

# Análisis de la polaridad estructural y funcional de estructuras tridimensionales (esferoides) de células hepáticas porcinas cultivadas *in vitro*

Alicia S Lorenti,<sup>1</sup> Alejandra M Hidalgo,<sup>1</sup> Mariana R Barbich,<sup>1</sup> José Torres,<sup>1</sup> Juan Batalle,<sup>1</sup> María F Izaguirre,<sup>2</sup> María Paula Fiorucci,<sup>2</sup> Víctor Casco,<sup>2</sup> Adrián Gadano,<sup>3</sup> Pablo F Argibay<sup>1</sup>

*Acta Gastroenterol Latinoam* 2006;36:66-75

## Resumen

Los hepatocitos son células epiteliales polarizadas que, al ser aisladas y cultivadas, pierden la polaridad y las propiedades de célula diferenciada. El cultivo de células hepáticas como esferoides permite obtener estructuras con organización de tipo tisular. En este trabajo se analizó estructural y funcionalmente la polaridad de esferoides porcinos. Para ello, las células hepáticas porcinas fueron aisladas y cultivadas en agitación constante. La actividad metabólica de los esferoides fue probada mediante el metabolismo de diazepam y de amonio, así como con síntesis de albúmina. Sus características estructurales mostraron la polaridad de las células. Fueron observados paquetes de fibras de colágeno distribuidas irregularmente y fibras reticulares en forma homogénea en todo el volumen del esferoide. Se hallaron células Ck19+ formando estructuras tipo ducto biliar, así como también  $\eta$  y  $\eta$ -cateninas y pan-cadherinas en diferentes zonas, especialmente en las láminas externas, con características de epitelio cuboidal. Por microscopía electrónica de barrido se observaron es-

tructuras muy compactas con superficie lisa, y por microscopía electrónica de transmisión, canalículos biliares con microvellosidades, uniones tight, zonula adherens y desmosomas. Las organelas celulares como mitocondrias, núcleos, nucleolos, peroxisomas, retículo endoplásmico estaban bien conservadas. Una compleja red de canalículos biliares fue observada mediante la incorporación y excreción de un análogo de sal biliar fluorescente. El análisis de los ácidos biliares excretados mostró un patrón normal. La morfología y funcionalidad de los esferoides puede aportar un modelo apropiado para aplicaciones en las que es primordial mantener las funciones específicas del hígado, como un dispositivo de hígado bioartificial.

## Summary

### Structural and functional polarity of porcine hepatocyte cultured spheroids

Hepatocytes are epithelial cells that show a complex polarity *in vivo*. However, hepatocytes isolated and cultured *in vitro* normally lose both their differentiated properties and polarity. Culturing hepatocyte spheroids seems to be the accurate approach to maintain tissue level of organization. The structural and functional polarities of pig liver spheroids were analyzed in this work. Swine liver cells were isolated and cultured as spheroids. Their metabolic activity was proved through the metabolism of diazepam, ammonium and synthesis of albumin. Several structural features show the presence of polarity in the cells inside the spheroids. Reticular and collagen fibers, as well as Ck19(+) cells forming duct-like structures were found.  $\eta$  and  $\eta$ -catenins and pan-cadherins were positive in different regions of the spheroids, mainly in the outer cell layers, which have cuboi-

<sup>1</sup> Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental, Hospital Italiano de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup> Laboratorio de Microscopía, Facultad de Bioingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos, Paraná, Argentina.

<sup>3</sup> Servicio de Hepatología, Hospital Italiano de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.

<sup>4</sup> Profesor de Gastroenterología, Facultad de Medicina, Universidad Federal de Bahía – UFBA. Coordinador de Laboratorio de Gastroenterología y Biología Molecular, Hospital Universitario Profesor Edgard Santos.

**Correspondencia:** Pablo Argibay  
Potosí 4240, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.  
Tel: 4959-0200 int. 8919 - Fax: 4958-2200  
E-mail: pablo.argibay@hospitalitaliano.org.ar

*dal epithelia features. The scanning electron microscopy showed a tightly compacted architecture, with smooth surface. The transmission electron microscopy analysis showed bile canaliculi with microvilli, tight junctions, zonula adherens and desmosome-like junctions. Well-maintained cellular organelles, as mitochondria, nucleus, nucleolus, peroxisomes, endoplasmic reticulum, were seen in the spheroids. A complex inner bile canaliculi network was shown by using a fluorescent bile acid analogue incorporated and excreted by the spheroids. Furthermore, excretion of a normal pattern of bile acids was demonstrated. The morphology and functionality of the spheroids may provide an appropriate model for applications where the maintenance of liver-specific functions is crucial, as a bioartificial liver device.*

**Index (palabras claves):** Gastric Emptying, Myocardial Infarction.

El trasplante ortotópico de hígado es el tratamiento definitivo para pacientes con falla hepática fulminante, aunque, dada la escasez de donantes, muchos de estos pacientes mueren en lista de espera. El desarrollo de terapias alternativas basadas en el uso de células, como un dispositivo de hígado bioartificial para soporte temporario de estos pacientes, requiere la utilización de células como componente biológico, capaces de mantener y llevar a cabo sus funciones diferenciadas hasta tanto el hígado en falla se recupere espontáneamente, o bien el trasplante definitivo pueda ser realizado.

La elección del tipo de células es un punto fundamental y dependerá de su disponibilidad, efectos adversos potenciales y capacidad para llevar adelante las funciones específicas.

Pueden obtenerse a partir de diferentes fuentes: células *stem* hepáticas,<sup>1-6</sup> líneas celulares hepáticas<sup>7-9</sup> o hepatocitos primarios.<sup>10</sup>

El uso de células primarias de origen humano o animal es quizás la mejor opción. Dado que la procuración de células humanas es tan limitada como la procuración de órganos,<sup>11</sup> el uso de células primarias de origen animal es una buena alternativa. En este sentido, el cerdo puede ser el animal de elección para tratamientos en humanos, por su adecuado tamaño, por la posibilidad de contar con criaderos en buenas condiciones de bioseguridad y porque sus órganos son anatómicamente similares al de los seres humanos.

Las células hepáticas porcinas pueden mantener *in vitro* la capacidad de sintetizar albúmina, detoxificar amonio y conservar la funcionalidad del citocromo P-450 por un período de tiempo.<sup>12,13</sup>

El objetivo de este trabajo es analizar la arquitectura y funcionalidad de esferoides hepáticos porcinos mediante diferentes técnicas: microscopía óptica y electrónica de barrido y transmisión, inmunocitoquímica, inmunofluorescencia, metabolización de diazepam y amonio, síntesis de albúmina, producción de sales biliares e incorporación y excreción de un análogo de sal biliar fluorescente.

## Materiales y métodos

### Aislamiento de hepatocitos y cultivo de esferoides

Todos los experimentos que fueron realizados siguiendo normas institucionales e internacionales para el uso y cuidados de animales de laboratorio. Los hepatocitos fueron aislados de cerdos Landrace de 8-12 kg de peso. Los animales fueron anestesiados con ketamina (100mg/ml), intubados, ventilados mecánicamente y luego anestesiados con isoflurano (1,5%). El método de aislamiento de las células hepáticas y su cultivo fue previamente descrito.<sup>20</sup>

### Ensayos de detoxificación y síntesis

Fueron analizados el metabolismo de amonio (a través de la medición de la producción de urea) y el metabolismo de diazepam como medidas de la capacidad de detoxificación de los esferoides *in vitro*. Para la medición de urea se agregó al cultivo de esferoides 20 mM CINH<sub>4</sub> (Sigma) y 2 mM de L-ornithine (Sigma) a diferentes tiempos. La urea fue determinada en el sobrenadante de los esferoides en los días: 1, 2, 4 y 6, mediante la técnica de diacetilmonoxima (Sigma).

Para la medición del metabolismo de diazepam, esta droga fue agregada (50 µg/ml) a los cultivos e incubada durante 3 horas. Diazepam, temazepam y oxazepam fueron determinados en los días 0, 1, 2, 4 y 6, en el sobrenadante de los cultivos. Para ello, los residuos de las muestras purificadas fueron resuspendidas en la fase móvil e inyectadas en un cromatógrafo HPLC (Symmetry, Waters Corp. Milford, MA, USA). La detección de las drogas se realizó por espectrometría de masa (triple quadrupole mass spectrometer, Quatro II, Micromass, Manchester, UK).

La síntesis de albúmina fue evaluada por *immuno-blotting* y se determinó tanto su contenido intracelular como el excretado al medio de cultivo. Para la medición de albúmina intracelular una alícuota de esferoides fue lavada dos veces con PBS frío y solubilizada con *buffer* de lisis (150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.5, 0,1% SDS, 1% deoxicolato de sodio, 1% Triton X-100, 0,5 mM EDTA), y 1% de cocktail inhibidor de proteasa y fosfatasa (Sigma). El lisado de proteínas obtenido (100µg determinado por método de Bradford) o bien 14 µl del medio de cultivo de los esferoides, fueron separados electroforéticamente sobre un gel 8% SDS-PAGE y luego transferidos a una membrana de nitrocelulosa por 90 minutos a 100 V (*buffer* de transferencia: 25 mM Tris-ClH, 192 mM glicina, 20% v/v metanol, pH 8.3). La membrana fue bloqueada por 90 minutos en 5% (w/v) leche descremada-*buffer* TTBS (20 mM Tris-ClH, 500 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7.5), y luego incubada por 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo monoclonal de cabra anti-albúmina porcina (Bethyl), a dilución 1:1000 en 5% (w/v) de leche descremada-TTBS. Se hicieron cinco lavados con TTBS de 5 minutos cada uno y se agregó anticuerpo anti-IgG de cabra, conjugado con peroxidasa, en una dilución 1:2000 en *buffer* leche descremada-TTBS. Las muestras fueron incubadas durante 1 hora y los cinco lavados fueron repetidos. Las especies inmunorreactivas fueron visualizadas por quimioluminiscencia.

#### Microscopía óptica

Tras 2 ó 6 días en cultivo los esferoides fueron dejados sedimentar por gravedad, cosechados y fijados con 10% de formaldehído-*buffer* neutro, embebidos en parafina y cortados con micrótopo (4µm). Se realizaron las siguientes tinciones: tricrómico de Masson, impregnación argéntica, hematoxilina-eosina y P.A.S.

#### Inmunohistoquímica

Diversas reacciones de inmunohistoquímica fueron realizadas sobre los esferoides previamente fijados en 10% formaldehído-*buffer* neutro, deshidratados en soluciones de etanol en concentraciones crecientes (50-100%), embebidos en parafina y cortados en secciones de 4 µm. Para la detección de células positivas para citokeratina 19, el anticuerpo primario (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle,

UK) fue analizado con el método de avidina-biotina-peroxidasa (Biogenex, San Ramon, CA, USA).

Para el análisis de moléculas de adhesión fueron usados los siguientes anticuerpos primarios: monoclonal de ratón anti-E y anti-P cadherinas (1:50 y 1:100, respectivamente); anti-catenina (1:50), anti integrina-β1 (1:50), anti-FAK (1:100), (Transduction Laboratories, Lexington, Kentucky, USA); policlonal de conejo anti-Pan-cadherina (1:100), (Sigma) y anti-catenina (1:100), (obsequio del Dr Pierre McCrea, Anderson Cancer Center, Texas, USA). Para la detección de los anticuerpos primarios se usaron los métodos de complejo ABC y fluorocromo. También se realizó inmunohistoquímica para 5-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU), (Novocastra, Newcastle, UK).

#### Microscopía electrónica

Para el análisis por microscopía electrónica las muestras de esferoides, colectados a los 2 ó 6 días en cultivo, fueron decantadas por gravedad y fijadas con glutaraldehído 2,5 % (Sigma) en *buffer* Millonig (2,26% PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>Na, Merck; 2,52% HONa, Merck; 5,4% glucosa, Sigma; 7.5:2:1), durante 2 horas. Siguió por un tratamiento con tetróxido de osmio 1% (Sigma) durante 30 minutos. Las muestras fueron incluidas en resina epoxi y cortadas con ultramicrotomo (60-90 nm).

#### Determinación de apoptosis

Para la detección de células apoptóticas se utilizó el *kit* TUNEL (Apoptag, Intergen, NY, USA) en muestras de esferoides de 2 y 6 días de cultivo, de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

#### Incorporación y excreción de ácidos biliares

La presencia de ácidos biliares fue analizada en el sobrenadante de esferoides cultivados por 24 y 48hs, mediante electroforesis capilar (Capillary Ion Analyzer, Waters Corp, Milford, MA, USA). Los datos fueron procesados por el *software* Millennium (Waters Corp).

Además, con el objeto de determinar la capacidad de los esferoides para captar y excretar ácidos biliares, se utilizó un análogo fluorescente de un ácido biliar, colil-lisil-fluoresceína (provisto gentilmente por el Dr Marcelo G Roma Rosario, Argentina, de una donación original del Dr Charles O Mills, Birmingham, UK). Para ello, una alícuota de esferoides cultivados

2 días fue incubada con el análogo fluorescente por 15, 30 y 60 minutos, a 37°C en oscuridad, lavada, congelada con metil-butano a -70°C, cortada y observada con microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400, Nikon Corporation, Tokyo, Japón).

## Resultados

El número de células obtenido en 30 experimentos osciló entre 4.000 y 23.000 x 10<sup>6</sup>, con una media de 9.569,7 ± 4.760,7 x 10<sup>6</sup> células. La viabilidad media fue de 88,7 ± 8,9 %. Inmediatamente después del aislamiento, más del 95% de las células estaban aisladas. Al primer día de cultivo con agitación constante comenzaron a observarse esferoides. Las células que permanecían aisladas fueron no viables y se eliminaron en los cambios del medio de cultivo. A los 2 días de cultivo, los esferoides eran estructuras esféricas y con tamaño medio de 134,2 ± 27,9 0µm. Si el cultivo se continuaba hasta los 6 días, el tamaño de los esferoides llegaba a 683,3 ± 181,2 µm.

Observados por microscopía óptica, los esferoides mostraban dos regiones: una monocapa externa de células cuboidales de naturaleza epiteloidal y, por debajo de ella, varias capas de las clásicas células poliédricas parenquimatosas con forma poligonal, núcleo redondeado y prominente, y baja relación citoplasma/núcleo.

Observados al microscopio electrónico de barrido los esferoides aparecían como estructuras muy compactas, con superficie lisa (figura 1A). Por microscopía electrónica de transmisión se observaron las características ultraestructurales de las células dentro de los esferoides: núcleos grandes y redondos, con nucleolo (uno o más) prominente, y abundante eucromatina. El citoplasma presentó pocos lisosomas y gotas de lípidos, mitocondrias bien mantenidas, mostrando numerosas crestas en su membrana interna, abundante retículo endoplásmico liso y rugoso rodeando las mitocondrias, y peroxisomas (figuras 1B y 1C). Se observaron también numerosos canalículos biliares con microvellosidades y complejos de unión característicos de la membrana apical: uniones *tight*, *zonula adherens* y desmosomas (figura 1D).

La tinción de impregnación argéntica permitió observar la presencia de fibras reticulares formando una compleja red entre las células en todo el volumen de los esferoides (figura 2A). La tinción con tricrómico de Masson permitió observar fibras de colágeno como paquetes de fibras en zonas aisladas (figura 2B).

Se encontraron células positivas para citoqueratina (19 dentro de los esferoides), formando estructuras tipo ducto biliar (figura 2C).

La presencia de depósitos de glucógeno fue observada por la presencia de células positivas en la tinción de PAS (figura 2D). Estos depósitos también fueron observados por microscopía electrónica de transmisión.

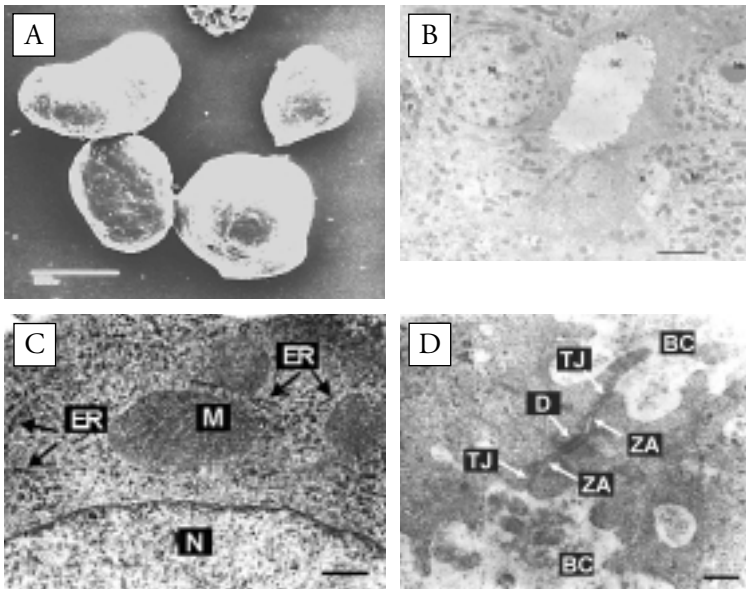
La inmunohistoquímica para pan-cadherinas reveló una delimitación entre las células cuboidales y poliédricas cercanas a la periferia de los esferoides. Por inmunofluorescencia, el patrón de tinción en el contacto entre las células poliédricas más externas se observó a través de toda la superficie y se volvió más aislado en las células cuboidales interiores (figura 3A). Fueron halladas células-catenina positivas en las células poligonales, tanto en la membrana como en el citoplasma (figura 3B). Fue observada una fuerte marcación para-catenina en las uniones intercelulares del epitelio cuboidal externo (datos no mostrados). Aún cuando estas moléculas de adhesión son más abundantes cerca de la periferia, ellas están presentes en todo el volumen de esferoides cultivados durante 2 días. Las tinciones para E-cadherina, P-cadherina, FAK, -catenina y 1-integrina, mostraron resultados negativos.

La inmunohistoquímica para 5-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU) mostró aisladas figuras mitóticas dentro de los esferoides a las 24, 48 y 72 hs de incubación (figura 4).

La técnica de TUNEL mostró la presencia de numerosos cuerpos apoptóticos en el interior de los esferoides de 6 días de cultivo, pero no en los de 2 días. Unas pocas células positivas aisladas fueron halladas en la periferia de los esferoides de 2 y 6 días de cultivo. Fue detectada la presencia de necrosis masiva en el interior de esferoides cultivados por 6 días, no así en los cultivados 2 días (datos no mostrados).

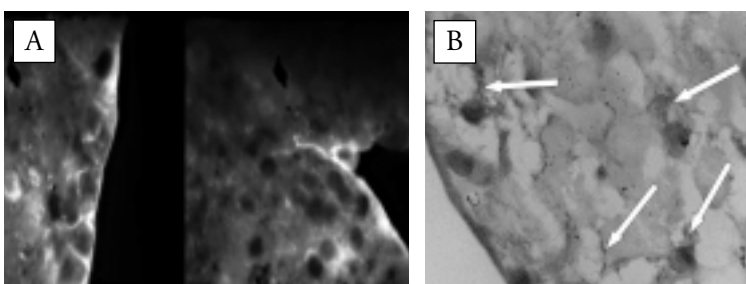
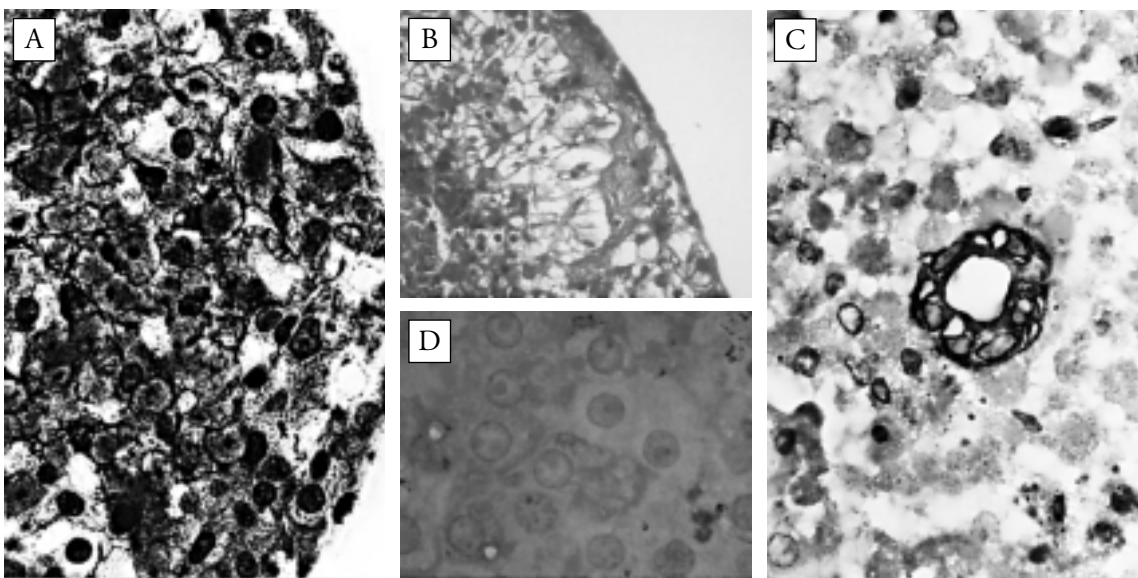
Los esferoides mantenidos *in vitro* fueron capaces de metabolizar amonio, lo cual se determinó a partir de la producción de urea (figura 5A). Por otro lado, el metabolismo de diazepam *in vitro* fue confirmado por la presencia de sus metabolitos temazepam y oxazepam (figura 5B).

El análisis de la excreción de ácidos biliares en el sobrenadante de los esferoides cultivados 1 y 2 días, mostró la presencia de los ácidos litocólico, queno-deoxicólico, glicoliticólico, taurolitocólico y glicocólico (tabla 1).

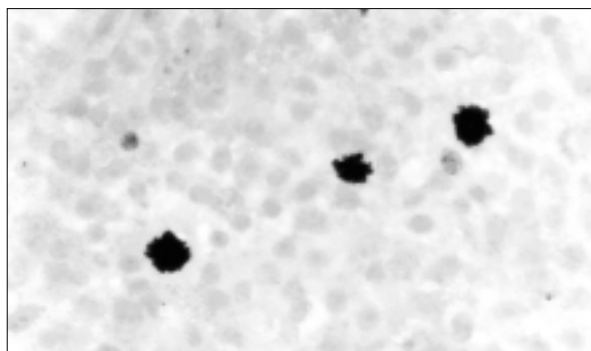


**Figura 1.** A - Esferoides de células hepáticas cultivados durante 48 hs, observados por microscopía electrónica de barrido. Barra: 100  $\mu$ m. B, C- Sección de esferoides observada por microscopía electrónica de transmisión, mostrando canaliculos biliares (BC) y alto grado de diferenciación de las células hepáticas. N: núcleo; Nc: nucleolo; P: peroxisoma; M: mitocondria; Mv: microvellosidades. ER: reticulo endoplásmico. Barra: 8  $\mu$ m (Figura B) y 200 nm (Figura C). D - Detalle de un complejo de unión intercelular entre dos canaliculos biliares observado por microscopía electrónica de transmisión. Se observan microvellosidades bien desarrolladas (Mv), uniones tight (TJ), zonula adherens (ZA) y desmosoma (D). Barra: 60 nm.

**Figura 2.** - Componentes de matriz extracelular observadas dentro de los esferoides: A. Fibras reticulares observadas por la tinción de impregnación argéntica (250 X). B. Paquete de fibras de colágeno observado por la tinción de tricrómico de Masson (100X). C. Células positivas para citoqueratina 19 formando una estructura tipo ducto biliar (250 X). D. Gránulos de glucógeno dentro de los esferoides (400X).

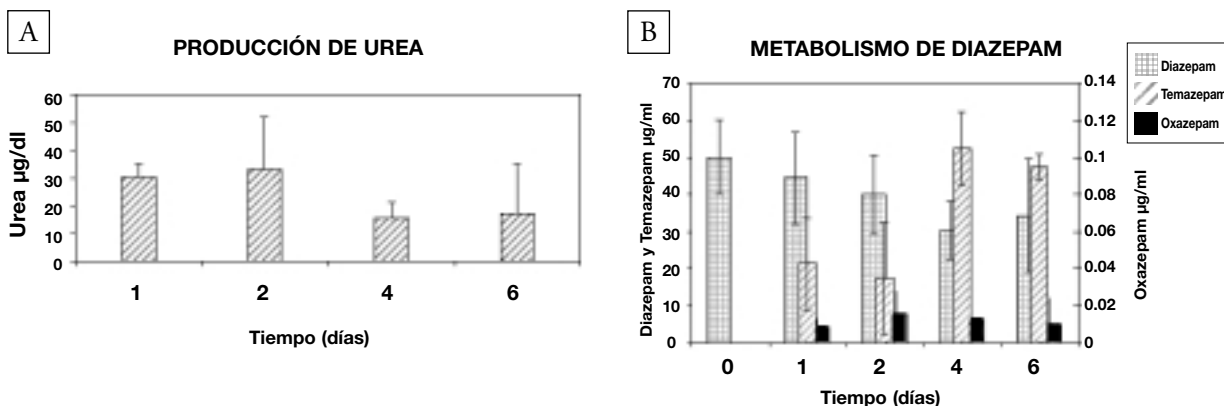


**Figura 3.** - A. Expresión de pan-cadherina en las células cuboidal periféricas y las poliédricas cercanas a la periferia de un esferoide, observada por inmunofluorescencia (333X). B. Expresión de-catenina por inmunohistoquímica (333 X). Las flechas indican regiones positivas tanto en la membrana como en el citoplasma de células dentro de un esferoide.



**Figura 4.** - Células aisladas positivas para 5-bromo-2'-deoxiuridina dentro de un esferoide.

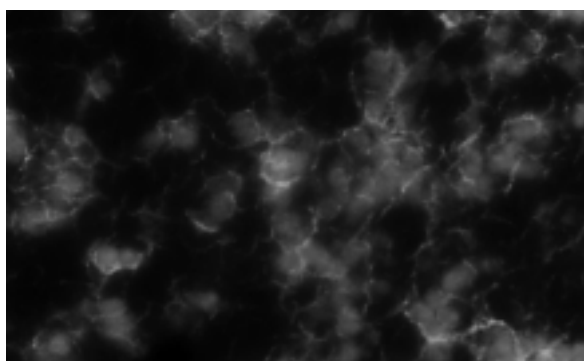
**Figura 5.** - Metabolismo llevado a cabo por los esferoides durante el cultivo in vitro de las células en los frascos con agitación magnética. Las determinaciones fueron realizadas como se describe en Materiales y Métodos. **A.** Producción de urea a partir de amonio, expresada como mg/dl, a diferentes tiempos (1, 2, 4 y 6 días de cultivo). **B.** Concentraciones de diazepam y sus metabolitos temazepam y oxazepam, expresados como µg/ml, a diferentes tiempos (0, 1, 2, 4 y 6 días).



**Tabla 1.** - Patrón de ácidos biliares secretados por los esferoides a las 24 y 48 hs de cultivo. Las concentraciones de los ácidos biliares fueron medidas en el sobrenadante de los esferoides en los frascos spinner. Después de las primeras 24 hs de cultivo, el medio fue completamente reemplazado. Los valores están expresados en µg/ml y porcentaje (%) de cada uno con respecto a la cantidad total de ácidos biliares encontrada.

Ácido biliar	24 hs (µg/ml)	48 hs (µg/ml)
Ácido litocólico	140.0	81.4
Ácido quenodeoxicólico	66.9	54.6
Ácido glicolitocólico	244.0	70.5
Ácido taurolitocólico	48.0	11.7
Ácido glicocólico	39.8	11.7

**Figura 6.** - Esferoides incubados por 15 minutos con colil-lisilfluoresceína. Se observa la concentración del análogo de la sal biliar en canales entre las células, formando una red.



La incubación de los esferoides por 15 y 30 minutos con colil-lisilfluoresceína mostró la incorporación y excreción del análogo fluorescente desde los hepatocitos

y su concentración en canales entre las células, formando una red (figura 6). Después de 1 hora de incubación la fluorescencia ya no fue hallada.

## Discusión

El desarrollo de un dispositivo de hígado bioartificial requiere contar con un gran número de hepatocitos metabólicamente activos por un período de tiempo suficiente como para sostener un paciente en falla hepática fulminante.<sup>10</sup> Idealmente, el mantenimiento de la polaridad celular que garantice una complejidad de organización similar a la de un tejido, podría asegurar que las células lleven a cabo las variadas y características funciones diferenciadas del hígado. El cultivo de hepatocitos como agregados esferoidales permite sin duda una mejor preservación de la morfología y función de una forma mucho más eficiente que el cultivo convencional en monocapa.<sup>14,15</sup>

En nuestros experimentos, el tamaño de los esferoides se incrementó desde  $134,2 \pm 27,9 \mu\text{m}$  al segundo día de cultivo, hasta  $683,3 \pm 181,2 \mu\text{m}$  al sexto día. Este incremento puede ser atribuido a la proliferación de las células dentro de los esferoides o bien a la agregación de pequeños esferoides formando otros más grandes. Aun cuando alguna actividad proliferativa fue demostrada en los esferoides por la presencia de figuras mitóticas, la agregación de pequeños esferoides parece ser la forma más adecuada para justificar el incremento del tamaño de los esferoides. Numerosas células necróticas y apoptóticas fueron detectadas en el interior y la periferia de los esferoides cultivados 6 días, en contraste con unas pocas observadas en los de 2 días. La apoptosis y la necrosis podrían ser causadas por una disminuida llegada de oxígeno y nutrientes a la parte interna de los esferoides más grandes y compactos, sumado a una acumulación de metabolitos secretados por las células. Es por este motivo que los esferoides cultivados por 2 días fueron seleccionados con vistas al diseño de un dispositivo de hígado bioartificial, en desarrollo en este momento por nuestro grupo de trabajo.<sup>16</sup>

Dentro de los esferoides se observaron las organelas celulares bien conservadas, como mitocondrias, retículo endoplásmico, peroxisomas, y otras, lo cual es fundamental para que las células sean capaces de llevar adelante los procesos metabólicos característicos de las células hepáticas funcionales.

La diferenciación y proliferación celular parecen ser procesos antagónicos dado que la diferenciación está frecuentemente asociada con la interrupción de la proliferación celular.<sup>17</sup> Sin embargo, ambos even-

tos pueden ser considerados estrechamente asociados, pues factores de crecimiento que estimulan la proliferación están relacionados también a procesos de diferenciación. Existen en la bibliografía diversos informes acerca del posible rol de diferentes factores de crecimiento sobre la capacidad de síntesis de los hepatocitos, como ser la expresión de albúmina,<sup>18</sup> así como funciones metabólicas y de detoxificación.<sup>19</sup> La estructura de los esferoides podría también ser modificada por la presencia de factores de crecimiento en el medio de cultivo. En este sentido, el medio de cultivo usado en este trabajo tiene una combinación de factores de crecimiento y de suero que contribuye a mantener el estado diferenciado de las células dentro de los esferoides. De hecho, a modo de ejemplo puede mencionarse que el ácido ascórbico sería un importante suplemento, dado que es requerido para el ensamblaje de la matriz extracelular,<sup>20</sup> y además disminuye el daño celular causado por la agitación constante durante este tipo de cultivo.<sup>21</sup>

Los componentes de la matriz extracelular tienen múltiples sitios de unión para diferentes proteínas de matriz extracelular, como colágeno y fibronectina, y también sirven como receptores y transductores de señales transportando información a través de la membrana plasmática en ambas direcciones.<sup>22</sup> La detección de una compleja red de fibras reticulares y paquetes de fibras de colágeno aislados dentro de los esferoides probablemente juegue un papel esencial en la estructura, compactación y funcionalidad de estos esferoides. De hecho, en otros trabajos la matriz extracelular ha sido implicada como parte fundamental en el mantenimiento de la polaridad celular.<sup>23</sup>

También debe mencionarse que no sólo la interacción célula-matriz extracelular sino también las moléculas de adhesión entre células vecinas influyen en la diferenciación celular.<sup>24</sup> Estas moléculas permiten los contactos directos célula-célula y proveen los sitios de anclaje para los filamentos intermedios que mantienen la arquitectura de todos los tejidos. Además de esta función estructural, las moléculas de adhesión también participan en la morfogénesis tisular y en la diferenciación celular.<sup>24</sup> En este sentido pueden mencionarse las cadherinas,<sup>25,26</sup> que son glicoproteínas de transmembrana presentes en las uniones intercelulares como los desmosomas y están involucradas en la polaridad, la motilidad y la diferen-

ciación.<sup>26-29</sup> Por otro lado, las cateninas (E-cadherinas,  $\alpha$ -cateninas) funcionan como conectores entre las cadherinas y el citoesqueleto de actina.<sup>29</sup> Nuestros resultados muestran una clara expresión de cadherinas y cateninas en los esféroides. Aun cuando estas moléculas de adhesión fueron más abundantes cerca de la periferia, ellas estaban presentes en todo el volumen de los esféroides cultivados por dos días.

En células epiteliales polarizadas las uniones tipo *adherens* forman parte de un complejo de unión flanqueado por las uniones *tight*, más apicales, y los desmosomas, más basales.<sup>30</sup> Nuestros estudios ultraestructurales demostraron la presencia de canalículos biliares sellados por complejos de unión como los mencionados y en ese orden: uniones *tight*, *zonula adherens* y desmosomas.

Aunque los hepatocitos y las células epiteliales ductales biliares (BEC) tienen un origen embriológico común, difieren en sus fenotipos y función.<sup>31</sup> Las BEC tienen un citoesqueleto bien desarrollado (citoqueratinas), diferente del de las células parenquimatosas. Esto permite que algunas citoqueratinas puedan ser usadas como marcadores para su identificación. Una de las más importantes es la citoqueratina 19. Fueron encontradas en este trabajo células positivas para citoqueratina 19, no como células aisladas sino formando estructuras tipo ducto, similares a los que se observan en el tejido hepático. La presencia de estas células u otras no analizadas específicamente en este trabajo, y no solamente hepatocitos, jugaría un papel clave en la obtención de los esféroides, como estructuras funcionales y con organización de tipo tisular.

Todas las características estructurales mencionadas demuestran que las células que componen los esféroides tienen polaridad desde el punto de vista estructural y esta polaridad podría estar asociada a polaridad funcional, es decir, que las diferentes caras de la superficie de los hepatocitos serían capaces de llevar a cabo sus funciones específicas y especializadas.<sup>30</sup>

Para probar la funcionalidad de los esféroides se usaron distintos ensayos. Así fue probada la capacidad de los esféroides de metabolizar amonio agregado al medio de cultivo, produciendo urea, durante los 6 días de cultivo. Es sabido que el amonio es uno de los mediadores de la encefalopatía hepática, que es una severa complicación de la falla hepática fulminante.

El metabolismo de drogas como las benzodiazepi-

nas llevado a cabo por el hígado es dependiente de un sistema microsomal dentro del cual se incluye la familia de hemoproteínas conocidas como citocromo P-450.<sup>32</sup> En este trabajo la actividad e integridad del citocromo P-450 de los esféroides fue efectivamente probado demostrando su capacidad de detoxificación de diazepam, mediante la presencia de sus metabolitos temazepam y oxazepam, también durante los 6 días.

Por otro lado, el transporte de ácidos biliares es también un elemento clave para analizar la polaridad de las células cultivadas como esféroides. Los ácidos biliares son derivados hidrofílicos del colesterol, sintetizados en el hígado a través de una cantidad de pasos que ocurren en el citosol, las mitocondrias, el retículo endoplásmico y los peroxisomas.

La formación de la bilis es una función importante en el hígado de los vertebrados y es producida por una continua secreción vectorial de sales biliares y otros aniones orgánicos desde la sangre a la bilis. El transporte de ácidos biliares a través de los hepatocitos es un proceso activo llevado a cabo mediante diferentes proteínas de transporte ubicadas en los dominios basolateral (sinusoidal) y apical (canalicular) de los hepatocitos.<sup>33,34</sup> La incorporación de las sales biliares a través de la membrana basolateral ocurre contra un gradiente de concentración manejado fundamentalmente por un sistema de transporte activo sodio-dependiente y también sodio-independiente. Una vez dentro de los hepatocitos, las sales biliares alcanzan la membrana canalicular para ser secretadas en la bilis, proceso modulado fundamentalmente por un sistema de transporte ATP-dependiente.<sup>34</sup>

En el ser humano, los ácidos biliares más abundantes son los primarios: ácido quenodeoxicólico (45%) y cólico (31%). En el intestino, los ácidos biliares primarios son convertidos a secundarios: deoxicólico y litocolato. Ambos son reabsorbidos por el intestino y devueltos al hígado a través de la circulación portal. Allí, los ácidos biliares primarios y secundarios son conjugados con glicina o taurina para luego pasar al canalículo biliar.<sup>35</sup> En este trabajo, la presencia de ácidos biliares (primarios, secundarios y conjugados) en el sobrenadante del cultivo de esféroides mostró un patrón similar al hallado en el hígado normal. Las concentraciones de ácidos biliares encontrados a las 24hs de incubación son superiores que las observadas a las 48hs para todos los

ácidos biliares. Sin embargo, analizando los porcentajes relativos de los diferentes tipos de ácidos se observa un descenso de los ácidos biliares conjugados respecto de los primarios y secundarios a las 48 hs de cultivo. Es importante mencionar que el medio de cultivo fue completamente reemplazado a las 24 hs de cultivo, lo cual implica que los ácidos biliares encontrados a las 48 hs fueron secretados por los esféroides después del cambio de medio. Serían necesarios otros experimentos con el objeto de elucidar si los esféroides son capaces de sintetizar los ácidos biliares o si su presencia es sólo el resultado del transporte de los ácidos biliares previamente sintetizados y contenidos en los hepatocitos.

Los análogos fluorescentes sintéticos de ácidos biliares han sido usados para analizar los mecanismos de transporte de ácidos biliares.<sup>36</sup> Tienen cinéticas de incorporación, propiedades físicas y biológicas, tasas de eliminación y propiedades colestáticas similares a los correspondientes ácidos biliares endógenos. La estrecha similaridad en el comportamiento del ácido biliar conjugado lisil-fluoresceína con respecto al compuesto natural correspondiente da suficiente soporte para que sea usado como molécula sustituta para estudios de transporte de ácidos biliares.<sup>37</sup> Este análogo fluorescente fue tomado por los hepatocitos en los esféroides y luego excretado y concentrado en canales entre células, poniendo en evidencia el desarrollo de una red de canales ya observada a los 15 minutos de incubación, hasta los 30 minutos pero no después de 1 hora.

En conclusión, los estudios mostrados respecto de la estructura y funcionalidad de los esféroides demuestran que éstos no son simples agregados de células sino que han alcanzado un nivel de organización similar al del tejido hepático. Estas estructuras serían útiles como modelo *in vitro* para ciertas aplicaciones en las cuales el mantenimiento de las funciones específicas del hígado es crucial, particularmente en el desarrollo de un dispositivo de hígado bioartificial.

#### Agradecimientos

Los autores agradecen la invaluable colaboración del Dr Sung Ho Hyon, Veterinario Esteban Mele, y los Técnicos Luis Sanjurjo, Eduardo Pérez y Gloria Rada. También desean agradecer al Dr Arquímedes Bolondi por su detallado análisis de microscopía electrónica y al Dr Marcelo Roma por su generosa colaboración del análogo de sal biliar fluorescente.

#### Referencia

- Hunt JN. Mechanisms and disorders of gastric emptying. *Annu Rev Med* 1983;34:219-229.
- Burks TF, Galligan JJ, Porreca F, Barber WD. Regulation of gastric emptying. *Fed Proc* 1985;44:2897-2901.
- Weisbrodt NW. Gastric emptying. In: Johnson LR, eds. *Gastrointestinal physiology*. St Louis, Louisiana; 1997.p 33-42.
- Sakaguchi T, Ohtake M. Inhibition of gastric motility induced by activation of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* 1985;335:365-367.
- Mönnikes H, Schmidt BG, Raybould HE, Taché Y. CRF in the paraventricular nucleus mediates gastric and colonic response to restraint stress. *Am J Physiol* 1992;262:137-143.
- Collares-Buzato CB, Collares EF, Fernandes GA. Effect of paraventricular nucleus lesion and cold restraint stress on gastric emptying of a liquid meal in rats. *Braz J Med Biol Res* 1993;26:1009-1014.
- Azpiroz F. Control of gastric emptying by gastric tone. *Dig Dis Sci* 1994;39:18-19.
- Ehrlein HJ, Akkermans LMA. Gastric emptying. In: Akkermans LMA; Johnson AG, Read NW, eds. *Gastric and Gastrointestinal Motility*. Surgical Science, Series 4, New York; 1984.p74-84.
- Camilleri M, Malagelada JR. Gastric motility in disease. In: Akkermans LMA, Johnson AG & Read, NW, eds. *Gastric and Gastrointestinal Motility*. Surgical Science, Series 4, New York; 1984.p201-232.
- Alpert JS, Thygesen K. Myocardial infarction redefined. *Eur Heart J* 2000;21:1502-1513.
- Fuster V, Lewis AC. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation* 1994;90:2126-2146.
- Conhen RA, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation* 1995;92:3337-3349.
- Graça JRV, Gondim Fde-AA, Cavalcante DIM, Xavier-Neto J, Messias ELM, Rego MCV, Marques JAP, Santos AA, Rola FH. Gastrointestinal resistance and neural mechanisms involved in saline flow decrease elicited by acute blood volume expansion in anesthetized rats. *Braz J Med Biol Res* 1997;30:1257-1266.
- Gondim Fde-AA, De-Oliveira GR, Graça JRV, Cavalcante DIM, Sousa MAN, Santos AA, Rola FH. Variation in gastric emptying of liquid elicited by acute blood volume changes in awake rats. *Braz J Med Biol Res* 1998;31:967-973.
- Graça JRV, Leal PRL, Gondim Fde-AA, Rola FH, Santos AA. Variations in gastric compliance induced by acute blood volume changes in anesthetized rats. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:405-410.
- Johns JNP, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. *Ann Surg* 1954;140:675-680.
- Belangero VMS, Collares EF. Esvaziamento gástrico e acidade metabólica. I. estudo de um modelo experimental em ratos, empregando uma solução de cloreto de amônio por via orogastrica. *Arq Gastroenterol* 1991;28:145-150.

18. Bucarechi F, Collares EF. Effect of Phoneutria nigriventer spider venom on gastric emptying in rats. *Braz J Med Biol Res* 1996;29:205-211.
19. Van Royen N, Hoefler I, Buschmann I, Kostin S, Voskuil M, Bode CH, Schaper W, Piek JJ. Effects of local MCP-1 protein therapy on the development of the collateral circulation and atherosclerosis in Watanabe hyperlipidemic rabbits. *Cardiovas Res* 2003;57:178-185.
20. Rocha B. The effects of stress in normal and adrenalectomized mice. *Eur J Immunol* 1985;15:1131-1135.
21. Axelrod J, Reisine TD. Stress hormones: Their interaction and regulation. *Science* 1984;224:452-459.
22. Lenz HJ, Raedler A, Greten H, Vale WW, Rivier JE. Stress-induced gastrointestinal secretory and motor responses in rats are mediated by endogenous corticotrophin-releasing factor. *Gastroenterology* 1988;95:1510-1517.
23. Zornoff L, Paiva S, Matsubara B, Matsubara L, Tucci P, Spadaro J. Efeito do Lysinopril sobre parâmetros cardíacos e mortalidade no infarto experimental em ratos. *Arq Bras Cardiol* 1997;68:175-179.
24. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC. Myocardial infarct size and ventricular functions in rats. *Circ Res* 1979;44:503-512.
25. Camurça FD, De Queiroz DAF, Leal PRL, Rodrigues CL, Gondim FAA, Graça JRV, Rola FH, Souza MAN, Santos AA. Gastric emptying and gastrointestinal transit of liquid in awake rats is delayed after acute myocardial infarction. *Dig Dis Sci* 2004;49:757-762.