



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

CAMPUS IZTACALA

**TRANSFORMACIÓN DE HEPATOCITOS FETALES EN CULTIVO
PRIMARIO CON CARCINÓGENOS QUÍMICOS**

BO 1303/97
Ej. 1

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

PRESENTA:

MINERVA ARCE FONSECA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. SAÚL VILLA TREVIÑO



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO

1997



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.



ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA
 JEFATURA DE LA CARRERA DE BIOLOGIA

UNIVERSIDAD NACIONAL
 AUTÓNOMA

Los Reyes Iztacala, a 27 de noviembre de 1996

APROBACION DE TESIS

LIC. AMERICA LANDA ROMERO
 JEFE DE LA UNIDAD
 DE ADMINISTRACION ESCOLAR.
 P R E S E N T E .

Por medio de la presente manifestamos a Ud. que como Miembros de la Comisión Dictaminadora del trabajo de Tesis del Pasante de Biología:

MINERVA ARCE FONSECA

titulado:

"TRANSFORMACION DE HEPATOCITOS FETALES EN CULTIVO
 PRIMARIO CON CARCINOGENOS QUIMICOS"

para obtener el grado de Licenciatura, después de haber sido cuidadosamente revisado y realizadas las correcciones que se consideraron pertinentes, declaramos nuestra aprobación del trabajo escrito, ya que reúne las características, calidad y decoro académico del título al que aspira.

A t e n t a m e n t e
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

M. EN C. MARTHA SALCEDO ALVAREZ

BIOL. HUGO V. PERALES VELA

BIOL. JOSEFINA VAZQUEZ MEDRANO

DR. SAUL VILLA TREVIÑO

M. EN C. ISMAEL LEDESMA MATEOS

(Nombre completo)

Martha Salcedo Alvarez
Hugo V. Perales Vela
Josefina Vazquez Medrano
Saul Villa Treviño
Ismael Ledesma Mateos

(Firma)

*Dedico esta tesis con todo cariño a quienes me han dado sin medida su amor,
apoyo y comprensión:*

*a mis padres, Mary y Ale,
a mis hermanos, Tania y Memo,
a mi abuelita Atzimba y
al amor de mi vida, Sergio.*

A Penélope, Gaby y Trini por ser mis mejores amigas.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Saúl Villa Treviño por la dirección de esta tesis así como por el apoyo y estímulo brindados durante mi estancia en el laboratorio.

A Samia y a Evelia por haberme ayudado en el trabajo experimental y por sus consejos y compañerismo.

A mis revisores de tesis por sus comentarios y sugerencias.

A mis profesores de la carrera de biología del plan modular por haber contribuido en mi formación como profesionista.

A mis compañeros de la carrera por los bellos momentos compartidos durante 4 años.

ÍNDICE

Página

ABREVIATURAS	i
---------------------------	---

RESUMEN	iii
----------------------	-----

INTRODUCCIÓN

Definición de cáncer.....	1
Incidencia del cáncer.....	2
Aspectos históricos.....	4
Datos históricos contemporáneos.....	5

AGENTES ETIOLÓGICOS DEL CÁNCER

Agentes ambientales.....	6
Agentes químicos.....	8
Agentes físicos.....	9
Agentes biológicos.....	10
Factores genéticos.....	11

ETAPAS DEL PROCESO CARCINOGENÉTICO	13
---	----

METABOLISMO DE AGENTES QUÍMICOS	16
--	----

HEPATOCARCINOGENESIS

Modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	17
--	----

MARCADORES DE TRANSFORMACIÓN CELULAR	19
---	----

OBJETIVO GENERAL	23
-------------------------------	----

OBJETIVOS PARTICULARES	23
-------------------------------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la suspensión celular.....	24
---	----

Estimación del número de células.....	24
---------------------------------------	----

Determinación de la viabilidad celular.....	25
---	----

Determinación del tiempo de adhesión celular.....	25
---	----

Determinación del mejor inóculo.....	26
--------------------------------------	----

Determinación de la proliferación celular

a) Conteo de células en el hemocitómetro.....	26
---	----

b) Incorporación de timidina tritiada.....	27
--	----

Tratamiento de los hepatocitos en cultivo primario.....	27
---	----

Determinación de la transformación celular

a) Siembra en agar blando.....	28
--------------------------------	----

b) Detección de la GST-P por inmunofluorescencia indirecta.....	28
--	----

RESULTADOS

Caracterización de la suspensión celular.....	30
---	----

Determinación del tiempo de adhesión.....	30
---	----

Determinación del mejor inóculo.....	31
Determinación del proliferación celular	
a) Conteo de células en el hemocitómetro.....	32
b) Incorporación de timidina tritiada.....	34
Determinación de la transformación celular	
a) Siembra en agar blando.....	34
b) Detección de la GST-P por inmunofluorescencia indirecta.....	36
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIONES.....	42
BIBLIOGRAFÍA.....	44

ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpo
Ca ²⁺	Calcio
Ci	Couries
CO ₂	Bióxido de carbono
DEN	Dietilnitrosamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dpm	Desintegraciones por minuto
EGTA	Etilen glicol-bis (β-amino etil éter) N, N, N', N' - ácido tetra acético
F12	Medio de cultivo
g	Gramo
GST	Glutación-S-transferasa
hr	Horas
KCl	Cloruro de potasio
K ₂ HPO ₄	Fosfato dibásico de potasio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio
mm	Milímetro
mmol	Milimol
mM	Milimolar
ml	Mililitro
μCi	Microcouries

μM	Micromolar
μl	Microlitro
MDAB	3'-metil-4-dimetil-aminoazobenceno
MEM	Medio mínimo esencial
NaCl	Cloruro de sodio
Na_2HPO_4	Fosfato dibásico de sodio
PB	Fenobarbital
PBS	Amortiguador de fosfatos
PVC	Cloruro de polivinilo
REL	Retículo endoplásmico liso
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecíl sulfato de sodio
TCA	Ácido tricloro acético
TD	Solución salina
TH^3	Timidina tritiada

RESUMEN

Diversos modelos *in vivo* han sido desarrollados, especialmente en rata, para examinar tanto cualitativa como cuantitativamente el proceso de la hepatocarcinogénesis. Dadas las similitudes entre el desarrollo gradual del cáncer en diversos órganos y tejidos, la información que se obtenga acerca de cualquier etapa en el desarrollo del cáncer de hígado puede ser extrapolada al proceso neoplásico en otros órganos o tejidos. El desarrollo de los sistemas *in vitro* surgió como una alternativa para el análisis a nivel celular del proceso carcinogénico, ya que, se puede observar con más detalle el crecimiento autónomo de las células neoplásicas y se puede tener control de las dosis empleadas tanto del iniciador como del promotor y reducir el tiempo de tratamiento. Los cultivos primarios de hepatocitos de roedores adultos no proliferan, lo cual ha limitado su uso en el estudio del proceso carcinogénico. Por lo anterior, en el presente estudio se desarrolló un cultivo de hepatocitos de fetos de hámster los cuales muestran proliferación y presentan algunos de los cambios que ocurren a nivel molecular en las etapas de iniciación y promoción del proceso carcinogénico.

El método de preparación de la suspensión de hepatocitos fetales de hámster se caracterizó por un rendimiento de 35.47×10^6 células/g de hígado con una viabilidad del 85.04 %. El periodo que se requiere para una adhesión adecuada fue de 2 a 5 horas. Los hepatocitos fetales cultivados en medio F12 libre de arginina y suplementado con suero, insulina e hidrocortisona, mantuvieron la proliferación por 45 días. El inóculo que presentó mayor proliferación fue el de 2×10^5 células/ml, el cual tuvo 3 ciclos de duplicación. El inóculo idóneo para ensayos de proliferación y transformación celulares

fue el de 8×10^5 células/ml. No se observó crecimiento de células tratadas en el agar blando, lo que implica que este periodo de tratamiento no fue suficiente para que las células expresaran autonomía, sin embargo, la inmunofluorescencia indirecta fue útil para detectar a la glutatión-S-transferasa clase Pi (GST-P) a partir de los 5 días de cultivo después del tratamiento con carcinógenos. Células tratadas con el promotor fenobarbital (PB) fueron positivas para GST-P a los 5 y 24 días, mientras que para el día 8 fueron negativas. Las células tratadas con el iniciador dietilnitrosamina (DEN) no presentaron GST-P a los 3, 8 y 24 días pero sí a los 5. Para todos los casos los controles fueron negativos. Las células tratadas a diferentes tiempos con DEN y PB fueron positivas, lo que nos sugiere que dicho tratamiento mantuvo a las células en el proceso de iniciación-promoción.

INTRODUCCIÓN

Definición de cáncer.

El cáncer puede ser definido como un trastorno en los mecanismos que controlan la proliferación y la diferenciación en las células de organismos pluricelulares. El problema se manifiesta en la perturbación de la tasa de crecimiento (relación entre las células nuevas y las células que mueren) y no tanto en el incremento de la velocidad de la proliferación celular. En los tumores, no necesariamente hay una velocidad incrementada de la proliferación celular, lo que existe es una pérdida de equilibrio entre la proliferación, diferenciación y muerte. Así, el cáncer se caracteriza por una proliferación celular descontrolada unida a una pérdida de rasgos de diferenciación y a una mortalidad disminuída. La coordinación precisa entre estos tres procesos es vital para el desarrollo normal y la renovación de los tejidos (Torroella y Villa , 1997).

Las células que integran los tejidos presentan las siguientes características:

- ◆ Tienen funciones específicas como consecuencia del proceso de diferenciación.
- ◆ Tienen un tiempo de vida definido.
- ◆ Presentan inhibición al contacto, es decir, la proliferación de las células se inhibe cuando entran en contacto con otras células vecinas.
- ◆ Su proliferación es controlada. Existen “factores de crecimiento”, en la célula o provenientes de otras células que regulan la división.
- ◆ Presentan dependencia a anclaje, es decir, no tienen posibilidad de moverse y requieren de un soporte sólido sobre el cual fijarse y proliferar.

- ◆ Tienen formas características conferidas por la organización determinada de su citoesqueleto.

En contraste las células malignas, cancerosas o transformadas han adquirido otros rasgos:

- ◆ Son inmortales. Esto se refiere a que tienen un crecimiento indefinido.
- ◆ Su proliferación celular es descontrolada, las células pierden su dependencia a factores de crecimiento.
- ◆ Son independientes a anclaje, por lo que no necesitan de una superficie sólida y adquieren capacidad de movilización y desplazamiento (metástasis).
- ◆ Hay pérdida de la inhibición por contacto, así, las células a pesar de estar confluentes continúan proliferando, adquieren formas redondeadas y comienzan a crecer en varias capas o estratos, formando la masa tumoral o neoplasma (Lewin, 1994).

Incidencia del cáncer.

El cáncer constituye un complejo problema actual; cada año son diagnosticados en el mundo 6.5 millones de nuevos casos. Esta enfermedad se presenta con mayor frecuencia en la edad adulta y en la vejez, sin embargo, también se presenta en niños. Aunque las tasas de curación de esta enfermedad han mejorado ya que, los tumores pueden ser removidos quirúrgicamente o destruidos con químicos tóxicos o radiación, la mortalidad total por cáncer en el mundo sigue en aumento (Torroella y Villa, 1997).

En Estados Unidos de América, las estadísticas del cáncer señalan que 1 de cada 3 personas desarrollará algún tipo de cáncer en su vida, que 2 de cada 3 familias se verán afectadas con un enfermo y que 1 de cada 4 personas morirá por cáncer. Las enfermedades cardiovasculares son la primer causa de muerte en dicho país, afectando a 1 de cada 3

personas, seguidas del cáncer como segunda causa de muerte (tabla 1), y de las enfermedades cerebrovasculares como tercera causa de muerte, incidiendo en 1 de cada 15 personas (Torroella y Villa, 1997) .

Tabla 1. INCIDENCIA Y MORTALIDAD POR CÁNCER EN ESTADOS UNIDOS, 1993.

TIPO DE CANCER	NUEVOS CASOS POR AÑO		MUERTES POR AÑO	
Total	1,170,000		528,300	
Cáncer de epitelios: carcinomas	992,700	(85%)	417,175	(79%)
Cavidad oral y faringe	29,800	(3%)	7,700	(1%)
Órganos digestivos (total)	236,900	(20%)	120,325	(23%)
Colon y recto	152,000	(13%)	57,000	(11%)
Páncreas	27,700	(2%)	25,000	(5%)
Estómago	24,000	(2%)	13,600	(3%)
Hígado y sistema biliar	15,800	(1%)	12,600	(2%)
Sistema respiratorio (total)	187,100	(16%)	154,200	(29%)
Pulmones	170,000	(15%)	149,000	(28%)
Mama	183,000	(16%)	46,300	(9%)
Piel (total)	(>700,000)*		9,100	(2%)
Melanoma maligno	32,000	(3%)	6,800	(1%)
Tracto reproductivo (total)	244,400	(21%)	59,950	(11%)
Próstata	165,00	(14%)	35,000	(7%)
Ovario	22,000	(2%)	13,300	(3%)
Cérvix uterino	13,500	(1%)	4,400	(1%)
Útero (endometrio)	31,000	(3%)	5,700	(1%)
Órganos urinarios (total)	79,500	(7%)	20,800	(4%)
Vejiga	52,300	(4%)	9,900	(2%)
Cáncer de los sistemas hematopoyético e inmune:				
Leucemias y linfomas	93,000	(8%)	50,000	(9%)
Cáncer del sistema nervioso central y de la vista:				
Gliomas, retinoblastoma	18,250	(2%)	12,350	(2%)
Cáncer de los tejidos conectivo, vascular y músculos:				
Sarcomas	8,000	(1%)	4,150	(1%)
Todos los otros tipos de cáncer + sitios inespecíficos	57,050	(5%)	43,425	(8%)

* Los casos de cáncer de piel no melanoma no son incluidos en el total debido a que la mayoría se curan fácilmente y muchos no son registrados.

Al igual que en todo el mundo, los cinco tipos de cáncer más comunes son los de pulmón, estómago, mama, colon/recto, y cérvix uterino, y el número total de nuevos casos por año está justo sobre los 6 millones. Hay que notar que únicamente cerca de la mitad de las personas que desarrollan cáncer mueren por dicha enfermedad.

Tomada de Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D., 1994.

En nuestro país no se cuenta con estadísticas, sin embargo, los registros de la Secretaría de Salud revelan que las principales causas de muerte son las mismas que las reportadas en los países desarrollados (Torroella y Villa, 1997).

Aspectos históricos.

Los antecedentes más antiguos que se tienen del cáncer en el ser humano han sido descritos en momias egipcias de hace 5000 años. Los casos mejor documentados incluyen 3 sarcomas osteogénicos y 3 carcinomas nasofaríngeos. La evidencia de cáncer también existe entre las momias Incas del Perú, cuya edad, determinada con C^{14} es de 2400 años. En estas momias además de sarcoma osteogénico también se identificaron melanomas. Los papiros egipcios de Edwin Smith y Ebers son los registros más viejos en los que se mencionan los tumores de mama y cáncer de piel. Dichos papiros tienen aproximadamente 3500 años. Hace 2400 años Hipócrates describió en sus escritos el cáncer de mama y el del útero. Este médico griego proponía que era mejor no aplicar ningún tratamiento en caso de cáncer ya que de esta manera el paciente viviría más tiempo. John Hill, cirujano inglés, en 1761 reportó 6 casos de pólipos nasales relacionados con el uso de rapé. Más tarde, en 1795, Soemmeing, otro cirujano inglés, identificó al tabaco como un carcinógeno y mencionó que el carcinoma de labio ocurría más frecuentemente en personas que tenían el hábito de fumar pipa. En esa misma época Percival Pott, cirujano londinense, hizo la descripción del cáncer de escroto en limpiadores de chimeneas y fue el primero en reconocer un cáncer ocupacional causado por la exposición crónica a agentes ambientales como el alquitrán de hulla y el hollín (Shimkin, 1979).

Datos históricos contemporáneos.

La carcinogénesis química en seres humanos fue primeramente documentada por Pott en 1775, desde entonces se han reportado muchos compuestos que son carcinogénicos para el ser humano. Haenszel y Kurihara, en 1968, a partir de una investigación en poblaciones de emigrantes, demostraron que factores presentes en el ambiente son muy importantes en la producción del cáncer en el hombre. En Japón hay una incidencia muy alta de cáncer de estómago y una baja incidencia de cáncer intestinal, mientras que en Estados Unidos ocurre lo contrario. En este estudio se demostró que en los japoneses emigrantes a Estados Unidos la incidencia de estos tipos de cáncer fue intermedia a la de los dos países. En la segunda generación de emigrantes, la incidencia fue la misma que para los norteamericanos. Con esto se concluyó que para el cáncer de estómago e intestino, el factor ambiental, y posiblemente el régimen alimenticio, es más importante que el genético. Estas y muchas otras observaciones que relacionaban la exposición a químicos particulares con ciertos tipos de cáncer motivó a muchos científicos a experimentar con animales induciendo tumores en sitios específicos usando los agentes químicos implicados, así se iniciaron los estudios encaminados a comprender el proceso carcinogénico (Heidelberger, 1975).

Los experimentos de Yamagiwa e Ichikawa en 1915 abrieron el campo de la carcinogénesis química experimental al producir un carcinoma en la piel de conejos por aplicaciones de alquitrán en las orejas durante un periodo prolongado de 100 días. Pocos años después (1918) Tsutsui describió la inducción de tumores malignos de piel en ratón (Tomatis, L.; Aitio, A.; Wilbourn, J.; Shuker, L., 1989).

AGENTES ETIOLÓGICOS DEL CÁNCER

La identificación de agentes causantes de cáncer ha sido dilucidada por estudios epidemiológicos, y directamente de pruebas experimentales, los cuales han mostrado que el 90 % de los casos de cáncer en el ser humano es causado por productos químicos, mientras que el restante 10 % es producido por factores genéticos, virales y físicos (Heidelberger, 1975).

Agentes ambientales.

Algunos agentes que contribuyen a la aparición o desarrollo del cáncer se enlistan en las tablas 2, 3 y 4.

Tabla 2. TIPOS DE CÁNCER OCUPACIONAL

Agente	Ocupación	Sitio del cáncer
Radiaciones ionizantes		
radón	Trabajadores de algunas minas subterráneas (uranio, fluoropatos, hematita)	Bronquios
rayos X, radio	Radiólogos, radiógrafos	Piel
radio	Pintores	Hueso
Luz ultravioleta	Campesinos, marineros	Piel
Hidrocarburos policíclicos en hollín, alquitrán, petróleo	Limpiadores de chimeneas, manufactureros del gas de hulla y otros trabajadores de la industria	Escroto
2-Naftilamina; 1-naftilamina	Trabajadores expuestos a químicos; trabajadores del caucho; manufactureros del gas de hulla	Vejiga
Benzidina; 4-amino-bifenil	Trabajadores expuestos a químicos	Vejiga
Asbestos	Trabajadores de asbestos y astilleros	Bronquios y peritoneo
Arsénico	Trabajadores de minas de oro y fundidores de algunos metales	Piel y bronquios
Bis (clorometilo) éter	Manufactureros de resinas	Bronquios
Benceno	Trabajadores expuestos a pegamentos, barnices, etc.	Médula ósea (leucemia)
Gas mostaza	Manufactureros del gas	Bronquios, laringe, -senos nasales
Cloruro de vinilo	Manufactureros de PVC	Hígado (angiosarcoma)
Mineral de cromo	Manufactureros del cromo	Bronquios
Mineral de níquel	Trabajadores que refinan el níquel	Bronquios y senos nasales
Aceite de isopropilo	Manufactureros de isopropileno	Senos nasales
*	Carpinteros	Senos nasales
*	Curtidores	Senos nasales

*Agente específico no identificado.

Tomada de Doll, citado por Hiatt, H. H.; Watson, J. D.; Winsten, J. A., en *Origins of Human Cancer*, 1977.

La mayoría de estos agentes fueron identificados por su uso en la industria o como fármacos. Los herbicidas, pesticidas, aditivos alimenticios y desechos industriales pueden también ser responsables del desarrollo de esta enfermedad. Los peligros iatrogénicos no pueden haber contribuido mucho al riesgo total, aunque en algunos países pudieron haber sido responsables del 10 % de todos los casos de cáncer en infantes y de una proporción considerable de un tipo particular de esta enfermedad (Doll, citado por Hiatt *et. al*, en *Origins of Human Cancer*, 1977).

Tabla 3. TIPOS DE CÁNCER IATROGÉNICOS

Agente	Sitio del cáncer
Diagnóstico o terapia con rayos X torio	Todos los sitios Hueso
Torostrasto	Hígado, bazo
Hidrocarburos policíclicos en hulla o alquitrán en parafina líquida	Piel Estómago, colon, recto
Agentes alquilantes melfalano, ciclofosfamida	Leucemia mieloide
Estrógenos estilbestrol	Útero, mama Vagina, mama
Esteroides anticonceptivos	Hígado
Andrógenos (esteroides anabólicos)	Hígado
Arsénico	Piel, pulmón
Clornafacina	Vejiga
Fenacetina	Pelvis renal
Medicamentos inmunosupresivos	Reticulosarcoma
Vacuna de polio contaminada con el virus SV40	Sistema nervioso central

Tomada de Doll, citado por Hiatt *et. al* en *Origins of Human Cancer*, 1977.

Tabla 4. OTROS TIPOS DE CÁNCER AMBIENTAL

Agente	Sitio del cáncer
Luz solar	Piel expuesta (úlceras, carcinoma escamoso, melanoma)
Masticación de betel, tabaco	Boca
Tabaquismo	Paladar, boca, faringe, laringe, bronquios, esófago, vejiga
Bebidas alcohólicas	Boca, faringe, laringe, esófago
Aspectos del intercurso sexual (virus)	Cérvix uterino
Mononucleosis	Enfermedad de Hodgkin (ganglios linfáticos)
Aflatoxina	Hígado
Schistosomiasis	Vejiga

Tomada de Doll, citado por Hiatt, *et. al* en *Origins of Human Cancer*, 1977.

Otro factor ambiental al cual se le está dando mucha importancia actualmente es la dieta. Se ha observado que personas que tienen una alimentación rica en grasas, carne y alimentos con conservadores son más propensas a contraer ciertos tipos de cáncer. Por otro lado, se ha sugerido que algunas sustancias bioquímicas tales como los carotenoides, vitaminas C y E, ácido fólico, selenio y otros elementos traza, pueden reducir el riesgo de padecer cáncer. (Hakama, 1996). Por ejemplo, se piensa que una dieta variada y balanceada rica en frutas frescas y vegetales puede representar la principal medida de protección contra el cáncer gástrico. El efecto de la dieta se basa en el papel antioxidante de los micronutrientes, los cuales pueden actuar en diferentes fases del proceso carcinogénico, interrumpiendo la progresión y lesiones precancerosas (Buatti y Muñoz, citados por Hakama, M.; Beral, V.; Buiatti, E.; Faivre, J.; Parkin, D. M., en *Chemoprevention in Cancer Control*, 1996).

Agentes químicos.

Las poblaciones en general han estado expuestas a agentes químicos que se encuentran en el ambiente, tales agentes incluyen arsénico, asbestos, y cloruro de vinilo e hidrocarburos policíclicos producidos por la combustión de carbón, madera y petróleo, (Doll, citado por Hiatt *et. al* en *Origens of Human cancer*, 1977).

Los agentes genotóxicos pueden actuar directa o indirectamente. Los directos son aquellos que al interaccionar directamente con el DNA inducen un daño. La mayor parte de los agentes genotóxicos son indirectos ya que requieren de una activación o transformación metabólica que modifique su estructura química después de entrar al organismo y de esa manera hacer posible su interacción con el DNA (Torroella y Villa, 1997).

Estas transformaciones metabólicas se efectúan predominantemente en el hígado de los mamíferos o en órganos similares en especies inferiores. Dicho metabolismo requiere de

la participación de las enzimas microsomales pertenecientes a la familia del citocromo P-450 (Alberts *et. al*, 1994).

En su interacción con el DNA, los compuestos químicos son capaces de inducir una gran variedad de daños genéticos, entre los cuales están las mutaciones puntuales, recombinaciones mitóticas recíprocas o no recíprocas, deleciones, aberraciones cromosómicas, etc. En la actualidad se reconoce que no todos los carcinógenos son necesariamente mutágenos, es decir, existen carcinógenos no genotóxicos. Este tipo de compuestos a dosis elevadas pueden inducir cáncer, aparentemente por estimulación de la proliferación celular, ya que al aumentar el número de células en división, aumenta la probabilidad de que ocurran mutaciones o cambios genéticos en algunas de ellas que den lugar al cáncer (Torroella y Villa, 1997).

Agentes físicos.

El cáncer puede ser causado por agentes físicos como las radiaciones. Estas pueden ser genotóxicas cuando causan daño a nivel de DNA o no genotóxicas. Las radiaciones genotóxicas pueden ser ionizantes o no ionizantes. Las radiaciones ionizantes, de mayor contenido energético como la radiación gamma, los rayos X, los neutrones, etc., atraviesan la materia viva ionizando a su paso átomos y generando radicales libres, los cuales al ser sumamente activos, pueden causar daño a nivel de DNA y proteínas. Las radiaciones genotóxicas no ionizantes están representadas por la radiación ultravioleta, la cual interactúa con el DNA induciendo la formación de dímeros de timina interfiriendo así con el proceso normal de replicación del DNA (Torroella y Villa, 1997).

Las radiaciones no genotóxicas son las radiaciones conocidas como de baja frecuencia, tales como ondas de radio, microondas, etc. Este tipo de radiación es la emitida

por los equipos electrónicos de uso cotidiano como televisores, computadoras, hornos de microondas, videograbadoras, etc. Algunos estudios experimentales recientes parecen indicar que este tipo de radiación podría actuar sobre las membranas biológicas alterando el flujo de iones. Otras evidencias señalan que los mecanismos de acción de las radiaciones no genotóxicas son similares a los de los compuestos químicos carcinógenos no genotóxicos (Torroella y Villa, 1997).

Agentes biológicos.

Con respecto a los factores biológicos en la etiología del cáncer también existen los genotóxicos y no genotóxicos. Los factores biológicos carcinogénicos genotóxicos son principalmente los virus, los cuales causan daño en el DNA de las células infectadas y producen algunos tipos de neoplasias malignas. Los virus tumorales causan transformación como consecuencia de su capacidad para integrar su información genética en el DNA de la célula hospedera (Lodish, H.; Baltimore, D.; Berk, A.; Lawrence, S.; Matsudaira, P.; Darnell, J., 1995).

Las diferentes familias de virus de DNA o RNA tumorales que se conocen son: Herpes, Hepatitis B, Papillomavirus, Polyoma y Adenovirus (Lewin, 1994).

Los factores biológicos no genotóxicos están representados por algunos hongos, bacterias y algas. Estos, al infectar de manera crónica algunos tractos del organismo, como el genital o el pulmonar, pueden contribuir al desarrollo de cáncer a través de mecanismos estimuladores de la proliferación de estos tejidos (Torroella y Villa, 1997).

Factores genéticos.

Otros factores que contribuyen a la complejidad del proceso carcinogénico son de naturaleza espontánea o causados por herencia. Las mutaciones espontáneas causantes de algunos tipos de cáncer se deben a procesos biológicos endógenos naturales y comunes que ocurren en las células. Algunos de estos procesos son: la infidelidad de la DNA polimerasa, es decir, errores que puede cometer dicha enzima durante el proceso de replicación del DNA; la depurinación espontánea, o pérdida espontánea de bases púricas por la molécula de DNA; el daño oxidativo causado por radicales libres generados por diferentes procesos biológicos y, la deaminación espontánea de la 5-metil citosina a timina, este cambio de base tiene una eficiencia muy baja de reparación. Si la replicación del DNA ocurre con fallas y no son reparadas, los daños mencionados quedan fijados como mutaciones espontáneas (Torroella y Villa, 1997).

Las diferencias entre las propiedades de las células normales cultivadas y las células transformadas pueden deberse a la expresión de uno o dos genes llamados oncogenes. Un **oncogen** es un gen que codifica para una proteína que cuando es alterada o producida en demasía es capaz de transformar células en cultivo o de inducir cáncer en animales. Se han identificado cerca de 100 oncogenes y éstos son derivados de genes celulares normales. Los genes celulares conocidos como progenitores de los oncogenes son conocidos como **protooncogenes** (tabla 5). Se ha dilucidado que la mayoría de los protooncogenes han sido altamente conservados a través de la evolución ya que sus productos son básicos para el funcionamiento de las células de los animales (Lodish *et. al*, 1995).

La mayoría de los oncogenes derivan de genes cuyos productos actúan en la vía de control del crecimiento celular. Las proteínas codificadas por los oncogenes se denominan oncoproteínas, algunas son formas mutantes de las proteínas producidas por los proto-

oncogenes correspondientes. En otros casos, la proteína producto de un oncogen y su protooncogen es la misma. La oncoproteína causa cáncer por estar presente donde normalmente no está o porque se encuentra expresada en un nivel mucho más alto del normal (Lodish *et. al*, 1995).

Existen evidencias experimentales de otra clase de genes cuya expresión normal inhibe la transformación. La pérdida de tales genes conlleva a la conversión neoplásica de la célula afectada. A estos genes se les conoce como **genes supresores** (tabla 6) y en la actualidad se conocen cerca de 10. En los tumores estos genes carecen de su función supresora de la proliferación celular, debido a deleciones o mutaciones inactivantes, y la pérdida de dicha función es tumorigénica (Lewin, 1994).

Tabla 5. PROTOONCOGENES Y TUMORES EN SERES HUMANOS

PROTOONCOGEN*	NEOPLASMA(S)	LESIÓN
<i>ABL</i>	Leucemia mielógena crónica	Translocación
<i>ERBB-1</i>	Carcinoma escamoso; astrocitoma	Amplificación
<i>ERBB-2</i> (<i>NEU</i>)	Adenocarcinoma de mama, ovario y estómago	Amplificación
<i>GIP</i>	Carcinoma de ovario y glándula adrenal	Mutaciones puntuales
<i>GSP</i>	Adenoma de glándula pituitaria; carcinoma de tiroides	Mutaciones puntuales
<i>MYC</i>	Linfoma de Burkitt	Translocación
<i>L-MYC</i>	Carcinoma de pulmón	Amplificación
<i>N-MYC</i>	Neuroblastoma; carcinoma de pulmón	Amplificación
<i>H-RAS</i>	Carcinoma de colon, pulmón y páncreas; melanoma	Mutaciones puntuales
<i>K-RAS</i>	Leucemias mielógena y linfoblástica agudas; carcinoma de tiroides; melanoma	Mutaciones puntuales
<i>N-RAS</i>	Carcinoma del tracto genitourinario y tiroides; melanoma	Mutaciones puntuales
<i>RET</i>	Carcinoma de tiroides	Rearreglos
<i>ROS</i>	Astrocitoma	?
<i>K-SAM</i>	Carcinoma de estómago	Amplificación
<i>SIS</i>	Astrocitoma	?
<i>SRC</i>	Carcinoma de colon	?
<i>TRK</i>	Carcinoma de tiroides	Rearreglos

* Esta lista intenta ser representativa pero no exhaustiva.

Tomada de Bishop, 1991.

La principal evidencia de la naturaleza de estos genes es provista por las familias con síndrome de cáncer, en las cuales se transmiten de generación en generación los genes supresores mutados (Lewin, 1994).

Tabla 6. GENES SUPRESORES Y TUMORES EN SERES HUMANOS

GEN SUPRESOR*	NEOPLASMA
RB1	Retinoblastoma; osteosarcoma; carcinoma de mama, vejiga y pulmón
P53	Astrocitoma; carcinoma de mama, colon y pulmón; osteosarcoma
WT1	Tumor de Wilms
DCC	Carcinoma de colon
NF1	Nerufibromatosis tipo 1
FAP	Carcinoma de colon
MEN-1	Tumores de paratiroides, páncreas, pituitaria y corteza adrenal

* Esta lista intenta ser representativa pero no exhaustiva.

Tomada de Bishop, 1991.

ETAPAS DEL PROCESO CARCINOGENÉTICO

El desarrollo de un tumor a partir de una célula que se alteró, es un proceso complejo que transcurre a lo largo del tiempo y a través de diferentes etapas (figura 1).

La primera de estas etapas es la **iniciación** la cual se refiere a un daño permanente y heredable en el DNA de una célula, que si no se repara, se fija como una mutación, quedando la célula iniciada. Este daño no conduce necesariamente a la transformación maligna, sólo ofrece una ventaja selectiva a la célula que lo presenta. La frecuencia con la que ocurre el evento inducido químicamente puede ser de 1 en 10,000. Los agentes iniciadores son, por definición, compuestos genotóxicos (Cordero, 1984; Torreola y Villa, 1997).

Mediante experimentación se ha establecido que ciertas sustancias, no genotóxicas, pueden favorecer la expansión clonal reversible, hiperplasia, a partir de la célula que se inició, a esta etapa se le conoce como **promoción**. Las células promovidas forman la neoplasia o

tumor benigno. Cuando una neoplasia se ha malignizado entonces se da origen al cáncer. El nivel de acción al que aparentemente sucede el fenómeno de la promoción es la activación de los mecanismos de transducción de la señal proliferativa, es decir, a nivel de la estimulación de la división celular. Algunos de los agentes promotores típicos son el TPA (tetradecanoyl phorbol acetate), los esteroides y las grasas de la dieta (Fitzgerald, 1990). Existen compuestos químicos y mezclas complejas de éstos que tienen simultáneamente acciones iniciadoras y promotoras, tal es el caso del humo del cigarro. Cuando los compuestos químicos son capaces de inducir la formación de tumores por sí solos se denominan carcinógenos completos y si requieren de la ayuda de otros agentes, específicamente promotores, son carcinógenos incompletos. A su vez, los carcinógenos pueden ser considerados iniciadores (si actúan mediante mecanismos genotóxicos) o promotores (si actúan mediante mecanismos proliferativos) (Ames y Swirsky, 1990; Torroella y Villa, 1997).

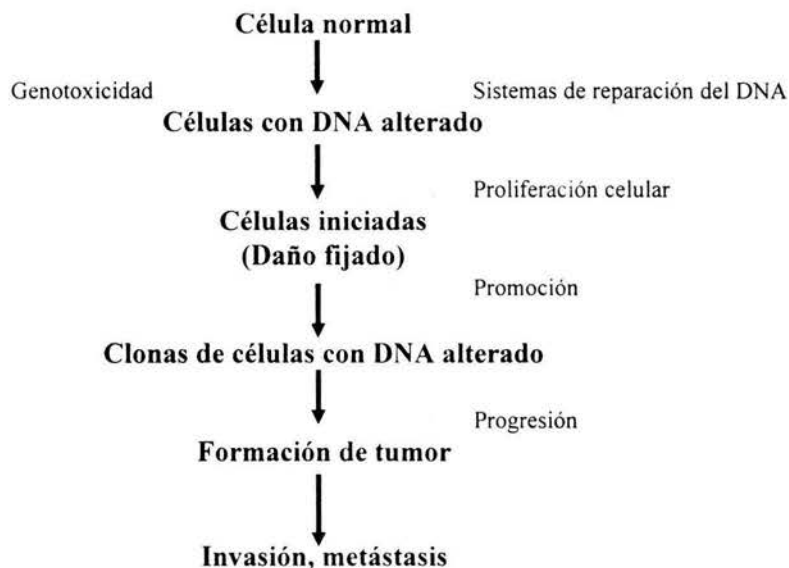


Figura 1. Etapas en el desarrollo de un tumor.

Todos los procesos que de alguna manera induzcan proliferación celular, como pueden ser la inflamación, la cicatrización, la regeneración tisular, son procesos que pueden estimular la promoción de células ya iniciadas, o que pueden aumentar la probabilidad de que ocurran nuevas mutaciones durante el proceso proliferativo (Ames y Swirsky, 1990; Torroella y Villa, 1997).

La mayoría de los cambios morfológicos ocurridos en las células en la etapa de iniciación desaparecen y sólo unas cuantas células pueden evolucionar durante la **progresión** hasta constituir un carcinoma (Farber, 1987). La malignización de la neoplasia se debe a la aparición secuencial de subpoblaciones que cada vez presentan más anormalidades cariotípicas y un aumento en la expresión de protooncogenes (Pitot, 1991). Los cambios genéticos progresivos y acumulativos que se presentan son, entre otros, aneuploidía, pérdida de alelos y amplificación génica. Es característica de esta etapa final la aparición de rasgos de dediferenciación o diferenciación aberrante, mediante la expresión de neoantígenos, propios de células embrionarias o más indiferenciadas. El rasgo distintivo terminal de esta etapa es la capacidad de escapar, invadir y colonizar o hacer metástasis en órganos distantes. Las células invasoras pueden movilizarse, atravesar la membrana basal del tejido al cual pertenecen, entrar en los vasos sanguíneos o linfáticos, y trasladarse a través de ellos a regiones distantes, reconocer allí determinados tejidos, atravesar nuevamente los vasos y la nueva membrana basal, y colonizar el nuevo órgano, reproduciéndose activamente en él y originando nuevas formaciones tumorales. Toda esta secuencia de hechos se conoce como cascada metastásica (Torroella y Villa, 1997).

La duración del proceso carcinogénico en el ser humano es de 10 a 20 años desde la primera exposición al agente iniciador hasta la aparición del cáncer.

METABOLISMO DE LOS AGENTES QUÍMICOS

El hígado de los mamíferos es un órgano en el que se llevan a cabo diversas funciones; una muy importante es el metabolismo de compuestos químicos, exógenos como drogas e insecticidas y compuestos endógenos como los esteroides y probablemente la mayor parte de las otras hormonas (Alberts *et. al*, 1994). Los carcinógenos químicos de varias clases sufren una variedad de reacciones químicas o bioquímicas cuando son introducidos a un sistema viviente. Estas reacciones pueden ser mediadas simplemente por el agua del cuerpo, por un tejido selectivo, por sustancias químicas celulares o por las enzimas de los mamíferos o de los sistemas microbiológicos. Estas reacciones pueden permitir la detoxificación, que consiste en hacer los productos menos carcinogénicos o menos activos; sin embargo, dichas reacciones pueden originar metabolitos más activos e inclusive formar el carcinógeno final. Las reacciones dependen en parte de la estructura química del agente, y están sujetas a muchas variables, tales como la especie, la edad, la dieta, el ambiente, así como la presencia de otros compuestos químicos (Becker, 1975).

Las enzimas que detoxifican al organismo pertenecen a la familia del citocromo P-450 y se encuentran en el retículo endoplásmico liso (REL) del hepatocito. Dichas enzimas catalizan una serie de reacciones en las que drogas insolubles en agua o metabolitos que de otra manera podrían acumularse a niveles tóxicos en las membranas celulares, son vueltos suficientemente hidrosolubles para que la célula los pueda excretar. Cuando grandes cantidades de ciertos compuestos tales como el fenobarbital, entran a la circulación, las enzimas de detoxificación son sintetizadas en el hígado en grandes cantidades y el REL duplica su área en pocos días. Una vez que la droga desaparece, el exceso de membrana del REL es removido rápidamente por un proceso dependiente de lisosomas llamado autofagocitosis (Alberts *et. al*, 1994).

HEPATOCARCINOGÉNESIS

Desde 1915, diversos modelos *in vivo* han sido desarrollados, especialmente en rata, para examinar tanto cualitativa como cuantitativamente el proceso de la hepatocarcinogénesis (Pitot, 1990). La gran capacidad metabólica del hígado y la presencia de lesiones preneoplásicas antes de la aparición del cáncer lo hacen un órgano apto para el ensayo de compuestos con potencial carcinogénico, además de que se tiene gran conocimiento acerca de su biología celular, bioquímica y patología. Dadas las similitudes entre el desarrollo gradual del cáncer en diversos órganos y tejidos, cualquier información que se obtenga acerca de cualquier etapa en el desarrollo del cáncer de hígado puede ser extrapolada al proceso neoplásico en otros órganos o tejidos (Farber y Sarma, 1987).

Modelos *in vivo* e *in vitro*.

La rata ha sido el animal experimental más empleado, ya que existen muchas similitudes entre sus neoplasmas malignos y los de los seres humanos, por lo que se piensa que el proceso carcinogénico puede ser similar en ambas especies (Farber y Sarma, 1987).

El empleo de diversos tipos celulares y sustancias carcinogénicas en los modelos *in vivo* e *in vitro*, han sido de gran utilidad para la comprensión de los sucesos implicados en el fenómeno de la iniciación, tales como el metabolismo de las sustancias carcinogénicas, la interacción de los carcinógenos finales con el DNA y la reparación inducida por éstos (Rosales, 1982).

El desarrollo de los sistemas *in vitro* surgió como una buena alternativa para un análisis del proceso carcinogénico a nivel celular, ya que se puede observar con más detalle el crecimiento autónomo de las células neoplásicas. Así mismo se puede tener un mayor

control de las dosis empleadas y reducir el tiempo del tratamiento. Por ello se han establecido cultivos de diversos tejidos y órganos, tales como cultivos de células epiteliales humanas, fibroblastos y hepatocitos de rata (Rosales, 1982).

En la década de los ochentas se pensó que los cultivos de hepatocitos de ratas adultas podrían servir para caracterizar fenotípicamente a las células transformadas. Estas células, obtenidas por medio de la disociación del tejido con ayuda de enzimas, dan poblaciones homogéneas representativas del hígado, con las funciones específicas de dicho órgano *in situ*, capaces de llevar a cabo el metabolismo de diversas sustancias químicas (Rosales, 1982). En estos cultivos no se presenta proliferación celular, pero se pensó que ésta se podría inducir usando cultivos de hepatocitos provenientes de ratas parcialmente hepatectomizadas, ya que continuaban sintetizando DNA, alcanzando la máxima duplicación del material genético a las 24 horas; la idea fue que durante la síntesis de esta molécula se exponen sitios que pueden interaccionar con los metabolitos, sin embargo las células permanecían viables solo por un periodo de 8 días, tiempo insuficiente para analizar un proceso como el de la hepatocarcinogénesis (Talamás, 1983; Fattel, 1988).

Tratando de obtener cultivos proliferativos y que se mantengan por más tiempo se han buscado otras alternativas, así, una proliferación sostenida por ocho semanas se ha descrito en hepatocitos fetales de roedor tratados con 3'-metil-4dimetil-aminoazobenceno y fenobarbital (Yeoh, G.; Porter, I.; Arcus, M.; Douglas, A., 1989).

La carcinogénesis química en hígado de roedores ha sido objeto de estudio de muchos investigadores. Una línea de investigación dentro de estos estudios ha sido el desarrollo de diferentes tipos de cultivos de hepatocitos. Leffert y Paul (1972 y 1973) describieron un método para obtener cultivos de células de hígado de ratas fetales en el que emplean un medio selectivo el cual presenta arginina en cantidades deficientes para suprimir el

crecimiento de células de hígado no parenquimales, así como suero de bovino fetal dializado. Estos autores observaron que la densidad celular de los cultivos, era proporcional a la concentración del suero en el medio.

En 1980 se reportó que el efecto del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en cultivos primarios de hepatocitos neonatales de rata, es modulado por el suero fetal de bovino y puede ser amplificado por la administración simultánea de dosis subfisiológica de glucagon e insulina (Draghi, E.; Armato, U.; Andreis, P. G.; Mengato, L., 1980).

Yeoh *et. al.*, en 1989, transformaron hepatocitos fetales en cultivo y observaron que en los hepatomas resultantes algunas enzimas eran expresadas en altos niveles.

MARCADORES DE TRANSFORMACIÓN CELULAR.

Varios investigadores han experimentado con diversas sustancias químicas carcinogénicas y han observado que durante la promoción se presentan nódulos de células que expresan alteraciones en ciertas actividades enzimáticas, las cuales se han usado como marcadores para la identificación de las diferentes etapas de la hepatocarcinogénesis. Un grupo de estas actividades enzimáticas se caracteriza por la rápida disminución o pérdida de su actividad, tal es el caso de: la glucosa-6-fosfatasa, la nucleótido fosfatasa, la serina deshidratasa, la glicógeno fosforilasa, la ribonucleasa y la desoxirribonucleasa (marcadores negativos). Otro grupo de actividades enzimáticas se caracteriza por su aparición o aumento, tal es el caso de: la alfafetoproteína, antígenos preneoplásicos y la γ -glutamyl-transpeptidasa a los cuales se les conoce como marcadores positivos (Scherer y Emmelot, 1975; Pitot, 1991).

Dentro de los marcadores positivos, la clase Pi (forma placentar) de la Glutathion-S-transferasa (GST), en roedores GST-P, ha sido registrada como uno de los mejores marcadores para las células preneoplásicas en cáncer inducido en hígado y en páncreas en ratas y en hámster. Las Glutathion-S-transferasas (GSTs) forman una familia de enzimas que juegan un papel importante en la detoxificación celular, ya que catalizan la conjugación del glutathion reducido con un gran número de compuestos electrofílicos hidrofóbicos biotransformados a partir de genobióticos, incluyendo carcinógenos químicos. Estos compuestos son perjudiciales ya que, al ser moléculas cargadas positivamente, reaccionan con sitios de densidad electrónica presentes en varios compuestos celulares incluyendo el DNA, el RNA y las proteínas, interfiriendo así en sus funciones. Las GSTs también actúan como proteínas acarreadoras de bilirrubina, ácido fólico, hormonas esteroideas, hematina y carcinógenos (Mennervik y Danielson, 1988). Las GSTs de hígado de rata han sido ampliamente estudiadas, y se han identificado al menos 12 formas moleculares (isoenzimas), las cuales se agrupan en Alfa, Mu, Pi y otras clases o familias. (Mannervik y Danielson, 1988; Sato, 1988 y 1989). Se ha encontrado que los niveles de la GST-Pi están incrementados en tejidos neoplásicos de seres humanos tales como riñón, ovario, pulmón, estómago, vejiga, colon, mama, hígado, melanocitos, piel, cerebro, endometrio, próstata, testículo, cérvix y tejidos blandos, lo cual sugiere que el gen de dicha enzima es activado durante la transformación maligna. Esta transformación puede ser mediada por varios agentes, incluyendo carcinógenos químicos, oncogenes y virus (Sato, 1989; Kantor, 1991; Zhang, 1994).

Un método adicional para la evaluación de transformación maligna es el cultivo de células en suspensión en medio semisólido, ya que las células transformadas no requieren anclarse a un substrato para su crecimiento. Las células normales no crecen en suspensión

debido a que la forma esférica que adoptan reduce su superficie limitando el área de flujo de nutrientes. Bajo condiciones similares, las células transformadas pueden tener un adecuado suplemento de nutrientes ya que presentan microvellosidades aumentadas y una eficiencia incrementada en los mecanismos de transporte de membrana. Otras diferencias con respecto a las células normales es la ausencia de filamentos de actina (ésto se ha observado en la mayoría de las células transformadas aunque no en todas) y una mayor tensión superficial de la membrana plasmática (Neugut, 1979). Las células transformadas evaden el control de crecimiento geométrico formando colonias en cultivos en suspensión; estas colonias no crecen indefinidamente, sino que están sujetas al control de crecimiento de poblaciones celulares, las cuales pueden ser consideradas bidimensionales o tridimensionales dependiendo de la configuración de su crecimiento. El crecimiento bidimensional no es autorregulado y la colonia muestra un apilamiento de células con crecimiento ilimitado, mientras que el crecimiento en tres dimensiones en presencia de espacio y nutrientes disponibles es autorregulado (Folkman, 1975). El cultivo celular en agar blando es una técnica atractiva que ofrece la posibilidad de detectar y seleccionar las células malignas de una población mixta. Así mismo, es un sistema útil para detectar nuevas drogas anticáncer y para ensayar la sensibilidad de tumores de seres humanos ante distintas drogas con el fin de crear regímenes quimioterapéuticos individuales (Klein, 1981).

Los cultivos primarios de hepatocitos de roedores adultos no proliferan, lo cual ha limitado su uso en el estudio del proceso carcinogénico. Por lo anterior, en el presente estudio se desarrolló un cultivo proliferativo de hepatocitos provenientes de fetos de hámster. El hámster ofrece ventajas que pueden ser utilizadas en los modelos *in vitro*, como un cariotipo celular estable (Namba, Hyodo y Kimoto, 1978) y una mayor susceptibilidad hepática a carcinógenos dada su menor capacidad de reparación de las lesiones premutagénicas en el

DNA (Hall, Brésil, Serres, Martel-Palanche, Wild y Montesano, 1990). Estos cultivos, en principio cubren los requisitos para ser transformados en células cancerosas mediante el uso de sustancias químicas. En este modelo se estudiaron algunos de los cambios que ocurren a nivel molecular en las etapas de iniciación y promoción del proceso carcinogénico.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un cultivo proliferativo de hepatocitos que pueda servir como modelo para estudiar los cambios que ocurren a nivel molecular en las etapas de iniciación y promoción del proceso carcinogénico.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Caracterizar la suspensión de hepatocitos fetales de hámster:
 - a) Obtener una suspensión celular a partir de hígados fetales.
 - b) Determinar el rendimiento celular: número de células/g de hígado.
 - c) Determinar la viabilidad de los hepatocitos.
- 2.- Establecer las condiciones óptimas para obtener cultivos proliferativos:
 - a) Calcular el porcentaje de adhesión celular.
 - b) Determinar el inóculo idóneo para medir la proliferación.
 - c) Estimar la proliferación celular.
 - ◆ Conteo de células en hemocitómetro.
 - ◆ Incorporación de timidina tritiada (TH³).
- 3.- Establecer las condiciones óptimas para transformar las células en cultivo:
 - a) Estudiar el efecto de carcinógenos químicos sobre los hepatocitos en cultivo.
 - ◆ Máxima dosis tolerada que no produzca manifestaciones tóxicas.
 - b) Estimar la transformación celular.
 - ◆ Marcador enzimático (positivo).
 - ◆ Crecimiento en agar blando.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la suspensión celular.

Se emplearon hámsters *syrian golden* de 14 días de gestación para la obtención de fetos, a los cuales se les extirpó el hígado; los hígados se colocaron en una solución salina conocida como TD (8.0 g de NaCl, 3.75 g de KCl, 3.0 g de trizma base, 0.1 g de Na₂HPO₄, y 1ml de rojo fenol disueltos en 1000 ml de agua bidestilada, pH 7.4) con 0.5 mM de EGTA (Sigma) en una proporción del 20 % peso/volumen y se pesaron. Se enjuagaron 2 veces con TD salino más 2.55 mM de Ca²⁺ (Cloruro de Calcio, J. T. Baker). Posteriormente el precipitado se resuspendió con TD salino más Ca²⁺ en el mismo volumen usado anteriormente. Se agregó colagenasa tipo IV (Sigma) al 0.05 % y se agitó por 15 minutos a 100 golpes/minuto; a los 7.5 minutos se resuspendió 5 veces con pipeta de 10 ml y se repitió esta operación al finalizar los 15 minutos. La suspensión se filtró a través de una malla de organdí de 360 µm y después se centrifugó (Centrifuga International, modelo PR-2) por 1 minuto a 500 rpm. La pastilla se resuspendió en TD salino y posteriormente se enjuagó 2 veces con esta misma solución para eliminar las células no parenquimales. Finalmente las células fueron resuspendidas en medio F12 libre de arginina (Gibco) suplementado con suero fetal de bovino (Biocel) dializado a una concentración del 10 %, 1 mg/lit de hidrocortisona (Sigma), 15 U de insulina (Lilly R U-100) por cada 100 ml de medio, 2000 U de penicilina G-sódica (Sigma) y sulfato de estreptomycinina (Sigma) al 0.005 %.

Estimación del número de células.

Se adicionaron 0.5 ml de la suspensión celular a 4.5 ml de medio de cultivo en un vaso de precipitados. Se resuspendió la mezcla y se transfirió con una pipeta Pasteur al

hemocitómetro. Se contaron los hepatocitos de cuatro cuadrantes. Se obtuvo el promedio, se multiplicó por 10^4 y por el factor de dilución para calcular el número de células por ml de suspensión. El número de hepatocitos por gramo de hígado se calculó de la siguiente manera:

$$\text{No. de hepatocitos por gramo de hígado} = \frac{\text{No. de hepatocitos totales}}{\text{g de hígado}}$$

Determinación de la viabilidad celular.

Durante el aislamiento de los hepatocitos se tomaron muestras y se les añadieron, en una relación volumen/volumen, azul de tripano (Sigma) al 0.5 % disuelto en una solución de NaCl al 0.9 %. Posteriormente se observaron al azar varios campos contando al menos 100 células. Tomando como criterio la exclusión del colorante por las células vivas, la viabilidad se expresó como:

$$\text{Viabilidad} = \frac{\text{No. de células teñidas (muertas)}}{\text{Total de células}}$$

Determinación del tiempo de adhesión celular.

Se sembraron 4×10^5 células/ml en cada caja. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Lab-line instruments, Inc., modelo Imperial II CO₂) con CO₂ al 5 %, atmósfera húmeda y a una temperatura de 37° C. El tiempo de incubación varió haciendo triplicados para cada uno de ellos y fueron de 30, 60, 90, 120, 180, 240 y 300 minutos.

Después de cada tiempo se sacaron las cajas correspondientes y se lavaron con 1 ml de TD salino, se les adicionó 1 ml de solución de tripsina de páncreas de bovino (Gibco) al

0.05 % y KCl (J. T.Baker) 0.1 M y se incubaron por 3 minutos. Se les agregó 1 ml de medio completo ó 100 μ l de suero para inactivar la tripsina y se resuspendieron la células con una pipeta Pasteur. Se contó el número de células utilizando el hemocitómetro.

Determinación del mejor inóculo.

Se ensayaron los siguientes inóculos: 2×10^5 , 4×10^5 , 8×10^5 , 1×10^6 , 1.6×10^6 y 2×10^6 células/ml para determinar el mejor, con base en el porcentaje de adhesión. Para ello se realizaron observaciones al microscopio y se agregó tripsina para desprender las células y así contarlas.

Determinación de la proliferación celular.

a) Conteo de células en el hemocitómetro.

Para determinar la proliferación celular se realizaron experimentos en los que se ensayaron inóculos iniciales de 2×10^5 , 4×10^5 , 8×10^5 y 1.6×10^6 células/ml. Después de la siembra se calculó el porcentaje de adhesión y posteriormente se contaron las células a los 0, 3, 6 y 8 días de cultivo. El procedimiento fue el siguiente: a cada caja se le retiró el medio y se lavó con 1 ml de TD salino dos veces. Después se le agregó 1 ml de tripsina al 0.05 % y KCl 0.1 M incubándose por 3 minutos ó hasta que se desprendieron las células. Cuando se desprendieron las células la tripsina se inactivó adicionando 1 ml de medio suplementado ó 100 μ l de suero. Se resuspendieron las células con micropipeta 3 veces. Finalmente se tomó una muestra y se puso en el hemocitómetro para contar los hepatocitos. Se sacó el promedio de las 3 cajas y se multiplicó por el factor de dilución y por el del hemocitómetro.

b) Incorporación de timidina tritiada (TH^3).

Se sembraron 8×10^5 células/ml en cada caja y se hizo un cambio de medio a las 3 horas para permitir la adhesión. El tratamiento se llevó a cabo a las 3 horas y a los 2, 4, 6 y 8 días de cultivo y consistió en dar a las células pulsos de 2 horas con TH^3 (metil-timidina-tritiada, 69 Ci/mmol, Sigma). Se preparó una solución madre de TH^3 adicionando 5 μCi del isótopo por cada ml de medio MEM libre de timidina (Gibco) y sin suero.

El procedimiento fue el siguiente: se eliminó el medio de cultivo de cada caja y ésta se lavó dos veces con TD salino. Se agregó 1 ml de la solución madre a cada caja y se incubó por 2 horas. Al finalizar el tiempo de incubación se determinó la cantidad de TH^3 que incorporaron las células de la siguiente manera: se retiró el medio y se enjuagaron las cajas con TD salino dos veces. Se agregaron 500 μl de SDS (Sigma) al 1 % y el contenido de cada caja se transfirió a tubos de ensaye (colocados en hielo). Posteriormente se adicionó 1 ml de TCA (J. T. Baker) al 10 % a cada caja y se vació el contenido al tubo correspondiente. El contenido de cada tubo se pasó a través de un filtro de fibra de vidrio (Whatman, GF/C 2.4 cm) y se enjuagó con TCA al 5 %. Cada filtro se colocó en un vial y se estimaron las dpm en un contador de centelleo líquido (Beckman, modelo LS 6000SC).

Tratamiento de los hepatocitos en cultivo primario.

Se preparó una solución madre de dietilnitrosamina (Sigma) en agua bidestilada estéril 30 minutos antes de su empleo añadiendo la cantidad necesaria al medio de cultivo F12 hasta obtener una concentración final de 1.5 μM de dietilnitrosamina (DEN).

Se sembraron los hepatocitos y se incubaron por 3 horas para permitir su adhesión. Enseguida se eliminó el medio a cada caja y se enjuagó dos veces con TD salino. Se agregó 1 ml de medio de cultivo con DEN 1.5 μM (o con 1.5 μM de agua estéril en el caso de los

controles) a cada caja y se incubaron por 3 días. Al tercer día de cultivo se les cambió el medio y se les adicionó fenobarbital (PB; purificado de la presentación de 0.10 g/tableta, Abbott) a una concentración final de 1.5 mM. Los cultivos se retiraron para diferentes ensayos de transformación celular a los 3, 6, 8, 24 y 45 días después de iniciado el tratamiento. En el caso de las células que se mantuvieron por más de 6 días se hicieron cambios del medio de cultivo cada 6 u 8 días.

Determinación de la transformación celular.

a) Siembra en agar blando.

Después del tratamiento, se desprendieron las células de las cajas de la misma manera que se hizo para el conteo de células en el hemocitómetro (se empleó tripsina al 0.05 %). Los tiempos de cultivo de las células fueron 3, 6, 8, 24 y 45 días. Se juntó la suspensión celular de los triplicados y se centrifugó por 1 minuto a 500 rpm para eliminar la tripsina. La pastilla se resuspendió con medio F12 y se estimó la viabilidad celular. Se ajustó el número de células en una solución de medio F12 y agarosa (Bio-Rad) al 0.125 % hasta obtener concentraciones de 50×10^3 , 100×10^3 , 200×10^3 , 300×10^3 y 400×10^3 células/ml. Dichos inóculos se sembraron sobre una capa (1.2 ml) gelificada de medio con agarosa al 0.5 %.

b) Detección de la GST-P por inmunofluorescencia indirecta.

Se sembraron hepatocitos sobre cubreobjetos previamente tratados con poli-D-lisina. Se emplearon 3 cajas por tratamiento para cada tiempo: uno como control positivo, el segundo como control negativo y el tercero para detectar la GST-P. Se sacaron los cultivos a diferentes tiempos (3, 6, 8 y 24 días) y se eliminó el medio a cada caja con el cubreobjetos. Los cubreobjetos se lavaron con PBS (2.8 g de K_2HPO_4 , 0.4 g de KH_2PO_4 y 6.5 g de NaCl

disueltos en 1000 ml de agua bidestilada, pH 7.4) Las células se fijaron con 15 ml de paraformaldehído al 4% por 15 minutos y se lavaron con PBS. Se permeabilizaron con 100 μ l de tetrón X 100 al 0.5 % en PBS por 10 minutos y se lavaron con PBS. Se adicionaron 100 μ l del primer anticuerpo (Ab) de la siguiente forma: se usó Ab anti-actina (Amersham) como control positivo, Ab anti-GST-P (anticuerpo monoclonal obtenido de líquido ascítico producido por hibridomas crecidos en la cavidad peritoneal de ratón Balb/c) diluído con PBS 1:10 en los problemas y en los controles negativos se puso PBS en lugar del primer Ab. La incubación con el primer Ab fue de una hora a temperatura ambiente al término de la cual se lavaron los cubreobjetos con PBS. En seguida se pusieron de 25 a 30 μ l del segundo anticuerpo a todos los cubreobjeto; el Ab que se empleó fue anti-ratón-fluoresceinado (Amersham) diluído con PBS 1:60 por 1 hora a temperatura ambiente en condiciones de obscuridad. Posteriormente los cubreobjetos se lavaron, se montaron en un portaobjetos con gelvatol y se guardaron a 4° C en obscuridad. Toda las incubaciones se realizaron en cámara húmeda la cual se acondicionó en una caja petri de 35 mm con papel filtro humedecido con PBS.

RESULTADOS

Caracterización de la suspensión celular.

La suspensión de hepatocitos fetales de hámster de 14 días de gestación obtenida mediante digestión con colagenasa tipo IV, acción mecánica y centrifugación, se caracterizó por presentar un rendimiento de 35.47×10^6 células/g de hígado con una viabilidad del 85.04 % (Tabla I).

Tabla I. CARACTERÍSTICAS DE LA SUSPENSIÓN DE HEPATOCITOS FETALES DE HÁMSTER

CARACTERÍSTICA	\bar{x}	\pm	σ
Gramos de hígado por camada	1.05		0.26
Número de fetos por camada	10.95		1.86
Viabilidad (%)	85.04		9.66
Número de células $\times 10^6$ /g de hígado	35.47		9.73

Estos datos fueron obtenidos de un total de 22 experimentos.

Hámsters de 14 días de gestación fueron empleadas para la obtención de hígados fetales. Los hígados fueron digeridos con colagenasa tipo IV al 0.05 % para obtener una suspensión celular. El rendimiento se determinó por conteo directo en el hemocitómetro y la viabilidad por la exclusión de azul de tripano y conteo directo en el hemocitómetro.

Determinación del tiempo de adhesión.

Para este ensayo se emplearon cajas de cultivo de 35 mm marca Nunc y se sembraron 4×10^5 células/ml por caja y por triplicado para cada tiempo. Durante 5 horas de incubación se hizo un monitoreo de las cajas desprendiendo las células con tripsina para contarlas y así determinar el porcentaje de adhesión. Como se observa en la tabla II, en los primeros 30

minutos sólo se adhiere un 8.75 % del inóculo, esto corresponde a un total de 35×10^3 células. La adhesión se incrementa hasta alcanzar un máximo de 35.15 % a las 2 horas y se mantiene en este nivel hasta 5 horas después. Ya que entre los 120 y 300 minutos se mantiene constante la adhesión se seleccionó el tiempo de adhesión de 3 horas (Tabla II).

Tabla II. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE ADHESIÓN CELULAR			
TIEMPO DE CULTIVO (MINUTOS)	PORCENTAJE DE ADHESIÓN		
	\bar{x}	\pm	σ
30	8.75		Nd
60	31.29		9.36
90	21.25		Nd
120	35.16		14.80
180	34.58		14.51
240	37.03		16.08
300	35.76		8.15

Nd = No determinado

Estos datos fueron obtenidos de un total de 5 experimentos.

Se sembraron 4×10^5 células/ml y se incubaron a diferentes tiempos. Al concluir el tiempo de incubación se eliminó el medio y las células no adheridas y se lavaron las cajas con TD salino. Las células adheridas se desprendieron al incubarlas con 1 ml de una solución de tripsina al 0.05 % y KCl 0.1 M durante 3 minutos o más. Se calculó el porcentaje de adhesión mediante conteo directo en el hemocitómetro.

Determinación del mejor inóculo.

Se sembraron 7 diferentes cantidades de células por caja y se analizó su adhesión después de 3 horas (Tabla III). En general los porcentajes de adhesión fueron muy bajos, el mínimo fue de 8.70 % para el inóculo de 1×10^6 y el máximo que fue de 18.98 % y

correspondió al inóculo de 2×10^5 . Sin embargo, en los inóculos mayores se observaron más células adheridas.

Tabla III. DETERMINACIÓN DEL MEJOR INÓCULO

NÚMERO DE CÉLULAS SEMBRADAS	PORCENTAJE DE ADHESIÓN		
	\bar{x}	\pm	σ
2×10^6	16.69		12.09
1.6×10^6	16.01		10.72
1×10^6	8.70		2.80
8×10^5	12.56		3.48
5×10^5	13.57		9.05
4×10^5	17.27		5.02
2×10^5	18.98		6.94

Estos datos fueron obtenidos de un total de 5 experimentos.

Se sembraron diferentes inóculos (por triplicado) y se mantuvieron en incubación por 3 horas. Se determinó el mejor inóculo con base en el mayor porcentaje de adhesión para lo cual las células se desprendieron incubándolas con una solución de tripsina al 0.05 % y KCl 0.1 M durante 3 minutos o más y se contaron en la cámara de Neubauer.

Determinación de la proliferación celular.

a) Conteo de células en el hemocitómetro.

Se sembraron 1.6×10^6 , 2×10^5 , 4×10^5 y 8×10^5 células/ml por caja, por triplicado en cada experimento. A las tres horas de cultivo se analizó el porcentaje de adhesión de las células después de la adición de tripsina y contando en el hemocitómetro. El valor más alto correspondió al inóculo de 1.6×10^6 células/ml con un 8 % y el menor, de 5 %, fue para el inóculo de 8×10^5 células/ml. Sin embargo, este último fue uno de los mejores inóculos en cuanto a proliferación (figura 2), ya que para el día 8 completó el equivalente a

1.7 duplicaciones. El que presentó la mayor duplicación fue el inóculo de 2×10^5 células/ml con 3 ciclos. Los inóculos de 1.6×10^6 y 4×10^5 células/ml tuvieron 1.4 y 2 ciclos de duplicación respectivamente.

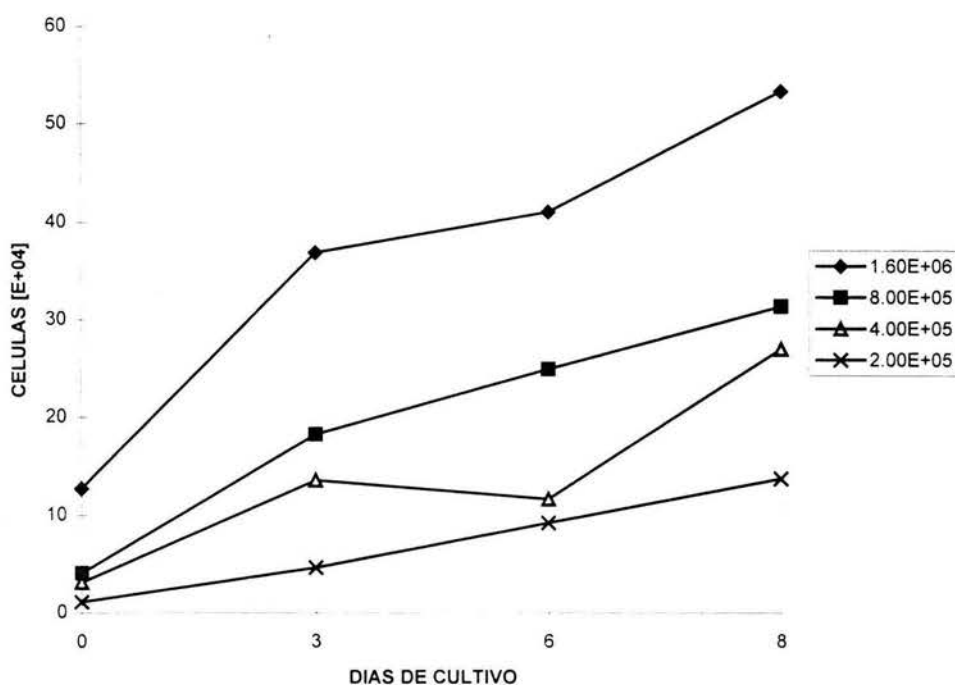


Figura 2. Determinación de la proliferación celular mediante conteo directo en el hemocitómetro. Se sembraron diferentes inóculos y se mantuvieron en cultivo durante 0, 3, 6 y 8 días, después de los cuales se desprendieron los hepatocitos por medio de una incubación con tripsina al 0.05 % y KCl 0.1 M durante 3 minutos o hasta que se desprendieron las células. Las células se contaron en el hemocitómetro.

b) Incorporación de timidina tritiada (TH³).

Para este ensayo se sembraron 8×10^5 células/ml por caja, ya que se determinó que esta cantidad de hepatocitos era la más adecuada para comprobar la proliferación. Se tomaron cajas con células después de diferentes tiempos de cultivo y se dieron pulsos de 2 hr con TH³. Los resultados muestran que a las 2 hr de cultivo, es decir, el mismo día de obtención y siembra de las células, se obtiene la mayor incorporación: 28,089 dpm. Se observa una disminución progresiva hasta las 12 hr cuando se registraron 5,989 dpm; entre las 24 y las 192 hr (es decir, del día 2 al día 8) se mantuvo relativamente constante la incorporación alrededor de 2,000 dpm (figura 3), es importante destacar que se observa un incremento significativo a las 63 hr (que corresponden a 2 días y medio) con una incorporación de 2,526 dpm lo cual nos indica que al día 3 de cultivo se encuentra la mayor proliferación celular.

Determinación de la transformación celular.**a) Siembra en agar blando.**

Para este experimento se emplearon células en cultivo tratadas con DEN, PB, y DEN + PB. Se desprendieron de la caja las células que habían sido mantenidas con tratamiento por 3, 6, 8, 24 y 45 días. Se determinó la viabilidad la cual fue del 72% y se hicieron diluciones hasta obtener concentraciones de 50×10^3 , 100×10^3 , 200×10^3 , 300×10^3 y 400×10^3 células/ml las cuales fueron sembradas en agar blando. Después de 24 horas de cultivo, tanto en los controles como en las células tratadas no se observó crecimiento para ninguno de los inóculos, mientras que las células de linfoma de ratón que fueron el control positivo formaron colonias (figura 4).

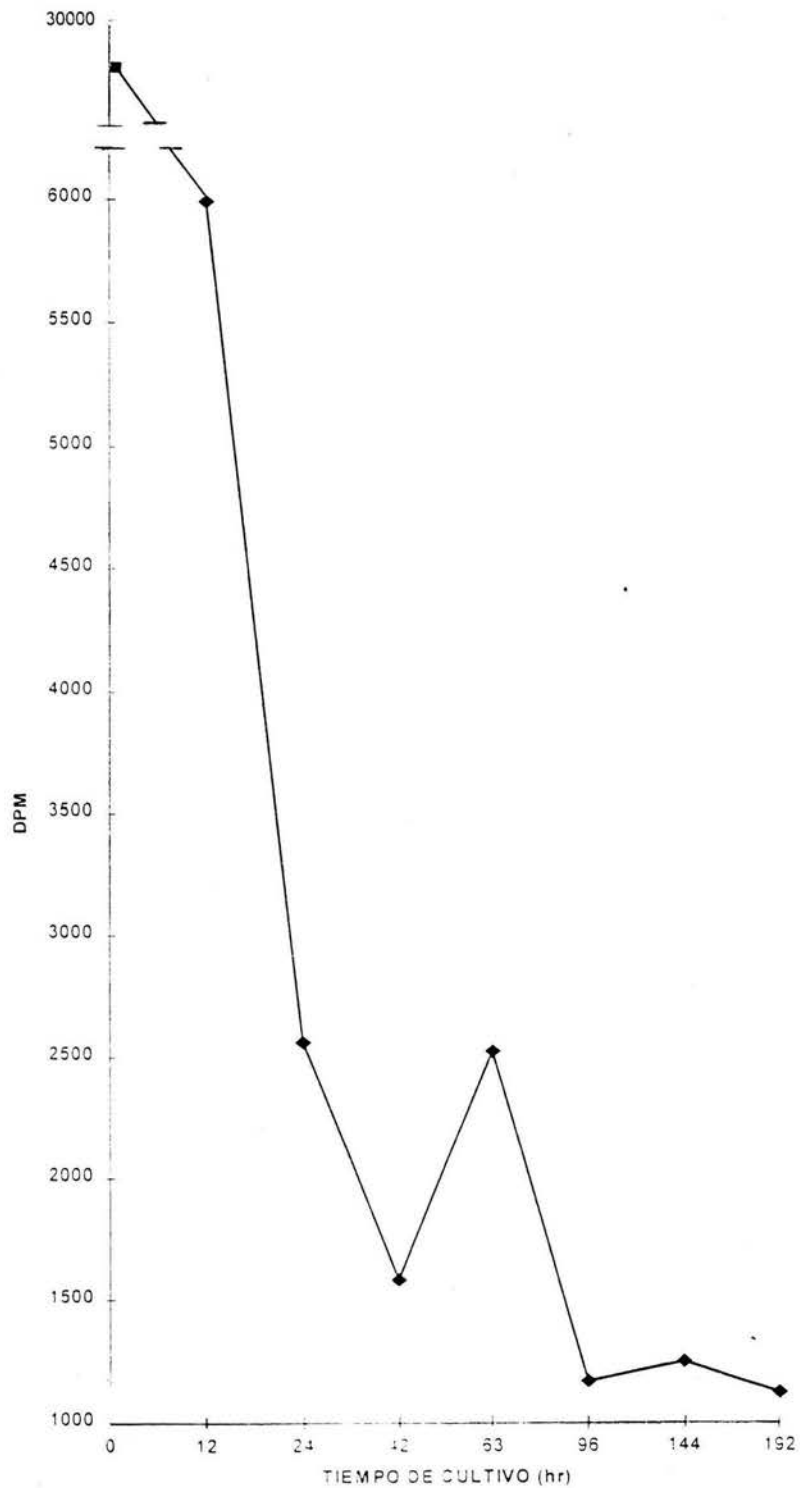


Figura 3. Determinación de la proliferación celular mediante incorporación de TH^3 . Las células (8×10^5 células/ml) fueron incubadas a diferentes tiempos. Concluido el tiempo de cultivo las cajas fueron lavadas con TD salino y se aplicaron pulsos de horas 2 con TH^3 ($5 \mu Ci/ml$) en medio MEM libre de arginina y sin suero. La marca incorporada se determinó en un contador de centelleo líquido.

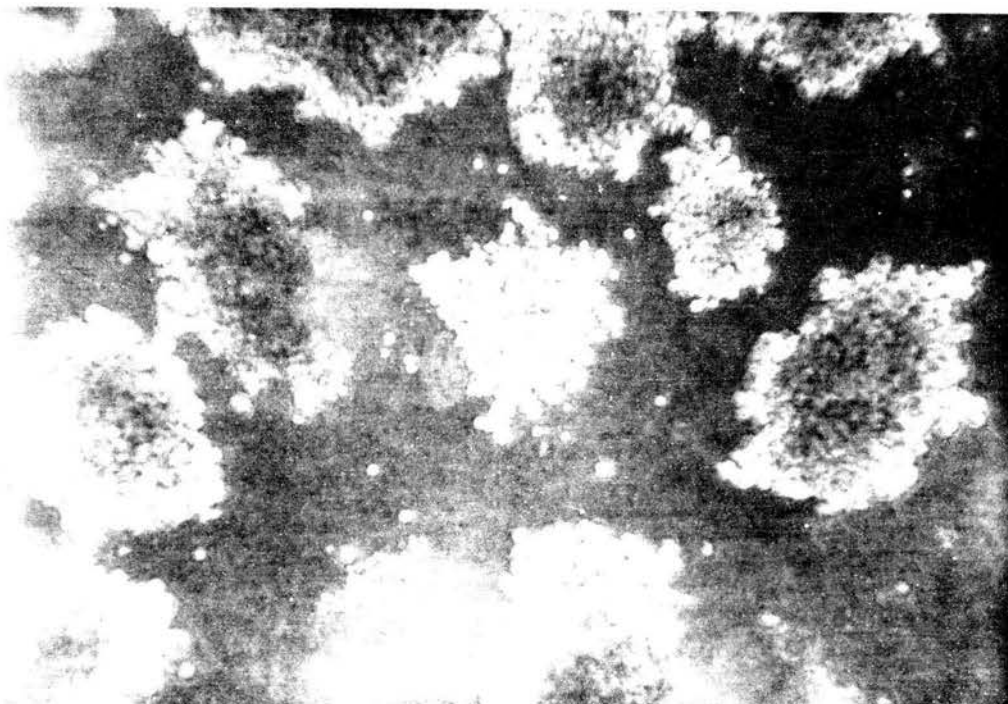


Figura 4. Células de linfoma de ratón crecidas en agar blando durante 24 horas. Micrografía de contraste de fases a un aumento de 400X. Hepatocitos fetales de hámster fueron tratados con carcinógenos durante diferentes tiempos. Una vez concluido el tratamiento las células fueron desprendidas mediante tripsinización y se sembraron diferentes inóculos en agar blando. Solamente se observó formación de colonias en los cultivos de linfoma de ratón. Los hepatocitos fetales tratados con carcinógenos y los no tratados no mostraron formación de colonias.

b) Detección de la GST-P por inmunofluorescencia indirecta.

Las células sembradas en cubreobjetos y tratadas con carcinógenos químicos fueron incubadas con el Ab monoclonal anti-GST-P y reveladas con un Ab fluoresceinado para detectar la expresión de dicha enzima, la cual es un marcador temprano de células preneoplásicas. Mediante microscopía de fluorescencia se encontró que, las células tratadas con el promotor PB a los 5 y 24 días de cultivo expresaron dicha enzima, mientras que para el día 8 el resultado fue negativo. Las células tratadas con el iniciador DEN no presentaron la GST-P a los 3, 8 y 24 días pero a los 5 días se presentó una débil fluorescencia. Las células iniciadas y promovidas en los tiempos empleados en el ensayo fueron positivas (tabla IV). Para todos los casos los cultivos de hepatocitos sin tratar fueron negativos. En la figura 5 se

puede apreciar que las células iniciadas y promovidas (A) presentan colonias con mayor número de células en comparación con las que solamente están iniciadas (B) o promovidas (C) pero que fueron positivas para la GST-P a los 5 días de tratamiento.

Tabla IV. DETECCIÓN DE LA GST-P POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

TRATAMIENTO	TIEMPO DE CULTIVO (DÍAS)	GST-P
DEN	3	Negativo
PB	5	Positivo
DEN	5	Positivo
DEN + PB	5	Positivo
PB	8	Negativo
DEN	8	Negativo
DEN + PB	8	Positivo
PB	24	Positivo
DEN	24	Negativo
DEN + PB	24	Positivo

Estos datos fueron obtenidos de un total de 5 experimentos.

Se sembraron células en cubreobjetos y se mantuvieron en tratamiento con carcinógenos químicos. A diferentes tiempos se determinó la GST-P mediante inmunofluorescencia indirecta. Como primer anticuerpo se empleó un Ab monoclonal anti-GST-P obtenido del líquido ascítico producido por hibridomas crecidos en la cavidad peritoneal de ratón Balb/c. Después de una hora de incubación con el primer Ab éste se lavó con PBS y posteriormente se adicionó el Ab anti-ratón-fluoresceinado. Las preparaciones se montaron en portaobjetos con gelvatol y se guardaron a 4° C en obscuridad.

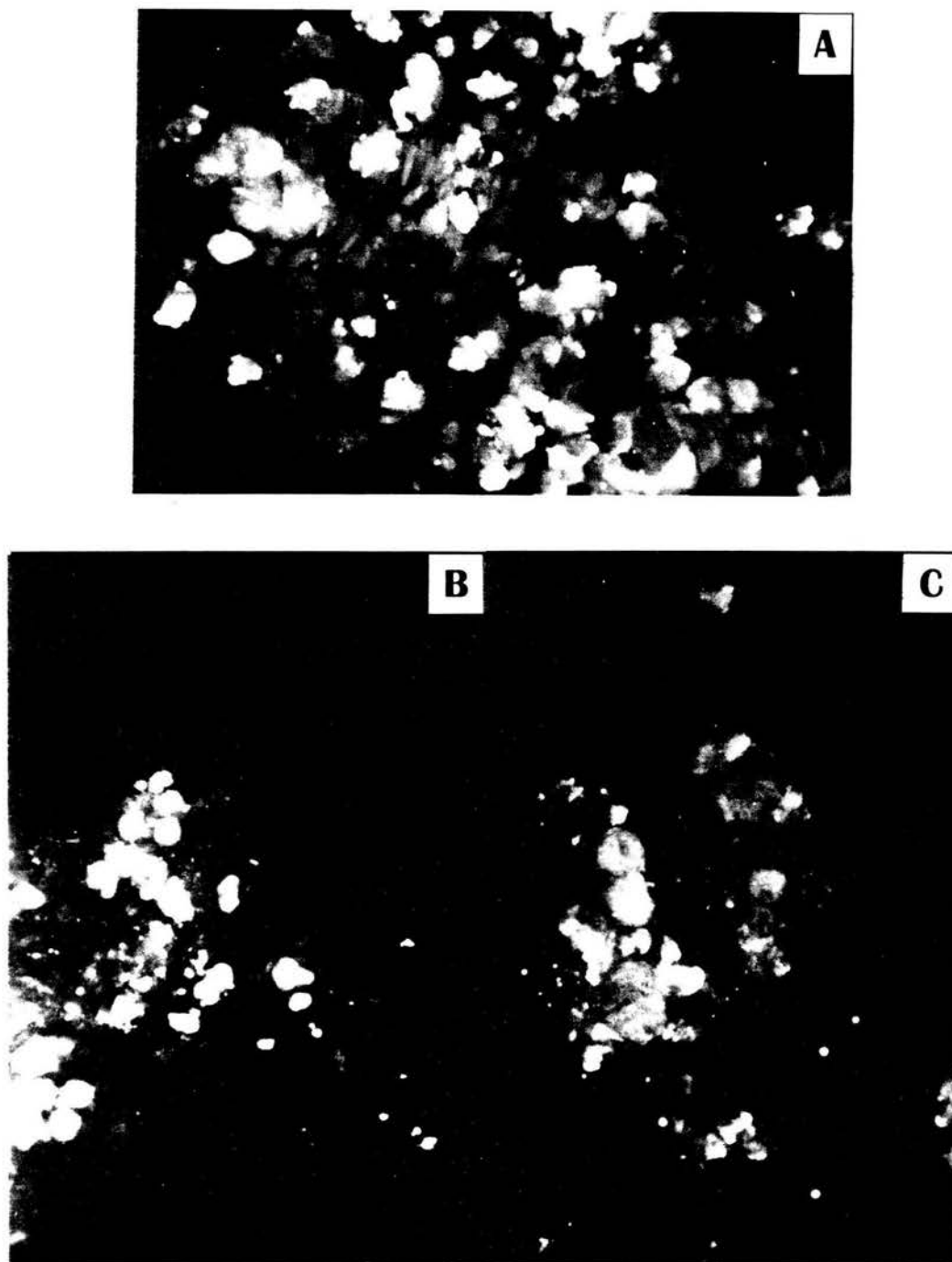


Figura 5. Detección de la GST-P por inmunofluorescencia indirecta. Micrografías de fluorescencia a un aumento de 400X. Los hepatocitos fueron tratados con DEN y/o PB durante diferentes tiempos y se determinó la expresión de la enzima GST-P mediante inmunofluorescencia indirecta. Células iniciadas y promovidas (A), células iniciadas (B) y células promovidas (C).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se caracterizó la suspensión de hepatocitos fetales de hámster (Tabla I), encontrándose que el rendimiento celular por gramo de hígado de 35.47×10^6 células es del doble del reportado por otros autores (Leffert *et. al* citados por Barnes, D. W.; Sirbasku, D. A.; Sato, G. H., 1984; Lorenzo, M.; Roncero, C.; Benito, M., 1986; Roncero, C.; Lorenzo, M.; Fabregat, I.; Benito, M., 1989) quienes obtienen 15×10^6 células/g de hígado. Con respecto a la viabilidad, el porcentaje obtenido fue de 85.04 % el cual cae dentro del rango del 85 al 95 % de viabilidad reportado por los autores antes mencionados y por Rojas en 1994. Estos resultados apoyan la idea de que los métodos empleados en este estudio para la obtención de hepatocitos fetales fueron los adecuados.

En segundo término se establecieron las condiciones para obtener cultivos proliferativos, para lo cual se determinó el porcentaje de adhesión celular, así como el inóculo idóneo para mediar la proliferación. Hay que hacer notar que las células fueron mantenidas en medio F12 totalmente libre de arginina para suprimir el crecimiento de células hepáticas no parenquimales, lo cual ya había sido descrito anteriormente por Leffert y Paul (1972, 1973). Los porcentajes de adhesión calculados para los diferentes inóculos están por debajo del obtenido por Rojas (1994) quien reporta un máximo de adhesión del 45.6 % a las 3 horas, sin embargo, aunque algunos autores reportan la eliminación del medio para descartar las células no adheridas después de horas de haberlas sembrado (Leffert y Paul, 1972; Hoffmann y Paul, 1990; Balavoine, S.; Rogier, E.; Feldmann, G.; Lardeux, B., 1992), no mencionan el porcentaje de adhesión celular.

Debido a que se requiere que haya síntesis de DNA para que un daño en dicha molécula pueda fijarse y de esta manera dar comienzo al proceso carcinogénico, fue necesario

determinar el carácter proliferativo del cultivo de hepatocitos fetales de hámster. Para cubrir dicho objetivo se emplearon dos técnicas, el conteo directo en cámara de Neubauer y la incorporación de TH³. Los resultados obtenidos con ambas técnicas (figuras 2 y 3) muestran que los hepatocitos fetales de hámster cultivados con medio F12 libre de arginina son proliferativos, lo cual concuerda con lo encontrado en otros estudios (Leffert y Paul, 1972 y 1974; Draghi *et. al*, 1980; Hoffmann, B.; Piasecki, A.; Paul, D., 1989). Las diferencias en los patrones de las gráficas de las figuras 2 y 3 se deben a la base de cada método.

Mediante conteo directo en el hemocitómetro se encontró que el inóculo con mayor proliferación fue el de 2×10^5 células/ml con 3 ciclos de duplicación, sin embargo, debido a que el número de células por caja era muy bajo y a que la cantidad de marca incorporada era tan poca que no permitía distinguirla del fondo, se decidió que el inóculo más práctico para comprobar la proliferación a través de la incorporación de TH³ y hacer los ensayos de transformación era el de 8×10^5 células/ml. El hecho de que el inóculo con menor número de células haya tenido una mayor proliferación puede deberse a que están en mayor disponibilidad de espacio y nutrientes, ya que al haber menos células hay menos competencia.

El tercer objetivo de este trabajo fue el de probar si el cultivo proliferativo de hepatocitos fetales expresa los marcadores estudiados *in vivo* durante el proceso carcinogénico. Se determinó la transformación de células tratadas con sustancias químicas carcinogénicas mediante el crecimiento en agar blando y la expresión de la GST-P. Nuestros resultados fueron negativos en relación al crecimiento de las células en agar blando, mientras que si se pudo detectar la GST-P por inmunofluorescencia indirecta. Yeoh *et. al* (1989) demostraron la transformación de hepatocitos fetales tratados con MDAB y PB por más de 8 semanas inoculando las células en ratones inmunodeficientes, los cuales desarrollaron

tumores. En nuestro caso los resultados fueron negativos lo que implica que el período de tratamiento de 45 días no fue suficiente para que las células expresaran autonomía.

Los resultados de la expresión de la GST-P con los diferentes tratamientos (Tabla IV) concuerdan con lo reportado en otros estudios. Vandenberghe, Y.; Glaise, D.; Meyer, D. J.; Guillouzo, A., (1988) mencionan que el perfil de expresión de la familia de la GST puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo, esto es, en diferentes composiciones del medio y si las células están en cultivo convencional o cocultivadas. Más tarde, Vandenberghe, Y.; Morel, F.; Foriers, A.; Ketterer, B.; Vercruysse, A.; Guillouzo, A.; Rogiers, V., (1989) muestran que los hepatocitos de rata adulta tratados con 3.2 mM de PB presentan un aumento en el nivel de expresión de las GSTs. Nuestros resultados mostrados en la Tabla IV permiten plantear el posible efecto del tratamiento con carcinógenos sobre la expresión de la GST-P en hepatocitos fetales *in vitro* en un periodo de 24 días.

Las células tratadas con DEN en los primeros días expresan GST-P posiblemente por el efecto iniciador, sin embargo, al no existir un estímulo proliferativo esta expresión cesa como se observa a los 8 días. Con respecto al efecto del PB a los 5 y 24 días concuerda con lo reportado acerca de que el PB incrementa la expresión de las GSTs, sin embargo no hay una explicación para la falta de expresión de esta enzima a los 8 días. Las células tratadas con DEN + PB expresaron GST-P desde los 5 a los 24 días por lo que se concluye que el tratamiento mantuvo a las células en el proceso de iniciación-promoción.

CONCLUSIONES

- ◆ Las suspensiones celulares obtenidas con los métodos descritos en este estudio son adecuados para el establecimiento de cultivos primarios de hepatocitos fetales de hámster, ya que se obtienen buen rendimiento y una viabilidad adecuada de más del 80 %.
- ◆ Se caracterizó que el período necesario para la adhesión fue de 2 a 5 horas; por razones prácticas se utilizó el de 2 horas.
- ◆ Los hepatocitos fetales de hámster mantenidos en cultivo con medio F12 libre de arginina y suplementado con suero, insulina e hidrocortisona, mantuvieron una proliferación sostenida por 45 días.
- ◆ El inóculo que presentó mayor proliferación correspondió al de 2×10^5 células/ml el cual tuvo 3 ciclos de duplicación.
- ◆ El inóculo escogido para ensayos de proliferación y transformación fue el de 8×10^5 células/ml ya que después de las 2 horas de adhesión, al remover el medio y descartar las células no adheridas, quedan las suficientes células para que no haya escasés de nutrientes y espacio y pueda formarse una monocapa.
- ◆ No se observó crecimiento de células tratadas en agar blando, lo que implica que el período de tratamiento no fue suficiente para que las células expresaran autonomía.

- ◆ En los cultivos de hepatocitos tratados con el iniciador DEN y el promotor PB se detectó la GST-P desde los 5 días y hasta los 24 días que duró el tratamiento.
- ◆ La expresión temprana de la GST-P sugiere que los tratamientos usados produjeron la transformación cancerosa de algunas células, ya que la GST-P es uno de los marcadores de células preneoplásicas más confiables.

BIBLIOGRAFIA

- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M. ; Roberts, K.; Watson, J. D. (1994) *Molecular Biology of the Cell*. Gerland Publishing, Inc. Tercera edición. 1294 pp.
- Ames, B. N. y Swirsky, G. L. (1990) Chemical carcinogenesis: Too many rodent carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 7772-7776.
- Balavoine, S.; Rogier, E.; Feldmann, G.; Lardeux, B. (1992) Responseveness of RNA degradation to amino acids in cultured rat hepatocytes: comparasion with isolated rat hepatocytes. *Journal of Cellular Physilogy*, 150: 149-157.
- Barnes, D. W.; Sirbasku, D. A.; Sato, G. H. (1984) *Cell Culture Methods for Molecular and Cell Biology*. Vol. 3. Alan R. Liss, Inc. New York.
- Becker, F. F. (1975) *Cancer. Etiology: Chemical and Physical Carcinogenesis*. Vol. 1. Plenum, Estados Unidos de América, 524 pp.
- Bishop, J. M. (1991) Molecular Themes In Oncogenesis. *Cell*, 64: 235-248.
- Cordero, A. G. (1984) Estudio de la iniciación de la carcinogénesis por 2-AAF en hepatocitos de rata *in vitro*. Importancia de la replicación del DNA. Tesis para obtener el grado de M.en C. con especialidad en Biología Celular, CINVESTAV del I.P.N. México, D. F.
- Draghi, E.; Armato, U.; Andreis, P. G.; Mengato, L. (1980) The Stimulation by Epidermal Growth Factor (Urogastrone) of the Growth of Neonatal Rat Hepatocytes in Primary Tissue Culture and Its Modulation by Serum and Associated Pancreatic Hormones. *Journal of Cellular Physiology*, 103:129-147.
- Farber, E. y Sarma, D. S. R. (1987) Biology of Disease. Hepatocarcinogenesis: A dynamic cellular perspective. *Laboratory Investigation* , 56 (1): 4-22.
- Fattel, S. (1988) Caracterización del cultivo en agar blando de hepatocitos provenientes de

- rata parcialmente hepatectomizada tratados con dimetilnitrosamina. Tesis para obtener el título de Biólogo. UNAM, E.N.E.P. Iztacala.
- Fitzgerald, J. D. y Yamasaki, H. (1990) Tumor promotion: models and assay systems. *Teratogenesis, carcinogenesis and mutagenesis*, 10: 89-102.
- Folkman, J. y Greenspan, H. P. (1975) Influence of geometry on control of cell growth. *Biochimica et biophysica acta*, 417: 211-236.
- Hakama, M.; Beral, V.; Buiatti, E.; Faivre, J.; Parkin, D. M. (1996) *Chemoprevention in Cancer Control*. IARC Scientific Publications No. 136. 140 pp.
- Heidelberger, C. (1975) Chemical carcinogenesis. *Ann. Rev. Biochem.* 44:79-121.
- Hiatt, H. H.; Watson, J. D.; Winsten, J. A. (1977) *Origins of Human Cancer*. Vol A: Mechanisms of carcinogenesis. Cold Spring Harbor Laboratory, E. U. A. 1303 pp.
- Hoffmann, B.; Piasecki, A.; Paul, D. (1989) Proliferation of fetal rat hepatocytes in response to growth factors and hormones in primary culture. *Journal of Cellular Physiology* 139:654-662.
- Hoffmann, B. y Paul, D. (1990) Precocious induction of tyrosine aminotransferase mRNA by hydrocortisone in cultured fetal rat hepatocytes at different developmental stages. *Journal Cellular of Physiology*. 143: 352-356.
- Kantor, R. R S.; Giardina, S. L.; Bartolazzi, A.; Townsend, A. J.; Myers, Ch. E.; Cowan, K. H.; Longo, D. L.; Vatali, P. G. (1991) Monoclonal antibodies to glutathione s-transferase Pi-immunohistochemical analysis of human tissues and cancers. *Int. J.Cancer*, 47: 193-201.
- Klein, J. C. (1981) How selective are agar cultures for malignant transformation? *Arch. Geschwulstforsch*, 51 (1): 58-62.
- Leffert, H. L. y Paul, D. (1972) Studies on primary cultures of differentiated fetal liver cells.

The Journal of Cell Biology 52: 559-565.

Leffert, H. L. y Paul, D. (1973) Serum dependent growth of primary cultured differentiated fetal rat hepatocytes in arginine-deficient medium. *Journal of Cellular Physiology*, 81:113-124.

Leffert, H. L. (1974) Growth control of differentiated fetal rat hepatocytes in primary monolayer culture. *The Journal of Cell Biology*, 62:767-779.

Lewin, B. (1994) *Genes V*. Oxford University Press. 1272 pp.

Lodish, H.; Baltimore, D.; Berk, A.; Lawrence, S.; Matsudaira, P.; Darnell, J. (1995) *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books, Inc. Tercera Edición. 1344 pp.

Lorenzo, M.; Roncero, C.; Benito, M. (1986) The rol of prolactin and progesterone in the regulation of lipogenesis in maternal and fetal rat liver *in vivo* and isolated hepatocytes during the last day of gestation. *Biochem. J.* 239: 135-139.

Neugut, A. I. y Weinstein, I. B. (1979) The use of agarose in the determination of anchorage-independent growth. *In vitro*, 15 (5): 351-354.

Mannervik, B. y Danielson, U. H. (1988) Glutathione transferases: structure and catalytic activity. *CRC Crti. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 23: 282-337.

Peraino, C.; Michael, R. J.; Staffeldt, E.; Christopher, J. P. (1975) Comparative enhancing effects of phenobarbital, amobarbital, diphenylhydantoin, and dichorodiphenyltrichoroethane on 2-acetylaminofluorene- induced hepatic tumorigenesis in the rat. *Cancer research*, 35: 2884-2890.

Pitot, H. C.; Barsness, L.; Goldsworthy, T. (1978) Biochemical characterisation of stages of hepatocarcinogenesis after a single dose of diethylnitrosamine. *Nature*, 271: 456-458.

Pitot, H. C. (1990) Altered hepatic foci: their role in murine hepatocarcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 465-500.

- Pitot, H. C. (1991) Biochemical markers associated with the stages of promotion and progression during hepatocarcinogenesis in the rat. *Environmental Health Perspectives* 93: 181-189.
- Rojas, O. A. (1994) Establecimiento del cultivo primario de hepatocitos fetales de hamster fetal para estudios de carcinogénesis química. Tesis para obtener el título de Biólogo, UNAM, E.N.E.P. Iztacala.
- 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.
- Rosales, J. L. (1982) Estudio de la iniciación de la transformación celular por 2-AAF en cultivo primario de hepatocitos de rata. Tesis para obtener el grado de M. en C. con especialidad en Biología Celular, CINVESTAV del I.P.N. México, D. F.
- Sato, K. (1988) Glutathione- S-transferases and hepatocarcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.*, 79: 556-572.
- Sato, K. (1989) Glutathione transferases as markers of preneoplasia and neoplasia. *Advances in cancer research*, 52: 205-255.
- Scherer, E. y Emmelot, P. (1975) Kinetics of induction and growth of precancerous liver-cell foci, and liver tumour formation by diethylnitrosamine in the rat. *Europ. J. Cancer*, 11: 689-696.
- Shimkin, M. B. (1979) *Contrary to Nature*. U. S. Department of health, education and welfare. Washintong, D. C., E. U. A. 498 pp.
- Solt, D. y Farber, E. (1976) New principle for the analysis of chemical carcinogenesis, *Nature*, 263: 701-703.
- Talamás, P. (1983) Estudio comparativo de los fenómenos involucrados en la iniciación de

- la carcinogénesis química por la ¹⁴C-DMN en cultivo primario de hepatocitos de rata intacta y de rata parcialmente hepatectomizada. Tesis para obtener el grado de M. en C. con especialidad en Biología Celular, CINVESTAV del I. P. N. México, D. F.
- Tomatis, L.; Aitio, A.; Wilbourn, J.; Shuker, L. (1989) Human carcinogens so far identified. *Jpn. J. Cancer Res.* 80: 795-807.
- Torroella, M. y Villa, S. (1997) Bases genéticas del cáncer. En prensa.
- Vandenberghe, Y; Glaise, D.; Meyer, D. J.; Guillouzo, A.; Ketterer, B. (1988) Glutathione transferase isoenzymes in cultured rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, 37: 2482-2485.
- Vandenberghe, Y.; Morel, F.; Foriers, A.; Ketterer, B.; Vercruysse, A.; Guillouzo, A.; Rogiers, V. (1989) Effect of phenobarbital on the expression of glutathione S-transferase isoenzymes in cultured rat hepatocytes. *FEBS Letters*, 251: 59-64.
- Yeoh, G.; Porter, I.; Arcus, M.; Douglas, A. (1989) Transformation of cultured fetal rat liver cells by MDAB and phenobarbital. Morphological, biochemical and immunocytochemical characterization of cell lines. *Carcinogenesis*, 10 (6): 1015-1027.
- Zhang, L. (1994) The value of placental glutathione S-transferase and γ -glutamyl transpeptidase as markers of altered foci during hamster pouch carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 15 (1): 105-109.

Esta tesis fue realizada en el departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Saúl Villa Treviño.