

Cultivo de hígado de rata de diferentes edades mediante la técnica de explantes

M. J. Gómez-Lechón, R. Gil y J. Baguena

Centro de Investigación
Ciudad Sanitaria «La Fe»
Avda. Campanar, 21, Valencia-9

(Recibido el 14 de abril de 1981)

M. J. GOMEZ-LECHON, R. GIL and J. BAGUENA. *Liver Explant Cultures from Rats of Various Ages*. Rev. esp. Fisiol., 38, 97-102. 1982.

Liver tissue from rats of different age has been cultured. The samples were obtained by surgical biopsy. A relationship between the obtained growth in culture and the animal age was established. The liver from young and weanling rats grows larger and earlier than the adult liver. The cells obtained in culture have been classified in five different types according to morphological criteria.

Los hepatocitos adultos de mamífero, en cultivo, constituyen un sistema experimental que encierra grandes posibilidades respecto al estudio de la interrelación y el control de los procesos metabólicos y funcionales del hígado.

Durante los últimos diez años, se ha extendido cada vez más el uso del método de perfusión desarrollado inicialmente por BERRY y FRIEND (2). Sin embargo, a pesar de proporcionar poblaciones de hepatocitos muy homogéneas con elevada viabilidad, no es posible utilizarlo cuando el material disponible no permite ser perfundido. Es decir, cuando no se trata del hígado entero cuya vascularización haga posible el paso de las soluciones de perfusión a su través. Esta limitación es un obstáculo cuando se trata de cultivar hepatocitos a partir de biopsias de hígado humano o de animales de gran

tamaño. Sin embargo, ya que el cultivo de biopsias hepáticas es, sin lugar a dudas, un importante instrumento para el estudio de la patología hepática, se han desarrollado otros métodos de cultivo (15, 16, 18).

HILLIS y BANG (15) cultivaron hígado humano embrionario a partir de la siembra de explantes sobre superficies cubiertas con colágeno. INGRAM (16), con esta misma técnica cultivó hígado de mono adulto, obtenido por biopsia quirúrgica. Otros autores (6, 12) han cultivado hígado humano adulto con características patológicas muy variadas, llegando a clasificar las células obtenidas en varios tipos morfológicamente diferentes (19). Se han establecido, incluso, líneas celulares continuas de hígado humano (5).

En este trabajo, se ha pretendido comprobar las posibilidades y rendimiento de

una técnica que permite cultivar biopsias de hígado y para ello se ha estudiado si los fragmentos de hígado de ratas normales de diferentes edades, obtenidos por biopsia quirúrgica, pueden ser cultivados con regularidad o si, por el contrario, las condiciones del animal donante, referidas fundamentalmente a la edad, influyen de forma decisiva en la pauta de crecimiento y supervivencia de las células.

Material y métodos

Se han utilizado ratas de la cepa Sprague-Dawley de diferentes edades. Un grupo estaba constituido por animales adultos de 2 a 3 meses, y otro por jóvenes de uno hasta cuarenta y cinco días de edad.

Los fragmentos de hígado, obtenidos quirúrgicamente, se lavan con solución de Hank conteniendo antibióticos (100 U.I./ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina). Se trocean en fragmentos de 1 a 2 ram y se siembran en frascos de cultivo de plástico de modo que la separación entre ellos sea aproximadamente de 1 cm. Los frascos se mantienen a 37° C durante 1 hora para que los explantes se adhieran suficientemente al substrato; pasado este tiempo, se añade sobre ellos 1 ml de medio de cultivo que se renueva, aumentando el volumen, cada 24 ó 48 horas, dependiendo del grado de crecimiento y actividad metabólica de las células.

El medio de cultivo tiene la siguiente composición en %: MEM, complementado con 350 mg de glucosa, 22 mg de L-glutamina, 20 de suero bovino fetal y 1 de solución de antibióticos (50 U.I./ml de penicilina y 50 μ g/ml de estreptomina). El pH se ajustó con bicarbonato sódico a 7,4.

El criterio adoptado para medir el crecimiento del hígado en cultivo, ha sido la determinación del porcentaje de explantes que presentan coronas celulares a su alrededor, así como el tiempo transcu-

rrido desde el inicio del cultivo hasta la emigración de las primeras células desde el explante.

Resultados

El crecimiento celular obtenido de hígado de rata, cultivado según las condiciones expuestas, es inversamente proporcional a la edad del animal donante, sin embargo, no se ha podido establecer ningún tipo de relación entre la morfología de los tipos celulares que crecen alrededor de los explantes y la edad de las ratas donantes.

Algunos explantes presentan el mismo tipo de células creciendo a su alrededor durante todo el tiempo de cultivo; otros, en cambio, presentan simultáneamente varios tipos y, por último, hay explantes en los que un tipo de células sucede a otro, predominando casi, siempre al final del cultivo, las células de morfología fibroblástica.

No se ha encontrado regularidad en el tipo de células que emigran del explante en primer lugar, o en la forma de desplazarse unos tipos celulares a otros.

Se han clasificado en cinco tipos las células que crecen alrededor de los explantes, atendiendo únicamente a su aspecto morfológico mediante la observación al microscopio óptico invertido en contraste de fases.

Tipo I. Células de morfología epitelial con forma poligonal. Forman un mosaico y se muestran estrechamente juxtapuestas unas a otras, (fig. 1 a), observándose abundantes células binucleadas. Los núcleos son redondos, ocupan posición central en la célula y contienen 1 ó 2 nucleolos.

Tipo II. Células de morfología epitelial de tamaño mayor que las anteriores. Forman pavimento no muy apretado, dejando espacios visibles entre ellas. Se ob-

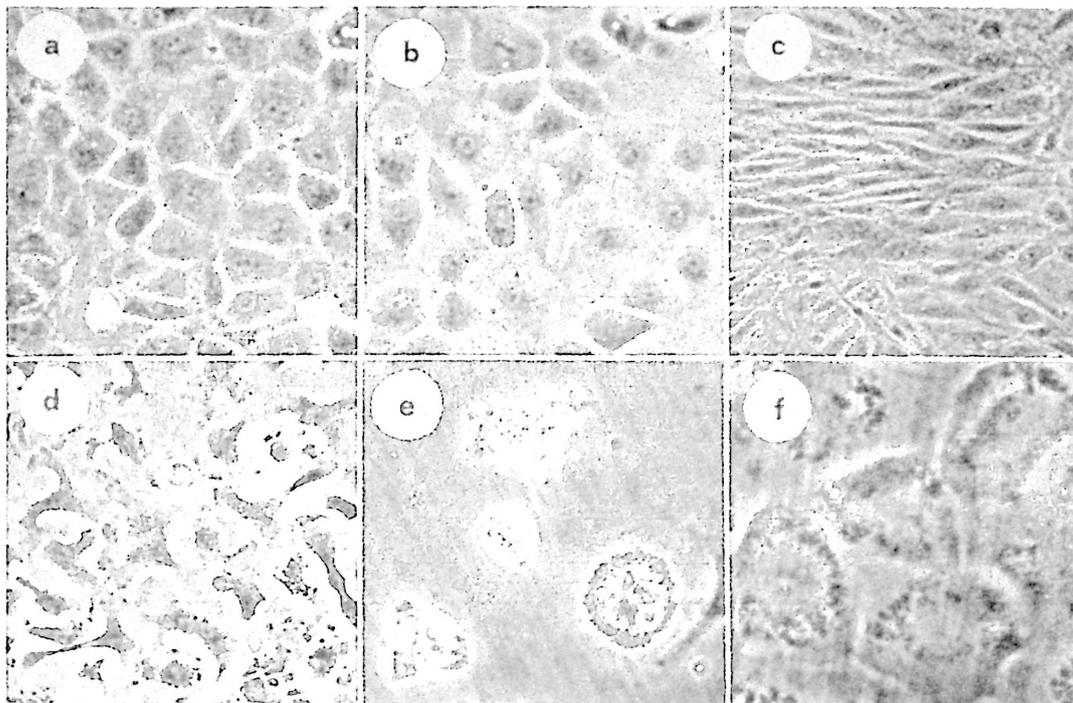


Fig. 1. Morfología de los diferentes tipos de células que crecen en cultivo alrededor de los explantes (a-d) 250x, (e, f) 400x.

serva también la existencia de células binucleadas. El citoplasma contiene abundantes granulaciones que se localizan preferentemente alrededor del núcleo (figura 1 b, f).

Tipo III. Fibroblastos de morfología fusiforme típica, con núcleo oval (fig. 1 c).

Tipo IV. Macrófagos de forma variable, muy irregular y con emisión de prolongaciones citoplásmicas. Se presentan aislados, sin tomar contacto unos con otros. Presentan también abundantes granulaciones en el citoplasma (fig. 1 d).

Tipo V. Aparecen con menos frecuencia células redondeadas y siempre aisladas unas de otras, en cuyo citoplasma se

observa un contenido granuloso que en muchos casos parece ser materia grasa (fig. 1 e).

Crecimiento en cultivo del hígado de rata: Ratas adultas. El porcentaje de cultivos con crecimiento positivo ha sido del 41,90 %, y sólo en el 33,33 % de estos casos han crecido más del 50 % de los explantes sembrados.

El crecimiento se inicia después del cuarto día, salvo en raras excepciones (tabla I).

Ratas menores de 45 días. El número de cultivos con crecimiento celular positivo ha sido del 89,40 %, en relación inversamente proporcional a la edad del animal, distribuyéndose entre las edades como se expone en la tabla I.

Tabla I. *Relación entre la edad de la rata donante y el inicio de crecimiento de los cultivos.*

Edad (días)	N.º de casos	Día del inicio del crecimiento							Crecimiento nulo
		1.º	2.º	3.º	4.º	5.º	6.º	7.º	
<i>Jóvenes</i>									
1-7	7	4	2						1
8-15	27	9	13	2					3
16-30	18	3	4	4	4	2			1
31-45	14	0	5	3	2	0	1	1	2
Total	66	16	24	9	6	2	1	1	7
%	100	24,2	36,4	13,6	9,1	3	1,5	1,5	10,6
		74,2 %			15,2 %				10,6 %
<i>Adultos</i>									
60-90	36	0	0	0	1	2	6	6	18
%	100				2,7	5,5	16,8	16,8	58,1
					41,9				58,1

Discusión

El crecimiento celular que se observa en los cultivos de hígado de rata, pone de manifiesto la facilidad con que puede ser cultivado, utilizando un método clásico como la siembra de pequeños explantes.

Durante el desarrollo postnatal, el hígado muestra una intensa proliferación celular que conduce no sólo al aumento del número de células, sino también a la poliploidización de los hepatocitos, mediante un mecanismo en el que la binucleación constituye el escalón intermedio entre un grado de ploidia y el siguiente (17, 21). Este crecimiento activo se mantiene durante las primeras semanas de vida de la rata, deteniéndose cuando se alcanza el estado adulto, sin que por ello el hígado haya perdido la capacidad de proliferar cuando se le somete a un estímulo adecuado (14). Parece lógico que la iniciación del crecimiento en cultivo del hígado sea inmediata, rápida y regular cuando se trata de animales jóvenes. Sin embargo, el hígado adulto contiene una gran

proporción de hepatocitos poliploides con escasa capacidad mitótica (7), lo que debe influir de forma directa sobre la mayor dificultad para crecer en cultivo. Los hepatocitos concretamente, cuando son aislados de hígado adulto, mediante la técnica de perfusión con enzimas, y son puestos en cultivo, tampoco proliferan y se mantienen funcionalmente adultos durante varios días (3, 4, 10).

Los resultados coinciden por una parte con los obtenidos por GLINOS y BARTLETT (9) en sus estudios sobre la potencialidad de crecimiento en cultivo del hígado sano o en regeneración; por otra parte, con el hecho de que el hígado humano adulto crece lentamente en cultivo y se subcultiva con dificultad, mientras que el hígado fetal, o afectado de algún proceso patológico, muestra un crecimiento rápido y las células sobreviven por períodos más prolongados de tiempo (13). Finalmente, con los estudios realizados por GRISHAM (11), que aportan también evidencia de la limitada potencialidad de los hepatocitos para proliferar en cultivo, fundamentalmente cuando se trata de explantes.

Es necesario resaltar que tratándose de una técnica cuyo objeto es el cultivo de tejido hepático, no cabe esperar la homogeneidad que proporcionan los cultivos celulares, que presuponen la utilización de técnicas selectivas de aislamiento orientadas a la obtención de un determinado tipo celular. Las condiciones de cultivo utilizadas favorecen por igual a todas las células del tejido sembrado, con la particularidad de que aquellas que se adaptan mejor al nuevo entorno son las más indiferenciadas cuya capacidad proliferativa es mayor, produciéndose un desplazamiento de las más especializadas, en este caso los hepatocitos, con más exigencias adaptativas. Todo ello explica el crecimiento en cultivo de varios tipos de células simultáneamente entre las que se encuentran en proporción variable los hepatocitos. No obstante, se han descrito modificaciones del medio de cultivo con objeto de favorecer la supervivencia y estabilidad de las células parenquimáticas sobre las demás (18, 20) que podrían ser efectivas en este tipo de cultivos.

La heterogeneidad celular y la imprevisible evolución de cada uno de los tipos celulares, dentro de la población, sea cual sea la edad de la rata donante, constituye la limitación fundamental de los cultivos de hígado obtenidos por este método. Pese a todo, se sigue utilizando (1) cuando la escasez del material disponible no permite utilizar otras técnicas, reconociéndose su utilidad en lo que se refiere a la información que ofrecen los cultivos hepáticos para estudios de diferentes aspectos bioquímicos y funcionales de la patología hepática humana, o bajo condiciones experimentales en animales.

Agradecimientos

Agradecemos la asistencia técnica de las señoritas E. Belenchón, N. Pont y C. Jordán en la realización del trabajo

Resumen

Se cultiva tejido hepático de rata de diferentes edades, obtenido por biopsia quirúrgica. El crecimiento obtenido guarda estrecha relación con la edad del animal, siendo mayor y más temprano cuando el hígado procede de animales jóvenes o recién nacidos. Las células obtenidas se clasifican en cinco tipos diferentes por sus características morfológicas en cultivo.

Bibliografía

1. AUBERY, M., GUILLOUZO, A., BERNARD, B. y FONT, J.: *Exp. Cell. Res.*, **129**, 273-280, 1980.
2. BERRY, M. N. y FRIEND, D. S.: *J. Cell. Biol.*, **43**, 506-520, 1969.
3. BONNEY, R. J.: *In Vitro*, **10**, 130-142, 1974.
4. COLOMA, J., GÓMEZ-LECHÓN, M. J., GARCÍA, M. D., FELIU, J. E. y BAGUENA, J.: *Experientia*, **37**, 941-942, 1981.
5. CHANG, R. S.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **87**, 440-448, 1954.
6. DEMOISE, CH., GALAMBOS, J. T. y FALECK, A.: *Gastroenterology*, **3**, 390-399, 1971.
7. EPSTEIN, G. M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **57**, 327-334, 1967.
8. GEBHARDT, R. BELLEMANN, P. y MECKE, D.: *Exp. Cell. Res.*, **117**, 431-441, 1978.
9. GLINOS, A. D. y BARTLETT, E. G.: *Cancer Res.*, **11**, 164-170, 1951.
10. GÓMEZ-LECHÓN, M. J., BARBERÁ, E., GIL, R. y BAGUENA, J.: *Cl. Mol. Biol.* (en prensa).
11. GRISHAM, J. W., THAL, S. B. y NAGEL, A.: En «Gene Expression and Carcinogenesis in Cultured Liver» (L. E. Gerchenson y E. B. Thompson, eds.). Academic Press, Nueva York, 1975, p. 1.
12. GUILLOUZO, A., OUDEA, P., LE GUILLY, Y., OUDEA, M. C., LENOIR, P. y BOUREL, M.: *Exp. Mol. Path.*, **16**, 1-15, 1970.
13. HAYS, D. M. y OKUMURA, S.: *Surg. Res.*, **7**, 270-276, 1967.
14. HIGGINS, G. M. y ANDERSON, R. M.: *Arch. Path.*, **12**, 186-202, 1931.
15. HILLIS, W. D. y BANG, F. B.: *Exp. Cell. Res.*, **17**, 557-560, 1959.

16. INGRAM, R. L.: *Exp. Cell. Res.*, 28, 370-380, 1962.
17. JAMES, J., TAS, J., BOSCH, K. S., MEERE, A. J. P. y SCHYT, H.: *Exp. Cell. Biol.*, 19, 222-226, 1979.
18. KOCH, K. y LEFFERT, H. L.: *J. Cell. Biol.*, 62, 780-791, 1974.
19. LE GUILLY, Y., LENOIR, P., BOUREL, M., POUPON, R. y GUILLOUZO, A.: *Path. Biol.*, 18, 733-741, 1970.
20. LENOIR, P., LE GUILLY, J. y BOUREL, M.: *C. R. Acad. Sci. Serie D.* 267, 1522-1523, 1968.
21. NADAL, C. y ZAJDELA, F.: *Exp. Cell. Res.*, 42, 99-116, 1966.