

Células ovals en el hígado de ratas con lesiones quirúrgicas severas

SARRADELL, J.¹; RONDELLI, F.M.²; HRDALO, J.C.³; FIORENTINI, J.³; GOLLAN, A.⁷; MOLINARI, C.³; IBARGOYEN, G.¹; D'ESPÓSITO, R.⁴; PIETRONAVE, V.²; BELÁ, M.³; SCHIAFFI, A.³; RINAUDO, A.⁵; SACCHI, L.¹; PAGNI, C.⁶; FAIN BINDA, J.C.²

Resumen

Se realizaron intervenciones quirúrgicas para visualizar histológicamente la presentación y la intervención de células madre en la restitución tisular hepática de ratas hepatectomizadas. Se trabajó con dos grupos de animales: en uno se realizó hepatectomías leves, y en el otro, hepatectomías severas. En el primer grupo se observó una cicatrización del tejido injuriado, a diferencia del segundo grupo donde se verificó una masiva proliferación de conductos biliares de trayecto sinuoso, que generaron abundantes prolongaciones satélites. También se observó gran cantidad de células de morfología compatible con células ovals (núcleo y citoplasma ovals y relación núcleo citoplasma aumentada). Podemos concluir que la reparación hepática tras un daño menor se hace por la proliferación de células diferenciadas; en cambio, los daños mayores inician un proceso de reparación por células indiferenciadas progenitoras que generarán luego, hepatocitos y células ductales.

Palabras clave: (hígado), (células ovals), (lesiones quirúrgicas), (histopatología).

Oval cells in the liver of rats with severe surgical lesions

Summary

Surgical experiences to histologically visualize the presentation and intervention of stem cells in the hepatic cellular healing of rats were drawn. In one experience the hepatic tissue was slightly injured and in other group severe lesion was done. In the first group there was scarring. In the second group there was massive proliferation of biliary ducts of sinuous tract generating abundant satellital extensions when the lesion was severe. In relation to these structures, a great quantity of cells being morphologically compatible with hepatic oval cells (oval nucleus and cytoplasm and large nucleus to cytoplasm ratio) were observed. In conclusion the hepatic healing after a lesser damage is made by proliferation of differentiated cells and extreme damages begin healing by non-differentiated stem cells from biliary ducts generating hepatocytes and ductal cells.

Key words: (liver), (oval cells), (surgical lesions), (histopathology).

¹Patología Gral. y Esp., ²Inmunología, ³Cirugía Veterinaria, ⁴Patología Médica, ⁵Histología y Embriología, ⁶Inglés Técnico, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional Rosario, ⁷Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Esperanza. Correspondencia: Dr. Javier Sarradell, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNR, Ruta 33 y O. Lagos-Casilda (SF), CP 2170. Tel: 03464-422050 int. 234. e-mail: jsarrade@fveter.unr.edu.ar

Recibido: 12.08.2009 - Aceptado: 26.08.2010

Introducción

El aislamiento de células madre embrionarias humanas (hCME) en 1998 por J. Thomson y col., con capacidad potencial de formar la mayoría de las células del cuerpo (totipotenciales), constituyó una buena posibilidad de emplearlas como fuente de reemplazos de células, tejidos y órganos, para tratamientos de tipo regenerativo, no paliativo. Estas hCME, para ser utilizadas en forma efectiva, requieren destrucción previa de embriones humanos. Estos procedimientos constituyeron un tema muy controvertido desde varios puntos de vista, por lo que el avance científico fue enfocado en estudios en animales que permitieran conocer otras vías de restitución. Existen diversos trabajos en la bibliografía internacional, dedicados al estudio de las células madre (CM) hepáticas^{2,5,6,7,8,13,14}. La unidad estructural-funcional del parénquima hepático es el lobulillo, construido alrededor del tracto portal y la vena central. Formado por seis grupos de tractos, cada uno con una vena portal, una arteriola hepática y un ducto biliar, alrededor de la vena central. La sangre proviene de sinusoides que rodean los hepatocitos y fluyen desde las venas y arteriolas^{11,16}. Los hepatocitos (células epiteliales) predominan, organizados en placas que alcanzan 20 células de longitud, rodeados a ambos lados por el endotelio sinusoidal. Tienen diferencias morfológicas y funcionales según su localización, aumentan de tamaño desde el tracto portal a la vena central, siendo los más cercanos al tracto portal diploides y con mayor potencial de crecimiento¹⁵. Las células madre, de forma oval (células ovals) están localizadas en la cercanía de los canales de Hering, ductos biliares o colangiolos, diferenciándose en su recorrido hacia la vena central¹⁴. Las células ovals hepáticas son células progenitoras, que poseen núcleo y citoplasma ovalado y mayor relación núcleo-citoplasma que otras células. Fueron descubiertas por efecto de carcinógenos en ratas; se originan en los canales de Hering¹³ e invaden el parénquima, surgiendo entre ellas pequeños núcleos de hepatocitos basófilos y otras células con morfología en transición, constituyendo un

“compartimiento de células ovals”, que luego se diferenciarán hacia células parenquimatosas². Los anticuerpos monoclonales desarrollados para identificar antígenos de células madre (OV-6, OC2 y OC3) han permitido identificarlas como células ovals^{12,17}. Asimismo, estas células también expresan marcadores de células madre hematopoyéticas: Thy-1, CD34 y c-kit así como Flt-3¹⁰. El hígado tiene una gran capacidad de regeneración después de injurias o resecciones, a través de la proliferación de las diversas células, pero si el daño es extenso, la regeneración se hace desde células progenitoras del canal de Hering que originan clones de células ovals de capacidad bipotencial (linaje hepatocitario y epitelial biliar)^{2,5}.

El objetivo de la presente comunicación es describir los cambios inducidos por lesiones quirúrgicas severas en hígados de ratas Wistar.

Materiales y métodos

Con la finalidad de visualizar el mecanismo reparador de las propias células progenitoras y observar in situ la morfología de las CM hepáticas, se realizaron resecciones de distintos tamaños en el hígado de veinte ratas Wistar (Figuras 1 y 2). En diez de ellas se realizó una resección pequeña del lóbulo hepático anterior de 2 cm. de largo por 0,5 cm. de ancho y 0,4 cm. de profundidad. En las otras diez se realizó una resección mayor que involucró a los lóbulos medio, caudal y lateral derecho, escindiéndose aproximadamente 2/3 del órgano.

Protocolo anestésico: se utilizó una combinación de xilacina 2% (5 mg./kg.) y ketamina 5% (100 mg./kg.), ambas administradas por vía intramuscular, obteniéndose un plano de anestesia quirúrgica de aproximadamente 30 minutos, suficiente para llevar a cabo la intervención.

Protocolo Quirúrgico: el abordaje del hígado se realizó a través de una laparotomía ventral mediana xifo-umbilical. La resección hepática se hizo con tijera curva delicada y sobre la línea de incisión se instiló adrenalina tópica. El parénquima se suturó con puntos hemostáticos,



Figura 1: Wistar, preparación del campo quirúrgico previo a la cirugía.

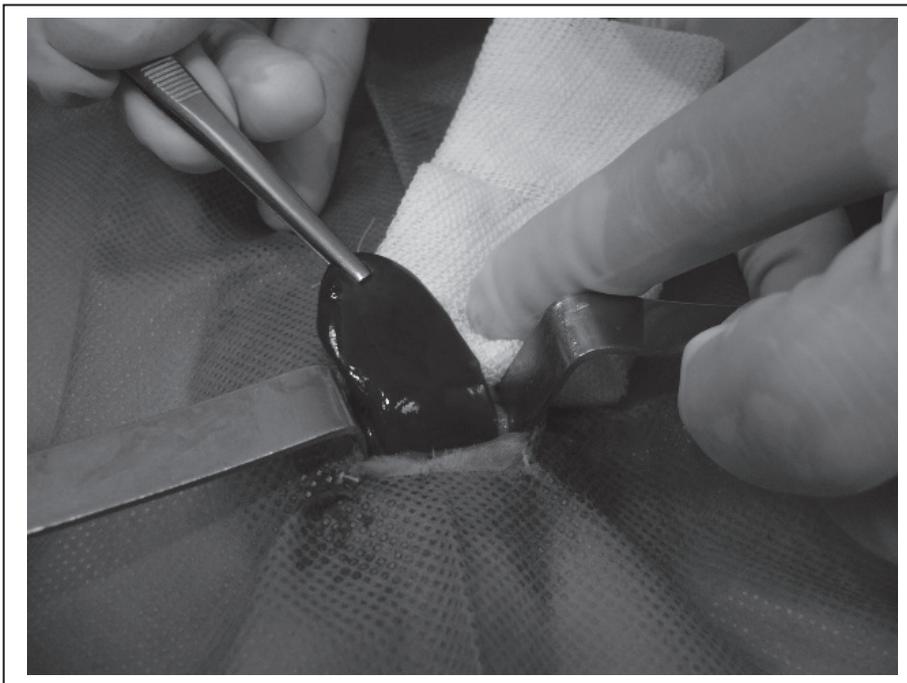


Figura 2: rata Wistar, procedimiento de resección de lóbulo hepático.

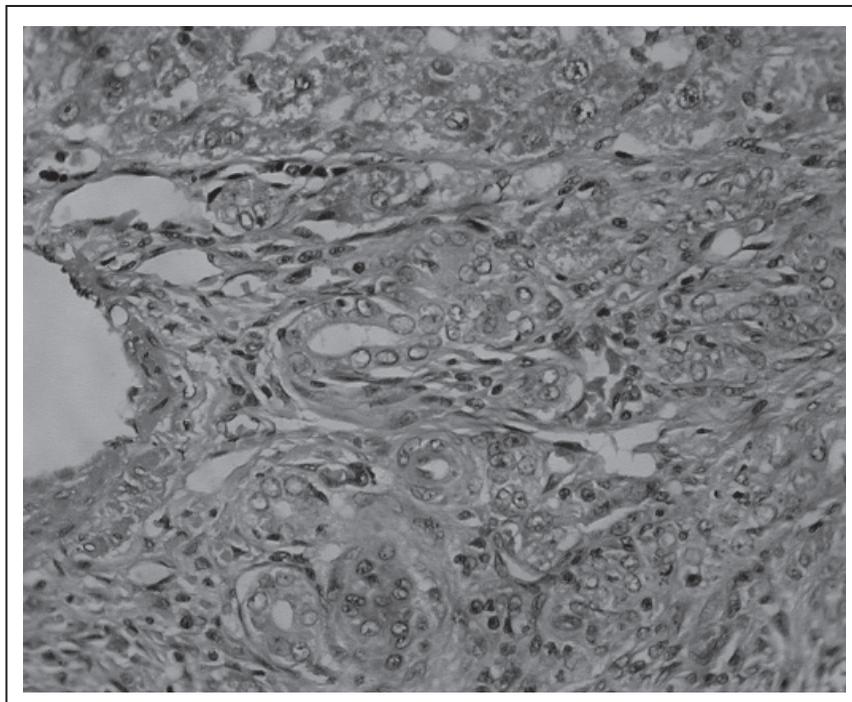


Figura 3: rata Wistar, proliferación de conductos biliares de trayecto sinuoso y presencia de células de morfología compatible con células ovales hepáticas. Hematoxilina y Eosina, 450x.

discontinuos en equis con seda 4/0 y aguja curva atraumática. La síntesis de la pared abdominal se realizó en dos planos, el primero (peritoneo y línea alba) con surgete continuo simple con seda 4/0; el segundo (subcutáneo y piel) mediante sutura discontinua de puntos en equis con nylon 0.25.

A los diez días, los animales fueron sacrificados para obtener muestras del órgano intervenido y realizar el estudio del proceso cicatrizal. Las muestras se fijaron inmediatamente en formol al 10% bufferado, y posteriormente incluidas en parafina y procesadas. Los cortes histológicos, de aproximadamente 4 micrómetros, fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina y PAS.

En todos los casos se brindaron los cuidados pre y post-operatorios pertinentes, conforme los principios de ética y bienestar animal, normados por la Comisión de Bioética de la FCV-UNR.

Resultados

Los cambios histológicos observados en los hígados de ambos grupos mostraron un patrón común conforme la magnitud de la resección realizada:

a) Cambios observados en resecciones pequeñas. Fuera del área quirúrgica, el parénquima hepático presentaba una arquitectura normal, con lobulillos poco definidos debido a una escasa presencia de tejido conectivo. Algunas células hepáticas mostraban inclusiones citoplasmáticas del tipo de vacuolas bien delimitadas que desplazaban el núcleo e histológicamente vacías del tipo lipídicas. La red de sinusoides hepáticos se mostraba moderadamente dilatada y congestiva.

En el área lesionada quirúrgicamente se pudo verificar un proceso de cicatrización hepático. Se observó un área de necrosis coagulativa delimitada por un infiltrado inflamatorio con predominio de polimorfonucleares neutrófilos y escasos macrófagos espumosos. Toda el área se encontraba circundada por una banda regular de tejido conectivo neoformado, donde ocasionalmente se observó moderada hiperplasia de canalículos biliares con un infiltrado mononuclear de población mixta (linfocitos y células tipo histiocitario). Se

registró la presencia de escasas células de Kupffer reactivas. El resto del parénquima no mostró cambios histopatológicos significativos.

b) Cambios observados en la resección mayor. El parénquima hepático alejado del área lesionada presentó cambios moderados caracterizados por la observación de células de Kupffer reactivas y una arquitectura normal, con lobulillos poco definidos debido a una escasa presencia de tejido conectivo. Al igual que el grupo anterior con resecciones pequeñas, algunas células hepáticas mostraban inclusiones citoplasmáticas del tipo de vacuolas bien delimitadas que desplazaban el núcleo e histológicamente vacías del tipo lipídicas. La red de sinusoides hepáticos se mostraba moderadamente dilatada y congestiva.

En las áreas lesionadas se verificó masiva proliferación de conductos biliares de trayecto sinuoso, que producían abundantes prolongaciones satélites. En relación a estas estructuras se observó gran cantidad de células de morfología compatible con células ovals hepáticas (núcleo y citoplasma ovals y relación núcleo citoplasma aumentada), el núcleo presentaba cromatina laxa finamente granular, la membrana nuclear delgada, el citoplasma claro levemente eosinófilo sin granulaciones evidentes y límite celular marcado (Figura 3). La extensión de este proceso fue considerado importante dado que involucró el ancho de aproximadamente un campo histológico con 200 aumentos.

Discusión

En los últimos años mediante estudios en ratas y aplicación biológica a la patogénesis de enfermedades hepáticas, se han demostrado células progenitoras hepáticas. Por ejemplo, el uso de distintos carcinógenos derivaban en un carcinoma hepatocelular⁴, que era acompañado de la proliferación de pequeñas células, de citoplasma escaso y núcleo ovoide, situadas en el tracto portal en los canales de Hering. A medida que el parénquima se reconstituye, las células ovals van desapareciendo. La analogía humana con estas células está en debate¹⁴. En 1999 se obtuvieron células ovals en ratas a

partir de células madres (CM) hematopoyéticas de médula ósea, que migran en el hígado, originando nuevos tejidos¹¹. Otros modelos de activación de células ovals en ratas se logran por administración de 1,4-bis [N,N'-di(etilen)-fosfamida] piperazina (Dipin) o 12,18- dihidroxi-senecionan-11-16-diona (retrorsine) en combinación con hepatectomía parcial, intoxicación aguda con alcohol alílico o administración de D-galactosamina que bloquea temporalmente la proliferación de hepatocitos⁹.

El hígado puede mostrar dos tipos diferentes de cicatrización, siempre dependiendo del grado o extensión de la lesión⁵. Daños focales, mínimos o moderados, no activan el proceso de regeneración antes mencionado y el daño es reparado simplemente por la proliferación de tejido conectivo. Esto coincide con lo observado en nuestro trabajo. Cuando se producen daños más extensos, cualquiera fuera su causa, el hígado se regenera muy rápidamente en una a dos semanas⁹ y es posible verificar la presencia de células ovals (células progenitoras), hepatocitos y células epiteliales biliares. Aquéllas podrían provenir de la médula ósea (células itinerantes). Esto fue confirmado en humanos, demostrándose que es un hecho fisiológico, no necesitándose injuria hística y se postula que el daño crónico puede ser reparado por células hematopoyéticas endógenas y exógenas^{3,11,15}. Como se ha comprobado que las CM de médula ósea derivan en músculo cardíaco, esquelético y tejido mesenquimático, transformándose en células itinerantes susceptibles de sufrir diferenciaciones, el tratamiento de enfermedades hepáticas con CM hematopoyéticas ofrece opciones favorables³.

La reconstitución del parénquima hepático tras el tratamiento con N-2- acetilaminofluoreno (2-AA) y la hepatectomía parcial involucra no sólo a las células ductales ovals, sino a las células de Kupffer, a las células hepáticas estrelladas y a componentes de la matriz extracelular (laminina y fibronectina). La remodelación de la matriz extracelular, la producción de factores de crecimiento y la expresión de receptores de factores

de crecimiento por las células no parenquimatosas juegan un rol fundamental en la regeneración hepática mediada por células ovasales a través de interacciones célula - célula y célula- matriz¹⁸.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en esta experiencia, muestran que la reparación hepática tras un daño menor se hace por la proliferación de células diferenciadas; en cambio, cuando el daño es severo, inician una reparación por células indiferenciadas progenitoras (células ovasales) desde los conductos biliares, que van a generar luego, hepatocitos y células ductales. Por lo tanto, se puede inferir que el hígado ante lesiones quirúrgicas, puede mostrar dos tipos diferentes de cicatrización, dependiendo del grado o extensión de las mismas. Las focales, mínimas o moderadas, son reparadas por la proliferación de tejido conectivo. En los daños más extensos, es posible verificar la presencia de células tipo ovasales (células progenitoras), hepatocitos y células epiteliales biliares. Las primeras, podrían provenir de la médula ósea (células itinerantes).

Agradecimiento

A los alumnos: Holeywell, L.; Ruscica, V.; Carlín, C.; Poli, G. por su colaboración.

Bibliografía

1. De Vos, R., Desmet, V. Ultrastructural characteristics of novel epithelial cell types identified in human pathologic liver specimens with chronic ductular reaction. *Am J Pathol.* 1992; 140:1441-1450.
2. Fausto, N. Liver regeneration. *J Hepatol.* 2000; 32:19-31.
3. Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 1998; 279:1528-1530.
4. Hixson, D., Faris, R., Thompson, N. An antigenic portrait of the liver during carcinogenesis. *Pathobiology.* 1990; 58:65-77.
5. Lorenti, A. Células progenitoras hepáticas. *Medicina.* 2001; 61:614-620.
6. Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol.* 2007; 213(2): 286-300.
7. Michalopoulos GK. Liver regeneration: Alternative epithelial pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009; 27. [Epub ahead of print]
8. Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol.* 2010; 176(1):2-13.
9. Oertel M., Shafritz DA. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1782:61-74.
10. Oh SH., Hatch HM., Petersen BE. Hepatic oval "stem" cell in liver regeneration. *Semin Cell Devel Biol.* 2002; 13: 405-409.
11. Petersen, B., Bowen, W., Patrene, K., et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science.* 1999; 284:1168-1170.
12. Roskams, T., De Vos, R., Van Eyjn, P., Myazaki H., Van Damme B., Desmet V. Hepatic OV-6 expression in human liver disease and rat experiments: evidence for hepatic progenitor cells in man. *J Hepatol.* 1998; 29:455-463.
13. Strain, AJ., Crosby, H. Hepatic stem cells. *Gut* 2000; 46:743-745.
14. Theise, N., Saxena, R., Portmann, B., et al. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology.* 1999; 30: 1425-1433.
15. Theise, N., Mimmakayalu, M., Gardner, R., et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology.* 2000; 32:11-16.
16. Weibel, ER., Stäubli, W., Gnägi, HR., Hess, FA. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. *J Cell Biol.* 1969; 42:68-91.
17. Zhang, Y., Bai, XF, Huang, CX. Hepatic stem cells: existence and origin. *World J Gastroenterol.* 2003; 9(2): 201-204.
18. Zhang, W., Chen, XP, Zhang, WG., et al. Hepatic non-parenchymal cells and extracellular matrix participate in oval cell-mediated liver regeneration. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(5): 552-560

