

24, 29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"

CARACTERIZACION E INTOXICACION CON
ETANOL DE LA LINEA CELULAR WRL-68 DE
ORIGEN HEPATICO HUMANO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
ELIZABETH MORENO PONCE

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

PÁGINAS

I.	Introducción.	
1.1.	Anatomía del hígado.	1
1.1.1.	Anatomía macroscópica.	1
1.1.2.	Anatomía microscópica.	2
1.2.	Hepatotoxicidad inducida por etanol.	8
1.2.1.	Generalidades acerca de la toxicidad inducida por etanol.	8
1.2.2.	Rutas hepáticas del metabolismo del etanol.	9
1.2.2.1.	Ruta del sistema de la deshidrogenasa alcohólica (DMA).	9
1.2.2.2.	Ruta del sistema oxidativo microsomal del etanol (SOME).	10
1.2.2.3.	Ruta de la catalasa.	11
1.2.3.	Mecanismos del daño hepático inducido por etanol.	11
1.2.3.1.	Alteraciones físicas y químicas en una intoxicación aguda con etanol.	14
1.2.3.2.	Alteraciones físicas y químicas en una intoxicación crónica con etanol.	15

PÁGINAS

1.2.3.3. Efectos de los productos metabólicas del etanol.	16
II. Fundamentación.	17
III. Planteamiento del problema. Caracterización e intoxicación con etanol de la línea celular WRL-68, de origen hepático humano.	20
IV. Objetivos.	26
V. Hipótesis.	28
VI. Material y métodos.	29
VII. Resultados.	48
VIII. Discusión y análisis de resultados.	73
IX. Conclusiones.	78
X. Anexos.	80
XI. Bibliografía.	81

I. INTRODUCCION

11. ANATOMÍA DEL HÍGADO.

11.1. Anatomía Macroscópica.

El hígado es la glándula más grande del cuerpo, con un peso promedio de 1500 gr. (20); está constituido por una masa única dividido de manera incompleta en dos lóbulos, derecho e izquierdo. El lóbulo derecho se divide a su vez en lóbulos cuadrado y caudado.

El hígado es el principal órgano de la homeostasia bioquímica y desempeña un papel central en el metabolismo del organismo a través de las múltiples funciones que realiza, actuando como glándula exócrina y endócrina. Controla la utilización de aminoácidos exógenos y endógenos y es el único sitio de síntesis de muchas proteínas plasmáticas. Es el mejor regulador de la glucosa en sangre, sirve como almacén de carbohidratos fácilmente movilizables en forma de glucógeno. Sintetiza colesterol, lípidos plasmáticos y lipoproteínas, oxida ácidos grasos y proporciona un almacén de grasas movilizables. Elabora protrombina y otros factores esenciales para la coagulación de la sangre, convierte precursores de vitaminas y hormonas a sus formas activas y es también responsable de la degradación de otras vitaminas y hormonas (104). Juega un papel vital en la detoxificación y excreción de muchas drogas y productos del metabolismo (45). La bilis sintetizada por el hígado, es un vehículo para la excreción de estas sustancias y es también esen

cial en la absorción de grasas por el intestino. El hígado posee extraordinaria resistencia a los daños traumáticos debido a su enorme poder de regeneración.

Para realizar sus funciones metabólicas, el hígado dispone de un abundante suministro sanguíneo proveniente de la arteria hepática, rica en oxígeno, y de la vena porta, que drena al tracto gastrointestinal, así que nutrientes y sustancias tóxicas llegan al hígado antes que a cualquier otro órgano.

1.1.2. Anatomía microscópica.

Hay dos nociones principales acerca de la unidad estructural microscópica del hígado: la primera y más aceptada es la noción clásica de lobulillo hepático; la segunda la noción de acino hepático.

Lobulillo hepático (fig. 1). Es una unidad de 0.5 a 2 mm de diámetro, tiene forma poliédrica. En el centro se observa la vena central, de la cual se irradian cordones de células hepáticas hacia la periferia del lobulillo. En los límites externos de esta estructura se localizan los espacios porta, que contienen las ramas portal y arterial y el conducto biliar. La sangre proveniente de las ramas portal y arterial confluye en los sinusoides ubicados entre las columnas celulares. En el sinusoides hepáticos ocurre el intercambio sanguíneo, la sangre drenada del hepatocito es transportada a la vena central y finalmente a la vena cava inferior (20).

Acino hepático (fig. 2). Rappaport (75) menciona que la unidad

estructural y funcional más pequeña del hígado es el acino hepático, el cual se define como una masa irregular de tejido parenquimatoso no encapsulado, que se encuentra entre dos o más venas centrales.

El eje de esta unidad llamado espacio porta contiene una rama portal principal, la arteria hepática, el canal biliar, elementos linfáticos y nerviosos. Dentro de cada acino, las células se agrupan en zonas concéntricas alrededor de su eje. Las células más próximas al espacio porta (zona 1) son las primeras que reciben sangre y sustancias nutritivas, las últimas que mueren y las primeras en regenerarse.

Las células en la zona 3 están situadas en la periferia del acino y reciben sangre que ha intercambiado gases y metabolitos en las zonas 1 y 2. Este anillo parenquimatoso es más sensible al daño por los disturbios circulatorios (isquemia, anoxia o congestión) y deficiencias nutricionales.

La zona 2 es una porción de tejido de transición entre las zonas 1 y 3.

El hepatocito (fig. 3). El hepatocito normalmente presenta aparencia poliédrica, mide de 20-30, de diámetro. La membrana plasmática presenta cuatro caras: dos caras adyacentes a otros hepatocitos, la sinusoidal y la pared del canalículo biliar, se ha estimado que representan el 37, 50 y 13% respectivamente del área membranal de los hepatocitos. La superficie sinusoidal representa numerosas microvellosidades y es el sitio en el cual

se lleva a cabo el intercambio metabólico entre el hepatocito y la sangre. El canalículo biliar está formado por la separación de dos o más hepatocitos adyacentes, tiene numerosas microvellosidades más regulares que las de la superficie sinusoidal (103). Su núcleo es central y único con nucleolo destacado. El citoplasma tiene aspecto granular y contiene gran cantidad de glucógeno. La mitocondria, efectúa la fosforilación oxidativa, el ciclo de Krebs y la oxidación de ácidos grasos. En el retículo endoplásmico liso (REL) se realiza la síntesis de colesterol y ácidos biliares, conjugación de bilirrubina, fármacos y esteroides antes de ser excretados por la bilis, metabolismo de fármacos y esteroides y degradación de glucógeno. El REL posee enzimas esenciales para desempeñar su papel metabólico, principalmente el sistema oxidasa de función mixta, que incluye NADPH, citocromo reductasa y citocromo P450. El retículo endoplásmico rugoso (RER) granular es el sitio de síntesis proteica. Las proteínas para exportación producidas por el RER llegan al complejo de Golgi y son liberados en la superficie vascular de la célula. Los lisosomas son cuerpos densos pericanaliculares que contienen enzimas hidrolíticas y probablemente intervienen en los mecanismos de transporte de sustancias intracelulares. Los lisosomas y el aparato de Golgi son los responsables del almacenamiento de sustancias que deben ser excretadas e intervienen probablemente en el proceso activo de la excreción celular (20, 78).

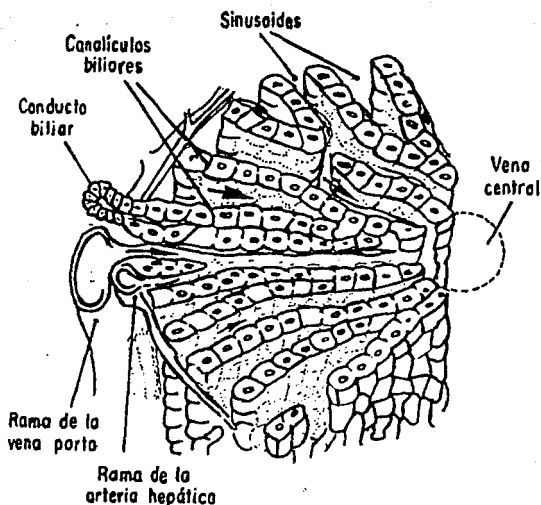


Fig. 1. Dirección de los flujos sanguíneo y biliar en un segmento de lobulillo hepático. Las láminas celulares y los sinusoides se disponen en forma radial alrededor de la vena central (vécula hepática terminal). La sangre, proveniente de terminales de la vena porta y de la arteria hepática, situadas en los canales portales, fluye a lo largo de los sinusoides y se vacía en la vena central. Tomado de A. W. Ham. *Textbook of Histology*. I. B. Lippincott Company, Philadelphia, 1965.

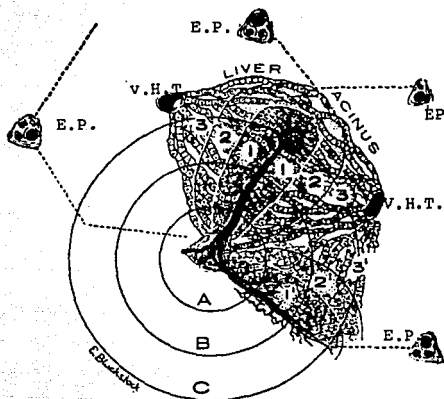


Fig. 2. Irrigación de un acino hepático simple. La tensión de oxígeno y el nivel de los principales nutrientes de la sangre disminuyen en los sinusoides desde la zona 1 hasta la 3. Las zonas 1', 2' y 3' indican volúmenes correspondientes de una porción de una unidad acinosa inmediata. El círculo A encierra la zona comúnmente conocida como "periportal" mientras que la zona B y la C representan las zonas más periféricas al espacio porta (E.P). V.H.T vénulas hepáticas terminales. Tomado de Rappaport et. al. Anat. Record. 119: 11 (1954).



Fig. 3. El hepatocito. La superficie membranal está provista en dos de sus bordes de microvellosidades. Una corresponde al polo sinusoidal y el otro al polo biliar. Las microvellosidades del polo sinusoidal delimitan con las células de Kupffer una zona que corresponde al espacio de Dissé.

El polo biliar, constituido a su vez por microvellosidades, representa el inicio del canal biliar.

Entre los organelos, destaca la función del REL porque aquí se cumplen la mayoría de las funciones específicas del hígado.

Tomado de Ferreras, P.V.: Medicina Interna. 8a. ed. Edit. Marín. Mex., D. F., 1983.

1.2. HEPATOTOXICIDAD INDUCIDA POR ETANOL.

1.2.1. Generalidades acerca de la toxicidad inducida por etanol.

El etanol no requiere digestión y su entrada a la circulación sanguínea ocurre por difusión simple a través del tracto digestivo. Se distribuye principalmente entre los tejidos y órganos más abundantemente irrigados, por esta razón el grado de daño producido por el etanol varía de un órgano a otro (68).

En el hígado se produce el metabolismo del 98% del etanol que se ingiere (76). Debido a esto, el hígado es el órgano más proclive al deterioro por su consumo excesivo. Otros sistemas y órganos afectados por el etanol son el sistema nervioso (36), tubo gastrointestinal (51), páncreas (68) y corazón (64).

Los efectos tóxicos del etanol sobre el tejido hepático, constituyen un problema de interés médico alrededor del cual se han realizado numerosas investigaciones (16), debido a que varios de los mecanismos de daño inducidos por esta sustancia aún no están bien comprendidos (48).

Hasta hace algunas décadas varios investigadores (13, 31, 72) postulaban que las deficiencias nutricionales desempeñaban un papel determinante en el desarrollo de las enfermedades hepáticas asociadas al alcoholismo. Actualmente se acepta que los factores nutricionales y genéticos tienen solamente una intervención secundaria en el desarrollo y progresión de las enfermedades hepáticas alcohólicas, ya que hay un consenso general en que el etanol por sí mismo es un agente tóxico (28, 35, 40, 47).

Durante la ingestión alcohólica, los efectos tóxicos son causados por el etanol o por los productos de su metabolismo, y el espectro de daño producido es variable dependiendo de la dosis y del período de exposición (alcoholismo crónico y agudo (68)).

El consumo de etanol tiene profundos efectos bioquímicos y fisiológicos en animales y el hombre, y la comprensión de muchos de los mecanismos de daño hepático inducido por esta sustancia se ha logrado a través del estudio de las alteraciones bioquímicas a nivel celular, correlacionándolas posteriormente con los cambios morfológicos y funcionales del tejido hepático (48).

1.2.2. Rutas hepáticas del metabolismo del etanol.

Actualmente se acepta que existen tres diferentes sistemas enzimáticos capaces de metabolizar el etanol en el hígado, tales sistemas son la deshidrogenasa alcohólica (DHA), el sistema oxidativo microsomal del etanol (SOME) y la catalasa (69). El etanol es metabolizado por conversión a acetaldehído, el cual es oxidado a acetato. El acetato es convertido finalmente en AcetilCoA y entra en la ruta de oxidación de las grasas (fig. 4, cuadro I)(98).

1.2.2.1. Ruta de la deshidrogenasa alcohólica (DHA).

La deshidrogenasa alcohólica (EC.1.1.1.1.,DHA) es la enzima más importante en el metabolismo a concentraciones bajas de etanol, es responsable de degradar aproximadamente el 90% del etanol ingerido (14). Es abundante en citosol de hígado, sin embargo,

se encuentran pequeñas cantidades en el tracto gastrointestinal y en los riñones. La DHA estomacal tiene un papel importante en la primera etapa del metabolismo del etanol en el cuerpo. La administración crónica de etanol disminuye la actividad de DHA gástrica (posiblemente secundaria a daño a la mucosa gástrica) (42-43). El abuso prolongado de etanol probablemente daña la barrera gastrointestinal "protectora" incrementando la absorción de etanol hacia la corriente sanguínea y elevando las varias manifestaciones tóxicas del etanol en el SNC de los alcohólicos (55).

1.2.2.2. Ruta del sistema oxidativo microsomal del etanol (SOME).

Lane y Lieber (1966) observaron que el consumo crónico de etanol en ratas y hombre estaba asociado a la proliferación del REL de hígado y sugirieron que los microsomas hepáticos también podían ser un sitio donde se metabolizara el etanol lo cual fue comprobado posteriormente por Lieber y DeCarli (53-54).

La ruta de SOME contribuye significativamente a la oxidación del etanol sobre todo a concentraciones altas por arriba de las necesarias para saturar a la DHA que posee una Km baja para metabolizar el etanol (menor de 2 mM, ver cuadro I), en tanto que SOME posee una Km alta para dicho sustrato.

El S O M E comparte características similares pero no necesariamente idénticas con otras enzimas microsomales hepáticas metabolizantes de compuestos exógenos. La localización preferencial se encuentra en hígado (53-54) y solo menores ac-

tividades hay en pulmones (89), estómago (53-54), tracto intestinal (88), riñón (53-54) y corazón (53-54); la localización subcelular de la actividad enzimática en hígado es mayor en microsomas que en cualquier otro organelo (53-54).

En analogía a otras enzimas metabolizantes de compuestos exógenos, SOME consiste de citocromo P450, NADPH citocromo c reductasa y fosfolípidos (61,69).

Hay una isoenzima de citocromo P450 inducible por etanol (61, 69,90), dicha enzima tiene la capacidad de metabolizar otras sustancias además del etanol, como la anilina (63), alcohol propílico (97), alcohol butílico (97), etc. La isoenzima de citocromo P450 inducible por etanol puede también ser inducida por otras sustancias como acetona (92), pirazol (18), benceno (38), etc.

1.2.2.3. Ruta de la catalasa.

La catalasa se encuentra en peroxisomas de hígado, y es capaz de oxidar el etanol a acetaldehído cuando se dispone de peróxido de hidrógeno. Debido a que la producción de peróxido de hidrógeno en el hígado es lenta (7) probablemente la catalasa no desempeña un papel significativo en el metabolismo del etanol (14).

1.2.3. Mecanismos del daño hepático inducido por etanol.

Los mecanismos por los cuales el etanol perturba la homeostasis celular todavía no están bien comprendidos pero parecen in

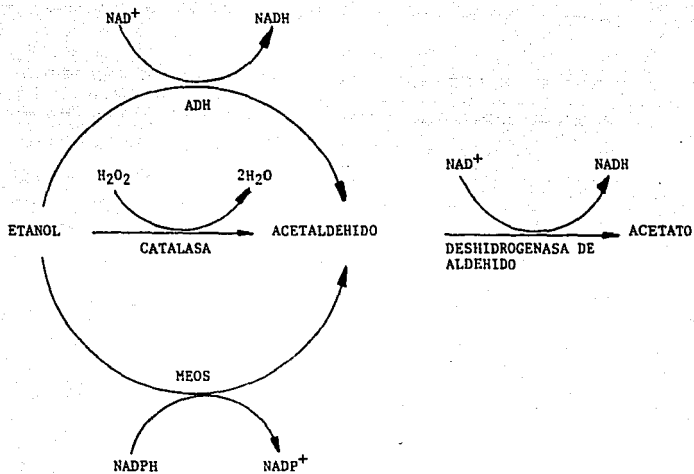


FIG. 4 Rutas Hepáticas del metabolismo del etanol. (Tomado de Alcoholism Clinical and Experimental Research; Vol 10(6):22)

Cuadro 1. Características de las enzimas hepáticas metabolizantes del etanol. Tomado Alcoholism. Clin. Exp. Res.10 (6): 22

	ADH	M E O S	Catalasa
Características			
Localización intracelular	Citosol	Reticulo endoplásmico	peroxisomas
Cofactor	NAD	NADPH+H ⁺	—
Cosustrato		Oxígeno molecular	H ₂ O ₂
Productos de reacción	Acetaldehído NADH+H ⁺	Acetaldehído NADP ⁺ , H ₂ O	Acetaldehído H ₂ O
Cinética			
Km (etanol)	0.5-2.0 mM	7-11 mM	0.6-10 mM
Km (O ₂)		8.3 mM	50 mM
pH óptimo	11	6.9-7.5	5.5
Efecto inhibidor			
Pirazol (0.1 mM)	++++	—	(+)
Cianuro (1.1. mM)	ND	—	+++
Azida (0.1 mM)	—	—	+++
Especificidad de sustrato			
Metanol	++	++	+++
Etanol	+++	+++	+++
n-Propanol	+++	+++	(+)
n-Butanol	+++	++	—
n-Pentanol	+++	+	—
Isopropanol	+	+	—
t-Butanol	—	+	—
Incremento en actividad después de consumo crónico de etanol.	—	+++	—
Extracción de la enzima	+	+	+

ND = NO DETERMINADO

volucrar interacciones con las membranas celular y subcelular (efecto físico) (95), así como cambios secundarios resultantes del metabolismo del etanol, que afecta el estado redox y produce niveles elevados de acetaldehído y acetato (efecto químico). (57,100).

La intoxicación con etanol ya sea crónica o aguda afecta al hepatocito de diferentes maneras, alterando una variedad de procesos hepatocelulares como el transporte de aminoácidos (81), lípidos (3), síntesis y secreción de proteínas y glucoproteínas (3,41,94), y metabolismo de drogas (82).

1.2.3.1. Alteraciones físicas y químicas inducidas por el etanol en una intoxicación aguda.

El modelo mosaico fluido de Singer-Nicholson describe a las membranas biológicas como una bicapa de lípidos salpicada de proteínas (92). Las proteínas de la membrana funcionan como canales, acarreadores, receptores y enzimas enlazadas a la membrana y su ambiente altera su función. Funcionan mejor en un grado específico de viscosidad en la matriz lipídica, pues la fluidez lipídica afecta la capacidad para asumir conformaciones activas, y porque la difusión lateral permite el acoplamiento de proteínas localizadas en el interior y en la superficie de la bicapa (77).

En una intoxicación aguda, la interacción directa del etanol con las membranas biológicas tiene un efecto solubilizante que incrementa la fluidez membranar (80, 84, 95).

El aumento de la fluidez se refleja en un incremento de la permeabilidad membranar con una función celular alterada.

El etanol interactúa con las membranas biológicas de forma parecida que otros agentes anestésicos (34) fluidizando la membrana y alterando la funcionalidad de receptores, transportadores y enzimas unidas a la membrana.

Estudios realizados en hepatocitos de ratas sometidas a intoxicación aguda con etanol muestran que el transporte de aminoácidos está disminuido y el transporte iónico se encuentra alterado, estos cambios funcionales son reflejo de la alteración en la fluidez membranar asociado a cambios en conformación de receptores de proteína (84).

1.2.3.2. Alteraciones físicas y químicas inducidas por el etanol en una intoxicación crónica.

El etanol inicialmente incrementa la fluidez de todas las membranas biológicas. Este efecto, si es continuado crónicamente, es balanceado por un cambio en la composición de los lípidos membranales, los cuales incrementan su rigidez con la concomitante alteración en la funcionalidad de receptores, acarreadores y enzimas de membrana (91).

Los efectos del consumo crónico de etanol sobre las proteínas de membrana ha sido estudiados en membranas plasmáticas y mitocondriales de hígado de rata (22,46), primates (83) y humanos (74); en los cuales se observa disminución en la actividad ATPasa (81,89), reducción en el contenido de citocromos (99) y

disminución en la capacidad de oxidación de sustratos (100). Los cambios morfológicos, funcionales y químicos son reflejo de daño a las membranas biológicas, asociado además a alteraciones en la síntesis proteica.

1.2.3.3. Efectos de los productos del metabolismo del etanol.

La oxidación del etanol afecta el estado redox del hepatocito debido a la formación incrementada de equivalentes reducidos (aumenta NADH^+/NAD), este incremento inhibe la β -oxidación de los ácidos grasos y el ciclo de Krebs (1,11,67,102) conduciendo al desarrollo de hígado graso.

Por otro lado, aumenta la producción de acetaldehído que es particularmente tóxico para la mitocondria (22), y en menor grado afecta a otros organelos (67). El acetaldehído se enlaza a proteínas mitocondriales hepáticas y juega un importante papel patofisiológico (37). La unión del acetaldehído a proteínas de membrana puede ser la base para explicar la respuesta inmune producida en pacientes alcohólicos hacia sus propias proteínas de membrana. Recientemente se han publicado evidencias de que la unión de acetaldehído con ciertas enzimas puede inhibir moderadamente su actividad catalítica (37).

II. FUNDAMENTACION.

Estudiar los efectos tóxicos del etanol sobre el hígado de un animal completo, permite dilucidar varios de los mecanismos por los cuales esta sustancia produce daño hepático. Sin embargo, muchas cuestiones no son resueltas por este camino y esto se debe a que un animal funciona como un sistema integrado que precisamente lo ha adaptado para compensar las influencias y perturbaciones del medio externo. Sus sistemas homeostáticos, sus órganos de eliminación y sus mecanismos detoxificantes enmascaran el fenómeno que se desea estudiar.

Una vez ingerido, el etanol interactúa con el hígado y con varios órganos y sistemas del cuerpo afectándolos en diferente grado, lo cual se refleja en la alteración del funcionamiento general del organismo. De esta manera, las alteraciones morfológicas y funcionales del hígado son consecuencia de su interacción directa con el etanol, así como por los efectos secundarios de la alteración funcional del resto del organismo (68).

Por ello, es de particular interés dilucidar el grado en que el etanol intrínsecamente afecta al metabolismo celular al interactuar de manera directa con el tejido hepático.

Con el objeto de circunscribir el sistema y el número de variables bajo estudio, se ha pensado en el cultivo de tejidos en lugar de emplear animales completos. Dentro del cultivo de tejidos, el cultivo primario de hepatocitos constituye una buena alternativa, pues las células en estas condiciones pre-

sentan la ventaja de conservar muchas de las funciones especializadas del tejido de origen (30,52,59,62,85). Sin embargo, hasta la fecha no se han establecido las condiciones óptimas que permitan mantener estos cultivos por tiempo indefinido, puesto que después de cierto número de subcultivos las células muestran una degeneración progresiva y mueren (5). Por esta razón, su utilización como modelo para realizar intoxicaciones con etanol a largo plazo, se ve limitada porque se corre el riesgo de perder los cultivos antes de alcanzar los objetivos.

Ocasionalmente, algunos cultivos primarios derivan a líneas celulares, que a diferencia de los primeros proliferan indefinidamente en cultivo, pero en cambio pueden tener enmascaradas muchas de sus propiedades especializadas (23). Sin embargo, esto no constituye un obstáculo insalvable, puesto que en los últimos años el mejoramiento en las técnicas y en las condiciones de cultivo, ha permitido mantener líneas celulares a partir de hígado de rata que expresan propiedades diferenciadas in vitro (15,25,26,39,58).

Así, algunas líneas celulares además de proliferar indefinidamente en cultivo, expresan propiedades fenotípicas del tejido de origen, constituyendo una alternativa viable como modelo para estudiar los efectos tóxicos a corto y a largo plazo de ciertas sustancias, como el etanol, sobre la fisiología celular.

De esta manera, las ventajas que se obtienen al realizar estudios farmacológicos o toxicológicos sobre un cultivo celular

con respecto a la utilización de animales completos, son las siguientes: 1) actuar específicamente sobre un tejido en particular, sin sistemas compensatorios ni inmunitarios que interfieran, 2) actuar sobre membranas directamente expuestas al agente en estudio, 3) manifestar reacciones cinéticas no modificadas por redistribución compartamental, 4) estudiar los efectos durante la fase logarítmica de crecimiento celular donde expresa una sensibilidad mayor, ya que durante su desarrollo, los sistemas biológicos no están aún equilibrados, no cuentan con todas las baterías enzimáticas típicas del estado estacionario y presentan por lo tanto mayor sensibilidad a los tóxicos.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el laboratorio disponemos de la línea celular WRL-68, obtenida a partir de hígado fetal humano normal por Kostadin Apostolov, quien la puso a disposición de la American Type Culture Collection (ATCC) (Patente U.S. 3 935 066) para propósitos de investigación. Sin embargo, desde la fecha de su registro (1976) a la actualidad no se encuentran en la literatura reportes dirigidos a la caracterización e investigación de la conservación de propiedades hepáticas por estas células.

Siendo el hígado el órgano blanco primario para la mayoría de drogas y agentes químicos (19,33) y el sitio principal de transformación metabólica para estas sustancias (9), es importante poder disponer de cultivos permanentes de células que conserven características hepáticas in vitro, para realizar estudios toxicológicos o farmacológicos de agentes que continuamente están en contacto con el hombre ya sea como contaminantes ambientales o como químicos comerciales, por ejemplo alcoholes, cetonas, etc.

Nuestro propósito al trabajar con la línea celular WRL-68 es su caracterización y determinar si conserva propiedades diferenciadas de hepatocito con el fin de precisar su utilidad como modelo para realizar tratamientos con etanol en forma crónica y aguda y evaluar las alteraciones que éste produce al actuar específicamente sobre las células, sin la influencia de mecanismos regulatorios que interfieran.

Para ello se han diseñado una serie de experimentos divididos fundamentalmente en tres fases:

a) La primera consiste en la caracterización del cultivo, en ella se determinan las condiciones óptimas para el crecimiento y se investigan las propiedades morfológicas y funcionales de las células WRL-68.

b) La segunda fase consiste en determinar la viabilidad de la línea celular en medios con diferentes concentraciones de etanol, esto con el fin de precisar su capacidad para sobrevivir a esta sustancia y para elegir las concentraciones óptimas que se emplearán para la intoxicación crónica y aguda de las células.

c) En la tercera fase se realiza la intoxicación crónica y aguda con etanol de las células WRL-68 y se determinan diversos parámetros para evaluar los efectos de esta sustancia sobre las células en cultivo.

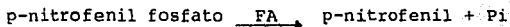
Dentro de la primera fase destacan la realización de la curva de crecimiento y la determinación de la funcionalidad de las células WRL-68. La curva de crecimiento proporciona datos sobre la cinética de crecimiento celular para seleccionar el tiempo óptimo de cultivo en el que las células se encuentran en fase logarítmica de crecimiento para medir en esta etapa los parámetros que se desean conocer como son las actividades enzimáticas y el estado de los sistemas de transporte iónico membranal.

Para determinar la conservación de funciones especializadas

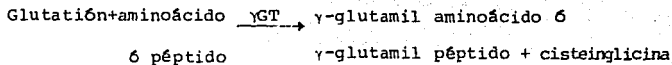
por parte de las células WRL-68 se seleccionaron cuatro enzimas características del tejido hepático: la fosfatasa alcalina (EC. 3.1.3.1., FA), la γ -glutamil transpeptidasa (EC.2.3.2.2., γ GT), la transaminasa glutamicopirúvica (EC.2.6.1.2., TGP), y la transaminasa glutamicooxaloacética (EC.2.6.1.1., TGO).

Fosfatasa alcalina. Cataliza la liberación de fosfato inorgánico de un éster de fosfato, a un pH alcalino. No se conoce su función biológica, excepto por la relación que al parecer guarda con el depósito de hueso. Además de hígado se localiza en intestino, hueso, riñón, placenta y leucocitos (44).

Muchos compuestos de fósforo son sustrato para la fosfatasa alcalina. La fosfatasa alcalina es una enzima no específica, puede hidrolizar muchos compuestos de fósforo, aunque puede haber mayor especificidad para algunos compuestos como los ésteres fenólicos. En muchos de los ensayos bioquímicos se usa como sustrato el p-nitrofenil fosfato (44).



γ -Glutamil transpeptidasa. Cataliza la transferencia de γ -glutamil de glutatión a un aminoácido o a un péptido que actúa como receptor (32).



Esta reacción es de gran importancia en el metabolismo del glutatión y se ha postulado que ésta o reacciones análogas estén involucradas en el transporte de aminoácidos a través de la mem-

brana por interacción tanto con aminoácidos extracelulares como glutatión intracelular.

De esta manera, el aminoácido entra a la célula como γ -glutamil aminoácido.

La γ -glutamil transpeptidasa se encuentra en membranas de células de hígado, riñón, páncreas bazo y duodeno (86).

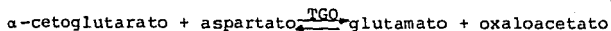
Se ha comprobado que el hígado fetal contiene una considerable actividad de esta enzima, pero que va disminuyendo durante el desarrollo, lo cual indica que esta enzima tiene un importante papel en el transporte de aminoácidos en el hígado fetal (10).

Transaminasa glutamicopirúvica. Cataliza la transferencia de grupos amino de alanina hacia α -cetoglutarato (87).



Se encuentra casi exclusivamente en el citoplasma de hígado (86) y es liberado a la sangre como consecuencia de necrosis hepática (73).

Transaminasa glutamicooxaloacética. Cataliza la transferencia de grupos amino de aspartato hacia α -cetoglutarato.



Tiene dos isoenzimas en hígado humano, una asociada con el citoplasma y otra con la mitocondria (70). La enzima se presenta en varios tejidos y es particularmente abundante en hígado,

corazón y músculo esquelético (86).

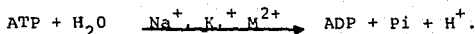
Las enzimas anteriores además de ser marcadoras del tejido hepático, constituyen parámetros adecuados para evaluar los efectos tóxicos del etanol y de otros agentes sobre el hepatocito.

La fosfatasa alcalina y la γ -glutamil transpeptidasa son enzimas membranales útiles para evaluar los efectos de la interacción directa de etanol con la membrana plasmática de las células. Debido a su localización membranal, estas enzimas son sensibles a la presencia de etanol. La γ GT es más sensible que la FA a la presencia del mismo y se encuentra alterada en el hepatocito aún antes de que se produzca daño hepático (79).

Las transaminasas glutamicopirúvica y glutámico oxaloacética son enzimas citosólicas, y la presencia de las mismas en el suero de alcohólicos es indicativa de daño a órgano inducido por alcohol (86).

Otra enzima membranal que es afectada selectivamente por la presencia del etanol es la ATPasa $\text{Na}^+:\text{K}^+$ (EC.3.6.1. 37) (96).

La ATPasa $\text{Na}^+:\text{K}^+$ hidroliza ATP solamente si están presentes Na^+ y K^+ además de Mg^{2+} .



La ATPasa $\text{Na}^+:\text{K}^+$ es parte integrante de la bomba de $\text{Na}^+:\text{K}^+$ y la rotura del ATP suministra la energía necesaria para mantener altas concentraciones de K^+ y bajas concentraciones de

Na^+ en el interior de la célula animal relativa al medio externo. El transporte activo de $\text{Na}^+ : \text{K}^+$ es de gran significado fisiológico (60).

En las células hepáticas estas enzimas tienen gran importancia ya que además de regular los gradientes de cationes, también controlan el transporte de nutrientes indispensables para el hepatocito (aminoácidos y azúcares) y el transporte de ácidos biliares, pues estos últimos se acoplan al transporte de sodio. Dada la gran actividad metabólica que desarrolla el hígado esto es de gran importancia.

IV. OBJETIVOS.

Objetivos generales:

Caracterizar a la línea celular hepática humana WRL-68 en cultivo.

Estudiar los efectos tóxicos del etanol sobre la línea celular WRL-68.

Objetivos particulares:

- 1.- Caracterizar a las células WRL-68 en cultivo.
 - a) Condiciones de cultivo.
 - b) Morfología por microscopía de fases y electrónica.
 - c) Clonación.
 - d) Curva de crecimiento.
 - e) Actividad de enzimas hepáticas.
 - f) Estado de los sistemas de transporte iónico membranaral.

- 2.- Viabilidad de células WRL-68 en un medio que contenga etanol.

- 3.- Efecto de la administración crónica de etanol a células WRL-68.
 - a) Morfología por microscopía de fases y electrónica.
 - b) Curva de crecimiento.
 - c) Actividad de enzimas hepáticas.
 - d) Estado de los sistemas de transporte iónico mem-

branal.

4.- Efecto de la administración aguda de etanol a células WRL-68.

- a) Morfología por microscopía de fases y electrónica
- b) Actividad de enzimas hepáticas.
- c) Estado de los sistemas de transporte iónico membranaral.

V. HIPOTESIS.

1.- Respecto del primer objetivo

Las células WRL-68 constituyen una línea celular establecida obtenida de hígado fetal humano normal, no se conocen las características del cultivo ni la persistencia de su carácter hepático con los sucesivos pasajes.

Nuestra hipótesis es que estas células pueden cultivarse *in vitro* y que conservarán sus características hepáticas.

2.- La hipótesis de trabajo con respecto al segundo objetivo es que estas células son capaces de vivir en un medio con altas concentraciones de etanol utilizándolo como sustrato metabólico.

3.- La administración crónica de etanol producirá alteraciones en muchos de los parámetros que nos proponemos estudiar y esas alteraciones podrán compararse con los valores obtenidos en células normales e intoxicadas agudamente.

4.- La administración aguda de etanol producirá alteraciones en muchos de los parámetros que nos proponemos estudiar y estas alteraciones podrán compararse con células normales y con células intoxicadas crónicamente.

VI. MATERIAL Y METODOS.

PROCEDIMIENTOS DE USO GENERAL EN UN CULTIVO CELULAR.

A) Cosecha (tripsinización) de un cultivo celular (23,71)

i) Material equipo y reactivos para cultivo de tejidos.

Botellas de plástico para cultivo NunC.

Pipetas estériles de 10 ml.

Mechero Touch-o-mate.

Portapipetas.

Incubadora a 37°C con atmósfera con 90% de humedad y 5% de CO₂ Labline.

Invertoscopio de fases Zeiss IM.

Campana de flujo laminar Vecco.

Suero fetal bovino Hy Clone

Solución salina buffer de fosfatos (PBS) (Gibco)

Medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco)

Solución de tripsina al 0.05% (In vitro).

Cultivo de células WRL-68.

ii) Procedimiento.

1.- Remover y descartar el medio de cultivo.

2.- Lavar la capa celular con solución PBS previamente calentado a 37°C, descartar el fluido.

3.- Agregar solución de tripsina-verseno al 0.05%, de tal manera que cubra la superficie de la monocapa. Incubar a 37°C durante 3 a 5 minutos.

4.- Cuando las células se han despegado del sustrato, agregar varios mililitros de DMEM complementado con 8% de suero fetal bovino y 1% de aminoácidos no esenciales, en lo sucesivo lo denominaremos medio completo. Resuspender las células suavemente en el medio.

5.- Transferir la suspensión celular a otra botella de cultivo que también contiene DMEM completo. Los nuevos cultivos son incubados a 37°C sin turbulencias para facilitar la adhesión celular. Cuando el cultivo alcanza la confluencia, realizar nuevamente la cosecha.

B) Congelamiento y almacenaje de un cultivo celular (23,71).

i) Material equipo y reactivos.

Material, equipo y reactivos de uso común en cultivo de tejidos.

Ampulas de plástico de 2 ml. Nunc.

Hematocitómetro para conteo de células.

Termo refrigerante con N₂ líquido MVE Cryogenic

Centrífuga clínica Sol Bat

Dimetilsulfóxido (DMSO) Merck

ii) Procedimiento.

1.- Para que las células sobrevivan mejor al almacenamiento criogénico cosechar en fase logarítmica de crecimiento, y en DMEM completo normal.

2.- Realizar el conteo celular en un hematocitómetro para conocer la concentración total de células en suspensión.

3.- Centrifugar la suspensión celular a 800-1000 rpm durante 5 minutos, eliminar el sobrenadante.

4.- Resuspender el paquete celular en un medio especial para congelamiento que contiene 70% de DMEM, 20% de suero fetal bovino y 10% de DMSO.

La concentración celular óptima para congelar es de 1200 000 a 1 500 000 cel ml⁻¹.

5.- Distribuir la suspensión celular en viales de plástico de 2 ml. No llenar completamente los viales para evitar que estallen durante el proceso de congelamiento.

6.- Etiquetar y almacenar los viales en el congelador a -70°C. Las células son viables a esta temperatura por 6 meses, pero si se desea, a las 24 horas los viales son transferidos y almacenados en N₂ líquido a -196°C. Si el proceso es bien realizado las células se mantienen viables hasta 10-12 años en N₂ líquido. Posteriormente descongelar algunos viales para verificar la viabilidad celular.

1.- CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS WRL-68.

A) Condiciones de cultivo

i) Material equipo y reactivos

Se emplean los materiales y aditamentos de uso común en cultivo de tejidos.

Cultivo de células WRL-68.

ii) Procedimiento

Descongelar las células WRL-68 e incubar a 37°C e inmediatamente transferir a botellas de cultivo que contienen DMEM completo y cultivar bajo las condiciones que recomienda la ATCC.

B) Microscopía por contraste de fases y electrónica.

- Microscopía de fases

i) Material equipo y reactivo

Invertoscopio Zeiss I.M.

Cultivo de células WRL-68.

Cajas Petri estériles de plástico de 2 cm de diámetro Falcon

Pipetas estériles de 2 ml.

Solución de NaOH 0.32 N.

Colágena estéril.

ii) Procedimiento.

Observar las células a través del microscopio invertido

de fases con los objetivos 10x y 20x y registrar las características del cultivo: tipo de crecimiento (monocapa o multicapas), morfología (formas alargadas, redondas, triangulares, etc.), número de núcleos (mononucleadas, binucleadas, etc.), características del citoplasma, verificar si existe o no contaminación por otras células, etc.

-Microscopía electrónica de transmisión.

ii) Procedimiento.

Debido a que las células sembradas directamente sobre el plástico no se despegan fácilmente, para realizar las microscopías electrónicas las células se sembraron sobre camas de colágena.

1.- Sembrar las células en camas de colágena y fijar en 2.5% de glutaraldehído y buffer de fosfatos 0.1 M (pH 7.4) por 1 hora a 0. °C. Lavar con amortiguador de PO_4^{-3} 0.1M-sac.0.25.

2.- Posfijar las muestras en OsO_4 en amortiguador de fosfatos.

3.- Deshidratar en una serie gradual de etanol a las muestras y posteriormente son embebidas en pon 812.

4.- Separar las células de la caja Petri con un ultramicrotomo, teñir con acetato de uranilo y citrato de plomo en el microscopio electrónico.

Las muestras para las microscopías electrónicas fueron procesadas en el Instituto de Fisiología Celular (U.N.A.M.) a quien agradecemos su colaboración.

C) Clonación por dilución (23,71).

i) Material equipo y reactivos.

Equipo para cultivo de tejidos.

Hematocitómetro.

Centrífuga clínica Sol Bat

Pipetas Pasteur estériles.

Placas de 96 pozos Nunc.

Placas de 24 pozos Nunc.

Solución de azul tripano al 0.1%.

ii) Procedimiento.

1.- Cosechar y resuspender las células en fase logarítmica de crecimiento en DMEM completo normal.

2.- Contar las células en hematocitómetro.

3.- Diluir la suspensión celular a una concentración de $3-10 \text{ cel ml}^{-1}$.

4.- Colocar la dilución celular en una multicámara de 96 pozos, adicionar 1 gota en cada pozo. Agitar repetidamente la multicámara para asegurar la dispersión homogénea de las células.

5.- Incubar a 37°C durante 1 hora para permitir que el pH se estabilice; cubrir con parafilm para evitar la evaporación del medio e incubar nuevamente.

6.- Transcurrida una semana, verificar el crecimiento de los clones y agregar una gota de medio condicionado a cada

pozo. El medio condicionado se obtiene dejándolo en contacto con células durante 24 horas a 37°C.

7.- Cuando se han formado colonias de 500-600 células, comunmente en 2-3 semanas, cosechar. Retirar el medio de los pozos y tripsinizar. Transferir las células a cada pozo de una multicámara de 24 pozos, desde el cual las células clonadas se desarrollan. Posteriormente transferir a frascos de cultivo.

D) Curva de crecimiento (23,71)

i) Material equipo y reactivos

Equipo de uso común para cultivo de células.

Placa de 24 pozos (Area del pozo 1.7671 cm²)

Hematocitómetro para conteo de células.

Centrífuga clínica Sol Bat

ii) Procedimiento

1.- Realizar la cosecha del cultivo celular. Las células son resuspendidas en DMEM completo normal.

2.- Contar las células en hematocitómetro.

3.- Diluir la suspensión celular a una concentración de 2-3 x 10⁴ cel ml⁻¹

4.- En una multicámara de 24 pozos colocar 1 ml de la suspensión celular en cada pozo, incubar a 37°C.

5.- A las 24 horas cosechar los dos primeros pozos de la multicámara, contar el número de células de cada pozo en un hemocitómetro. A las 48 horas realizar la cosecha y conteo de los siguientes dos pozos. Este proceso se repite hasta completar los 24 pozos de la multicámara.

6.- Los datos obtenidos se expresan mediante una curva de crecimiento en la que se grafican número de células (variable dependiente) vs. tiempo (variable independiente).

E) Actividad de enzimas hepáticas.

i) Material equipo y reactivos.

Tubos de ensaye de 12x100

Vortex o agitador Touch Plate

Pipetas de 5 y 10 ml.

Parrilla de calentamiento Thermolyne Type 1000 Stirr Plate.

Micropipetas de 100 y 1000 μ

3 radilla para tubos de ensaye. Cubetas de 1 cm de espesor.

Espectrofotómetro Cary 118.

a) Reactivos para la determinación de fosfatasa alcalina (F.A.)

Solución amortiguadora: amortiguador de dietanolamina-HCl
1.0 M. pH 9.8; cloruro de magnesio 0.5 mM.

Solución de sustrato: 4-nitrofenilfosfato 10 mM.

b) Reactivos para la determinación de glutamil transpeptidasa (γ GT).

Solución amortiguadora: amortiguador tris 100 mM pH.
8.25 glicilglicina 100 mM.

Solución de sustrato: L- γ -glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilida 4 mM.

c) Reactivos para la determinación de transaminasa glutámico oxaloacética (TGO).

Solución de enzima y amortiguador: NADH_2 0.18 mM.

LDH 1.3 U/ml; MDH 0.7 U/ml; amortiguador de fosfatos 80 mM. pH 7.4

Solución de sustrato: L-aspartato 200 mmol/L; cetoglutarato 12 mM.

d) Reactivos para la determinación de transaminasa glutámico pirúvica (TGP).

Solución de enzima y amortiguador: NADH_2 0.18 mM.

1.3 KU/L., amortiguador de fosfatos 80 mM. a pH 7.4.

Solución de sustrato: L-alanina 800 mM -cetoglutarato 18 mM.

ii) Procedimiento.

Con el objeto de estandarizar las condiciones de cultivo, sembrar el lote de células sobre el que se determinarán las actividades enzimáticas.

1.- Cultivo de las células WRL-68.

En cajas de petri de plástico de 9 cm de diámetro sembrar células WRL-68 normales (no intoxicadas con etanol) a una concentración inicial de 350 000 células por caja; 48 horas después el cultivo alcanza la confluencia y se le retira el medio. Lavar la monocapa celular suavemente 3 veces con solución salina al 0.85% y almacenar las cajas de Petri en el congelador a -70°C hasta el momento de la determinación de

enzimas.

2.- Preparación de las muestras para determinar las actividades enzimáticas.

Con ayuda de un gendarme levantar las células del sustrato (inicialmente no es necesario agregar agua porque las cajas Petri tienen cierta humedad). Posteriormente agregar 1 ml de agua y verificar a través del microscopio que las células estén completamente despegadas. Transferir la suspensión celular a un vial de plástico. Lavar la caja Petri gradualmente con 3 ml más de agua, es decir, a cada caja de cultivo se agregan 4 ml. de agua.

Con el tratamiento inicial las células se rompen sin embargo, para tener muestras más homogéneas los viales son congelados en N_2 líquido a $-196^\circ C$ y descongelados a temperatura ambiente, por tres veces sucesivas.

Agitar la suspensión celular en vortex y utilizarla para determinar las actividades enzimáticas.

3.- Medición de las actividades enzimáticas.

a) Fosfatasa alcalina (E.C.3.1.3.1.3.1.; FA) (25)

1.- Preparar una solución reactiva que contiene amortiguador de dietanolamina-HCl 1.0 mM $MgCl_2$ 0.5 mM y 4 nitrofenilfosfato 10 mM y llevar a 10 ml.

2.- En una cubeta espectrofotométrica pipetear 2.0 ml de

solución reactiva.

3.- Agregar 20 μ l del homogenado celular y mezclar.

Medir el aumento de absorbancia durante 3, 4 ó 5 minutos a 405 nm.

Actividad por volumen (U/L) = $A/\text{min} \times 5454$

AE/min = El promedio de los cambios de absorbancia por minutos.

b) γ -Glutamil transpeptidasa (E.C. 2.3.2.2. γ -GT) (15)

1.- Preparar una solución reactiva que contiene amortiguador tris 100 mM. pH 8.5; Glicilglicina 100 mM y L- γ -Glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida 4 mM.

2.- Agregar en un tubo de ensayo 2 ml de la solución reactiva y 200 μ l de homogenado celular y mezclar.

Después de un minuto leer el aumento de absorbancia cada minuto durante 3, 4 ó 5 minutos a 405 nm.

Actividad por volumen (U/L) = $AE/\text{min} \times 1158$

c) Transaminasa glutámicooxaloacética (E.C.2.6.1.1., TGO) (70,87).

1.- Preparar una solución reactiva consistente de amortiguador de fosfatos 80 mM a pH 7.4, L-aspartato 200 mM, α -cetoglutarato 12 mM; $NADH_2$ 0.18 mM; LDH 1.3 U/ml y MDH 0.7 U/ml.

2.- En un tubo de ensayo agregar 2.0 ml de la solución

reactiva y mezclar.

3.- Agregar 500 μ l de la muestra por analizar y mezclar.

4.- Pasarlo inmediatamente a la cubeta fotométrica y medir la absorbancia (a 25°C) a 340 nm al cabo de un minuto, aproximadamente, y, simultáneamente poner en marcha el cronómetro.

5.- Repetir las lecturas, de minuto en minuto, durante 3 4 6 5 minutos.

Actividad por volumen (U/L) = $AE/min \times 794 \text{ u/L}$.

d) Transaminasa glutamicopirúvica (E.C.2.6.1.2., TGP).
(46, 87).

1.- Preparar una solución reactiva con los siguientes reactivos: amortiguador de fosfatos 80 mM a pH 7.4, L-alanina 800 mM; α -cetoglutarato 18 mM; $NADH_2$ 0.18 mM y LDH 1.2 KU/L.

2.- En un tubo de ensayo colocar 2.0 ml de la solución reactiva y mezclar.

3.- Agregar 500 μ l de la muestra por analizar y mezclar.

4.- Pasarlo inmediatamente a la cubeta fotométrica y medir la absorbancia (a 25°C) a 340 nm después de un minuto y poner en marcha el cronómetro.

5.- Repetir la medición cada minuto, durante 3, 4 6 5 minutos.

Actividad por volumen (U/L) = AE/min x 794 u/L.

F) Estados de los sistemas de transporte iónico membranaral (17).

i) Material equipo y reactivos.

Tubos de ensayo 13 x 100

Micropipetas de 10, 100 y 1000 mcl.

Agitador vortex. Touch Plate.

Cronómetro.

Espectrofotómetro Cary 118.

Contador de centelleo Packard

Solución de KCl 100 mM, Mg Cl₂ 7.5 mM pH 6.8 (Solución a)

Solución de NaCl 500 mM, MgCl₂ 7.5 mM pH 6.8 (Solución b)

Solución ATP Na₂ 30 mM, HisCl 150 mM pH 6.8 (Solución c)

Solución de ouabaina 10⁻³ M en agua.

Solución de molibdato de amonio al 6.6%.

Solución de lucim⁻¹ ²²Na, 118 mM NaCl, ²²Na mM de NaHCO₃,

1 mM de MgCl₂, 5 mM dextrosa, 10 mM HEPES Mg Cl₂ 0.1 M.

1) Determinación de la actividad enzimática de ATPasa Na⁺:K⁺

ii) Procedimiento

1.- Mezclar 5 ml de a), 5 ml de b), 5 ml de c) y 10 ml de agua.

2.- Poner en 6 tubos de ensayo 0.5 ml de la mezcla anterior.

3.- Agregar 100ul de ouabaina 10⁻³M a 3 de los tubos.

4.- Incubar 5 min a 37°C los 6 tubos de ensayo.

5.- Agregar 10 μ l. de homogenado celular a cada uno de los tubos.

6.- Agitar en vortex.

7.- Incubar 30 minutos a 37°C.

8.- Introducir en hielo.

9.- Agregar 7.5 ml. de agua cada tubo.

10.- Agregar 1 ml. de NH_4MoO_4 en cada tubo.

11.- Adicionar 1 ml. de FeSO_4 a cada tubo.

12.- Esperar 10 minutos y leer a 660 nm.

Tubo control: todo igual pero manteniendo en hielo tubo blanco
8 ml de agua + 1 ml de NH_4MoO_4 + 1 ml de FeSO_4

Hacer curva de calibración de fosfatos y determinar la actividad- de $\text{N}^+:\text{K}^+$ ATPasa.

2) Salida de sodio a través de la membrana plasmática de las células WRL-68.

Las células WRL-68 crecidas a la densidad de saturación sobre cajas de Petri se lavan 3 veces con solución salina de fosfatos (PBS). Luego se incuban durante 2.5 horas con una solución de carga que contiene 1 Ci ml^{-1} ^{22}Na , 118 mM NaCl, 22 mM de NaHCO_3 , 1 mM de MgCl_2 , 5 mM dextrosa y 10 mM HEPES. 5 minutos de que se complete el período de carga la mitad de las cajas son tratadas con ouabaína 10^{-4} M. Las monocapas son rápidamente lavadas 4 veces con MgCl_2 0.1 M frío y se dejan en contacto

con esta solución a 4°C durante 2 minutos. Luego se siguió el lavado de ^{22}Na de las células, incubando la monocapa con 1 ml de Ringer adicionado con KCl 5 mM a 37°C. Después de 1 minuto el Ringer fue recolectado para contar la radiactividad y las cajas de Petri rellenas con Ringer fresco. El procedimiento se repitió 4 veces al final del período de muestreo se añadió 1 ml NaOH 0.5 M y se dejó toda la noche a temperatura ambiente. Se tomaron 2 alícuotas de las células digeridas, una de ellas para contar la radiactividad que había quedado dentro de las células y la otra para la determinación de proteínas.

3) Unión de ^3H Ouabaina.

Las células WRL-68 se sembraron a confluencia, 48 horas más tarde se lavaron con un Ringer de sodio más fosfatos (118 mM NaCl, 22 mM NaHCO_3 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 2.5 mM NaH_2PO_4 , pH 7.4). Las células se incubaron durante 2 horas a 37°C con este Ringer adicionado de ^3H ouabaina 5×10^{-7} M de ^3H ouabaina 5×10^{-7} M más ouabaina fría 5×10^{-4} M. Al final del período de incubación las células se lavaron 4 veces con Ringer sodio (la última vez durante 10 minutos). Las células se cosecharon y se tomó una alícuota para contarlas y al resto se le digirió con 0.5 ml de NaOH 0.5 M durante una noche. Una alícuota del digerido se usa para contar la radiactividad.

2.- CURVA DE VIABILIDAD EN ETANOL.

i) Material equipo y reactivos.

Material y equipo para cultivo de tejidos.

Pipetas Pasteur.

Microscopio invertido de fases.

Solución de azul tripano al 0.1%.

Multicámara de 96 pozos.

DMEM completo adicionado con etanol 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} ,
0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 y 2.0 M.

MDEM completo adicionado con manitol 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} ,
0.25, 0.5 y 1.0 M.

ii) Procedimiento.

1.- Cuando el cultivo está en fase logarítmica de crecimiento realizar la cosecha, y resuspender las células en DMEM completo normal.

2.- Distribuir la suspensión celular sobre los pozos de una multicámara de 96 pozos, incubar a 37°C.

3.- A las 24 horas cambiar el medio por uno fresco que contiene DMEM completo adicionado con etanol a las concentraciones 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 0.25, 0.5 0.75, 1.0, 1.5 y 2.0 M y dejar una hilera de pozos con medio sin etanol como control. Se hace lo mismo en otra multicámara pero el medio contiene manitol en lugar de etanol. Incubar a 37°C.

4.- A las 24 horas retirar el medio y agregar a cada pozo una gota del colorante de exclusión azul tripano durante 2 a 3 minutos, retirar el colorante y determinar la viabilidad celular. Las células muertas se tiñen de azul, en tanto que las células viables no absorben el colorante.

3.- EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE ETANOL.

i) Material equipo y reactivos.

Equipo y aditamentos de uso común en el cultivo de tejido.

DMEM completo adicionado con etanol 0.1 M.

Cultivo de células WRL-68.

ii) Procedimiento.

1.- Cosechar las células en fase logarítmica de crecimiento y resuspender en DMEM completo normal.

2.- Transferir la suspensión celular a una botella de cultivo e incubar a 37°C durante 45 minutos para permitir que las células se adhieran al sustrato.

3.- Transcurrido este tiempo, succionar el medio y eliminarlo, agregar DMEM fresco completo adicionado con etanol 0.1 M. Se incuba a 37°C. Las células son cultivadas en este medio durante 1 mes.

4.- Después de tratar al cultivo con etanol 0.1M durante un mes, determinar los siguientes parámetros, descritos anteriormente:

A) Morfología por microscopía de fases y electrónica

B) Curva de crecimiento.

C) Actividad de enzimas hepáticas.

D) Estado de los sistemas de transporte iónico membranal.

4.- EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE ETANOL.

i) Material equipo y reactivos.

Equipo y aditamentos de uso común en el cultivo de tejidos.

DMEM completo adicionado con etanol 0.5 M.

Cultivo de células WRL-68.

ii) Procedimiento.

1.- Realizar la cosecha celular cuando las células están en fase logarítmica de crecimiento. Resuspender las células en DMEM completo normal.

2.- Transferir la suspensión celular a una botella de cultivo, incubar a 37°C durante 45 minutos para permitir que las células se adhieran al sustrato.

3.- Transcurrido este tiempo cambiar el medio por DMEM fresco completo adicionado con etanol 0.5 M. Incubar el cultivo a 37°C.

4.- A las 24 horas el medio es retirado y determinar los siguientes parámetros usando las técnicas previamente descritas.

A) Morfología por microscopía de fases y electrónica.

B) Actividad de enzimas hepáticas.

C) Estado de los sistemas de transporte iónico membranal.

VII. RESULTADOS

1.- CARACTERIZACION DE LAS CÉLULAS WRL-68

A) Condiciones de cultivo

Las células WRL-68 requieren para su crecimiento medio mínimo esencial modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con 8% de suero fetal bovino y 1% de aminoácidos no esenciales, en lo sucesivo denominaremos a éste medio completo.

Las condiciones óptimas del cultivo son 36.5 °C en una atmósfera de 90% de humedad con 5% de CO₂.

Las células se distribuyen en las botellas de cultivo de manera poco usual, ya que al multiplicarse los cultivos no cubren la superficie total de sustrato disponible dejando huecos conforme las células van alcanzando la confluencia. Estos huecos no se deben a retracciones celulares o a despegamiento de las mismas. Al llegar a confluencia las células tienden a apilarse perdiendo cierto contacto por inhibición y a determinada densidad empiezan a despegarse.

Se sembraron sobre diferentes sustratos a fin de ver si podían cubrir toda la superficie disponible, así como mejorar su adhesividad. Los sustratos empleados fueron vidrio, plástico, cama de colágena, polilisina y una biomatriz hepática; encontrando que el plástico era el sustrato más adecuado para la siembra de las células WRL-68 y que su baja adhesividad es una característica intrínseca de ellas al llegar a cierta confluen

cia.

B) Morfología

Al microscopio de fases las células WRL-68 presentan dos tipos de morfología: células de forma irregular con múltiples elongaciones que se proyectan hasta contactar una célula con otra, y células redondeadas más refringentes que las primeras. El citoplasma de ambas morfologías presenta diversos tamaños y un núcleo prominente y redondeado que contiene uno o dos nucleolos (fig. 5). Se advierten células binucleadas que constituyen una aberración en las líneas celulares.

Por microscopía electrónica de transmisión (fig. 6) encontramos que las células presentan núcleo con número variable de nucleolos; en el citoplasma se observa glucógeno y corpúsculos de grasa; entre las células a nivel de membranas hay estructuras que semejan canalículos con microvellosidades, los cuales están delimitados por complejos de unión.

Por microscopía electrónica de barrido (fig. 7) se ven claramente los dos tipos de morfología antes mencionados, y se observa la formación de matriz extracelular.

C) Clonación.

Los dos tipos de morfología observados en el cultivo de células WRL-68 no pueden separarse por clonación, por lo que pensamos corresponden a un mismo tipo celular pero que se encuentran en diferente fase de desarrollo.

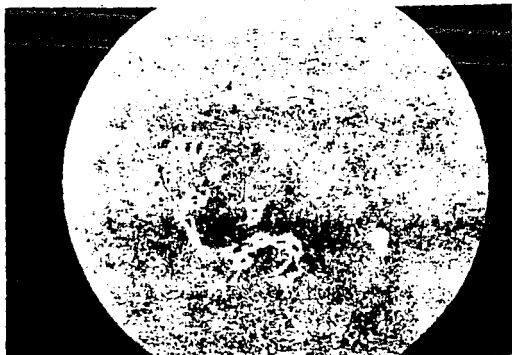


FIG. 5a. Células WRL-68 normales sembradas a baja densidad. La flecha señala células redondeadas con mayor refringencia que las células triangulares.



FIG. 5b. Células WRL-68 normales sembradas a alta densidad. La flecha indica células redondeadas y refringentes. Con dos flechas se señalan una célula binucleada.



FIG. 6 Microscopía electrónica de transmisión de células WRL-68 normales.

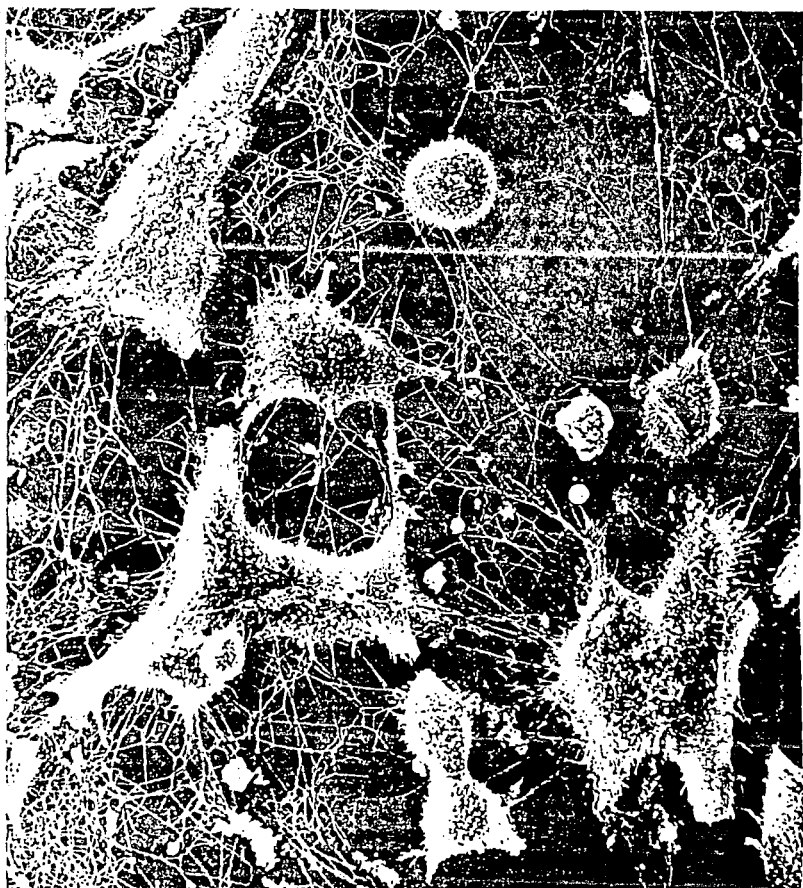


FIG. 7a. Microscopía electrónica de barrido de células WRL-68 normales sembradas a baja densidad.

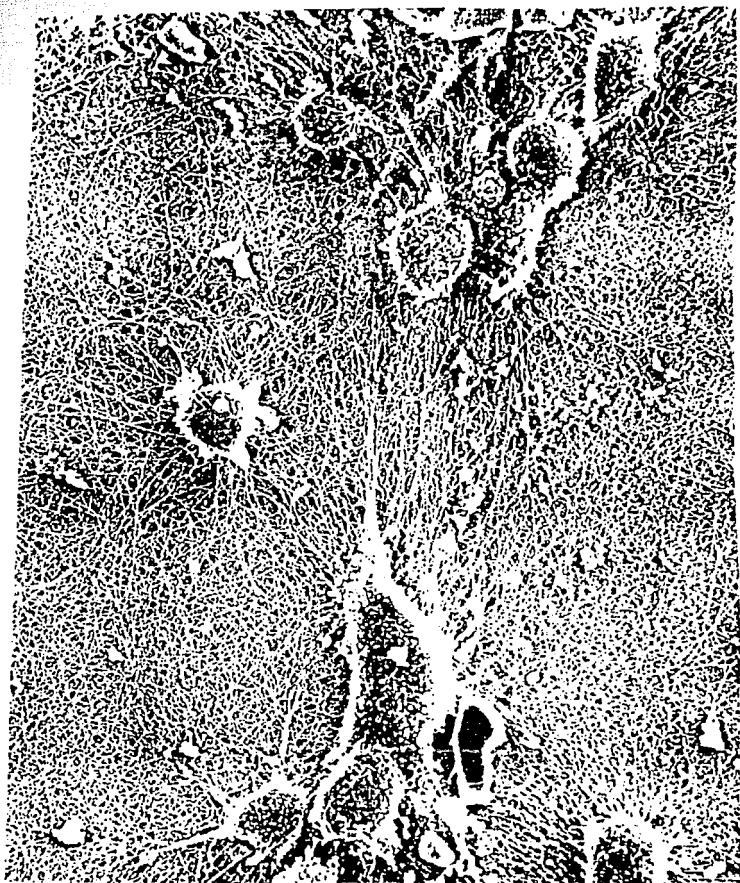


FIG.7b. Microscopía electrónica de barrido de células WRL-68 normales sembradas a alta densidad.

D) Curva de crecimiento

La cinética de crecimiento de las WRL-68 normales (así llamaremos a las células no intoxicadas con etanol) se presentan en el cuadro II, fig. 8.

Se puede ver que la curva de crecimiento es exponencial. El tiempo de duplicación ocurre cada 27 horas. La densidad de saturación se alcanza a los seis días de inoculación cuando hay 1.38×10^5 cel/cm⁻² y después de este tiempo las células comienzan a despegarse del sustrato.

E) Actividad de enzimas hepáticas.

A fin de asegurarnos del carácter hepático del cultivo, investigamos la presencia de enzimas consideradas como marcadoras de hepatocitos: fosfatasa alcalina (FA), -glutamyltranspeptidasa (GT), transaminasa glutamicopirúvica (TGP) y transaminasa glutamicooxaloacética (TGO). Los resultados obtenidos se presentan en el cuadro III.

Cuadro II. Curva de Crecimiento de Células WRL-68 Normales

Tiempo (días)	cel/cm ⁻² (\bar{x})	log cel/cm ⁻²
T ₀	4 500	3.65
T ₁	6 000	3.80
T ₂	11 000	4.00
T ₃	20 000	4.30
T ₄	37 000	4.60
T ₅	65 000	4.80
T ₆	138 000	5.10
T ₇	102 000	5.00
T ₈	34 000	4.50
T ₉	18 000	4.25
T ₁₀	12 000	4.10

Cuadro III. Actividad de Enzimas Hepáticas en células WRL-68 Normales. El número en paréntesis indica el número de determinaciones.

Enzimas	nmol/μgDNA ⁻¹ min ⁻¹
FA	0.4856 [±] 0.1014 (10)
GT	0.0320 [±] 0.0051 (10)
TGP	0.0229 [±] 0.0048 (7)
TGO	0.0220 [±] 0.0027 (7)

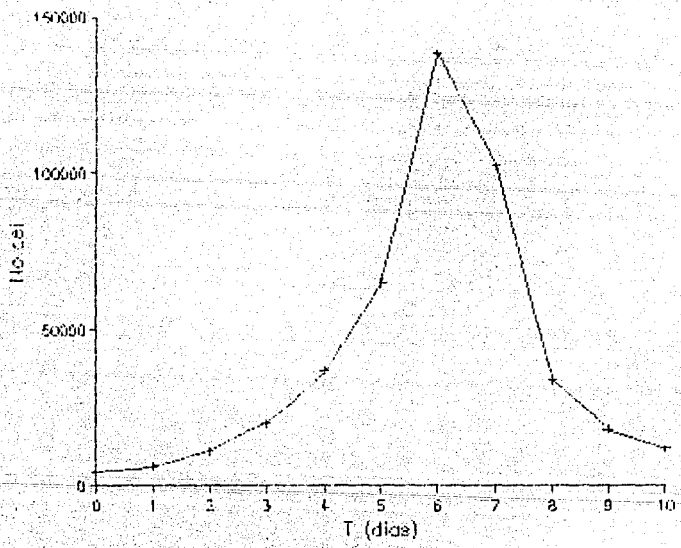


FIG. 8a. Curva de crecimiento de células WRL-68 normales.

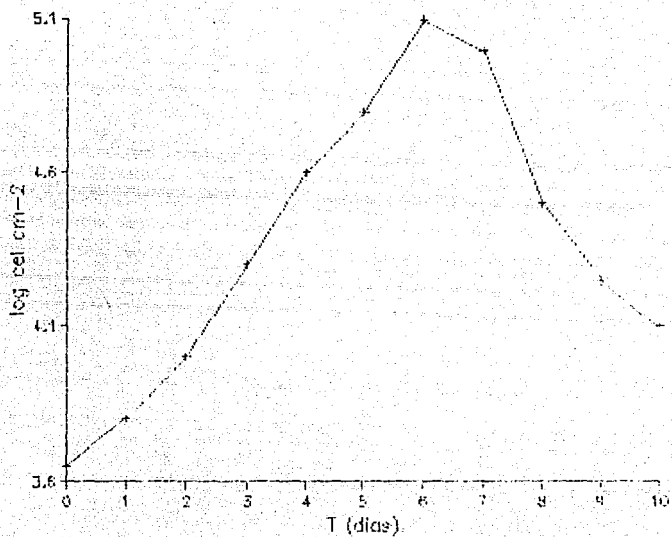


FIG. 8b. Curva de crecimiento de células WRL-68 normales.

2.- CURVA DE VIABILIDAD EN ETANOL DE

CÉLULAS WRL-68

Se realizaron experimentos en los cuales se utilizaron medios con distintas concentraciones de etanol para determinar si las células WRL-68 eran capaces de mantenerse viables en presencia de esta sustancia. Como control se empleó manitol, un disacárido para el cual no existen mecanismos de transporte al interior de la célula y que por tanto, sirve para ver el efecto de la osmolaridad sobre las células a concentraciones altas de dicha sustancia. Los resultados obtenidos se presentan en la cuadro IV, fig 9.

Las determinaciones de viabilidad en etanol y manitol se realizaron también en la línea celular MDCK provenientes de riñón de perro; esto con el fin de comparar la capacidad de estas células con respecto las WRL-68 de origen hepático humano para sobrevivir, y en consecuencia para metabolizar al etanol (cuadro V, fig. 9).

De la curva de viabilidad (cuadro IV, fig. 9) se observa que las células WRL-68 tienen un 100% de viabilidad a concentraciones de 10^{-3} a 10^{-1} M de etanol. A partir de 0.25 M de etanol las células comienzan a morir; sin embargo a concentraciones de 0.5 y 0.75 M la viabilidad es todavía del 50 y 40%, respectivamente. De estos resultados, se eligió la concentración 0.1 M de etanol como punto óptimo para realizar la intoxicación crónica, con un período de exposición de 1 mes. Para la intoxicación

aguda se consideró adecuada la concentración de 0.5 M de etanol, durante 24 horas.

Las células MDCK tienen solamente 50% de viabilidad a la concentración 10^{-1} M de etanol y mueren a 0.25 M de esta sustancia (cuadro V fig. 9).

Cuadro IV Viabilidad en etanol y manitol de células WRL-68.

[Etanol] M	Viabilidad %	[Manitol] M	Viabilidad %
10 ⁻³	100	10 ⁻³	100
10 ⁻²	100	10 ⁻²	100
10 ⁻¹	100	10 ⁻¹	60
0.25	70	0.25	0
0.50	50	0.50	0
0.75	40	0.75	0
1.00	0	1.00	0
1.50	0	1.50	0
2.00	0	2.00	0

Cuadro V Viabilidad en etanol y manitol de células MDCK.

[Etanol] M	Viabilidad %	[Manitol] M	Viabilidad %
10 ⁻³	100	10 ⁻³	100
10 ⁻²	100	10 ⁻²	100
10 ⁻¹	50	10 ⁻¹	80
0.25	10	0.25	30
0.50	0	0.50	0
0.75	0	0.75	0
1.00	0	1.00	0
1.50	0	1.50	0
2.00	0	2.00	0

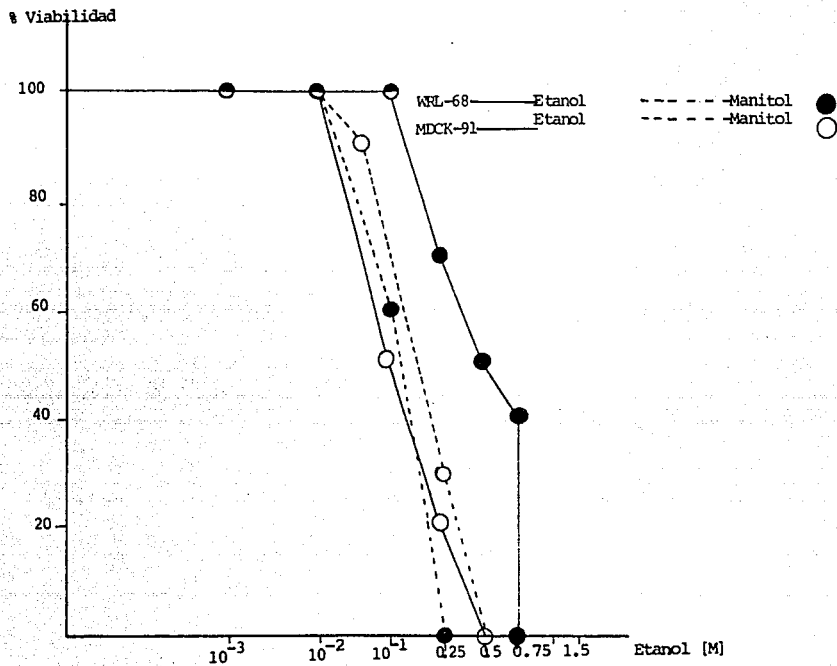


Fig.9 Curva de viabilidad en etanol de células WRL-68 y MDCK

3.- EFECTOS DE LA ADMINISTRACION CRONICA Y AGUDA DE ETANOL.

A) Morfología

La microscopía de fases muestra que las células WRL-68 mantenidas en un medio que contiene etanol 0.1M durante un mes, no presentan diferencias morfológicas con respecto a las células normales (fig. 10).

En la microscopía electrónica de transmisión, las células mantenidas en etanol crónica presentan una mayor cantidad de lisosomas, aumento ligero de retículo endoplásmico liso y rugoso.(Fig.11)

Al microscopio de fases las células WRL-68 en etanol agudo (0.5 M, 24 hrs.) muestran alteraciones morfológicas profundas con células que se han despegado del sustrato y células adheridas al sustrato cuyas membranas presentan diferentes grados de necrosis.

La microscopía electrónica de transmisión de células en etanol agudo muestran un daño generalizado. Se observan alteraciones en núcleo, mitocondria aparato de Golgi y gran cantidad de lisosomas.

B) Curva de crecimiento de células intoxicadas crónicamente con etanol.

Para ver si la intoxicación crónica con etanol tiene efectos sobre la proliferación de la línea celular, se obtuvo la curva de crecimiento en analogía a las células sin tratar (cuadro VI, fig. 12), en ella se observa que no hay diferencias significa-

tivas entre las células intoxicadas crónicamente y las normales.



Fig.10 Células WRL-68 en etanol 0.1M durante un mes. No se observan cambios con respecto a las células normales.



FIG. 11. Células WRL-68 en etanol 0.1M durante un mes.

Cuadro VI. Curva de crecimiento de células
WRL-68 intoxicadas crónicamente con etanol.

Tiempo (días)	celcm ⁻² (\bar{X})	logcelcm ⁻²
T ₀	6 500	3.81
T ₁	8 000	3.90
T ₂	14 500	4.16
T ₃	24 500	4.39
T ₄	43 000	4.63
T ₅	74 500	4.81
T ₆	153 000	5.19
T ₇	100 000	5.00
T ₈	39 000	4.60
T ₉	20 000	4.30
T ₁₀	8 000	3.90

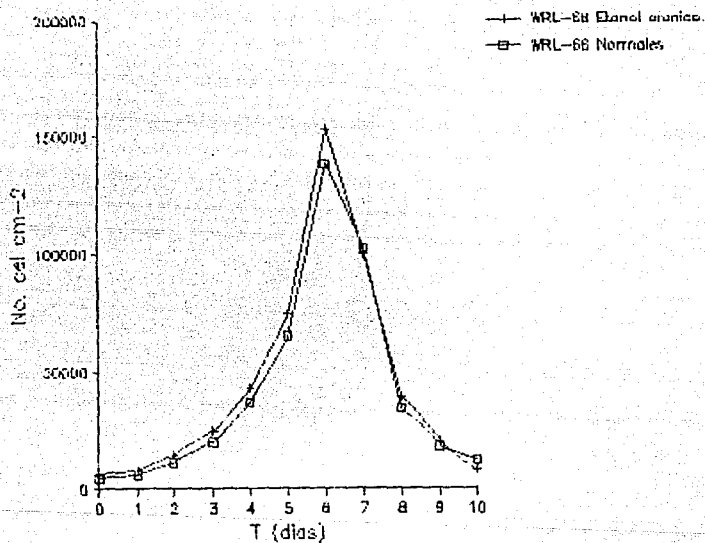


Fig. 12a. Curva de crecimiento de células WRL-68 normales e intoxicadas crónicamente con etanol.

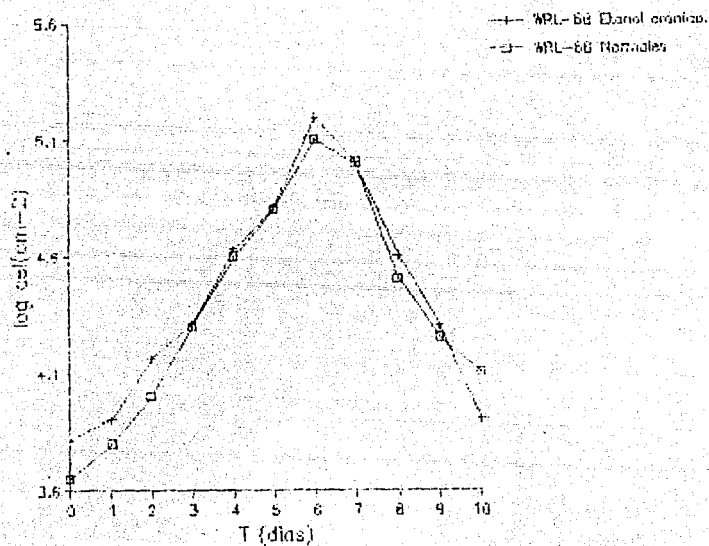


Fig. 12b. Curva de crecimiento de c6lulas WRL-68 normales e intoxicadas cr6nicamente con etanol.

C) Actividad de enzimas hepáticas.

Las enzimas fosfatasa alcalina (FA), γ -glutamil transpeptidasa (γ GT), transaminasa glutamicopirúvica (TGP) y transaminasa glutámico oxaloacética (TGO) se emplearon como parámetro para evaluar los efectos de la exposición crónica y aguda con etanol sobre las células WRL-68. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro VII.

D) Estado de los sistemas de transporte iónico membranal.

Para evaluar el estado de los sistemas de transporte iónico membranal se midió la actividad de la enzima ATPasa⁺:K⁺ y el número de bombas de estos iones. (Cuadros VIII, IX, X).

Cuadro VII Actividad de las enzimas hepáticas en células WRL-68 intoxicadas aguda y crónicamente con etanol.

Enzimas	Condición Experimental	nmol _{gDNA} ⁻¹ min ⁻¹
FA	Células normales	0.4856±0.1014 (10)
	Células en etanol crónico	0.4336±0.0601 (10)
	Células en etanol agudo	0.1630±0.0200 (10)
YGT	Células normales	0.03206±0.0051 (10)
	Células en etanol crónico	0.02360±0.0041 (10)
	Células en etanol agudo	0.01722±0.0020 (10)
TGP	Células normales	0.02290±0.0048 (7)
	Células en etanol crónico	0.02510±0.0033 (7)
	Células en etanol agudo	0.00900±0.0022 (7)
TGO	Células normales	0.02705±0.0027 (7)
	Células en etanol crónico	0.02420±0.0019 (7)
	Células en etanol agudo	0.00900±0.0026 (7)

Cuadro VIII. Actividad de ATPasa Na ⁺ :K ⁺	
Condición experimental	nmol Pi/μg DNA ⁻¹
WRL-68 normales	0.676
WRL-68 en etanol crónica	0.379
WRL-68 en etanol agudo	0.569

CUADRO IX. Marcaje de células WRL-68 con ^3H -ouabaina. El número entre paréntesis indica el número de determinaciones.

Condición experimental	Presencia de ouabaina no marcada	# de moléculas unidas por células $\times 10^5$	# de sitios de bombeo de Na por células
WRL-68 Normales	—	5.42 \pm 1.18 (7)	4.34 \pm 1.30
	+	1.08 \pm 0.12 (7)	
WRL-68 en ETOH crónico	—	5.55 \pm 1.28 (6)	3.93 \pm 1.74
	+	1.62 \pm 0.46 (6)	
WRL-68 en ETOH agudo	—	9.45 \pm 1.80 (7)	4.19 \pm 3.02
	+	5.26 \pm 1.22 (7)	

CUADRO X. Eflujo de Na+a través de la membrana plasmática de células
WRL-68 calculado del washout de ^{22}Na .

Condición experimental	K (min^{-1})	S nmol/mgprot.	J nmol/hrs.mg-prot.
Normal	0.048 \pm 0.002	793 \pm 70	2251 \pm 190
Normal+ouabaina 10^{-4}M	0.027 \pm 0.002	1155 \pm 88	1815 \pm 101
Etanol 0.1M (1 mes)	0.061 \pm 0.003	874 \pm 57	3192 \pm 182
Etanol 0.1M (+ouabaina 10^{-4}M	0.074 \pm 0.007	684 \pm 52	3037 \pm 158
Etanol 0.5M (24 hrs.)	0.131 \pm 0.028	469 \pm 59	3670 \pm 103
Etanol 0.5M (24 hrs.) +ouabaina 10^{-4}M	0.066 \pm 0.017	128 \pm 23	507 \pm 45

K = Cte de velocidad

S = Contenido intracelular de Na

J = Flujo

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS.

Se reporta (Pat US 3 935 066) que la línea celular WRL-68 ha sido obtenida a partir de hígado fetal humano; sin embargo, hasta el momento no se encuentran en la literatura estudios dirigidos a la caracterización y verificación de propiedades hepáticas en dicha línea celular.

Los objetivos de este trabajo fueron primero caracterizar y determinar la conservación de propiedades morfológicas y funcionales de hepatocito en las células WRL-68. Después de comprobar la conservación de propiedades hepáticas, se procedió a exponer los cultivos celulares a diferentes concentraciones de etanol y se encontró que tienen la capacidad de mantenerse viables a altas concentraciones de esta sustancia.

Los resultados obtenidos permitieron considerar a las células WRL-68, un modelo adecuado para estudiar los efectos del etanol in vitro. En particular, las ventajas de estas células como modelo de estudio es que constituyen cultivos permanentes sobre los que se pueden realizar intoxicaciones con etanol en forma crónica y aguda, sin la influencia de mecanismos regulatorios que inevitablemente operan in vivo, permitiendo de este modo definir con mayor precisión la respuesta celular específica. Por otra parte, la mayoría de las investigaciones de laboratorio sobre los efectos del etanol, se han realizado sobre animales vivos (54, 63) o cultivos celulares de éstos (4, 5, 15, 25, 28); sin embargo hasta el momento no se ha encontrado una especie que reproduzca las alteraciones típicas

que el etanol provoca en el hombre (16). Los estudios utilizando células y tejidos humanos pueden proporcionar probablemente mayor información mecanística sobre el proceso de daño y alteración de las funciones bioquímicas y metabólicas que las células derivadas de otras especies.

De los estudios realizados se encontró que:

Caracterización. Las células WRL-68 presentan características morfológicas y actividad bioquímica funcional de hepatocitos. Las observaciones al microscopio de fases muestran que estas células se asemejan morfológicamente a células epiteliales de hígado en cultivo primario (15, 24, 62). Ultraestructuralmente, por microscopía electrónica de transmisión encontramos que el REL en las células expuestas crónicamente a etanol está aumentado con respecto a las no intoxicadas. Por microscopía de barrido se observan que las células forman matriz extracelular, lo cual se puede explicar como un intento de asemejar a las condiciones in vivo.

En cuanto a sus propiedades funcionales de hepatocito, las células WRL-68 tienen la capacidad de sintetizar las enzimas FA, γ GT, TGO y TGP. De acuerdo a la expresión secuencial de marcadores de diferenciación, el desarrollo del hígado se puede clasificar en tres fases: fetal temprano, perinatal y neonatal (65). Algunas enzimas específicas son sintetizadas antes del nacimiento, por ejemplo la γ GT, que es abundante en el período fetal (10), en tanto que otras se expresan hasta después del nacimiento, como por ejemplo la tirosina aminotransferasa

(65). En nuestro caso desconocemos la etapa de desarrollo en la que se encontraba el feto al momento de extraer la muestra de tejido hepático a partir del cual derivaron las células WRL-68. Sin embargo, consideramos que esto no es importante, pues existen evidencias (26, 27, 49, 52) de que cultivos celulares derivados de tejido no maduro, adquieren in vitro propiedades de diferenciación debido a las condiciones de cultivo o a la presencia de ciertos inductores como por ejemplo determinadas hormonas (23). Bajo las condiciones cultivadas, las células WRL-68 no requieren la presencia de inductores especiales para sintetizar a las enzimas ya mencionadas.

Relativo al número de bombas de sodio de las células WRL-68, se observa que éstas son del mismo orden de magnitud que en las células de Giraldi (corazón humano), Hella (cuello de útero humano), conejillo de indias (riñón), etc.

Viabilidad en etanol. Las células WRL-68 tienen la capacidad de vivir en medios con altas concentraciones de etanol sin sufrir choque osmótico.

A concentraciones de 10^{-3} a 10^{-1} M de etanol dichas células presentan un 100% de viabilidad, y aún a concentraciones tan altas como 0.5 y 0.75 M la viabilidad es del 50 y 40% respectivamente. Por el contrario las células MDCK, procedentes de riñón de perro mueren a concentraciones tan bajas como 10^{-1} M de etanol.

Estos resultados indican que la línea WRL-68 posee mecanismos

para utilizar el etanol como sustrato metabólico evitando el choque osmótico a altas concentraciones, en tanto que las células MDCK carecen de dichos mecanismos y mueren por choque osmótico.

En consecuencia este resultado indica de manera indirecta el carácter hepático de las células WRL-68 y su capacidad para metabolizar al etanol.

Exposición crónica y aguda a etanol. La microscopía de fases y electrónica de las células WRL-68 muestra que la exposición crónica a etanol no indujo cambios en la morfología y la estructura celular, en tanto que la intoxicación aguda produjo alteraciones y necrosis celular.

Los mecanismos implicados en la multiplicación celular tampoco son alterados en la exposición crónica con etanol, pues la curva de crecimiento es similar a las células no alcoholizadas.

La liberación de enzimas hepáticas es considerada comunmente como una respuesta tóxica debido a la alteración en la permeabilidad o necrosis membranal de la célula hepática y se usa ampliamente en la evaluación de daño a hígado en animales y hombres (73). Con este propósito se seleccionaron tres enzimas membranales (FA, γ GT, ATPasa Na:K) y dos enzimas citosólicas (TGO, TGP) para evaluar los efectos del etanol.

La exposición crónica a etanol indujo disminución en la actividad enzimática de γ GT y ATPasa Na:K, mientras que FA, TGO y TGP no sufrieron alteraciones. Estos resultados indican que

la presencia crónica de etanol tiene un efecto solvente sobre la membrana celular y produce alteraciones en enzimas muy sensibles a cambios de microambiente como son la GT y la ATPasa Na+:K⁺. Se ha encontrado que in vivo e in vitro la GT es muy sensible a etanol crónico y las alteraciones en su actividad se presentan aún antes de que se produzca daño celular (86); así como en rebanadas de tejido hepático de rata se ha encontrado que hay disminución en la actividad de ATPasa Na:K, en presencia de etanol crónico. La liberación de las enzimas citosólicas TGOy TGP se produce cuando hay necrosis celular (86); en este caso al no haber alteraciones en su actividad se infiere que la presencia de etanol crónico no produjo necrosis en las células WRL-68.

Por otra parte, la intoxicación aguda con etanol indujo disminución en la actividad de todas las enzimas medidas.

De los resultados anteriores se infiere que la exposición crónica a etanol produce adaptación de las células pues de los parámetros medidas, únicamente las enzimas membranales GT y Na:K ATPasa están alteradas, indicando el efecto solvente sobre la membrana.

La exposición aguda al etanol produjo alteraciones en todos los parámetros determinados.

IX. CONCLUSIONES

1.- La línea celular WRL-68 presenta:

a) Dos tipos de morfología celular: redondeadas y poliédricas, que no se pueden separar por clonación.

b) Morfología muy semejante a hepatocitos en cultivo primario.

c) Curva de crecimiento exponencial, con una densidad de saturación de 1.38×10^5 células cm^{-2} .

d) Actividad de enzimas características de tejido hepático: FA, γ GT, TGO, TGP.

e) Un número de bombas de sodio por célula de 4.0, valor similar a los reportados en otros sistemas.

2.- La capacidad de vivir en medios que contienen concentraciones altas de etanol (sin sufrir choque osmótico).

3.- La capacidad de adaptarse a la exposición crónica de etanol.

a) Sin sufrir alteraciones morfológicas al microscopio de fases y electrónico.

b) Curva de crecimiento no alterada con respecto a células no intoxicadas.

c) Enzimas membranales (γ GT y ATPasa Na:K) alteradas por el efecto tóxico solvente.

d) Enzimas citoplásmicas (TGO y TGP) no alteradas, bajo

las condiciones en que se determinaron .

4.- Alteraciones morfológicas y funcionales debidas a la presencia de etanol agudo.

De todo ello podemos concluir que las células WRL-68 constituyen un buen modelo para estudiar los efectos solvente-tóxicos del etanol sobre las células de origen hepático.

X. ANEXOS.

Análisis estadísticos de Resultados

Los resultados obtenidos en las determinaciones de cada grupo (WRL-68 en etanol crónico y WRL-68 en etanol agudo) fueron promediados obteniéndose la media \pm error standard, y se compararon con los valores promedio de un grupo control (WRL-68 no intoxicado con etanol). Las diferencias entre los grupos control y tratados se demostraron estadísticamente mediante el método t de Student, con una significancia de $p=0.05$.

XI. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Anderson, S.: Redox effects of Ethanol on steroids Metabolism. Alcoholism Clin Exp Res. 18 (6): 55. 1986.
- 2.- Baraona, E., Leo, M. A. and Borowski, S. A.: Pathogenesis of alcohol-induced accumulation of protein in the liver. J Clin Invest. 68: 546-554. 1977.
- 3.- Baroana, E. and Lieber, C.S.: Effect of Ethanol on Lipid metabolism. J Lipid Res. 28; 289-315. 1979.
- 4.- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., Sweet, W.: Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. Sci. 161: 370. 1978.
- 5.- Bissel, D.M., Ha-marker, L.E. and Meyer, U.A.: Parenchymal cells from adult rat liver in nonproliferating monolayer culture. I. Functional studies. J. Cell Biol. 59: 722-734. 1973.
- 6.- Borenfreund, E., Higgins, P. J., Steinglass, M.: Properties and malignant transformation of established rat liver parenchymal cells in culture. JNCI. 55: 375-384. 1975.
- 7.- Boverris, S. A., Oshino, N. and Chance, B.: The cellular production of hydrogen peroxide. Biochem J. 128: 617-638. 1972.
- 8.- Breen, G.A.M. and DeYellis, J.: Regulation of glycerol phosphate dehydrogenase by hydrocortisone in dissociated

cerebral cell cultures. Dev Biol. 41: 255-266. 1974.

9.- Briggs, M. and Brigs, M.: Chemistry and Metabolism of Drugs and Toxins. An Introduction to xero biochemistry N. Heinemann Medical Books, Ltd, London.

10.- Cameron, R., Kellen, F., Kolin, A., Malin, A. and Ferber, E.: γ -glutamyltransferase in putative premalignant liver cell populations during hepatocarcinogenesis. Cancer Res. 38: 823-829. 1978.

11.- Cederbaum, A. I. and Lieber, C.S.: The effects of acetaldehyde on mitochondrial function. Arch. Biochem Biophys. 161: 26. 1974.

12.- Clermont, E. J. and Chalmers, F. C.: the transaminase tests in liver disease. Medicine. 46: 197. 1967.

13.- Connor, C.L.: The etiology and pathogenesis of alcoholic cirrhosis of the liver. JAMA. 112: 387-398. 1939.

14.- Crabb, W.A. and Bosron, F.W.: Ethanol metabolism Pharmac Ther. 34: 59-73. 1987.

15.- Chessebauff, M. and Padieu, P.: Rat liver epithelial cell culture in a serum free medium: Primary culture derived cell line expressing differentiated Function. In vitro. 20 (10): 780-795. 1984.

16.- Davidson Ch. S.: Changing concepts in the Pathogenesis of Alcohol Liver Disease. Alcoholism Clin Exp. Res. 10 (6): 3-4. 1986.

17.- Dyke, Van W.R. and Seharschmidt, B.F.: (Na,K) ATPase-mediated Cation Pumping in Cultured Rat Hepatocytes. J. Biol. Chem. 258 (21): 12912-12919. 1983.

18.- Evarts, P.P. and Holliday, E.: Induction of microsomal dimethylnitrosamine dimethylase by pirazole. Biochem Pharmacol. 31: 1245-1249. 1982.

19.- Farland, W.H., Tyson, C.A. and Sawhey, D. S.: Rationale and use of functions tests in toxicity testing: a review. In. Organ Function Tests in Toxicity Evaluating. C. A. Tyson and D. S. Sawhey, eds., pp 1-22. Noyes Publications, Park Ridge, N.J. 1985.

20.- Farreras, P.V.: Medicina Interna. 8a. ed. Editorial Marin, Mex., D. F., 1983.

21.- Fleuret-Balter, C. and Barin, F.: Brain membrane disordering by administration of a single ethanol dose Pharmacol. Biochem Behavi 18 (Suppl 1): 25-29. 1983.

22.- French S. W.: Fragility of liver mitochondria in ethanol-fed rats. Gast. 54: 1086-1114. 1986.

23.- Freshney, R. I.: Culture of animal cells. A manual of Basis Technique. 1a edición. Edited by Alan R. Liss, Inc., New York., U.S.A., 1983.

24.- Furukawa, K., Shimada, T., England, P.: Enrichment and characterization of clonogenic epithelial cells from adult rat liver and initiation of epithelial cells strains. In vitro

Cellular and Developmental Biology. 23 (5): 339-348 1987.

25.- Gebhardt, R., Williams, G. M.: Amino acid transport in adult rat epithelial cells. Cell Biol. Toxicol. 2: 9-20. 1986.

26.- Gerchenson, L. E., Okigaki, T. and Anderson, M.: Fine structural and growth characteristics of cultured rat liver cells. Insulin effects. Exp. Cell Res. 71: 49-58. 1972.

27.- Graanner, D.K., Lee, A.: Thompson, E. B.: Interaction of glucocorticoid hormone and cyclic nucleotides in induction of tyrosine amino transferase in cultured hepatoma cells. J. Biol. Chem. 252: 3891-3897. 1987.

28.- Grieve, S. J., Griffiths, P. J. and Littleton, J. M.: Genetic influences on the rate of development of ethanol tolerance and the ethanol dependence with drawal syndrome in mice. Drug Alcohol Depend. 44: 77-86. 1979.

29.- Grisham, J.W.: Cell types in long term propagable cultures of rat liver. In: Botch. C.; William, G. M., eds. Differentiation and carcinogenesis in liver cells cultures, New York: New York. Acad. Sci. 128-137. 1980.

30.- Guillouso, A and Guguen-Guillouzo, C.: Isolated and cultured hepatocytes. John Libbey and Co.; London. 1986.

31.- Gyorgy, P. and Goldblatt, H.: Further observations on the production and prevention of dietary hepatic injury in rats. J. Exp. Med. 89: 245-268. 1949.

32.- Hanes, C.S. and Hird, F.J.R.: Enzymatic transpeptidation reaction involving gamma-glutamyl peptides and alpha-aminoacyl peptides. *Biochem J.* 51:25-35. 1952.

33.- Haseman, J. K., Crawford, D.D. Ituff, J. E., Boorman G. A. and McConnel, E. E.: Result from 86 two-year carcinogenicity studies conducted by the National Toxicology Program. *J. Toxicol viron Health.* 14: 621-639. 1984.

34.- Hill, A. B. and Baangham, A. D.: General Depressant drug dependence: a Biophysical Hypothesis. *adv Exp. Med. Biol.* 59: 1-9. 1975.

35.- Himworth, H. P.: *Leetures on the liver and it's Disease.* Cambridge, M. A. Harvard Univ Press. 1958.

36.- Himwich, H. E. and Callison, D. A.: The effects of alcohol on evoked potentials of various parts of the central nervous system of the cat. *The Biology of Alcoholism.* Vol. II. Physiology and Behavior (Kissin B. and Begleiter, H. eds). Pheum Press. New York, U.S.A. pp 67-84. 1972.

37.- Hoerner, M. and Behrens, V.: Immune response to acetaldehyde aducts in alcoholit patients. *Res Comm clin Pathol Pharmacol*, 1986.

38.- Ingelman-Sundberg, M. and Hogbojork, A. L.: On the significance of cytochrome P450-dependent hydroxyl radical-mediated oxygenation mechanism. *Xenobiotica.* 12:673-686. 1982.

39.- Iype, P.T., Baldwin, R.W., Clavis, D.: Cultures from

adult rat liver cells. II. Demonstration of organ-specific cell surface antigens of cultured cells from normal liver. Br J. Cancer. 26: 6-9. 1972.

40.- Jeejeebhoy, K. M., Phillips, M. J. and Bruce-Robertson, A.: The acute effect of ethanol on albumin, fibrinogen, and transferrin synthesis in the rat. Biochem J. 126: 1111-1126. 1982.

41.- Jordan, M. P., Casey, A. C. and Sorrell, M. F.: Chronic Ethanol Administration Alters Hepatic Surface Membrane as Evidenced by Decreased Concanavalin A. Binding. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 185: 1-5. 1987.

42.- Julkunen, R. J. K., Tannebaum, L., Baraona, E. and Lieber, C. S.: First pass metabolism of ethanol: An important determinant of blood levels after alcohol consumption. Alcohol, 2: 437-441. 1985a.

43.- Julkunen, R. J. K., DiPadova, C. and Lieber, c.s.: First pass metabolism of ethanol a gastrointestinal barrier against the sisthemic toxicity of ethanol. Life Sci. 37: 567-573. 1985b.

44.- Kaplan, M.M.: Alkaline phasphatase, New Eng J. Med. 286: 200. 1972.

45.- Kappas, A. and Alvarez, P. A: How the liver metabolizes fareign Substances. Am Sci. 232 (6): 22-31. 195.

46.- Kiessling, K.H. and, Tobe, B.: Degeneration of liver mitochondria in rat after prolonged alcohol consumption. Exp.

Cell Res. 33: 350-354. 1974.

47.- Klatskin, G.: The role of alcohol in the pathogenesis of cirrhosis. Yale J. Biol. Med. 26: 23-37. 1953.

48.- Koop, D. R. and Coon, J.M.: Ethanol Oxidation and Toxicity: Role of alcohol P450 Oxygenasc. Alcoholism Clin. Exp. Res. 10 (6): 44-49. 1986.

49.- Lambiote, M., Thierry, N.: Hidroxylation, Sulfatation and conjugation of bile acids in rat hepatomi and hepatocyte culture under the influence of glucocorticords. J. Biol. Chem. 255: 11324-11331. 1980.

50.- Lane, P. B., and Lieber, C. S.: Ultrastructural alterations in human hepatocytes Following ingestion of ethanol with adequat diets. Amer J. Path. 49: 593-603. 1966.

51.- Leeyy, C.M., Tanrilibir, A.K.: Biochemistry of Gastrointestinal on liver disease in Alcoholism. Vol I. Biochem Phenum Press. N. Y., pp 307-325. 1971.

52.- Leffert, H. L., Paul, D.: Studies on primary culture of differenciated fetal liver cells. J. Cell. Biol. 52: 559-568. 1972.

53.- Lieber, C. S. and Decarli, L. M.: Ethanol oxidation by hepatic microsomes. Adaptative increase after ethanol feeding. Sci. 162: 217-918. 1968.

54.- Lieber, C. S. and DeCarli, L.M.: Hepatit microsomal

ethanol oxidizing system: in vivo characteristics and adaptive properties. J. Biol. Chem. 245: 2505-2512. 1970.

55.- Lieber, C.S.: Medical Disorders of alcoholism: pathogenesis and treatment, W. B. Saunders. Philadelphia, Pa. 589 p. 1982.

56.- Lieber, C. S., Jones, D. P., Mendelson, J. and DeCarli L. M.: Fatty liver hyperlipidemia and hyperuricemia produced by prolonged alcohol consumption despite adequate dietary intake. Trans Assoc. Am. Physiol. 76: 289. 1983.

57.- Lieber, C. S.: Metabolism and metabolic effects of alcohol. Med. Clin. North Am. 68: 13-31. 1984.

58.- Malan-Shibliq ; L., Iype, P. T.: The influence of culture conditions on cell morphology and tyrosine amino transferase levels in rat liver epithelial cells lines. Exp. Cell. Res. 131: 363-371. 1981.

59.- Michalopoulos, G. Pitot, H. C.: Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membranes. Fed. Proc. 34:826. 1975.

60.- Mills, J., Macknight, A., Dayer Jean-Michel and Ausiello, Dennis, A.: Localization of (³H) ouabaina sensitive Na⁺ pump sites in cultured pig kidney cell. Am J. Physiol. 236 (3): 157-162. 1979.

61.- Miwa, G.T., Levin, W. and Thomas, P. E.: The direct oxidation of ethanol by a catalase-and alcohol dehydrogenase

free reconstituted system containing cytochrome P450. Arch Biochem Biophys. 187: 464-475. 1978.

62.- Miyazaki, M.: Primary culture of Adult Rat Liver Cells II. Cytological and biochemical properties in primary cultured cells. Acta. Med. Okayama. 32 (1): 11-22. 1978.

63.- Morgan, E.T., Devine, M. and Skett, P.: Changes in the rat hepatic mixed function oxidase system associated with chronic ethanol vapor inhalation. Biochem. Pharmacol. 38: 595-608. 1981.

64.- Myerson, R. M.: Effect of alcohol on cardiac and muscular function. In Biological Basis of Alcoholism. John Wiley and Sons Inc. New York., pp 183-208. 1971.

65.- Nakamura, T., Nagao, M. and Ichihara, A.: In vitro Induction of Terminal Differentiation of Neonatal Rat Hepatocytes by Direct Contact with Adult Rat Hepatocytes. Exp. Cell. Res. 169: 1-14. 1987.

66.- Neumeier, R. R., Reutter, W.: Hepatocyte adhesion on plastic, Exp. Cell. Res. 160: 287-296. 1986.

67.- Nomura, F. and Lieber, C.S.: Binding of Acetaldehyde to rat liver microsomes: enhancement after chronic alcohol consumption. Biochem Biophys Res. Commun. 75: 1059. 1979.

68.- Null, S. and Null, S.: Alcohol y nutrición. 1a. edición. Edit Lidium. Buenos Aires, Argentina. 1976.

69.- Onishi, K. and Lieber, C. S.: Reconstitution of the microsomal ethanol oxidizing system (MEOS). A qualitative changes of cytochrome P450. after chronic ethanol consumption. J. Biol. Chem. 257: 7124-7131. 1977.

70.- Pantheghini, M., Falsetti, F., Chiari, E.: Determination of aspartate aminotransferase isoenzymes in hepatic disease-preliminary findings. Clinica Chim. Acta. 128:133-140. 1983.

71.- Parker, C. R.: Methods of tissue culture. Third Edition. Edited by Paul B. Hoebner, Inc., New York, U.S.A. 1984.

72.- Patek, A. J. and Post, J.: Treatment of cirrhosis of the liver by a nutritious diets and supplement rich in vitamin B complex. J. Clin Invest. 20: 481. 1941.

73.- Plaa, G. L.: Responses of the liver In: Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Sciences of Poisons. Third edition New York U.S.A. 1986.

74.- Porta, E. A., Bergman, B. J.: Acute alcoholic hepatitis. Am J. Pathol. 46: 657-689. 1965.

75.- Rappaport, A. M.: Toxic injury of the liver. Part A: Physioanatomical basis of Toxic Liver Injury. Edited by Emmanuel Farber, Marcel Dekker, Inc. New York, U.S.A. pp 2-14. 1979.

76.- Richie, J. M.: The Pharmacological basis of Therapeutic (L. S. Goodman and Gillman editors). Mac Millan Publishing Co. New York., U. S.A. 120 p. 1978.

77.- Rimon, G. and Hanski, E.: Mode of coupling between hormone receptors and adenylate cyclase elucidated by modulation of membrane fluidity, *Nature (London)*. 276: 394-396. 1978.

78.- Robblins, S. L., Cottran, R. S.: *Patología Estructural y funcional*. 8a. ed. Edit. Interamericana. Méx. D. F., 1985.

79.- Rollason, J. G. and Pincherle, G.: Serum Gamma glutamyl transpeptidase in relation to alcohol consumption *Clin Chim Acta*. 39: 75-80. 1972.

80.- Rosa, J. and Kubin, E.: Effect of ethanol on amino acid uptake by rat liver cells. *Lab Inves*. 43: 366-372. 1980.

81.- Rottenberg, H. and Robertson, D. E.: The effect of ethanol the temperatura dependence of respiration and ATPase activities of rat liver mitochondria. *Lab. Invest*. 42: 318-326. 1980.

82.- Rubin, E. and Lieber, C. S.: Hepatic Microsomal Exposition man and rat. Induction and Inhibition by Ethanol. *Sci*. 162: 690-691. 1968.

83.- Rubin, E. and Lieber, C. S.: Fatty Liver, Alcoholic Hepatitis and cirrhosis produced by alcohol in primates. *N. Engl. J. Med.*, 290: 128-135, 1974.

84.- Rubin, E. and Rottanberg, H.: Ethanol induced injury and adaptation in biological membranes. *Fed Proc*. 41: 2465-2471. 1982.

85.- Sattler, C. A., Michalopoulos, G., Sattler, G. L.,

Pitot, H. C.: Ultrastructure of adult rat hepatocytes cultured on floating Collagen membranes. *Cancer Res.* 38:1539-1549, 1978.

86.- Salaspuro, M.: Use of Enzymes for the Diagnosis of Alcohol-Related Organ Damage. *Enzyme*, 37: 87-107, 1987.

87.- Schmidt, E., Schmidt, F. W.: Enzyme diagnosis in disease of the liver and biliary system in Schmidt. Schmidt. Trautsohld. Friedel. *Adv. Clin. Enzymol.*, Vol., I pp 239-292, 1979.

88.- Seitz, H.K. and Bosche, J.: Microsomal ethanol oxidation in the colonie mucosa of the rat. Effect of chronic ethanol ingestion. *Naunyn-Schemiedebergs. Arch. Pharmacol.* 320: 81, 1982.

89.- Seitz, H. K. and Garro, A. J.: Enhance pulmonary and intestinal activation of procarcinogens and mutagen after chronic ethanol consumption in the rat. *Eur J. Clin. Invest.* 11: 33, 1981.

90.- Sharma, R. M. and Cameron, R. G.: Multiplicity of induction patterns of rat microsomal mono-oxygenases and others polipeptides produced by administration of varibus xenobiotics. *Biochem J.* 182: 317-327, 1979.

91.- Sinesky, M.: Homeoviscous adaptation-A Homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in E. cole. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71: 522-525, 1974.

92.- Singer, S. J. and Nicholson, G.L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membrane. *Sci.* 175. 720-731, 1978.

93.- Sipes, A., Stripp, B. and Krishna, G.: enhanced hepatic microsomal activity by pretreatment of rat with acetone and isopropanol Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142: 237-240, 1973.

94.- Sorrell, M. F., Tuma, D. J.: Role of acetaldehyde in the ethanol-induced impairment of glycoprotein metabolism in rat liver slices. Gastr. 73: 137-144. 1977.

95.- Sun, G. T. and Sun, A. Y.: Ethanol and membrane lipids. Alcoholism Clin Exp. Res. 9: 164-180. 1985.

96.- Tabakoff, B., Hoffman, P.L. and Liljequist, S.: Effects of Ethanol on the Activity of Brain Enzymes. Enzymes. Enzyme. 37: 70-86. 1987.

97.- Teschke, R., Hasumara, Y. and Lieber, C. S. Hepatic Microsomal alcohol-oxidizing system. Affinity for methanol, propanol and butanol. J. Biol. Chem. 250:7397-7404, 1975.

98.- Teschke, R., Hasumara, Y. and Lieber, C. S.: Hepatic Microsomal Oxidizing System (MEOS): Metabolic Aspects and clinical Implications. Alcoholism Clin Exp. Res. 10 (6): 20-32, 1986.

99.- Thayer, W.S. and Rubin, E.: Effect of chronic ethanol intoxication on oxidative phosphorylation in rat liver submitochondrial particles. J. Biol. Chem. 254: 7717-7723, 1979.

100.- Thayer, W. S. and Rubin, E.: Molecular alteration in the respiratory chain of rat liver after ethanol chronic consumption. J. Biol. Chem. 256: 6090-6097, 1981.

101.- Veech, R.L., Felber, M. E., Laksmanan, M. R. and Huang, M. T.: Control of a secondary pathway of ethanol metabolism by differenced in redox state: A study of the failure to arrest the Krebs cycle for drunkenness. *Curr Top Cell Regul.* 18:151-179, 1981.

102.- Walgren, H.: Effect of Ethanol on intracellular respiration on acerebral function. *iology of Alcoholism. Vol I. Biochemistry* (Kissin B. and Begleiter, H. eds.). Phenum Press., N. Y., U.S.A. pp. 103-125, 1971.

103.- Wibel, E., Staubli, W., Gnay, G. R. and Hess F. A.: Correlated morphometric and biochemical studies of the Liver, Cell: I Morphometric model streereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. *J. Cell Biol.* 42:68-91, 1969.

104.- Weiss, L. and Roy O.G.: *Histology.* fourth edition cGraw-Hill. U.S.A. 1977.

105.- Wroblewski, F: Clinical significance of transaminase activities of serum and other body fluids. *Adv. Clin Chem.* 1:313, 1958.