



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"I Z T A C A L A"**

**"CARACTERIZACION DEL CULTIVO EN AGAR
BLANDO DE HEPATOCITOS PROVENIENTES DE
RATA PARCIALMENTE HEPATECTOMIZADA
TRATADOS CON DIMETILNITROSAMINA"**

T E S I S

Que Para Obtener la Licenciatura en Biología

SAMIA FATTEL FAZENDA

Director de Tesis: Dr. Saúl Villa Treviño

Los Reyes Iztacala, Edo. de México



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.

*A mis queridos padres, hermanos,
a mi hija Salime Monserrat y a
todos mis amigos.*

MI AGRADECIMIENTO

Al Doctor Saúl Villa Treviño por haberme asesorado y permitido realizar mi trabajo de tesis en el laboratorio del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV y a Carmén por su apoyo y dedicación que me brindo durante el trayecto y realización de este trabajo.

LOS TRES PELDAÑOS

HAY QUE SUBIR TRES PELDAÑOS PARA LLEGAR A LA SABIDURIA

EL RECTO PENSAMIENTO estriba en una mente abierta y pronta a considerar todas las cosas; una mente humilde que acepta recibir las migajas de los festines de los sabios; una mente caritativa que no condena a nadie salvo así misma; una mente sabaz capaz de ver el bien en todas las cosa y llegar hasta el bien en todas las cosas.

LA RECTA ACCION consiste en prestar los debidos cuidados al cuerpo, en hacer el ejercicio apropiado, y en ocupar el lugar debido en la gran batalla material de la vida. El hombre crece poniendose en contacto con todo lo que crece. Cuando un hombre es capaz de conocer todas las formas de vida con placer, con consideración con el corazón de alguien que quiere ayudar, y con la mente de un estudioso, progresa.

LA RECTA ACTITUD significa que todo debe emprenderse con el espíritu de amor, de verdad, y con un sincero deseo generoso de prestar ayuda para convertir este mundo en un lugar mejor donde vivir. Una manera honrada de encarar la vida significa alegría, espíritu de ayuda y cooperación con todos los que tratan de progresar. Significa consideración para todos, aún cuando no estén de acuerdo con nosotros, puesto que comprende que el hombre no debe trabajar para el hombre, sino para "DIOS", y que a cada uno le corresponde lo suyo.

INDICE

	Página
<i>Lista de abreviaturas</i>	i
<i>Lista de figuras</i>	ii
<i>Lista de tablas</i>	iii
<i>Resumen</i>	1
<i>Introducción</i>	3
<i>Iniciación</i>	4
<i>Promoción</i>	7
<i>Modelos in vivo</i>	7
<i>Iniciación in vitro</i>	10
<i>Cultivo primario de hepatocitos</i>	12
<i>Cambios progresivos que sufre una célula normal a una neoplásica in vitro</i>	14
<i>Estado preneoplásico</i>	14
<i>Estado neoplásico</i>	15
<i>Medio de cultivo en agar blando</i>	16
<i>Glutamyl transpeptidasa</i>	19
<i>Dimetilnitrosamina</i>	20
<i>Objetivo del trabajo</i>	21
<i>Métodos</i>	23
<i>Hepatectomía parcial</i>	29
<i>Cultivo primario de hepatocitos</i>	29
<i>Viabilidad celular</i>	29
<i>Inóculo y condiciones del cultivo</i>	30
<i>Tratamiento de los hepatocitos en cultivo primario</i>	30
<i>Recolección y sembrado en agar blando</i>	30
<i>Aislamiento de los hepatocitos tumorales</i>	31
<i>Aislamiento de las células leucémicas L5178Y</i>	32
<i>Tinción histoquímica de la glutamil transpeptidasa</i>	32
<i>Resultados</i>	34
<i>Condiciones del cultivo en agar blando de las células leucémicas L5178Y</i>	34
<i>Tratamiento de los hepatocitos en cultivo primario</i>	35

	<i>Página</i>
<i>Condiciones</i>	36
<i>Discusión</i>	53
<i>Conclusiones</i>	58
<i>Referencias</i>	60

LISTA DE ABBREVIATURAS

<i>AFB₁</i>	<i>Aflatoxina FB₁</i>
<i>2AAF</i>	<i>2 acetil amino fluoreno</i>
<i>CPH</i>	<i>Cultivo primario de hepatocitos</i>
<i>DEN</i>	<i>Dietyl nitrosamina</i>
<i>DMSO</i>	<i>Dimetil sulfóxido</i>
<i>DMN</i>	<i>Dimetil nitrosamina</i>
<i>DNA</i>	<i>Acido desoxi-ribonucleico</i>
<i>GGT</i>	<i>Gama-glutamyl transpeptidasa</i>
<i>HRI</i>	<i>Hepatocitos de rata intacta</i>
<i>HRP</i>	<i>Hepatocitos de rata parcialmente hepatectomizada</i>
<i>MEM</i>	<i>Medio mínimo esencial de Eagle</i>
<i>3 Me-DAB</i>	<i>3 metil-diamino-azo-benzeno</i>
<i>RNA</i>	<i>Acido ribonucleico</i>
<i>SDS</i>	<i>Duodecil sulfato de sodio</i>
<i>SSB</i>	<i>Solución salina balanceada</i>

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 *Colonia de células leucémicas (L5178Y) después de 12 días de cultivo en agar blando.*
- FIGURA 2 *Cultivo de hepatocitos de rata intacta (HRI) a los 4 días de cultivo en agar blando.*
- FIGURA 3 *"Célula grande" segmentada de un cultivo de hepatocitos de rata parcialmente hepatectomizada después de 4 días de cultivo.*
- FIGURA 4 *"Células grandes" con relieve topográfico arrugado, de un cultivo de hepatocitos de rata parcialmente hepatectomizada después de 4 días de cultivo.*
- FIGURA 5 *Colonia de "células pequeñas", de un cultivo de hepatocitos de rata hepatectomizada de rata parcialmente hepatectomizada después de 12 días de cultivo.*
- FIGURA 6 *Colonia de células pequeñas asociadas a una célula grande, de un cultivo de hepatocitos de rata parcialmente hepatectomizada después de 12 días de cultivos.*

LISTA DE TABLAS

- TABLA 1. *Diferentes concentraciones de agarosa para la capa superior del cultivo en agar blando de células leucemicas.*
- TABLA 2. *Tiempo de tratamiento con DMN en cultivo primario de hepatocitos de rata intacta.*
- TABLA 3. *Tiempo de tratamiento con DMN en cultivo primario de hepatocitos provenientes de rata parcialmente hepatectomizada.*
- TABLA 4. *% Viabilidad de los hepatocitos provenientes de rata parcialmente hepatectomizada después de ser transferidos al agar blando.*
- TABLA 5. *% Viabilidad de los hepatocitos de rata intacta después de ser tranferidos al agar blando.*
- TABLA 6. *Viabilidad del cultivo de hepatocitos de rata intacta en agar blando.*
- TABLA 7. *Viabilidad del cultivo de hepatocitos de rata parcialmente hepatectomizada en agar blando.*

RESUMEN

Desde principios de siglo los avances conceptuales en el campo de la carcinogénesis química experimental empezaron a florecer, lográndose grandes avances en cuanto a los mecanismos que operan para que se produzca cáncer, por la acción de sustancias químicas. Los primeros trabajos se realizaron "*in vivo*," proponiendo a la iniciación y la promoción como etapas tempranas del proceso carcinogénico; sin embargo, con el fin de dilucidar a que etapa pertenecen los eventos moleculares que suceden hacia una transformación maligna, se propusieron modelos más sencillos, que han permitido separar el efecto iniciador del efecto promotor, inducidos por diferentes agentes o manipulaciones de cultivos celulares, de los que podemos destacar el cultivo primario de hepatocitos. Bien caracterizado por las ventajas que ofrece para el estudio de la acción de las sustancias químicas carcinogénicas. La dificultad en el estudio de la transformación neoplásica en estos sistemas, es la falta de parámetros confiables que sean constantes para medir malignidad. En la última década se ha incrementado el medio de cultivo en agar blando y en el presente es el mejor criterio para evaluar transformación "*in vitro*" (Tucker y col 1977; Neuguth y Weinstein, 1979).

Los resultados obtenidos mostraron eficiencia del agar blando para desarrollar colonias de tumor ascítico L5178Y, así como también la expresión de la enzima GGT en estas células. Para los hepatocitos provenientes de rata intacta y de rata parcialmente hepatectomizados, tanto tratados como no tratados, no se encontraron diferencias significativas, pues en ambos cultivos se encontró la presencia de células grandes, células pequeñas (epiteliales) y la parte mayoritaria, hepatocitos, los cuales permanecieron sin presentar fenotipos alterados y sin dividirse,

La viabilidad de estos hepatocitos disminuyó considerablemente al 4° día de cultivo, mientras que las células pequeñas empezaron en ese momento a crecer y formar colonias de más de 12 células a los 12 días de cultivo.

En cuanto a la tinción histoquímica en ambos cultivos se encontró la presencia de células aisladas positivas a la enzima γ -glutamyl-transpeptidasa. Las condiciones para el aislamiento de las células provenientes de los nódulos (tumerales) no fueron encontradas ya que se contaron con pocos animales a los que se les había inducido transformación "in vivo" por la dieta con un carcinógeno y fenobarbital, y segundo, porque la dispersión celular no se logró con buenos resultados, obteniéndose un número pequeño de células.

INTRODUCCION

En el campo de la carcinogénesis, uno de los objetivos es conocer los mecanismos por medio de los cuales los diferentes agentes producen cáncer y extrapolar la información que se obtenga del nivel experimental hacia el ser humano.

La aseveración de que las sustancias químicas como grupo son las responsables de la aparición del cáncer en el ser humano está basada en un gran número de estudios epidemiológicos. Entre los que podemos mencionar: El cáncer de pulmón en los fumadores de tabaco, asociado con sustancias carcinogénicas encontradas en la orina de estos fumadores que son mutagénicas en bacterias (Doll, 1977).

Un ejemplo particular de cáncer producido por contaminantes ambientales es el de los trabajadores de la industria del asbesto, quienes llevaban entre sus ropas de trabajo polvo proveniente de éste. Esto fue suficiente para reflejarse en cáncer y mesoteliomas de pulmón en los miembros de sus familias (IARC). A partir de estos estudios se ha llegado a la conclusión de que el 90% del cáncer en el ser humano es producido por factores ambientales, de estos las sustancias químicas determinan el mayor número de las neoplasias y el restante 10% se les atribuye a factores genéticos, virales, físicos. (Higginson, 1969; Boyland, 1967, tomada de Mondal, 1980).

El desarrollo del campo de la carcinogénesis química experimental parte de 1915, con los trabajos desarrollados por los investigadores Yamagiwa e Ichikawa, (1918), quienes indujeron cáncer en las orejas de los conejos mediante repetidas aplicaciones de alquitrán de hulla. La identificación de sustancias carcinogénicas a partir de entonces se intensificó, posteriormente en

la década de los 50's, se estableció que la mayoría de estas sustancias necesitaba sufrir alguna forma de activación metabólica antes de que pudiera inducir cáncer.

En la actualidad se acepta que el proceso carcinogénico se lleva a cabo en varias etapas y que diversos factores influyen para que una célula normal expuesta a un agente carcinogénico pueda progresar a una célula transformada y dar origen a una neoplasia (Mondal, 1980; Van Rensselaer, 1980).

Los avances conceptuales hechos durante la década de los 40's, establecieron a la iniciación y a la promoción como dos de las etapas tempranas de la carcinogénesis química (Farber y Cameron, 1980). Sin embargo las bases mecanísticas de estos fenómenos son objeto de estudios actuales.

INICIACION

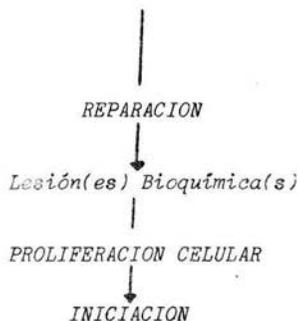
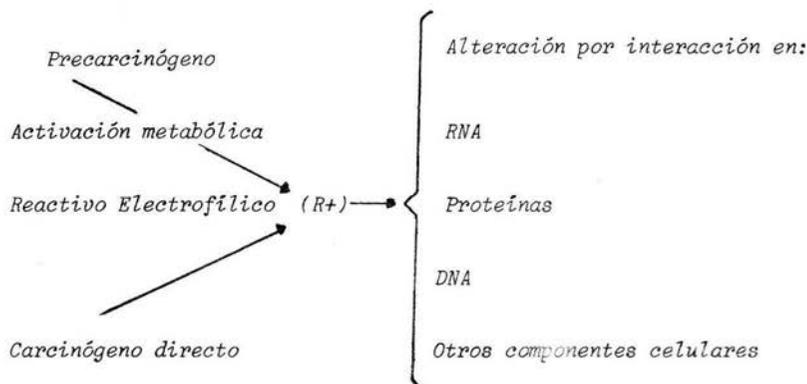
Lo que se conoce como iniciación de la carcinogénesis química se puede definir como el cambio permanente y hereditario en la estructura genética de la célula (Mondal, 1980). Operacionalmente dicho proceso de iniciación consta de las siguientes etapas: Una primera etapa consiste en la generación de metabolitos activos provenientes de sustancias que requieren una transformación metabólica en la célula llamados carcinógenos indirectos o de sustancias que son altamente reactivas "per se" llamados carcinógenos directos, y no requieren participación enzimática para dar lugar a los metabolitos activos (Miller, 1978).

Una segunda etapa consiste en la interacción de los metabolitos activos de las sustancias carcinogénicas con el DNA. El hecho de que las lesiones en el DNA puedan explicar más fácilmente cambios permanentes y heredables son la base de la hipótesis de que la unión covalente de las sustancias químicas carcinó-

génicas a esta molécula es un requisito indispensable para la iniciación de la carcinogénesis química (Sarna y col. 1975; Farber, 1984).

Una tercera etapa en donde una alteración en los mecanismos normales de reparación del DNA, evita la reparación de la lesión producida por el metabolito activo y se incrementa la posibilidad de iniciación (Farber, 1984). Adicional a lo anterior un requisito indispensable es que estos eventos ocurran cuando menos un ciclo de replicación celular. Existen ejemplos en modelos "in vitro" tanto con rayos X, como con virus y con sustancias químicas en el que la iniciación de la carcinogénesis se lleva a cabo cuando existe una etapa de proliferación celular durante el efecto del agente carcinogénico (Farber, 1984). Aunado a esto, existen resultados experimentales que apoyan la aseveración de que las células en "replicación" son más susceptibles al efecto de las sustancias químicas carcinogénicas, tales evidencias son: En animales recién nacidos o en ratas adultas parcialmente hepatectomizadas la administración de sustancias químicas carcinogénicas induce a un gran número de tumores que en los adultos normales no hepatectomizados (Cradock, 1971; Cradock, 1976).

Y aún cuando no se conoce el mecanismo por medio del cual se establece la iniciación durante la replicación celular, se ha sugerido que durante la síntesis del DNA, existen sitios disponibles para la interacción de los metabolitos en las células que están en replicación, mientras que en las células en estado quiescente estarían protegidos por el apareamiento de la doble cadena. Además, si éste se replica antes de que la lesión se repare se puede esperar que de esta manera se introduzca la lesión permanente en la cadena recién sintetizada. De acuerdo con lo anterior se ha propuesto el siguiente esquema que explica el proceso de iniciación por sustancias químicas.



Ref. Farber, 1981.

Si bien es cierto que se ha obtenido información importante en cuanto al fenómeno de iniciación y de que se va obteniendo un panorama más claro en cuanto a los eventos iniciales en carcinogénesis, no ocurre lo mismo en la secuencia de eventos posteriores a la iniciación las cuales no están bien definidas.

PROMOCION

Con base en modelos experimentales se ha establecido que existen condiciones y efectos de ciertas sustancias, que en sí no son carcinogénicas, pero que promueven la aparición de los tumores, a este fenómeno se le ha dado el nombre de promoción. El cual se considera como la expresión fenotípica maligna de los cambios genéticos producidos en la Iniciación (Mondal, 1980).

En el transcurso de esta etapa ocurren fenómenos que permiten que una célula iniciada prolifere libremente hasta constituir un tejido canceroso de características bien definidas. Esta etapa ocurre lentamente en el transcurso de meses o años, requiere de repetidas exposiciones y se sabe que hasta cierto momento de su evolución puede ser reversible (Farber y Cameron, 1980). Al contrario de la iniciación, durante la promoción comienzan a apreciarse diferencias morfológicas entre el tejido en proliferación y el tejido que lo rodea.

Un hecho sobresaliente en carcinogénesis experimental es que si bien durante la promoción temprana se llegan a desarrollar varios nódulos, la mayoría de ellos involucionan y sólo unos pocos progresan hasta constituir un carcinoma (Chosal y col. 1983).

MODELOS IN VIVO.

El modelo más estudiado en carcinogénesis química experimental ha sido la inducción de tumores en el hígado de roedores, debido a las innumerables ventajas que presenta en cuanto al conocimiento de su biología celular, bioquímica y patología, además de ser un órgano que se puede manipular en estado de proliferación celular.

El número de carcinógenos que se ha utilizado es bastante grande y se han podido detectar cambios poblacionales previo al

desarrollo de neoplasias. A los que se les ha dado el nombre de focos o nódulos hiperplásicos, que son poblaciones focales o nodulares de algunas células hepáticas, alteradas durante la fase preneoplásica, por lo que son consideradas como probables lesiones precursoras (Farber, 1973). Se ha observado que después del tratamiento con una sustancia química carcinogénica, las células de los nódulos expresan rápidamente cambios en ciertas actividades enzimáticas, tales como la rápida disminución o pérdida de actividades de glucosa-6-fosfatasa, nucleótido fosfatasa, serina deshidratasa, glicógeno fosforilasa, ribonucleasa y desoxirribonucleasa (marcadores negativos) (Farber y col., 1979) o la aparición o aumento de alfafetoproteína (Abelev, 1971), antígenos preneoplásicos y γ -glutamyl-transpeptidasa (Fiala, 1972) como marcadores positivos. Utilizando éstos marcadores como herramienta para la identificación de células iniciadas o preneoplásicas, se ha hecho uso de modelos "in vivo" para el análisis secuencial del fenómeno de producción de cáncer.

1) Modelo de Peraino (Peraino, 1971).

En este modelo se hace uso de ratas recién nacidas destetadas, a las cuales se les administra durante 18 días una dieta con el carcinógeno 2-acetilaminofluoreno (2-AAF) y después de una semana de recuperación se les adiciona fenobarbital al 0.05% en la dieta, este tratamiento continúa por varios meses. Como resultado se producen lesiones hiperplásicas y carcinomas. El fenobarbital por sí mismo no es iniciador pues cuando se le aplica sólo no produce tumores, pero sí ayuda a promoverlos.

2) Modelo de Scherer y Emmelot (Scherer y Emmelot, 1975)

En este modelo se usan hembras adultas que se les da una sola administración del carcinógeno iniciador dietilnitrosamina (DEN) de 20 a 24 hrs después de haber sido hepatectomizadas.

En semanas se pueden observar nódulos bien definidos deficientes en ATPasa o en glucosa 6-fosfatasa, pero estas lesiones no progresan a menos que en la dieta se les de por períodos largos, una concentración baja no tóxica de dietil-nitrosamina (DEN) de 2 a 4 mg. por día. Este modelo tiene la ventaja que utiliza una dosis única del carcinógeno iniciador y se pueden cuantificar los nódulos que tienen deficiencias enzimáticas y que potencialmente son lesiones precursoras de los carcinomas.

3) Modelo de Solt y Farber (Solt y Farber, 1976).

En este modelo, se utilizan ratas adultas que son expuestas a una dosis única necrogénica del carcinógeno iniciador, después de un período de recuperación los animales son expuestos a una dosis baja de 2AAF en la dieta por 7 días para crear un efecto "mito-inhibitorio" y después son sometidas a una hepatectomía parcial. En este modelo se ha descrito la aparición de nódulos con deficiencias enzimáticas tan temprano como a los 5 a 10 días después de la hepatectomía parcial. Alrededor del 80. mes se desarrolla el cáncer.

4) Modelo de Pitot (Pitot y col., 1978).

En este modelo se utilizan ratas jóvenes adultas, 24 hrs. antes de practicarles una hepatectomía parcial, se les administra una dosis única del carcinógeno iniciador. Después de un período de recuperación de dos meses se les adiciona en la dieta, fenobarbital al 0.05% por un período adicional de 6 meses. Por medio de marcadores enzimáticos tales como la ATPasa, glucosa-6-fosfatasa y la γ -glutamyl-transpeptidasa, es posible hacer estudios cuantitativos de la aparición de nódulos hiperplásicos y de los hepatocarcinomas.

INICIACION IN VITRO

En los sistemas "in vivo," algunos mecanismos como el crecimiento autónomo y el carácter invasivo de las células neoplásicas son poco entendibles, además de presentar ciertas desventajas como: el costo tan elevado de su producción, el tiempo de duración tan prolongado de cada experimento, las dosis empleadas, más altas de aquellas a que le hombre esta expuesto y además de presentar poca sensibilidad para detectar carcinógenos débiles (Stick y col. 1975). Esto dio lugar a desarrollar sistemas más sencillos que cubrieran con los requisitos para seguir avanzando en el conocimiento del cáncer.

Así se han establecido un buen número de sistemas de células y órganos en cultivo, que en la actualidad se han clasificado en:

1) Transformación cualitativa con fibroblastos diploides: Se logró la transformación celular y se caracterizaron algunas propiedades de estas células transformadas como: pérdida de la inhibición por contacto; aglutinación celular, cuando se les adicionó aglutinina en el medio de cultivo; formación de colonias en agar blando; y producción de fibrosarcomas cuando se inocularon en animales. De estas características el crecimiento apilado parece ser un parámetro confiable para evaluar transformación celular "in vitro." La desventaja en este sistema es que no se pueden hacer medidas cuantitativas (Kuroki y Heidelberg, 1972; Kuroki y Sato, 1968; Bernal y Sachs, 1965).

2) Transformación cuantitativa con fibroblastos diploides: En este sistema, después de 8 a 10 días de tratamiento con el carcinógeno, se obtuvo la transformación de las colonias, lo cual no se caracterizó por el apilamiento de células. La característica que se midió, es que las colonias transformadas aisladas se desarrollaron por subsecuentes cultivos en líneas celulares, que

produjeron fibrosarcomas cuando se inocularon en huéspedes apropiados. Este sistema presenta heterogeneidad celular que hace difícil distinguir las colonias normales de las transformadas (huberman y Sachs, 1966; Dipaolo y col. 1969).

3) Transformación cualitativa con fibroblastos aneuploides: Este sistema presenta la ventaja que se puede cuantificar la transformación celular después de semanas de tratamiento, así como varias técnicas de cultivo como clonación y cultivo sincrónico, aplicables a estudios de transformación por sustancias químicas, sin embargo el empleo de células aneuploides es un problema por la dificultad que presentan las células en mantener la capacidad de pérdida de la inhibición del crecimiento por contacto (Mondal y Heidelberg, 1970; Marquardt, 1974; Reznikoff y col. 1973).

4) Transformación cualitativa con células epiteliales diploides: Se emplean células epiteliales obtenidas de hígado de rata, pero la transformación celular en este sistema tarda más en manifestarse comparado con los fibroblastos. Estas células transformadas provienen de cultivo secundario, es decir que estas células se han mantenido por varios meses a través de pases o subcultivos y después de cierto tiempo se les han aplicado diferentes carcinógenos (Katsuta y Takaota, 1975 tomada de Kuroki, 1975). La dificultad que ofrece este sistema es la falta de parámetros confiables "in vitro" para evaluar transformación maligna en estas células.

5) Transformación cualitativa con órganos en cultivo: Los estudios en órganos en cultivo se acercan más a las condiciones "in vivo," ya que se pueden observar cambios morfológicos tanto en epitelio como en mesénquima, la malignidad de las células es difícil lograrla en estos sistemas (Roller y Heidelberg, 1967; tomada de Kuroki, 1975).

Como se puede observar, los cambios asociados con transformación maligna incluyen: morfología (Barker y Sanford, 1970; Dipaolo y col. 1969), crecimiento en agar blando (Macpherson y col. 1964; Shin y col. 1975), disminución en el suero para crecer (Smith y col. 1971), incremento en la densidad de saturación (Smith y col. 1971), y el incremento en el activador del plasminogéno (Unkeless y col. 1973), provienen en su mayoría de estudios en cultivos de fibroblastos. A pesar de que la gran mayoría de tumores humanos son carcinomas originados de células epiteliales, la evolución neoplásica de estos tejidos ha sido menos estudiada. El cultivo de células epiteliales ofrece muchas ventajas en el campo de la carcinogénesis química, pues se puede obtener una población altamente uniforme de células, en un medio completamente definido, que presentan las enzimas necesarias para el metabolismo de una gran variedad de carcinógenos.

CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS

El modelo de cultivo primario de hepatocitos ha sido materia de considerables estudios en la última década, para la evaluación de la carcinogénesis química, basados en dos razones principales: primero la capacidad que tienen para metabolizar una gran variedad de compuestos químicos (Sims, 1980; Rosales, 1982; Cordero, 1984); y segundo por el alto nivel de actividad reparadora del DNA, lo cual es una medida sensible del daño causado por los carcinógenos finales. Por tanto, los pasos involucrados en la iniciación de la carcinogénesis, metabolismo, interacción y reparación son evidentes en el cultivo y el requisito de que éstos pasos se lleven a cabo durante un estímulo de proliferación celular, se cumple en los cultivos realizados de hepatocitos provenientes de rata parcialmente hepatectomizada, puesto que las células que han entrado en fase de síntesis la terminan.

Además este sistema nos proporciona las siguientes ventajas:

a) homogeneidad celular; al emplear el método de dispersión

enzimática para la obtención de células aisladas representativas del hígado, se elimina la heterogeneidad celular (Berry y col. 1969); b) funciones específicas del hígado "in situ," con pruebas experimentales se ha comprobado que los cultivos primarios de hepatocitos (CPH), son capaces de metabolizar sustancias carcinogénicas como lo es el metabolismo de 2-AAF, DMN, DEN, AFB₁ etc., además de sintetizar proteínas, DNA y RNA responden a estímulos hormonales en forma similar a lo que ocurre "in vivo" (Leffert y col. 1976); c) ausencia de efectos colaterales; una de las ventajas de este modelo es poder controlar la dosis adicionada al medio de cultivo, lo cual no se podría hacer "in vivo," pues el carcinógeno se diluiría afectando a otros órganos susceptibles, además intervendrían factores como peso, edad, dieta, nivel de hormonas, etc. lo cual es difícil controlar "in vivo;" d) reproducibilidad; se ha observado que hay una excelente reproducibilidad en los datos ya que es posible obtener diferentes muestras de un sólo lote homogéneo facilitando a su vez el estudio de las diferencias del testigo y la muestra problema.

Aunque el cultivo primario de hepatocitos es un buen modelo para estudiar los pasos involucrados en la iniciación de la carcinogénesis química "in vitro," a diferencia de los modelos "in vivo" en donde se cuantifica la aparición de nódulos hiperplásicos y las alteraciones enzimáticas que presenta, en este sistema no se ha caracterizado este fenómeno. En la literatura existen varios estudios de transformación de células epiteliales de hígado de rata en cultivo por carcinógenos químicos (Montesano y col. 1977; Warren y col. 1978), pero todos estos sistemas presentan las siguientes limitaciones: **Primera**: la transformación tiene lugar en un tiempo mucho más largo que el requerido por los fibroblastos. En algunos casos cuando las células se mantienen por más de 40 semanas en cultivo ocurre transformación espontánea y el tratamiento químico únicamente reduce el tiempo requerido. **Segunda**: la transformación involucra exposiciones repetidas o continuas del carcinógeno. **Tercera**: los tumores al inocular las células transformadas

en animales singénicos, se presentan de áreas mesenquimales y epiteliales aunque los cultivos originales parezcan consistir únicamente de células epiteliales. *Cuarta*: existen algunos criterios objetivos y reproducibles para transformación de células epiteliales en cultivo, como cambios citológicos, incremento en la basofilia citoplásmica y en relación núcleo-citoplasma; incremento en la captación de glucosa; crecimiento en agar blando y γ -glutamyl-transpeptidasa positiva. A la fecha no existe un sistema cuantitativo simple para la transformación "in vitro" de células epiteliales.

CAMBIOS PROGRESIVOS QUE SUFRE UNA CELULA NORMAL A UNA CELULA NEOPLASICA IN VITRO.

Los cambios que sufre una célula normal a una célula neoplásica "in vitro" están basados en un número grande de pruebas experimentales (Barret y col. 1984). De esta manera se ha podido demostrar que para que una célula normal progrese a una célula neoplásica se requieren cuando menos dos etapas cualitativamente diferentes.

ESTADO PRENEOPLASICO

- 1) Puede ser inducido por virus o por sustancias químicas.
- 2) Puede ser inducido por sustancias químicas con dosis pequeñas no tóxicas, con una curva lineal dosis/respuesta.
- 3) La frecuencia de cambios preneoplásicos tanto en fibroblastos como con células epiteliales es alta.
- 4) La inducción del estado preneoplásico por la acción de sustancias químicas, puede ocurrir en ausencia de una mutación genética detectable. Concomitante en la misma célula, por sustancias químicas que producen mutaciones cromosómicas.
- 5) Los resultados con células humanas no son claros. Un cambio medido como la capacidad de crecer en agar blando después

del tratamiento con un carcinógeno, puede ser un cambio preneoplásico, pero no es concluyente.

- 6) Una alteración en la habilidad de responder a la diferenciación inducida es la base de una alteración preneoplásica en células epidérmicas de ratón.
- 7) Células epidérmicas traqueales de rata son inducidas a crecer por el tratamiento con carcinógenos por una dosis/respuesta, y una alta frecuencia, similar a los resultados con fibroblastos.

ESTADO NEOPLASICO

En el presente la transformación neoplásica de células epiteliales por acción de sustancias químicas es muy limitado. La mayor parte de los estudios de transformación neoplásica se derivan de fibroblastos. Los fenotipos que son usados para detectar transformación después del tratamiento con carcinógenos son:

- 1) Colonias individuales de células alteradas, sobre una superficie de plástico.
- 2) Colonias discretas en medio semisólido.
- 3) Focos de células alteradas, sobre una capa confluyente de células.

Con base en la información obtenida Barret y col (1981), proponen la hipótesis, en donde la primera etapa o preneoplásica ocurre con una alta probabilidad, mientras que la segunda etapa o neoplásica hay una transformación espontánea al azar de células activadas, que se manifiesta por su crecimiento. De tal manera que se define a la transformación celular "in vitro", como la inducción de alteraciones fenotípicas en las células en cultivo. Y por último cabe mencionar que hay dos puntos esenciales que pueden

ser enfatizados en el proceso de multiestados en carcinogénesis con respecto a los estudios de transformación "in vitro".

Primero es importante en los sistemas de transformación celular, considerar si uno está estudiando la transformación celular de una célula normal a una preneoplásica o si está considerando una célula preneoplásica a una neoplásica.

Segundo, los mecanismos de transformación de un estado a otro, pueden variar dependiendo del punto de partida de las células. Así los mecanismos de transformación pueden ser diferentes de una célula normal a una preneoplásica y de una preneoplásica a una neoplásica.

MEDIO DE CULTIVO EN AGAR BLANDO

El crecimiento de células en agar blando como una prueba de transformación celular, se describió en 1964 por Macpherson y Montagnier, el principio de esta prueba está basado en la independencia de anclaje que presentan las células transformadas, es decir, su capacidad para proliferar en suspensión o en geles semisólidos. Una manera de explicar el uso de geles semisólidos está basado en las propiedades que exhiben ciertas células neoplásicas en crecer en medios en suspensión y sustituir la agitación mecánica que de alguna manera deteriora a la célula, por una malla que las contenga. El método de suspensión de células sin agitación mecánica puede ser el uso de una matriz semisólida que en este caso es el agar blando (Tucker y col. 1977). Como se mencionó anteriormente algunas células neoplásicas pueden crecer en suspensión adoptando una forma redonda o esférica (Sandord y col. 1970). Sin embargo, el por qué crecen y que mecanismos regulan su crecimiento, es sin duda un problema interesante. De los mecanismos que controlan el crecimiento celular podemos mencionar: factores de crecimiento en el suero, nucleótidos

cíclicos celulares, gradientes de oxígeno, y en muchas instancias la geometría de una célula individual o la configuración geométrica de una población celular, ejercen gran influencia sobre el crecimiento y diferenciación celular.

De los estudios "in vitro," que se han llevado a cabo para observar el efecto que tiene la geometría de la célula, en el crecimiento celular, la mayoría procede de fibroblastos de ratón.

Se ha observado que la forma redonda que adoptan las células en un medio en suspensión, en donde las células normales no crecen, mientras que las transformadas sí lo hacen, se debe principalmente a:

- 1) Las células transformadas no dependen de anclaje para poder crecer (Macpherson y Montagnier, 1964; Neuguth y Weinstein, 1979; Maraudas, 1972).
- 2) Los componentes de membrana plasmática en células transformadas (microvellosidades y vejigas), se ven aumentados (Allen e Iepe, 1976).
- 3) Eficiencia incrementada de los mecanismos de transporte de membrana (Holley, 1972).
- 4) Los cables de actina están ausentes en la mayoría de células transformadas (Pollack y Rifkin, 1975).
- 5) Independencia de un componente liso, que influya en la diferenciación celular (Paranipe y col. 1975).
- 6) Mayor tensión superficial, en células de forma esférica, distribuida en toda la membrana plasmática, que en aquellas de forma comprimida y extendida (Folkman y Greenspan, 1975).

Mientras que las células transformadas escapan a la restricción impuesta por la geometría de las células normales en suspensión, las células transformadas igual crecen en forma comprimida (crecimiento en monocapa), que en forma esférica (crecimiento en suspensión). Sin embargo, este crecimiento no es indefinido, las colonias están sujetas a un control de crecimiento dado por la geometría que adoptan, a este control de crecimiento, se le llama control de crecimiento de poblaciones celulares (Folkman y Greenspan, 1975). Dependiendo de la configuración geométrica que adopte la colonia se ha podido clasificar en dos tipos: a) crecimiento en dos dimensiones y b) crecimiento tri-dimensional.

- a) El crecimiento en dos dimensiones no es autoregulado y la colonia muestra un apilamiento de células con crecimiento ilimitado.
- b) Se ha propuesto el esquema general para el crecimiento en tres dimensiones, en presencia de espacio y nutrientes disponibles, siendo este autoregulado:
 - 1) Fase lineal de crecimiento, con una aparente necrosis central.
 - 2) Fase lineal de crecimiento, con una necrosis central.
 - 3) Fase durmiente, que comienza cuando la colonia deja de crecer (se establece un equilibrio entre el número de mitosis y células muertas).

Del esquema anteriormente propuesto se sacó en conclusión que el tamaño de la colonia está en función de la eficiencia de la colonia en mantener en equilibrio la fase durmiente, y de la capacidad de la colonia en eliminar catabolitos y absorber nutrientes (Folkman y Greenspan, 1975).

A la fecha el cultivo en agar blando parece ser el parámetro más real para medir la transformación de células, en este caso epiteliales (Tucket y col. 1977) y principalmente por que ofrece la posibilidad de detectar células malignas en una población celular mixta. Además, este sistema de cultivo ha sido utilizado eficientemente como medida para predecir quimiosensibilidad "En vivo" (Courtenay, 1976; Hamburger y Salmon, 1977), y también ha sido utilizado para monitorear el efecto de drogas en tumores humanos (Kornblith y col 1981; Brouman y col 1983; Greenberg y Salmon, 1984), para el estudio de nuevos compuestos anticancerígenos (Salmon y col. 1981) y para el análisis citogenético (Trent y Salmon, 1980), interferones (Ludwin y col 1983), oxígeno (Fan y col. 1985), vitaminas (Meyskens y col. 1983) en células de origen tumoral.

γ-GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA

La γ-glutamyl transpeptidasa (GGT) es uno de los marcadores de células preneoplásicas más usados en estudios cuantitativos durante el desarrollo de cáncer de hígado. Esta enzima se asoció con carcinogénesis química en 1972 por Fiala y col. quienes descubrieron un incremento en los niveles enzimáticos, en el hígado de ratas en el último estado de hepatocarcinogénesis con 3^hMe-DAB y en hepatomas químicos transplantables. Usando una tinción histoquímica para la GGT, Kalegayi y col. (1975), encontraron que los niveles aumentados de la enzima durante la administración del carcinógeno se debió a un incremento en la actividad de la GGT en áreas focales hiperplásicas de hepatocitos, los niveles aumentados de la GGT durante hepatocarcinogénesis se encuentran también en otras especies como el ratón, después de la inducción de tumores de hígado con safrole (Lipsky y col. 1980) o con o-aminoazotolueno (Jolanko y Rouslahti (1979). En los carcinomas hepatocelulares humanos, también se encuentran niveles elevados de la GGT (Sawabu, y col. 1978). En estudios realizados en cultivos de células epiteliales hepáticas, relacionados con transformación maligna, la

actividad de la GGT determinada citoquímicamente, se detectó en 3 de 5 líneas celulares tumorales, pero en ninguna de las líneas celulares epiteliales no tumorales. Estos resultados sugieren que la tinción histoquímica de la GGT, puede ser útil en la determinación de la transformación maligna de células epiteliales hepáticas en cultivo.

DIMETIL NITROSAMINA

La dimetilnitrosamina (DMN) es un cancerígeno hepático (Magee y Barnes, 1956) que tiene gran importancia como cancerígeno ambiental ya que puede producirse "in situ," en el tracto digestivo humano al reaccionar las aminas alifáticas secundarias con el nitrito de sodio, componente que se encuentra en un gran número de alimentos (Heidelberg, 1975). La DMN y algunas nitrosaminas superiores así como sus precursores, están presentes en muchos alimentos procesados, en el tabaco y en el humo de éste, en sustancias químicas de uso agrícola, en cosméticos, en el aire de las ciudades y en el agua potable (Lai y col. 1979).

Su efecto hepatotóxico fue dado por Magee y Vandekar (1958), estudiando el efecto de la DMN, de un hígado dañado. En la actualidad se ha probado en varios sistemas de transformación y se ha podido observar su efecto carcinógeno "in vivo." (Pienta, 1977b).

OBJETIVO

Como se ha descrito uno de los problemas que existen en el estudio de la transformación neoplásica "in vitro", es la carencia de alteraciones fenotípicas constantes, que nos puedan servir como marcadores medibles de malignidad, tal es el caso del cultivo primario de hepatocitos utilizado como sistema de transformación por substancias químicas carcinogénicas. Por medio de estudios comparativos entre los cultivos de hepatocitos de rata intacta y de rata parcialmente hepatectomizada, se ha caracterizado ampliamente este sistema en cuanto a los pasos involucrados en la iniciación de la carcinogénesis química.

Como parte del objetivo general del laboratorio en "Desarrollar un Sistema *in vitro*" para el estudio de la secuencia de cambios moleculares durante la transformación neoplásica. Nuestro objetivo particular en este trabajo, fue determinar si la "iniciación" como estado temprano de transformación por substancias carcinogénicas, podía ser detectado por medio del crecimiento en agar blando y de la γ -glutamil transpeptidasa como marcador enzimático de células preneoplásicas. Para cumplir con este objetivo se planteo el siguiente esquema general de trabajo:

- 1) Establecer las condiciones óptimas de crecimiento en agar blando utilizando como control positivo la línea de células leucémicas de ratón L5178-Y.
- 2) Encontrar el tiempo de tratamiento con la DMN, de los hepatocitos de rata intacta y parcialmente hepatectomizada, en cultivo primario.
- 3) Establecer las condiciones óptimas para la transferencia de los hepatocitos en cultivo primario en ambas condiciones, al cultivo en agar blando.

- 4) *Aislar hepatocitos de nódulos heperplásicos hepáticos de rata, después de un tratamiento "in vivo" con DMN y fenobarbital, para su cultivo en agar blando.*

- 5) *Analizar en cada uno de los cultivos anteriores en agar blando, su evolución y morfología durante 14 días de cultivo y tinción histoquímica con la γ -glutamyl-transpeptidasa a los 7 y 14 días.*

M E T O D O S

- a) MEM (Medio Mínimo Esencial de Eagle).
 1) Solución salina balanceada (SSB) de Eagle.

a) NaCl	6.80 g	116.0 (mM)
KCl	.40	5.4
Na ₂ HPO ₄	.14	1.1
Agua bidestilada hasta 800 ml		
b) CaCl ₂	1.00	1.8
Agua bidestilada hasta 1000 ml		
c) MgSO ₄ · 7H ₂ O		1.0
Agua bidestilada hasta 100 ml		

Se ajustó el pH a 7.2; porciones de 64 ml de la solución a se colocaron en botellas, y todas las soluciones se esterilizaron en autoclave (15 mn. a 20 lb escape lento) por separado. Se añadieron asépticamente a cada botella con solución a (temperatura ambiente), 8 ml de b y 8 ml de c inmediatamente antes de añadir el resto de los componentes del medio.

- 2) Solución de aminoácidos esenciales (100 X)

L-arginina-HCl	1.27 g	0.6 (mM)
L-histidina HCl·H ₂ O	0.38	0.2
L-leucina	0.52	0.4
L-isoleucina	0.52	0.4
L-metionina	0.15	0.1
L-fenilalanina	0.32	0.2
L-treonina	0.48	0.4
L-triptofano	0.10	0.05
L-valina	0.46	0.4

Se disolvieron los componentes en 100 ml de SSB calentando a 80°C. La solución se esterilizó por filtración y se almacenó (10 ml por tubo) a 0-5°C en tubos Pyrex (16x24 mm) con tapón de rosca.

3) Solución de aminoácidos poco solubles (100 X).

L-tirosina	0.36 g	0.2
L-cisteína-CHL.H ₂ O	0.35	0.1

Se disolvieron el 100 ml de HCl 0.1 N con calentamiento ligero. La solución se esterilizó por filtración y se almacenó a -0.5°C, 10 ml, por tubo.

4) Solución de vitaminas (1000 X).

Cloruro de colina	0.10 g	0.007 (mM)
Nicotinamida	0.10	0.008
Pantotenato de calcio	0.10	0.004
Piridoxal-HCl	0.10	0.005
Tiamina-CHL	0.10	0.003
Riboflavina	0.01	0.0003
l-inositol	0.20	0.011

Se disolvieron todos los componentes en 100 ml de SSB por calentamiento a 50°C. La solución se esterilizó por filtración y se almacenó a 0-5°C en tubos protegidos de la luz con papel aluminio 10 ml por tubo.

5) Solución de ácido fólico (100 X).

ácido fólico	0.01 g	0.002 (mM)
--------------	--------	------------

Se disolvió en 100 ml de SSB mediante la adición de 1 a 2

gotas de Na OH 0.5 N, hasta pH neutro. La solución se esterilizó por filtración y se almacenó a 0-5°C en tubos cubiertos con papel aluminio (10 ml por tubo).

6) Solución de glucosa (100 X)

D-glucosa	20.00 g	11.1 (mM)
-----------	---------	-----------

Se disolvió en 100 ml de SSB. La solución se esterilizó por filtración y se almacenó a 0-5°C en tubos (10 ml por tubo).

7) Solución de bicarbonato de Sodio (3 X).

.NaHCO ₃	2.80 g	23.8
---------------------	--------	------

Rojo fenol al 1% .15 ml

Agua bidestilada, hasta 100 ml

8) Solución de antibióticos (100 X)

Penicilina G sódica 200,000 U.I

sulfato de estreptomicina 0.50 g

Agua bidestilada hasta 100 ml se almaceno a -20°C

9) Solución de L-glutamina (100 X)

L-glutamina	2.29 g	2.0 (mM)
-------------	--------	----------

Se disolvió en 100 ml de SSB.

10) Solución de aminoácidos no esenciales (100 X).

L-alanina	0.089 g	0.1 (mM)
-----------	---------	----------

L-aspargina.H ₂ O	0.150	0.1
------------------------------	-------	-----

ácido L-aspártico	0.133	0.1
-------------------	-------	-----

ácido L-glutámico	0.147	0.1
L-prolina	0.115	0.1
L-serina	0.105	0.1
glicina	0.075	01

Se disolvieron todos los componentes en 100 ml de agua bidestilada.

11) Suero de ternera neonata.

Se descongeló en un baño a 73°C y se calentó en un baño a 56°C durante 30 min. con agitación suave cada 5 min. Se transfirió asépticamente a tubos recién esterilizados (7 ml por tubo) y se incubó a 37°C durante una semana para prueba de esterilidad, se almacenaron a -20°C.

PREPARACION PARA LA MEZCLA PARA BOTELLAS CON 93 ml DE MEM.

A los 80 ml de la solución 1, se les añade 1 ml. de la solución 2 1 ml. de la solución 3, .1 ml. de la solución 4, 1 ml. de la solución 5, 1 ml. de la solución 6, 7.15 ml. de la solución 7, 1 ml. de la solución 8, ml. de la solución 9 y 1 ml. de la solución 10.

La mezcla se esterilizó por filtración, en botellas de rosca permanentemente esterilizadas. Las botellas se incubaron a 37°C durante 5 días como prueba de esterilidad y se almacenaron a 4°C.

PREPARACION DEL MEM COMPLETO

A cada una de las botellas con MEM se les añadió inmediatamente antes de utilizarlos 10 ml. de suero de bobino neonato y 15U de insulina.

b) PREPARACION DEL TD SALINO

TD salino 10 X:	NaCl	80.00 g
	KCl	37.55
	Na ₂ HPO ₄	1.0
	Trizma base	30.00
	Rojo fenol 1%	10 ml

Se disolvieron todos los componentes en un matraz de un litro en 800 ml. de agua bidestilada. Se repartió en botellas con tapón de rosca (100 ml. por botella) que se esterilizaron en el autoclave (15 min. a 15 lb y escape lento) y se guardaron a temperatura ambiente.

TD Saslino 1 X:

Se diluyó el contenido de una botella de TD 10 X en 800 ml de agua bidestilada. La solución se ajustó a pH 7.4-7.5 con Na OH N. a 37°C. Se aforo a un litro con agua bidestilada y se almacenó y se esterilizó como se indica para el TD salino 10 X.

Las concentraciones finales fueron:

NaCl	137 (mM)
KCl	50
Na ₂ HPO ₄	0.4
trizma base	25
rojo fenol	.001%

c) PREPARACION DE COLORANTES

1) Azul de tirpano al 5% (p/v). Cinco gramos del colorante se disolvieron en 100 ml de una solución isotónica (NaCl 0.9%,

p/v y pH neutro). La solución se filtro con papel Whatman No.1 y se guardo en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

2) Rojo fenol al 1% (p/v). Un gramo del colorante se disolvió en 100 ml de HCl 0.06 N. La solución se guardo congelada a -20°C .

d) PREPARACION DE LAS ENZIMAS

1) Solución de tripsina al 0.1%:

NaCl	8.0 g
KCl	0.2
Na_2HPO_4	1.15
KH_2PO_4	0.2
glucosa	1.0
tripsina	1.0
estreptomicina	0.1
rojo fenol al 1%	1.5 ml
penicilina	400,000 U.I.

Se ajustó a un pH de 7.35 y se aforo a un litro con agua bidestilada. Se almacenó a -20°C en tubos de rosca con 10 ml cada tubo.

2) Solución de tripsina al 0.05%: Se diluyó la solución de tripsina al 0.1% con TD salino 1 X a 37°C en una relación 1:1

3) Solución de colagenasa: Se preparó inmediatamente antes de utilizarla, disolviendo la cantidad de enzima necesaria para tener 100 U/ml. de TD salino 1X estéril a 37°C en un volumen final de 70 ml.

e) HEPATECTOMIA PARCIAL

La hepatectomía se realizó eliminando los lóbulos medio e izquierdo mediante cirugía.. Según método descrito por Higgins y Anderson (1931) 24 hrs antes del aislamiento de hepatocitos y ayuno por 16 hrs.

f) CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS

Aislamiento de los hepatocitos: El aislamiento de los hepatocitos tanto de rata intacta como de rata parcialmente hepatectomizada se baso en el método descrito por Berry y Friend (1969), modificado por Mendoza y Figueroa (1978), los animales con 18-20 hrs de ayuno, se anesteciaron con éter etílico. Se realizó la hepatectomía en condiciones asépticas, se desplazaron los intestinos hacia la derecha del animal para dejar al descubierto la vena porta, que se canuló con una aguja calibre 18 conectada a una bomba peristáltica. La perfusión se inició pasando la solución TD salina 1 X a 37°C durante dos minutos a una velocidad de 15 ml/min. Al inicio de la perfusión se corto la vena cava inferior a la altura de los riñones para eliminar la sangre del hígado, posteriormente se pasaron 70 ml de la solución de colagenasa con un flujo de 9 ml/min. Al término de la perfusión se escindió el hígado y se colocó en una caja de petri. En condiciones de esterilidad se añadieron 4.50 ml de medio MEM completo. Se hizo una dilución 1:10 de esta suspensión con TD salino 1 X, para determinar el número de células/ml en un hematocitómetro.

g) VIABILIDAD CELULAR

Se tomaron varias muestras en el transcurso del aislamiento de hepatocitos para determinar su viabilidad, utilizando el criterio de exclusión del azul de tripano al 0.05%. En todos los experimentos la viabilidad de las células al momento de sembrar fue mayor del 85%.

h) INOCULO Y CONDICIONES DEL CULTIVO

Alicuotas de 3 ml de la suspensión celular con una concentración final de 1×10^6 cél/ml de MEM completo se incubaron en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 a 37°C . Después de 1 hora de incubación se retiró el sobrenadante con las células que no se adherieron a la caja de cultivo y se procedió al tratamiento de los hepatocitos.

i) TRATAMIENTO DE LOS HEPATOCITOS EN CULTIVO PRIMARIO

Se preparó una solución madre de DMN $1.35 \times 10^{-3} \text{M}$ en agua bidestilada 30 min antes de utilizarse y las soluciones de trabajo se obtuvieron mediante diluciones en MEM completo.

El tratamiento se realizó con una dosis de DMN a una concentración de 10^{-5}M a diferentes tiempos, después de los cuales se transfirieron al medio en agar blando.

j) RECOLECCION Y SEMBRADO EN AGAR BLANDO

Para desprender las células de las cajas de cultivo a 3, 6, 9 y 12 hrs de tratamiento, se retiró el medio de cultivo, se lavaron las cajas con TD salino 1X y se añadió 1 ml por caja de la solución de tripsina 0.05%. Después de 2 a 3 min se inactivó la acción de la tripsina por la adición de 1 ml de MEM completo y se resuspendieron las células hasta formar una suspensión homogénea. De la suspensión obtenida se midió viabilidad con azul de tripano, se contó el número de células y se hicieron diluciones para obtener 1×10^6 cel/ml.

El agar blando se preparó de acuerdo al método descrito por Macpherson y Montagnier (1964) con las siguientes modificaciones.

Para la primera capa de agar se prepararon soluciones al 3 y 5% de agarosa en agua bidestilada y se esterilizaron en autoclave. Inmediatamente después se diluyeron en una relación de 1:10 con MEM completo a una temperatura de 40°C, para evitar la formación de grumos. Se utilizaron cajas de cultivo de 30x10 mm con ambas concentraciones. En el caso de la concentración final de 0.3% se utilizó un volumen de 1.7 ml y con la de 0.5% el volumen empleado fue de 1.2 ml. Una vez gelificada la primera capa, se procedió a preparar la segunda capa en tubos de ensayo de 12x75 mm estériles, para obtener una concentración final de agarosa de 0.125%, con un inóculo de 50×10^3 cel/caja, ajustando con MEM completo a un volumen final de 1.2 ml. Se vertió este volumen sobre la primera capa se incubaron las cajas a 37°C en atmósfera húmeda de CO₂ al 5% durante 15 días.

k) AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS TUMORALES

El aislamiento de los hepatocitos provenientes de rata la cual fue tratada in vivo de acuerdo al esquema de Iniciación-Promoción descrito por Pitot y col. (1978), con una dosis de carcinógeno iniciador y fenobarbital en la dieta durante 8 meses, se realizó después de poner en ayuno al animal de 18-20 hrs antes de la perfusión. Se anestesió a la rata bajo éter etílico y se canuló la vena porta con una aguja de calibre 20, conectada a una bomba peristáltica. La perfusión se realizó como se describió anteriormente, pero aumentando el volumen y concentración de la solución de colagenasa, siendo 150 ml a 200 U/ml.

Al término de la perfusión se resectaron los nódulos que aparecían en el relieve del hígado y se transfirieron a un vaso de precipitado que contenía una solución de tripsina al 0.1% y mediante agitación magnética se obtuvo una suspensión de hepatocitos a los que llamamos hepatocitos tumorales. Del resto del hígado se desprendieron los hepatocitos mediante agitación mecánica y se obtuvo otra suspensión de hepatocitos a los que llamamos

hepatocitos periféricos. Ambos tipos de células se sembraron en el agar blando como se describió anteriormente.

1) AISLAMIENTO DE LAS CELULAS LEUCEMICAS L5178Y

Las células leucémicas de ratón, L5178Y, mantenidas en tumor ascítico de ratón BALB/c, se extraen de la siguiente manera: se sujeta al ratón y se coloca en posición ventral para limpiar asepticamente con etanol al 1%. Se punsiona la cavidad abdominal con una jeringa hipodérmica para extraer las células. Después de quitar la aguja, se coloca en un tubo de ensaye estéril y se lavan con solución salina mediante centrifugación a 1000 rpm, 5 min. Se retira el sobrenadante y la pastilla celular se resuspenden en MEM completo ajustando a una concentración de 1×10^6 cel/ml. Se mide viabilidad mediante el azul de tripano y se siembran en el agar blando, como se describe anteriormente con un inóculo de 50×10^3 cel/caja.

m) TINCION HISTOQUIMICA DE LA GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA (GGT).

La tinción histoquímica de la GGT, se realizo de acuerdo al método descrito por Rutenburg y col. (1969), utilizando γ -glutamyl-4-metoxi-2-naftilamida como substrato y glicil-glicina como acceptor, con las siguientes modificaciones, para las preparaciones en agar blando.

Se disolvieron 2.5 mg de γ -glutamyl-4-metoxi-2-naftilamida en 0.05 ml de DMSO (dimetil-sulfoxido). Se añadieron 0.05 ml de NaOH 1N; 5 ml de tris-HCl 0.1 M, pH 7.4 a 37°C; 14 ml de la solución salina al 0.85%, 10 mg de glicil-glicina y 10 mg de la sal diazónica se filtró el medio inmediatamente. La incubación deberá empezar tan pronto como sea posible porque la adición de este compuesto produce turbidez en el medio en muy corto tiempo. Obteniéndose una coloración rojo en el sitio de la actividad

enzimática. Se suprimió el uso del sulfato cérico, que queda al compuesto azo resultante, haciendolo insoluble, pues precipita a las proteínas del suero presentes en el medio de cultivo.

RESULTADOS

CONDICIONES DEL CULTIVO EN AGAR BLANDO DE LAS CELULAS LEUCEMICAS (L5178Y).

Para caracterizar el cultivo de las células leucémicas (L5178Y) en agar blando tomando como base el método descrito por MacPherson y Montagnier, (1964), se experimentó con el volumen y con la concentración de las capas de agar, todo esto en cajas de cultivo de 35 mm de diámetro. Adicionalmente, se ensayaron diferentes cantidades de células en los inóculos, se probaron diferentes sueros y por último se determinó histoquímicamente la γ -glutamyl-transpeptidasa (GGT).

La capa inferior del medio de cultivo, se definió después de probar volúmenes de 1.7 y 1.2 ml y concentraciones de agarosa de 0.5% y 0.3% respectivamente. En cuanto a estas condiciones no hubo diferencia en cuanto al crecimiento de las células L5178Y. Para la capa superior los volúmenes probados fueron de 0.51 ml y 1.2 ml. Con el primero, se observó crecimiento limitado en el desarrollo celular, pero con 1.2 ml el volumen fue adecuado para la formación de colonias. También se probaron concentraciones de agarosa de 0.3%; 0.25%; 0.20% y 0.15%. La tabla I, muestra que para las concentraciones de 0.3% y 0.25% no se observaron diferencias ya que la formación de mancuernas de células por campo sólo fue de 2 a las 24 hrs de cultivo. Con 0.20% de agarosa la presencia de mancuernas por campo fue de 5 y los mejores resultados se obtuvieron en la concentración de 0.15%, con esta última, la presencia de mancuernas por campo al primer día de cultivo fue de 8.

En relación al número de células en los inóculos, se probaron concentraciones celulares de 25×10^3 y 50×10^3 , el segundo inóculo fue el mejor, ya que las colonias de células se desarrollaron en

mayor proporción y a los 7 días de cultivo alcanzaban un diámetro de aproximadamente 1 mm (Figura 1).

Con el fin de seleccionar el suero más apropiado para el crecimiento de las colonias, se utilizaron: suero fetal de bovino, suero de caballo y suero neonato de bovino. Con los dos primeros sólo hubo presencia de mancuernas al segunda día de sembrados y muerte celular en los días posteriores; los resultados con estos dos sueros fueron negativos. El suero neonato de bovino fue el único que promovió el crecimiento y desarrollo de las colonias.

Con base en estos resultados, establecimos las siguientes condiciones de volumen final y concentración de agarosa: para la capa inferior se utilizaron las dos condiciones mencionadas anteriormente de 1.7 ml con 0.5% de agarosa y 1.2 ml con 0.3% de agarosa. Para la capa superior se estableció un volumen de 1.2 ml con una concentración de agarosa de 0.15%. El inóculo seleccionado fue de 50×10^3 células por caja y el suero utilizado fue el de neonato de bovino.

2) TRATAMIENTO DE LOS HEPATOCITOS EN CULTIVO PRIMARIO.

Con el fin de establecer el tiempo de tratamiento con el carcinógeno iniciador, de los hepatocitos en cultivo primario, para su posterior transferencia al agar blando, se ensayaron períodos de tratamiento a 3, 6, 9 y 12 hrs. utilizando una dosis de DMN de 1×10^{-5} M. Es importante señalar que los hepatocitos para ser transferidos al agar blando, necesitan ser desprendidos de las cajas de cultivo, utilizando para esto tripsina, por lo que fue necesario determinar el efecto de dicha enzima sobre los hepatocitos, en cada uno de los tiempos analizados.

Los primeros experimentos mostraron que los hepatocitos a las 12 hrs de cultivo disminuyeron considerablemente su viabilidad

después del tratamiento con la tripsina a valores menores del 50%, por lo que se optó por eliminar dicho tiempo de cultivo.

Los resultados obtenidos del cultivo de hepatocitos de rata intacta (HRI), (Tabla II), mostraron una disminución en la viabilidad conforme transcurre el tiempo de cultivo, la cual no es debida al tratamiento de la DMN puesto que los valores de los cultivos tratados son iguales a los controles, en los tres tiempos analizados. Dicha disminución fue más marcada en los hepatocitos tripsinizados, obteniendo valores alrededor del 51% a los 9 hrs de cultivo los cuales son estadísticamente significativos con respecto a los controles correspondientes sin tripsina.

Los resultados obtenidos del cultivo de hepatocitos provenientes de rata parcialmente hepatectomizada (HRP), (Tabla III), mostraron que la DMN no afecta la viabilidad de los hepatocitos en ninguno de los tiempos analizados, con respecto a sus testigos correspondientes. Al analizar el efecto de la tripsina, los datos no son estadísticamente significativos, por la gran variación de viabilidad obtenida en los hepatocitos tripsinizados; no obstante después de las 9 hrs de tratamiento se observó una disminución en la viabilidad a valores del 65-70%.

Con base en estos resultados, se decidió trabajar únicamente con los tratamientos de 3 y 6 hrs en cultivo primario tanto en HRI como de HRP para su transferencia al agar blando.

3) CONDICIONES DEL CULTIVO EN AGAR BLANDO DE LOS HEPATOCITOS

Se utilizaron las concentraciones y volúmenes que se establecieron para el cultivo de células L5178Y. Después de ensayar, se varió la concentración de la capa de agar superior ya que, los hepatocitos se veían poco birrefringentes al tercer día de cultivo, se encontró que a la concentración mínima a la que gelifica el

agar, era la mejor condición para el cultivo. En estas condiciones con las células leucémicas se desarrollaron un buen número de colonias positivas a la GGT a los 7 y 14 días de cultivo.

Debido al tiempo que transcurre entre la tripsinización de los hepatocitos provenientes del cultivo primario y la manipulación de los mismos, hasta el momento de ser sembrados en el agar blando la viabilidad podría verse afectada. Con tal propósito se midió la viabilidad de los hepatocitos de la suspensión celular de la cual fueron tomadas las alicuotas.

Los resultados de los hepatocitos de rata intacta (HRI) después de ser transferidos al agar blando (Tabla 7) mostraron viabilidades similares a las obtenidas inmediatamente después de tripsinizarlos (Tabla II) después de las 3 hrs de cultivo, tanto en los controles como en los tratados; a las 6 hrs de cultivo se observó una disminución en la viabilidad de 91.2 ± 1.9 a 84.7 ± 2.9 en los cultivos controles y de 93.6 ± 0.46 a 83.9 ± 3.5 en los tratados pero esta disminución no fue estadísticamente significativa. En el caso de los hepatocitos provenientes de rata parcialmente hepatectomizada (HRP) después de transferidos al agar blando (Tabla IV), hubo una disminución en la viabilidad tanto en los cultivos controles como en los tratados a las 3 y 6 hrs comparados con los valores obtenidos inmediatamente después de tripsinizar (Tabla III), pero dicha disminución no fue estadísticamente significativa en ninguno de los casos.

Al seguir la cinética de viabilidad de los hepatocitos conforme transcurre el tiempo de cultivo en agar blando, los resultados de los HRI (Tabla VI) mostraron una disminución paulatina hasta los 4 días de cultivo, tiempo en el cual los hepatocitos tanto controles como tratados, transferidos al agar blando, después de 3 y 6 hrs de cultivo primario, presentaron una viabilidad del 20 y 10% respectivamente.

En el caso de los HRP (Tabla VII) partiendo de viabilidades al tiempo de transferirlos al agar blando (tiempo 0), del 85%, la disminución en la viabilidad alcanzo valores a los 4 días de alrededor del 15%, tanto en los provenientes de 3 hrs. como en los de 6 hrs. de cultivo primario.

Al seguir las características morfológicas de los hepatocitos (Figura 2) desde el momento de ser transferidos al agar blando, observamos durante las primeras 24 hrs. en ambos tipos de cultivo, HRI y HRP, la presencia de células de 4 a 5 veces más grandes que los hepatocitos, a las que llamamos "células grandes". Dichas células no presentaron siempre las mismas características, en ocasiones su apariencia fue segmentada (Figura 3) y en otras ocasiones mostraron un relieve topográfico arrugado (Figura 4). Su tamaño fue variable y menos birrefringentes que los hepatocitos. Algunas veces al cuarto día de cultivo se observó la presencia de células más pequeñas asociadas a las células grandes.

A pesar de que la viabilidad de los HRI y los HRP a los 4 días de cultivo en el agar blando disminuyó considerablemente, a partir de este día la aparición de otro tipo de células, de tamaño más pequeño que los hepatocitos a las que llamamos "células pequeñas" las cuales presentaron capacidad para proliferar en estas condiciones, encontrándose de manera aislada o asociadas a las células grandes, decidiendo seguir los cultivos hasta los 7 y 14 días. Al realizar la tinción histoquímica de la GGR en dichos cultivos, a los 7 días las colonias aisladas de 6 a 8 células pequeñas fueron negativas a la enzima. A los 12 días de cultivo se formaron colonias de más de 12 células, que fueron negativas a la GGT (Figura 5). Cuando las células pequeñas se encontraban formando colonias de más de 30 células asociadas a las células grandes, presentaron una tinción positiva a la GGT (Figura 6).

Los resultados del aislamiento de las células tumorales median-

te las dos condiciones ensayadas, la digestión con agitación mecánica utilizando una solución de colagenasa o una solución de tripsina, no fueron satisfactorias ya que a pesar de que con la tripsina se obtuvo un mayor rendimiento de las células de los nódulos no fue suficiente y la viabilidad fue de un 50%. En estas condiciones, el cultivo en agar blando tanto de los hepatocitos tumorales, como de los hepatocitos periféricos obtenidos como se describió en métodos fue negativo en cuanto al crecimiento en agar blando de hepatocitos transformados y por consiguiente a la tinción positiva del marcador enzimático de células preneoplásicas utilizado.

TABLA 1. DIFERENTES CONCENTRACIONES DE AGAROSA PARA LA CAPA SUPERIOR DEL CULTIVO EN AGAR BLANDO DE CELULAS LEUCEMICAS^a.

AGAROSA CONCENTRACION (%)	NUMERO DE MANCUERNAS/CAMPO ^b
0.15	8
0.20	5
0.25	2
0.30	2

^aCélulas leucemicas de ratón, L5178Y, mantenidas en tumor ascítico.

^bLa cuantificación se realizó a las 24 hrs., de cultivo y los valores representan el promedio de dos cultivos.

TABLA II. TIEMPO DE TRATAMIENTO CON DMN EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS DE RATA INTACTA.

TIEMPO DE CULTIVO (HR)	% DE VIABILIDAD			
	SIN TRIPSINA		CON TRIPSINA	
	CONTROL	TRATADO	CONTROL	TRATADO ^a
3	95.0 ± 0.8	94.0 ± 1.5	92.3 ± 6.0	94.6 ± 1.0
6	91.0 ± 2.2	92.7 ± 1.1	91.2 ± 1.9	93.6 ± 0.46
9	82.5 ± 1.5 ⁺⁺	84.9 ± 2.3	51.3 ± 1.7 ^{**}	51.1 ± 5.9 ^{*++}

^aLa dosis de DMN fue de $1 \times 10^{-5} M$

+ El análisis estadístico se hizo mediante una prueba de t para datos pareados, encontrándose los siguientes valores de significación: con respecto al tiempo de cultivo de 3 h.

* $p > 0.01$; ++ $p > 0.01$; + $p > 0.05$. Y al comparar tripsinizados con no tripsinizados a las 9h de cultivo los valores fueron para los controles ** $p > 0.005$ y tratados ++ $p < 0.01$.

TABLA III. TIEMPO DE TRATAMIENTO DON DMN EN CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS PROVENIENTES DE RATA PARCIALMENTE HEPATECTOMIZADA.

TIEMPO DE CULTIVO (HR)	% DE VIABILIDAD			
	SIN TRIPSINA		CON TRIPSINA	
	CONTROL	TRATADO	CONTROL	TRATADO
3	90.7 ± 0.68	89.5 ± 3.1	92.0 ± 4.1	94.6 ± 1.7
6	83.5 ± 0.87	81.1 ± 3.0	79.7 ± 4.7	83.7 ± 8.8
9	89.5 ± 3.1	81.47 ± 0.39	67.8 ± 19.1	69.5 ± 13.8

^a La dosis de DMN fue de $10^{-5}M$

- El análisis estadístico se hizo mediante una prueba de t para datos pareados no encontrándose diferencias significativas en ninguna de las condiciones de tiempos analizados.

TABLA IV. % VIABILIDAD DE LOS HEPATOCITOS PROVENIENTES DE RATA PARCIALMENTE HEPATECTOMIZADA DESPUES DE SER TRANSFERIDOS AL AGAR BLANDO.

TIEMPO DE TRATAMIENTO (HR)	% VIABILIDAD					\bar{x}
	1	2	3	4	5	
3	<i>c</i> 84.2	<i>c</i> 84.0	<i>c</i> 84.5	<i>c</i> 86.9	<i>c</i> 81.8	<i>c</i> 84.2 \pm 1.8
	<i>t</i> 86.9	<i>t</i> 80.0	<i>t</i> 82.1	<i>t</i> 84.2	<i>t</i> 82.2	<i>t</i> 83.0 \pm 2.6
6	<i>c</i> 71.9	<i>c</i> 74.0	<i>c</i> 75.1	<i>c</i> 71.9	<i>c</i> 78.2	<i>c</i> 73.0 \pm 1.4
	<i>t</i> 76.6	<i>t</i> 74.1	<i>t</i> 75.1	<i>t</i> 71.9	<i>t</i> 72.2	<i>t</i> 74.1 \pm 3.1

\bar{x} Representa el promedio de 5 experimentos realizados por separado.

c Hepatocitos sin tratamiento provenientes de cultivo primario.

t Hepatocitos provenientes de cultivo primario tratados con DMN a una concentración de 1×10^{-5} M.

TABLA V. % VIABILIDAD DE LOS HEPATOCITOS DE RATA INTACTA DESPUES DE SER TRANSFERIDOS AL AGAR BLANDO.

TIEMPO DE CULTIVO (HR)	% VIABILIDAD			\bar{x}
	1	2	3	
3	^c 98.53	^c 88.95	^c 90.5	^c 92.9 ± 4.8
	^t 95.76	^t 89.94	^t 89.5	^t 91.7 ± 3.4
6	^c 88.0	^c 84.0	^c 82.2	^c 84.7 ± 2.9
	^t 87.7	^t 82.0	^t 81.8	^t 83.9 ± 3.5

\bar{x} Representa el promedio de 3 experimentos realizados por separado.

^c Hepatocitos sin tratamiento provenientes de cultivo primario.

^t Hepatocitos provenientes de cultivo primario tratados con DMN a una concentración de $1 \times 10^{-5} M$.

TABLA VI. VIABILIDAD DEL CULTIVO DE HEPATOCITOS DE RATA INTACTA EN AGAR BLANDO.

TIEMPO DE CULTIVO (DIAS)	% DE VIABILIDAD ^a			
	DMN 3 HRS		DMN 6 HRS	
	CONTROL	TRATADO	CONTROL	TRATADO
0	95.5	95.7	94.1	89.0
1	78.4	83.3	84.0	75.5
2	61.5	60.6	53.1	54.2
3	52.1	55.1	39.0	39.0
4	20.0	19.0	10.0	10.0

^a La cuantificación se realizó diariamente, y los valores representan el promedio de dos cultivos.

TABLA VII. VIABILIDAD DEL CULTIVO DE HEPATOCITOS DE RATA PARCIAL-
 MENTE HEPATECTOMIZADA EN AGAR BLANDO.

TIEMPO DE CUTIVO (DIAS)	% DE VIABILIDAD ^a			
	DMN 3 HRS		DMN 6 HRS	
	CONTROL	TRATADO	CONTROL	TRATADO
0	89.2	87.9	84.0	82.0
1	73.1	72.2	71.0	70.0
2	60.2	54.0	61.0	59.1
3	46.0	45.0	42.0	40.2
4	15.0	14.0	18.0	12.0

^a La cuantificación se realizó diariamente, y los valores representan el promedio de dos cultivos.



FIGURA 1

Colonia de células leucémicas (L5178Y), después de 12 días de cultivo en agar blando. Tomada con microscopio invertido de luz con una resolución de 40X.

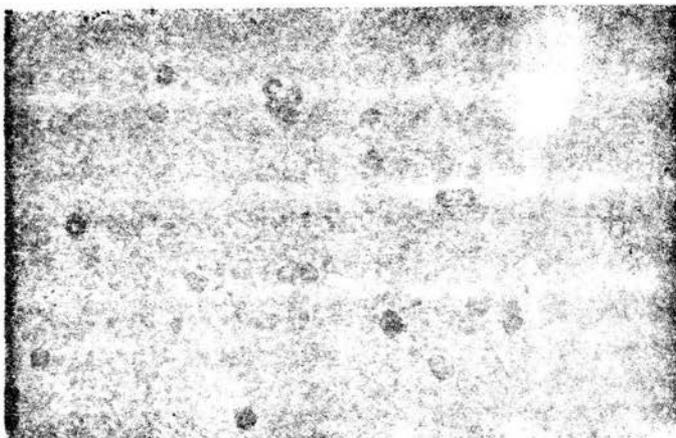


FIGURA 2

Cultivo de hepatocitos de rata intacta (HRI), a los 4 días de cultivo en agar blando. Tomada con microscopio de luz invertida, con objetivo 16X.

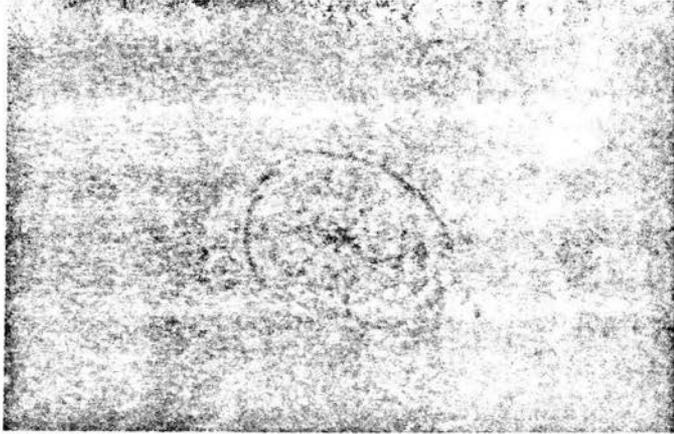


FIGURA 3

Cultivo de hepatocitos provenientes de rata parcialmente hepatectomizada tratados con DMN, después de 4 días de cultivo en agar blando. La fotografía muestra una célula grande segmentada. Tomada con microscopio de luz invertida con objetivo 40X.

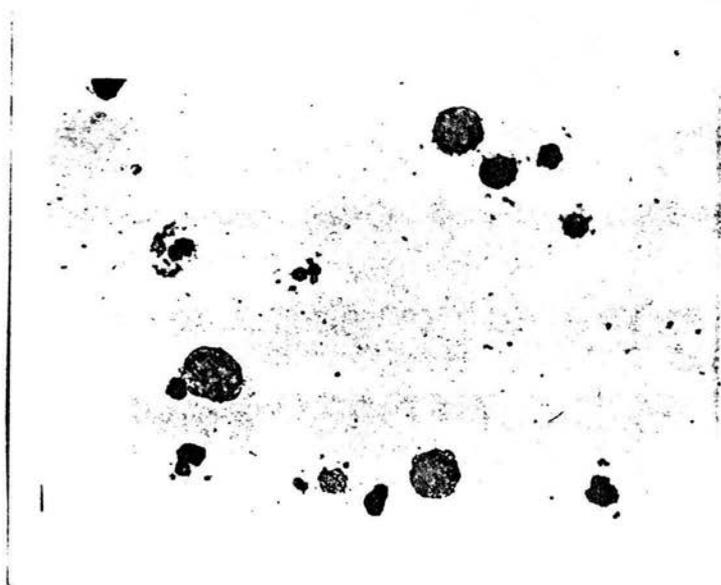


FIGURA 4

Cultivo de hepatocitos provenientes de rata parcialmente hepatectomizada, después de 4^{1/2} días de cultivo en agar blando. La fotografía muestra "células grandes" de relieve topográfico arrugado, tomadas con microscopio de luz invertida con objetivo 16x.

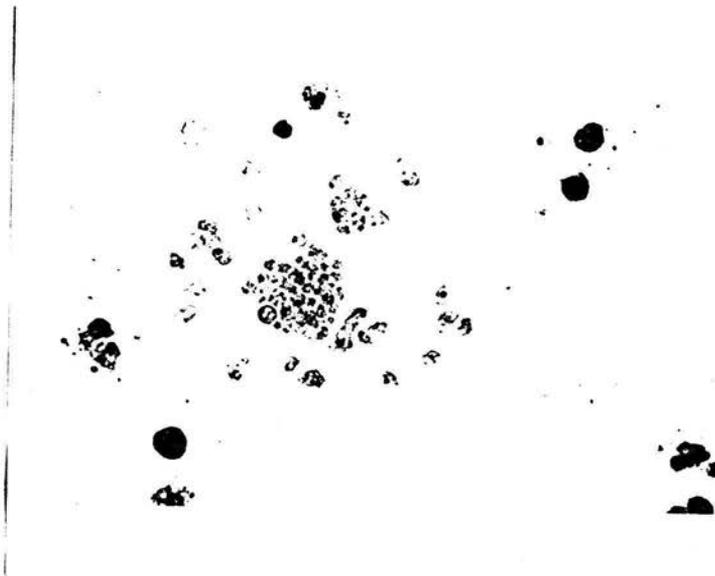


FIGURA 5

Colonia de células pequeñas, de un cultivo de hepatocitos de rata parcialmente hepatectomizada, después de 12 días de cultivo en agar blando, tomadas con microscopio de luz invertida, con objetivo de 16X.

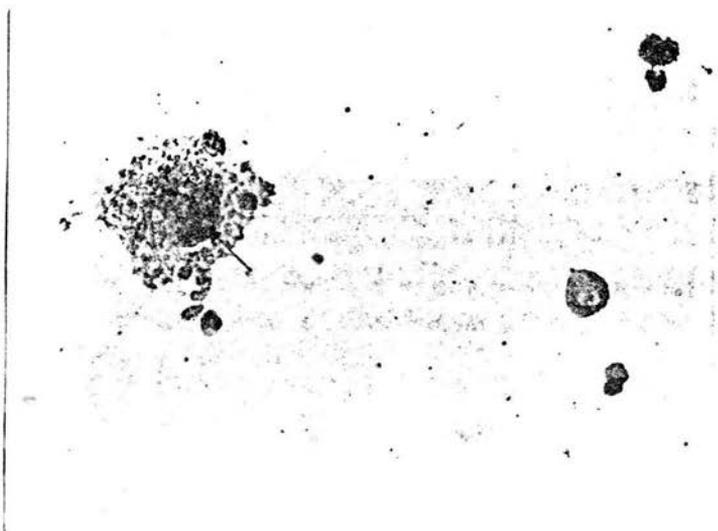


FIGURA 6

Cultivo de hepatocitos provenientes de rata parcialmente hepatectomizada tratados con DMN, después de 12 días de cultivo en agar blando. La fotografía muestra una “célula grande,” de donde emergen “células pequeñas,” tomadas con microscopio de luz invertida con objetivo 16X.

DISCUSION

Uno de los problemas que se tiene en la actualidad en el estudio de los cambios que sufre una célula normal durante el proceso carcinogénico, es la falta de parámetros confiables para medir malignidad de las células en cultivo. La búsqueda de estas características es intensa, y en las últimas décadas se ha podido correlacionar el estado transformado con el crecimiento en agar blando (MacPherson y Montagnier, 1964).

El cultivo primario de hepatocitos ha sido ampliamente caracterizado en el laboratorio en lo que se refiere a los pasos involucrados en la etapa de iniciación del proceso carcinogénico, al comparar los efectos causados por sustancias químicas carcinogénicas en hepatocitos en este estado quiescente, provenientes de rata intacta, con los causados en hepatocitos en síntesis activa de DNA, provenientes de ratas parcialmente hepatectomizadas 24 hrs. antes, en los cuales en teoría se cumplen todos los requisitos para que se lleve a cabo la iniciación. Las diferencias encontradas en ambos tipos de hepatocitos en cultivo (Mendoza, 1981; Rosales, 1982; García, 1983; Talamás, 1983; Cordero, 1984; González, 1987), en cuanto al metabolismo, la interacción de sus metabolitos activos con el DNA y a la reparación de las bases conjugadas, apoyan la hipótesis de que éste, es un buen modelo de carcinogénesis experimental, pues cumple con los requisitos indispensables para que ocurra el primer paso del proceso carcinogénico.

En el caso específico de la DMN, utilizada en este trabajo, la dosis empleada de $1 \times 10^{-5} M$, es considerada no tóxica (Talamás Rohana, 1983) y concuerda con la dosis empleada para la inducción de transformación "in vitro" (Pienta, 1977, tomada de Heidelberg y col 1983).

En cuanto a los tiempos de tratamiento de los hepatocitos en cultivo primario, se estableció trabajar a 3 y 6 hrs. para los cultivos de hepatocitos provenientes de rata intacta (HRI), y de rata parcialmente hepatectomizada (HRH). Los periodos de 9 y 12 hrs. de cultivo fueron excluidos debido a que presentaron una disminución significativa en la viabilidad de los hepatocitos y la formación de grumos que implica poca dispersión celular. Esto se puede explicar, por la secuencia de cambios morfológicos que sufren los hepatocitos en cultivo primario, ya que durante las 3 primeras horas: su morfología se mantiene redonda y conforme transcurre el tiempo de cultivo, la morfología de los hepatocitos cambia de tal manera que a más de 9 hrs. de cultivo, las células se presentan totalmente extendidas y adheridas a las cajas de cultivo con una morfología poliédrica y formando una monocapa, de acuerdo a lo descrito por Bonney (1974). Por lo que en los primeros tiempos de cultivo, las uniones intercelulares que se establecen, son más fáciles de romper, por la acción de la tripsina que las uniones intercelulares a mayor tiempo de cultivo, por tal motivo la tripsinización y la manipulación mecánica realizada para obtener una suspensión celular lo mas disgregado posible, causa la disminución en la viabilidad y la formación de grumos a las 9 y 12 hrs. de cultivo.

Una vez establecidos los periodos de tratamiento de los hepatocitos en cultivo primario, para su posterior transferencia al agar blando, surgió la inquietud de medir la viabilidad de éstos después de sembrados en el agar blando, tomando en cuenta que hay un tiempo considerable desde que son tripsinizados, hasta el momento de ser sembrados al agar. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas, al comparar los hepatocitos recién tripsinizados y después de sembrados, en ambos tipos de cultivos (HRI, HRP).

Al tratar de establecer las condiciones del cultivo en agar blando para los hepatocitos, fue necesario encontrar inicialmente

las condiciones de cultivo de las células leucémica L5178Y, determinándose primero la concentración y el volumen para la primera capa. Se llegó a la conclusión de que dichas variables no son determinantes en la formación de colonias, ya que solo intervienen en la formación de una cama, para mantener en interfase a las células, evitando que se adhieran a la caja de cultivo, dicho en otras palabras impiden el anclaje. Sin embargo para la capa superior, la concentración de agarosa y el volumen utilizado fueron limitantes para el desarrollo de las colonias. Para el primer caso, la concentración final que se estableció de 0.12% concuerda con lo descrito en la bibliografía para las células L5178Y (Folkman y Hochberg, 1973). El volumen, por otro lado, limita el crecimiento de las colonias probablemente por la falta de nutrientes, debido a que el agar blando por ser un medio semi-sólido, no puede ser reabastecido (Folkman y col. 1975). Por último, el suero utilizado, también fue un factor limitante para el crecimiento de las colonias ya que a pesar de que se ha descrito que el suero de caballo y el suero fetal de bovino estimulan el crecimiento de esta línea y de otras líneas celulares (Folkman y Hochberg, 1973; Kuroki y col. 1975; Nakamura e Ichihara, 1985), en nuestras condiciones de cultivo no tuvieron el efecto esperado; el suero neonato de bovino fue el único que estimuló el crecimiento celular, lo que puede ser atribuido a la calidad de los sueros empleados o a los factores séricos presentes.

Una vez encontradas las condiciones del cultivo en agar blando de las células leucémicas, bajo estas mismas condiciones se trabajó el cultivo de los hepatocitos provenientes del cultivo primario. Como lo muestran los resultados (Tablas VI, VII) la viabilidad de éstos disminuyó considerablemente hasta el 4º día a valores entre 10 y 20% en el cultivo de HRI y para HRP la viabilidad alcanzó valores alrededor del 15%

Sin embargo la presencia de otro tipo de células, a las que llamamos "células pequeñas" determinó seguir el cultivo por más de 4 días.

Estas células que aparecen al cabo de este tiempo, tienen la particularidad de presentarse en forma aislada o emergiendo de "células grandes", formando colonias de más de 12 células a los 12 días de cultivo. La presencia de estas células puede justificarse con base en lo reportado por Nakamura e Ichihara (1985), quienes describen la aparición de estas células en los cultivos primarios en un porcentaje muy reducido como resultado de ser contaminantes de la suspensión original de hepatocitos, los cuales aparecen en un lapso de aproximadamente 5 días, asociadas a restos celulares de hepatocitos, característica que se podría relacionar con nuestras observaciones de la presencia de células pequeñas que emergen de células grandes. Tomando en cuenta la morfología característica que presentan las células de Ito y el método de cocultivo con hepatocitos (Mendoza-Figueroa y col. 1986), consideramos a las células pequeñas, como células almacenadoras de grasa o células de Ito. La función que realizan estas células en el hígado, es el almacenamiento y metabolismo de la vitamina A, así como la síntesis de componentes del tejido conectivo, en condiciones normales y durante fibrogénesis (Hendriks y col. 1985; Senzoo y col. 1984; Blomhoff y col. 1985).

En cuanto a las "células grandes", no encontramos información al respecto, suponemos que se trata de la fusión de varios hepatocitos. Estas células se presentan asociadas a células pequeñas formando colonias o bien aisladas, su tamaño es 4 a 5 veces mayor al de los hepatocitos parenquimales y morfológicamente se observaron como células segmentadas, en las cuales en cada segmento se presentan 1 o 2 núcleos, lo cual nos hizo pensar en esta posibilidad. En cuanto al cultivo de hepatocitos tumorales sembrados directamente en el agar, por las dificultades de aisla-

miento de estas células y por la escasez de material vivo con nódulos inducidos por carcinógenos y fenobarbital, no fue posible tener resultados concluyentes.

En la bibliografía reportan problemas para el aislamiento de este tipo de células, sobre todo cuando provienen de tumores sólidos (Courtenay, y col. 1978; Pavelic y col. 1983). Es importante en este caso implementar la técnica de aislamiento de estas células mejorando sobre todo la dispersión celular. Utilizamos el doble de la concentración de colagenasa estandar, para la perfusión de un hígado normal o parcialmente hepatectomizado. Sin embargo no fue suficientemente eficaz para disgregar las células que conformaban los nódulos.

Para finalizar, los resultados obtenidos con γ -glutamil transpeptidasa, están fuera de discusión ya que en principio no hubo proliferación de los hepatocitos, aunque se encontraron células aisladas positivas a la enzima GGT, en los hepatocitos provenientes de ambos cultivos, (HRI, HRP). Pero aún así no se puede hacer una inferencia lógica que esté apoyada en datos concluyentes solamente hubo expresión de esta enzima exitosamente en las colonias de células leucémicas L5178Y, que en este caso están en un estado más avanzado de transformación

CONCLUSIONES

Las condiciones del cultivo en agar blando de las células L5178Y. Se definieron en base al mejor desarrollo de las colonias así para la primera capa determinamos 1.7 ml a 0.5% y 1.2 ml a 0.3% agarosa y para la capa superior un volumen de 1.2 ml a 0.125%. Las colonias de más de 1.0 mm de diámetro a los 7 días de cultivo fueron positivas a la GGT.

Una vez que probamos que nuestro control positivo funcionaba establecimos los períodos de tratamiento de los hepatocitos en cultivo primario, a 3 y 6 hrs con la DMN a una dosis de 1×10^{-5} M. En estas condiciones los hepatocitos tanto de rata intacta como de rata parcialmente hepatectomizada mostraron viabilidades arriba del 75% y una buena dispersión celular cuando fueron tripsinizados para ser transferidos al agar blando.

Al medir la cinética de viabilidad de los hepatocitos de rata intacta y de rata parcialmente hepatectomizada en el agar blando encontramos que su viabilidad disminuía a valores de alrededor del 15% al 4 día de cultivo, y únicamente algunas células aisladas, presentaron una tinción positiva hacia la GGT, en ambos tipos de hepatocitos. A partir del 4º día de cultivo, aparecieron otros tipos de células a las que llamamos "células pequeñas", las cuales formaron colonias más de 12 células a los 12 días de cultivo, y que mostraron ser negativas con la tinción de la enzima. Estas mismas células, en ocasiones se observaron asociadas a "células grandes" las cuales se presentaron con un relieve topográfico arrugado y también segmentadas. Con base en esta última característica, consideramos que estas células grandes podrían ser el producto de la fusión de varios hepatocitos, ya que cada compartimiento tenía uno o dos núcleos. Por último, las condiciones de aislamiento de las células provenientes de los nódulos tumorales, no fueron

encontradas debido a que la colagenasa del doble de la utilizada para disgregar los hepatocitos de un hígado normal o parcialmente hepatectomizado solo logró disgregar los hepatocitos que circundaban los nódulos hiperplásicos transferidos al agar blando, contrario a lo que se esperaba, no manifestaron ninguna diferencia con los hepatocitos provenientes de rata intacta, pero surge la posibilidad de que el tiempo que permanecen viables en el cultivo sea determinante para que se exprese su carácter transformado.

REFERENCIAS

- Abelev, G.I. (1971). Alpha-feto protein in ontogenesis and its association with alignat tumors. Adv. Cancer. Res. 14; 295-358.
- Allen, T.A. and Lype, p.r. (1976). The surface morphology of normal and malignant rat liver epithelial cells in culture In Vitro 12; 837-852.
- Barger, B.E. Sandord, R.R. (1970). Cytologyc manifestations of neoplastic transformation in vitro. J. Natl Cancer Inst. 44; 39-63.
- Barret, J.C. Hesterberg, T.W. and Thomassen D.D. (1984). Use of cell transformation systems for carcinogenicity testing and mechanistic studies of carcinogenesis. Pharmacological Reviews 32; (2). 57-70.
- Berry, M.N. and friend, D.D. (1969). High yield preparation of isclated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structur study. J. Cell. Biol. 43; 506-520.
- Berwald, Y. y Sachs. L. (1965). In vitro transformation of normal cells to tumor cells by carcinogenic hydrocarbons. J. Natl. Cancer Inst, 35; 641-661.
- Browhan, G. Goldberg, J. Gotilib, A.I. Freisler, H.D. Azarnia, No., Priore, R.L., Breman, J.L, Vogler, W.R., Winton, E.F. Miller, K.B., Grudwald, H. (1983). The clonogenic assay as a reproducible in vitro system to study predictive parameters of treatment outcome in acute nonlymphoblastic leucemia. Hematol, 15; 227-235.

Blamhoff, R., Rasmussen, M., Nilsson, A., et al (1985). Hepatic retinol metabolism. Distribution of retinoids, enzymes and binding proteins in isolated rat liver cells. J. Biol. Chem. 260; 13560-13565.

Chosal, A.K., Mullen, B., Medline, A. and Farber, E. (1983). Sequential analysis of hepatic carcinogenesis. Laboratory Investigation 48; 224-230.

Colburn, N.H., Bruegge, W.F., Bates, J.R., Gray, R.H. Rossen, W.H. Kelsey and T. Shimada. (1978). Correlation of Anchorage-independent growth with tumorigenicity of chemically transformed mouse epidermal cel Cancer Research. 38; 624-634.

Cordero, V.D. (1976). A soft agar colony assay for lewis lung tumour and B16 melanoma taken directly from the mouse. Br. d. Cancer, 34; 39-45.

Courtenay, V.D. and J. Mills (1978). An in vitro colony assay for human tumours grow in immune-suppressed mice and treated in vivo with cytotoxic agents. Br. J. Cancer 37; 261-268.

Courtenay, V.D. Selby, P.J. Smith. I.E., Mills J. and Peckham M.J. (1978). Growth of human tumor cell colonies from biopsies using two soft-agar techniques. Br. J. Cancer, 38; 77.

Cradock, V.M. (1971). Liver carcinomas induced in rats by single administration of dimethylnitrosamine after partial hepatectomy. J. Natl. Cancer. Int. 47; 889-907.

Cradock, V.M. (1976). Cell proliferation and experimental in liver cell cancer. Cameron, H.M., Linseil, D.A. and Warwick, G.P. Edit. Elsevier North Holland Biomedical Press Chapter 8; 153-201.

- Deelhan, H.T. (1927). The part played by injure and repair in the development of cancer. Br. Med. J. 1; 872-874.
- Dipaolo, J.A., Donova, P. Nelson, R. (1969). Quantitative studies of in vitro transformation by chemical carcinogens. J. Natl. cancer Inst. 42; 867-876.
- Dipaolo, J.A., Nelson, RL.L. and Donovan, P.J. (1969). Sarcoma-producing cell lines derived from clones transformed in vitro by benzo a pyrene. Science 165; 917-918.
- Doll, R. (1977). Strategy for detection of cancer hazards to man. Nature, 265 $\frac{1}{2}$ 589-596.
- Evans, C.H. and Dipaolo, J.A. (1975). Neoplastic transformation of quinea pig fetal cell in culture induced by chemical carcinogenesis Cancer. Res. 25; 1035-1044.
- Fan, D., Morgan, L.R.R., Schneider, C., Blank, H., Bubrata, P., Yun Fanyang and Fan, S. (1985). Pharmacologic, assessment of regimen chemosensitivity in the soft-agar assay: Effect of oxigen on human tumors. A. Cancer Res, Clin. Oncol. 110; 209-215.
- Farber, G. (1973). Hiperplastic liver nodules methods. Cancer Res., 7; 345-375.
- Farber, E. (1981). Chemical carcinogenesis, The New Engl. D. Med. 305; 1379-1389.
- Farber, E. (1984). Cellular biochemistry of the siewise development of cancer with chemical. G.H.A. Gowes Memorial Lecture Cancer Res. 44; 5473-5474.

Farber, E., and Cameron, R.G. (1980). The sequential analysis of cancer development. Ad. in Cancer Res. 31; 125-226.

Faber, E., Cameron, R.G., Laishes, B., Lin, J.CH., Medline, A., Ogawa, K., and Solt, D.B. (1979). Physiological and molecular markers during carcinogenesis. In: Carcinogens: Identification and mechanisms of action. A.C. Griffin and C.R. Shaw, eds. Raven Press, New York. 319-335.

Fiala, S., Fiala, A.E., and Dixon, B. (1972). glutamil transpeptidasa in trasplantable. Chemically induced rat itepatomas and spontaneous mouse hepatomas. J. Nat. Cancer, Inst. 48; 1393-1401.

Folkman, J., and Greenspan, H.P. (1975). Influence of geometry on control of cell growth. Biochim. Biophys. Acta 417; 211-236.

Folkman, J. and Hochberg, M. (1973). Self-regulation of growth in tree dimensions. J. Exp. Med. 139; 745-753.

Friedman, V.H. and Shin, S.I. (1974). Cellular tumorigenicity in nude mice. Correlation with cell growth in semi-solid medium. Cell. 9; 335-359.

Friedwald, W.F., Rous, P. (1944). The initiating and promoting elements in tumor production. J. Exp. Med. 80; 101-128.

García Reyes, M.A.S. (1983). Estudio sobre el mecanismo del DMS y la MNV en el cultivo primario de hepatocitos de rata wistar.

González, G.C. (1987). Uso de la -glutamyl transpeptidasa y la glutation-s-transferasa para identificar hepatocitos preneoplasicos in vitro. Tesis, México, D.F. Depto. de Biología Clínica, E.N.C.B.

Greenberg, B.R., Salmon, S.E. (1984). Human tumor clonogenic assay in patients with unknow primary carcinoma, J. Clin Oncol. 2; 46-50'

Hamburger, A.W., Salmon, S.E. (1977). *Prymar and Biossay of human tumor stem cells.* Science. 197; 461-463.

Heidelberg, C. (1975). *Chemical carcinogenesis* Ann, Rev. Bioch., 79-121.

Heidelberg and Boshell (1975). *Chemical oncogenesis in culture.* Gann monograpithon Cancer Res. 17; 39-58.

Hendriks, H.F.J., Verhoofstad, W.A.M.M., Brower, A. et.al. (1985). *Perisinuosoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver.* Exp. Cell Res., 160; 138-149.

Higgins, G.M. and Anderson, R.M. (1931). *Experimetnal pathology of the liver. I. Restoratin of the liver of the white rat following partial surgical removal.* Archives of pathology, 12; 186-202.

Holley, R.W. (1972). *A unifying hipothesis concerning the nature of malignant growth.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69; 2840-2841.

Huberman, E. and Sachs, L. (1966). *Cell susceptibilty to transformation and citotoxicity by the carcinogenic hydrocarbon benzo(a)pyrene.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 56; 1123-1129.

Jarc. (1973). *Some inorgnic and organometallic compounds.* International agency for research on Cancer, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemical to man E; 14-47.

Jolanko, H. and Rouslahti, E., (1979). *Differential expression of -glutamyl transpeptidasa activity by Dyetary phenobarbital in spontaneus hepatic tumors of C3M mice,* Gann, 71; 536-542.

Kuroki, T. (1975). *COntributions of tissue culture to the study of chemical carcinogenesis: A review.* Gann Monograph on cancer Res. 17; 69-85.

- Kuroki, T. and Heidelberger, C. (1972). Determination of the h-protein in intranformable and transformed cells in culture. Biochemistry 11; 2116-2124.
- Kuroki, T., and Sato, H. (1968). Transformation and neoplastic development in vitro of hamster embionic cells by 4-nitro-quinoline 1-oxide and its derivatives. J. Natl. Cancer, Inst. 41; 53-71.
- Lai, D.Y., Myers, S.C. Wou, Y., Greene, E.J., Friedman, M.A., Argus, M.R. and Arcos, J.C. (1979a). Role of dimethyl-nitrosamine-dimethylase in the metabolic activation of dimethyl-nitrosamine. Chem. Biol. Interac. 28; 107-126.
- Leffert, J.H.L., Koch, K.S., Ruvalcaba, B., Sell, S., Moron, T. and Boorsteing, R. (1976). Hepatocyte growth control: In vitro approach to problems of liver regeneration and function. Presented at the third pecennial review conference, cell, tissue, and rogan culture, Held in Lake Placid, New York.
- Lornblith, P.L., Smith, B.H., Leauard, L.A. (1981). Response of cultured human brain tumors to nitrosoureas: correlation with clinical data Cancer 47; 255-265.
- Ludwing, C.,V., Durie, B.G.M. Salmon, S.E., Moon, T.E., (1983). Tumor growth stimulation in vitro by interferons, Evr. J. Cancer Clin. Oncol. 10; 1625-1632.
- Macpherson, I., and Montagnier, L. (1964). Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virys Inst. of virology University of Glasgow, Scotland, 23; 291-294.
- Magee, P.N. and Barnes, J.M, (1956). The production be malignant pprimary hepatic. Tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine. Brit. J. Cancer, 10; 114-122.

Magee, P.N. and Vandekar, M. (1958). Toxic liver injury: The metabolism of dimethylnitrosamine In vitro. Biochem. J. 70; 600-605.

Maraudas, N.G. (1972). Anchorage dependence: Correlation between amount of growth and diameter of bead for single cells grown on individual glass beads. Exp. Cell. Res. 74; 337-342.

Marquardt, H. (1974). Cell cycle dependence of chemically induced malignant transformation in vitro. Cancer. Res. 34; 1612-1613.

Mendoza Figueroa, L.T. (1978). Un nuevo ensayo rápido para la detección de cancerígenos químicos: Cuantificación de las rupturas al DNA de hepatocitos de rata en cultivo primario. México, D.F., CIEA-IPN 114p. TESIS.

Mendoza Figueroa, L.T. (1981). Detección de las rupturas producidas al DNA de hepatocitos de rata en cultivo primario por el precancerígeno dimetlnitrosamina. México, D.F. CIEA-IPN. 136p. TESIS.

Meyskens, F.L. Alberts, D.S., Salmon, S.E. (1983). Effect of 13-Cos-Retinoic acid and 4-hydroxy anebuk-all-trans-retinamide on human tumor colony formation in soft-agar. Ins. J. Cancer, 32; 295-299.

Miller, E., (1978). Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animal. Presidential address. Cancer. Res., 38; 1479-1496.

Mondal, S. (1980). Two stage carcinogenesis Kouri, R.E., ed. CRC PRESS, 129-149.

Mondal, S. and Heidelberger, C. (1970). In vitro malignant transformation by methylcholantrene of the progeny of single cells derived from C3H mouse prostate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65; 219-225.

Moon, T.E., Salmon, S.E., White, C.S., Chew, H.S.G., Meyskens, F.L., Durie, B.G.M. Alberts, D.S. (1981). Quantitative association between in vitro human tumor stem cell assay and clinical response to cancer chemotherapy. Canc. Chemotek. Pharmacol 6; 211-218.

Montesano, R., Drevon, C., Kuroki, T., Saint Vincent, L., Handleman, S., Sanford, K.K. Deborah, Defeo, and Weinstein, B.I. (1977). Test for malignant transformation of rat liver cells in culture: Cytology, growth in soft-agar and production of plasminogen activator. J. Natl. Cancer Inst. 59; 1651-1658.

Nakamura, T., and Ichihara, A. (1985). Control of growth and expression of differentiated functions of nature hepatocytes in primate culture. Cell structure and function. 10; 1-16.

Neugutr, A.I. and Weinstein, B. (1979). The use of agarose in the determination of anchorage-independent growth. Cancer, Res. 5; 351-355.

Paranjpe, M.S. Boone, CH. W. and S. del Andelaton, (1975). Selective growth of malignant cells by in vitro incubation on teflon. Exp. Cell. Res. 93; 508-512.

Pavelic, T.P., Nowak, N.J. Scolcu, H.K. amd Rustum, M. (1983). Correlation of tumor-cell growth in four semisolid systems. J. Cancer, Res. Clin. Oncol. 105; 94-97.

Peraino, C., Fry, R.J.M. Staffelat, E.F. (1971). Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in the rat by 2-acetylaminofluorene. Cancer Res., 31; 1506-1512.

Pietra, G., Rapport, H. and Shubik, P. (1961). The effects of carcinogenic. Chemicals in Newborn mice. Cancer 14; 308.

- Pollack, R. and Rifkin. (1975). Actin-containing calices within anchorage-dependent rat embryo cells are dissociated by plasmin and trypsin. Cell 6; 495-506.
- Porter, K.B., Todaro, G.J. and Ponte, V. (1973). A scanning electron microscope study of surface features of viral and spontaneous transformants of mouse Balb/3T3 Cells, J. Cell. Biol. 59; 633-642.
- Pitot, H.C. Barnes, L. Goldsworthy, T., Kitakawa, T. (1978). Biochemical characterization of stages of aeratocarcinogenesis after a single dose of dietaylnitrosamine. Nature 271; 456-458.
- Roller, M.R. and Heidelberg, C. (1967). Attempts to produce carcinogenesis in organ cultures of mouse prostate with polycyclic hydrocarbons, Int. J. Cancer 2; 209-520.
- Rosales, E.J.L. (1982). Estudio de la iniciación de la transformación celular por 2-AAF en cultivo primario de hepatocitos de rata. México, D.F, CIEA-IPN. 138p. TESIS.
- Reznikoff, C.A., Bertram, J.A., Brankow, D.W. and Heidelberg, C. (1973). Quantitative and qualitative studies of chemical transformation of cloned C3H mouse embryd cells sensitive tp post-confluence inhibition of vell division. Cancer Res., 33; 3239-3249.
- Sabharwal, P.S., D. Pad do Paulo, N.E., Garrett, C. Rudert. S. Levy, P. Markovits, and M. Hubert-Habart. (1976). Growth of normal and chemically transformed hamster cells inliquid and semi-solid media In vitro. 12; 326.
- Salmon, S.E., LIV. R.M. Casazza, A.M. (1981). Evaluation of new anthracycline analogs with the human tumor stem cell assay, Cancer chemoter pharmacol. 6; 103-110.

Sandord, K.K. Barker, B.E., Parshad, R., Westfall, B.B. Woods, M.W., Jackson, J.K., King, D.R., and Peppers, E.V. (1970). Neoplastic conversion in vitro of mouse cells, Cytologic chromosomal enzymatic. Glycolytic, and growth properties. J. Natl., Cancer, Inst. 45; 1071-1096.

Sarma, D.S.R., Rajalakshmi, S., Farber, E. (1975). Chemical carcinogenesis interaction of carcinogens with nucleic. Acids. Cancer. Vol. 1; 235-287, Plenum Press, N.Y.

Sawabu, N., Nakagen, M. Yoneda, M. Makino, H., Kameda, S., Kobayashi, K., Hattori, N., ISHM. (1978). Movel γ -glutamyl-transpeptidase isoenzyme specifically found in sera of patients with hepatocellular carcinoma. 6 Ann; 69; 601-605.

Senoo, H., Hata, R., Negar, and et. al. (1984). Stellate cells (vitamin A storing cells) are the primary site of collagen synthesis in non parenchymal cells in the liver, Biomedical Res. 5; 451-458.

Sherer, E. and Emmelot, P. (1975). Fochi of altered liver cells induced by a singel dose of diethylnitrosamine and partial hepatectomy: Their cntribution tohepatocarcinogenesis in the rat. Europ. J. Cancer, 11; 145-154.

Shin, S.I., Freedman, V.H., Risser, R.S. and C. Pollack, (1975). Tumorogenicity of virus transformed cells in nude mice is correlated specifically with anchoroage independent growth in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72; 4435-4439.

Sims, D. (1980). The metabolic activation of chemical carcinogens Br. Med. Bull., 36; 11-18.

Smith, H.S. Scher, C.D., Todaro, G.J. (1971). Induction of cell division in medium lacking serum growth factor by SV 40. Virology 44; 359-370.

Solt, D.F., Garber, E. (1976). A new principle for the sequential analysis of chemical carcinogenesis, including a quantitative assay for initiation in liver. Nature. 263; 701-703.

Stick, H.F., Lam, P., Lo, L.W. Koropatnick, D.J. and San, R.H.C. (1975). The search for relevant short term bioassays for chemical carcinogens. The tribulation of a modern synthesis. Cancer, J. Gen. Cytol. 17; 471-492.

Stoker, M. C. O'Neill, S. Berryman, and V. Waxman, (1968). Anchorage and growth regulation in normal and virus transformed cells, Int. J. Cancer 3; 683-693.

Talamas-Rohana, P. (1983). Estudio comparativo de los fenómenos involucrados en la iniciación de la carcinogénesis química por la 14 C-DMN en cultivos primarios de hepatocitos de rata intacta y parcialmente hepatectomizada. México, D.F., CIEA-IPN. 156p. TESIS.

Trent, A.M. Salmon, S.E. (1980). Potential applications of human tumor stem cell bioassay to the cytogenetic assessment of human cancer. Cancer, Gen. Cytogenet 1; 291-296.

Tucker, R.W., Sanford, K.K., Handleman, S.L. and Jones, H.G. (1977). Colony morphology and growth in agarose as test for spontaneous neoplastic transformation in vitro. Cancer research, 37; 1571-1579.

Unkles, J.C., Tobia, A., Ossowsky, L. et. al. (1973). An enzymatic function associated with transformation of fibroblast by oncogenic viruses. I. Chick, Embryo fibroblast cultures transformed by avian RNA tumor viruses. J. Exp. Med. 137; 85-111.

Van Rensselaer, P. (1980). Initiation and promotion in cancer formations: The importance of studies on intracellular communication. 1, Biol. Med., 53; 367-384.

Warrer, I.S., Nicholas, H.H. (1978). A diploid rat liver cell culture in malignant transformation by aflatoxin B., In vitro, 14; 418-427.

Weinstein, I.B. Ornetow, J.H. Gebert, R., Kaighn, M.E. and Stadler, V.C. (1975). Growth and structural properties of epithelial cell cultures established from normal rat liver and chemically induced hepatomas. Cancer Res. 35; 253-263.

Weinstein, J.B. Wigler, M. and Stadler, U. (1976). Analysis of the mechanism of chemical carcinogenesis in epithelial cell cultures. IN: R. Montesand, H. Barthsch, and L. Tomatis (Eds.) Screening test in chemical carcinogenesis. Cc.rc. Scientific publication No. 12, Lyon, France. 335-381.

Yamagiwa, E.E., Ichigawa, K. (1918). Experimental study of the pathogenesis of carcinoma, J. Cancer Res. 3; 1.