

2
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO COMPARATIVO DE DIFERENTES TECNICAS
DE AISLAMIENTO Y CULTIVO DE HEPATOCITOS Y
SU OPTIMIZACION.

T E S I S P R O F E S I O N A L
para obtener el título de
B I O L O G O
p r e s e n t a
FRANCISCO MIGUEL ACOSTA VAZQUEZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

INDICE

I. RESUMEN.	1
II. INTRODUCCION.	3
1. CARACTERISTICAS DEL HIGADO.	3
2. FUNCIONES DEL HIGADO.	4
A) Metabolismo de la glucosa.	6
B) Metabolismo de los lípidos.	6
C) Desintoxicación y otras funciones.	7
3. CELULAS DEL HIGADO.	7
A) Células parenquimatosas.	8
B) Células sinusoidales.	9
a) Células endoteliales.	9
b) Células de Kupffer.	10
C) Células de Ito.	11
D) Células Pit.	13
4. COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR DEL HIGADO.	13
A) Colágenas.	13
B) Proteoglicanos.	15
C) Glicoproteínas.	15
5. CIRROSIS HEPATICA.	16
III. ANTECEDENTES.	18
1. AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS.	19
2. CULTIVO DE HEPATOCITOS.	21
IV. OBJETIVOS.	24

V. MATERIALES Y METODOS.	25
1. METODO I.	25
2. METODO II.	26
3. METODO III.	29
4. METODO III (CULTIVO DE HEPATOCITOS).	31
5. OPTIMIZACION DE LAS TECNICAS DE AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS.	33
6. PRUEBAS DE ADHESION CELULAR.	35
7. DURACION EN CULTIVO.	36
VI. RESULTADOS	37
VII. DISCUSION	54
VIII. CONCLUSIONES	61
IX. BIBLIOGRAFIA	62

I. RESUMEN

Los hepatocitos son las células que se encuentran en mayor proporción en el hígado, constituyen del 60 al 65 % del número total de células del órgano, debido a que su tamaño es relativamente grande, ocupan el 80 % del volumen total y son los encargados de llevar a cabo la mayor parte de las funciones de este órgano. Estas células se encuentran firmemente unidas entre sí a través de uniones específicas, así como por un tejido conjuntivo muy compacto por lo que su aislamiento y cultivo por largos periodos ha presentado dificultades especiales. En este trabajo se realizó un estudio comparativo entre diferentes métodos de aislamiento de hepatocitos y se desarrolló una técnica combinada.

Para establecer esta técnica se midió el efecto de diferentes soluciones de perfusión y de disgregación sobre la viabilidad celular. Dichas soluciones fueron: a) solución de Krebs-Ringer (K-R) para limpiar solución K-R con colagenasa para perfundir y solución K-R con albúmina o sin ella para disgregar, b) solución Tris-Dextrosa (T-D) para limpiar, solución T-D con colagenasa para perfundir y medio de cultivo modificado de Dulbecco (DMEM) para disgregar ya sea con albúmina o sin ella.

Con los hepatocitos obtenidos mediante la técnica combinada se establecieron cultivos celulares en los que se probaron 4 sustratos diferentes: a) plástico de la caja de cultivo, b) geles hidratados de colágena y c) inmersos en matrices hidratadas de colágena y se evaluó el tiempo en el que las células permanecieron adheridas al sustrato y morfológicamente en buen estado. Estos ensayos mostraron que el mejor sustrato de adhesión

para mantener los cultivos por largos periodos fue la colágena seca, en donde los cultivos duraron en buenas condiciones hasta 15 días. Además, se realizaron pruebas de adhesión celular para evaluar los siguientes parámetros: a) diferentes densidades de siembra en presencia o ausencia de 7 % de suero, b) Diferentes concentraciones de colágena como sustrato c) diferentes tiempos de adhesión en presencia o ausencia de suero y d) concentración de suero en el medio.

En las pruebas de adhesión celular se observó que la colágena seca, a concentraciones iguales o mayores de 476 ng/cm², fue mejor sustrato de adhesión que el plástico de la caja de cultivo, también se observó, que el suero a concentraciones de 10 a 15 % facilitó la adhesión y que el mejor tiempo de adhesión fue de 2 horas.

El método combinado que consistió en la utilización de solución T-D para limpiar, solución T-D con colagenasa (1mg/ml) para perfundir y medio de cultivo DMEM sin albúmina para disgregar demostró ser el mejor de los métodos evaluados, ya que los resultados obtenidos en la evaluación de los parámetros antes mencionados: adhesión, viabilidad y duración del cultivo fueron superiores y más constantes que los obtenidos con los otros métodos.

11. INTRODUCCION.

1. CARACTERISTICAS DEL HIGADO

El hígado es la glándula mayor del cuerpo humano y llega a constituir hasta un 5% del peso total en niños y un 2.8 % en adultos, en los que pesa aproximadamente 1.5 Kg. Por regla general su tamaño es mayor en los animales carnívoros, intermedio en omnívoros y menor en herbívoros (Glawman et al, 1983). Está formado por dos lóbulos principales, de los cuales el derecho es de mayor tamaño y por dos lóbulos secundarios (Leeson et al, 1987). Está cubierto por una delgada cápsula de tejido conjuntivo que penetra en la glándula y la divide en lóbulos y lobulillos, dicha cápsula se denomina cápsula de Glisson (Leeson et al, 1987).

La unidad estructural del hígado, llamada lobulillo hepático, está formada por el parénquima hepático, unas ramas de la vena porta, una rama de la arteria hepática, conductos biliares y uno o más vasos linfáticos incluidos en el tejido conjuntivo. A diferencia de las demás glándulas exócrinas compuestas, los lobulillos del hígado en los humanos carecen de tabiques o divisiones interlobulillares al igual que el riñón. Sin embargo, tales divisiones sí se encuentran en los lobulillos hepáticos de cerdos y otros animales (Ham y Cormack, 1983). Cuando se observa al microscopio el lobulillo hepático presenta una forma hexagonal en cualquiera que sea la dirección del tejido para realizar el corte histológico, de lo que se deduce que es tridimensionalmente polihédrico (Wheater et al, 1988).

El hígado recibe la sangre a través de la vena porta, de la cual un 75% es venosa y rica en azúcares y aminoácidos, pero pobre en oxígeno, el cual llega al hígado en forma de sangre arterial a través de la arteria hepática que representa un 25% del total (Wheater et al, 1988).

El hígado está formado por estroma y parénquima, el estroma está constituido por tejido conjuntivo, células de la pared de los vasos sanguíneos, epitelio de los ductos biliares y nervios. El parénquima consta de hepatocitos, células de Kupffer, células de Ito, células Pit y células endoteliales (Glawman, et al, 1988). Los hepatocitos forman filas de una sola célula de espesor, una parte de ellos colinda con un conductillo biliar y la otra lo hace con un sinusoides (Fig. 1). Estos sinusoides están alineados por filamentos discontinuos de células y desembocan en la vena central de los lobulillos hepáticos. Los hepatocitos y las células de recubrimiento de los sinusoides son soportados por fibras de reticulina, las cuales se extienden alrededor de la vena central de cada lóbulo (Wheater et al, 1988).

2. FUNCIONES DEL HIGADO.

Los procesos metabólicos que desempeña el hígado son esenciales para proveer de energéticos al cerebro, músculo y otros órganos corporales. Las vías metabólicas principales del hígado son: el ciclo de Krebs, que utiliza la acetil coenzima A como fuente de carbono. También se llevan a cabo diferentes procesos metabólicos, tales como la gluconeogénesis, transaminación, desaminación y lipogénesis. Algunos de estos procesos se llevan a cabo en casi todos los tejidos, pero el tejido hepático es el único en donde ocurren todos ellos con importancia extrema. Las

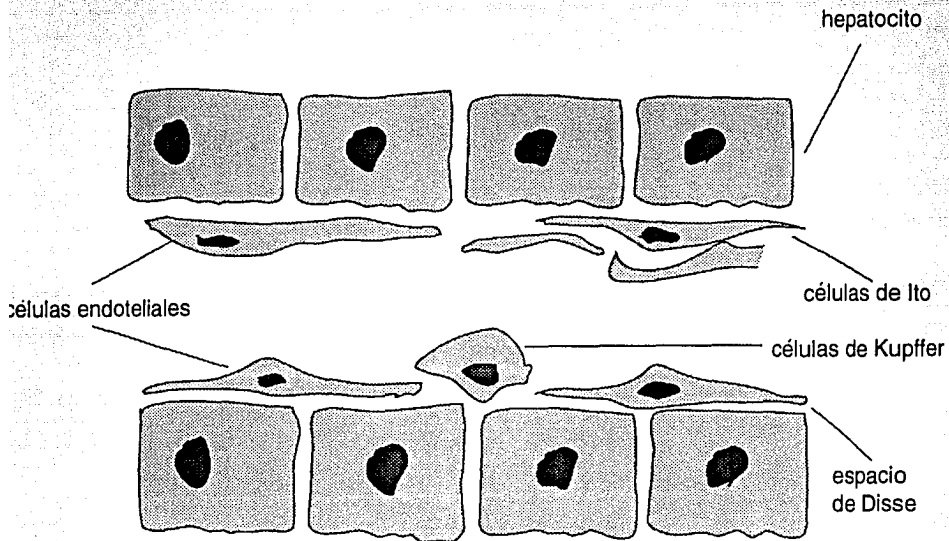


Figura 1. Diagrama de los principales tipos celulares residentes en el hígado. Tomado de Decker, 1990.

principales funciones que desempeña el hígado se pueden agrupar en las siguientes:

- A) Metabolismo de la glucosa.
- B) Metabolismo de los lípidos
- C) Desintoxicación y otras funciones

A) Metabolismo de la glucosa.

La glucosa y los aminoácidos llegan al hígado a través de la vena porta junto con otros elementos hidrosolubles. El hígado regula la concentración de glucosa en sangre, para lo cual la glucosa es transformada en glucógeno por medio de la ruta metabólica llamada glucogénesis. De esta manera puede ser almacenada en el hígado donde, llega a constituir hasta un 6 % del volumen del órgano y guardar hasta 400 Kcal (Stryer, 1988). El glucógeno hepático sirve como una fuente de glucosa sanguínea que se va utilizando entre comidas, para restituir y mantener la concentración de glucosa en sangre por medio de la glucogenólisis. Después de 12 a 18 horas de ayuno, el hígado agota prácticamente su reserva de glucógeno, por lo que también puede formar glucosa a partir de metabolitos no carbohidratos como el lactato, el glicerol y los aminoácidos, por medio del proceso de gluconeogénesis. Estos procesos se regulan por hormonas de las que intervienen principalmente la insulina y el glucagon (Murray et al, 1992).

B) Metabolismo de los lípidos.

El hígado secreta la bilis que facilita la absorción y digestión de los lípidos; además, cuando el aporte de energéticos

es abundante, este órgano sintetiza ácidos grasos, los esterifica y los secreta hacia la sangre en forma de lipoproteínas de muy baja densidad, las cuales se encargan de transportar el triacilglicerol del hígado a tejidos extrahepáticos (Mendoza et al, 1988a). El hígado tiene sistemas enzimáticos para formar y oxidar triacilglicérol, fosfolípidos y colesterol. Además, participa en transformaciones metabólicas de las lipoproteínas del plasma, en el catabolismo de lipoproteínas de baja y de alta densidad y quilomicrones remanentes, de manera que desempeña una parte integral en el metabolismo de las lipoproteínas plasmáticas (Murray et al, 1992).

C) Desintoxicación y otras funciones.

En el hígado se lleva a cabo la síntesis de proteínas especializadas tales como fibrinógeno, albúmina, protrombina y transferrina, también la desintoxicación y eliminación de materias extrañas como bacterias, fármacos y otras sustancias nocivas. Así mismo, se efectúa la conjugación de bilirrubina con el ácido glucurónico y la secreción de la bilis necesaria para la digestión de grasas y la absorción de nutrientes, además de la excreción de sustancias insolubles en agua tales como el colesterol y la bilirrubina (Murray et al, 1992).

El volumen de bilis que se secreta diariamente oscila entre 250 y 1 100 ml los cuales se almacenan en la vesícula biliar y se secretan hacia el duodeno. El hígado funciona también como almacén de vitaminas y minerales (Murray et al, 1992).

3. CELULAS DEL HIGADO

Los componentes celulares del hígado se pueden dividir en tres

categorías: A) Células parenquimatosas B) Células sinusoidales y C) Una fracción menor de otros tipos celulares (Phillips et al, 1987).

A) Células parenquimatosas.

Son llamadas también hepatocitos y constituyen una población homogénea de células de origen endodérmico que representa del 60% al 65% del total de células del hígado; son células relativamente grandes ya que su diámetro es de 10 a 30 μm , por ello ocupan cerca del 80% del volumen del órgano (Phillips et al, 1987). Su forma es polihédrica con una apariencia citoplasmática que varía de acuerdo con el estado de nutrición del individuo. En organismos bien nutridos estas células son las encargadas de almacenar glucógeno y de sintetizar lípidos; su núcleo es generalmente grande, más de la mitad de los hepatocitos son tetraploides y algunos llegan a tener hasta 8 veces el juego normal cromosómico, un 25% de ellos son binucleados (Wheater et al, 1986). Los hepatocitos poseen numerosas mitocondrias, cada célula contiene 1000 o más de ellas; los polirribosomas son también abundantes, se encuentran libres y unidos a la membrana, poseen complejo de Golgi, retículo endoplásmico liso y rugoso, contienen lisosomas de todos tipos, muchos de los cuales se encuentran cercanos a la membrana celular en la vecindad de los conductillos biliares. También presentan microcuerpos, los cuales poseen un núcleo cristalino, característica que es dada por la uricasa, enzima que interviene en el metabolismo del ácido urico. La membrana del hepatocito se puede dividir en tres regiones: a) La que se encuentra en contacto con el espacio de Disse, la cual

posee muchas microvellosidades que le permiten incrementar la superficie de absorción. b) Las superficies laterales, que en la mayoría de las especies presentan prolongaciones e indentaciones que facilitan el contacto con los hepatocitos vecinos. y c) Zonas en contacto con los conductillos biliares, que son zonas de secreción, principalmente de bilis (Ham y Cormack, 1983).

Los hepatocitos llevan a cabo la mayor parte de las funciones del hígado, de manera que reaccionan a las hormonas insulina e hidrocortisona sintetizando glucógeno. Sintetizan albúmina, fibrinógeno y casi todas las globulinas del plasma y muchas otras proteínas que participan en la coagulación de la sangre. Son también los encargados de controlar el nivel de los lípidos en la sangre (Ham y Cormack, 1983).

B) Células sinusoidales.

Hasta la fecha se han identificado 4 tipos de células en los sinusoides hepáticos, donde cada uno de estos tipos celulares tiene sus características propias, así como una morfología, función y dinámica de población particulares. Los cuatro tipos son: a) Células endoteliales, b) Células de Kupffer, c) Células de Ito y d) Células Pit (Wisse et al, 1989):

a) Células endoteliales.

Las células endoteliales del hígado son diferentes a los demás tipos de células endoteliales presentes en otros tejidos y órganos, ya que el endotelio sinusoidal difiere en morfología del endotelio de los vasos sanguíneos. Mientras que el endotelio de la mayoría de los tejidos se encuentra sobre una membrana basal,

en los sinusoides del hígado se encuentra una membrana fenestrada (Irving et al, 1984, Wisse et al, 1989). Estas células filtran los fluidos que se intercambian entre el lumen sinusoidal y el espacio de Disse. Solo permiten el paso de partículas menores de 0.1 μm , a través del recubrimiento fenestrado, lo cual se confirma por la presencia de quilomicrones y sus remanentes, los cuales pueden penetrar al espacio de Disse de acuerdo con su diámetro. Se ha determinado en preparaciones histológicas para microscopía electrónica que el endotelio fenestrado mide de 150 a 175 nm. La porosidad limitada de las células endoteliales constituye una barrera de protección para los hepatocitos. Estas células tienen mecanismos especializados de endocitosis y receptores para manosa/N-acetilglucosamina y ácido N-acetilneuramínico, así como receptores de "recolección" (scavenger). Un gran número de sustancias son incorporadas específicamente por estas células, entre las que se encuentran transferrina, ceruloplasmina, transcobalamina II, glicosaminoglicanos, lipoproteínas de alta y baja densidad, albumina sérica tratada con formaldehído, lipasa de hígado, ácido hialurónico, condroitín sulfato, hidrolasas lisosomales, invertasa, amilasa A, ovoalbúmina, etc. (Wisse et al, 1989).

b) Células de Kupffer.

Estas células son los macrófagos residentes en el hígado, se originan en la médula ósea pero también se establecen y propagan en el hígado. Comparten con los macrófagos las siguientes características: a) presentan antígenos, b) tienen la capacidad de fagocitar, c) presentan respuesta inmune inespecífica

(inmunomodulación) y d) acción citotóxica. En el hígado de la rata llegan a constituir el 15 % del total de células, pero debido al gran tamaño de las células parenquimatosas ocupan sólo el 3 % de la masa total del hígado (Decker, 1990). Se encuentran anclados en la pared endotelial de los sinusoides (Fig. 1) y abundan principalmente en el área periportal que está próxima a la vena central. Dicha ubicación hace que las células de Kupffer, sean las células sinusoidales del hígado, más expuestas a sustancias extrañas (Decker, 1990). Su forma es generalmente estrellada, aunque muestran perfiles irregulares, poseen gran cantidad de vesículas intracitoplasmáticas, vacuolas y cuerpos densos. Se diferencian de los monocitos en que estas células se tiñen con peroxidasa, la reacción se localiza sobre su membrana plasmática, retículo endoplásmico rugoso y envoltura nuclear (Wisse et al, 1989). Estas células funcionan como un receptáculo de desechos entre los que se encuentran: células viejas de la sangre, desechos celulares, parásitos, bacterias y productos de degradación de la fibrina (Wisse et al, 1989).

Las células de Kupffer producen dos grupos de sustancias lipídicas; estas son los eucosanoides (derivados del ácido araquidónico) y los factores activadores de plaquetas (PAF). Aunque también secretan lipoproteínas y lipoproteín lipasas (Decker, 1990).

c) Células de Ito.

Las células de Ito se encuentran en el espacio de Disse y son tan abundantes como las células de Kupffer (Friedman et al, 1985). Una de sus funciones es el almacenamiento y metabolismo de

la vitamina A. Su forma es fibroblastoide, con prolongaciones citoplasmáticas debajo del recubrimiento endotelial, poseen mitocondrias redondas uniformemente distribuidas y retículo endoplásmico abundante, con cisternas y dilataciones, el complejo de Golgi contiene muchas vacuolas (Mendoza et al, 1988b). Cuando se mantienen en cultivo, las células pueden ser redondas o estrelladas con un diámetro aproximado de 14.4 μm ; además, presentan una gran movilidad y cambian constantemente de forma redonda a estrellada y viceversa (Mendoza et al, 1988b). Los procesos citoplasmáticos muestran con la ayuda de métodos inmunocitoquímicos la presencia de filamentos del citoesqueleto que son visibles con la reacción positiva a desmina y además carecen de actividad de peroxidasa (Wisse et al, 1989). Su capacidad biosintética incluye a las colagenas tipo I, III, IV y laminina, aunque la colágena tipo I es la que sintetizan en mayor proporción (Weiner et al, 1989). La relación de síntesis de proteínas colagénicas y no colagénicas es de 20 a 30 veces mayor para estas células que para los hepatocitos y aproximadamente tres veces más que la determinada para las células endoteliales (Friedman et al, 1985). En presencia de tetracloruro de carbono CCl_4 , o en los casos de fibrosis experimental, estas células elevan su producción de colágena y proliferan rápidamente, lo mismo sucede cuando se exponen a factores secretados por células de Kupffer activadas. Las células de Ito emiten prolongaciones que rodean a los sinusoides, por lo que se cree que actúan como un esfínter y pudieran desempeñar un papel decisivo en la regulación del flujo sanguíneo del hígado (Wisse et al, 1989).

d) Células Pit.

Las células Pit se encuentran embebidas en el recubrimiento endotelial del hígado, sus organelos se encuentran adyacentes al núcleo, lo que les genera una polaridad morfológica. Poseen pequeños gránulos parecidos a los encontrados en las células endócrinas. Tienen la capacidad de eliminar células tumorales y posiblemente células infectadas con virus. Las células Pit con actividad NK (natural killers, asesinas naturales) pueden caracterizarse como linfocitos grandes y granulares en preparaciones hematológicas teñidas con Giemsa (Wisse et al, 1989).

4. COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR DEL HIGADO.

La matriz extracelular había sido considerada como un componente inerte de los tejidos, cuya función era solamente la de un soporte estructural. Sin embargo, en los últimos años se ha descubierto que participa activamente en el metabolismo tisular y es capaz de transmitir información a las células. Además, juega un papel importante en los procesos de unión celular, diferenciación y filtración (Martínez, 1984).

Los componentes de la matriz extracelular se pueden dividir en tres grupos de macromoléculas: a) Colágenas, b) proteoglicanos y c) glicoproteínas (Biagini y Ballardini, 1989).

A) Las colágenas

Las colágenas comprenden una familia de proteínas con al menos 14 tipos genéticamente diferentes, las cuales tienen varias

características comunes, como son: cada molécula tiene uno o más dominios de triple hélice y presentan una secuencia de aminoácidos repetida que se expresa como (Gli-X-Y),, donde la posición X es ocupada frecuentemente por prolina y la posición Y por hidroxiprolina de manera que la glicina es un tercio del total de los aminoácidos presentes, mientras que la prolina e hidroxiprolina constituyen aproximadamente el 25 % de la proteína (Martín y Kleinman, 1985, Kröttsch, 1992). Las colágenas están compuestas por tres cadenas polipeptídicas denominadas cadenas α , dichas cadenas están unidas entre sí por puentes de hidrógeno intercadena formando una estructura de triple hélice, en la cual la glicina se ubica en el centro de la molécula (Martínez, 1984, Kröttsch, 1992). La alta proporción de iminoácidos (prolina e hidroxiprolina) da como consecuencia una considerable rigidez en la molécula (Kröttsch, 1992).

Los tipos de colágena identificados en el hígado comprenden los tipos I, III, IV, V y VI y constituyen aproximadamente el 4% del total de proteínas del órgano. En el hígado normal las colágenas tipo I y III son las más abundantes y cada una constituye el 33 % del total de colágena del órgano, mientras que el 33 % restante corresponde a las colágenas de membrana basal (Biagini y Ballardini, 1989). La distribución de colágenas tipo I, III y VI es similar y se encuentran principalmente en los tractos portales y en el espacio de Disse (Voss et al, 1980). La colágena tipo I es el principal componente de la cápsula de Glisson y se localiza también en el estroma de los espacios portales y como recubrimiento de las venas centrales al igual que la colágena tipo III, la cual es más abundante que la tipo I en

los espacios de Disse (Martínez, 1985). La colágena tipo IV se encuentra en todas las membranas basales: vascular, ductal y neural. Además, se localiza en las regiones lobulares a lo largo del espacio de Disse formando un filamento continuo (Martínez, 1984). La colágena tipo V al igual que la colágena tipo IV se encuentra en membranas basales, estructuras portales y a lo largo de los sinusoides (Bianchi et al, 1984).

B) Los proteoglicanos

Los proteoglicanos son la segunda clase más importante de componentes de la matriz extracelular (Martín y Kleinman, 1985). Estas moléculas juegan un papel fundamental en la regulación de la proliferación y organización del tejido hepático, están compuestos por un núcleo de proteína unido a carbohidratos aminados denominados glicosaminoglicanos. En el hígado normal el principal proteoglicano es el heparán sulfato, seguido, por condroitín y dermatán sulfato (Biagini y Ballardini, 1989). Se ha sugerido que el heparán sulfato desempeña una actividad de filtración en las membranas basales. Se encuentra anclado en la superficie celular de los hepatocitos e interactúa con la fibronectina y la laminina (Martín y Kleinman, 1985).

C) Las glicoproteínas

Las principales glicoproteínas que se han identificado en el hígado son la laminina y la fibronectina. La laminina es una glicoproteína compuesta por tres cadenas polipeptídicas glicosiladas, una cadena A de 440 kD, una cadena B₁ de 200 kD y una cadena B₂ de 220 kD. Desempeña un papel importante en la

morfogénesis del hígado y en la organización de sus placas durante los procesos regenerativos. Su localización dentro del hígado es en todas las membranas basales: vascular, neural y ductal, se encuentra también en áreas portales (Martínez, 1984).

La fibronectina es una de las principales glicoproteínas no colagénicas de la matriz extracelular y las membranas basales. La fibronectina se produce en el hígado y participa en la agrupación de plaquetas, reacciones de coagulación, fijación de fibrina en heridas, fagocitosis y se ha demostrado que promueve la proliferación de células y su migración (Biagini y Ballardini, 1989). Se encuentra en los vasos sanguíneos, en el estroma de las áreas portales, rodea las venas centrales, también se ha identificado como un componente constitutivo de las membranas basales de los capilares portales, pero no en las membranas basales de las arterias grandes, además se ha encontrado en el espacio de Disse formando agrupaciones irregulares de material amorfo (Martínez, 1984).

5. CIRROSIS HEPATICA.

La cirrosis hepática es una enfermedad que tiene múltiples etiologías y diferentes formas histológicas; sin embargo, todos los tipos de cirrosis presentan algunas características en común, como son: a) desorganización del parénquima debido a la infiltración de fibras de cicatrización, b) Formación de nodulos de regeneración y c) Pérdida de la relación vascular normal (Braunwald et al, 1980). En el estado cirrótico se alteran las proporciones de las proteínas de la matriz extracelular, al mismo tiempo que se incrementa su síntesis de manera que el contenido

total de colágena que normalmente es de 4 % en el hígado humano, llega a constituir hasta un 10 % de la proteína total hepática.

En los hígados cirróticos aparecen dos tipos de células sinusoidales diferentes a los anteriormente descritos, estas células son las células transicionales y los miofibroblastos. Aunque se ha reportado su existencia en hígados normales tanto de humanos como de animales (Eeva et al, 1984), es generalmente aceptado que estas células se encuentran presentes solamente en los hígados cirróticos (Greenwel et al, 1991).

Las células transicionales tienen características intermedias entre las células de Ito y los miofibroblastos, su tamaño es más pequeño que el de las células de Ito, presentan microfilamentos, cuerpos densos y vesículas pinocíticas, características que también se encuentran en las células de Ito (Greenwel et al, 1991).

Los miofibroblastos presentan características de células de músculo liso, se encuentran en el área perivenular, poseen abundantes microfilamentos con prominentes cuerpos densos, vesículas pinocíticas y están rodeados por una estructura semejante a la lámina basal (Ki et al, 1984). Tanto las células de Ito como las células transicionales y los miofibroblastos poseen la capacidad de sintetizar colágena, pero dependiendo de la localización lobular de la lesión, cada uno de esos tipos celulares podrían participar de una manera diferente en este proceso (Ki et al, 1984).

III. ANTECEDENTES

Para el estudio del metabolismo hepático "in vitro" se han desarrollado 4 tipos de sistemas experimentales los cuales son: a) hígado perfundido aislado, b) fragmentos de hígado aislados (rebanadas, cultivo de órganos) c) hepatocitos aislados en suspensión y d) hepatocitos en cultivo de monocapa.

El hígado perfundido, los fragmentos de hígado y los hepatocitos en suspensión sobreviven por muy poco tiempo fuera del cuerpo y reflejan el estado fisiológico del animal donador. Estos sistemas se utilizan para determinar diversos efectos hormonales sobre el estado nutricional del animal. En estos sistemas uno de los grandes problemas es la disminución de la actividad metabólica hepática después de 3 ó 4 horas de ser aislados. Sin embargo, este periodo es suficiente para llevar a cabo algunos experimentos "in vitro" como biosíntesis de proteínas y respuesta metabólica rápida, (Glaumann et al, 1983). Desafortunadamente en muchas áreas de investigación, tales como toxicología y carcinogénesis, se necesita mantener las células vivas y metabólicamente activas por varios días, semanas o hasta meses. Para estos estudios se han utilizado líneas celulares derivadas de hígado o de hepatomas; sin embargo, dichas células conservan muy pocas de las funciones metabólicas que son características del hígado normal (Berry et al, 1991).

La viabilidad y la capacidad de síntesis proteica de los hepatocitos en cultivo primario puede extenderse por semanas, a diferencia de los otros sistemas experimentales; Por lo que los hepatocitos en cultivo primario, permiten diseñar protocolos

para medir efectos hormonales y la respuesta de las células a diversas sustancias. En las células cultivadas todos los hepatocitos tienen igual acceso a oxígeno, nutrientes y hormonas, a diferencia de los fragmentos de hígado y al hígado perfundido, en donde muchos resultados se pueden ver afectados por problemas asociados con deficiencias en alguno de los parámetros antes mencionados (Glaumann et al, 1983).

1. AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS

En el hígado, los hepatocitos se encuentran firmemente unidos entre sí a través de uniones específicas, así como por un tejido conjuntivo muy compacto, por lo que se ha dificultado su aislamiento. La falta de éxito se debió en gran medida a una ignorancia de las propiedades de los componentes responsables de la adhesión célula-célula en el hígado. Ahora se sabe que los hepatocitos se encuentran unidos por 4 tipos de uniones intercelulares, que son: las uniones impermeables o estrechas, la unión intermedia, los desmosomas y la unión tipo comunicante.

Uno de los primeros intentos para aislar a los hepatocitos fue reportado en 1943 por Schneider y Potter, en dicho método se forzaba al hígado a pasar a través de una tela de algodón y después por una malla de seda. Las células aisladas se separaban de los restos celulares, por medio de centrifugaciones diferenciales de baja velocidad (Berry et al, 1991). Posteriormente Bucher et al (1951) aislaron hepatocitos a partir de fragmentos de hígado en un medio acuoso y agitándolos con cuentas de vidrio sobre un agitador mecánico y obtuvieron un

rendimiento del 10 % de células. Estos autores observaron que las bajas temperaturas y la inclusión de Ca^{++} en el medio de resuspensión reducía la producción de células. Posteriormente se desarrollaron otras técnicas para aislar hepatocitos en las que utilizaron agentes quelantes en el medio de dispersión, tales como el EDTA o los citratos (Berry et al, 1991). Aunque estas técnicas incrementaban el rendimiento de las células, éstas se dañaban durante el procedimiento o tratamiento, ya que mostraban cambios en su estructura fina (Berry et al, 1962). En la década de 1960 aún predominaban los métodos mecánicos para la disgregación de las células. En 1967 Howard reporta el primer aislamiento exitoso de hepatocitos, en donde obtiene hepatocitos no dañados. Este método consistió en inyectar solución salina sin Ca^{++} y con colagenasa (0.05 %) y hialuronidasa (0.1 %) a través de los sinusoides del hígado de la rata. La cantidad de células intactas obtenidas por este método fue sólo del 3 al 5 %. Posteriormente se desarrolló otra técnica que permitió una mayor viabilidad y aprovechamiento del hígado. Dicha técnica, a diferencia de las anteriores, consistía en una perfusión con enzimas proteolíticas a través de la vena portal (Berry y Friend, 1969). A principios de la década de 1970, los métodos de disgregación enzimática predominaban ya sobre los mecánicos y la perfusión del hígado con enzimas proteolíticas empezaba a ser la forma más común de disgregación de este órgano (Bissell et al, 1973, Howard et al, 1973, Tanaka et al, 1978).

Sin embargo, a estos métodos de disgregación se les han hecho una serie de variaciones para su optimización. Una de las modificaciones más importantes, fue la perfusión del hígado en

dos pasos propuesta por Seglen en 1972. A partir de entonces, el método que se utiliza frecuentemente comprende dos pasos y las modificaciones que se le han hecho incluyen variaciones en la concentración de las sustancias de cada una de las soluciones, en el sistema de amortiguadores para regular el pH, en la velocidad de flujo de las soluciones, en el tipo de enzimas proteolíticas y en su concentración. Las perfusiones se han realizado tanto "in situ" como "in vitro". También se han utilizado diferentes diseños de aparatos para llevar a cabo la perfusión (perfusores, bombas peristálticas, etc.)

2. CULTIVO DE HEPATOCITOS

Uno de los principales objetivos en los años de la década de 1960 fue el lograr el cultivo de líneas celulares del parénquima del hígado normal, meta que no ha sido lograda completamente hasta la fecha. La técnica de cultivo de hepatocitos se empezó a desarrollar a partir de 1969 cuando se diseñó un método de obtención de hepatocitos intactos con altos rendimientos (Berry y Friend, 1969). Fue en 1973 cuando Bissell reportó un método de cultivo de hepatocitos en monocapa; en dicho sistema los hepatocitos conservaban algunas actividades metabólicas después de 4 a 6 días de cultivo. Estas actividades incluían: síntesis y secreción de albumina, gluconeogénesis y respuesta a insulina y glucagon. Sin embargo, el cultivo de hepatocitos por largos períodos ha presentado dificultades especiales, por lo que se ha probado el efecto de varios factores con el fin de alargar la vida de los hepatocitos en cultivo y de mantener las actividades

metabólicas características de estas células. Entre los factores que se han adicionado al medio de cultivo se incluyen varios tipos de hormonas tales como: la insulina y dexametasona (Kuri y Mendoza, 1989), vitaminas como el ácido ascórbico (Scheffer et al, 1982), sustancias como el dimetilsulfóxido, etc. También se han utilizado diferentes tipos de medio de cultivo en presencia o en ausencia de suero de distintas fuentes. Enat et al (1984), encontró que el suero no autólogo parece ser dañino para los hepatocitos ya que inhibe la expresión de funciones específicas del hígado y es citostático para estas células.

Un factor que ha sido de gran importancia para mejorar las condiciones de los hepatocitos en cultivo ha sido el tipo de sustrato que favorezca una mejor adhesión, de manera que el cultivo primario sea confluyente, ya que los hepatocitos en cultivo no se dividen, salvo en condiciones muy especiales. Por ello se han ensayado una serie de sustratos tales como colágena aislada de tendón de cola de rata, seca o en gel hidratado, gel preparado de tumor de Engelbreth-Holm-Swarm (Strom y Michalopoulos, 1982, Ben-Ze, 1988), laminina, fibronectina, mucopolisacáridos etc. (Rojkind, M., 1980).

Los hepatocitos en cultivo de monocapa generalmente adquieren una forma polihédrica, se aplanan y mantienen una relación estrecha con los hepatocitos vecinos, con los cuales llegan a formar uniones intercelulares (Berry et al, 1991). Se ha demostrado que esta relación con los hepatocitos vecinos es muy importante para mantener las características fenotípicas diferenciadas "in vitro" al menos durante cortos periodos (Obrink, 1982). Se ha demostrado que los hepatocitos cultivados

en altas densidades sobre geles hidratados de colágena se aplanan y presentan una organización trabecular compacta, mientras que células sembradas sobre el mismo sustrato, pero a bajas densidades, no se extienden y muestran niveles elevados de síntesis de proteínas del citoesqueleto pero bajos niveles de síntesis de albúmina (Obrink, 1982).

La naturaleza del sustrato de adhesión influye grandemente en la síntesis de proteínas de los hepatocitos y favorece el que se puedan mantener vivos y con características diferenciadas; sin embargo, los cultivos no sobreviven más de 15 a 20 días cuando se siembran sobre sustratos de proteínas.

IV. OBJETIVOS

El objetivo general fue el siguiente:

Realizar un estudio comparativo entre los diferentes métodos de obtención y cultivo de hepatocitos, para desarrollar e implementar una técnica que nos permita utilizar los cultivos para realizar diferentes estudios sobre el metabolismo celular y determinar el efecto de distintos fármacos con propiedades antimicrotubular y antifibrosante.

Los objetivos particulares incluyeron los siguientes:

1) Aprender y manejar diferentes técnicas de aislamiento de hepatocitos que se llevan a cabo en distintos grupos de investigación (IFC, FM, CINVESTAV).

2) Reproducir las técnicas aprendidas y desarrollar una técnica alterna que nos permitiera el aislamiento y cultivo de hepatocitos para los fines planteados en el objetivo general.

3) Determinar la duración y las características de los cultivos primarios de hepatocitos sembrados sobre 4 sustratos diferentes: a) caja de cultivo de plástico, b) Inmersas en un gel de colágena hidratada, c) sobre un gel de colágena hidratada y d) Sobre colágena seca.

4) Determinar las mejores condiciones de adhesión de los hepatocitos sobre diferentes concentraciones de colágena, en presencia de distintas concentraciones de Suero Bovino Fetal en el medio y a varios tiempos de adhesión al sustrato.

V. MATERIALES Y METODOS.

Se realizó un estudio comparativo entre tres técnicas de aislamiento de hepatocitos, estos métodos se basan en la técnica desarrollada por Berry y Friend (1969) y consisten en lo siguiente:

1. METODO I

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar adultas, en las que se perfundió el hígado con solución salina de Krebs-Ringer (K-R) pH 7.35 que contenía: NaCl 77 mM, KCl 5 mM, KH_2PO_4 1.27 mM, MgSO_4 2.59 mM y NaHCO_3 18.76 mM.

La solución se colocó en la esfera de un perfusor (Fig. 2) el cual mantiene la temperatura de la solución a 37°C, donde se mantuvo burbujeando con CO_2 -0₂ al 5 y 95 % respectivamente, hasta que el amortiguador llegó a un pH entre 7.35 y 7.4. Se tomaron 300 ml de esta solución y se les agregaron 800 μl de CaCl_2 1.2 mM y se dejó incubando a 37°C con un burbujeo constante, 30 ml de esta solución se colocaron en el cono del perfusor también con burbujeo constante.

A continuación se procedió a perfundir el hígado, para lo cual se anestesió a la rata con cloroformo y se colocó sobre una caja de unicel, se le cortó la piel y músculo de la parte superior del abdomen hasta que se descubrió el hígado y la vena porta moviendo a las vísceras hacia el lado derecho. Se ligó la parte inferior de la vena porta para cerrar el flujo de sangre

que llega al hígado y se hizo a continuación una pequeña incisión a la vena porta y se introdujo una cánula por la que se hizo pasar la solución K-R que se encontraba en la esfera del perfusor (Fig. 2) y se seccionó la vena cava superior para permitir la salida del líquido, se retiró el hígado de la rata y se colocó en el embudo del perfusor, el cual había sido cubierto con papel autoadherible. Una vez que el hígado se limpió de sangre, se cerró el flujo de la solución K-R al mismo tiempo que se abrió el flujo del amortiguador con CaCl_2 al cual se le agregaron 15 mg de colagenasa tipo IV marca Worthington (179 U/mg) La solución de colagenasa se recirculó a través del hígado por medio de una bomba peristáltica hasta que éste adquirió una textura pastosa; en este punto se detuvo el flujo de colagenasa y se colocó al hígado sobre una caja de petri con solución K-R, donde fue disgregado mediante un tubo de plástico. Posteriormente se filtró la suspensión a través de una malla de seda y el filtrado se centrifugó a 800 rpm durante un minuto en una centrífuga clínica marca IS; se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en solución K-R con CaCl_2 . La centrifugación se repitió dos veces más para lavar las células.

2. METODO II

Para la obtención de los hepatocitos se utilizaron ratas de la cepa Wistar de 180 a 200 g de peso. La rata se anestesió con éter, se colocó sobre una charola de disección y se le hizo un corte en el abdomen hasta descubrir totalmente la cavidad abdominal; se expuso la vena porta moviendo las vísceras hacia el

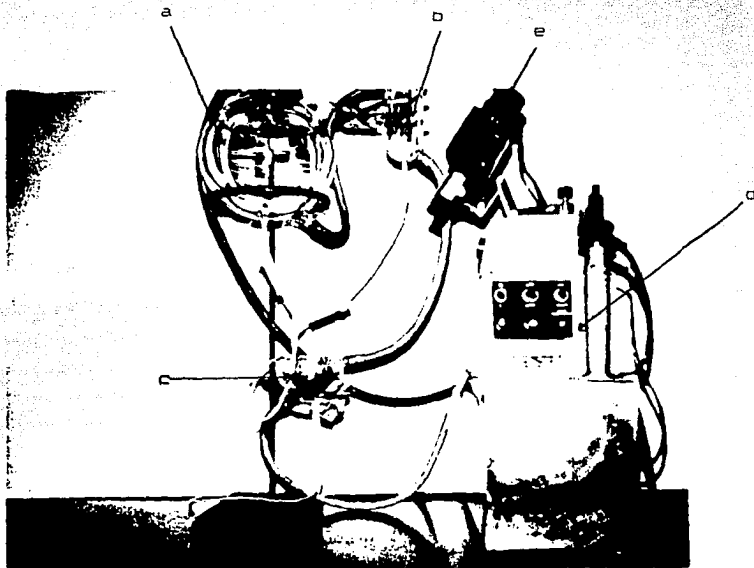


Figura 2. Aparato utilizado para la perfusión del hígado de las ratas en los métodos I, II y en el método desarrollado por nosotros.

- a) Esfera del perfusor.
- b) Cono del perfusor.
- c) Embudo del perfusor.
- d) Recirculador de agua a temperatura constante.
- e) Lámpara.

lado derecho, sacándolas de la cavidad abdominal. Se ligó la vena porta con un hilo para cerrar el flujo de sangre que llega al hígado por esta vía, se hizo una incisión en la vena porta y se introdujo por ella la cánula del perfusor, la cual se ató con otro hilo de manera que ésta permaneciera dentro de la vena.

Para la perfusión del hígado se utilizó la solución K-R, la cual se incubó en un baño maría a 38°C y se aeró con $\text{CO}_2\text{-O}_2$ al 95 y 5 % para ajustar el pH entre 7.35 a 7.40. De esta solución se tomaron 150 ml a los cuales se le agregaron 26 mg de CaCl_2 ; de esta nueva solución se tomaron 20 ml y se le agregaron 20 mg de colagenasa tipo IV marca Sigma (>125 U/mg). Por otro lado se tomaron 70 ml de la solución K-R y se le agregaron 700 mg de albúmina.

La solución K-R sin CaCl_2 fue colocada en la esfera del perfusor y se mantuvo en aereación constante a una temperatura de 37°C. La solución de K-R con CaCl_2 y colagenasa fue colocada sobre el embudo del perfusor.

A través de la cánula situada en la vena porta se hizo pasar la solución K-R, después de cortar la vena cava superior, para permitir la salida del líquido. Mientras se permitía el paso de la solución K-R a través del hígado, éste fue retirado de la rata y se le colocó sobre el embudo del perfusor, el cual había sido cubierto con papel autoadherible. Una vez colocado en este lugar, se cerró el flujo de la solución de K-R y se abrió el sistema de recirculación que contenía la solución con la colagenasa, la cual se dejó reciclar hasta que el hígado tomó una consistencia suave y se observó la aparición de pequeños canales. Posteriormente se cerró el flujo de la colagenasa y se colocó al hígado en una caja

de petri con 5 ml de solución de K-R con CaCl_2 y albúmina donde fue disgregado con un tubo de plástico. Se filtró la suspensión a través de una malla y se centrifugó a 800 rpm durante un minuto en una centrífuga clínica marca IS; se desechó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido nuevamente para ser centrifugado dos veces más en las mismas condiciones.

3. METODO III

Para la perfusión del hígado se utilizó una solución T-D que contenía: glucosa 5.5 mM, NaCl 137 mM, KCl 50 mM, Na_2HPO_4 0.4 mM, Tris-HCl 25 mM pH 7.4 y rojo de fenol al 0.01 %. El sistema que se utilizó para hacer pasar la solución a través del hígado se muestra en la figura 3 y consta de una bomba peristáltica, una aguja y una manguera.

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar machos de 200 g. La rata se anestesió con éter y se colocó sobre una charola de plástico dentro de una campana, se ataron sus extremidades de manera que el abdomen quedara descubierto y fue desinfectado con alcohol al 70 %; se cortó la piel y músculo del abdomen para luego remover las vísceras y descubrir las venas cava inferior y porta. Se colocaron dos hilos debajo de la vena porta y se ligó con el hilo más distal al hígado para detener el flujo sanguíneo. Se introdujo la aguja del sistema alimentador en la vena porta, y se sujetó dentro de la vena con el otro hilo y se seccionó la vena cava inferior para permitir la salida del líquido. Posteriormente

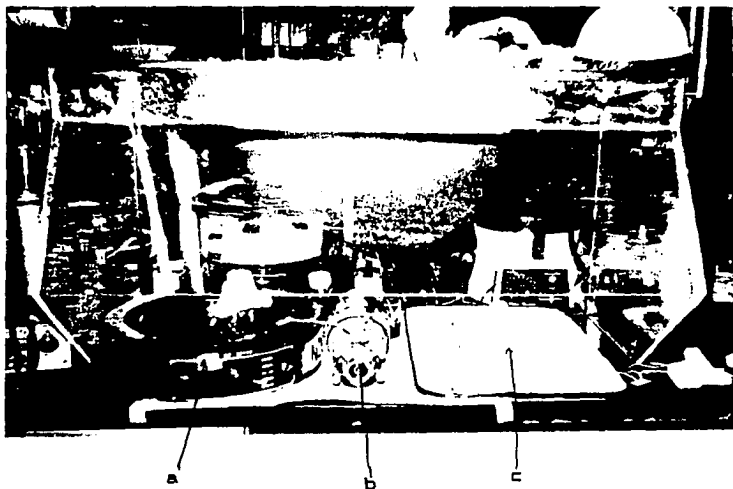


Figura 3. Sistema utilizado para la perfusión del hígado de las ratas en el método III.

- a) Baño de María.
- b) Bomba peristáltica.
- c) Charola de disección.

se hicieron pasar 50 ml de la solución T-D a 37°C y pH de 7.4 a un flujo de 9 ml/minuto. Al terminar de pasar la solución T-D se hicieron pasar 100 ml de una solución de colagenasa en T-D (0.36 mg/ml) a un flujo de 15 ml/minuto, se iluminó el hígado con una lámpara durante el proceso para proporcionarle calor y se limpió constantemente con gasa estéril.

Posteriormente se extrajo el hígado de la cavidad abdominal y se colocó en una caja de petri estéril, se le agregó medio de cultivo modificado de Dulbecco (DMEM) frío (4°C) y se le quitó la cápsula de Glisson con unas pinzas. Ya sin cápsula de Glisson el hígado se agitó en medio de cultivo DMEM frío para disgregar las células y se obtuvo una suspensión celular, la cual fue filtrada a través de una malla. La suspensión resultante se mezcló con percoll en una relación 2 a 1, se centrifugó a 800 rpm durante un minuto y se descartó el sobrenadante.

4. METODO III (CULTIVO DE HEPATOCITOS).

Las células obtenidas por el tercer método de aislamiento se sembraron a una densidad de 50 000 células/cm² en cajas de 8 cm² sobre el plástico de la caja de cultivo y sobre una monocapa alimentadora de fibroblastos de la línea 3T3 tratados con mitomicina C. El medio utilizado fue DMEM suplementado con 7 % de suero bovino fetal (SBF), d-biotina 10⁻⁷ M, insulina 5 µg/ml e hidrocortisona 10 µg/ml. Las células fueron sembradas e incubadas a 37°C en una atmósfera de CO₂-O₂ 95-5 %, después de 2 horas se les cambió el medio de cultivo por medio fresco y se mantuvieron en las mismas condiciones por periodos variables (Fig. 4).

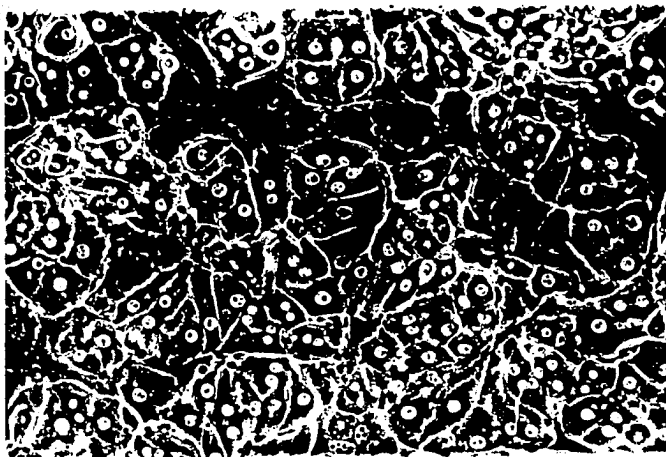


Figura 4. Hepatocitos sembrados sobre una capa alimentadora de fibroblastos de la línea 3T3 en DMEM suplementado con SBF al 7 %, d-biotina 10^{-7} M, insulina 5 $\mu\text{g/ml}$ e hidrocortisona 10 $\mu\text{g/ml}$, fotografiados a través de un microscopio de contraste de fases marca Olympus, modelo IMT, con un aumento de 20 X.

5. OPTIMIZACION DE LAS TECNICAS DE AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS.

El método que se utilizó para el aislamiento de hepatocitos originalmente fue el método II, con la diferencia de que la solución K-R no se mantuvo en aereación, por lo que se reguló el pH utilizando NaHCO_3 . Para limpiar el hígado de sangre, se utilizaron 2 soluciones: K-R y T-D. Después de lavar con K-R se disgregó a los hepatocitos con: a) K-R con albúmina y b) K-R sin albúmina. Mientras que cuando se utilizó T-D para lavar los hepatocitos se disgregaron con 5 soluciones diferentes que fueron: a) solución K-R con albúmina a 37°C, b) solución K-R sin albúmina a 37°C, c) medio de cultivo DMEM a 37°C, d) medio de cultivo DMEM con albúmina a 37°C y e) medio de cultivo DMEM con albúmina a 4°C.

Para evaluar la integridad de los hepatocitos obtenidos en los diferentes métodos, se midió viabilidad por exclusión de azul tripan; esta prueba consistió en preparar una solución de colorante al 0.04 % en la solución de K-R. Para determinar la viabilidad con azul tripan se mezclaron 100 μl de esta solución con 100 μl de la suspensión celular y se contaron las células teñidas y las no teñidas. A partir de esta determinación se calculó el porcentaje de viabilidad.

Los hepatocitos obtenidos por los métodos anteriormente descritos fueron sembrados en diferentes condiciones, se mantuvo como constante el uso del DMEM suplementado con 7 % de suero bovino fetal.

Las condiciones del cultivo variaron en cuanto a número de

células sembradas, concentración de suero en el medio de cultivo, medio normal y condicionado por fibroblastos humanos y sustrato sobre el que se sembraron las células. Los parámetros que se utilizaron para evaluar las condiciones de cultivo fueron:

- a) Adhesión celular.
- b) Duración del cultivo.

Los sustratos de adhesión que se probaron fueron los siguientes:

- a) Cajas de plástico. Las células fueron sembradas directamente sobre la caja de cultivo de 35 mm (Lux, SA).
- b) Sobre una matriz de colágena hidratada.
- c) Inmersas en una matriz de colágena hidratada.
- d) Sobre colágena seca.

La colágena que se utilizó para cubrir las cajas fue proporcionada por la empresa Aspid SA de CV y se diluyó en PBS hasta obtener la concentración deseada, de la cual se agregaron $60 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ a la caja de cultivo. Las cajas con diferentes concentraciones de colágena se dejaron irradiar durante 24 horas con radiación ultravioleta, tiempo en el cual la colágena se seca y las cajas se utilizaron inmediatamente.

El medio condicionado se obtuvo de cultivos de fibroblastos de piel humana después de 24 horas de incubación con medio DMEM que fue suplementado con 10 % de SBF y gentamicina 0.1 % (V/V).

6. PRUEBAS DE ADHESION CELULAR.

Se realizaron pruebas de adhesión celular para determinar las condiciones a las cuales se obtenía una mayor adhesión.

Los parámetros que se evaluaron en estas pruebas fueron:

- 1) Concentración de colágena.
- 2) Número celular.
- 3) Ausencia o presencia de suero y diferentes concentraciones del mismo a distintos tiempos de adhesión.

1) Se sembraron 50 000 células por cm^2 en cajas de cultivo con diferentes concentraciones de colágena como sustrato, en ausencia o presencia de 7 % de suero bovino fetal, después de 2 horas de incubación se aplicó la prueba de adhesión. Las concentraciones de colágena ensayadas fueron las siguientes: 0.48, 0.95, 2.4, 4.8, 10, 20, 30, 40, y 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

2) Se desarrollo una curva patrón donde se sembraron diferentes densidades celulares, las cuales fueron 10, 20, 30, 40 y 50 $\times 10^3$ células/ cm^2 de la caja de cultivo. Posteriormente se realizó otra curva patrón donde se sembraron nuevamente diferentes densidades celulares, las cuales fueron de 40, 80, 120, 160 y 200 $\times 10^3$ células por cm^2 de la caja de cultivo. Ambos experimentos se realizaron en ausencia y presencia de suero bovino fetal al 7 %. También se sembraron 50 000 células por cm^2 sobre un sustrato de colágena seca a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, después de 2 horas de incubación se les aplicó la prueba de adhesión.

3) Se evaluaron las concentraciones de suero de 0, 5, 7, 10 y

15 % en DMEM a los tiempos de adhesión al sustrato de 1, 2 y 3 horas. Se sembraron 50 000 células por cm^2 sobre un sustrato de colágena de $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. A los tiempos mencionados se aplicó la prueba de adhesión.

El experimento consistió en lo siguiente, después de sembradas, las células se incubaron durante el tiempo determinado, (1, 2 o 3 horas según el experimento). Posteriormente se les retiró el medio de cultivo, se lavaron con PBS y se fijaron con Karnovsky durante 15 minutos; pasado este tiempo, se les retiró el fijador y se les agregó azul de Toluidina, el cual se retiró después de 24 horas. Las células se lavaron con abundante agua destilada, se dejaron secar al aire y se extrajo el colorante de las células con duodecil sulfato de sodio (SDS) al 2 % durante 10 minutos y se midió la absorbancia a 600 nm.

7. DURACION EN CULTIVO.

Las células fueron sembradas sobre los sustratos de:

- a) Plástico de la caja de cultivo.
- b) Geles de colágena hidratada.
- c) Inmersas en un gel de colágena hidratada.
- d) Diferentes concentraciones de colágena seca.

El tiempo de duración de los cultivos se tomó desde el día en que las células fueron sembradas hasta el día en que las células se empezaban a desprender del sustrato formando grumos en suspensión.

VI. RESULTADOS

Las principales diferencias entre los métodos de aislamiento de hepatocitos se resumen en la tabla I, donde se puede ver que los métodos I y II son muy parecidos. Sus principales diferencias fueron que en el método I se utilizó cloroformo para anestesiarse a las ratas y la colagenasa fue de la compañía Worthington, mientras que en el método II fue de Sigma; Otra diferencia fue que en el método II se utilizó albumina en el medio de disgregación. También se puede observar que el método III es muy diferente a los anteriores, la solución que se utilizó en este método fue la solución T-D que contenía glucosa y era amortiguada con Tris-HCl a diferencia de la solución K-R que era amortiguada con bicarbonato y aerada constantemente con $\text{CO}_2\text{-O}_2$. La solución enzimática en el método III contenía 0.36 mg/ml a diferencia de los anteriores métodos donde la concentración de la enzima fue de 1 mg/ml. Otra diferencia fue que en el método III la solución utilizada para disgregar las células fue DMEM a 4°C y en los otros métodos fue solución K-R a 37°C . En los tres métodos se centrifugó para eliminar las células muertas de la suspensión, solo que en el método III la centrifugación se llevó a cabo en percoll.

La viabilidad obtenida en el método I fue superior al 80 % mientras que en los métodos II y III se logró una viabilidad superior al 90 %; no obstante la morfología de las células obtenidas por los distintos métodos fue muy similar (Fig. 5 y 6). Las células obtenidas por los dos primeros métodos se utilizaron inmediatamente para medir el efecto de hormonas sobre determinadas funciones de los hepatocitos y ciertas actividades enzimáticas,

TABLA I

CUADRO COMPARATIVO DE DIFERENTES TECNICAS DE AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS

METODOS	I	II	III
ANESTESIA	cloroformo	éter	éter
SOLUCION DE PERFUSION	solución K-R	solución K-R	solución T-D
SOLUCION DE PERFUSION CON ENZIMA	K-R con colagenasa 1 mg/ml	K-R con colagenasa 1 mg/ml	T-D con colagenasa 0.36 mg/ml
SOLUCION PARA DISGREGAR	K-R a 37°C	K-R con albúmina a 37°C 0.66 mg/ml	DMEM a 4°C
LIMPIEZA DE LA SUSPENSION	4 centrifugaciones diferenciales 800 rpm 1 minuto	4 centrifugaciones diferenciales 800 rpm 1 minuto	1 centrifugación en percoll
VIABILIDAD	80-90 %	> 90 %	> 90 %
UTILIDAD	Las células se utilizan recién aisladas, para medir actividad enzimática	Las células se utilizan recién aisladas para medir la acción de ionóforos sobre la permeabilidad de la membrana	Las células se utilizan para establecer cultivos, se mantienen vivas por largos periodos

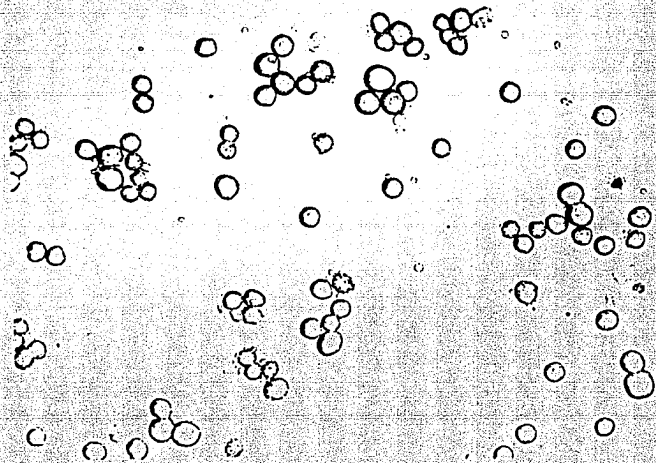


Figura 5. Suspensión de hepatocitos obtenidos con el metodo I fotografados a través de un microscopio en campo claro, marca ZEISS con un aumento de 10 X.

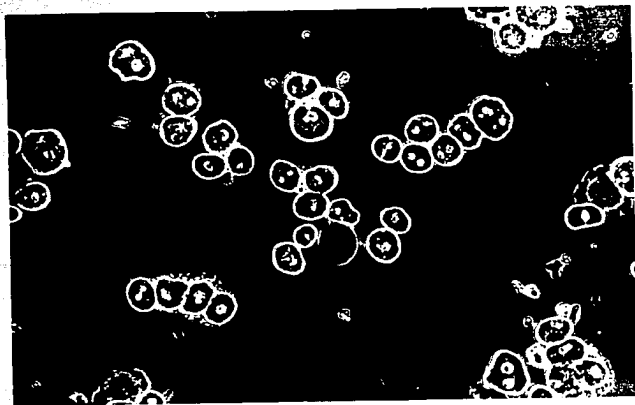


Figura 6. Suspensión de hepatocitos obtenidos con el metodo III fotografados a través de un microscopio de contraste de fases, marca Olympus, modelo IMT con un aumento de 20 X.

mientras que en el tercer método se establecieron cultivos de hepatocitos por tiempos largos para evaluar el efecto de fármacos sobre la síntesis de lípidos.

OPTIMIZACION.

Una vez aprendidos los 3 diferentes métodos, se procedió a implementar un método alternativo con las condiciones de trabajo existentes en el laboratorio.

En la figura 7 se presenta el porcentaje de viabilidad de los hepatocitos obtenidos utilizando diferentes condiciones de cultivo. En esta se puede observar que la mayor viabilidad se obtuvo cuando los hepatocitos se aislaron utilizando solución T-D para perfundir y DMEM para disgregar, ya sea con albumina o sin ella. En ambos casos la viabilidad fue del 82 %. La viabilidad más baja se obtuvo cuando se aislaron los hepatocitos utilizando solución K-R para perfundir y solución K-R con albumina para disgregar, en tal caso la viabilidad fue del 68 %.

En la tabla II se puede observar que las células sembradas sobre el plástico de la caja de cultivo se mantuvieron viables durante aproximadamente 3 días, a diferencia de las células sembradas sobre colágena seca o sobre gel de colágena hidratada, las cuales fueron viables entre 10 y 15 días. Además, las células sembradas sobre el plástico de la caja se adhirieron muy poco y su forma fue predominantemente redonda, al igual que las células sembradas sobre un gel de colágena hidratada (Figs. 8, 9 y 10).

En esta tabla también se puede observar que la densidad de células sembradas y el medio condicionado, no afectaron ni el tiempo de duración ni las características de los cultivos.

En la tabla III se puede ver que las células sembradas en

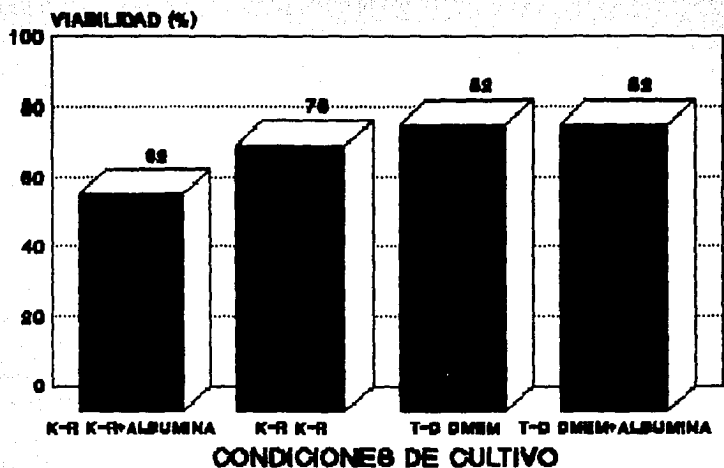


Figura 7. Viabilidad obtenida cuando se aislaron hepatocitos por medio de diferentes soluciones de perfusión y de disgregación; la concentración de colagenasa fue de 1 mg/ml en el medio de perfusión.

Barra 1: Perfusión (K-R), disgregación (K-R) + albumina

Barra 2: Perfusión (K-R), disgregación (K-R)

Barra 3: Perfusión (T-D), disgregación (DMEM)

Barra 4: perfusión (T-D), disgregación (DMEM) + albumina

TABLA II

DURACION Y CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE HEPATOCITOS SEMBRADOS SOBRE VARIOS SUSTRATOS Y A DIFERENTES DENSIDADES CELULARES.

# DE CEL/cm ²	SUSTRATO	MEDIO	DURACION EN CULTIVO	CARACTERISTICAS DEL CULTIVO
119 000	plástico	DMEM con 10 % de SBF	3 días	Pocas células adheridas, redondas
155 000	plástico	DMEM con 10 % de SBF	3 días	Pocas células adheridas, redondas
180 000	plástico	DMEM con 10 % de SBF	4 días	Pocas células adheridas, redondas
377 000	colágena seca	DMEM con 10 % de SBF	10 días	Células confluentes cuboidales
119 000	colágena seca	DMEM con 10 % de SBF	12 días	Células confluentes cuboidales
811 000	colágena seca	DMEM condicionado, 10 % SBF	15 días	Células confluentes, cuboidales
811 000	colágena seca	DMEM con 10 % de SBF	15 días	Células confluentes, cuboidales
378 000	colágena seca	DMEM condicionado, 10 % SBF	13 días	Células confluentes, cuboidales
378 000	colágena seca	DMEM con 10 % de SBF	13 días	Células confluentes, cuboidales
62 000	colágena seca	DMEM con 10 % de SBF	12 días	Células confluentes, cuboidales
62 000	gel de colágena	DMEM con 10 % de SBF	12 días	Células confluentes, cuboidales



Figura 8. Hepatocitos de dos días de cultivo sembrados sobre un gel de colágena hidratada de tendón de cola de rata, fotografiados a través de un microscopio de contraste de fases marca NIKON AFX-II A, con un aumento de 20 X.

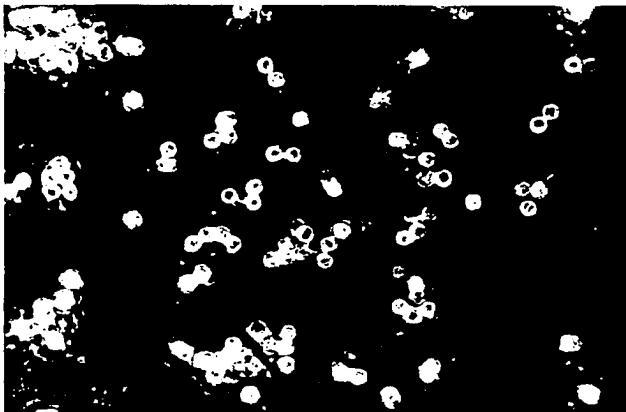


Figura 9. Hepatocitos de dos días de cultivo sembrados inmersos en una matriz de colágena hidratada de tendón de cola de rata fotografiados a través de un microscopio de contraste de fases marca NIKON AFX-II A, con un aumento de 10 X.

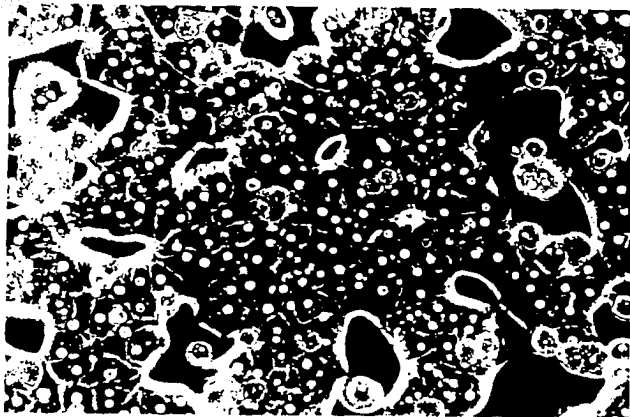


Figura 10. Hepatocitos de oos días de cultivo sembrados sobre colágena seca fotografiados a través de un microscopio de contraste de fases marca NIKON AFX-11 A, con un aumento de 10 X.

TABLA III

DURACION Y CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LOS CULTIVOS DE HEPATOCITOS SEMBRADOS SOBRE DIFERENTES SUSTRATOS DE COLAGENA.

NUMERO DE CELULAS/cm ²	SUSTRATO	DURACION (DIAS)	CARACTERISTICAS DE CULTIVO
50 000	Clg seca (a)	15	células con forma cuboidal
50 000	Clg seca (b)	13	células con forma cuboidal
50 000	Clg seca (b)	12	células con forma cuboidal
50 000	gel de Clg (c)	12	células con forma redonda
10 000 20 000 40 000	suspensión (d)	4	células con forma redonda
10 000 20 000 40 000	suspensión (d)	4	células con forma redonda

- a) Para este ensayo se utilizó colágena (Clg) seca a las siguientes concentraciones: 10, 20, 50 y 100 µg/cm²
 b) Para estos ensayos se utilizó colágena seca a la concentración de 5 µg/cm²
 c) En este ensayo las células se sembraron sobre una matriz de colágena hidratada
 d) En este ensayo las células se cultivaron en suspensión (inmersas en una matriz de colágena hidratada).

suspensión mostraron un tiempo de duración de 4 días y su forma fue redonda al igual que las células sembradas sobre un gel de colágena. La densidad de siembra de los hepatocitos en los cultivos en suspensión no afectó ni la duración del cultivo ni la forma de las células, aunque en ciertas zonas las células se agregaron cuando se sembraron en altas densidades. La concentración de colágena en el sustrato tampoco afectó el tiempo de duración de los cultivos ni la forma de las células; sin embargo, las células que fueron sembradas sobre plástico, sí mostraron un tiempo de duración menor. En la figura 11 se puede observar que existe una relación directa entre la densidad de siembra y la densidad óptica del colorante que es un índice de la adhesión celular. También se puede observar que la adhesión fue mayor en presencia de suero que en su ausencia.

En la figura 12 se presenta nuevamente el efecto de la densidad de siembra sobre la adhesión celular, en este caso las densidades fueron más altas y se puede ver que la relación es lineal hasta densidades de 140 000 células por cm^2 . A partir de ese punto la adhesión celular no aumenta al incrementar la densidad de siembra. En esta figura también se puede ver que nuevamente las células se adhieren más en presencia de suero que en su ausencia, aunque la diferencia es menor.

En la figura 13 se muestra la adhesión de los hepatocitos sobre diferentes concentraciones de colágena y a diferentes tiempos, en ausencia de suero. Se puede observar que la adhesión celular fue menor cuando se dejaron adherir los hepatocitos por 3 horas, mientras que los niveles de adhesión fueron semejantes para 1 y 2 horas. En todos los casos se observó que la adhesión celular fue

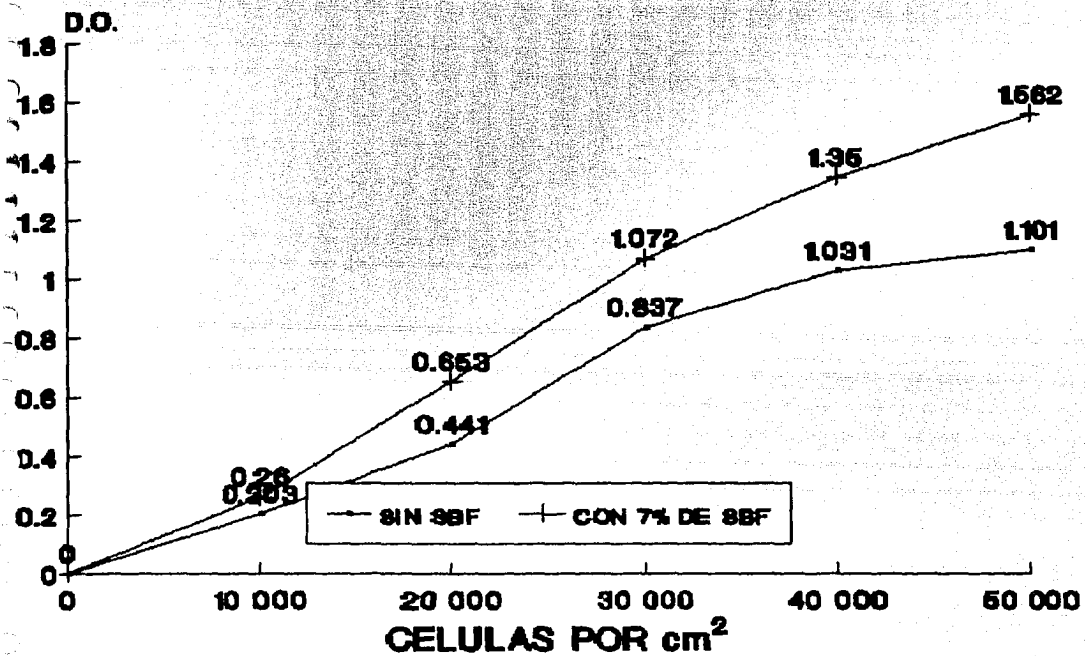


Figura 11. Adhesión de los hepatocitos sembrados a diferentes densidades en presencia y ausencia de suero.

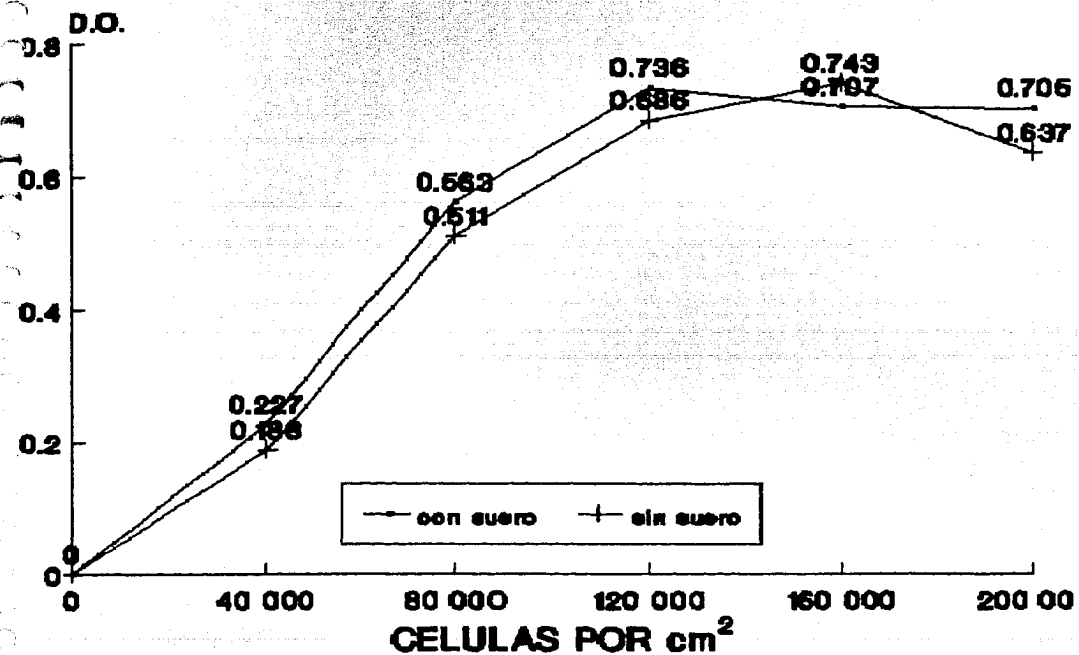


Figura 12. Adhesión de los hepatocitos sembrados en altas densidades en presencia y ausencia de suero.

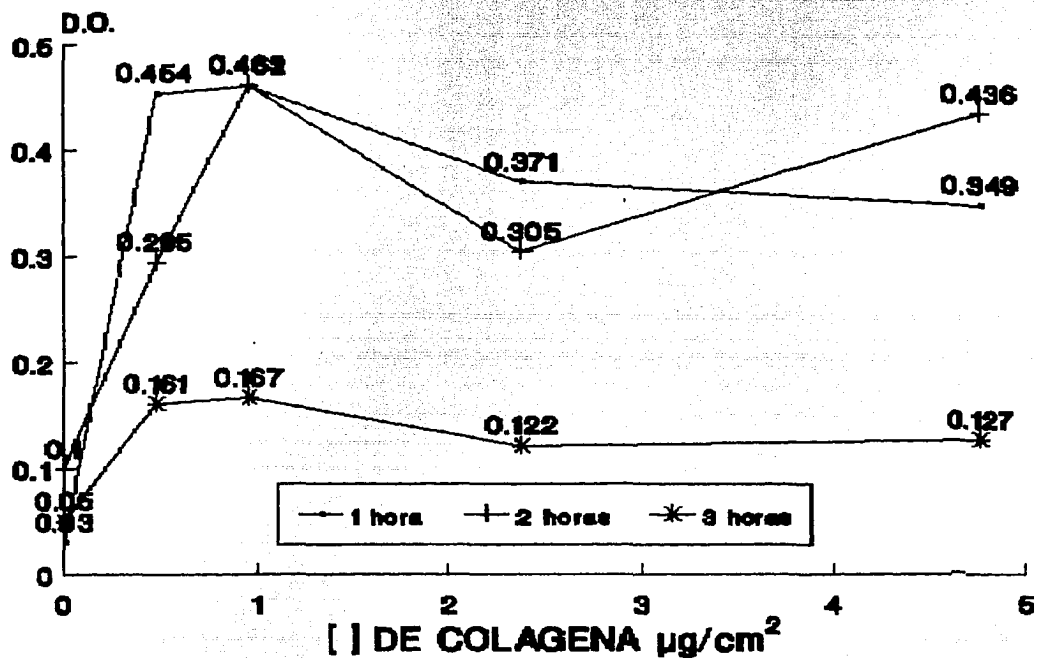


Figura 13. Efecto de la concentración de colágena como sustrato sobre la adhesión de los hepatocitos a diferentes tiempos de incubación en ausencia de suero.

menor en ausencia de colágena y que la menor concentración de colágena utilizada (476 ng/cm^2) fue suficiente para incrementar la adhesión celular. La adhesión celular no se incremento con concentraciones mayores de colágena, por el contrario, se observó una disminución en la adhesión celular a concentraciones mayores de $2 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$.

En la figura 14 se observa que la adhesión celular fue mejor cuando se incubaron las células por 2 horas en presencia de suero, y que ésta disminuyó notablemente cuando se recogieron las células a las 3 horas. En esta figura se observa nuevamente que para los tiempos de 2 y 3 horas, la adhesión celular se vio incrementada con la menor concentración de colágena. Las células incubadas por 1 hora mostraron una disminución en la adhesión al aumentar la concentración de colágena, a diferencia de las células incubadas por 2 horas, en las cuales se observó un comportamiento opuesto.

En la figura 15 se muestra la adhesión celular de los hepatocitos en altas concentraciones de colágena. Se observó un marcado incremento en la adhesión de las células con la menor concentración de colágena ensayada que fue de $10 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$, a mayores concentraciones se observó un ligero incremento en la adhesión celular, excepto a $40 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$ donde la adhesión celular disminuyó.

En la figura 16 se observa la adhesión de los hepatocitos a diferentes concentraciones de suero en el medio de cultivo. Se puede observar que la adhesión celular aumentó al incrementar la concentración de suero en el medio y alcanzó valores máximos con una concentración de 10 %. A concentraciones más elevadas se obtuvieron valores semejantes de adhesión.

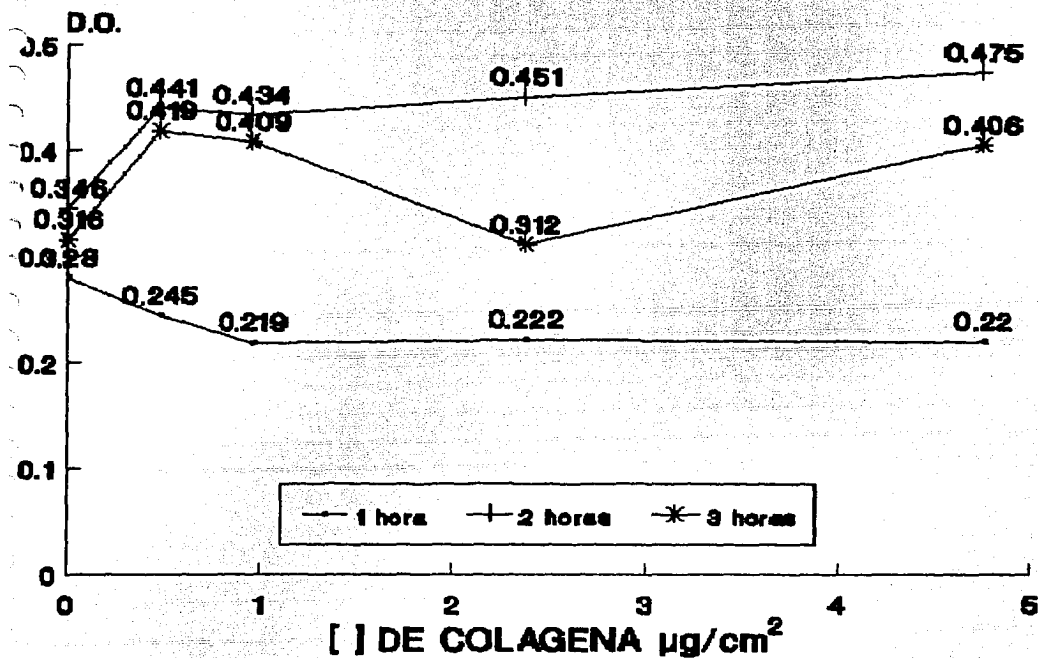


Figura 14. Efecto de la concentración de colágena en el sustrato sobre la adhesión de hepatocitos a diferentes tiempos de incubación en presencia de suero.

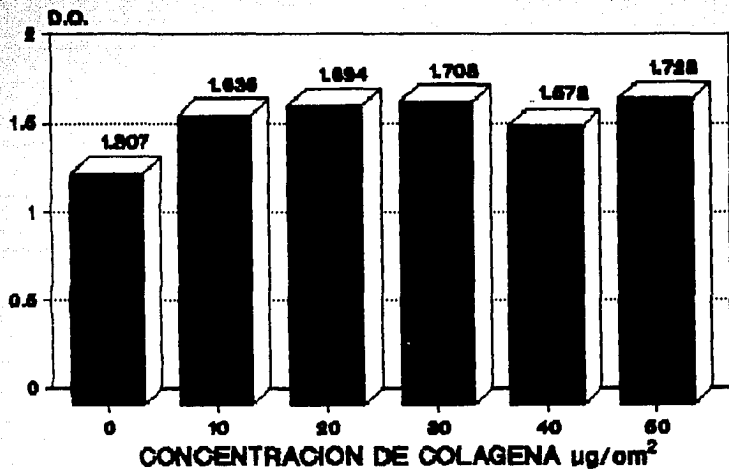


Figura 15. Efecto de la concentración de colagena (altas concentraciones) sobre la adhesión de hepatocitos sembrados en medio de cultivo con 7 % de suero.

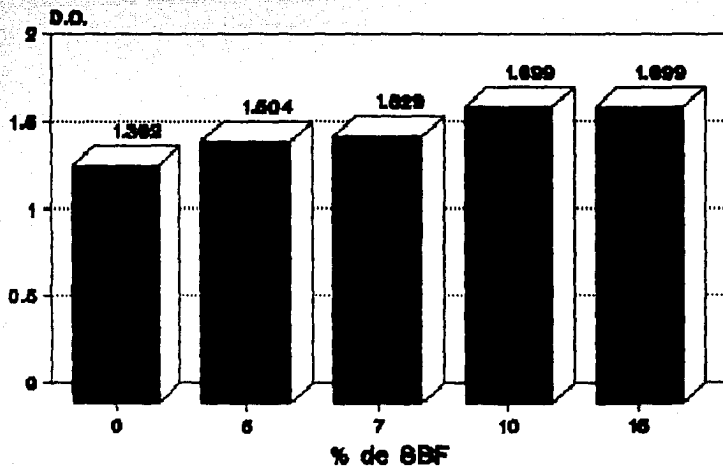


Figura 16. Efecto de la concentración de suero sobre la adhesión de hepatocitos sembrados sobre un sustrato de colágena ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).

VI. DISCUSION

Entre los sistemas utilizados para el estudio del metabolismo hepático, el cultivo primario de células constituye uno de los más adecuados ya que en este los hepatocitos mantienen sus funciones diferenciadas por lo menos durante una semana, en contraste con el sistema de hepatocitos aislados en suspensión. Además, en los cultivos primarios se puede obtener la respuesta específica de este tipo de células ante diversos factores, a diferencia del hígado perfundido aislado y el sistema de fragmentos aislados de tejido hepático. Esta inespecificidad también se presenta en los sistemas de cocultivo, ya que en ellos los hepatocitos se cultivan conjuntamente con otro tipo celular, el cual conserva su propio metabolismo, que puede interferir en el diseño experimental para estudiar el efecto de diferentes compuestos sobre el metabolismo hepático. Por tal motivo, y de acuerdo con los objetivos para los que se realizó este estudio comparativo, hemos optimizado una técnica de cultivo primario de hepatocitos que nos permitirá realizar estudios de la acción de fármacos sobre el metabolismo hepático: síntesis y secreción de proteínas como albúmina, colágena, etc.

Nuestros resultados muestran que los métodos I y II son muy semejantes, esto se debe a que los fines para los que son destinados los hepatocitos son muy parecidos. En ambos métodos, los hepatocitos se utilizan recién aislados para experimentos de corto tiempo, mientras que en el método III los hepatocitos se utilizan para establecer cultivos primarios.

El uso de albúmina sérica bovina (ASB) para el aislamiento de hepatocitos se ha justificado con base en su participación en la regulación osmótica y se adiciona con frecuencia a los medios de cultivo como un acarreador de vitaminas, lípidos, hormonas y minerales (Fraslin et al, 1992). Sin embargo, en este trabajo se observó que la adición de albúmina en el medio de disgregación no influyó notablemente en la viabilidad de los hepatocitos (Fig 6). Esta observación concuerda con los resultados obtenidos por Johnson et al (1972), quienes encontraron que la albúmina adicionada al medio no mejoraba las condiciones de los hepatocitos aislados (Berry et al, 1991). Se han reportado una serie de estudios en los que se utilizó colagenasas de los tipos I, II y IV, ya sean de la marca Sigma o Worthington (Carlsson et al, 1981, Kuri y Mendoza, 1989, Obrink, 1982). En dichos estudios se obtuvo una viabilidad superior al 80 %. Sin embargo, se ha reportado que es más importante el lote específico de colagenasa que la marca o proveedor (Howard et al, 1973, Berry et al, 1991). Por lo tanto las pequeñas diferencias observadas en la viabilidad cuando se comparan ambos métodos pueden explicarse parcialmente por el lote específico de la colagenasa utilizada, así como por las diferencias en la manipulación del tejido hepático.

El método III es muy diferente a los anteriores, pues la composición de la solución de perfusión, contiene glucosa, lo cual pudiera ayudar a mantener a los hepatocitos en mejores condiciones metabólicas. La concentración de colagenasa utilizada es menor; sin embargo, el tiempo de incubación es mayor, con lo cual se obtienen resultados semejantes en ambos tratamientos. Se ha observado que la concentración de colagenasa es crítica para la disgregación y viabilidad de hepatocitos de humanos y se ha

encontrado que la concentración recomendable es de 0.5 a 1 mg/ml de colagenasa (Li et al., 1972). No obstante, para el aislamiento de hepatocitos de ratas, se han utilizado concentraciones desde 0.3 mg/ml de colagenasa tipo 2 (Carlsson et al., 1981) hasta 4.4 mg/ml de colagenasa tipo I (Seglen, 1972) sin daños notables a las células. Por lo anterior, las concentraciones utilizadas en los métodos I, II y III se encuentran dentro de los intervalos de concentración de enzima reportados en la literatura. Seglen en 1973, reportó que la concentración de colagenasa con la que se obtienen los mejores resultados es de 0.5 mg/ml y que a mayor concentración de la enzima no se obtienen mejores rendimientos; sin embargo, como se mencionó anteriormente, la actividad de la enzima varía con el lote utilizado y con las condiciones particulares de la técnica. Otra de las diferencias entre los métodos lo constituyen la temperatura y el medio de disgregación, que en el método III fue medio de cultivo DMEM a 4°C. Debido a que el objetivo principal es aislar los hepatocitos para establecer cultivos primarios, durante la disgregación se les proporciona un medio rico en nutrientes a los hepatocitos recién aislados.

En la mayoría de los métodos reportados se utilizan varias centrifugaciones diferenciales a baja velocidad para limpiar la fracción de hepatocitos de otros tipos celulares, células muertas y fragmentos celulares (Bissell et al., 1973, Howard et al., 1973). En los métodos I y II se utiliza también la centrifugación diferencial, ya que se ha estimado que otros tipos de células constituyen menos del 1 % en la suspensión celular (Bissell et al., 1973). En el método III a diferencia de los anteriores se utiliza un gradiente de percoll, con el objeto de purificar los hepatocitos viables.

OPTIMIZACIÓN

Para conocer la influencia de los distintos medios de perfusión y de disgregación utilizados en los métodos estudiados, se llevo a cabo el aislamiento de hepatocitos con las distintas soluciones empleadas. Los resultados obtenidos demuestran que la mayor viabilidad se tiene cuando los hepatocitos se aíslan utilizando solución T-D para perfundir y DMEM para disgregar con o sin albúmina. Uno de los factores que influyó para que la perfusión efectuada con solución K-R tuviera baja viabilidad, fue el sistema de amortiguación empleado, ya que el pH de esta solución se mantiene por aereación con $\text{CO}_2\text{-O}_2$ al 95 y al 5 % respectivamente. En el método que diseñamos no se aereó la solución por lo que el pH no fue estable. Se ha reportado que los hepatocitos necesitan un estricto control del pH para una mayor viabilidad (Howard et al, 1973). Otro de los factores que influyó en el resultado fue la manipulación del tejido.

Los hepatocitos se adhirieron muy poco al plástico de la caja de cultivo a diferencia de cuando se utilizó un sustrato de colágena seca, donde la adhesión fue buena. Este resultado es contrario al obtenido por Francavilla et al. (1986) quienes reportaron que las cajas de cultivo marca Falcon son tan buenas o mejores para el estudio de hepatocitos en cultivo primario que las cajas cubiertas con colágena. Sin embargo, resultados similares a los nuestros se han obtenido en otros estudios; por ejemplo se han cultivado hepatocitos en medio suplementado con suero, en medio definido y una mezcla de ambos, en todos los casos la adhesión al plástico de la caja de cultivo fue muy poca (Enat et al, 1984). También se obtuvieron resultados similares cuando se

sembraron las células en medio L-15 con 5 % de SBF sobre el plástico de la caja de cultivo, mientras que las células sembradas sobre un sustrato de colágena en esas condiciones, permanecían adheridas y morfológicamente identificables como hepatocitos durante 6 o 7 días. En nuestras condiciones de cultivo los hepatocitos se veían en buen estado durante 10 o 15 días al igual que las células cultivadas por Enat et al (1984). La morfología de los hepatocitos adheridos sobre el plástico de la caja de cultivo fue redonda, un resultado semejante al reportado por Strom y Michalopoulos (1982), mientras que en los hepatocitos cultivados sobre colágena seca es poligonal, en tanto que los hepatocitos cultivados sobre gel hidratado de colágena presentaron forma redonda. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Ben-Ze et al (1988) y Strom y Michalopoulos (1982), quienes reportan que los hepatocitos cultivados sobre gel hidratado de colágena tienen una forma aplanada y permanecen viables por largos periodos. La importancia de la forma de las células ha sido ampliamente comprobada en varios sistemas de cultivos celulares. Se ha visto que cambios en la morfología de las células participan en la regulación de crecimiento, expresión genética y en el mantenimiento de las funciones diferenciadas (Ben-Ze, 1988).

Los hepatocitos sembrados dentro de una matriz de colágena hidratada sobrevivieron 4 días y el gel se contrajo, resultados semejantes se han obtenido cuando los hepatocitos son sembrados sobre un gel de colágena (Strom y Michalopoulos, 1982). El mecanismo de la contracción de los geles de colágena no está enteramente claro pero parece que en dicho fenómeno no se lleva a cabo la degradación de la colágena (Strom y Michalopoulos, 1982).

La importancia de un sustrato de colágena y de la interacción

celula-celula en la duracion de un cultivo y en el mantenimiento de las características diferenciadas ha sido ampliamente comprobado (Utesch y Desch, 1992, Ben-Ze, 1988), estas interacciones no se presentaban en los cultivos sembrados sobre el plástico, debido a la poca cantidad de células que lograron adherirse a este sustrato lo cual posiblemente influyó en la corta duracion de los cultivos. Las células sembradas sobre un sustrato de colágena seca sobrevivieron por más tiempo ya que éstas se adhirieron en gran cantidad logrando un cultivo confluyente en el cual se favorecieron las interacciones célula-celula, al igual que las interacciones célula-matriz extracelular.

La densidad de las células sembradas no influyó grandemente en el tiempo de duracion del cultivo, ni sobre las características morfológicas; esto se debió en parte a que en todos los cultivos la densidad de siembra fue superior a la de confluencia. Además, en las pruebas de adhesión realizadas, se observó un incremento en la adhesión de las células a densidades mayores que las de confluencia, hasta una densidad celular de 140 000 células/cm², que fue 3 veces superior a la de confluencia. Sin embargo, estas pruebas de adhesión se llevaron a cabo en periodos cortos de incubación, los cuales no sobrepasaron las 3 horas, tiempo en el cual las células no se han extendido sobre el sustrato ni han adquirido su morfología característica en cultivo, lo cual nos sugiere que las células sembradas a densidades muy altas llevan a cabo una competencia para adherirse al sustrato y las células que se adhieren mejor son las que sobreviven, esta idea es apoyada por el hecho de que a las 24 horas la morfología del cultivo es similar, entre los cultivos sembrados a altas y bajas densidades.

Se ha reportado que la concentración de colágena adecuada para tener una buena adhesión de hepatocitos es de 625 ng/cm², si las concentraciones de colágena son menores, las células se adhieren en menor proporción (Obrink, 1982). Nuestros resultados mostraron que con la menor concentración de colágena en la caja de cultivo que fue de 476 ng/cm² fue suficiente para que las células se adhirieran bien al sustrato. A mayores concentraciones de colágena no se incrementó la adhesión de células al sustrato.

El tiempo óptimo de adhesión de los hepatocitos fue entre 1 y 2 horas de incubación; un resultado similar encontró Obrink (1982) quien observó que la máxima adhesión al sustrato fue a los 90 minutos. En todos los casos, la colágena a cualquier concentración ensayada incrementó la adhesión de los hepatocitos, excepto cuando se dejó a las células incubando por más de tres horas en presencia de 7 % de SBF.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de este trabajo las podemos resumir en los siguientes puntos:

- Los tres métodos de aislamiento de hepatocitos son apropiados de acuerdo con el propósito de su uso.

- El método de aislamiento de hepatocitos optimizado, es más parecido al método III debido a que en ambos métodos el objetivo de su aislamiento es establecer cultivos primarios.

- El mejor sustrato de adhesión de los hepatocitos es colágena seca a una concentración igual o mayor de 476 ng/cm^2 .

- La concentración adecuada de suero para facilitar la adhesión celular en nuestras condiciones de cultivo fue del 10%.

- El tiempo que se deben dejar incubando los hepatocitos para una mayor adhesión es de 2 horas, a tiempos más largos los hepatocitos se desprenden del sustrato.

IX. BIBLIOGRAFIA.

-Ben-Ze'ev, A., Robinson, G.S., Bucher, N.L., Farmer, S.R.: Cell-cell and cell-matrix interactions differentially regulate the expression of hepatic and cytoskeletal genes in primary cultures of rat hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988;85:2161-2165.

-Berry, M.N.: Metabolic properties of cells isolated from adult mouse liver. J. Cell Biol. 1962;15:1-8.

-Berry, M.N., Friend, D.S.: High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. J. Cell Biol., 1969;43:506-520.

-Berry, M.N., Edwards, A.M., Barritt, G.J., (1971) Isolated Hepatocytes preparation properties and applications; Elsevier Netherlands 460 p.p.

-Biagini, G., Ballardini, G.: Liver fibrosis and extracellular matrix. J. Hepatol. 1989;8:115-124

-Bianchi, F.B., Biagini, G., Ballardini, G., Basement membrane production by hepatocytes in chronic liver disease. Hepatology. 1984;4:1167-1172

-Bissell, D.M., Hammaker, L., Meyer, U.A.: Parenchymal cells from adult rat liver in nonproliferating monolayer culture. J. Cell Biol. 1973;59:722-734

-Braunwald, E., Petersdorf, R.G., Wilson, J.D., (1980) Principios de medicina interna; McGraw Hill Book Company. U.S.A. 1473-1477 p.p.

-Carlsson, R., Engvall, E., Freeman, A., Ruoslahti, E.: Laminin and fibronectin in cell adhesion: Enhanced adhesion of cells from regenerating liver to laminin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1981;78:

-Decker, K.:Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). Eur. J. Biochem. 1990;192:245-261.

-Eeva, R.S., Leo, M.A., Timpl, R., Lieber, C.S.:Acetaldehyde and lactate stimulate collagen synthesis of cultured baboon liver myofibroblasts. Gastroenterology 1984;87:777-787

-Enat, R., Jefferson, D.M., Ruiz, N., Gatmaitan, Z., Leinwand, L.A., Reid L.M.:Hepatocyte proliferation in vitro Its dependence on the use of serum-free hormonally defined medium and substrata of extracellular matrix. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984;81:1411-1415

-Engelmann, G.L., Fierer, J.A.:Preparation of primary monolayer cultures of adult rat hepatocytes. J. Tiss. Cult. Meth. 1982;7(4) :169-173

-Francavilla, A., Ove, P., Polimeno, L., Sciascia, C., Coetzee, M., Starzl, T.:Epidermal Growth factor and proliferation in rat hepatocytes in primary culture isolated at different times after partial hepatectomy. Cancer Res. 1986;46:1318-1323.

-Fraslin, J.M., ouquete, L., Douaire, M., Menez, Y., Guillemot, J.C. Mallard, J.:Isolation and long term maintenance of differentiated adult chicken hepatocytes in primary culture. In Vitro Cell Dev. Biol. 1992;28A:615-620

-Friedman, S.L., Roll, F.J., Boyles, J., Bissell, D.M.:Hepatic lipocytes: The principal collagen-producing cells of normal rat liver.Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985;82:8681-8685.

-Glaumann, H., Peters, T., Redman, C.,(1983) Plasma protein secretion by the liver; Academic Press, New York. 500 p.p.

-Greenwel, P., Schwartz, M., Rosas, M., Peyrol, S., Grimaud, J., Rojkind, M.: Characterization of fat storing cell lines derived from normal and CCL₄-cirrhotic livers. Lab. Invest. 1991;65(6):644-653

-Ham, A.D., Cormack, D.H., (1983) Histología; Interamericana. México D.F. 1078 p.p.

-Howard, R.B., Lee, J.C., Pesch, L.A.: The fine structure, potassium content and respiratory activity of isolated rat liver parenchymal cells prepared by improved enzymatic techniques. J. Cell Biol. 1973;57:642-658

-Howard, R.B., Christensen, F.A., Gibbs, Pesch.,: The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver. J. Cell. Biol. 1967;35:675.

-Irving, M.G., Roll, F.J., Huang, S., Bissell, D.M.: Characterization and culture of sinusoidal endothelium from normal rat liver: lipoprotein uptake and collagen phenotype. Gastroenterology. 1984;87:1233-1247.

-Ki, M., Leo, M.A., Lieber, C.S.: Alcoholic liver injury in baboons: transformation of lipocytes to transitional cells. Gastroenterology. 1984;87:188-200.

-Krotzsch, F., E.: Metodo modificado para extracción de colágena nativa a partir de piel de ovino no-nato. Tesis para obtener el título de químico farmacéutico biólogo. Fac. de química. Universidad Nacional Autónoma de México. 1992.

-Kuri, W., Mendoza, T.: Cultivation of adult rat hepatocytes on 3T3 cells: expression of various liver differentiated functions. Differentiation. 1989;41:148-157

-Leeson, C.R., Leeson, T.S., Paparo, A.A., (1987) Histología; Interamericana. México 600 p.p.

-Li, A.P., Roque, A., Beck, D.J., Kaminski, D.L.,: Isolation and culturing of hepatocytes from human livers. J. Tiss. Cult. Meth. 1992;14:139-146.

-Martin, G.R., Kleinman, H.K., The extracellular matrix component in development and in disease. Semin Liver Dis. 1985;5:147-156

-Martínez, A.H.,: The hepatic extracellular matrix. I. Electron immunohistochemical studies in normal rat. Lab. Invest. 1984;51(1):57-74

-Martínez, A.H.,: The hepatic extracellular matrix. II. Electron immunohistochemical studies in rats with CCL₄-induced cirrhosis. Lab. Invest. 1985;53(2):166-186.

-Martínez, A.H., Martínez, F., Amenta, P.S.,: The extracellular matrix in hepatic regeneration. Localization of collagen types I, III, IV, Laminin and fibronectin. Lab. Invest. 1991;64(2):157-166

-Mendoza, T., Argüello, C., Kuri, H.,: Culture of proliferating and differentiating fat-storing cells in 3T3-conditioned medium. Biol. Cell. 1988a;64:29-38.

-Mendoza, T., Hernández A., Kuri, H.,: Intracytoplasmic triglyceride accumulation produced by dexamethasone in adult rat hepatocytes cultivated on 3T3 cells. Toxicology 1988b;52:273-286.

-Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V., (1992) Bioquímica de Harper; Manual Moderno. México D.F. 740 p.p.

-Öbrink, B.,: Hepatocyte-Collagen adhesion. Methods enzymol. 1982;82:513-529

-Phillips, S., Poucell, J., Patterson, J., Valencia, P., (1987) The liver: An atlas and text of ultrastructural pathology; Raven Press. New York 1-10 p.p.

-Rojkind, M., Gatmaitan, Z., Mackensen, S., Giambrone, M., Ponce, P., Reid, L.,: Connective tissue biomatrix: Its isolation and utilization for long-term cultures of normal rat hepatocytes. J. Cell. Biol. 1980;87:255-263.

-Scheffer, C.G., Lee, P.C., Ellis, P.F., Bissell, D.M., Smuckler, E.A., Stern, R.: Collagen production by rat hepatocytes and sinusoidal cells in primary monolayer culture. Hepatology. 1982;2(1):13-18

-Seglen, P.O., Preparation of rat liver cells: Effects of Ca^{++} on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver. Exp. Cell. Res. 1972;74:450-454.

-Seglen, P.O., Preparation of rat liver cells: Enzymatic requirements for tissue dispersion. Exp. Cell. Res. 1973;82: 391-398

-Stryer, L., (1988) Biochemistry; Freeman and Company. New York 636-638 p.p.

-Strom, S., Michalopoulos, G.,: Collagen as a substrate for cell growth and differentiation. Methods enzymol. 1982;82:544-555

-Takehara, T., Matsumoto, K., Nakamura, T.: Cell density-dependent regulation of albumin synthesis and DNA synthesis in rat hepatocytes by hepatocyte growth factor. J. Biochem. 1992;112:330-334

-Tanaka, K., Sato, M., Tomita, Y., Ichiara, A.,: Biochemical studies on liver functions in primary cultured hepatocytes of adult rats. J. Biochem. 1978;84(4)937-946

-Utesch, D., Desch, F.: Dependency of the in vitro stabilization of differentiated functions in liver parenchymal cells on the type of cell line used for co-culture. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 1992; 28A:193-198

-Voss, B., Rautemberg, J., Allam, S., Distribution of collagen type I and type III and Two collagenous components of basement membranes in the human liver. *Pathol. Res. Pract.* 1980;170:50-60

-Weiner, F.R., et al.: Ito-cell gene expression and collagen regulation. *Hepatology.* 1989;11 (1):111-117

-Wheater, P.R., Burkitt, H.G., Daniels, V.G., (1986) *Functional Histology*; Churchill Livingstone. Londres, 250 p.p.

-Wisse, E., Knook, D.L., Decker, K. (1989) *Cells of the hepatic sinusoid; The Kupffer cell foundation.* Noruega 1-8 p.p.