

170
Rej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

COMPORTAMIENTO DE POBLACIONES CELULARES EN CONDICIONES DE CULTIVO II.

Estudio de la proliferación de fibroblastos de piel de rata in vitro.

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

PRESENTA

OLIVIA ALICIA REYNOSO DUCOING.

1 9 8 8



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE.

ABREVIATURAS.....	3
I. RESUMEN.....	5
II. INTRODUCCION.....	6
III. MATERIALES Y METODOS	12
A) Obtención y siembra de los explantes.....	12
B) Caracterización del explante.....	13
C) Parámetros para determinar el comportamiento de la población.....	14
1. Determinación del número óptimo de explantes	14
2. Observación y medición de la proliferación celular al microscopio	15
3. Analisis de la proliferación celular por medio de:	
a) Cuantificación de proteínas	15
b) Incorporación de timidina tritiada.....	15
c) Producción de figuras mitóticas.....	16

D) Cálculo del número de células	17
E) Tratamiento estadístico de los resultados.....	18
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	19
A) Descripción del explante.....	19
1. Altura.....	19
2. Peso.....	19
3. Cuantificación de proteínas.....	19
4. Cuantificación de ADN.....	20
5. Número óptimo de explantes	21
B) Comportamiento de cultivos con 9 explantes.....	22
1. Cuantificación de proteínas.....	22
2. Incorporación de timidina tritiada.....	23
3. Producción de figuras mitóticas.....	26
C) Cálculo del número de células	29
V. BIBLIOGRAFIA.....	33

ABREVIATURAS.

- ADN = Acido desoxirribonucleico.
- AMPc = Monofosfato de adenosina ciclico.
- ARN = Acido ribonucleico.
- ATCA = Acido tricloroacético.
- cpm = Cuentas por minuto.
- DSS = Dodecil sulfato de sodio.
- E. E. = Error estandar.
- GMPC = Monofosfato de guanosina ciclico.
- ng = Nanogramos.
- nm = Nanometros.
- rpm = Revoluciones por minuto.
- G₁ = Fase del ciclo de generación celular que está después de la mitosis y antes de la iniciación de la síntesis de ADN.
- G₀ = Fase del ciclo de generación celular que se considera dentro de G₁, en que de acuerdo con Pardee (1974), la célula está en un estado de diferenciación.
- S = Fase del ciclo de generación celular que está después de G₁ y antes de G₂. En esta etapa se lleva a cabo la síntesis de ADN.
- G₂ = Fase del ciclo de generación celular que está después de S y antes de la mitosis.
- M = Fase del ciclo de generación celular que esta después de G₂ y antes de S. En este periodo se lleva a cabo la división celular.
- mm = Milímetros.

SS = Solución salina 0.85%.

uCi = Microcurie.

ug = Microgramos.

ul = Microlitros.

um = Micrometros.

I. RESUMEN.

Se trabajó con una población de fibroblastos de piel de rata *in vitro* con el fin de definir la dinámica de crecimiento del cultivo, por medio de 3 parámetros indicadores de dicho crecimiento, con respecto a 15 días de incubación: Cuantificación de proteínas, incorporación de timidina tritiada y determinación del número de figuras mitóticas.

En lo que se refiere a la cuantificación de proteínas se encontró durante los tres primeros días un decremento gradual de la cantidad de proteínas, que aumentó ligeramente un 13% al cuarto día de cultivo y se mantuvo más o menos constante hasta el sexto día, donde se registró uno de los máximos ejes de proliferación alrededor del explante y posteriormente conforme transcurría el tiempo, se presentó un decremento de la cantidad de proteínas, hasta llegar al día 15. Por otro lado se encontró por medio de la incorporación de timidina tritiada que el cultivo durante las primeras 32 horas de incubación se adaptó a las condiciones del medio de cultivo para poder iniciar su ciclo de generación celular. Se estableció un período de síntesis de ADN, fase S, que se registró al tercer día de cultivo. La otra fase del ciclo que se pudo estudiar fue la división celular o mitosis (M), que se registró durante los dos días posteriores a la mayor incorporación de timidina tritiada, al registrar el máximo número de figuras mitóticas durante el tiempo de estudio.

Se calculó el número de células que constituían un explante y la proporción que tuvo capacidad de división celular, así como el número de células presentes en las monocapas de los cultivos.

II. INTRODUCCION.

El estudio de la vida tiene una etapa caracterizada por la investigación de las unidades a base de las cuales están formados los organismos vivos, es decir, las células. Estas, además de tener una estructura definida, tienen en común un cierto número de capacidades funcionales interesantes como: la capacidad de dividirse y dar origen a células hijas (Brachet, 1961), así como extraer y transformar la energía de su entorno a partir de materias primas sencillas y emplearlas en la edificación y mantenimiento de sus estructuras, idea que se puede enmascarar en el estructuralismo, el cual postula que se debe de estudiar un fenómeno en específico, o bien el comportamiento de un organismo, como tal, no solo como la suma de las partes que lo constituyen sino como la suma, más el resultado de las interacciones entre éstas (Stent, 1972).

Para estudiar la vida de una célula se ha recurrido al cultivo de tejidos, el cual es una técnica que intenta mantener a células y/o tejidos en condiciones similares a las fisiológicas, que tratan de reproducir las que tienen *in vivo*, por lo que se requiere de elementos como aminoácidos, vitaminas, azúcares y sales minerales, que las mantengan en un ambiente apropiado para desarrollar todas sus funciones normales, y por lo tanto, continuar con su ciclo de vida. Se ha observado que es necesaria la presencia de suero sanguíneo, previamente inactivado, en el medio de cultivo para obtener una respuesta satisfactoria de las células, ya que en éste se encuentran las hormonas esteroideas y los factores de crecimiento necesarios para el desarrollo de las mismas. La concentración administrada depende del tipo celular, por ejemplo para linfocitos se requiere un 20% y para fibroblastos un 10%.

Es también necesario controlar algunos parámetros como la temperatura, el pH y la osmolaridad para asegurar el mantenimiento del ambiente ecológico necesario para el desarrollo de las células.

Es posible clasificar las técnicas de cultivo de tejidos en dos grupos, desde el punto de vista de las características de la población celular que se trabaje, es decir, si las células requieren crecer en contacto con el sustrato se les denomina cultivos en monocapa, o si se pueden desarrollar sin tener contacto con éste se les denomina cultivos en suspensión.

Todas las poblaciones celulares en cultivo presentan una cinética de crecimiento característica, que se inicia con un periodo de adaptación durante el cual no hay división celular y es denominada **fase lag**. La duración de esta fase depende del tipo celular, de la densidad de la población, de la composición del medio de cultivo y de la manipulación previa que se les haya dado a las células. Posteriormente se presenta una etapa de crecimiento exponencial denominada **fase log**, durante la cual se observa la máxima actividad metabólica de las células, y por lo tanto la tasa de división celular es muy alta. La duración de esta fase es muy variable, pues depende de que tanto las condiciones ecológicas del cultivo soporten las nuevas densidades celulares, es decir, que los factores nutritivos presentes en el medio alcancen a cubrir los requerimientos de las células y a la vez que la acumulación y los desechos de las mismas no lleguen a niveles tóxicos. Si esto no es cubierto, entonces el cultivo entra a una fase estacionaria durante la cual el número celular permanece constante (McAteer y Douglas, 1979).

También puede darse el caso de que el medio de cultivo tenga la capacidad de aportar todos los nutrientes, así como las condiciones ecológicas necesarias para que el crecimiento continúe hasta llegar al estado de confluencia, característico de los cultivos en monocapa, por lo que se presenta el fenómeno de inhibición por contacto, según Pardee (1974) inhibición dependiente de la densidad, y por lo tanto el cultivo entre a la fase estacionaria, es decir, las células permanecen en la fase G₁ del ciclo de generación celular. Durante este período el metabolismo celular permanece en un estado de mantenimiento, es decir, todas las vías de síntesis están funcionando a un nivel que mantienen a la célula viva pero sin entrar a las fases de preparación para la mitosis, que empezarían con la fase de síntesis del ADN (fase S) y terminarían con la fase M en donde se lleva a cabo la mitosis y que es anterior a la fase G₁ del nuevo ciclo de generación celular.

Todos estos conocimientos han sido el resultado de muchos años de investigación que revisaron Rothblat y Cristofalo (1972)

y que se iniciaron con los estudios de Arnold en 1887 al aislar leucocitos del saco linfático dorsal de rana y observar sus movimientos por 4 ó 5 días. Harrison en 1907 hizo estudios posteriores y más detallados al trabajar con fibras nerviosas y con linfa de rana como soporte y medio nutritivo, por lo cual se le dió el título de "padre" de la técnica del cultivo de tejidos. Warren y Margaret Lewis, contemporáneos de Harrison, se dieron cuenta de la importancia de controlar y definir el medio ambiente de las células *in vitro*. Burrows, un estudiante de Harrison en 1910 - 1911 introdujo el empleo de acumulaciones plasmáticas o coágulos, como un soporte para los tejidos de ave y mamífero, y en colaboración con Carrel entre 1912 y 1913 desarrollaron el método para el crecimiento de cultivos en plasma y extractos embrionarios. Carrel propuso que el coágulo plasmático servía como sustrato físico y el extracto de tejidos embrionarios como la fuente de nutrientes y "estimulantes para el crecimiento".

En el trabajo presentado por Carrel en 1931 se menciona la interacción entre células y medio que dan una dinámica al sistema y expresa: "las células están en continuidad fisiológica con su medio ambiente. Células y medio forman un todo. Una célula depende estrictamente de su medio como el núcleo del citoplasma", es decir, "los tejidos secretan su propio medio orgánico y este entorno regula su actividad ya que para una constitución dada del medio, corresponde un cierto estado morfofisiológico de las células", de manera que "cada tipo celular responde de una manera diferente al mismo medio", lo cual indica que "el estado de un tejido radica simultáneamente en sus propiedades hereditarias, en su historia previa y en las condiciones del medio". Alexis Carrel recibió el premio Nobel en 1912 por sus estudios sobre cultivo de tejidos. (Gray, 1949).

En todas las actividades celulares se requiere de la comunicación como una propiedad vital de los seres vivos en todos los niveles de organización. En 1948 Shannon propuso la teoría matemática de la comunicación. En su diseño es necesario que exista una fuente de información, un transmisor, un canal de comunicación, una fuente de ruido y un receptor del mensaje. (Pierce, 1972). Este fenómeno es entendido como "el proceso de intercambio de información que genera un cambio de conducta entre dos o más elementos que funcionan como recepto - transmisores" (León-Cázares, 1987). Según Stent (1972), "Los tipos de información que son objeto de comunicación celular son agrupados en: genética, nerviosa y metabólica".

Durante el ciclo de vida de una célula, se producen continuamente fenómenos de comunicación que son la base de su sobrevivencia. De esta forma se pueden entender muchos procesos celulares como el ciclo de generación celular. Este ciclo varía de un tipo celular a otro y de especie a especie (Baserga y

Kisielecki, 1963) y si se mantienen las condiciones óptimas de temperatura y alimentación, la duración del ciclo de un tipo celular dado es siempre la misma. (Mazia, 1974), lo que implica que los valores medios del tamaño celular y el contenido de los constituyentes celulares permanezcan constantes de generación en generación. (Darzynkiewicz, **et al.**, 1982).

El ciclo se ha dividido para su estudio, con bases morfofisiológicas, en un periodo de crecimiento entre las divisiones celulares conocido como interfase. La interfase es mucho más larga que la división celular. En la mayoría de las plantas y animales el ciclo tiene una duración de un día o menos. Un ciclo típico en células de mamífero se lleva a cabo en aproximadamente 20 horas, de las cuales una es ocupada por la división celular (fase M) y el resto por la interfase. En condiciones de laboratorio el ciclo se ha reducido en algunas ocasiones a 10 horas. En organismos como levaduras, bacterias y algunos protozoarios, el ciclo se completa en menos de 20 minutos. (Mazia, 1974)

El periodo de interfase a su vez se ha subdividido en 3 fases denominadas G_1 , S y G_2 . La fase G_1 se caracteriza por que la célula presenta una forma aplanada, es decir, la célula está en contacto con el substrato y en la superficie celular se manifiestan unas microampollas y microvellosidades, al progresar esta fase los márgenes de la célula comienzan a adelgazarse, se activan y presentan una apariencia de olan. Hay síntesis de ARN y proteínas. Esta fase es muy variable en tiempo ya que es durante G_1 cuando el ciclo celular se puede prolongar o acortar. Algunos autores como Berger (1979) y Ashihara y Baserga (1979) - opinión no compartida en la presente tesis - consideran que existe una etapa denominada G_0 que está situada dentro de la fase G_1 del ciclo de generación celular y piensan que las células que permanecen mucho tiempo en interfase están específicamente en G_0 , y por lo tanto están "fuera del ciclo de generación celular".

Durante la fase S la célula se aplanará más y tiene una apariencia lisa, debido a que se retraen las microampollas y microvellosidades, se sintetiza ADN (ácido desoxirribonucleico), ARN (ácido ribonucleico) y proteínas. La duración de esta fase es muy constante, en la mayoría de las células de mamífero dura de 6 a 8 horas, Pardee **et al.**, (1978), están de acuerdo en esta última idea. La fase G_2 se caracteriza porque la célula aumenta de volumen y sus prolongaciones son menos abundantes. Hay una disminución de la síntesis de proteínas y preparación de la célula para una nueva mitosis. Finalmente, en la fase M la célula presenta una forma esférica y casi no está unida al substrato, es durante esta fase que se lleva a cabo el proceso de división celular o mitosis, la duración de esta fase es de aproximadamente una hora. (Mazia, 1974).

Las células *in vivo* pueden sobrevivir de dos modos alternativos, es decir, en estado proliferativo o permanecer en interfase. En condiciones de cultivo estos dos estados celulares se pueden manejar al alterar el medio de cultivo. Hay varias condiciones nutricionales subóptimas que llevan al estado de interfase: densidades celulares altas que producen el fenómeno de inhibición por contacto, nutrientes, insuficiencia de suero o niveles altos de AMPc (monofosfato de adenosina cíclico). Estas células regresan a el estado proliferativo cuando el medio es suplementado con las proporciones adecuadas de cada uno de los elementos que lo constituyen. (Pardee, 1974).

Dentro del ciclo de generación celular se ha propuesto la existencia de un momento específico denominado punto de restricción, ubicado dentro de la fase G_1 , que es el que regula el paso de un estado proliferativo a uno de interfase o viceversa, y que le da a las células la posibilidad de permanecer viables en un medio que presente variaciones en la concentración de sus constituyentes, al responder a éstas con cambios metabólicos. Las células tumorales probablemente hayan perdido el control del punto de restricción, y por lo tanto, tienen divisiones celulares constantes. (Pardee, 1974).

Existen varias opiniones sobre qué es lo que induce el paso de una fase a otra del ciclo de generación celular, entre las cuales se menciona una transición inducida por un aumento de calcio en el citoplasma, o la presencia en la célula de nucleótidos cíclicos como el AMPc que aumenta durante todo el tiempo que la célula esta en G_0 y disminuye cuando la célula entra a la fase S y a la vez se presenta un aumento en los niveles de GMPc (monofosfato de guanosina cíclico), por lo que funcionan estas tres moléculas como segundos mensajeros que dan la señal de paso de G_0 a S (Pardee, *et al.*, 1978). Otra idea propuesta para que una célula pase de G_1 a S es un flujo de potasio a través de una AIPasa $Na^+ - K^+$. Durante la fase G_1 hay una disminución de potasio y en la fase S hay un incremento de este elemento, por lo cual la bomba $Na^+ - K^+$ tiene una actividad alta durante este periodo. (Christine, *et al.*, 1981.).

El uso de isotopos radioactivos en una población celular *in vitro* permite estudiar su comportamiento durante un tiempo determinado. Si para este efecto se utiliza timidina tritiada que es incorporada únicamente durante la síntesis de ADN, entonces se garantiza identificar este ácido nucleico y establecer los ritmos de síntesis de esta molécula durante un tiempo dado.

Es posible cuantificar las células que están en el periodo de división celular en un determinado momento, dentro de la población, al observar que células presentan figuras mitóticas características.

En trabajos anteriores (Ongay, 1978 y Castro, 1983) se ha establecido parte del ciclo de generación celular de linfocitos de sangre periférica de humano durante 15 días de cultivo. La fase de síntesis que corresponde a la mayor incorporación de timidina tritiada se presentó al quinto día de cultivo a partir del cual comenzó a disminuir paulatinamente hasta el día 15. Castro (1983), determinó que en los días 4 y 6 de cultivo se presenta el mayor número de metafases.

Con los dos parámetros anteriores, incorporación de timidina tritiada y producción de figuras mitóticas, es posible determinar las fases del ciclo de generación celular.

En la presente tesis se trabajó con poblaciones de fibroblastos en cultivo. La cinética de crecimiento se cuantificó por tres parámetros que fueron: a) la cantidad de proteínas presentes en el cultivo cada 24 horas durante 15 días de incubación, se esperaba que el cultivo tuviera una fase de estabilidad donde la cantidad de proteínas disminuya un poco, y después un aumento que gradualmente tendría una disminución. b) El segundo parámetro utilizado fue la incorporación de timidina tritiada. Los días en que se midió la incorporación con este isótopo radioactivo se determinaron según los resultados de la cuantificación de proteínas. Y de acuerdo con estos resultados se definió que intervalo de tiempo era el adecuado para cuantificar la producción de figuras mitóticas, que fue el tercer parámetro para estudiar la población. Se espera que en las células se cumplan las fases del ciclo de generación celular, por lo tanto al día siguiente de haber registrado la máxima incorporación de timidina tritiada (fase S) se deberá presentar también el máximo número de figuras mitóticas.

III. MATERIALES Y METODOS.

A) Obtención y siembra de los explantes.

- A una rata macho recién nacida se le lavó la piel del tronco del cuerpo con torundas impregnadas con agua destilada y jabón, y finalmente se desinfectó con alcohol al 76%.

- Se decapitó.

- Se disectó la piel a manera de cilindro, se cortaron las bases a nivel de la cintura escapular y la cintura pélvica y se abrió por la parte ventral.

- La piel se depositó en una caja de petri con 2 ml de medio L-15 (Gibco 430) y de aquí en adelante se trabajó en esterilidad.

- Se lavó la piel tres veces al pasarla a dos cajas de petri con 2 ml de medio L-15 fresco en cada una.

- Se obtuvieron explantes de toda la superficie de la piel con un horador de 2 +/- 0.05 mm de diametro.

- Los explantes se sembraron en frascos Falcon de 25 cm² de superficie. Con una aguja de raquia sostenida por una jeringa, se tomó un explante, sin hacer succión, se introdujo al frasco de cultivo y se depositó en un lugar determinado al presionar un poco la aguja contra la superficie del mismo. Los explantes se colocaron con el tejido conjuntivo en contacto con la superficie del frasco, la distribución dependió del número de éstos, pero siempre se mantuvieron equidistantes.

- Se adicionaron por una de las paredes del frasco, 4 ml de medio completo, formado por 90% de TC-199 (Difco 5477), 10% de suero fetal de ternera (Difco 5065) previamente inactivado a 60° C durante 30 min, TC glutamina (Difco 5789) al 0.5%, 100 unidades de TC penicilina y 100 ug de estreptomicina (Difco 5854). Este medio permaneció en el cultivo durante todo el tiempo de estudio.

- Los frascos se dejaron en posición vertical aproximadamente 105 min después de la siembra para facilitar la adherencia de los explantes al substrato.

- Lentamente se puso el frasco de cultivo en posición horizontal y entonces se inició la incubación en una estufa a 37° C.

- La primera observación del cultivo se hizo a las 24 horas a partir de la siembra.

Se estableció que la siembra de un cultivo se haría por triplicado, para tener resultados más representativos, y cada triplicado se realizó con la piel de un sólo animal, pero el total de los cultivos sembrados fue con organismos de la misma camada, para manejar menor cantidad de variables en los experimentos. El intervalo más largo de estudio fué de 15 días, por lo cual los organismos de una sola camada no alcanzaron para sembrar los 45 cultivos requeridos, entonces la siembra se realizó en dos series y con dos diferentes camadas, la primera fué del día 0 al 7 y la segunda del día 8 al 15, éstas se realizaron en diferente día.

B) Caracterización del explante.

- Se pesaron 6 explantes de uno en uno en la balanza analítica, se colocaron previamente en una servilleta para que absorbiera el medio que pudieran contener, se registraron las lecturas y se hizo un promedio con su correspondiente error estandar (E. E.)

- El diámetro se midió con una regla graduada en milímetros, se registraron las lecturas y se obtuvo un promedio con su E. E.

- La altura del explante se midió en el microscopio óptico con un ocular graduado y con el objetivo de 10x, en donde cada unidad equivale a 14.2 μm . La medición se logró al situar al explante de perfil entre dos portaobjetos sostenidos por un tercero.

- Con respecto a la cuantificación de proteínas y ADN se hicieron 4 ensayos cada uno, con 3 repeticiones de 4 lotes diferentes que contenían 1, 2, 3 y 6 explantes y se usó la siguiente metodología:

a) Se realizó el paso del lavado de la rata al de obtención de explantes con el horadador del protocolo de obtención y siembra de los explantes.

b) En 4 tubos de centrifuga de 15 ml se colocó 1 ml de solución salina al 0.85% (SS) en cada uno, con el fin de eliminar las proteínas que contenía el medio.

c) Se depositó un explante por tubo y se agitó en el vortex.

d) La SS se decantó de manera que el explante quedara adherido a una de las paredes del tubo.

e) Los tubos se dejaron en la estufa a 37° C durante toda la noche.

f) Se adicionó 0.5 ml de SS.

g) El explante se disgregó con una varilla de vidrio, y el volumen se completó a 1 ml con SS.

h) Se cuantificaron las proteínas por el método de Lowry *et al.*, (1951) y el ADN por el método de Burton *et al.*, (1956).

Para la cuantificación de proteínas se hizo una curva estandar con 50, 75, 100 y 250 μ l de una solución de albúmina de huevo (Sigma 568) de 1 mg/ml, se llevaron a 1 ml con SS y se les añadieron los reactivos utilizados en el método de Lowry.

Para la cuantificación de ADN también se hizo una curva estandar con 50, 100, 250 y 500 μ l de una solución de ADN de timo de ternera (Merck 24013) de 100 μ g/ml, se llevaron todas las muestras a 2 ml con ácido tricloroacético (ATCA) (Merck 807) al 10% frío y se añadieron 5 ml del reactivo de Burton.

C) Parámetros para determinar el comportamiento de la población.

1. Determinación del número óptimo de explantes.

Se sembraron cultivos por triplicado con 6, 9 y 12 explantes y se registraron los resultados a los 7 días al aplicar el método de cuantificación de proteínas descrito a continuación. A partir de estos estudios se determinó el número óptimo de explantes para continuar todos los experimentos.

Procedimiento para la cuantificación de proteínas de cultivos en monocapa.

Se utilizó una modificación de la técnica descrita por Oyama e Eagle (1956) que se menciona a continuación:

- El medio de cultivo se decantó del frasco Falcon.
- Se lavó 2 veces la monocapa con 4 ml de SS.
- El frasco destapado se dejó en la estufa a 37° C toda la noche.
- Los explantes se despegaron con unas pinzas.
- Se pasaron 3 a un tubo de centrifuga y 6 a otro, se agregaron 0.5 ml de SS por tubo y se disgregaron con una varilla de vidrio. Por cada 3 explantes se agregaron 4 ml del reactivo de Lowry.
- Se incubó con este reactivo 10 minutos a temperatura ambiente.

- Se agregaron 0.5 ml del reactivo de folin - Ciocalteu (Sigma 2790) por cada 4 ml del reactivo de Lowry.

- Se incubó durante 30 min y se leyó en el espectrofotómetro a 660 nm (Oyama e Eagle, 1956 y Manford y Patterson, 1979).

- Al mismo tiempo al frasco Falcon se le adicionaron 4 ml del reactivo de Lowry y con un gendarme se despegó la monocapa y lo que hubiera quedado del explante. Se continuó con los mismos pasos que se describieron para los explantes después de agregado el reactivo de Lowry.

La curva estandar de cuantificación de proteínas se realizó de la misma manera que se describió anteriormente.

2. Observación y medición de la proliferación celular al microscopio.

Los cultivos se observaron en un microscopio invertido que tiene un campo iluminado de 2 mm de diámetro, lo cual sirvió de referencia para realizar las mediciones de la proliferación de los fibroblastos a partir del límite del explante con respecto al tiempo de cultivo.

3. Análisis de la proliferación celular por medio de:

a) Cuantificación de proteínas.

Se utilizó la técnica descrita para la cuantificación de proteínas mencionada en el inciso "C" titulado Determinación del número óptimo de explantes.

b) Incorporación de timidinas tritiada.

- Se sembraron 8 cultivos por triplicado con 9 explantes cada uno.

- Se incubó el control 2 horas con 1 uCi de timidina tritiada por frasco (Amersham TRA. 310, actividad específica de 2.0 Ci/mM) y se procesó como se indica a continuación.

El resto de los cultivos se incubaron de 1 a 8 días a partir de la siembra, a cada uno se le adicionó 1 uCi de timidina tritiada 17 horas antes de continuar con el siguiente paso.

- Se desechó el medio de cultivo.

- Se lavó el frasco 2 veces con 4 ml de SS que se desechó.

- Se agregaron 5 ml de ácido tricloroacético (ATCA) al 10% frío y se incubó a 4° C durante una hora.
- Los explantes y la monocapa celular se removieron con un gendarme.
- Se observó al microscopio para asegurarse del desprendimiento total de las células.
- La solución se pasó a un tubo de centrifuga.
- Los explantes se disgregaron con una varilla de vidrio.
- Se centrifugó por 10 min a 2,000 rpm y se desechó el sobrenadante.
- Se agregó nuevamente ATCA hasta 5 ml y se resuspendió.
- Se colocó en un portafiltro, un filtro Millipore con poros de 0.65 um de diametro.
- El contenido del tubo se vertió sobre el filtro.
- El tubo se lavó con 5 ml de ATCA que se vertió nuevamente sobre el filtro.
- El filtro se pasó a un vial de contador, al que se le agregaron 0.4 ml de dodecil sulfato de sodio (DSS) (Sigma L5750) al 2%, se agitó para impregnar el filtro y se incubó a 60° C por 30 min.
- Se le agregaron 5 ml de líquido de centelleo tipo Bray para poder registrar las partículas emitidas por el elemento radioactivo, incorporado al ADN de las células que entraron a la fase S, como cuentas por minuto (cpm), en un contador de centelleo líquido (Packard) una vez durante 4 minutos para cada vial.

c) Producción de figuras mitóticas.

Se usó la modificación de la técnica descrita por Worton *et al.*, (1979), que se menciona a continuación:

- Se sembraron 8 cultivos con 9 explantes cada uno. Se procesaron cada 24 horas a partir de la siembra.
- Se agregó 0.2 ml de colcemid (Ciba 001641) por cultivo y se incubaron por 90 minutos a 37° C.
- El medio de cultivo se eliminó.

- Se adicionaron 2.0 ml de una solución hipotónica de KCl 0.075M a 37° C y se incubó durante 30 minutos a la misma temperatura.
- El sobrenadante se retiró y se agregaron 2 ml de fijador en una proporción 3:1 de metanol absoluto (Baker 9070) y ácido acético glacial (Baker 9507).
- Se repitió 3 veces más la fijación a intervalos de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente.
- Se incubaron los cultivos a 4° C por lo menos durante una noche.
- Se desechó el fijador.
- Se quitaron las paredes del frasco Falcon, lo que dejó libre la placa sobre la cual crecieron las células.
- Se secó al aire la monocapa.
- La tinción se hizo con Giemsa (Sigma 720) - Leishman (Sigma 746) - agua (3:1:36) durante 20 minutos.
- Se introdujo la placa en un recipiente con agua destilada 3 veces, en uno con alcohol al 50% 1 vez y 3 veces más en el de agua destilada. Se repitió este procedimiento 3 veces.
- Se observaron las placas al microscopio óptico y se registraron las figuras mitóticas presentes.

D) Cálculo del número de células.

Se encontró en la literatura (Yamada *et al.*, 1986) el dato de la cantidad de proteína que contiene un fibroblasto de rata de un cultivo secundario en estado de proliferación que es de 0.6 ng. Con base en esta información fue posible calcular el número de células, que por el tipo de procesamiento no fueron cuantificadas, que deberían estar presentes en los cultivos, por medio de los siguientes procedimientos:

A partir de los datos obtenidos de la cuantificación de proteínas que se efectuó durante los 15 días de estudio, se hicieron los cálculos de las células que deberían estar presentes según las proteínas registradas en la monocapa del cultivo. De tal manera que se calcularon los números de las células presentes durante los 15 días de estudio.

Para tener una idea de cuantas células formaban el explante se hizo también la conversión de la cantidad de proteína registrada en un explante, al número de células que lo constituían, al suponer que todas las células que formaban parte de éste tenían 0.6 ng de proteína. Con los datos anteriores se sacó el porcentaje de células que tuvieron capacidad de división celular con respecto al número total de células que formaban el explante.

E) Tratamiento estadístico de los resultados.

Para la cuantificación de proteínas e incorporación de timidina tritiada se sacaron promedios aritméticos de los triplicados de los datos obtenidos y también se calculó el E. E. de cada media.

En el caso de las curvas estándar para cuantificación de proteínas se hizo el ajuste por mínimos cuadrados y se obtuvieron la ordenada al origen, la pendiente y el coeficiente de correlación de cada uno.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

A) Descripción del explante.

1. Altura.

Las mediciones se realizaron en un microscopio óptico donde cada una de las divisiones del ocular equivalen a 14.2 μm . Se hicieron 10 mediciones a lo largo del grosor del explante de tal manera que las lecturas obtenidas fueron: 454.4, 454.4, 440.2, 454.4, 468.6, 454.4, 454.4, 454.4, 482.8 y 466.6 μm . Por lo que la altura promedio fue de 458.7 \pm 4.25 μm .

2. Peso.

Se tomaron 6 lecturas que fueron: 2.05, 1.57, 1.34, 1.52, 1.25 y 1.15 mg. El promedio obtenido fué de 1.48 \pm 0.13 mg.

3. Cuantificación de proteínas.



Se hicieron 3 pruebas por triplicado con 1, 2, 3 y 6 explantes. De tal manera que se obtuvieron los siguientes resultados promedio. (Ver figura 1).

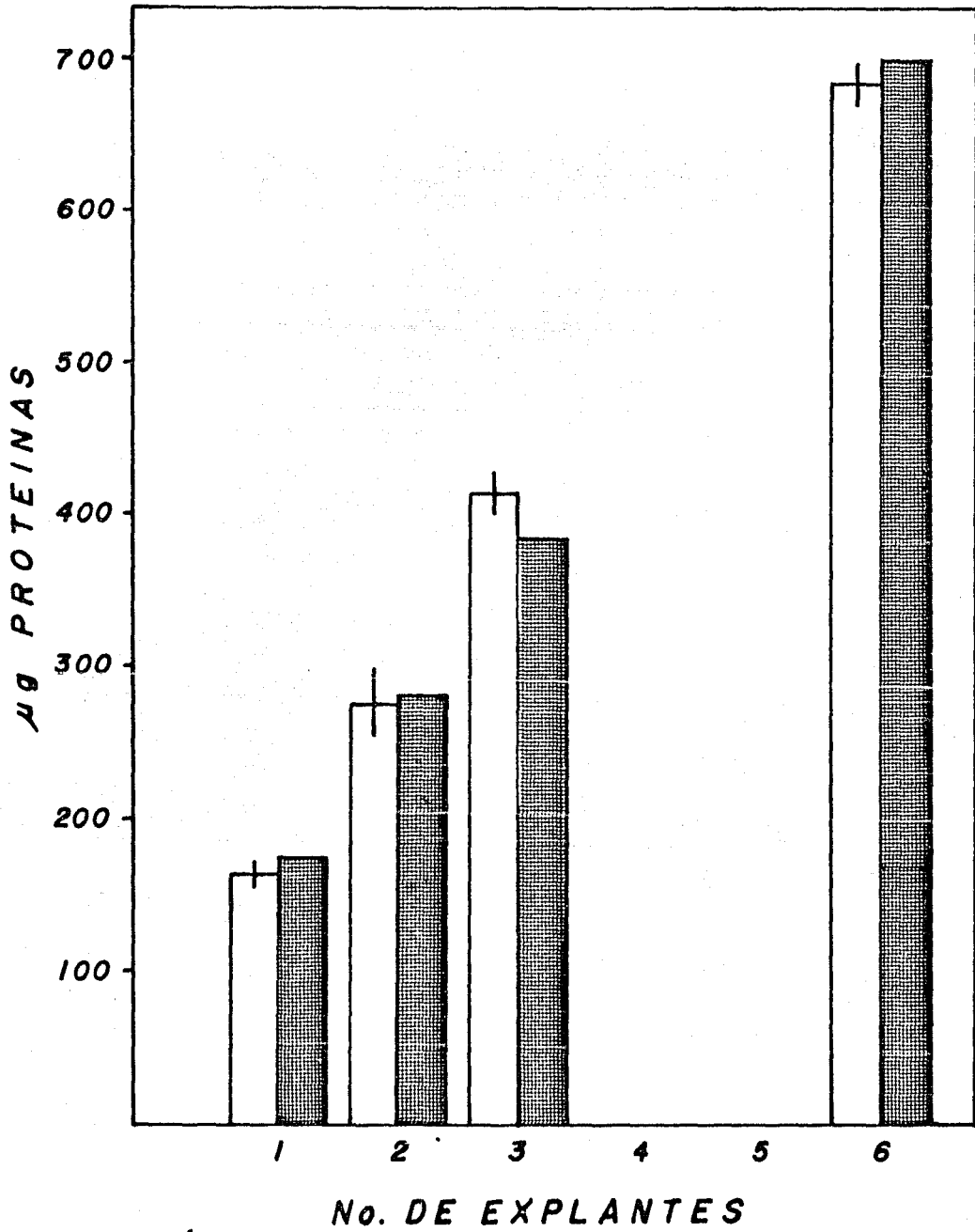
ug de proteína.

No. explantes.	Datos experimentales \pm E. E.		Datos teóricos.
1	164.15	7.12	175.10
2	275.15	27.94	280.46
3	414.79	12.60	385.81
6	689.16	14.10	701.87

Estos datos se ajustaron a una recta por el método de mínimos cuadrados y se obtuvieron los siguientes parámetros: un coeficiente de correlación de 0.9963, una ordenada al origen de 72.15 y una pendiente de 104.57.

Como se puede ver en la figura 1 se tiene una relación directamente proporcional entre el número de explantes y la cantidad de proteína obtenida. Lo que se confirma con el coeficiente de correlación de 0.9963. Debido a que esta relación es lineal, se decidió tomar como control de los experimentos

Figura. 1. Cuantificación de proteínas de diferente número de explantes de piel de rata. () datos experimentales; () datos teóricos.



posteriores, las proteínas contenidas en un solo explante que fue obtenido del mismo lote de los explantes que se sembraron, y se pusieron a secar el mismo día. Este resultado representa el día cero de cada figura referente a cuantificación de proteínas. Por ser una relación directa entre las dos variables es válido pensar que la piel de rata es muy homogénea y que de cualquier región, como se hizo en este experimento, se pueden obtener explantes para la siembra, siempre y cuando la piel se tenga íntegra, es decir, con el estrato epidérmico y dérmico completos así como también la parte correspondiente de tejido conjuntivo.

4. Cuantificación de ADN.

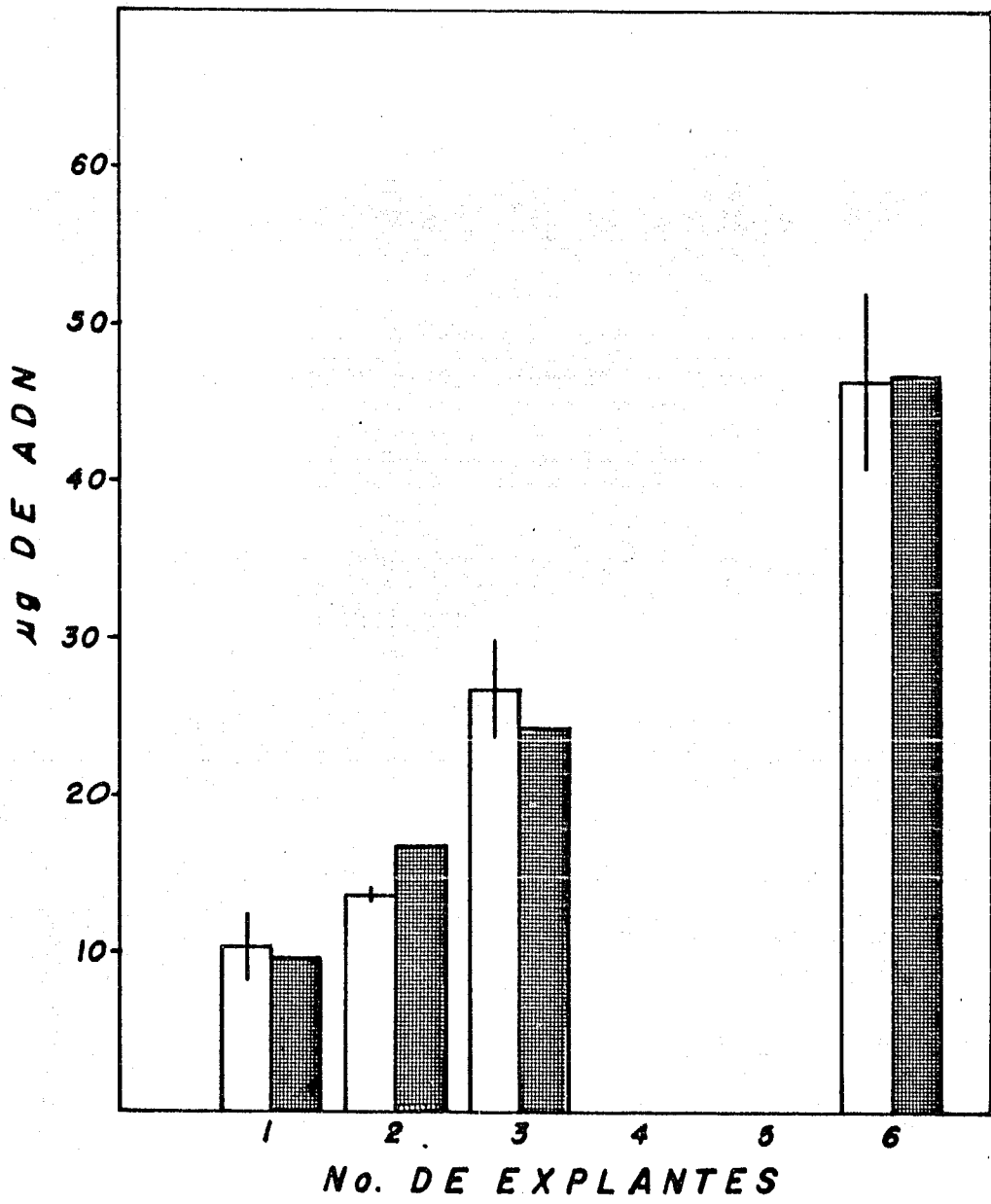
Se trabajaron con 1, 2, 3 y 6 explantes y cada prueba constó de un triplicado. Los resultados obtenidos fueron: (Ver figura 2).

No. explantes.	ug de ADN		Datos teóricos.
	Datos experimentales +/- E. E.		
1	10.51	1.910	9.46
2	13.75	0.005	16.88
3	26.73	2.960	24.29
6	46.20	5.750	46.55

Los datos se ajustaron por el método de mínimos cuadrados y se obtuvieron los siguientes parámetros: un coeficiente de correlación de 0.9892, una ordenada al origen de 2.05 y una pendiente de 7.42.

Al analizar la figura 2 se tiene también una relación directa entre las dos variables. Los datos teóricos y los obtenidos experimentalmente presentan un coeficiente de correlación de 0.9892, con lo cual se muestra que hay una relación lineal o directamente proporcional entre la cantidad de ADN y el número de explantes. De tal manera que se presenta un caso similar al descrito para las proteínas, lo que confirma lo anteriormente planteado de que los explantes tomados de cualquier región de la piel del mismo organismo, presentan una cantidad similar de ADN y proteínas que es directamente proporcional a la cantidad de explantes tratados.

Figura. 2. Cuantificación de ADN de diferente número de explantes de piel de rata. (□) datos experimentales; (▣) datos teóricos.



Es importante considerar las características que posee un explante antes de la siembra, porque es la base para poder comparar el comportamiento que ha seguido un cultivo durante uno o varios días de incubación con respecto a las condiciones iniciales, es decir, al saber la cantidad inicial de proteína (164.15 +/- 7.12 ug) y de ADN (10.51 +/- 1.91 ug) que tiene un explante y la que se tiene al final de un cultivo se puede sacar la diferencia entre éstos y determinar si hay "rincos" en la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos, lo que permite calcular el número de ciclos que se llevaron a cabo. Para la realización de estos cálculos es importante tomar en cuenta que no todas las células del explante se dividen, y que lo que se registra de proteínas y de ADN durante los diferentes días de incubación es con respecto a las células que si se dividieron.



En resumen, la forma del explante fue cilíndrica con 2 mm de diámetro, una altura de 456.7 +/- 4.26 um, un peso de 1.46 +/- 0.13 mg y contenía un promedio de 164.15 +/- 7.12 ug de proteína y 10.51 +/- 1.91 ug de ADN.

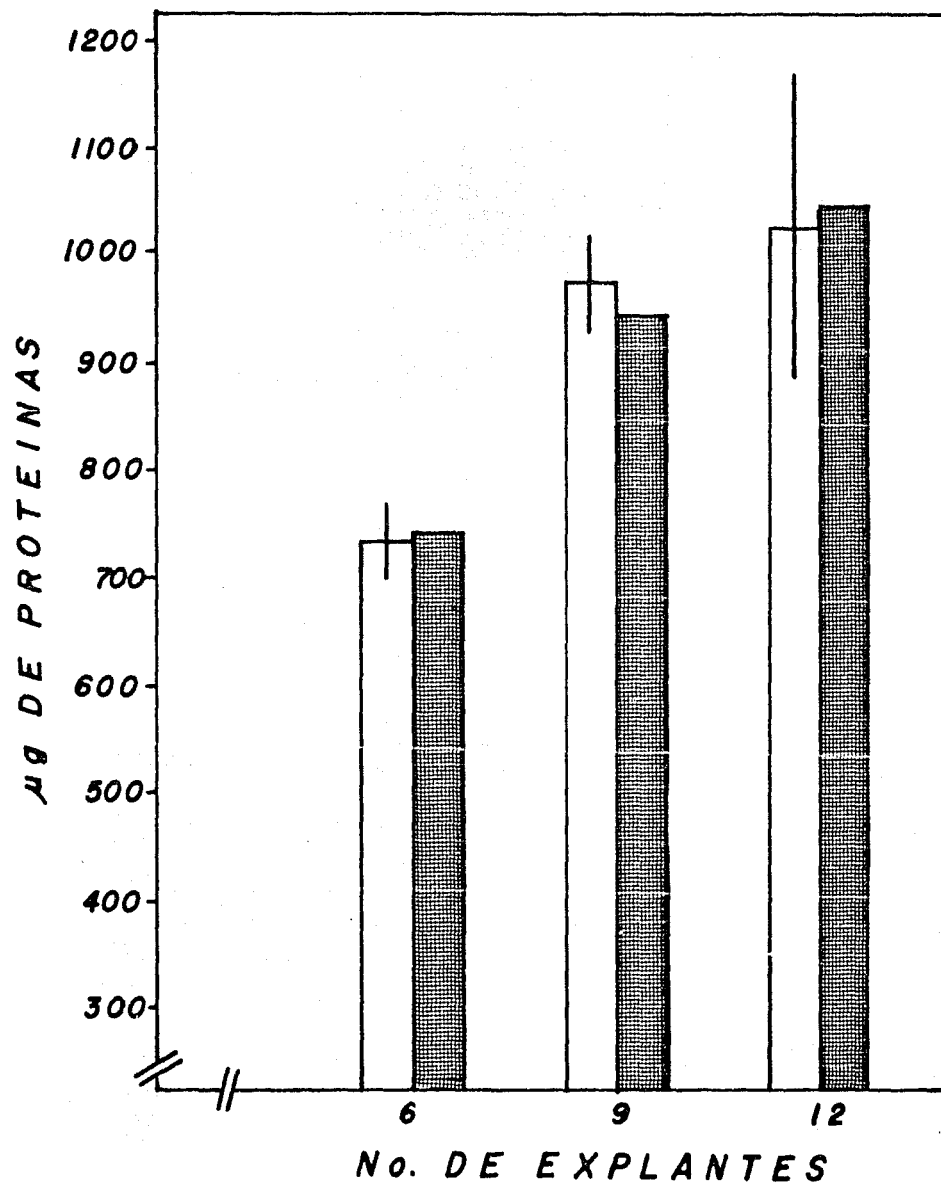
5. Número óptimo de explantes.

Con base en el número de explantes citado por Kruse y Patterson (1973) que son de 8 a 10 para sembrar cultivos en frascos Falcon de 25 cm², se decidió probar diferente número de éstos que fueron: 6, 9 y 12. De tal forma que se sembraron triplicados por cada uno y se cuantificaron las proteínas a los 7 días de incubación. Los resultados promedio se muestran a continuación: (Ver figura 3).

No. de explantes.	ug de proteínas.	
	Datos experimentales +/- E. E.	Datos teóricos.
6	730.65 36.68	743.76
9	970.78 45.62	944.57
12	1132.27 134.44	1145.38

Se hizo un ajuste por el método de mínimos cuadrados y se obtuvieron los siguientes parámetros: un coeficiente de correlación de 0.9937, una ordenada al origen de 342.14 y una pendiente de 66.94.

Figura. 3. Cuantificación de proteínas de fibroblastos de piel de rata en cultivo con 6, 9 y 12 explantes a los 7 días a partir de la siembra. () datos experimentales; () datos teóricos.



Como se puede observar, los resultados experimentales son muy parecidos a los teóricos, lo que quiere decir que la cantidad de explantes es directamente proporcional a la cantidad de proteína, por lo que se puede escoger para las siguientes siembras cualquier número de explantes. Pero se decidió trabajar con 9, debido a que se tienen observaciones de que la proliferación de explantes provenientes de diferentes ratas no es igual, y sobre todo si pertenecen a distinta camada; por lo cual para realizar la siembra de un cultivo, se trata de que todo el material provenga de un mismo animal. Como se tenía planeado hacer siembras por triplicado, se observó que de la piel de un mismo organismo se alcanzaban a obtener los explantes suficientes para sembrar 3 cultivos con 9 explantes en cada uno, con lo cual se abarca una buena superficie del frasco de cultivo y se deja espacio para que se produzca una buena proliferación celular; además éste número está entre el intervalo citado por Kruse y Patterson (1973) y finalmente los resultados indican que las condiciones ecológicas del cultivo con ese número de explantes son las óptimas para mantenerlo.

B) Comportamiento de cultivos con 9 explantes.

1. Cuantificación de proteínas.

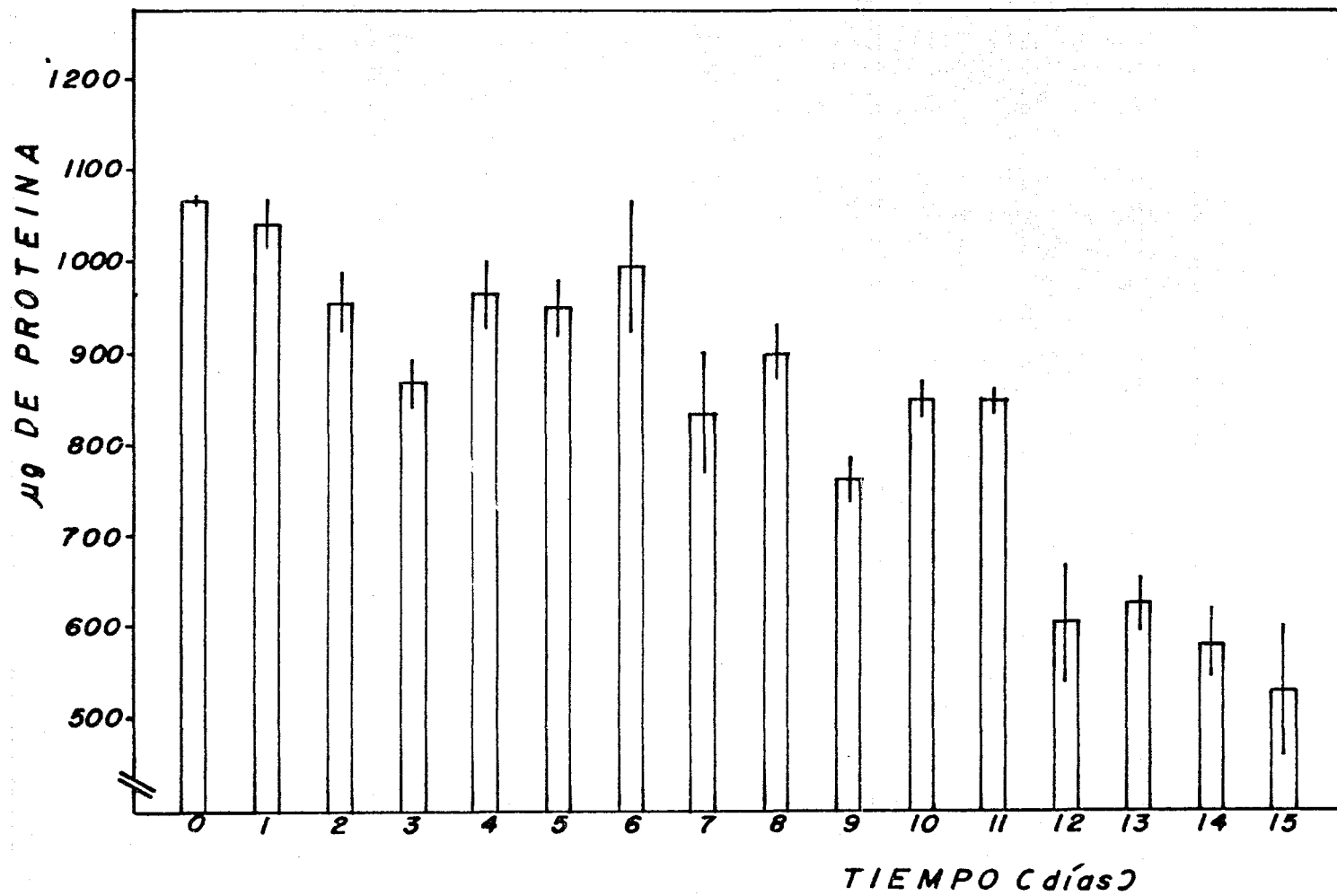
Se sembraron 45 cultivos con 9 explantes cada uno, para cuantificar diariamente un triplicado del día 1 al 15 a partir de la siembra.

El control también se hizo por triplicado al poner a secar, toda la noche como se describió anteriormente, y el mismo día de la siembra 3 explantes en sus correspondientes tubos de centrifuga.

Antes de realizar la cuantificación de proteínas se observaron los cultivos al microscopio, y se registró la distancia en el eje mayor de crecimiento de la proliferación celular alrededor del explante, que nunca llegó a tener más de 2.5 mm de extensión y por lo tanto nunca se llegó a un estado de confluencia. También se registró el pH del medio de cultivo que se mantuvo en 7.0 hasta el octavo día de incubación y del noveno al último día se mantuvo en 6.5. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1 y en la figura 4.

Como se muestra en esta figura, se tiene en los tres primeros días un decremento gradual de la cantidad de proteína que va de 1,163.79 +/- 6.07 a 870.68 +/- 24.08 ug. Esto se esperaba, ya que durante el inicio del cultivo hay una fase de estabilización del mismo, en donde en este caso hubo probablemente muerte celular en la región central del explante y la reposición de células por la división celular en esos

Figura. 4. Cuantificación de proteínas de fibroblastos de piel de rata en cultivo durante 15 días de incubación.



momentos fué mucho menor a la condición antes mencionada; ya que no todas las células del explante se dividen, es decir, sólo el estrato germinal tiene esta capacidad de división. Se registró que sólo el 13.37 +/- 0.78 % de las células de la primera serie sembrada y el 27.68 +/- 1.32 % de la segunda serie de siembra, tuvieron capacidad de división celular, por lo que se registró una disminución en la cantidad de proteína. (tabla 2).

Al cuarto día de incubación empieza a aumentar ligeramente la cantidad de proteína en un 13%, es decir, se mantiene alrededor de 970.01 +/- 13.75 ug hasta el sexto día, donde se registró uno de los máximos ejes de crecimiento alrededor del explante que fué de 2.0 mm como se puede observar en la tabla 2. Conforme transcurrió el tiempo, se tiene un decremento de la cantidad de proteínas hasta llegar al día 15 que es de 532.84 +/- 45.45 ug de proteína, aunque como se observa en la tabla 1, los ejes mayores de proliferación alrededor del explante tienen los valores más altos entre los días 10 y 13 pero, con respecto a esto es importante hacer notar, que entre el explante y las células más alejadas de este existían muchos espacios en donde se encontraban células que ya se habían desprendido del substrato, por lo que las proteínas registradas fueron menos que las registradas durante los días 4 a 6, en donde la densidad celular era muy alta al no presentarse estos espacios entre las células.

Como se puede apreciar en la tabla 1 en la sección que corresponde a la proliferación celular alrededor del explante hay una discontinuidad entre los valores del día 7 y los sucesivos, esto se debe probablemente a que estos días (7 y 8) marcan el fin y el inicio de las dos siembras que se hicieron para cubrir los 15 días de estudio, y por lo tanto se realizaron con la piel de animales que no pertenecían a la misma camada y en diferente fecha, lo que podría explicar estas diferencias.

2. Incorporación de timidina tritiada.

Se estudió el comportamiento de la población celular únicamente durante 8 días a partir de la siembra con el parámetro de incorporación de timidina debido a que ya se tenían los antecedentes proporcionados por la cuantificación de proteínas de que después de este tiempo disminuía la síntesis de proteínas y por lo tanto se pensó que en estas condiciones de cultivo tampoco se iban a encontrar datos que indicaran un nuevo ciclo de síntesis de ADN.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3 y en la figura 5.

Figura. 5. Incorporación de timidina tritiada de fibroblastos de piel de rata en cultivo durante 8 días de incubación.

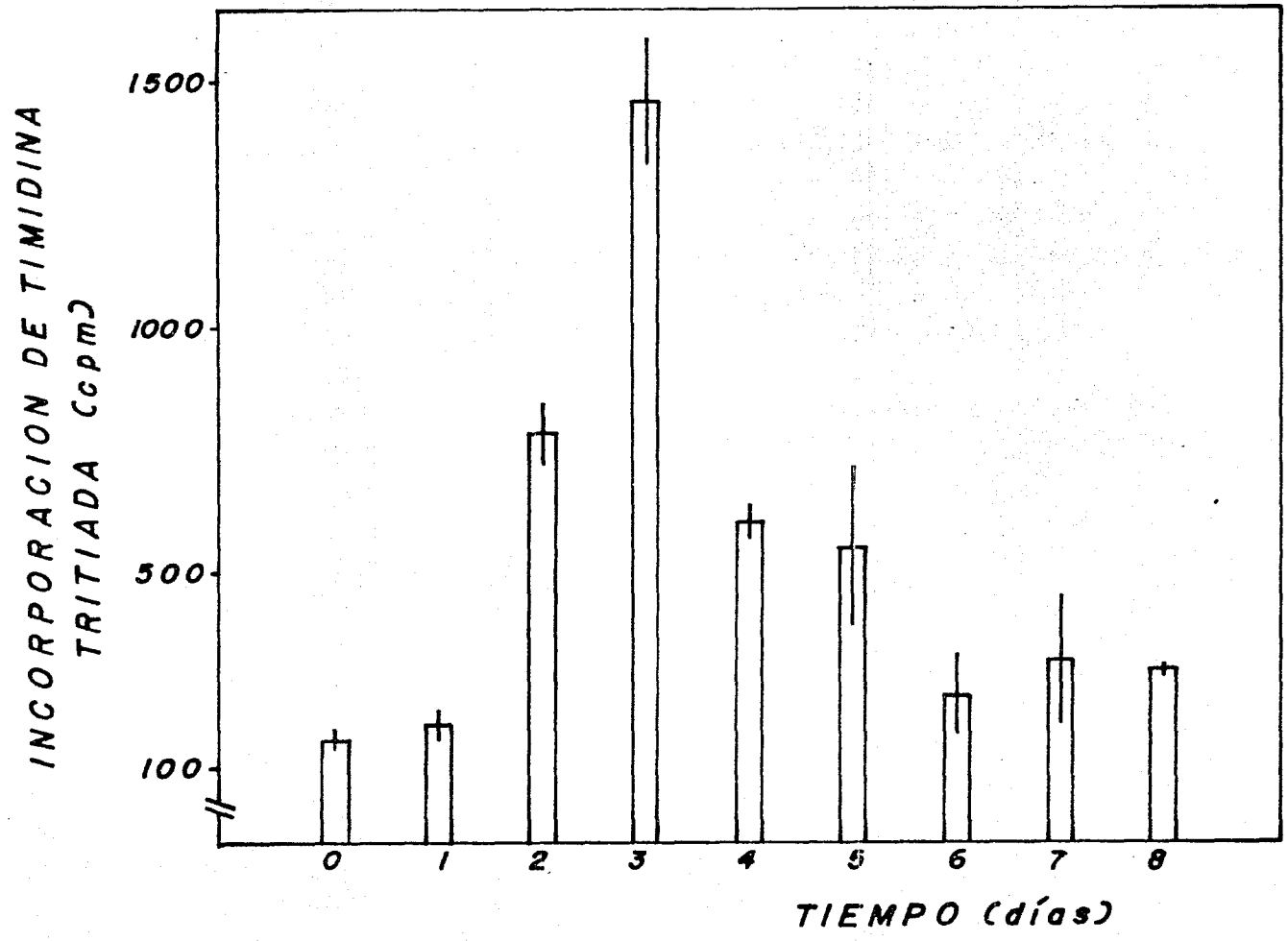


Tabla 1. Cuantificación de proteínas de cultivos en monocapa, por triplicado, durante 15 días de incubación a partir de la siembra y sus respectivos valores de proliferación celular alrededor del explante.

Días de incubación.	ug de proteínas de las monocapas +/- E. E.		ug de proteínas explantes +/- E.E.		ug de proteínas totales +/- E.E.		Proliferación celular (mm).
0		0.0	1,163.79	6.07	1,163.79	6.07	0.0
1	115.88	18.53	918.58	36.97	1,034.34	25.82	0.0
2	147.49	40.77	818.51	41.64	957.21	30.85	0.5
3	138.39	24.36	732.28	41.90	870.68	24.08	0.8
4	115.04	17.24	867.56	60.78	966.53	33.86	1.5
5	124.12	25.41	824.00	7.30	948.13	31.79	1.5
6	136.26	16.85	859.13	68.90	995.39	69.03	2.0
7	125.66	29.00	707.98	66.20	833.64	66.57	0.5
8	248.05	27.42	653.52	37.46	901.57	30.43	1.6
9	222.43	11.93	536.11	19.95	758.54	27.43	1.6
10	207.98	8.39	642.18	9.82	850.16	18.21	1.8
11	181.87	19.36	669.02	26.98	850.59	16.43	2.5
12	198.14	18.53	406.90	63.26	605.04	67.65	2.5
13	159.87	5.57	466.05	27.67	625.92	32.57	2.0
14	175.03	7.00	406.44	33.35	579.80	35.68	1.5
15	163.63	14.86	369.21	49.73	532.84	45.45	1.5

Tabla. 2. Resultados globales del número de células por cultivo (9 explantes + monocapa), calculado con base en la cuantificación de proteínas por el método de Lowry y al dato de que por célula hay 0.6 ng de proteína.

Días de incubación.	Total de células en el cultivo.	Células presentes en monocapa.	% de células con capacidad de división celular.
0	1,939,650*	0	0.0
1	1,723,900	192,933	11.15
2	1,595,350	231,166	14.48
3	1,451,113	230,666	15.89
4	1,610,883	164,950	10.23
5	1,580,216	206,883	13.09
6	1,658,983	227,100	13.68
7	1,389,400	209,433	15.07
8	1,502,616	413,416	27.51
9	1,264,233	370,716	29.32
10	1,416,933	346,633	24.46
11	1,417,650	302,616	21.34
12	1,008,400	330,233	32.74
13	1,043,200	266,450	25.54
14	966,333	288,933	29.89
15	888,066	272,716	30.70

* 9 explantes sin haber sido incubados.

Se puede considerar que los dos primeros días de incubación (figura 5) son la fase de establecimiento del cultivo y que las células están en la parte de G₁ del ciclo de generación celular. En el tercer día se presenta la máxima incorporación que corresponde a la fase S del ciclo que fué de 1,463.3 +/- 137.5 cuentas por minuto (cpm) a partir de la cual comenzó a disminuir hasta llegar al octavo día en donde la incorporación fué de 299.3 +/- 13.2 cpm.

Tabla 3. Incorporación de timidina tritiada de cultivos en monocapa durante los primeros 8 días de incubación.

Días de incubación	Cuentas por minuto (cpm). +/- E. E.	
0	162.2	18.3
1	192.2	34.5
2	781.6	60.0
3	1,463.3	137.5
4	607.7	30.3
5	547.5	158.8
6	250.4	84.1
7	322.3	139.2
8	299.3	13.2

3. Producción de figuras mitóticas.

El comportamiento del cultivo se estudió durante 8 días de incubación debido a que al igual que para la incorporación de timidina tritiada, ya se tenía el antecedente de que después de los primeros 8 días de cultivo disminuía la síntesis de proteínas, y además que la máxima incorporación de timidina tritiada de había registrado al tercer día de incubación y no tenía un aumento significativo después de este día para indicar otra fase de síntesis de ADN, sino que por el contrario disminuía diariamente.

Se encontró durante el análisis y conteo de las figuras mitóticas algunos grupos de cromosomas que no estaban perfectamente condensados, a los cuales se les denominó, por su semejanza con los que presenta Mazia (1974), cromosomas pulverizados. Los resultados del conteo se muestran en la tabla 4 y en la figura 6.

Tabla 4. Producción de figuras mitóticas durante 8 días de incubación.

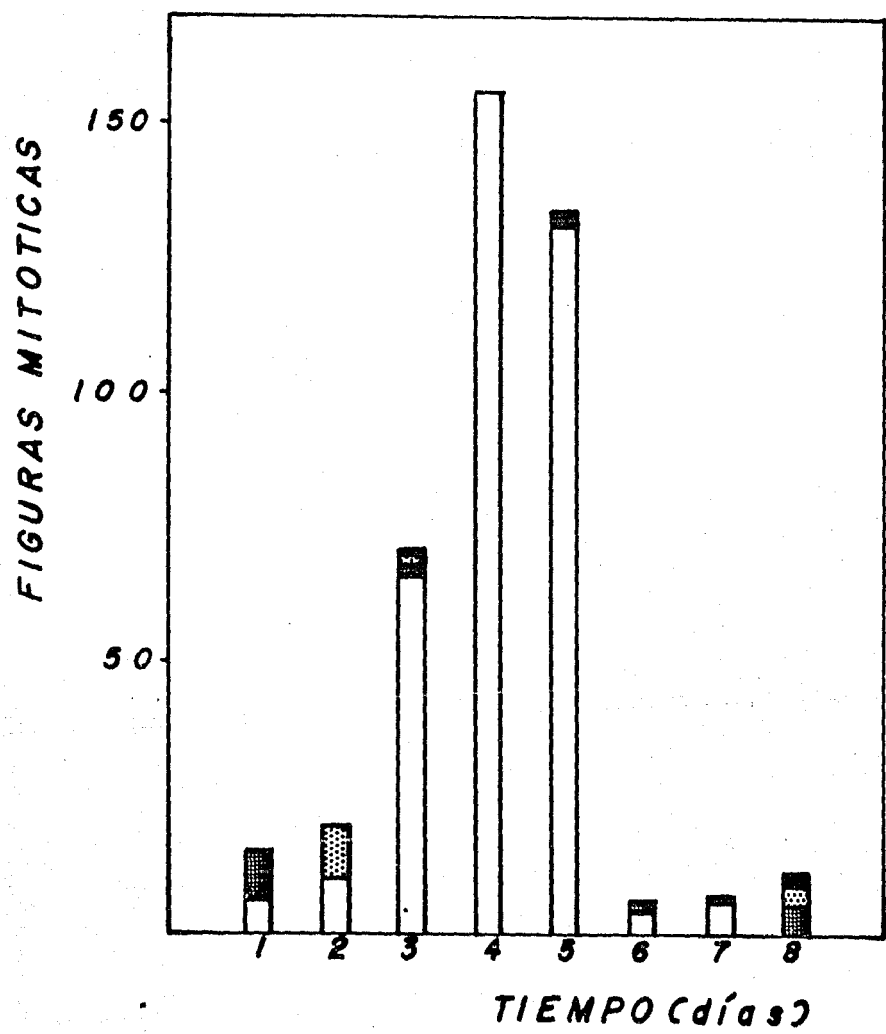
Días de incubación	Profases	Metafases pulverizadas	Metafases	Telofases	Total de figuras.
1	0	9	6	0	15
2	10	0	10	0	20
3	2	2	66	1	71
4	0	0	156	0	156
5	0	1	131	2	134
6	0	2	4	0	6
7	0	0	6	1	7
8	4	5	0	2	11

El estudio realizado por la producción de figuras mitóticas indica que la fase M de los fibroblastos que proliferaron en cultivo, se lleva a cabo durante los días 4 y 5 de incubación, al presentar el máximo número de figuras mitóticas características de esta fase, que fueron 156 y 134 respectivamente.

Después del quinto día se presentó una disminución en la producción de figuras mitóticas muy significativa, pues sólo se presentaron 6, al séptimo día 7 y al octavo 11, por lo cual se piensa que la mayoría de las células estaban nuevamente en fase G₁.

Al establecer una comparación entre las fases del ciclo de generación celular y lo que ocurrió durante los días de cultivo se encontraron las siguientes relaciones: la presencia de una fase G₁ caracterizada según Mazia (1974) por una etapa de preparación para la duplicación del ADN, durante la cual se registra un aumento en la masa celular y probablemente en la

Figura. 6. Producción de figuras mitóticas de fibroblastos de piel de rata durante 8 días de incubación.








cantidad de la mayor parte de las componentes celulares, tales como proteínas y organelos celulares como ribosomas, mitocondrias, etc. Esta etapa tiene una duración de 16 horas según Ellem y Mironescu (1972). Por lo cual se puede pensar que de las 48 horas que tardó el cultivo para empezar a incorporar la timidina tritiada (tabla 3 y figura 5), en las primeras 32 las células se adaptaron a las condiciones del medio. Idea que se reafirma con el trabajo de Betancourt *et al.*, (1978), en el cual se considera que en las primeras 24 horas de cultivo, las células no sintetizan ADN (periodo lag), sino que están en un período de adaptación al medio de cultivo para iniciar su ciclo celular.

Se encontró también una coincidencia entre los resultados de incorporación de timidina tritiada y la producción de figuras mitóticas (figura 7), por lo que se pudo establecer un periodo de síntesis de ADN, fase S, que según Ellem y Mironescu (1972) tiene una duración aproximada de 9 horas, y que se registró en estos estudios al tercer día de cultivo. La otra fase del ciclo que se pudo estudiar fue la división celular o mitosis (M) que se presentó durante los dos días posteriores a la máxima incorporación de timidina tritiada, cuarto (156 figuras mitóticas) y quinto día de cultivo (134 figuras mitóticas) a partir de la siembra.

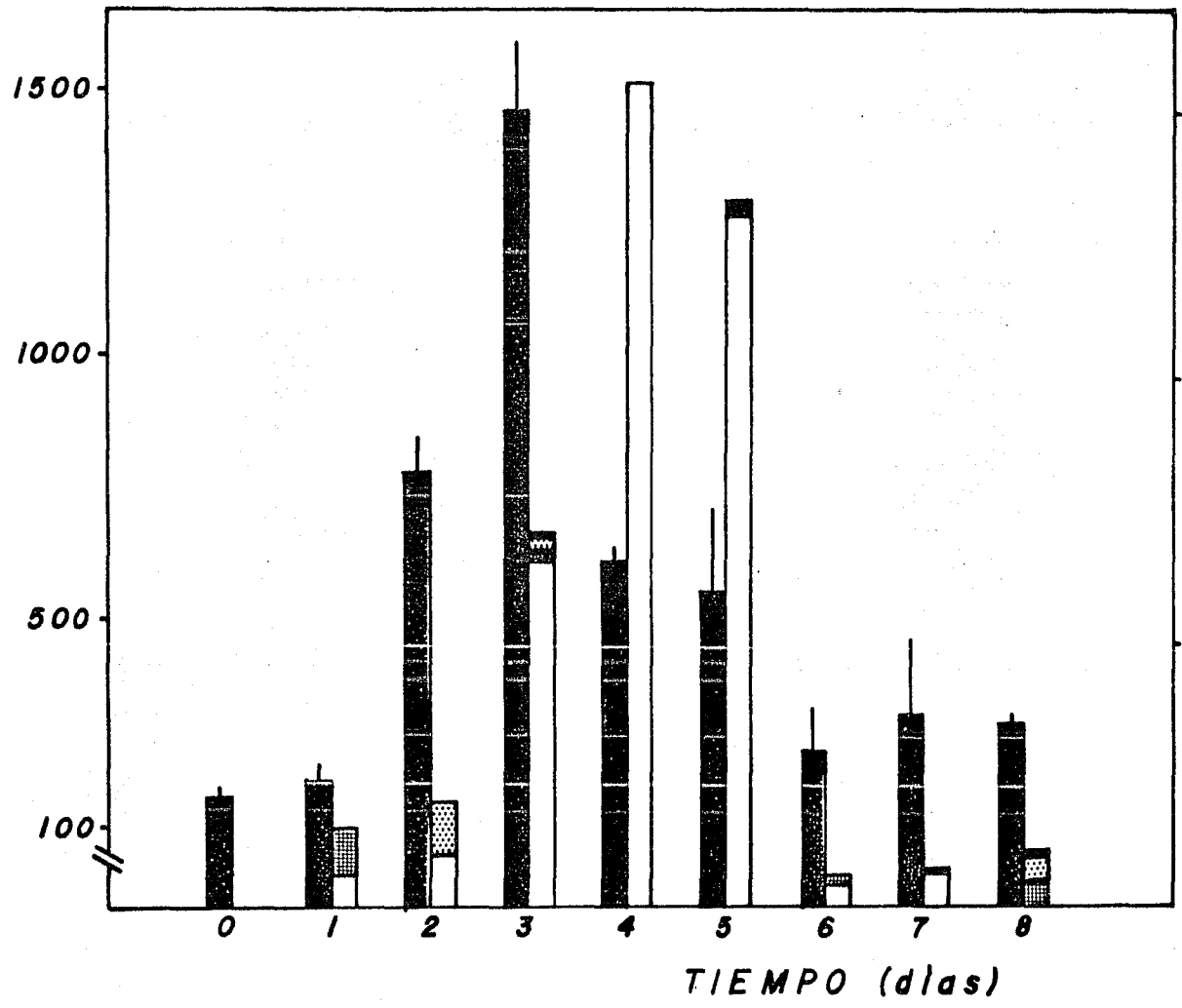
Entre las 24 horas siguientes a la máxima incorporación y el registro de las figuras mitóticas se debieron de presentar las 6 horas correspondientes a la fase G₂.

Al analizar detalladamente estos datos se encuentra que hasta el tercer día de incubación se presenta una disminución gradual de la cantidad de proteínas, que tal vez se deba a que las células que forman la parte central del explante habían muerto. Por otro lado el aumento de proteínas de las células que estaban en proliferación en esos momentos, en la periferia del explante, no substituyeron ni mucho menos rebasaron la pérdida de células, y por lo consiguiente de proteínas que se habían producido, por lo cual el resultado general se inclinó por una disminución de proteínas durante estos tres primeros días, lo que tal vez signifique una fase de adecuación del cultivo.

A la vez, al estudiar la población con otros parámetros se encontró que al tercero y cuarto día de cultivo, se registraron los resultados más elevados de incorporación de timidina tritiada, lo que concuerda con el aumento en la cantidad de proteínas del día 4 al 6, es decir, la población celular se incrementó, lo que significa que en los días posteriores a éstos, la población tenía que aumentar al presentarse la división celular, que como se mostró en la producción de figuras mitóticas, esto se registró al cuarto día de cultivo. En los

Figura. 7. Relación entre la incorporación de timidina tritiada () y la producción de figuras mitóticas en cultivos de fibroblastos de piel de rata durante 8 días de incubación. Metafasas (); metafasas pulverizadas (); profases (); telofases ().

INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA (cpm)



siguientes días, se presentó una disminución gradual de la cantidad de proteínas lo cual indicó que no hubo recuperación de la población celular, es decir, la tasa de mortalidad fue mayor que la tasa de división celular. Por esto ya no se creyó conveniente continuar con los estudios de incorporación de timidina y producción de figuras mitóticas en estas condiciones de cultivo.

Al tomar en cuenta todo lo anterior, se puede concluir que se logró determinar el comportamiento del cultivo con el estudio de los tres parámetros escogidos que indican las fases G_1 , S y M , es decir, gran parte del ciclo de generación celular ya que todo concuerda con lo esperado y con los antecedentes en la literatura.

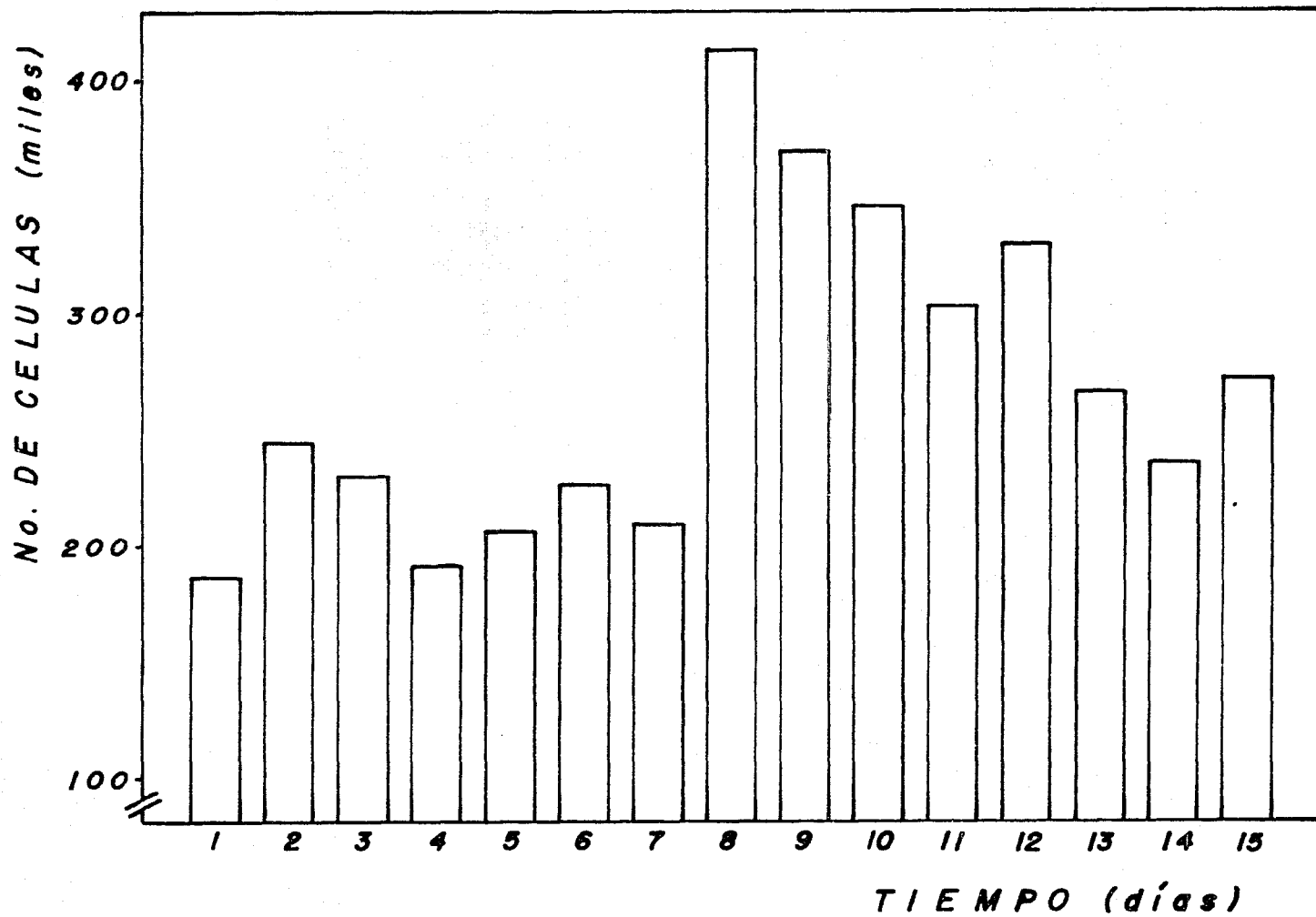
C) Cálculo del número de células.

El número calculado de células presentes en la monocapa vario entre 186,467 que corresponde al primer día de cultivo y 413,417 que fue el valor mas alto registrado al octavo día a partir de la siembra. (tabla 5 y figura 8).

El número de células que constituyan un explante acabado de obtener de la piel del animal fue de 215,516 células, de las cuales sólo un 13.37 +/- 0.78 % en la primera serie sembrada y un 27.68 +/- 1.32 en la segunda serie, tenían capacidad de división celular. (Tabla 2).

Con respecto a la cuantificación de proteínas se ha propuesto que la síntesis se lleva a cabo durante todo el ciclo de generación celular (Miedema y Kruse, 1965; Mazia, 1974; Kimbal *et al.*, 1971; Baxter y Stanners, 1978; Mummery *et al.*, 1981; Ronning *et al.*, 1981 y Yamada *et al.*, 1986). También se encontró en la literatura que la cantidad de proteínas durante el ciclo celular aumenta (Miedema y Kruse, 1965; Mummery *et al.*, 1981; Ronning *et al.*, 1981 y Yamada *et al.*, 1986) y que en un cultivo estas cantidades varían según del estado del mismo, es decir, cuando éste se encuentra en plena proliferación celular y no ha llegado a estado de confluencia, como sucedió en este caso, se presenta un valor de proteínas por célula (0.6 ng) mayor a cuando el cultivo llega a confluencia (0.4 ng/célula) (Miedema y Kruse, 1965 y Yamada *et al.*, 1986) La disminución en la cantidad de proteínas de células en un estado de proliferación continua, a un estado de confluencia, se cree que se deba a que las células ya no requieren de la duplicación de todas las histonas y por lo tanto la maquinaria sintética de la célula no está trabajando totalmente.

Figura. 8. Estimación del número teórico de células presentes en la monocapa con base en la cuantificación de proteínas, durante 15 días de incubación.



Estos valores dan una idea en general de la densidad de la población, además se debe de tomar en cuenta que Yamada *et al.*, en 1986 realizaron la cuantificación en un cultivo secundario, y en este caso se manejaron cultivos primarios. Sin embargo el cálculo no contradice a los resultados de los demás parámetros estudiados ya que conforme transcurren los días de cultivo, hay un aumento progresivo del número celular hasta llegar a un día máximo, que en este caso fue el octavo y a partir de este comenzó a disminuir gradualmente la población de fibroblastos, lo que también se observó al estudiar los cultivos por cuantificación de proteínas, incorporación de timidina tritiada y producción de figuras mitóticas.

Se encontró una relación directamente proporcional entre la cantidad de proteína registrada en las monocapas durante los 15 días de incubación y el número teórico de células presentes en éstas. (Figura 9). Lo que indica que el método que se utilizó para la cuantificación fue bueno.

Con todos estos resultados fue posible establecer las relaciones, entre los estudios realizados en este trabajo y los que sirvieron de antecedente (Ungay, 1978 y Castro, 1983) para el mismo. En lo que respecta a la incorporación de timidina tritiada, en linfocitos de sangre periférica de humano se presenta la máxima incorporación al quinto día de cultivo, aunque desde el segundo hay incrementos en ésta, y en los fibroblastos de piel de rata, el día de máxima incorporación fue el tercero. Con relación a las figuras mitóticas se encontró en linfocitos que al cuarto y sexto día se presentan los valores mas altos registrados, y en la población de fibroblastos sólo se registró un solo día de la más alta producción de figuras mitóticas y fue al siguiente día de la máxima incorporación de timidina tritiada, es decir, al cuarto día de cultivo, lo cual indica que esta última población estaba más sincronizada que la de linfocitos y por lo tanto se puede establecer que la dinámica de crecimiento y comportamiento de los dos tipos celulares estudiados es diferente.

Entre los estudios que se podrían realizar a continuación estaría el cuantificar la población real de los cultivos a través del tiempo de incubación, lo cual no fue posible realizar durante este trabajo por razones de tiempo y costo, ya que hubiera implicado sembrar 135 cultivos con 9 explantes cada uno y tratar 3 diariamente durante 15 días para hacer el conteo por separado de la población celular y obtener un valor diario con su correspondiente E. E. o bien escoger con base en los patrones de incorporación de timidina tritiada los días 0, 3, 4, 5, 8, 11 y 15 por lo que se sembrarían menos cultivos y todos provenientes de una sola rata.

Figura. 9. Relación entre la cantidad de proteína registrada diariamente en la monocapa de los cultivos y el número de células presentes en ésta.

μ g DE PROTEINAS EN LA
MONOCAPA

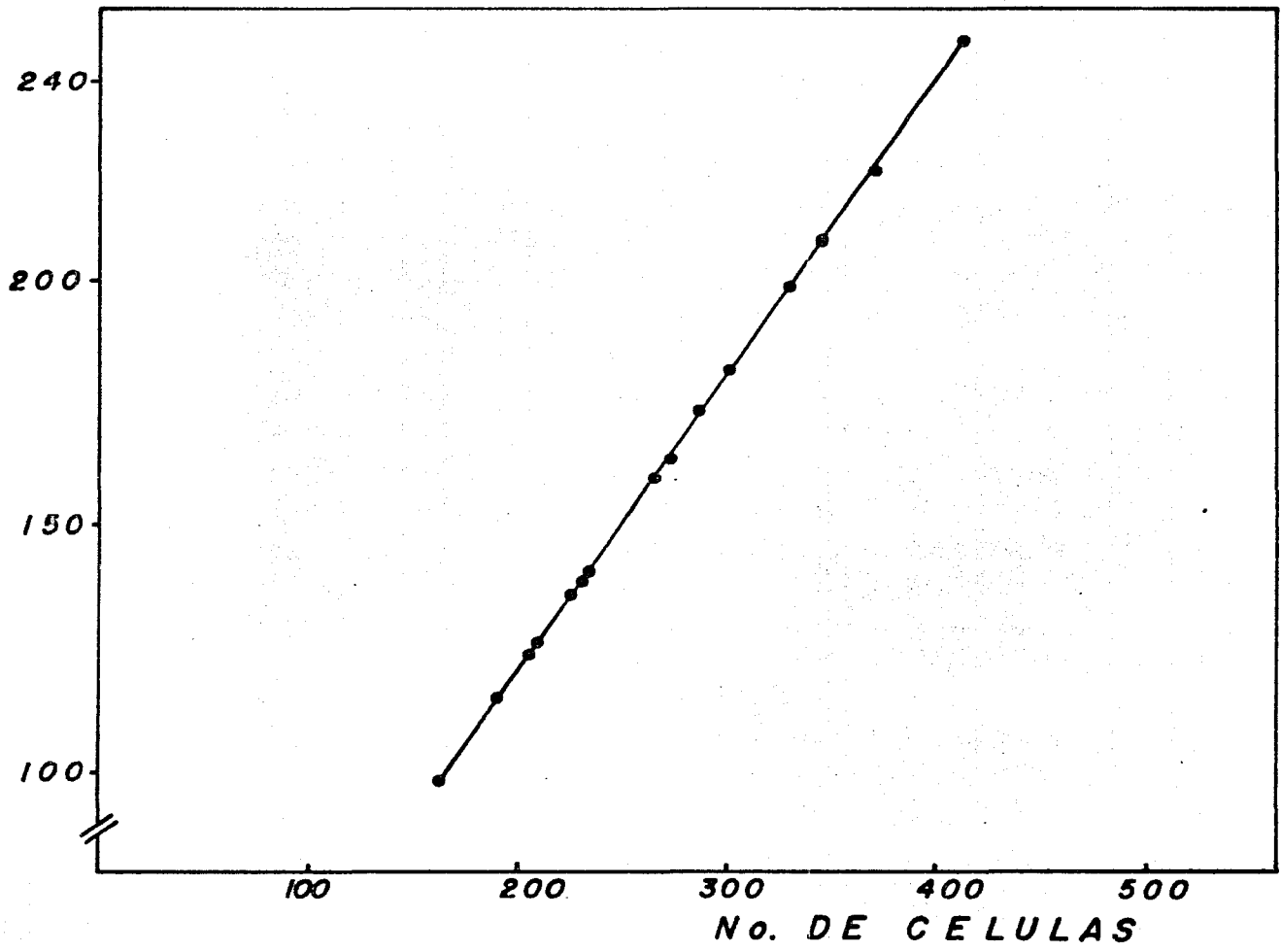


Tabla 5. Cálculo teórico del número celular presente en las monocapas durante 15 días de incubación.

Días de incubación.	Número de células.
1	192,933
2	231,166
3	230,666
4	164,950
5	206,883
6	227,100
7	209,433
8	413,416
9	370,716
10	346,633
11	302,616
12	330,233
13	266,450
14	288,933
15	272,716

Otros aspectos interesantes que se podrían estudiar en un futuro serian: 1) ver la cantidad inicial de células que posee un explante para analizar como se comporta este dato con relación a la proliferación celular durante el tiempo de incubación. 2) Trabajar con ratas de otra cepa para ver si es posible obtener un estado de confluencia, o bien trabajar con superficies de cultivo más pequeñas para observar como se comportan las células al llegar a la inhibición por contacto y obtener a partir de éstas, cultivos secundarios para ver el comportamiento celular. 3) Aplicar a los cultivos un marcador radioactivo que indique si hay producción de colágena a partir de los fibroblastos *in vitro* o cuantificarla colorimétricamente.

V. BIBLIOGRAFIA.

- Ashihara, T. y Baserga, R. (1979). Cell Synchronization. Meth. Enzymol. Vol. LVIII: 248 - 262.
- Baserga, R. y Kisielewski, W. E. (1963). Autobiographies of Cells. Sci. Amer. 209 (2): 103 - 110.
- Baxter, G. C. y Stammers, C. P. (1978). The Effect of Protein Degradation on Cellular Growth Characteristics. J. Cell. Physiol. 96: 139 - 146.
- Berger, S. L. (1979). Lymphocytes as Resting Cells. Meth. Enzymol. Vol. LVIII: 486 - 494.
- Betancourt, M., Aguilar, M.A., Ducolemb, Y., León, C.J.M. (1978). Ciclo Celular del Linfocito Humano "in vitro". XLVII Reunión reglamentaria de la Asociación de la Investigación Pediátrica, Valle de Bravo, México.
- Brachet, J. (1961). The Living Cell. Sci. Amer. 205 (3): 50 - 61.
- Burton, K. (1956). A Study of the Conditions and Mechanism of the Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of Deoxyribonucleic Acid. Biochem. Jour. 62: 315 - 323.
- Carrel, A. (1931). The New Cytology. Science. 77 (1980): 297 - 303.
- Castro, R. E. M. (1983). Estudio del Crecimiento de una Población de Linfocitos Humanos en Cultivo. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, U.N.A.M.
- Christine, L. Mummery, L. B. Van Der, S. y De Laat, S.W. (1981). Modulation of Functional and Optimal (Na⁺ - K⁺) ATPase Activity During the Cell Cycle of Neuroblastoma Cells. J. Cell. Physiol. 107: 1 - 9.
- Darzynkiewicz, Z., Crissman, H., Traganos, F. y Steinkamp, J. (1982). Cell Heterogeneity During the Cell Cycle. J. Cell. Physiol. 113: 465 - 474.
- Ellem, K. A. O. y Mironescu, S. (1972). The Mechanism of Regulation of Fibroblastic Cell Replication. J. Cell. Physiol. 79 (3): 389 - 406.
- Gray, G. W. (1949). The Nobel Prizes. Sci. Amer. 181 (6): 11 - 17.

- Kimbal, R. F., Perdue, S. W., Chu, E. H. Y. y Ortiz, J. R. (1971). Microphotometric and Autoradiographic Studies on the Cell Cycle and Cell Size During Growth and Decline of Chinese Hamster Cell Cultures. Exp. Cell. Res. 66: 17 - 32.
- Kruse, P. F. Jr. y Patterson, M. K. Jr. (1973). Tissue Culture Methods and Applications. Academic Press, New York, 868 pp.
- León - Cázares, J. M. (1987). Niveles de Complejidad y Comunicación. Departamento de Bioenergética, Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, U.N.A.M. En Prensa.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. S. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193: 265 - 275.
- Manford, K. y Patterson, Jr. Measurement of Growth and Viability of Cells in Culture. Meth. Enzymol. Vol. LVIII: 141 - 142.
- Mazia, D. (1974). The Cell Cycle. Sci. Amer. 230 (1): 54 - 64.
- McAteer, J. A. y Douglas, W. H. J. (1979). Monolayer Cultures Techniques. Meth. Enzymol. Vol. LVIII: 132 - 140.
- Miedema, E. y Kruse, P. F. Jr. (1965). Enzyme Activities and Protein Contents of Animal Cells Cultured under Perfusion Conditions. Biochem. Biophys. Res. Commun. 20 (4): 528 - 534.
- Ongay, L. L. M. (1978). Modelo Experimental del Desarrollo de una Población de Linfocitos Humanos "in vitro". Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, U.N.A.M.
- Oyama, V. I. e Eagle, H. (1956). Measurement of Cell Growth in Tissue Culture with a Phenol Reagent (Folin - Ciocalteu). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 91: 305 - 307.
- Pardee, A.B. (1974). A Restriction Point for Control of Normal Animal Cell Proliferation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 71(4):1286 - 1290.
- Pardee, A. B., Dubrow, R., Hamlin, J. L. y Kletzien, R. F. (1978). Animal Cell Cycle. Ann. Rev. Biochem. 47: 715 - 750.
- Pierce, J. R. (1972). Communication. Sci. Amer. 227 (3): 30 - 41.
- Ronning, O. W., Lindmo, I., Pettersen, E. O. y Seglen, P. O. (1981). The Role of Protein Accumulation in the Cell Cycle Control of Human NHIK 3025 Cells. J. Cell. Physiol. 109: 411 - 418.

- Rothblat, G. H. y Cristofalo, V. J. (1972). Growth, Nutrition, and Metabolism of Cells in Culture. Academic Press, New York. 471 pp.

- Stent, G. S. (1972). Cellular Communication. Sci. Amer. 227 (3): 42 - 51.

- Worton, R. G. y Duff, C. (1979). karyotyping. Meth. Enzymol. Vol. LVIII: 322 - 344.

- Yamada, K., Sasaki, M. y Kimura, G. (1986). Effect of temperature and Cell Density on Cellular Protein Content in temperature - Sensitive Mutants of rat 3Y1 Diploid Fibroblast. In Vitro Cell. Develop. Biol. 22: 212 - 216.