

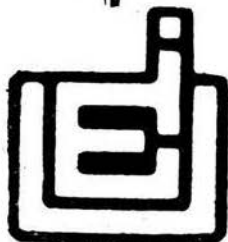


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

**ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO PRIMARIO DE
HEPATOCITOS DE HAMSTER FETAL PARA
ESTUDIOS DE CARCINOGENESIS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A
ALBERTO ROJAS OCHOA



LOS REYES IZTACALA, MEX.

1984



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 esta 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.

Universidad Nacional Autónoma de México
Escuela Nacional de Estudios Profesionales
Unidad Profesional Iztacala

Establecimiento del cultivo primario
de hepatocitos de hamster fetal
para estudios de carcinogénesis.

Alberto Rojas Ochoa

Este trabajo de tesis se llevó a cabo en el laboratorio número 50 del departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINEVESTAV), bajo la dirección del Dr. Saúl Villa Treviño.

A mi madre, Rosa Ochoa Juárez.

Por su gran amor y su apoyo, por ser una mujer ejemplar que a pesar de la adversidad nunca se dejó vencer y siempre salió adelante.

A mis Hermanas, Oliva y Paula.

Por su cariño, su apoyo y su aliento en todo momento de mi vida.

A mi morenita, Adela.

Por ser novia, compañera y amiga, por tu amor y tus palabras de aliento.

A mis hermanos y hermanas.

Por los buenos momentos al convivir en familia.

AGRADECIMIENTOS

A tí Saúl por dirigir este trabajo de tesis, por todas las facilidades otorgadas, por tus conocimientos y tu amistad.

A mis revisores de tesis por sus acertadas correcciones y comentarios

A mis profesores de la carrera de biología del plan modular de la ENEP Iztacala.

A mis compañeros de la licenciatura, en particular a Armando Pérez por ser además mi AMIGO.

A mis compañeros del laboratorio 50, Evelia y Samia por su ayuda en la parte experimental, y Alejandro por sus sugerencias y comentarios.

I N D I C E

Pag.

ABREVIATURAS

RESUMEN

I	INTRODUCCION	1
II	OBJETIVO.....	7
III	MATERIAL Y METODOS.....	8
	OBTENCION DE LA SUSPENSION CELULAR.....	8
	DETERMINACION DEL RENDIMIENTO CELULAR.....	9
	DETERMINACION DE LA VIABILIDAD CELULAR.....	10
	DETERMINACION DE LA ADHESION CELULAR.....	10
	DETERMINACION DEL INOCULO A SEMBRAR.....	11
	DETERMINACION DE LA PROLIFERACION CELULAR.....	12
IV	RESULTADOS.....	15
	RENDIMIENTO Y VIABILIDAD.....	15

DETERMINACION DE LA ADHESION CELULAR.....	17
DETERMINACION DEL TAMAÑO DEL INOCULO A SEMBRAR.....	17
DETERMINACION DE PROLIFERACION.....	19
INOCULO DE 1×10^6 CEL/CAJA.....	19
INOCULO DE 6×10^4 CEL/CAJA.....	22
INOCULO DE 2.5×10^5 CEL/CAJA.....	24
MEDIO MX-83.....	27
V DISCUSION.....	30
VI CONCLUSIONES.....	33
VII BIBLIOGRAFIA.....	35

ABREVIATURAS

EGTA	Acido N,N,N',N'-tetraacético etilen glicol-bis(β -aminoetil éter).
min.	minutos.
arg	arginina.
SBFD	suero de bovino fetal dializado.
INS	insulina.
U	unidades.
TH³	timidina tritiada.
HC	hidrocortisona.
FCE	factor de crecimiento epidérmico.
CPM	cuentas por minuto.
cél/g	células por gramo.
cél/caja	células por caja.
rpm	revoluciones por minuto.

RESUMEN

Los modelos biológicos *in vitro* son caracterizados para estudiar en profundidad las bases celulares y moleculares de la carcinogénesis, cultivos celulares de piel, tráquea, pulmón e hígado se han utilizado para este propósito, siendo los últimos de gran interés por su capacidad de metabolizar carcinógenos químicos. Una característica muy importante requerida en los modelos usados en estudios de carcinogénesis química, es que las células presenten actividad proliferativa, la cual es necesaria para que cuando se produzca daño genético este permanezca y se originen células transformadas. Tomando en cuenta esto y que los hepatocitos de organismos adultos no se dividen *in vitro*, los hepatocitos en estadios fetales son el modelo de preferencia por su capacidad de dividirse activamente. La caracterización de estos cultivos primarios proliferativos y su uso como modelo de carcinogénesis, será una herramienta muy efectiva para entender mejor este fenómeno.

En el presente trabajo se muestran resultados del establecimiento del cultivo primario proliferativo, obtenido de suspensiones celulares de hígados de hamster fetal, usando colagenasa para disgregar el tejido hepático, así como centrifugación y medio de cultivo libre de arginina para

seleccionar hepatocitos. Los inóculos utilizados fueron de 1×10^6 , 6×10^4 , y 2.5×10^5 cél/caja.

El rendimiento celular por gramo de tejido fué en promedio de 41.63×10^6 , con una viabilidad promedio de 85.63%. Para los experimentos de proliferación el medio se suplementó con Factor de Crecimiento Epidérmico (FCE) e Hidrocortisona (HC) y fué medida por conteo directo del número de hepatocitos, así como determinación de incorporación de timidina tritiada (TH^3).

Se observó actividad proliferativa en los cultivos suplementados con estas hormonas, en comparación con los controles. Adicionalmente se observó que tienen una duración adecuada para durante este periodo aplicar carcinógenos químicos y medir sus efectos. Los resultados indican que la metodología implementada para establecer los cultivos primarios proliferativos de hepatocitos fetales es la adecuada, y que estos cumplen los requisitos para sustentar los cambios celulares a nivel de biología celular y molecular.

INTRODUCCION

El estudio de las bases celulares y moleculares de la carcinogénesis sigue siendo de gran interés para los investigadores por ser un proceso complejo del cual se origina una población anormal de células, las cuales son capaces de un crecimiento excesivo, invasión y metástasis según sea el grado de malignidad (Farber y Sarma, 1987; León, Guerrero y Pellicer, 1988; Pitot, 1990).

Se han diseñado modelos biológicos para estudiar y entender el proceso carcinogénico. Los modelos mejor conocidos son los de la hepatocarcinogénesis en rata y en ratón, en donde se han estudiado muchas sustancias químicas cancerígenas (Hayashi y Carr, 1984; Farber y Sarma, 1987; León, et al, 1988; Pitot, 1990). Para entender los procesos biológicos se considera apropiado generar un determinado paso *in vivo* y posteriormente analizarlo con profundidad *in vitro* para controlar de una manera más apropiada las variables en este último sistema, expresión de esta estrategia es el incremento en el uso de cultivos celulares para estudiar la carcinogénesis (Patsch, Gotto y Patsch, 1986; Farber y Sarma, 1987; Yuspa y Poirier, 1988; Yeoh, Hilliard, Fletcher y Douglas, 1990).

Los sistemas *in vitro* utilizan células epiteliales de rata y/o ratón provenientes de tráquea, piel, pulmón e hígado, este último modelo posee la virtud de metabolizar carcinógenos químicos cualitativamente de forma similar a la actividad metabólica *in vivo* (Williams, 1980; Hayashi y Carr, 1984; Yuspa y Poirier, 1988). El hígado ofrece características únicas para el estudio de funciones celulares específicas, entre las que se encuentran: una masa diferenciada de células capaces de realizar una variedad de procesos químicos y que pueden llevar a cabo regeneración sincrónica en respuesta a una hepatectomía parcial de dos tercios del órgano (Hayashi y Carr, 1984). De tal forma que el objetivo de varios investigadores desde hace tiempo ha sido el establecimiento de cultivos de células hepáticas, logrando en un principio obtenerlos como explantes de tejido por cortos periodos (Hillis y Bang, 1959; Rose, Kumegawa y Cattoni, 1968).

Se ha observado que es difícil mantener cultivos primarios de hepatocitos de animales adultos los cuales presentan una capacidad proliferativa muy baja (Leffert y Paul, 1972; Hayashi y Carr, 1984; Paul y Piasecki, 1984; Hoffmann, Piasecki y Paul, 1989;). Es importante que los hepatocitos en cultivo retengan las características funcionales que se observan *in vivo* ya que pueden ser de gran valor en estudios sobre regulación, diferenciación, enfermedades hepáticas, carcinogénesis y metabolismo, así como destoxificación de

drogas (Namba, et al, 1978), por tal motivo se han buscado técnicas para aislarlos sin dañarlos.

La sistematización de la metodología para establecer el cultivo primario de hepatocitos se ha desarrollado por varios años tanto para células de rata adulta como para células de rata fetal. En 1960 Berry y Friend describen la técnica de perfusión de hígado de rata adulta por medio de la vena porta con enzimas proteolíticas para disgregar las células del tejido y posteriormente cultivarlas. Usando esta técnica con organismos adultos se han realizado investigaciones buscando favorecer que se preserve la morfología, aumente la vida media y se reproduzcan los hepatocitos en dichos cultivos celulares. Dentro de estos estudios se destacan el efecto de hormonas específicas, factores relacionados con plaquetas y medios de cultivo químicamente definidos (Laishes y Williams, 1976; Laishes y Williams, 1976(a); Williams, 1977; Leffert, Koch y Skelly, 1984; Paul y Piasecki, 1984; Hoffmann, et al, 1989).

En los cultivos primarios de hepatocitos de rata adulta se han realizado pruebas de toxicidad, se han detectado carcinógenos químicos midiendo la síntesis no programada de ADN en algunos casos, y en otros los niveles de citocromo P450 (Williams, 1977(a), 1980; Maslansky y Williams, 1981; McQueen, Maslansky, Crescenzi y Williams, 1981; Williams, Laspia y Dunkel, 1982; Mendoza-Figueroa, 1984;). Se ha observado

estimulación e inhibición del crecimiento celular en respuesta a factores de crecimiento presentes en plaquetas de suero de rata, factor de necrosis tumoral, factor beta de crecimiento transformante e interleucina 6 (Paul y Piasecki, 1984; Sato y Yamazaki, 1992), por otro lado, se ha determinado la actividad de enzimas y del citocromo P450, así como el efecto de aminoácidos sobre la degradación de ARN (Legrand y Bensadoun, 1991; Singh y Veltri, 1991; Balavoine, Rogier, Feldmann y Lardeux, 1992).

Por otro lado, los cultivos primarios de hepatocitos fetales son mejores debido a que presentan proliferación celular (Hoffmann, et al, 1989). En hígados fetales de rata, Leffert y Paul en 1972 obtienen cultivos primarios disgregando el tejido con colagenasa, purificando los hepatocitos por centrifugación y seleccionándolos en cultivo con medio libre de arginina. Así en estos cultivos, se han estudiado los efectos de suero de bovino fetal dializado, de fracciones específicas de este suero, de las interacciones de factores del suero y medio condicionado, así como el efecto de hormonas específicas y medios de cultivo químicamente definidos (Leffert y Paul, 1973; Koch y Leffert, 1974; Lefert, 1974; Leffert, 1974(a); Leffert, et al, 1984; Hoffmann, et al, 1989).

En este modelo se ha observado el efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular por lipoproteínas de muy baja densidad y etanol (Leffert y Weinstein, 1976; Henderson, Baskin, Horbach, Porter y Schenker, 1989;). Hay estudios sobre la biosíntesis de diversos tipos de moléculas, el efecto de hormonas, tipo de sustrato, y proteínas (Leffert y Paul, 1972; Leffert y Sell, 1974; Lorenzo, Roncero y Benito, 1986; Roncero, Lorenzo, Fabregat y Benito, 1989; Iturralde, Alava, González, Anel y Piñeiro, 1991). También se ha medido en estos sistemas *in vitro* el control de la transcripción bajo condiciones de cultivo químicamente definido (Hoffmann y Paul, 1990; Tönjes, Xanthopoulos, Darnell y Paul, 1992). Por último, se reporta transformación *in vitro* de células hepáticas fetales con un carcinógeno químico (Yeoh, et al, 1990).

Otras especies animales como el hamster ofrecen ventajas que pueden ser utilizadas en los modelos *in vitro* (Namba, Hyodo y Kimoto, 1978; Williams, 1980), como un cariotipo celular estable (Namba, et al, 1978) y una mayor susceptibilidad hepática a carcinógenos (Hall, Brésil, Serres, Martel-Planche, Wild y Montesano, 1990). No se han reportado trabajos en los que se utilice como modelo de carcinogénesis el cultivo primario de hepatocitos de hamster, y tampoco estudios usando hepatocitos de hamster fetal.

Tomando en cuenta las características favorables de las células hepáticas de hamster y, que los cultivos primarios de hepatocitos, representan un sistema homogéneo que proveen una correcta comparación con las propiedades de estas células *in vivo* (Singh y Veltri, 1991), en este trabajo se plantea establecer el cultivo primario de hepatocitos de hamster fetal para posteriormente ser utilizado como modelo en el estudio de la carcinogénesis.

OBJETIVO

Establecer el cultivo primario de hepatocitos de hamster fetal para ser utilizado como modelo en el estudio de la carcinogénesis.

Para cubrir el objetivo se plantearon las siguientes metas:

1.- Caracterizar y encontrar las condiciones óptimas para obtener suspensiones celulares de hepatocitos fetales.

Parámetros a medir:

- a) Rendimiento celular por gramo de tejido.
- b) Viabilidad.

2.- Definir las condiciones óptimas para obtener cultivos proliferativos.

Parámetro a medir:

- a) Densidad poblacional.

MATERIAL Y METODOS

OBTENCION DE LA SUSPENSION CELULAR

Se obtuvieron los fetos de hamster de 15-17 días de gestación, y se colocaron en un recipiente cubierto con gasas estériles.

En condiciones de esterilidad, se pesó un vaso de precipitados con TD salino (pH= 7.4-7.5), se resecaron los hígados con la ayuda de pinzas de relojero, se colocaron en la solución de TD salino y en seguida se pesaron por diferencia. Posteriormente se pasaron a una solución de EGTA 0.5 mM en una relación de 20% p/v en un matraz E.M. de 125 ml, y se incubaron por 15 min. a 37° C en agitación. En seguida se colocaron en una solución de colagenasa tipo IV 0.05%, en una relación de 20% p/v, se incubaron por 8 min. a 37° C en agitación, se resuspendió 10 veces con pipeta y se volvió a incubar por 7 min. a 37° C en agitación.

Se pasó la suspensión a un tubo cónico a través de un organdí, se llevó a 35 ml con TD salino y se centrifugó a 500 rpm por 5 min., se lavó y se volvió a centrifugar en dos

ocasiones más. Se resuspendió la pastilla en medio suplementado con 20 μM de Arginina (**arg**), 10% de suero de bovino fetal dializado (**SBFD**), más 15 U de insulina (**INS**) (modificado de: Leffert, Koch, y Skelly, 1984; Lorenzo, Roncero, y Benito, 1986).

DETERMINACION DEL RENDIMIENTO CELULAR

Se determinó el rendimiento celular por conteo usando el hemocitómetro de la siguiente manera:

Se pusieron 0.2 ml de la suspensión celular más 0.8 ml de medio de cultivo en un tubo de ensayo, se homogenizó la mezcla y se transfirió con una pipeta Pasteur al hemocitómetro. Se contaron los hepatocitos que se observaron en los cuadros de las cuatro esquinas. Se obtuvo el promedio, se multiplicó por 10^4 y por el factor de dilución (F.D.= 5) para saber el número celular por ml de suspensión. Para obtener el No. celular por gramo de tejido se multiplicó el No. de células/ml por el volúmen total de la suspensión.

DETERMINACION DE LA VIABILIDAD CELULAR

Se determinó la viabilidad celular por medio de la exclusión de azul de tripán de la siguiente manera:

Se pusieron 0.2 ml de la suspensión celular en un tubo de ensayo, se agregaron 0.3 ml de medio de cultivo y 0.5 ml de azul de tripán al 0.5%, se homogenizó la mezcla y se transfirió con una pipeta Pasteur al hemocitómetro. Se contaron los hepatocitos que no estaban teñidos, observados en los cuadros de las cuatro esquinas. Se obtuvo el promedio, se multiplicó por el factor de dilución y por 10^4 , el resultado se dividió entre el número de hepatocitos totales por ml y, por último se multiplicó por 100 para saber el porcentaje de células viables por ml de suspensión.

DETERMINACION DE LA ADHESION CELULAR

Para determinar el tiempo mínimo que necesita el mayor número de células para adherirse al sustrato, se sembraron 1.0×10^6 células/ml en cajas de plástico de 35 mm (COSTAR), 1 ml por caja, se usó medio F12 libre de arg (GIBCO),

suplementado con 10% de SBFD, 20 μ M de arg, y 15 U de INS por cada 100 ml, se incubó a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂ (LAB-LINE INSTRUMENTS, Inc) después de establecido el cultivo, se retiró el medio de cultivo en los siguientes tiempos: 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, y 6 horas, se lavó en dos ocasiones con TD salino e inmediatamente se incubaron los hepatocitos con una solución de tripsina 0.05%/KCl 0.1 M a 37°C de 15 a 20 min. en atmósfera húmeda y 5% de CO₂, una vez que estuvieron las células en suspensión se hizo conteo directo en el hemocitómetro.

DETERMINACION DEL INOCULO A SEMBRAR

Para determinar el tamaño del inóculo a sembrar se midió el número de hepatocitos adheridos a las cajas de plástico de 35 mm, después de tres horas de establecido el cultivo por medio de conteo en el hemocitómetro.

Los inóculos probados fueron: 0.5X10⁶, 1.0X10⁶, 1.5X10⁶ y, 2.0X10⁶ cél/caja.

DETERMINACION DE LA PROLIFERACION CELULAR

MEDIO F12

Para determinar si los cultivos eran proliferativos se midieron, el número de células adheridas a las cajas de 35mm de plástico a intervalos específicos por medio de conteo directo de hepatocitos en el hemocitómetro así como la incorporación de timidina tritiada (TH^3) utilizando un contador de centelleo líquido (BECKMAN INSTRUMENTS, Inc.), empleando la técnica descrita por Rossberger y Andrae en 1987.

Los grupos experimentales para estos ensayos tuvieron las siguientes características:

CONTROL: Medio F12 (GIBCO) suplementado con 15 U de **INS** por cada 100 ml (LILLY), 20 μ M de arg (SIGMA), 10% de **SBFD** (BIOCEL), $CaCl_2$ (MERCK) en una concentración final de 1.8 mM.

HIDROCORTISONA (HC): con las mismas características que el control más HC (SIGMA) 1 μ g/ml.

FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMICO (FCE): con las mismas características que el control más FCE (SIGMA) 100 ng/ml.

HC + FCE: con las mismas características que el control, suplementado con HC 1 μ g/ml más FCE 100 ng/ml.

El tamaño de los inóculos utilizados fué de 1.0×10^6 , 2.5×10^5 , y 6×10^4 .

Los datos obtenidos fueron tratados de la siguiente manera: la media de las cuentas por minuto (CPM) del grupo control al día cero corresponde al 100% y se representa como 1 en el eje de las "Y" en las figuras correspondientes, para ver el comportamiento del control con respecto al tiempo (disminución o aumento de la población celular), se dividió la media del control del día correspondiente entre la media del control del día cero. En el caso de los grupos suplementados con HC, FCE, y HC+FCE, los resultados se analizaron en relación a su grupo control correspondiente para ver incremento o disminución respecto a su control, es decir, la media de las CPM del grupo con HC en el día 4 se divide entre la media del grupo control del día 4, y así para cada caso; por lo que los valores sobre el eje de las "Y" representan incrementos o decrementos del número celular respecto al control.

MEDIO MX-83

También se determinó la proliferación de hepatocitos usando un medio químicamente definido libre de arginina el medio MX-83 (Hoffmann, y cols. 1989). Se hizo conteo celular en el hemocitómetro y se midió la incorporación de TH^3 como ya se mencionó. El número celular del inóculo en estos experimentos fué de 2.5×10^5 . Los grupos experimentales fueron como sigue:

MX-83 CON SUERO : Medio MX-83 suplementado con 10% de SBFD, 20 μM de arg, 15 U de INS por cada 100 ml de medio, HC 1 $\mu g/ml$, y FCE 100 ng/ml. Los resultados se trataron de la siguiente manera: los datos del día cero se dividieron entre sí y este resultado se toma como 100%, los datos de los demás días se dividieron entre el valor del día cero para determinar aumento o disminución de la población celular respecto al tiempo.

MX-83 SIN SUERO : Medio MX-83 suplementado con 20 μM de arg, 15 U de INS por cada 100 ml de medio, HC 1 $\mu g/ml$, y FCE 100 ng/ml. Los resultados se trataron de la siguiente manera: Los datos del día cero se dividieron entre sí y este resultado se toma como 100%, los datos de los demás días se dividieron entre el valor del día cero para determinar aumento o disminución de la población celular respecto al tiempo.

RESULTADOS

RENDIMIENTO Y VIABILIDAD

Los resultados de la caracterización de la metodología para obtener suspensiones celulares de hepatocitos fetales utilizando digestión con colagenasa tipo IV para disgregar el tejido, y acción mecánica resuspendiendo con pipeta para minimizar la agregación celular, así como centrifugación para separar los hepatocitos de los otros tipos celulares que se encuentran en el tejido hepático, se muestran en la **tabla 1**, en la cual se reportan, por conteo directo de células en el hemocitómetro, el rango y la media de 24 determinaciones. Se puede observar que se logró un rendimiento entre 12.5×10^6 cél/g y 68×10^6 cél/g, con un promedio de 41.63×10^6 cél/g de tejido hepático y una viabilidad entre 62.96% y 100%.

**CARACTERISTICAS DE LA SUSPENSION DE
HEPATOCITOS FETALES EN 24 DETERMINACIONES**

CARACTERISTICAS	RANGO	\bar{x}
Nº FETOS/CAMADA	7-18	13.25
g HIGADO/CAMADA	0.8-2.2	1.37
g HIGADO/FETO	0.057-0.188	0.107
1×10^6 CEL/g HIGADO	12.5-68	41.63
% DE VIABILIDAD	62.96-100	85.63

TABLA 1. Obtención de hepatocitos fetales, por medio de colagenasa tipo IV en una concentración de 0.05%. Se determinó el rendimiento por conteo directo en el hemocitómetro y la viabilidad por la exclusión de azul de tripano y conteo directo en el hemocitómetro.

DETERMINACION DE LA ADHESION CELULAR

Para determinar el tiempo mínimo en el cual se adhería el mayor número de células, se llevaron a cabo experimentos por cuadruplicado, en los que se determinó la adhesión celular a las cajas de 35 mm de plástico, por medio de conteo en el hemocitómetro a diferentes tiempos.

Los resultados de estos ensayos se expresan en porcentaje en la **figura 1**, en la cual se puede ver que una hora después de haber establecido el cultivo, el porcentaje de adhesión es menor de 20% y este va aumentando de manera proporcional en relación al tiempo hasta estabilizarse a las 3 horas con un porcentaje de 45.6%

DETERMINACION DEL TAMAÑO DEL INOCULO A SEMBRAR

Para saber el No. de células a sembrar por caja de cultivo de 35 mm, se utilizaron cuatro inóculos, 0.5×10^6 , 1×10^6 , 1.5×10^6 y 2.0×10^6 cél/caja. Tres horas después de establecido el cultivo se desprendieron los hepatocitos, y se contaron en el hemocitómetro.

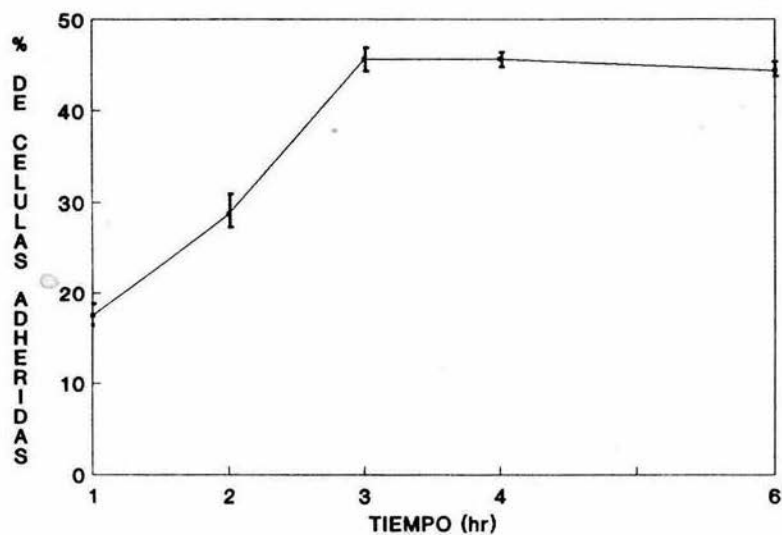


FIGURA 1. Determinación del tiempo de adhesión. Las células se cultivaron por tiempos variables hasta un máximo de 6 hr en medio F12 libre de arginina suplementado con 10% de SFBD, 15 U de INS/100ml de medio, y se utilizaron cajas de plástico de 35 mm. Las células se desprendieron con una solución de tripsina 0.05%/KCL 0.1M, incubando a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂ por 15-20' y se contaron por medio del hemocitómetro.

En la **figura 2** se muestran los resultados de estas determinaciones, y se puede observar que conforme aumenta el tamaño del inóculo, aumenta también el porcentaje de células presentes en los cultivos, de una manera directamente proporcional, hasta el inóculo de 1.5×10^6 células/caja en el que se obtuvo 55% de células adheridas.

DETERMINACION DE PROLIFERACION

INOCULO DE 1×10^6 CEL/CAJA

Como se puede observar en la **figura 3** en los cultivos que no fueron suplementados con HC y FCE el crecimiento tiende a declinar conforme transcurre el tiempo, mientras que en los cultivos suplementados con FCE, y con HC más FCE, se observa un claro efecto proliferativo y este se hace más evidente a partir de las 60 horas de cultivo. Por último, en aquellos grupos suplementados únicamente con HC no se observa proliferación, más bien los cultivos tienden a mantenerse estables.

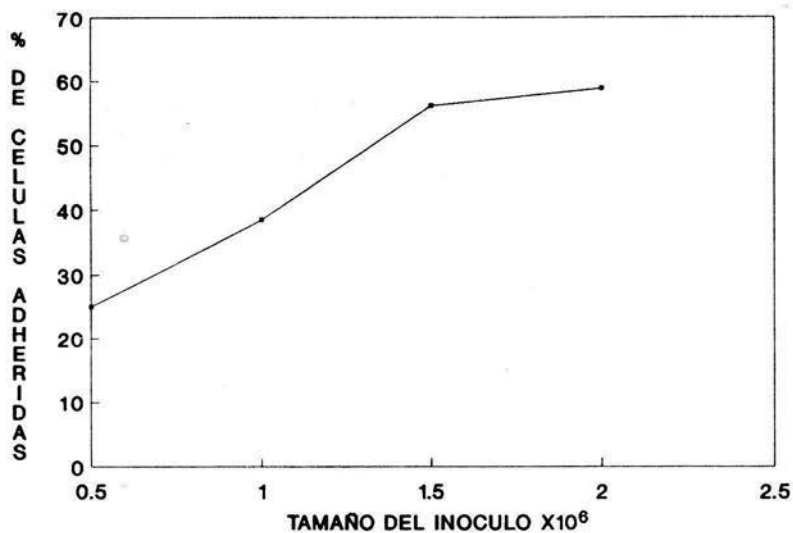


FIGURA 2. Determinación del tamaño del inóculo óptimo. Para los cultivos se utilizó medio F12 libre de arginina suplementado con 10% de SBFD, 15 U de INS por cada 100 ml de medio y 20 μ M de arg. 3 horas después las células se desprendieron de la caja como se indica en material y métodos, haciéndose una mezcla de las células desprendidas para cada inóculo, y se determinó el porcentaje celular.

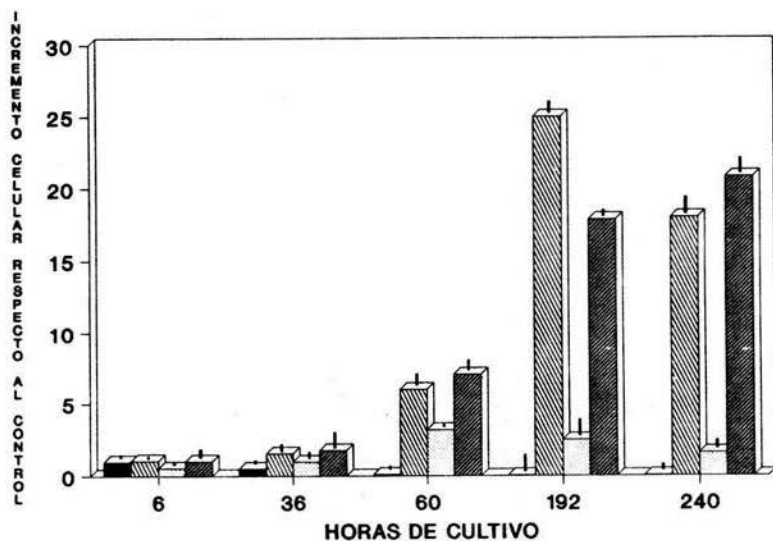


FIGURA 3. Determinación de la proliferación de los hepatocitos con inóculo de 1×10^6 cél/caja. Se utilizó medio F12 libre de arginina, suplementado como se indica en material y métodos. En los tiempos indicados se desprendieron las células y se realizó conteo en el hemocitómetro. Estos experimentos se realizaron por triplicado. Los grupos experimentales fueron los siguientes: control (■), FCE (▨), HC (□), FCE más HC (▤). El número uno en el eje de las "Y" al tiempo cero del control, representa el 100% y el resto de los valores en el mismo eje representan incrementos sobre esta cantidad.

INOCULO DE 6×10^4 CEL/CAJA

En 1989 Hoffmann y cols. reportaron proliferación de hepatocitos fetales de rata por efecto de FCE, HC e INS, trabajando con inóculos pequeños y medio químicamente definido elaborado por ellos y en ausencia de suero fetal dializado. Para ver si el efecto proliferativo observado con este inóculo pequeño era reproducible bajo las condiciones en las que se estableció el cultivo con un inóculo de 1×10^6 cél/caja, se realizaron experimentos con un inóculo de 6×10^4 cél/caja.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la **figura 4**. En los cultivos suplementados con FCE hay efecto proliferativo siendo más claro en el día 4 y en el día 10 respecto a los grupos control. Los cultivos suplementados con FCE más HC no muestran de manera evidente el efecto proliferativo, y los grupos experimentales suplementados con HC, así como los grupos control, no presentan actividad proliferativa.

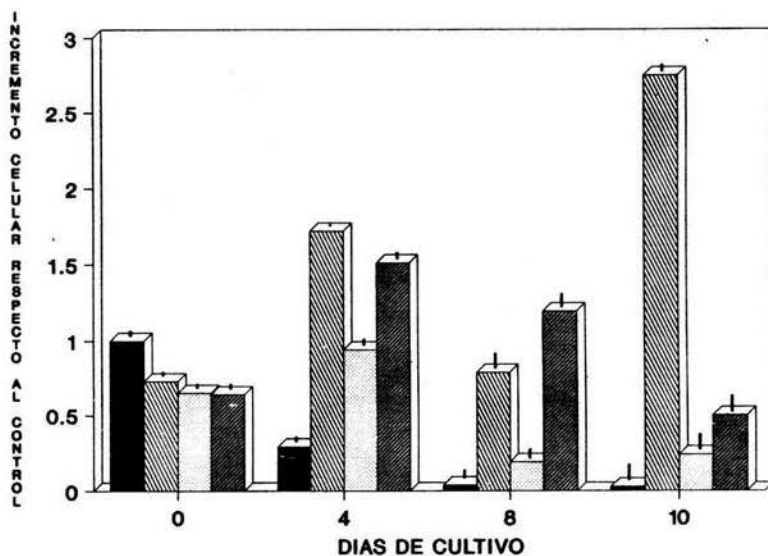


FIGURA 4. Determinación de la proliferación de los hepatocitos utilizando inóculo de 6×10^4 cél/caja. Se utilizó medio F12 libre de arginina, suplementado como se indica en material y métodos. En los tiempos indicados se realizó conteo en el hemocitómetro por triplicado (ver el texto). Los grupos experimentales fueron los siguientes: control (■), FCE (▨), HC (□), FCE más HC (▩). El número uno en el eje de las "Y" al tiempo cero del control, representa el 100% y el resto de los valores sobre el mismo eje representan incrementos sobre esa cantidad.

INOCULO DE 2.5×10^5 CEL/CAJA

Después de realizar los experimentos de proliferación con inóculos grandes y con inóculos pequeños, se efectuaron ensayos con un inóculo intermedio de 2.5×10^5 cél/caja, para ver si se reproducía el efecto proliferativo observado con 1×10^6 cél/caja.

Como se puede observar en la **figura 5**, los grupos experimentales suplementados con FCE, o con FCE más HC, presentan un claro efecto proliferativo y este se hace más evidente a partir de los días 10 y 16, mientras que los grupos experimentales suplementados con HC así como los grupos control no presentan actividad proliferativa, ni se observa que se mantengan estables.

Para corroborar el efecto proliferativo de los factores de crecimiento sobre los hepatocitos fetales, se realizaron determinaciones de incorporación de TH^3 , a la par de los conteos celulares en el hemocitómetro.

Los resultados de estos experimentos (**figura 6**) indican que los grupos experimentales suplementados con FCE presentan un alto porcentaje de incorporación de TH^3 respecto a los grupos control, un resultado similar se observa en

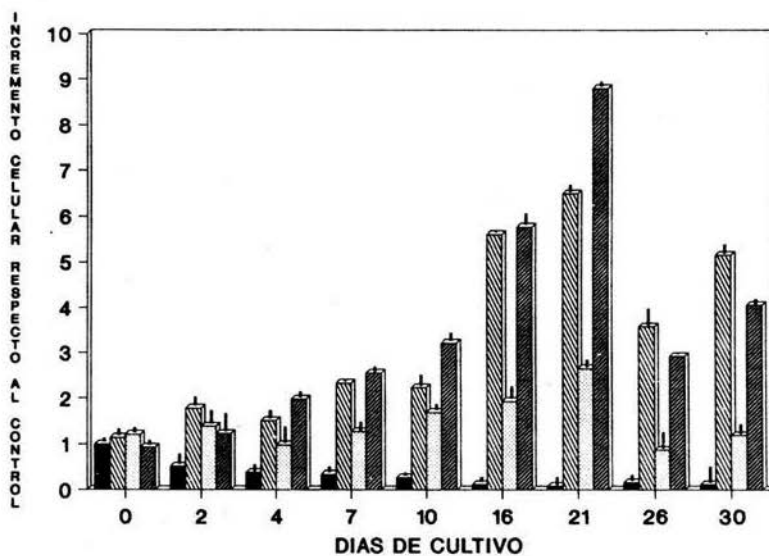


FIGURA 5. Determinación de la proliferación de los hepatocitos empleando un inóculo de 2.5×10^5 cél/caja. Se utilizó medio F12 libre de arginina, suplementado como se indica en el texto. En los tiempos establecidos se realizó conteo celular por triplicado (ver material y métodos). Control (■), FCE (▨), HC (▩), FCE más HC (▧). El número uno en el eje de las "Y" al tiempo cero del control, representa el 100% y el resto de los valores en el mismo eje representan incrementos sobre esa cantidad.

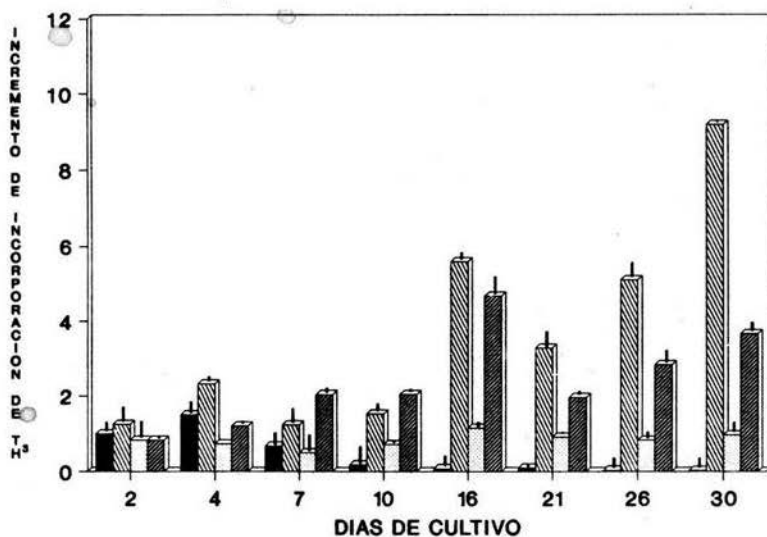


FIGURA 6. Determinación de la incorporación de TH^3 en cultivos de hepatocitos utilizando un inóculo de 2.5×10^5 cél/caja. En los tiempos indicados se determinó la incorporación de TH^3 , como se describió en material y métodos, utilizando un contador de centelleo líquido. Los experimentos se realizaron por triplicado. Control (■), FCE (▨), HC (□), FCE más HC (▩). El número uno en el eje de las "Y" al tiempo cero del control, representa el 100% y el resto de los valores en el mismo eje representan incrementos sobre esa cantidad.

aquellos cultivos suplementados con FCE más HC, mientras que los grupos experimentales en los que solo estuvo presente HC la incorporación tiende a ser estable respecto a los grupos control.

MEDIO MX-83

El medio MX-83 favorece la replicación de hepatocitos de rata fetal en ausencia de suero de bovino fetal dializado cuando se adiciona con FCE, INS, e HC (Hoffmann y cols., 1989). Para ver si el efecto proliferativo observado con medio F12 se reproducía con medio MX-83 en presencia y/o ausencia de suero fetal dializado se realizaron ensayos trabajando con dos grupos experimentales suplementados ambos con FCE más HC e INS.

Los resultados del conteo celular en el hemocitómetro de estos experimentos, se muestran en la **figura 7**. Como se puede observar, en los cultivos suplementados con SBFD se aprecia cierto aumento en el porcentaje celular respecto a los cultivos sin SBFD, en los cuales hay una tendencia a mantenerse estables. Por otro lado, los resultados de las determinaciones de la incorporación de TH^3 se expresan en porcentaje de

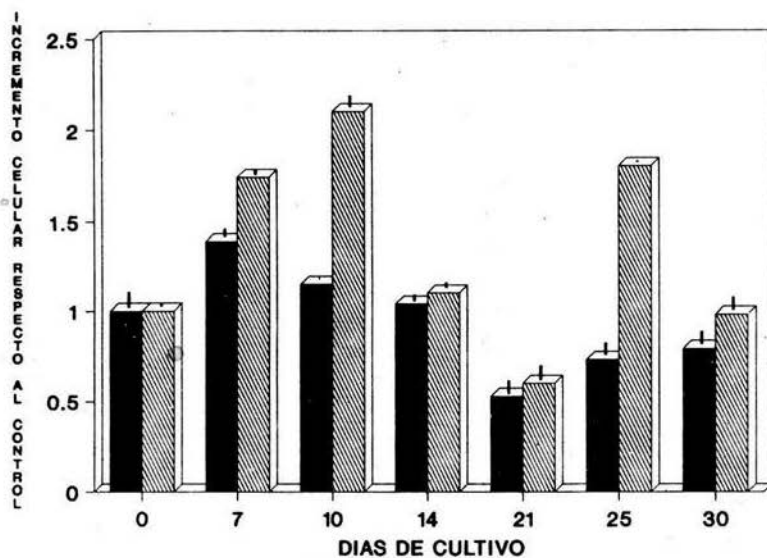


FIGURA 7. Análisis comparativo de la proliferación de los hepatocitos en presencia y ausencia de suero en medio selectivo MX-83. El medio se suplementó con FCE más HC, INS, y arginina, en las concentraciones que se reportan en el texto. En los tiempos establecidos se realizó conteo celular por triplicado en los cultivos, como se indica en material y métodos. Medio sin suero (■), medio con suero (▨). 2.5×10^5 cél/caja. El número uno en el eje de las "Y" al tiempo cero del medio sin suero, representa el 100% y el resto de los valores en el mismo eje representan incrementos sobre esa cantidad.

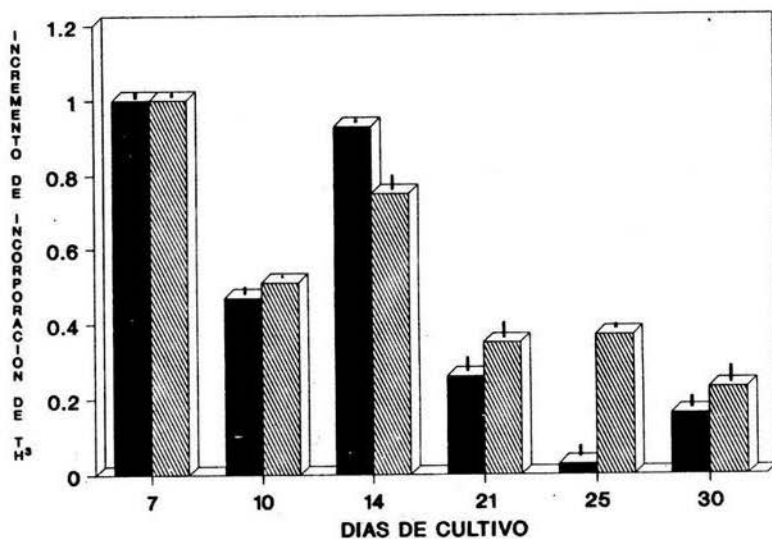


FIGURA 8. Determinación de la incorporación de TH^3 en cultivo de hepatocitos, en medio MX-83 en presencia o ausencia de suero. Los experimentos se realizaron por triplicado. En los tiempos especificados se midió la incorporación de TH^3 , como se indica en material y métodos. El inóculo fué de 2.5×10^5 cél/caja. Medio sin suero (■), medio con suero (▨). El número uno en el eje de las "Y" al tiempo cero del medio sin suero, representa el 100% y el resto de los valores en el mismo eje representan incrementos sobre ese valor.

incorporación de TH^3 en la **figura 8** y se puede observar que la incorporación de TH^3 tiende a decrecer conforme avanza el tiempo de experimentación tanto en aquellos cultivos suplementados con suero, como en aquellos cultivos que no estuvieron suplementados con suero.

DISCUSION

Con la metodología descrita en este trabajo para obtener suspensiones celulares de hepatocitos de hamster fetal se encontró que el rendimiento celular por gramo de hígado (**tabla 1**) está dentro de lo reportado en la literatura (Leffert, et al, 1984), e inclusive el rendimiento promedio de 41.63×10^6 cél/g supera el rendimiento reportado por otros autores (Lorenzo y cols., 1986; Roncero y cols., 1989). En cuanto a la viabilidad obtenida, esta supera lo reportado por los autores ya mencionados (Leffert y cols., 1984; Lorenzo y cols., 1986; y Roncero y cols., 1989) por lo que se puede decir que en relación a estos dos criterios, esta metodología es adecuada para obtener la suspensión celular de hepatocitos fetales.

Varios autores reportan que después de dos horas de cultivo retiran el medio para eliminar las células que no se adhirieron al sustrato, pero no mencionan el porcentaje de células adheridas (Balavoine, et al, 1992; Hoffmann y Paul, 1990; Leffert y Paul, 1972;). En este trabajo se determinó el tiempo óptimo de adhesión (**figura 1**), es decir, el tiempo mínimo en el que se adhiere el mayor número de células al sustrato, el cual se encontró entre 3-4 horas de establecido el cultivo, y esta adhesión fué de 45.6%, se puede decir que estos resultados son una contribución para el posterior establecimiento de cultivos celulares.

Como el establecimiento de este cultivo primario es parte de un proyecto más ambicioso, en el cual el cultivo se utilizará como modelo en el estudio de carcinogénesis química, es muy importante que haya un número celular grande para tener un número adecuado de células en fase S y así tener las máximas probabilidades de afectar el ADN, por tal motivo se determinaron varios inóculos a sembrar (**figura 2**), observando que con 1×10^6 células se puede medir claramente el efecto proliferativo inducido por los factores de crecimiento (FCE, HC), **figura 3**.

Por otro lado, aunque con inóculos grandes se observa proliferación, es importante que al darse ésta, las células tengan condiciones suficientes para dividirse el mayor número

de veces posible para que durante estas divisiones se pueda producir daño genético y este permanezca en las células. Es importante no saturar el cultivo con una gran densidad poblacional en donde se presente el fenómeno de inhibición por contacto y la falta de nutrimentos. Debido a esto, se realizaron experimentos para determinar la proliferación de hepatocitos fetales utilizando inóculos de 6×10^4 y de 2.5×10^5 cél/caja.

En los cultivos con 6×10^4 células se observa cierto efecto proliferativo solo con FCE y no con FCE más HC (**figura 4**). En los cultivos con una densidad poblacional intermedia (2.5×10^5 células) suplementados con FCE más HC y en aquellos suplementados solo con FCE se puede observar un claro efecto proliferativo (**figuras 5 y 6**), podría pensarse que bajo estas condiciones la densidad celular en el cultivo, tiene un papel importante en la proliferación ya que esta no se observa con 6×10^4 células por caja.

Los intentos por favorecer la proliferación de los hepatocitos fetales utilizando el medio MX-83 químicamente definido (**figuras 7 y 8**), no concuerdan con los resultados obtenidos por Hoffmann y cols. en 1989. Tal vez esto se deba a que se utilizó una densidad poblacional más grande (2.5×10^5 cél/caja) y esto haya afectado el crecimiento celular, o bien, que al elaborar el medio de cultivo se haya hecho de tal forma

que las condiciones no fueran las mismas o que alguno de los componentes del mismo se hubiese inactivado, y que por esas u otras razones no se pudiera reproducir el efecto proliferativo con este medio. Por otro lado, habría que corroborar si el medio MX-83 elaborado en el laboratorio favorece la proliferación de hepatocitos fetales con inóculos más pequeños.

CONCLUSIONES

- De los resultados de rendimiento y viabilidad, se puede concluir que la metodología utilizada para obtener suspensiones celulares de hepatocitos fetales, es adecuada para el establecimiento de cultivos primarios de hepatocitos de hamster fetal.

- El tiempo de 3 y 4 horas de adhesión determinado, en cajas de plástico de 35 mm, es el óptimo para que se adhiera el mayor número de células al sustrato.

- Los hepatocitos de hamster fetal en cultivo primario son proliferativos en el medio de cultivo F12 libre de arginina, con densidades poblacionales de 1×10^6 y 2.5×10^5 , y con la

adición de HC y FCE.

- No se observa un claro crecimiento de los hepatocitos de hamster fetal con densidad poblacional de 6×10^4 cél/caja con medio F12 suplementado con FCE más HC. Aunque, se observa cierto efecto proliferativo en las cajas que únicamente se suplementaron con FCE.

- No se observa crecimiento de los hepatocitos en el medio de cultivo químicamente definido MX-83, y a una densidad de 2.5×10^5 cél/caja con FCE más HC, con o sin suero de bovino fetal dializado.

- Se alcanzaron las metas de la caracterización de los cultivos primarios de hepatocitos fetales. Los resultados obtenidos indican que bajo las condiciones descritas se tiene un cultivo primario de hepatocitos proliferativo, que puede ser utilizado para estudios de carcinogénesis química.

- Los cultivos primarios establecidos en este trabajo ya han sido utilizados para estudiar la iniciación inducida por carcinógenos químicos (Marché C., A. comunicación personal), con lo que se concluye que estos cultivos primarios de hepatocitos de hamster fetal pueden ser utilizados para estudios de carcinogénesis.

BIBLIOGRAFIA

- Balavoine, S., Rogier, E., Feldmann, G., & Lardeux, B. 1992. *Responsiveness of RNA degradation to amino acids in cultured rat hepatocytes: comparison with isolated rat hepatocytes.* J. Cell. Physiol. 150: 149-157.
- Berry, M.N. & Friend, D.S. 1969. *High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells.* J. Cell. Biol. 43:506-520.
- Farber, E., & Sarma, D.S.R. 1987. *Hepatocarcinogenesis: a dynamic cellular perspective.* Lab. Invest. 56 (1): 4-22.
- Hall, J., Brésil, H., Serres, M., Martel-Planche, G., Wild, C.P., & Montesano, R. 1990. *Modulation of O⁶-methyl guanine-DNA methyltransferase in rat and hamster liver after treatment with dimethylnitrosamine.* Cancer Res. 50: 5426-5430.
- Hayashi, I., & Carr, B. *Rat hepatocytes in culture: a model for studies of growth control during experimental chemical hepatocarcinogenesis*, en: *Mammalian Cell Culture: The Use of Serum-Free Hormone-Supplemented Media*, 1984, (Mather, P., ed.), Plenum Press, Londres, pp. 151-166.
- Henderson, G.I., Baskin, G.S., Horbach, J., Porter, P., & Schenker, S. 1989. *Arrest of epidermal Growth factor-dependent Growth in fetal hepatocytes after ethanol exposure.* J. Clin. Invest. 84: 1287-1294.
- Hillis, W.D., & Bang, F.B. 1959. *Cultivation of embryonic and adult liver cells on collagen substrate.* Exp. Cell. Res. 17: 557-560.

- Hoffmann, B., Piasecki, A., & Paul, D. 1989. Proliferation of fetal rat hepatocytes in response to growth factors and hormones in primary culture. *J. Cell. Physiol.* 139: 654-662.
- Hoffmann, B. & Paul, D. 1990. Precocious induction of tyrosine aminotransferase mRNA by hydrocortisone in cultured fetal rat hepatocytes at different developmental stages. *J. Cell. Physiol.* 143: 352-356.
- Iturralde, M., Alava, M.A., González, B., Anel, A., & Piñeiro, A. 1991. Effect of α -fetoprotein and albumin on the uptake of polyunsaturated fatty acids by rat hepatoma cells and fetal rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1086: 81-88.
- Koch, K., & Leffert, H.L. 1974. growth control of differentiated fetal rat hepatocytes in primary monolayer culture. VI. Studies with conditioned medium and its functional interactions with serum factors. *J. Cell. Biol.* 62: 780-791.
- Laishes, B.A., & Williams, G.M. 1976. Conditions affecting primary cell cultures of functional adult rat hepatocytes. I. The effect of insuline. *In Vitro.* 12: 521-532.
- Laishes, B.A., & Williams, G.M. 1976(a). Conditions affecting primary cell cultures of functional adult rat hepatocytes. II. dexamethasone enhanced longevity and maintenance of morfology. *In Vitro.* 12: 821-832.
- Leffert, H.L., & Paul, D. 1972. Studies on primary cultures of differentiated fetal liver cells. *J. Cell. Biol.* 52: 559-568.

- Leffert, H.L., & Paul, D. 1973. Serum dependent growth of primary cultured differentiated fetal rat hepatocytes in arginine-deficient medium. *J. Cell. Physiol.* 81: 113-124.
- Leffert, H.L. & Sell, S. 1974. Alpha₁-fetoprotein biosynthesis during the growth cycle of differentiated fetal rat hepatocytes in primary monolayer culture. *J. Cell. Biol.* 61: 823-829.
- Leffert, H.L. 1974. growth control of differentiated fetal rat hepatocytes in primary monolayer culture. V. Occurrence in dialyzed fetal bovine serum of macromolecules having both positive and negative growth regulatory functions. *J. Cell. Biol.* 62: 767-779.
- Leffert, H.L. 1974(a). growth control of differentiated fetal rat hepatocytes in primary monolayer culture. VII. Hormonal control of DNA synthesis and its possible significance to the problem of liver regeneration. *J. Cell. Biol.* 62: 792-801.
- Leffert, H.L., & Weinstein, D.B. 1976. growth control of differentiated fetal rat hepatocytes in primary monolayer culture. IX. Specific inhibition of DNA synthesis initiation by very low density lipoprotein and possible significance to the problem of liver regeneration. *J. Cell. Biol.* 70: 20-32.
- Leffert, H.L., Koch, K.S., & Skelly, H. Primary culture of hepatocytes, en: *Cell Culture Methods for Molecular and Cell Biology*, 1984, vol. 3, (Barnes, D.W., Sirbasku, D.A., & Sato, G.H., eds.), Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 43-55.
- Legrand, P. & Bensadoun, A. 1991. Stearyl-CoA desaturase activity in cultured rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1086: 89-94.

- León, J., Guerrero, I., & Pellicer, A. 1988. *Activación de los oncogenes por radiación y agentes químicos*. Investigación y Ciencia. 143: 20-32.
- Lorenzo, M., Roncero, C., & Benito, M. 1986. *The rol of prolactin and progesterone in the regulation of lipogenesis in maternal and foetal rat liver in vivo and isolated hepatocytes during the last day of gestation*. Biochem. J. 239: 135-139.
- Maslansky, C.J., & Williams, G.M. 1981. *Evidence for an epigenetic mode of action in organochlorine pesticide hepatocarcinogenity: a lack of genotoxicity in rat, mouse, and hamster hepatocytes*. J. Toxicol. Environ. Healt. 8: 121-130.
- McQueen, C.A., Maslansky, C.J., Crescenzi, S.B., & Williams, G.M. 1981. *The genotoxicity of 4,4'-Methylenebis-2-chloroaniline in rat, mouse, and hamster hepatocytes*. Toxicol. Appl. Pharmacol. 58: 231-235.
- Mendoza-Figueroa, T. 1984. *Dimethylnitrosamine genotoxicity in rat liver primary cell cultures with low cytochrome P-450 levels*. J. Appl. Toxicol. 4 (6): 297-303.
- Namba, M., Hyodo, F., & Kimoto, T. *Establishment of a fibroblastic cell line and an epithelial cell line from livers of chinese hamsters: effects of dexamethasone on survival and proliferation of cells*. En: Nutritional Requirements of cultured cells. (Katsuta, H. edit.). Japan Scientific Press, Tokio. 1978. p.p. 227-291.
- Patsch, W., Gotto, A.M., & Patsch, J.R. 1986. *Effects of insulin on lipoprotein secretion in rat hepatocyte culture. The role of the insulin receptor*. J. Biol. Chem. 261(21): 9603-9606.

- Paul, D., & Piasecki, A. 1984. Rat platelets contain growth factor(s) distinct from PDGF which stimulate DNA synthesis in primary adult rat hepatocyte cultures. *Exp. Cell. Res.* 154: 95-100.
- Pitot, H.C. 1990. Altered hepatic foci: Their role in murine hepatocarcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 465-500.
- Roncero, C., Lorenzo, M., Fabregat, I., & Benito, M. 1989. Rates of lipogenesis in fetal hepatocytes in suspension and in primary culture: hormonal effects. *Biochim. Biophys. Acta.* 1012: 320-324.
- Rose, G.G., Kumegawa, M., Cattoni, M. 1968. The circumfusion system for multipurpose culture chambers. II. The protracted maintenance of differentiation of fetal and newborn mouse liver in vitro. *J. Cell. Biol.* 39: 430-450.
- Rossberger, S. & Andrae, V. 1987. Background DNA repair synthesis in rat hepatocyte cultures used for genotoxicity testing. *Toxic. in vitro.* 1 (4): 215-223.
- Satoh, M., & Yamazaki, M. 1992. Tumor necrosis factor stimulates DNA synthesis of mouse hepatocytes in primary culture and is suppressed by transforming growth factor β and interleukin 6. *J. Cell. Physiol.* 150: 134-139.
- Singh, G., & Veltri, K.L. 1991. A mechanism for the loss of cytochrome P-450 in primary mouse hepatocytes. *Mol. Cell. Biochem.* 108: 151-156.
- Tönjes, R.R., Xanthopoulos, K.G., Darnell, J. E., & Paul, D. 1992. Transcriptional control in hepatocytes of normal and $c^{14}Cos$ albino deletion mice. *The EMBO J.* 11 (1): 127-133.

Williams, G.M., Bermudez, E., & Scaramuzzino, D. 1977. Rat hepatocyte primary cell cultures. III. Improved dissociation and attachment techniques and the enhancement of survival by culture medium. *In Vitro*. 13 (12): 809-817.

Williams, G.M. 1977. Detection of chemical carcinogens by unscheduled DNA synthesis in rat liver primary cell cultures. *Cancer Res.* 37: 1845-1851.

Williams, G.M. DNA repair and mutagenesis in liver cultures as indicators in chemical carcinogen screening. En: *Advances in modern environmental toxicology, 1980, vol.1* (Mishra, N., Dunkel, V., & Mehlman, M., eds.), Senate Press, Inc., New Jersey, pp. 273-296.

Williams, G.M., Laspia, M.F., & Dunkel, V.C. 1982. Reliability of the hepatocyte primary culture/DNA repair test in testing of coded carcinogens and noncarcinogens. *Mutation Res.* 97: 359-370.

Yeoh, G.C.T., Hilliard, C., Fletcher, S., & Douglas, A. 1990. Gene expression in clonally derived cell lines produced by in vitro transformation of rat fetal hepatocytes: isolation of cell lines which retain liver-specific markers. *Cancer Res.* 50: 7593-7602.

Yuspa, S.H. & Poirier, M.C. 1988. chemical carcinogenesis: From animal models to molecular models in one decade. *Adv. Cancer Res.* 50: 25-69.