



Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
UNIDAD IZTACALA

CARACTERIZACION DE CULTIVOS PRIMARIOS DE HEPATOCITOS
DE RATA SOBRE BIOMATRIZ HEPATICA.

T E S I S

Que para obtener el Título de
B I O L O G O

p r e s e n t a

MARIA EUGENIA TORRES MARQUEZ

1 9 8 3



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo fue realizado en el Depto. de Bioquímica - del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN bajo la dirección del Dr. -- Marcos Rojkind a quien agradezco su aportación en mi de sarrollo académico.

Esta tesis representa la - culminación de una parte - de mi formación tanto académica como personal y como no soy mas que la obra construida por toda la gente que me ha rodeado hasta ahora, agradezco a todas - estas personas su grano(s) de arena.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVO	11
MATERIALES	12
METODOS	
Preparación de Biomatriz	13
Preparación de Cajas con Biomatriz	13
Medio de Cultivo	14
Preparación de los Factores Plaquetarios de Creci- miento	16
Aislamiento de Hepatocitos	17
Cuantificación de los Hepatocitos	18
Incorporación de Leucina- ³ H en Proteínas	18
Fluorografía	19
Incorporación de Timidina- ³ H en DNA	19
Medición Bioquímica de la γ -GTT	20
Determinación Histoquímica de la γ -GTT	21
Determinación Histoquímica de la ATPasa	21
RESULTADOS	23
Figura 1. Determinación del Número de Células Median- te la Actividad de LDH	24
Tabla 1. Incorporación de Leucina- ³ H en Proteínas Sin- tetizadas por los Hepatocitos Cultivados - sobre Biomatriz	26
Figura 2. Fluorografía de las Proteínas Radioactivas - Sintetizadas y Liberadas al Medio de Cultivo.	27
Tabla 2. Incorporación de Timidina- ³ H en DNA de los Hepatocitos cultivados sobre Biomatriz	28
Tabla 3. Actividad de la γ -Glutamyl-Transpeptidasa en el Hígado fresco	30

Tabla 4.	Actividad de γ -Glutamyl-Transpeptidasa en Hígado Fresco y en Hepatocitos en Cultivo....	31
Figura 3.	Determinación Histoquímica de la γ -Glutamyl Transpeptidasa en corte de Riñón	32
Figura 4.	Determinación Histoquímica de la γ -Glutamyl Transpeptidasa en corte de Hígado Normal	33
Figura 5.	Morfología de los Hepatocitos Cultivados sobre Biomatriz Hepática	36
Figura 6.	Determinación Histoquímica de la Actividad ATPasa en los Hepatocitos Cultivados sobre Biomatriz Hepática	37
Figura 7.	Determinación Histoquímica de la γ -Glutamyl-Transpeptidasa en Corte de Hígado Preneoplásico	38
Figura 8.	Determinación Histoquímica de la γ -Glutamyl Transpeptidasa en Cultivos de Hepatocitos de Hígado Preneoplásico sobre - Biomatriz Hepática	39
Figura 9.	Determinación Histoquímica de la γ -Glutamyl-Transpeptidasa en Hepatocitos de Hígado Preneoplásico Cultivados sobre Biomatriz de Riñón	40
DISCUSION	41
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFIA	49
ABREVIATURAS	55

RESUMEN

La biomatriz hepática es el único substrato que ha permitido la sobrevivencia de los hepatocitos en cultivo por períodos prolongados (4 meses), y aunque se han identificado ya algunas de las funciones que las células realizan en dicho substrato, a la fecha no se ha efectuado un estudio cuantitativo de tales funciones. En este trabajo se reporta la fase inicial de una caracterización cuantitativa de cultivos primarios de hepatocitos de rata normal adulta sobre biomatriz hepática de rata, considerando como parámetros la síntesis de proteínas y de DNA, así como el mantenimiento del fenotipo adulto y de la morfología celular. Todos los estudios se realizaron a las 24 horas de haber iniciado el cultivo. Los resultados obtenidos indican que existe una síntesis activa de proteínas tanto celulares como de exportación, la cual se mantiene en alto grado aún a los 7 días de cultivadas las células; además los hepatocitos parecen sintetizar DNA, y mantienen una morfología y un fenotipo similares a los que muestran *in vivo*. Se observó también que la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) es un método muy adecuado para cuantificar hepatocitos cultivados sobre biomatriz. Estos datos, en conjunto, abren perspectivas para el uso de este sistema en estudios tales como la inducción *in vitro* de la carcinogénesis, diferenciación, etc.

INTRODUCCION

El hígado puede considerarse como una glándula endócrina puesto que produce una gran cantidad de proteínas y lípidos - sanguíneos, y a la vez como una glándula exócrina, ya que se secreta bilis en el lumen intestinal. Además, este órgano filtra materiales de diversos orígenes que llegan a él a través de la circulación sanguínea, regula las concentraciones plasmáticas de multitud de metabolitos y detoxifica al organismo de sustancias extrañas (1).

Como glándula endócrina, el hígado es el sitio de síntesis de la mayoría de las proteínas del plasma tales como la albúmina, transferrina, lipoproteínas de alta y baja densidad, fibrinógeno y protombina (2-7) así como de la mayoría de las antiproteasas (8). También es capaz de aumentar los niveles plasmáticos de un cierto número de α -globulinas - (haptoglobina, ceruloplasmina, α_1 -glicoproteína ácida) o bien de hacerlas presentes, como en el caso de la α_2 -macroglobulina, la cual es detectada después de que se ha desencadenado un proceso infeccioso (9-11).

Dentro de las funciones exócrinas del hígado está la eliminación de bilirrubina, esteroides y otros compuestos semejantes que deben transportarse en la circulación unidos a proteínas plasmáticas, por lo cual la excreción renal de dichos complejos no es posible. Tal función excretora la

realiza el hígado gracias a que las grandes ventanas de las células endoteliales de los sinusoides permiten el libre - acceso de los complejos al espacio de Disse y, en esta forma, su arribo a la membrana del hepatocito, donde acarreadores específicos facilitan el desacoplamiento de las moléculas enlazadas y su transporte al interior de las células, en el cual son transformadas en moléculas con mayor grado de hidrofilicidad, pudiendo de este modo secretarse en la bilis junto con sólidos orgánicos entre los que figuran las sales orgánicas, lecitina y colesterol, así como compuestos inorgánicos, principalmente sales sódicas (12,13).

El hígado juega además un papel central en el mantenimiento de la homeostasis de carbohidratos (14). Durante la alimentación la glucosa que no es utilizada se almacena en el hígado en forma de glucógeno, el cual durante períodos prolongados de inanición puede hidrolizarse para dar glucosa gracias a la glucogenolisis. De esta manera el hígado provee de glucosa a los tejidos que la utilizan como único combustible, particularmente el cerebro.

La detoxificación de compuestos extraños es una función más del hígado. Existe una gran cantidad de drogas que, debido a la semejanza que guardan con respecto a compuestos normalmente presentes en el organismo, pueden ser metabolizados de manera similar a dichos compuestos. Sin embargo, los

compuestos extraños que no tienen contraparte endógena son generalmente metabolizados en el hígado por enzimas no específicas. Para tal efecto existen dos vías principales: la primera incluye reacciones que pueden transformar un grupo funcional en otro o introducir grupos polares en compuestos hidrofóbicos; la segunda comprende reacciones que conjugan grupos polares con glucuronato, sulfato, glicina, glutamina y grupos metilo (15).

De acuerdo a lo señalado anteriormente el hígado es un efector central en la homeostasis de los mamíferos, y es por esta razón que se han diseñado algunos métodos que permitan estudiar *in vitro* y en forma separada, diversos aspectos de su fisiología. Cuatro preparaciones son de uso general para tal efecto: hígado aislado perfundido, incubación de rebanadas hepáticas, cultivos de líneas celulares hepáticas y cultivos de células parenquimatosas de hígado (16). Aunque todas estas preparaciones han aportado conocimientos importantes, cada una tiene sus limitaciones metodológicas. El hígado aislado perfundido y las rebanadas hepáticas implican el uso de tejido no fraccionado, y en consecuencia fallan en la discriminación funcional entre las células parenquimatosas y las sinusoidales (16). En la búsqueda de una preparación más homogénea de células se desarrollaron los cultivos de líneas celulares provenientes de explantes de hígado (17). Estas líneas celulares satisfacen los requerimientos de homo-

geneidad, pero generalmente fallan como un sistema ideal ya que, a pesar de que su origen fue un grupo de células hepáticas, después de tantas rondas de replicación a las que se han sometido, las células carecen ya de muchas de sus características fisiológicas iniciales (18). Por último, las células aisladas directamente del animal no tienen este problema y, en cambio, presentan las siguientes ventajas - como sistema modelo: permiten el uso de células específicas sin la interferencia de otros tipos celulares, permiten seguir el curso temporal de un fenómeno dado y evitan la variabilidad biológica que resulta del uso de varios animales (19).

No obstante, una limitación importante de este último sistema es el corto período de sobrevivencia de -1 1/2 a 4 horas - de los hepatocitos una vez aislados del órgano (20,21). Una variante que evita esta limitación es el establecimiento de los hepatocitos en cultivo primario - las células se cultivan en monocapa inmediatamente después de extraerse del hígado-, ya que de esta manera se proporcionan a las células los diferentes nutrientes, factores y complementos hormonales, así como un substrato sobre el cual puedan crecer en condiciones similares a las de su medio ambiente natural (16).

Sin embargo, los cultivos primarios de hepatocitos y en general los de células epiteliales no han podido establecerse fácilmente (22), debido entre otras causas a: i) Un inadecuado

medio basal (23). ii) Inadecuados requerimientos hormonales (24), iii) las condiciones estáticas del cultivo celular, en el cual los gradientes de oxígeno y nutricionales limitan el crecimiento y el funcionamiento de las células (25), iv) la acumulación de productos de desecho que pudieran ser tóxicos para las células (23), y v) una carencia de organización en tres dimensiones como consecuencia de una interacción célula-substrato y célula-célula inadecuadas (26).

i) El medio debe suplir los nutrientes esenciales -iones totales, elementos que se requieren en pequeña cantidad (trazas), aminoácidos, vitaminas, etc. -y mantener dentro de límites aceptables los parámetros fisiológicos. Un adecuado punto de partida, en cuanto a hepatocitos se refiere, es el medio esencial mínimo (MEM) propuesto por Eagle en 1959 (27) el cual contiene un balance adecuado de nutrientes. Existen dos tipos de medios de cultivo: aquéllos cuya constitución esta químicamente definida, o bien aquéllos en los que esta definición no es completa por estar complementados con suero bovino fetal, cuya composición es desconocida (28). La razón por la cual el suero es usado como suplemento del medio es porque contiene gran número de diferentes actividades promotoras del crecimiento - -aunque también inhibitoras en un soporte fisiológicamente balanceado (23). Esta característica del suero, que en algunos casos es una ventaja, en otros representa más bien una limitación, ya que interfiere

en el estudio de las actividades metabólicas específicas de algunas células, por lo que se ha ideado la manera de suplementar medios basales con cantidades conocidas de elementos necesarios, que normalmente aportaría el suero (28,29). De los medios recientemente reportados el que propone Yamada y col. (29) contiene entre sus elementos al ácido oleico, y el de Hasegawa y col. (30) introduce el uso de ácido pirúvico. Estos medios de cultivo son adicionados de hormonas y factores de crecimiento, de los cuales se hablará a continuación.

ii) Los requerimientos hormonales, en general, se han determinado empíricamente, y a la fecha se han propuesto varias posibles funciones de las hormonas en los cultivos. Así, se ha sugerido que la insulina incrementa la eficiencia de anclaje (31), estimula la producción de albúmina y la síntesis de proteínas en general (32,33), induce la glucocinasa (34,35) y estimula la prolil-hidroxilasa (36). Por otra parte, el glucagon ayuda a mantener la actividad de fosfoenol-piruvato-carboxicinasa (37), la gluconeogénesis (38) y la entrada de aminoácidos gluconeogénicos (39). También se encontró que la hormona del crecimiento es estimulante de la producción de somatomedina - péptidos con actividad mitogénica- y junto con otras hormonas, induce la proliferación celular hasta por 6 días (40,41). La presencia de hormonas esteroides como la dexametasona incrementa el tiempo de sobrevida de los cultivos (42) y las del tipo -

hidrocortisona inducen la actividad del citocromo P₄₅₀ (43-45). Sin embargo, la presencia de este tipo de hormonas incrementa la actividad de gama-glutamyl-transpeptidasa (γ -GTT), la cual es una enzima localizada en la membrana plasmática (46) cuya actividad está aumentada en estados fetales y en células transformadas, por lo que es conveniente que se supriman del medio estos esteroides (47).

Otros elementos que con frecuencia se añaden al medio de cultivo son los factores epidérmico y plaquetario de crecimiento (FEC y FPC respectivamente), cuya función en el cultivo es inducir la duplicación celular (48-50); en el caso del FEC también se ha reportado que activa los sistemas de transporte de iones monovalentes (51) así como la fosforilación de proteínas de la membrana plasmática (52), e incrementa la actividad de la ornitina descarboxilasa (53).

iii) y iv) En cuanto a la necesidad de una tensión de oxígeno y un gradiente de nutrientes adecuados, así como la acumulación de metabolitos tóxicos para la célula, un cambio continuo del medio de cultivo (cada 24 horas) permite por una parte mantener una proporción adecuada de nutrientes, y por otra conserva los metabolitos de desecho por debajo de una concentración tóxica; este cambio de medio, aunado a una presión de 95% de O₂ y 5% de CO₂ -son las mejores condiciones hasta ahora encontradas (54).

v) La interacción célula-substrato es importante para

las células ya que se ha sugerido que determina la eficiencia de anclaje, así como la sobrevivencia, la forma y la funcionalidad celular (22,26,55-57). En la búsqueda de un sustrato adecuado, se ha probado una considerable cantidad de materiales, entre los cuales están el plástico (16,32,58), la Concanavalina A y cationes divalentes (59), asialoglicoproteínas (60) y los filtros de nitrocelulosa (61); en todos ellos el período de sobrevivencia de las células no excede de 15 días.

Considerando que las células *in vivo* se encuentran en contacto con elementos de la matriz extracelular, entre los cuales se encuentran los diferentes tipos genéticos de colágena (62-64), las glicoproteínas fibronectina y laminina (65, 66) y los glicosaminoglicanos (67-69), algunos de esos elementos se probaron como sustrato para los hepatocitos, encontrándose que con la colágena se presentaba el mayor lapso de vida celular, el cual fue de un mes (70-73). Ya que estos resultados eran aún insatisfactorios se probó un extracto crudo de tejido conectivo hepático (74), al cual se denominó biomatriz y con el cual se logró un período de sobrevivencia de 4 meses (74).

Además de la influencia sobre el lapso de vida de las células en cultivo, la biomatriz resultó ser el sustrato con el que mayor eficiencia de anclaje se ha logrado obtener (90%), característica que se ha demostrado es dependiente de la fracción proteica soluble en ácido acético presente en -

esta biomatriz (75).

Ahora bien, en cuanto a la participación de este subtrato en el mantenimiento de la funcionalidad celular, se sabe que los hepatocitos cultivados sobre biomatriz hepática sintetizan albúmina y mantienen presentes otros marcadores funcionales específicos durante aproximadamente 4 meses (74). Por otro lado, células de epitelio mamario de rata cultivadas sobre biomatriz del mismo origen son también capaces de crecer y producir lactosa y α -lactalbúmina (76).

Hasta este momento se sabe que la biomatriz mantiene un largo período de sobrevida de los hepatocitos a través del cual se expresan algunas funciones típicas de su fenotipo adulto, pero aún se desconoce la magnitud de tal expresión, por lo que esta tesis planteó el siguiente:

OBJETIVO

CARACTERIZACION DE CULTIVOS PRIMARIOS DE HEPATOCITOS DE RATA SOBRE BIOMATRIZ HEPATICA (Fase Inicial).

Los parámetros específicos de funcionalidad considerados fueron la síntesis de proteínas, medida por incorporación de leucina-³H; la síntesis de DNA, medida por incorporación de timidina-³H; la estabilidad fenotípica, determinada tanto bioquímica como histoquímicamente por la actividad de γ -GTT. Todos estos parámetros se midieron a las 24 horas de haber sembrado las células, excepto la síntesis de proteínas, la cual se determinó tanto a las 24 horas como a los 7 días.

MATERIALES

El material de plástico utilizado en los cultivos (cajas de Petri de 35 mm, pipetas, tubos de centrífuga, recipientes) fue adquirido de Lux Scientific Corp. (Newbury Park, Ca. USA) y Falcon Labware, División Becton Dickinson and Co. - (Cockesville, Md. USA). Las soluciones y medios de cultivo que se utilizaron fueron preparados con reactivos de grado analítico de la más alta pureza: aminoácidos, hormonas y vitaminas se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (Phillesburg, N.J. U.S.A.), las diferentes sales, de Merck (Darmastd, RFA), los antibióticos de Gibco Laboratories (Gran Island, N.Y. U.S.A.), la leucina-³H se obtuvo de New England Nuclear Corp (Boston, Ma. U.S.A.) y la timidina-³H se obtuvo de Amersham Corp. (Arlington Heights, Ill. U.S.A.).

La malla de nylon (Pe Cap HD7-85, 166-168 mallas por pulgada) utilizada en los pasos de filtración de las células y la preparación de la biomatriz se obtuvo de Tetko Inc. (Elmsford, N.Y. U.S.A.). Los filtros para esterilización de los medios fueron de 0.2µm y se obtuvieron de Millipore Corp. (Bedford, Ma. U.S.A.); los filtros de fibra de vidrio que retienen partículas de 1.2µm fueron obtenidos de Whatman Inc. (Clifton, N.J. U.S.A.). La película utilizada en la fluorografía, fue del tipo XS-5, 13 x 18 cm, y se obtuvo de Kodak de México (Guadalajara, Jal. México).

METODOS

Preparación de biomatriz.- La biomatriz se preparó como lo describen Rojkind y col. (74). Se licuó el tejido con 5 a 10 volúmenes de agua a 4°C (todo el procedimiento se realizó a esta temperatura) y se filtró inmediatamente a través de una malla de nylon. El material retenido (biomatriz) fue sujeto a varios lavados sucesivos -con agitación, de 1 hora cada uno- con las siguientes soluciones: NaCl 1M, butanol-éter 3:2, v/v, agua (2 veces o más); después del último lavado la biomatriz se filtró, se secó en papel filtro y se almacenó en medio de cultivo con antibiótico a -20°C. El rendimiento obtenido fue de aprox. 1% (g biomatriz húmeda/g de tejido).

Preparación de cajas con biomatriz.- Fragmentos de 10µm de biomatriz se obtuvieron por medio de un criostato (TETKO; Miles Tissue-tek II), y con un pincel se esparcieron lo más homogéneamente posible cubriendo toda la superficie de una caja de cultivo; a estas cajas se les agregó 1 ml del amortiguador salino de fosfatos (PBS), pH 7.4, conteniendo penicilina y estreptomina en las mismas concentraciones que las utilizadas en el medio. Las cajas se expusieron a luz UV durante la noche. Dos horas antes de iniciar los cultivos se eliminó el PBS de las cajas, y se les agregó el medio de cultivo cuya esterilidad se verificó por observación

en el microscopio.

Medio de cultivo.- El medio - carente de suero - usado fue el MEM modificado por Yamada y col. (29) y adicionado de hormonas (41), ácido pirúvico (30), factor plaquetario de crecimiento de bovino (77) y antibióticos (78). La composición final del medio fue la siguiente:

SALES	mg/L	Aminoácidos esenciales	mg/L
NaCl	6500	L-Arginina	105
KCL	400	L-Cisteína	324
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2000	L-Histidina	294
NaH ₂ PO ₄ · 4H ₂ O	140	L-Isoleucina	52
NaHCO ₃	200	L-Lisina	58
CaCl ₂ · 2H ₂ O	200	L-Fenilalanina	32
<hr/>		L-Treonina	48
Aminoácidos no esenciales mg/L		L-Triprófanó	10
<hr/>		L-Valina	46
L-Glutamina	294	L-Metionina	15
L-Alanina	890	L-Leucina	52.4
L-Aspártico	1330	<hr/>	
L-Asparagina	1500	Vitaminas	mg/L
L-Glutámico ⁻	1470	Cloruro de Colina	1.0
L-Prolina	1150	Acido Fólico	2.0
L-Serina	1050	Mio-inositol	1.0
L-Glicina	750	Nicotinamida	1.0
<hr/>		D-Pantotenato de Calcio	1.0
Hormonas	mg/L	Fosfato de Piridoxal	1.0
Insulina	6.72	Riboflavina	0.1
Transferrina	6.72	Tiamina	1.0
Inosina	6.72	Acido ascórbico	17.5
Ornitina	6.72	Biotina	0.02
T ₃	6.72	Hipoxantina	25.0
T ₄	6.72	Cianocobalamina	0.2

Otros Elementos	mg/L	Antibióticos	
Albúmina	2000.0	Penicilina	1000 U/ml
Acido Oleico	5.4	Estreptomicina	1000 U/ml
Glucosa	2000.0	Anfotericina	250 µg/ml
Acido pirúvico	4400.0	Se adiciona FPC a una <u>concentración</u> final de 10%.	
Glutati6n	15.0		
Rojo de fenol	100.0		
Hepes	780.0		

Preparaci6n de los Factores Plaquetarios de Crecimiento- (FPC).- Los factores plaquetarios de crecimiento son péptidos que se liberan de las plaquetas durante el proceso de coagula- ción, por lo que para su obtenci6n se procedió primeramente al aislamiento de estas células de la sangre de bovino, de acuerdo con el método de Gudino y Miller (79). La sangre se colectó en una soluci6n de ácido etilén-diamino-tetracético (EDTA) en una concentraci6n final de 1.5 mg/ml de sangre, se centrifugó a 250 x g por 10 min y con mucho cuidado se co- lectó el sobrenadante, el cual fue centrifugado a 1900 x g durante 10 min. El paquete obtenido en este paso contiene a las plaquetas.

Para inducir la coagulaci6n y con esto la liberaci6n de los factores, las plaquetas se resuspendieron en un amorti- guador Tris 20 mM (aproximadamente la décima parte del volumen

de suero original) conteniendo 14 μ m de CaCl_2 /ml de sangre y se dejaron a 4°C durante la noche. Al siguiente día fue separado el coágulo por centrifugación a 10000 x g durante 20 min y el material sobrenadante -que contenía a los factores plaquetarios- se esterilizó por filtración en millipore. La concentración de los factores plaquetarios se ajustó a un valor de 10x (es decir, el volumen de Tris en el que se reconstituyeron fue 10 veces menor que el volumen de suero inicial).

Aislamiento de Hepatocitos.- Las células se obtuvieron perfundiendo inicialmente el hígado con un medio Ringer-Krebs (80) sin calcio conteniendo NaCl 122 mM, KCl 4.89 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, MgSO_4 1.2mM, NaHCO_3 24.76 mM, equilibrado con O_2/CO_2 (95/5%), el cual fue incubado a 37°C. Se pasaron 100 ml de esta solución a través del hígado para eliminar el calcio extracelular (81), enseguida se hizo recircular durante 10 min una solución igual a la anterior, pero que además contenía CaCl_2 5 mM y colagenasa 1 mg/ml. Se eliminó la cápsula de Glisson (82) y se agitó el hígado en un recipiente conteniendo la solución inicial de perfusión, esta vez conteniendo CaCl_2 2.5 mM, y se filtró a través de una malla de nylon. El filtro se centrifugó a 50 x g durante 2 min y se descartó el sobrenadante; el precipitado se lavó 1 ó 2 veces más con esta misma solución, se resuspendió en medio de cultivo a una dilución de 10^6 células/ml y se depositó en cajas de cul

tivo (1 ml cada una) que contenían biomatriz.

Cuantificación de los Hepatocitos.- De acuerdo con Obrink (83), la actividad de lactato-deshidrogenasa (LDH) es constante en los hepatocitos normales, de manera tal que puede tomarse como un indicador del número de células en un cultivo. La actividad puede determinarse por la cantidad de ácido pirúvico que la enzima transforma en ácido láctico, utilizando NADH como donador de electrones -en una relación estequiométrica- que puede medirse como un decremento en la absorción a 340 nm. Así, para cuantificar a los hepatocitos se eliminó el medio de las cajas, se lavaron con PBS y a cada una se le añadió 500 μ l de amortiguador de lisis (Tritón X-100, albúmina 1% en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4). De esta manera las células se rompieron y la enzima quedó en forma soluble; esta solución se agregó a una mezcla de reacción que contenía 80 μ g/ml de NADH, 50 μ g/ml de ácido pirúvico, pH 7 y se registró el decremento de absorbencia a 340 nm. La curva patrón de actividad de LDH vs número de hepatocitos se determinó a partir de preparaciones de hepatocitos frescos contados en un hemocitómetro.

Incorporación de Leucina-³H en proteínas. La incorporación de leucina-³H se midió adicionando 5 μ Ci del isótopo - por ml de medio (sin leucina fría para estos estudios) e incubando las células a 37°C con una tensión de O₂/CO₂ de 95/5% (condiciones estándar). A las 24 horas de incubación el -

medio se separó de las células, se lavaron las cajitas con 1 ml de PBS, el cual se adicionó al medio de cultivo. De este material se tomaron 0.2 ml y se agregó un volumen igual de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, se filtró a través de discos de fibra de vidrio (1.2 μm), se lavó con 1 ml de TCA al 5% y los filtros se resuspendieron en 2 ml de agua más 10 ml de líquido de centelleo (aquasol) para determinar la radiactividad en un aparato Packard modelo 3255. Por otro lado, para medir la incorporación de leucina- ^3H en proteínas asociadas a la capa celular, se trataron las células con 1 ml de amortiguador de lisis, y alícuotas de 0.1 ml de este lisado recibieron el tratamiento ya descrito para las alícuotas del medio de cultivo.

Fluorografía.- Se preparó un gel de SDS-acrilamida al 7.5% de acuerdo al sistema descrito por Laemli (84) y se corrieron -en condiciones reductoras- alícuotas conteniendo 30, 60, 120 y 160 μg de proteína, la cual se determinó por el método de Lowry (85). Posteriormente el gel se trató con ácido salicílico 1 M durante 1 hora (86), se secó y se expuso sobre una película fotográfica (Kodak XS-5) durante 90 días a -70°C , período después del cual se reveló la película.

Incorporación de Timidina- ^3H en DNA.- Se siguió el procedimiento descrito por Strain y col. (77). Después de dar un pulso de timidina- ^3H (5 $\mu\text{Ci/ml}$ de medio), se mantuvieron

los cultivos en condiciones estándar durante 24 horas, al final de las cuales se eliminó el medio de cultivo y a las células se les agregaron 2 ml de KOH 1 N por 1 hora. Un ml se transfirió a un tubo de vidrio y se añadió un ml de TCA al 10%; el precipitado que se formó se transfirió a un filtro de fibra de vidrio (1.2 μ) y se lavó 3 veces con 3 ml de TCA al 5% y 3 veces con etanol absoluto. El filtro se sometió a ebullición con 800 μ l de ácido perclórico 0.5N durante 15 min y, finalmente, se tomaron alícuotas de 500 μ l para determinar su radiactividad.

Medición Bioquímica de la γ -GTT. La actividad transpeptidasa de esta enzima se determinó de acuerdo al reporte de Cameron y col. (87) utilizando γ -glutamyl-p-nitroanilina como sustrato, del cual la enzima transfiere el glutámico al aceptor glicil-glicina con la consecuente liberación de p-nitroanilina, la cual puede cuantificarse por absorbencia a 400 nm.

La mezcla de reacción - consistente de Tris-HCl 60 mM pH 8.2, MgCl₂ 20 mM, glicil-glicina 50 mM pH 8.2 y γ -glutamyl-p-nitroanilina 20 mM en un volumen total de 1.8 ml - se preincubó durante 10 min a 37°C. La reacción se inició añadiendo 100 μ l del lisado celular; después de incubar a 37°C con agitación por un lapso de 20 a 60 min, la reacción se detuvo con 2 ml de ácido acético 1.5 M y se cuantificó la p-nitroanilina liberada. La curva patrón de p-nitroanilina

fue utilizada en un rango de 0-200 nanomolas.

Determinación Histoquímica de la γ -GTT. La determinación histoquímica de la γ -GTT - de acuerdo al método de - Rutemberg y col. (88) - consiste en la formación de precipitados de color rojo intenso debido a que la hidrólisis enzimática del sustrato γ -glutamil-4-metoxi-2-naftilamida, libera la región 4-metoxi-2-naftilamida, que en presencia del agente acoplante azul rápido queda fijada en la región en que la reacción se lleva a cabo; el complejo formado tiene un color anaranjado que al formar un quelato con cobre cambia a rojo intenso. Para la determinación enzimática en los - cultivos, se eliminó el medio de las cajitas, las cuales se lavaron con PBS y se fijaron en una solución de formol-Ca²⁺ (formol al 2% conteniendo CaCl₂ 0.5%, pH 7) durante 5 min, se repitió el lavado con PBS y se incubaron en la mezcla de reacción (γ -glutamil-4-metoxi-2-naftilamida 0.25 mg/ml, glicil-glicina 0.5 mg/ml, azul rápido 0.5 mg/ml en una solución salina al 0.85% amortiguada a un pH de 7.4 con Tris-HCl) - durante 40 min. Se lavó con solución salina, se incubó durante 2 min con sulfato cúprico 0.1 M y se lavó con PBS. En el caso de los cortes de tejido el procedimiento que se - siguió fue el anteriormente descrito, sólo se cambiaron los tiempos de fijación (12-16 horas) y de reacción (30 min para cortes de riñón y 60 min para cortes de hígado).

Determinación Histoquímica de la ATPasa.- La determina

ción de la actividad ATPasa, de acuerdo a Hugon y Borgers (89), se basa en la formación de precipitados de sulfuro de plomo. La reacción se lleva a cabo en 2 pasos, el primero de los cuales se realiza cuando la enzima libera fosfato por la hidrólisis del ATP; este fosfato forma un quelato con el plomo. En el segundo paso el sulfuro de amonio precipita los quelatos. En la práctica, las células se fijaron por 3 min con formol- Ca^{2+} , se lavaron con amortiguador de cacodilato de sodio 0.1M, pH 7.4, y se incubaron durante 20 min en la mezcla de reacción (ATP 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 0.12% sulfato de magnesio 10 mM, disuelto en Tris-maleato 0.2M, pH 7.2). Posteriormente se lavaron las cajitas con agua bidestilada, se incubaron con sulfuro de amonio diluido por 1 min y se lavaron con agua destilada.

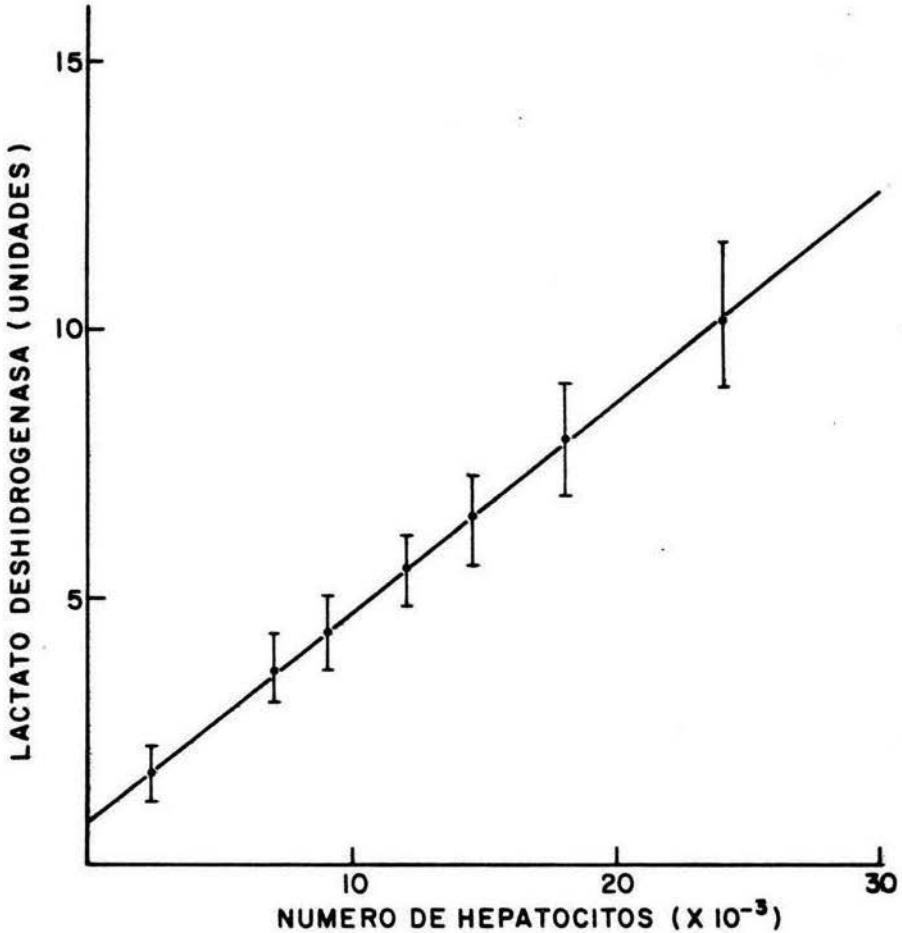
RESULTADOS

Un método generalmente utilizado en la determinación del número celular ha sido el conteo por hemocitómetro. Sin embargo, tal método presenta cierto grado de error debido a que no se puede distinguir entre células viables y no viables, además de que en algunos casos las células se agregan y esto impide establecer con claridad el número celular. Además, cuando se intenta despegar las células que se han cultivado sobre biomatriz, o bien se les daña, o simplemente no se les despega del substrato para transferirlas al hemocitómetro. Debido a estos problemas se procedió a estandarizar el método de la deshidrogenasa láctica.

Como se muestra en la Figura 1 la actividad de LDH guarda una relación lineal con el número de hepatocitos hasta 2×10^4 células. Para concentraciones mayores de hepatocitos, la pendiente fue diferente, debido posiblemente a que los substratos estaban en cantidad limitante. Por tal motivo todas las mediciones se hicieron en el rango comprendido entre 2.5 y 20×10^3 células, aunque los resultados de las mediciones enzimáticas realizadas se expresan por millón de células, para así facilitar la comparación de valores.

Como se mencionó en la introducción, una capacidad importante del hígado es la de síntesis de proteínas tanto de uso interno como de exportación, por lo cual se verificó la

FIGURA 1. DETERMINACION DEL NUMERO DE CELULAS MEDIANTE LA ACTIVIDAD DE LDH



Los valores corresponden al promedio de cuando menos cuatro mediciones por duplicado ± 1 D.S.

* Una unidad de LDH equivalente al decremento de 0.01 D.O. a 340 nm y es equivalente a la oxidación de 4.82×10^{-4} μ moles de NADH/min a 25°C y a pH de 7.0.

capacidad de los hepatocitos en cultivo primario de incorporar leucina- ^3H en proteínas. En la Tabla 1 se muestra la incorporación de este aminoácido radiactivo en las fracciones precipitables por TCA, tanto de proteínas de exportación como de las asociadas a la capa celular; los datos fueron de $3.41 \pm 1.1 \times 10^5$ y $6.27 \pm 1.7 \times 10^4$ dpm por millón de células respectivamente. Dos mediciones realizadas a los 7 días de cultivo, en condiciones similares, reportan resultados semejantes.

La fluorografía de las proteínas sintetizadas y liberadas al medio de cultivo se muestran en la Figura 2. Se observa una banda principal (f) con un peso aproximado de 65 000 daltones y con una movilidad relativa (Mr) de 0.52, así como cuatro bandas menores (g, h, i, j) con Mr de 0.55, 0.69, 0.70 y 0.97; por encima de la banda de 65 000 existen cinco más (a, b, c, d, e) con Mr de 0.43, 0.24, 0.16, 0.11 y 0.05.

La población celular hepática *in vivo* tiene una vida media aproximada de un año (90); sin embargo, ante ciertos estímulos es capaz de proliferar. Con el objeto de ver la capacidad proliferativa de los hepatocitos en el cultivo sobre biomatriz hepática, se determinó la incorporación de timidina- ^3H , encontrándose un valor de $1.53 \pm 0.23 \times 10^4$ dpm por millón de células (Tabla 2).

La pérdida de las características fenotípicas de las

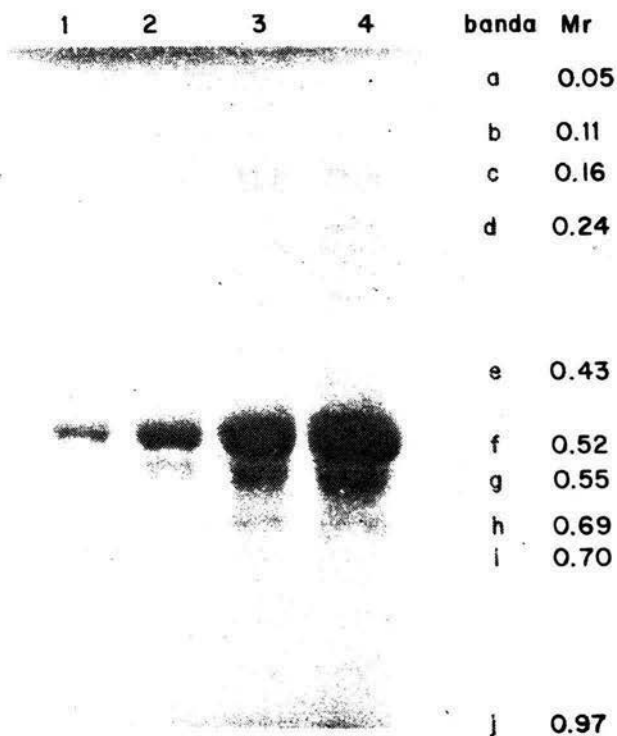
TABLA 1. INCORPORACION DE LEUCINA-³H EN PROTEINAS SINTETIZADAS POR LOS HEPATOCITOS CULTIVADOS SOBRE BIOMATRIZ.

Tiempo de cultivo	Incorporación en proteína soluble en el medio de cultivo. dpm x 10 ⁻⁵ /10 ⁶ cels.	Incorporación en proteína asociada a la capa celular. dpm x 10 ⁻⁴ /10 ⁶ cels.
24 horas *	3.41 ± 1.1	6.27 ± 1.7
7 días **	4.79 ± 1.1	5.36 ± 1.43

* El valor reportado corresponde a la media ± 1 D.S. de cuando menos 6 experimentos por duplicado.

** El valor reportado corresponde a la media ± 1 D.S. de 2 experimentos por duplicado.

FIGURA 2. FLUOROGRAFIA DE LAS PROTEINAS RADIOACTIVAS SINTETIZADAS Y LIBERADAS AL MEDIO DE CULTIVO.



Alícuotas de medio de cultivo conteniendo 30, 60, 120 y 160 μg de proteína (carriles 1-4 respectivamente) se sometieron a una electroforesis bajo condiciones reductoras utilizando β -mercaptoetanol de acuerdo al sistema de Laemli (84). Se utilizó un gel al 7.5% de acrilamida y se aplicó una corriente de 1.5 mA por carril. La película utilizada para la fluorografía de este gel se expuso durante 90 días.

TABLA 2. INCORPORACION DE TIMIDINA-³H EN DNA DE LOS HEPATOCITOS CULTIVADOS SOBRE BIOMATRIZ

Experimento #	dpm x 10 ⁻⁴ /10 ⁶ cels.
1*	1.424 y 2.079
2*	1.564 y 1.543
3*	1.29
Media ± D.S.	1.53 ± 0.23

* Cada uno de los valores reportados corresponde a la determinación realizada por caja de cultivo.

células en cultivo es uno de los problemas más críticos del cultivo primario de hepatocitos. El aumento de la actividad de la γ -GTT es una de las manifestaciones de tal fenómeno, por lo cual se procedió a la medición bioquímica y la determinación histoquímica de la enzima en las células cultivadas. Como primer paso obtuvimos el dato de la actividad de γ -GTT en el órgano intacto, la cual fue de 336.54 ± 118.33 nanomoles/minuto por gramo de tejido (Tabla 3). Esta actividad no parece ser dependiente de la edad del animal en estado adulto, y la dispersión de datos más bien parece ser una función de la variabilidad biológica.

Posteriormente se hicieron las determinaciones en los cultivos, en donde la actividad encontrada fue de 1.56 ± 0.35 nanomoles/min por millón de células (Tabla 4), valor similar al encontrado en el órgano intacto.

Como control para la determinación histoquímica de la enzima γ -GTT se realizó la tinción de un corte de riñón. Como se observa en la Figura 3 la mayor actividad enzimática está localizada en la región tubular, aunque se observa, además una tinción intensa en la porción cortical; la zona medular no carece totalmente de actividad.

En el corte de hígado (Figura 4) la actividad se localiza en las áreas canaliculares y zonas periportales. Sin embargo, el número de hepatocitos con tinción positiva es mínimo, lo cual refleja la poca actividad detectada bioquí

TABLA 3. ACTIVIDAD DE LA γ -GLUTAMIL-TRANSPEPTIDASA EN EL HIGADO FRESCO

Peso del animal (g)	Edad aprox (semanas)	actividad * n molas p-nitroanitina/min/g tejido
163	6	598.86
		588.19
170	6	381.94
		372.46
183	7	213.16
		200.86
185	7	276.22
		265.42
185	7	283.26
		293.26
270	9	260.57
		267.72
275	9	242.20
		242.20
275	9	383.87
		483.45
440	16	390.22
		313.95
Media \pm IDS		336.54 \pm 118.33

* La actividad se midi6 en la fracci6n que sedimenta a 1000 xg, despu6s de homogeneizar el tejido; el ensayo de la actividad se realiz6 como se describe en m6todos.

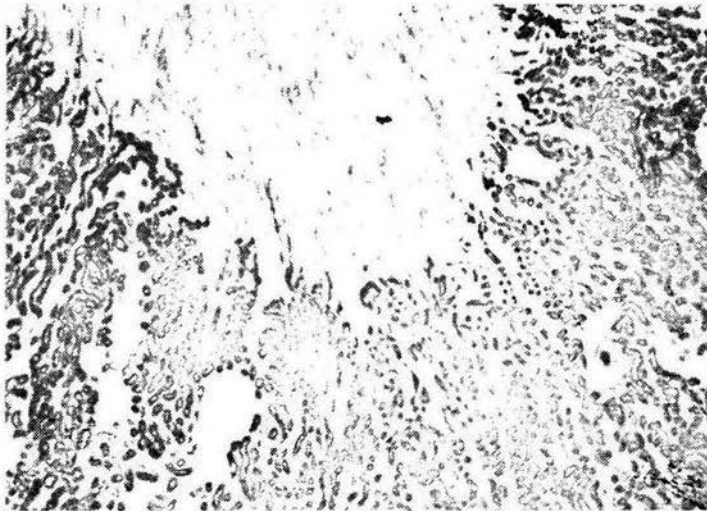
TABLA 4. ACTIVIDAD DE γ -GLUTAMIL-TRANSPeptIDASA EN HIGADO FRESCO Y EN HEPATOCITOS EN CULTIVO

Preparación	n moles de p-nitroanilina/min/10 ⁶ cels
Hígado fresco *	2.80 ± 0.98
Células en cultivo **	1.56 ± 0.35

* Se considera que 1 gramo de hígado contiene 120 x 10⁶ células.

** Valores obtenidos en células cultivadas por 24 horas y que son el promedio de 3 experimentos diferentes, realizados por duplicado.

FIGURA 3. DETERMINACION HISTOQUIMICA DE I.A γ -GLUTAMIL-
TRANSFERASA EN CORTE DE RIÑON



El grosor del corte de riñón fue de 10 μ m

* Las zonas más oscuras corresponden al sitio en donde se deposita el complejo formado en la reacción enzimática.

La fotografía corresponde a un aumento de 132 X

FIGURA 4. DETERMINACION HISTOQUIMICA DE LA γ -GLUTAMIL-
TRANSFERASA EN CORTE DE HIGADO NORMAL



El grosor del corte de hígado fue de 10 μ m

* La observación del color de la fotografía es la misma que se hace para la figura 3.

La fotografía corresponde a un aumento de 132 X.

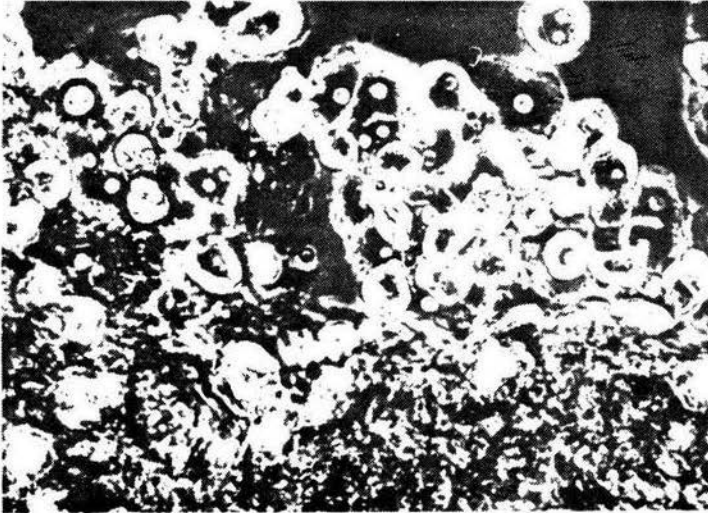
micamente. Un patrón similar se observó en los hepatocitos aislados a las 24 horas de cultivo (no se muestra).

Con respecto a la morfología que los hepatocitos normales muestran en el cultivo sobre la biomatriz, se encontró que es muy similar a la que tienen *in vivo*, como lo muestra la formación de "cordones" de células poligonales (Figura 5), que al ser teñidas histoquímicamente para ATPasa (Figura 6), muestran la actividad de esta enzima en regiones que semejan los sinusoides presentes en el órgano *in vivo*. Se observa, además, la carnecia de tinción en la región de los canalículos. Estos datos, en conjunto, manifiestan una adecuada polarización de las células mantenidas en el cultivo.

Cuando una rata ha sido tratada con carcinógenos la estructura del hígado muestra "focos celulares con enzimas alteradas" o nódulos preneoplásicos (87); tal es el caso de la γ -GTT, la cual se incrementa considerablemente como puede observarse en la Figura 7. Los hepatocitos obtenidos de estas ratas se cultivaron sobre biomatriz hepática y sobre biomatriz de riñón, con la idea de seleccionar en la biomatriz de riñón las células que han alterado sus características de membrana durante el proceso de transformación. Se observa que los hepatocitos cultivados sobre biomatriz hepática muestran el mismo patrón de tinción para la γ -GTT que el de las células normales (Figura 8) mientras que los hepatocitos "preneoplásicos" cultivados sobre biomatriz de riñón, son principalmente los

que tienen mayor actividad de γ -GTT (Figura 9). Estos resultados sugieren que el sistema puede ser adecuado para la selección de las células "preneoplásica" durante la transformación.

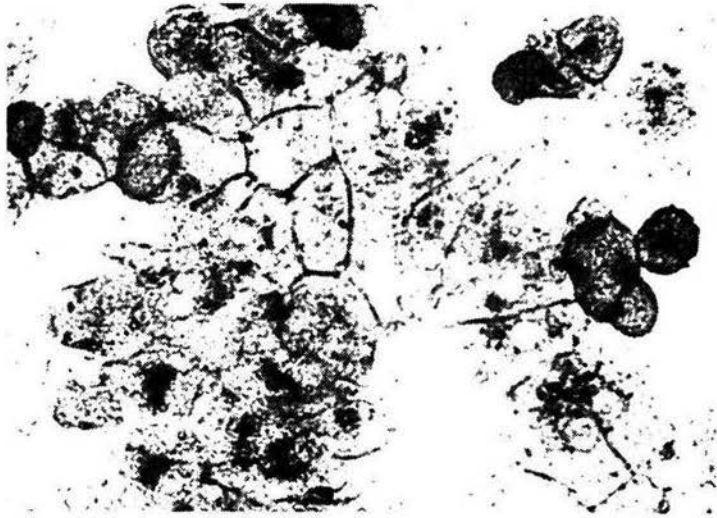
FIGURA 5. MORFOLOGIA DE LOS HEPATOCITOS CULTIVADOS SOBRE
BIOMATRIZ HEPATICA



La fotografía corresponde a un aumento de 264 X.

Los hepatocitos corresponden a un cultivo de 24 horas.

FIGURA 6. DETERMINACION HISTOQUIMICA DE LA ACTIVIDAD ATPasa
EN LOS HEPATOCITOS CULTIVADOS SOBRE BIOMATRIZ HEPATICA



La actividad se denota en la fotografía por un precipitado más oscuro que el fondo.

La fotografía corresponde a un aumento de 422 X.

FIGURA 7. DETERMINACION HISTOQUIMICA DE LA γ -GLUTAMIL-
TRANSFERASA EN CORTE DE HIGADO PRENEOPLASICO

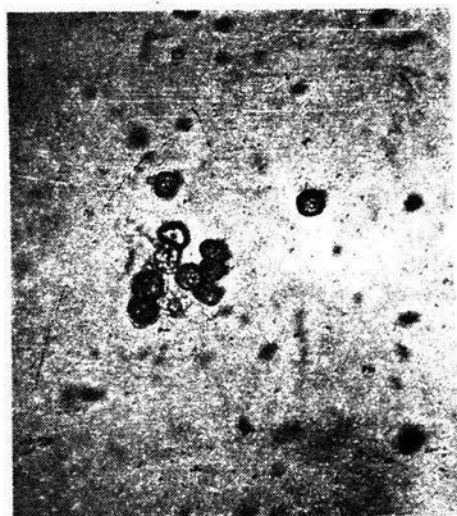


La tinción se realizó en un corte de 10 μ m de grosor.

* La observación del color en la fotografía es la misma que para la figura 3.

La fotografía corresponde a un aumento de 422 X.

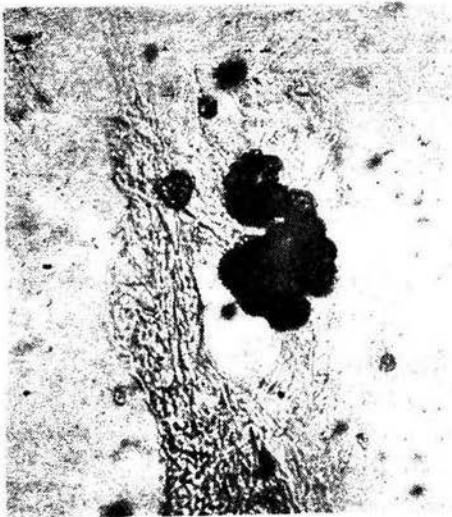
FIGURA 8. DETERMINACION HISTOQUIMICA DE LA γ -GLUTAMIL-
TRANSFERASA EN CULTIVOS DE HEPATOCITOS DE HIGADO PRENEO-
PLASICO SOBRE BIOMATRIZ HEPATICA



* La observación del color en la fotografía es la misma que para la figura 3.

La fotografía corresponde a un aumento de 132 X.

FIGURA 9. DETERMINACION HISTOQUIMICA DE LA γ -GLUTAMIL-
TRANSFERASA EN HEPATOCITOS DE HIGADO PRENEOPLASICO
CULTIVADOS SOBRE BIOMATRIZ DE RIÑON



* La observación del color en la fotografía es la misma que para la figura 3.

La fotografía corresponde a un aumento de 132 X.

DISCUSION

La biomatriz es un substrato que ha permitido la sobrevida de los hepatocitos y el mantenimiento de algunas de sus funciones por períodos prolongados (74).

Los parámetros que se estudiaron en esta tesis acerca de la constancia de las funciones celulares hepáticas en cultivo sobre biomatriz fueron: síntesis de proteínas (por la incorporación de leucina-³H), duplicación celular (por la incorporación de timidina-³H en el DNA), mantenimiento del fenotipo adulto (tomando como indicador a la γ -GTT). Además, se verificó la morfología de los hepatocitos en el cultivo. Estos parámetros pueden servir como base para estudios que deben realizarse a mayor plazo.

Cuando se realizan estudios cuantitativos, los parámetros de referencia deben contener el menor grado posible de error. En el caso de los cultivos, la referencia más utilizada es el número celular. En esta tesis se eligió la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) como el método para cuantificar hepatocitos por ser más sensible y reproducible que el hemocitómetro, y porque permite el conteo de las células cultivadas sobre superficies como la biomatriz, la cual no permite el fácil desprendimiento de aquéllas.

Nuestros datos indican que la incorporación total de leucina radioactiva a proteínas por los hepatocitos culti-

vados sobre biomatriz hepática fue 2-6 veces mayor que la reportada para otros substratos (ver Tablas 1 y 5). Además, se observa que aún a los 7 días de cultivados los hepatocitos sobre biomatriz la incorporación total del aminoácido radioactivo es aproximadamente 3 veces mayor que el encontrado por Tanaka y col a los 4 días (91). Puede observarse asimismo que a ese tiempo (7 días) la incorporación en proteínas secretadas al medio de cultivo aumenta en relación a la observada a las 24 horas, mientras que en el caso de la incorporación correspondiente a la capa celular se presenta una disminución. Ambos fenómenos probablemente ocurren porque durante el período posterior al shock que las células pudieran haber sufrido a causa del proceso de extracción, las células efectúan una síntesis de proteínas encaminada predominantemente a su recuperación, la cual tiende a disminuir hasta el valor que corresponde a la síntesis de proteínas tanto de recambio como de secreción en condiciones normales. Si esto es cierto, los datos de la Tabla 5 sugieren que la recuperación celular se ve más favorecida por la biomatriz que por el plástico, ya que en este último la recuperación parece llevarse a cabo aún a los 4 días de cultivo. La principal proteína sintetizada por los hepatocitos en el cultivo es la albúmina, como se demuestra por su migración en la fluorografía y por los experimentos con anticuerpos - específicos realizados en este laboratorio con anterioridad,

TABLA 5. INCORPORACION DE LEUCINA-³H A PROTEINAS POR HEPATOCITOS CULTIVADOS
EN DIFERENTES SUBSTRATOS

Autores	Substrato	Tiempo en Cultivo	Isótopo	Incorporación en proteína soluble en el medio de cultivo. (dpm x 10 ⁻⁵ /10 ⁶ cels)	Incorporación en proteína asociada a la capa celular. (dpm x 10 ⁻⁴ /10 ⁶ cels)
Crane y Miller (32)	Suspensión	24 horas	Leucina- ³ H		5.76*
Tanaka y col. (91)	Plástico	24 horas	Leucina- ¹⁴ C	1.04	0.56
Este trabajo	Biomatriz	24 horas	Leucina- ³ H	3.41	6.27
Tanaka y col. (91)	Plástico	4 días	Leucina- ¹⁴ C	1.84	1.6
Este trabajo	Biomatriz	7 días	Leucina- ³ H	4.79	5.36

* corresponde a la suma de ambos valores.

datos que además concuerdan con los reportados por Reid y col. (92). Como puede observarse, es la biomatriz el substrato que mejor mantiene la síntesis de proteínas en el cultivo al proporcionarle a las células el medio extracelular, lo que probablemente implica que la célula no invertirá -energía en la síntesis de proteínas que le sirvan de substrato, y que las proteínas sintetizadas serán predominantemente aquellas que corresponden a la expresión del fenotipo adulto del hepatocito.

En la Tabla 2, podemos observar la incorporación de timidina-³H en el DNA de nuestras células en cultivo primario -en presencia de ácido pirúvico y factor plaquetario de crecimiento de bovino- la cual se encuentra en el rango de lo encontrado con otros factores que estimulan la duplicación celular como el ácido pirúvico (30), factor epidérmico de crecimiento e insulina (93) o factor plaquetario de crecimiento de rata (77). Las diferencias observadas pueden deberse a que en estos estudios se utilizó como substrato al plástico, eliminando con esto la mayor y más adecuada interacción entre los factores y las células y entre éstas y el sustrato. La forma como la biomatriz podría fa facilitar estas interacciones sería "atrapando" a las macromoléculas con capacidad estimuladora del crecimiento (94), o bien permitiendo un mayor anclaje de las células al substrato, ya que de acuerdo con varios autores la adhesión es

una capacidad que está estrechamente relacionada con la duplicación celular (26,95,96). Asimismo, los trabajos de Wicha y col. (1976) dan apoyo a las aseveraciones anteriores, al observar, en cultivos de células de epitelio mamario sobre biomatriz del mismo tejido, que la incorporación de timidina-³H se presenta sólo en las células que están sobre el substrato, no así en aquellas que, estando en la misma caja, se hallan ancladas al plástico. No obstante, los estudios de incorporación del nucleótido marcado deben realizarse en presencia del factor plaquetario adecuado, ya que se ha reportado que existe especificidad de especie (77).

En cuanto a la morfología general que muestran los hepatocitos en el cultivo, se observó que se encuentran como células poligonales, formando cordoncillos y zonas que parecen canalículos, semejando en mucho a las estructuras que que mantienen *in vivo*. Esto puede deberse, de acuerdo con varios autores (26,74,97-99) a que las células pueden interaccionar de manera específica con la matriz que les sirve de sustrato y adquirir así una orientación correcta, lo cual permitiría entonces las interacciones célula-célula y la exposición de regiones del hepatocito adecuadas, dando por resultado un arreglo más semejante al que se presenta *in situ*.

Anteriormente la colágena se utilizó como sustrato para los hepatocitos, observándose que permite algunas con

ductas celulares que implican una mejora con respecto a otros sustratos como el plástico; esto puede no ser sorprendente en vista de que es un componente importante de la matriz extracelular (100). Sin embargo, las características que esta última confiere a las células indica que contiene otros componentes que son importantes y necesarios para el mantenimiento de las células en el cultivo (74), entre los cuales pueden citarse elementos que al parecer son específicos de adhesión celular (75) y otros que deben controlar la diferenciación de las células (74,76,101). Evidencia directa de esta última afirmación se presenta en los trabajos de Wicha y col. (76) quienes demostraron la producción de lactosa y α -lactalbúmina por células de epitelio mamario cultivadas sobre biomatriz del mismo tejido. Esto no sucede cuando las células se cultivan sobre biomatriz hepática.

Puede observarse que son varias las características que presenta la biomatriz y que la hacen el sustrato más idóneo para abordar diferentes investigaciones. Tal es el caso del estudio de la transformación *in vitro*, para el cual la biomatriz cumple con los requisitos de mantener la sobrevivencia de los cultivos por períodos prolongados y permitir la expresión de funciones típicas de las células. Otra de las características que parecen estar presentes en la biomatriz es la especificidad de órgano (esto es, células hepáticas se adhieren con preferencia a la biomatriz hepática, y células de

riñón -MDCK- se adhieren preferentemente a la biomatriz de riñón), la cual se está explorando como herramienta para seleccionar a las células "preneoplásicas" del hígado de una rata que se ha tratado con carcinógenos, en base a que se ha observado que las células obtenidas de tumores de Morris - muestran una disminución en la adhesión al extracto ácido de la biomatriz hepática (fracción que contiene los elementos de adhesión celular), dando como resultado una adhesión preferente a una fracción similar obtenida de riñón (102).

Como éste, podrían proponerse otros ejemplos, como el de seguir la diferenciación de las células de hígado fetal cultivadas sobre biomatriz hepática, así como otros estudios que no cuentan aún con un sistema adecuado para ser implementados.

CONCLUSIONES -

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que

- La actividad de LDH es un buen método para cuantificar hepatocitos cultivados sobre substratos que no permiten - fácilmente el desprendimiento de las células.
- La síntesis de proteínas de los hepatocitos cultivados - sobre biomatriz es muy semejante al primero y al séptimo día de iniciado el último.
- Los hepatocitos cultivados sobre biomatriz hepática incorporan timidina-³H en el DNA.
- La actividad de γ -GTT detectada en los hepatocitos cultiva dos sobre biomatriz se mantiene al mismo nivel que en el tejido intacto.
- Los cultivos de hepatocitos sobre biomatriz presentan una organización y orientación muy semejantes a las que se ob servan en el tejido intacto.

BIBLIOGRAFIA

1. Lane, P.B., (1974), The Liver, Part A, Marcel and Dekker Inc., N.Y., U.S.A. p. 3.
2. Miller, L.L. y Bale, V.L., (1954), J. Exp. Med. 94:431.
3. Miller, L.L., Bly, C.G., Watson, M.L. y Bale, V.L. - (1951), J. Exp. Med. 99:125.
4. Kukral, J.C., Sporn, J., Louch, J. y Wenzer, R.J. (1963), Amer. J. Physiol. 204:162.
5. Espinoza, E. (1959), Nature (London) 184:1801.
6. Hochwald, G.M., Thorbecke, G.J. y Asofsky, R. (1961), J. Exp. Med. 114:459.
7. Asofsky, R. y Thorbecke, G.J. (1961), J. Exp. Med. 114:471.
8. Asofsky, R. (1974), The Liver, Part. A, Marcel and Dekker Inc. N.Y., U.S.A. p. 87.
9. Heiskell, C.L., Carpenter, C.M., Weiner, H.E. y Nakagawa, S. (1961) Ann. N.Y. Acad. Sci., U.S.A. 94:183.
10. Sarcione, E.J., (1963), Arch. Biochem. Biophys. 100:516.
11. Sugiyama, K., Emori, T. y Nagase, S (1982), J. Biochem. 92:75.
12. Ostrow, J.D. (1974), The Liver, Part. A., Marcel and Dekker Inc. N.Y., U.S.A. p. 303.
13. Anderson, K.E. y Javitt, N.B. (1974), The Liver, Part A., N.Y. U.S.A. p. 371.
14. Altszuler, N. y Finegold, M.J. (1974), The Liver, Part. A., N.Y. U.S.A. p. 463.
15. Guillette, J.R. y Jollow, D.J. (1974), The Liver, Part. A. N.Y. U.S.A. p. 165.
16. Bissell, M.L., Hammaker, L.E. y Meyer, U.A. (1973), J. Cell. Biol. 59:722.
17. Watanabe, H. (1970), Prog. Liver Dis. 3:49.

18. Perske, W.L., Parks, R.E. Jr. y Walker, D.L. (1957), Science 125:1290.
19. Jeejeebhoy, K.N. y Phillips, M.J. (1976), Gastroent 71:1086.
20. Schreiber, G. y Schreiber, M. (1973), Sub-cel. Biochem. 2:307.
21. East, A.G., Louis, L.N. y Hoffenberg, R. (1973), Exp. Cell. Res. 76:41.
22. Reid, L. y Rojkind, M. (1979), Methods in Enzymol. LVIII:263
23. Ham, R.G. y McKeehan, M.L. (1979), Methods in Enzymol. LVIII:44.
24. Sato, G. y Reid, L. (1978), Biochemical and Mode of Action in Hormones cit. en 22.
25. Knazek, R., Gullino, P., Kohler, P. y Dedrich, R. (1972), Science 178:65.
26. Gospodarowicz, D., Greenburg, G. y Stoker, M. (1978), Canc. Res. 38:4155.
27. Eagle, H. (1959), Science 130:432.
28. Bottenstein, J., Hayashi, I., Hutchings, S. y col. - (1979), Methods in Enzymol. LVIII:94.
29. Yamada, S., Nakai, T., Kutsumi, Y. y col. (1981), Biomed. Res. 2:941.
30. Hasegawa, K., Watanabe, K. y Koga, M. (1982), Biochem. Biophys. Res. Com. 104:259.
31. Laishes, B.A. y Williams, G.M. (1976), *In vitro* 12:521.
32. Crane, J.L. y Miller, D.F. (1977), J. Cell. Biol. 72:11.
33. Jeejeebhoy, K.N., Ho, J., Greemberg, G.R. y col. (1975) Biochem. J. 146:141.
34. Katz, N.R., Nauk, M.A. y Wilson, P.T. (1979), Biochem. Biochem. Res. Com. 88:23.
35. Schmidt, C. (1979), Eur. J. Biocher, 98:77.

36. Bissell, M.L. y Guzelian, P.S. (1980), *Ann. N.Y. Acad. Sci. U.S.A.* 349:85.
37. Oliver, I.T., Edwards, A.M. y Pitot, H.C. (1978), *Eur. J. Biochem.* 87:221.
38. Keitzien, R.L., Pariza, N.W., Berker y Potter, V.R. (1976), *J. Cell. Physiol.* 89:461.
39. Shinno, H., Noda, C.H., Tanaka, K. y Ichihara, A. (1980). *Biochem. Biophys. Acta.* 633:310.
40. Spencer, E.M. (1979), *FEBS Letter.* 99:157.
41. Leffert, H.F., Moran, T., Boornstein, R. y Koch, J.T. (1977), *Nature (London)* 267:58.
42. Laishes, B.A. y Williams, G.M. (1976), *In vitro* 12:821.
43. Michalopoulos, G., Satler, G.L. y Pitot, H.C. (1978), *Life Sci.* 18:1139.
44. Guzelian, P.S. y Bissell, D.M. (1976), *J. Biol. Chem.* 251:4421.
45. Decad, G.M., Hsieh, D.P.H. y Biard, J.L. (1977), *Biochem. Biophys. Res. Com.* 78:29.
46. Ding, J.L., Smith, G.D. y Peters, T.J. (1981), *Biochem. Biophys. Acta.* 661:191.
47. Edwards, A.M. (1982), *Canc. Res.* 42:1107.
48. Richman, R.A., Claus, T.H., Pilkis, S.J. y col. (1976), *P.N.A.S. U.S.A.* 73:3589.
49. Bücher, N.L.R., Patel, V. y Cohen, S. (1978), *Adv. Enz. Reg.* 16:205.
50. McGowan, J.A., Strain, A.J. Bücher, N.L.R. (1981), *J. Cell. Physiol.* 108:353.
51. Fehlman, M., Canivet, B. y Freychet, P. (1981), *Biochem. Biophys. Res. Com.* 100:254.
52. Ehrhart, J.C., Creuzet, C. y Rollet, E. (1981), *Biochem. Biophys. Res. Com.* 102:602.
53. Stanley, M. y Cohen, S. (1970), *Biochem. Biophys. Acta.* 204:578.

54. McLimans, W.F. (1972), Growth, Nutrition and Metabolism of Cells in Culture 1:137.
55. Weiss, P.A. (1945), J. Exp. Zool. 100:353.
56. Maroudas, N.A. (1972), Exp. Cell. Res. 74:337.
57. Maroudas, N.A. (1973), Exp. Cell. Res. 81:604.
58. Bonney, R.J., Becker, J.E., Walker, P.R. y Potter, V.R. (1974), *In vitro* 9:399.
59. Seglen, P.O. y Fossa, J. (1978), Exp. Cell. Res. 116:199.
60. Rubin, K., Oldberg, A., Hook, M. y Obrink, B. (1978), Exp. Cell. Res. 117:165.
61. Sirica, A.E., Richards, W. y Tsukada, Y. (1979), P.N.A.S. U.S.A. 76:283.
62. Rojkind, M., Gatmaitan, Z. y Biempica, L. (1979), Gastroentery 76:710.
63. Seyer, J.M. (1980), Biochem. Biophys. Acta. 629:490.
64. Biempica, L., Morecki, R., Wu, C.H. y col. (1980), Am. J. Pathol. 98:591.
65. Hahan, E., Wick, G., Pencer, D. y Timpl, R. (1980), Gut. 21:63.
66. Carlsson, R., Engvall, E., Freeman, A. y Roushlahti, E. (1981), P.N.A.S. U.S.A. 78:2403.
67. Dietrich, C.P., Sampaio, G.D. y Toledo, O.M.S. (1976), Biochem. Biophys. Res. Com. 71:1.
68. Printz, R., Klein, V., Sudhakaran, P.R. y col. (1980), Biochem. Biophys. Acta. 630:402.
69. Ninomiya, Y., Hata, R. y Nagai, Y. (1980), Biochem. Biophys. Acta. 629:349.
70. Hook, M., Rubin, K., Oldberg, A. y col. (1977), Biochem. Biophys. Res. Com. 79:726.
71. Lin, R.C. y Snodgrass, P.J. (1975), Biochem. Biophys. Res. Com. 64:725.

72. Michalopoulos, G. y Pitot, H.C. (1975), *Exp. Cell. Res.* 94:70.
73. Michalopoulos, G., Satler, G.L. y Pitot, H.C. (1978), *Canc. Res.* 38:1550.
74. Rojkind, M., Gatmaitan, Z., MacKensen, S. y col. (1980), *J. Cell. Biol.* 87:255.
75. Ponce, P., Cordero, J., y Rojkind, M. (1980), *Hepatology* 1:204.
76. Wicha, M.S., Lowrie, G., Kohn, E. y col. (1982), *P.N.A.S. U.S.A.* 79:3213.
77. Strain, A.J., McGowan, J.A. y Bücher, N.L.R., (1982), *In vitro* 18:108.
78. Perlman, D. (1979), *Methods in Enzymol.* LVIII:110.
79. Gudino, M. y Miller, W.V., (1981), *Blood* 57:32.
80. Umbreit, W.W., Burris, R.H. y Stanfer, J.F. (1964), *Magnetic Techniques*, Burgess Pub. Co., Minnesota, U.S.A. p. 132.
81. Seglen, P.V. (1972), *Exp. Cell. Res.* 74:450.
82. Van de Werve, G. (1980), *Toxicology* 18:179.
83. Obrink, B. (1982), *Methods in Enzymol.* 82:513.
84. Laemli, N.L. (1970), *Nature (London)* 227:680.
85. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L. y col. (1959), *J. Biol. Chem.* 193:265.
86. Chamberlaine, J.P. (1979), *Anal. Biochem.* 98:132.
87. Cameron, R., Keller, J., Kolin, A. y col. (1978), *Canc. Res.* 38:823.
88. Rutemberg, A.M., Kim, H., Fischbein, J.W. y col. (1969), *J. Histochem. Cytochem.* 17:517.
89. Hugon, J. y Borgers, M. (1966), *J. Histochem. Cytochem.* 14:429.
90. Post, J., Huang, J. y Hoffman, H. (1963), *J. Cell. Biol.* 18:1.

91. Tanaka, K., Sato, M., Tomita, Y. y Ichihara, A. (1978), J. Biochem. 84:937.
92. Reid, L., Gatmaitan, Z., Arias, I. y col. (1980), Ann. N.Y. Acad. Sci. 349:70.
93. Tomita, Y., Nakamura, T. y Ichihara, A. (1981), Exp. Cell. Res. 135:363.
94. Smith, J.C., Singh, J.P., Linguist, J.S. y col. (1982), Nature (London) 296:154.
95. Folkman, J. y Moscona, A. (1978), Nature (London) 273:345.
96. Gospodarowicz, D., Delgado, D. y Vlodaysky, I. (1980), P.N.A.S. U.S.A. 77:1094.
97. Elsdale, T. y Bard, J. (1972), J. Cell. Biol. 54:626.
98. Bard, J.B.L. y Hay, E.D. (1975), J. Cell. Biol. 67:400.
99. Grinnell, F. y Hoy, M. (1982), Methods in Enzymol 82:535.
100. Strom, S. y Michalopoulos, G. (1982), Methods in Enzymol. 82:544.
101. Reddi, A.H. y Anderson, W.A. (1976), J. Cell. Biol. 69:557.
102. Mourelle, M., Cordero-Hernández, J., Ponce-N., P. y Rojkind, M. (1983) Hepatology 3:305.

ABREVIATURAS -

ATP	Adenosín- trifosfato
DNA	Acido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
dpm	Desintegraciones por minuto
DS	Desviación estándar
EDTA	Acido etilén-diamino-tetracético
FEC	Factor epidérmico de crecimiento
FPC	Factor plaquetario de crecimiento
cels	Células
γ -GTT	Gama-glutamyl-transpeptidasa
LDH	Lactato deshidrogenasa
MEM	Medio esencial mínimo
Mr	Movilidad relativa
μ m	Micromoles
NADH	Nicotín-adenín-dinucleótido reducido
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
TCA	Acido tricloroacético
Tris	Tris (hidroximetil-aminometano)
T ₃	Tri-iodotironina
T ₄	Tetra-iodo-tironina o tiroxina