
Análisis crítico por expertos de trabajos seleccionados

Derivación de células tipo ovocitos a partir de líneas celulares stem pancreáticas

(Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line)

Danner S, Kajahn J, Geismann C, Klink E, Kruse C

Fraunhofer-Institute of Biomedical Engineering, Group of Cell Differentiation and Cell Technology at the University of Luebeck,

Mol Hum Reprod 2007;13(1):11–20

Las células madre pancreáticas adultas (PSCs) son capaces de diferenciarse espontáneamente in vitro en varios tipos de células somáticas. Células madres aisladas del páncreas de ratas muestran una habilidad extensiva de autorenovación y crecimiento en cultivos altamente viables a largo plazo. Adicionalmente, estas células expresan marcadores típicos de células madre tal como Oct-4, nestina y SSEA-1. Aunque el potencial de diferenciación es ligeramente decreciente en cultivos a largo plazo, es posible conservar líneas celulares hasta el pasaje 140. Líneas celulares clonales podrían quedar establecidas a través de diferentes pasajes y mostrar características similares. Es de remarcar que una línea celular clonal, generada a través del pasaje 75, mostró propiedades aberrantes durante cultivos ulteriores. Las células clonales formaron grupos, los cuales construyeron estructuras tipo tejidos en la suspensión de cultivo.

Éstos grupos 3D generados produjeron permanentemente nuevas células en los márgenes periféricos. Las células liberadas tenían un tamaño remarcable, y un examen más cercano con microscopía óptica mostró una morfología tipo ovocito. Una comparación de los parámetros de expresión génica entre los cultivos primarios de los pasajes 8 y 75, entre la línea celular clonal y las células tipo ovocito producidas (OLCs) de las estructuras tipo tejido demostró algunas diferencias. La expresión de varios marcadores de células germinales, tales como Vasa, marcador de diferenciación de crecimiento 9 y SSEA-1, aumentaron en la línea celular clonal, y las OLCs mostraron expresión adicional de marcadores específicos de meiosis SCP3 y DMC1. Estamos frente un primer estudio piloto de investigación del potencial putativo de una línea germinal de PSCs adultas.

Desde hace varios años es aceptada la existencia de células stem somáticas en los tejidos de los individuos adultos. También es generalmente aceptado que estas células son de origen embrionario y se mantienen hasta la adultez, aunque no hay acuerdo si este proceso ocurre antes o después de la determinación de las células embrionarias en las distintas láminas germinales (Sell S, 2004; Hochedlinger K et al, 2006). Numerosas publicaciones mencionan la posibilidad de encontrar célula pluripotentes en el adulto, cosa que era impensada hasta hace unos años, cuando la pluripotencialidad estaba asociada estrictamente a las células embrionarias (Jiang et al, 2002). Otra características fundamental de las células stem somáticas es la plasticidad, es decir, la capacidad de una célula de un tipo de transformarse en una célula de linaje diferente y aún de lámina germinal diferente (Zipori D, 2005). Existen varios mecanismos que podrían explicar este fenómeno, como la transdiferenciación o la fusión de genomas, aunque ninguno de ellos está fehacientemente demostrado.

En 2004, los autores de este trabajo publicaron el aislamiento de células stem a partir de páncreas de rata adulta (Kruse C, 2004). Estas células pudieron ser cultivadas y subcultivadas *in vitro*, hasta el pasaje 140, manteniendo su capacidad de autorrenovación y de diferenciación en tipos celulares pertenecientes a las tres láminas germinales. De esta manera pudieron obtener diversas líneas celulares clonales (derivadas de una sola célula), todas ellas con características similares, aún proviniendo de distinto número de pasaje o subcultivo. Sin embargo, en este trabajo, los autores describen una línea celular, generada en el pasaje 75, que mostró un comportamiento diferente. Estas células formaban agregados, con estructura "tipo tejido" en cultivos en suspensión, tridimensionales, produciendo permanentemente nuevas células liberadas a través de su borde externo. El análisis por microscopía óptica de estas células mostró una morfología con características de oocito. En este trabajo realizan estudios morfológicos, inmunohistoquímicos y por RT-PCR de estas estructuras.

Resultados

Las líneas celulares fueron crecidas *in vitro*, en cultivo estático, y pudieron ser subcultivadas hasta el pasaje 140. Todas las líneas obtenidas tenían características morfológicas similares. Estas células fueron inducidas y activadas para diferenciar mediante la formación de organoides, que también fueron subcultivados. Sin embargo, estos organoides cultivados a largo plazo perdían su capacidad de unirse al sustrato, permaneciendo en suspensión,

y formando grandes cuerpos de tejido ("tiddue bodies", tal como los denominan los autores) alcanzando un tamaño de hasta 1,5 cm. El análisis microscópico de los organoides reveló la producción y liberación de 20 a 50 células por día, con propiedades completamente diferentes de las células que les dieron origen. Los autores mencionan que estas células tenían características similares a oocitos, formaban pequeños agregados, y tenían estructuras tipo folículo. Un pequeño número de estas células desarrollaron una membrana tipo zona pelúcida. Los organoides expresaban marcadores de célula stem, marcadores específicos de oocitos, y marcadores de meiosis, lo cual demostraba su capacidad de diferenciar en ese tipo celular. Es de destacar que la expresión de esos marcadores estaba ausente en los cultivos primarios.

Discusión

En los últimos años han sido publicados múltiples trabajos que demuestran la presencia de células stem en tejidos adultos, capaces de diferenciar en tipos celulares pertenecientes a las tres láminas germinales (Guan et al, 2006; Seaberg et al, 2004; Seeberger et al, 2006). Sin embargo sólo las células stem embrionarias parecían tener la capacidad de generar células germinales (Hubner et al, 2003; Clark et al, 2004; Geijsen et al, 2004). Recientemente ha sido publicada la obtención de células tipo oocito a partir de piel porcina fetal (Dyce et al, 2006), así como también la obtención de células germinales masculinas a partir de células stem de médula ósea (Nayernia et al, 2006). Estos hallazgos podrían confirmar la posibilidad de que células de médula ósea podrían diferenciar y repoblar el ovario con nuevos oocitos (Johnson et al, 2004; Byskov et al, 2005; Johnson et al, 2005; Eggen et al, 2006).

En este trabajo, los autores demuestran por primera vez la capacidad de líneas celulares establecidas (pasaje 75), derivadas de células stem de páncreas exócrino, de generar *in vitro* estructuras llamadas organoides, capaces de producir y liberar permanentemente células con propiedades, características morfológicas y presencia de marcadores típicos de célula stem, de oocito y del proceso de meiosis. Ninguno de estos marcadores estaba presente en las células de origen, ni en las cultivadas en monocapa. Si bien fue demostrada la presencia de marcadores de meiosis, los autores no pudieron demostrar la presencia del proceso de meiosis en sí mismo dentro de las células analizadas. Es importante destacar que todos los cultivos *in vitro*, independientemente de su origen clonal o no clonal, organoides o células liberadas de ellos, muestran la presencia de poblaciones heterogéneas de células en distintos estadios de diferenciación, lo cual se deduce de

la presencia de marcadores tanto de células stem como diferenciadas. La posibilidad de que estos organoides puedan ser activados para generar blastocistos no está demostrada aún (Hubner et al, 2003; Dyce et al 2006).

Los autores plantean la siguiente teoría como justificación a su hallazgo de haber obtenido células tipo oocito a partir de células stem de adulto: en el desarrollo de los mamíferos, las células germinales migran desde la pared posterior del saco vitelino hacia las gonadas. Es posible que en esa migración, algunas células se dirijan hacia el páncreas y residan allí hasta la adultez, pero reteniendo su potencial de célula germinal. Ese potencial podría ser reactivado por las condiciones de cultivo in vitro.

Como otra alternativa, los autores plantean que las células stem somáticas tendrían un gran potencial de diferenciación que les permitiría diferenciar a distintos tipos celulares, como osteocitos, adipocitos, condrocitos, hepatocitos, células β , células gliales y neuronales. Dada esta plasticidad, no sería imposible pensar en la capacidad de diferenciar en células germinales masculinas, como fue demostrado por Nayernia (Nayernia et al, 2006). Los autores estiman que sus resultados confirman la existencia de células stem pluripotentes en el tejido pancreático, capaces de diferenciar en células de las tres láminas germinales, y posiblemente células germinales femeninas.

Comentario

Numerosos trabajos publicados en los últimos años hacen referencia a la existencia de células stem pluripotentes en prácticamente todos los órganos y tejidos del individuo adulto, capaces de diferenciar en distintos tipos celulares, e incluso de cambiar su determinación, dando origen a células de diferentes linajes. Estas células stem somáticas expresan marcadores específicos de célula stem, siendo estos marcadores frecuentes en todas esas células, independientemente del tejido que las contiene. Más bien su presencia está relacionada a la condición de célula stem y a su grado de diferenciación, y también son frecuentes en células cancerosas. Los autores de este trabajo han identificado algunos de estos marcadores, como Oct4, SSEA, nestin, etc, en células cultivadas provenientes de tejido pancreático. La existencia de dichos marcadores, sumado al análisis morfológico que realizan sobre las células cultivadas, los lleva a afirmar la obtención de células tipo oocito, a partir de un órgano adulto que no tiene que ver con el aparato reproductor. Las condiciones de cultivo que usan, particularmente la obtención de estructuras tridimensionales, es un enfoque interesante dado que apunta al concepto de nicho celular. Es decir, una célula stem es tal sólo cuando está ubicada en su nicho. Este concepto abarca no sólo al espacio físico, quizás éste sea el aspecto menos importante, sino al conjunto de interacciones célula-

célula, célula-matriz extracelular y las señales que estas interacciones generan. El planteo que hacen los autores es interesante, siempre teniendo en cuenta que los resultados obtenidos a partir de cultivos in vitro difícilmente pueden ser extrapolables a situaciones in vivo, y más aún cuando los tiempos de cultivo son prolongados, y los subcultivos numerosos. Quizás lo más destacable de este trabajo sea plantear la posibilidad de que en el páncreas exista un nicho de células que podrían tener la capacidad para diferenciar en células tipo oocito. El concepto de neo-oogénesis y renovación folicular durante la adultez en mamíferos es un concepto novedoso que puede aportar conocimientos importantes a la fisiología del ovario y a la biología de la reproducción.

Bibliografía

1. Byskov A, Faddy M, Lemmen J, Andersen C. Eggs forever? Differentiation 2005;73(9-10):438-46
2. Clark A, Bodnar M, Fox M, Rodriquez R, Abeyta M, Firpo M, Pera R. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. Hum Mol Genet 2004;13(7):727-39
3. Dyce P, Wen L, Li J. In vitro germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. Nat Cell Biol 2006;8(4):384-90
4. Eggan K, Jurga S, Gosden R, Min IM, Wagers A. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. Nature 2006;441(7097):1109-14
5. Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley G. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. Nature 2004;427(6970):148-54
6. Guan K, Nayernia K, Maier L, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W, Hasenfuss G. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. Nature 2006;440(7088):1199-203
7. Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear reprogramming and pluripotency. Nature, 2007;441:1061-7
8. Hubner K, Fuhrmann G, Christenson L, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss J, Boiani M, Schöler H. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. Science 2003;300(5623):1251-6
9. Jiang Y, Jahagirdar B, Reinhardt R, Schwartz R, Keene C, Ortiz-Gonzalez X, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature 2002;418(6893):41-9
10. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK and Tilly J. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. Nature 2004;428(6979):145-50

11. Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee H, Adams G, Niikura Y, Tschudy K, Tilly J, Cortes M, Forkert R, Spitzer T, Iacomini J, Scadden DT, Tilly JL. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* 2005;122(2):303–15
12. Kruse C, Birth M, Rohwedel J, Assmuth K, Goepel A, Wedel T. Pluripotency of adult stem cells derived from human and rat pancreas. *Appl Phys A* 2004;79:1617–24
13. Nayernia K, Lee J, Drusenheimer N, Nolte J, Wulf G, Dressel R, Gromoll J, Engel W. Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. *Lab Invest* 2006;86(7):654–63
14. Seaberg R, Smukler S, Kieffer T, Enikolopov G, Asghar Z, Wheeler MB, Korbitt G, van der Kooy D. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol* 2004;22(9):1115–24
15. Seeberger K, Dufour J, Shapiro A, Lakey J, Rajotte R, Korbitt G. Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium. *Lab Invest* 2006;86(2):141–53
16. Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2004;51(1):1-28
17. Zipori D. The Stem State: Plasticity Is Essential, Whereas Self-Renewal and Hierarchy Are Optional. *Stem Cells* 2005;23:719-26

Héctor H Del Zotto

Investigador Adjunto CONICET Centro de Endocrinología Experimental y Aplicada (CENEXA-UNLP-CONICET-CCT -La Plata)

Los investigadores en el área de la Medicina regenerativa, conocen de la alta capacidad que poseen las células madres embrionarias en diferenciarse hacia distintos tejidos, provenientes de las tres hojas germinativas. Sin embargo, estaba en duda hasta hace muy poco tiempo, que las células madres adultas poseyeran dicha capacidad. Muchos trabajos de investigación, realizados con este tipo celular, ya sea derivadas de la médula ósea, cordón umbilical y páncreas entre otras, indudablemente han concluido esta discusión a favor de una elevada capacidad de autorrenovación y diferenciación, puesto que las mismas dan origen a diversos tejidos derivados de las tres hojas germinativas, al igual de lo que ocurre en las células madres embrionarias.

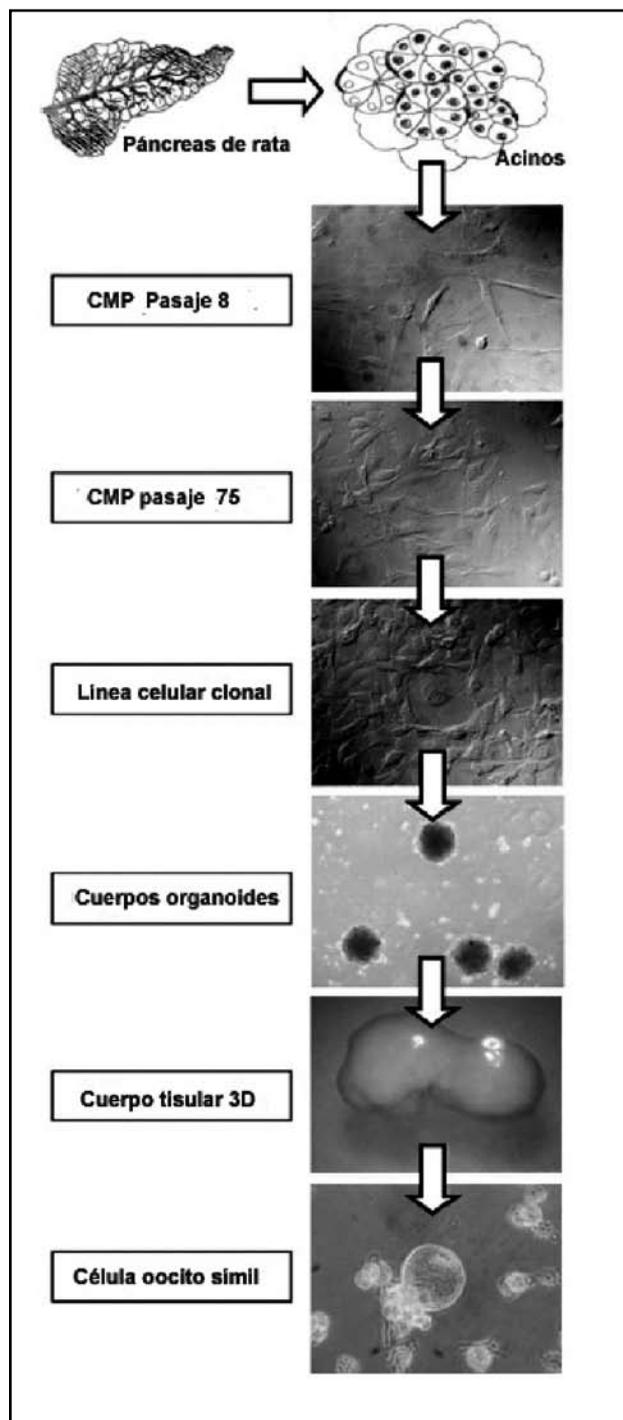
Los autores, un grupo con alta experiencia y capacidad técnica, intentan demostrar en este trabajo, que una variedad de células madres adultas derivadas del páncreas tendrían capacidad para diferenciarse espontáneamente en diversos tipos celulares adultos. Estas fueron primeramente descritas, como células pancreáticas estelares similares, debido a sus características morfológicas e inmunohistoquímicas similares, a las células estelares pancreáticas y actualmente se denominan células madres pancreáticas adultas (Ramiya *et al.*, 2000; Seaberg *et al.*, 2004),

Para ello utilizaron sofisticadas técnicas de aislamiento, con lo cual lograron obtener *in vitro*, por períodos prolongados, células con una alta viabilidad, que además presentaron una alta capacidad de autorre-

novación y crecimiento. Adicionalmente estas células expresaron marcadores típicos de células madres como Oct-4, nestina y SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen 1). Aunque la diferenciación obtenida, disminuyó levemente en los cultivos de larga data, fue posible mantener líneas celulares hasta por más de 140 pasajes. A través de los diferentes pasajes pudieron establecerse líneas celulares clonales que mostraron características similares. Notablemente, una línea celular clonal, que se generó en el pasaje 75, mostró propiedades de desviación durante los cultivos posteriores. Dichas células formaron agregados, los cuales se transformaron en estructuras similares a tejidos en cultivos en suspensión. Estos generaron agregados en tres dimensiones, que dieron origen a nuevas células permanentemente desde el margen externo. Las células liberadas alcanzaron gran tamaño y su análisis por microscopía de luz reveló una morfología similar a oocitos. Por otra parte, la comparación llevada a cabo de la expresión de los patrones genéticos entre los cultivos primarios de los pasajes 8 y 75 y de la línea celular clonal y las células productoras de oocitos similar, derivadas de estructuras tejido similar, mostraron algunas diferencias. La expresión de varios marcadores de células germinales, tales como Vasa, el marcador de diferenciación del crecimiento 9 y el SSEA-1, incrementaron en la línea celular clonal. Las células oocito similar mostraron la expresión adicional de marcadores específicos de meiosis SCP3 y DMC1. Comparando estos resultados con oocitos maduros de

rata, observamos que estas células en realidad presentan muchas de las características del oocito maduro. Por lo cual, podemos concluir que dichas células se diferencian en esta dirección. La posible hipótesis teórica por la cual las células madre adultas del páncreas tendrían esta capacidad, se basa en el desarrollo de las células germinales primordiales en mamíferos. Como todos recordamos de nuestros conocimientos de embriología, estas células se formarían en la pared posterior del saco vitelino, desde donde migrarían a través del intestino anterior hacia las gónadas (Tam and Zhou, 1996). Sería posible que algunas de las células germinales primordiales migrantes, se desvíen del trayecto y pasen a residir en el páncreas adulto, el cual se forma al mismo tiempo que el intestino anterior. Tal vez, ellas retengan su potencial de célula germinal y podrían reactivarse debido a las condiciones de cultivo *in vitro*. Esta posible explicación teórica se refuerza por los hallazgos de los autores, de que algunos marcadores de células germinales, por ejemplo el SCP3, se expresan en los estadios tempranos de las poblaciones celulares primarias

Por otra parte, el artículo deja abierta la posibilidad de que estas células oocito símil se acompañen de células más pequeñas con característica morfológicas similares a células foliculares, lo que da lugar a la formación de estructuras semejantes a folículos ováricos, como se ha descrito en trabajos precedentes realizados con células madres de piel de cerdos. También se postula la posibilidad de estudiar el desarrollo de células con potencialidad de diferenciación a estirpe espermatocítica. Por todo lo expuesto aquí este trabajo, en mi opinión, abre nuevas perspectivas en el conocimiento de la biología de las células madres adultas, en sus propiedades de crecimiento y diferenciación.



Representación esquemática y morfología ilustrando la generación de cuerpos tisulares liberando células oocito símil.