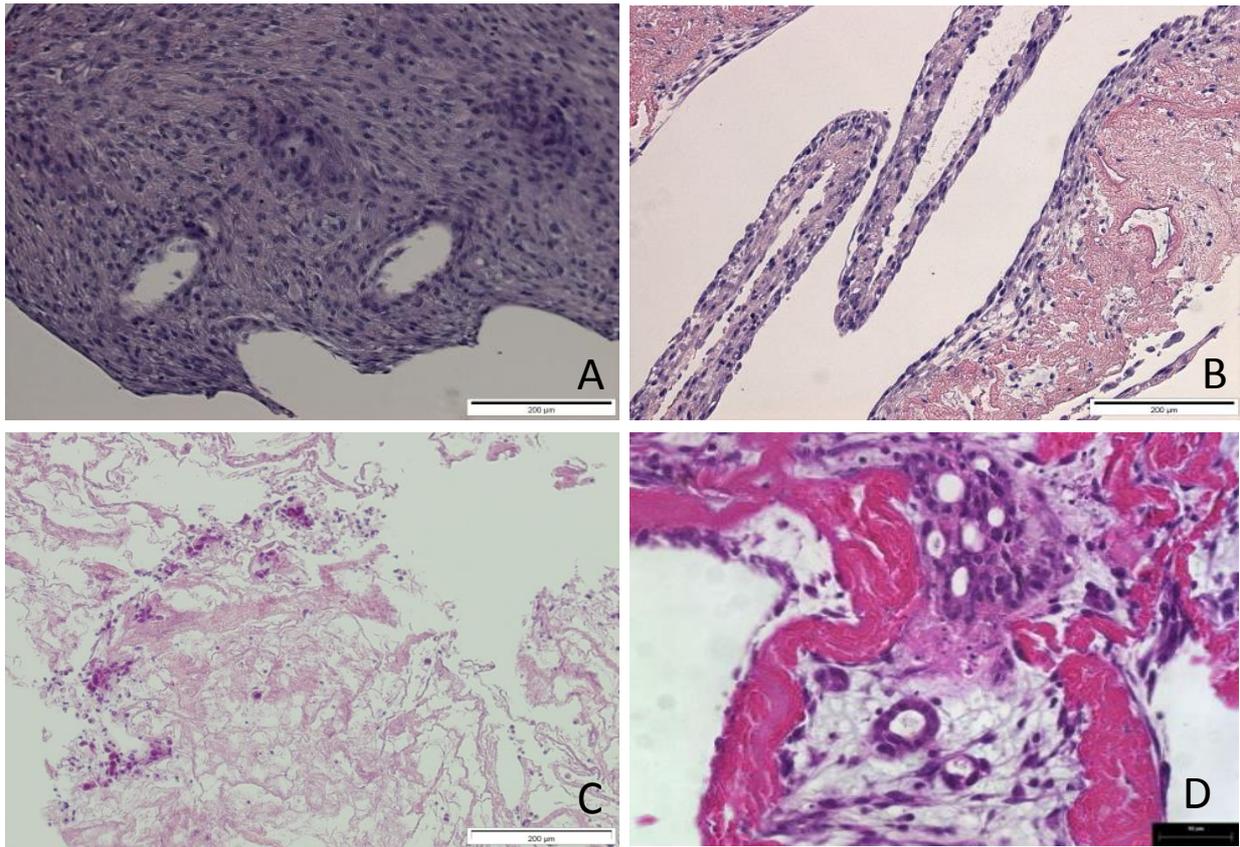


Figura 9. A) Agregado hBEC+hUVEC+hMSC sembradas en plástico, B) hMSC+hBEC sembradas en *scaffold*. C) hepatoblastos sembrados en *scaffold*; D) Imagen de ductos biliares (tomado de Baptista PM et al, incluido para mostrar una muestra positiva de ducto biliar)

La tinción con anticuerpos ha sido negativa en el caso del experimento con células adultas. En las fotos correspondientes a la muestra A (Fig.10.1) se pueden detectar los “lúmenes” vistos anteriormente rodeados de células, pero ninguna de ellas es positivo para el CD31, por lo que no se trata de un vaso sanguíneo; lo mismo ocurre para la CK19, por lo que no se trata tampoco de un ducto biliar. En la muestra B (Fig.10.1) se obtienen los mismos resultados negativos con estos dos anticuerpos. La vimentina, en cambio, da positivo en los dos casos, indicando que la mayor parte de las células que han sobrevivido son estromales.

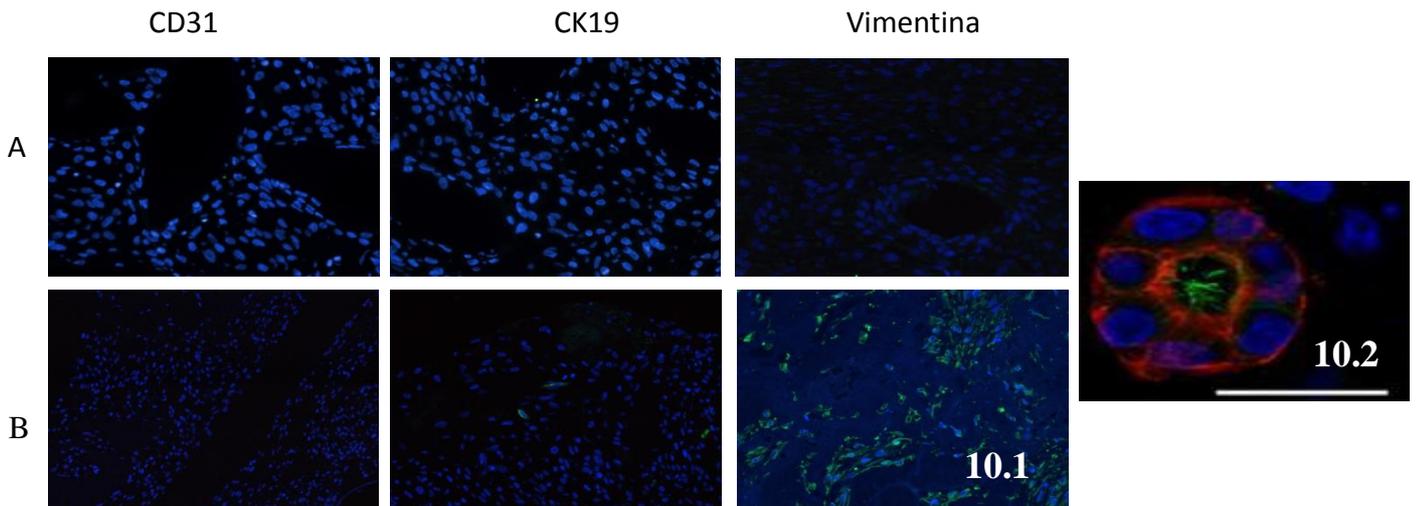


Figura 10.1 Tinción de las dos muestras sospechosas con los distintos anticuerpos (CD31 para las células endoteliales, CK19 para las células del epitelio biliar y vimentina para las células mesenquimales). A) Agregado hBEC+hUVEC+hMSC sembradas en plástico; B) hMSC+hBEC sembradas en *scaffold*; 10.2) Inmunotinción de un ducto biliar con CK19 y alpha tubulin (Tomado de Baptista PM el al, incluido para mostrar un control positivo de ducto biliar)

No se ha realizado prueba de inmunotinción en los scaffolds sembrados con hepatoblastos, debido a la escasez de supervivencia y crecimiento celular que presentaron.

DISCUSIÓN

Tras el análisis de estos experimentos, se observa que no ha sido posible formar ductos biliares *in vitro* en estas condiciones. Esto puede ser debido, en primer lugar, al componente celular. El fenotipo de las hBEC en el momento de la siembra, después de una larga expansión, ya no era el adecuado, ya que se podían observar muchas células senescentes y deformes, probablemente debido a un pase muy elevado (p10 y 12). Sin embargo, con este experimento se ha podido determinar su comportamiento en cultivo: cuando están en pases altos empiezan a deformarse y a perder su fenotipo normal, con presencia de muchas células de mayor tamaño y multinucleadas por todo el cultivo. Las hUVEC por su parte, presentaban muy buen crecimiento celular durante la fase de expansión, pero no fueron capaces de sobrevivir con el medio de cultivo diseñado para el co-cultivo con los otros dos tipos celulares (medio de cultivo de las *scaffolds*). En el caso de las hMSC, al igual que las hUVEC, presentaban también una tasa de crecimiento muy activa en la expansión, pero tampoco fueron capaces de sobrevivir con el medio de *scaffolds*.

A pesar de haber llegado al punto de obtener la formación de agregados celulares e incluso organoides (una buena señal, ya que indica que las células están interaccionando entre sí, reorganizándose y originando una estructura tridimensional), se ha visto con las inmunotinciones que ninguno de estos tipos celulares estaba presente ni en los agregados celulares ni en los *scaffolds* sembrados, sino que se trataría probablemente de fibroblastos. Esto indica que hay que rediseñar la fórmula del medio empleado en el co-cultivo, añadiendo algunos componentes extra (factores de crecimiento y hormonas) que sean más específicos para el crecimiento de cada tipo celular.

En el caso de los hepatoblastos, el principal problema fue el despegue de la placa. Se empleó mucho tiempo hasta que pudieron ser efectivamente desprendidas con el EDTA, lo que probablemente haya sido suficiente para alterar su constitución iónica. A pesar de que la prueba de viabilidad realizada después indicara que un 70% de las células estaban vivas, no fueron capaces de sobrevivir en números suficientes ni de crecer tras sembrarlas en los discos.

Otro factor que puede haber influido es el proceso de obtención de los *scaffolds*. Tal vez el proceso de descelularización empleado no sea el más adecuado. Hay científicos²⁷ que proponen un protocolo de descelularización de 4 fases, que consigue mantener insolubles todos los tipos de colágeno de la matriz. Es por ello que hay que optimizar la técnica de descelularización para obtener así una matriz que preserve en mayor medida sus componentes bioquímicos, manteniendo su estructura lo mejor posible, para que las células se puedan adherir más fácilmente, permitiéndoles sobrevivir y crecer de un modo más efectivo.

CONCLUSIÓN

La generación de organoides hepáticos que desarrollen ductos biliares es un paso importante para la creación de modelos biológicos *in vitro* con una fisiología más similar a la humana. Así, este proyecto ha podido crear las bases para la creación de estos organoides en laboratorio a partir de células exclusivamente humanas. Sin embargo, hay todavía una gran necesidad de optimizar estos modelos biológicos, mejorando el medio de cultivo (que sea realmente adecuado para todos los componentes celulares), utilizando células en fases más bajas y matrices extracelulares lo más preservadas posible. Una vez conseguido esto, creo que será posible lograr la generación de organoides hepáticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 260(5110):920-6, 1993
2. Chung SY. Bladder tissue-engineering: a new practical solution). *Lancet* 15;367(9518):1215-6, 2006
3. Raya-Rivera A. et al. Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study. *Lancet* 377(9772):1175-82, 2011
4. Raya-Rivera AM. et al. Tissue-engineered autologous vaginal organs in patients: a pilot cohort study. *Lancet* 384(9940):329-36, 2014
5. Liu JC. A novel strategy for engineering vascularized grafts in vitro. *World J Stem Cells*, 2(4):93-6, 2010
6. Macchiarini P. et al. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *Lancet* 372(9655):2023-30, 2008
7. Gallico GG. et al. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *The new English journal of medicine* 311(7):448-51, 1984
8. Hernigou P. Bone transplantation and tissue engineering. Part II: bone graft and osteogenesis in the seventeenth, eighteenth and nineteenth centuries. *International orthopaedics*, 2014
9. Bhardwaj N, Devi D, Mandal BB. Tissue-engineered cartilage: the crossroads of biomaterials, cells and stimulating factors. *Macromolecular bioscience*, 2014
10. Disher et al 2010: Discher D, et al. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science* 2009; 324(5935):1673-1677
11. Than N.N, Newsome P.N. Stem cells for liver regeneration. *Quarterly Journal of Medicine Vol 107 (6):417-421*, 2014
12. Kordes C, et al. CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 352:410–417, 2007
13. Sicklick JK, et al. Evidence for epithelial-mesenchymal transitions in adult liver cells. *AJP-Gastrointest Liver Physiol Vol 291 G575–G583*, 2006
14. Huang W. et al. Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science Vol.14; 312(5771):233-6*, 2006

15. Geier A, Trautwein C. Bile acids are “homeotrophic” sensors of the functional hepatic capacity and regulate adaptive growth during liver regeneration. *Hepatology* 45(1): 251-3, 2007
16. Martínez-Hernández A, Amenta PS. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J* 9:1401-10, 1995
17. Faulk DM, et al. The effect of detergents on the basement membrane complex of a biologic scaffold material. *Acta Biomater* 10(1):183-93, 2014
18. Baptista PM, et al. Whole organ decellularization - A tool for bioscaffold fabrication and organ bioengineering. *Engineering in Medicine and Biology Society, 2009. Annual International Conference of IEEE*
19. Baptista PM, et al. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology* Vol.53, No.2, 2011
20. Tanimizu N et al. Liver progenitor cells develop cholangiocyte-type epithelial polarity in three-dimensional culture. *Molecular Biology of the Cell* Vol.18, 1472-1479, 2007
21. Kinoshita T, Miyajima A. Cytokine regulation of liver development. *Biochim Biophys Acta* 1592:303-12, 2002
22. McClain VA, Zorn AM. Molecular control of liver development. *Clin Liver Dis*; 10:1-25, 2006
23. Wang Y, et al. Paracrine signals from mesenchymal cell populations govern the expansion and differentiation of human hepatic stem cells to adult liver fates. *Hepatology*; 52:1443-54, 2010
24. Peerani R, Zandstra P. Enabling stem cell therapies through synthetic stem cell-niche engineering. *The Journal of Clinical Investigation* Vol.120, number 1, 2010
25. Takebe T. et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*; 499(7459):481-4,2013
26. Schmelzer E, et al. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med*; 204:1973-87, 2007
27. Wang Y et al. Lineage restriction of human hepatic stem cells to mature fates is made efficient by tissue-specific biomatrix scaffolds. *Hepatology* 53(1), 2011

Figura 1. Ebrahimkhani MR et al. Bioreactor technologies to support liver function in vitro. *Advanced drug delivery reviews* 69-70; 132-157, 2014

Figuras 2,3. Kordes C, Häussinger D. Hepatic stem cell niches. *The Journal of Clinical Investigation* Vol.123 (5), 2013

Anexo I. Medios de cultivo empleados para los distintos tipos celulares

Medio de cultivo para hMSC (500mL)

Reactivo	Volumen
DMEM-F12 + glutamax	445 mL
P/S	5 mL
FBS	50 mL

Medio de cultivo para hBEC (500mL)

Reactivo	Volumen
DMEM F12 + glutamax	445 mL
FBS	25 mL
MEM non essential aminoacids	5 mL
MEM vitamin solution	5 mL
P/S	5 mL
Lipid mixture chemically defined	500 μ L
	Concentración
Insuline	0.005 mg/mL
Transferrine	0.01 mg/mL
Selenium	2.5 μ l/mL
Bovine pituitary extract	13.4 mg/mL
Dexamethasone	10 ⁻⁶ M
T3	34 mg/mL
EGF	1 mg/mL
Forskolin	40 mg/mL

Medio de cultivo para hUVEC (500mL)

Reactivo	Volumen
MCDB 131	480 mL
FBS	10 mL
Glutamax	5mL
P/S	5 mL
Insuline	250 μ L
Transferrine	100 μ L
	Concentración
VEGF	25 ng/mL
FGF-2	20 ng/mL
EGF	20 ng/mL
IGF1	20 ng/mL



Universidad Zaragoza