

**Estudios
bioquímicos
en cultivos
de tejidos.**

A. GOMEZ PUYOU*

LOS CULTIVOS de tejidos ofrecen posibilidades excelentes para conocer ciertas funciones bioquímicas y las alteraciones que pueden provocarse por medio de diversos agentes. Un paso preliminar para aprovechar al máximo estas posibilidades es el de conocer los patrones bioquímicos normales de las células cultivadas. Entre los estudios realizados a este respecto, destacan los de Zwartow y Westwood¹ quienes han estudiado los factores que influyen sobre el crecimiento y la glucólisis de las células cultivadas; encontraron que la concentración de la glucosa en el medio es uno de los factores limitantes en el crecimiento celular; además estudiaron la relación que existe entre glucólisis y velocidad de crecimiento. Bailey, Gey y Gey² estudiaron la utilización de los lípidos del suero por linfoblastos de ratón encontrando que los triglicéridos son los más rápidamente utilizados, seguidos por los fosfolípidos y luego el colesterol. Morgan y McCrone³ realizaron un estudio sobre la síntesis de proteína por cultivos de corazón de embrión de pollo y estudiaron el efecto que tienen algunos extractos añadidos al medio de cultivo como la levadura, el extracto de carne y el extracto de embrión de pollo sobre la síntesis proteica. Eagle y cols.⁴ investigaron el recambio de amino ácidos marcados en células de la conjuntiva humana y de células HeLa. La incorporación de adenina, guanina, uracilo y formato en el ácido ribonucleico y desoxiribonucleico de células HeLa ha sido estudiado por Pileri y Ledoux⁵.

Se han hecho estudios más específicos: por ejemplo King, Socolow y Bensch⁶ analizaron la relación que existe entre el colesterol y nitrógeno y número de células cuando las células están en crecimiento activo y cuando la síntesis proteica está disminuída, se encontró que esta

* Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina, Ciudad Universitaria. México.

relación es muy baja cuando las células están sintetizando proteína activamente y que, cuando esta síntesis es interrumpida la relación colesterol a nitrógeno se eleva. Piez y Eagle⁷ estudiando la poza de aminoácidos libres de células HeLa, hígado y conjuntiva humana han encontrado que el patrón de aminoácidos libres es muy similar en estas tres cepas, los principales aminoácidos libres encontrados por estos autores fueron el ácido glutámico, la taurina y la glutamina además encontraron que el glutatone se encuentra en una concentración bastante elevada.

Un trabajo muy interesante es el de Burlington⁸ sobre la actividad de algunas enzimas de células de riñón de conejo. Este autor ha comparado los patrones enzimáticos de células de riñón de conejo cultivadas con los patrones enzimáticos de células de riñón de conejo antes de ser cultivadas, comparó las actividades de las fosfatasas ácida y alcalina, la adenosintrifosfatasa, la glucosa-6-fosfatasa, la d-amino oxidasa, la deshidrogenasa succínica y la citocromo oxidasa. Este autor encontró cambios muy marcados en las actividades de estas enzimas en sus dos grupos. Así mismo Burlington encontró que la actividad de la vía colateral de la glucosa se encontraba elevada en las células ya cultivadas.

La cinética de la glutaminasa de las células HeLa fue estudiada por William y Manson⁹, así como el efecto de ciertos iones sobre la actividad de esta enzima de las células HeLa.

Aprovechando estos sistemas de cultivo de tejido de tejido Woesner y Gould¹⁰ estudiaron la biosíntesis de la colágena por tejido pulmonar de embrión de pollo en medio de cultivo con y sin la adición de vitamina C. Kovacks¹¹ analizó el efecto del virus de poliomielitis sobre las actividades de algunas enzimas en células infectadas por el virus.

El presente estudio fue hecho con el objeto de aumentar en parte los conocimientos que se tienen sobre la bioquímica de los cultivos de tejido. Se consideró de importancia estudiar la cantidad de nitrógeno a un tiempo fijo para conocer que tan estables son los crecimientos celulares, ya que la cantidad de nitrógeno es un buen índice de la cantidad de células; también se consideró de interés estudiar las variaciones que sufre la cantidad de nitrógeno a diferentes tiempos de incubación.

Ya que no existe ningún dato en la literatura sobre el glucógeno en cultivos de tejido se consideró conveniente incluir en este trabajo la cuantificación de este compuesto y la relación que existe entre el glucógeno y nitrógeno en diferentes etapas de crecimiento celular.

La relación entre ácido desoxirribonucleínico y ribonucleíco y nitrógeno ha sido poco estudiada en cultivos de tejido; su conocimiento es de importancia por la relación que en los últimos se le ha dado al desoxirribonucleínico y ribonucleínico con la reproducción celular y la herencia. Esta relación ha sido incluida en este trabajo.

En vista de que Eagle⁷ cuantificó los amino ácidos libres y estableció patrones cromatográficos de ellos en tres cepas de cultivo diferentes, aquí también se incluyó su análisis para comparar estos resultados con los obtenidos por Eagle. La cuantificación de la glutamina y el ácido glutámico fue incluida por las mismas razones.

Entre más se conozcan las actividades enzimáticas de los diferentes tipos de cultivo, más útiles serán estos en el futuro. Burlington⁸ ya ha reconocido esto y ha hecho un estudio bastante extenso sobre este tema. La cuantificación de la actividad enzimática de dos de las enzimas más importantes en el metabolismo de las proteínas, la glutaminasa y la arginasa, fue incluida en este estudio.

Ya en el presente los estudios en cultivo de tejido están demostrando una gran importancia en la investigación médica¹², es de esperarse que en el futuro los cultivos de tejido sean aún más útiles para el progreso de la medicina.

MATERIAL Y MÉTODO

Cultivo de tejidos. El cultivo de células de riñón de conejo fue hecho siguiendo la técnica de Younger¹³. El conejo fue anestesiado levemente con hexobarbital sódico, administrado por vía intravenosa; los riñones fueron extirpados por vía lumbar, descapsulados y decorticados. La corteza se cortó en fragmentos muy pequeños que se lavaron varias veces con solución salina estéril para quitarles el exceso de sangre. A los fragmentos de corteza lavados se les añadió 250 cc de tripsina al 0.33% en solución de Hank's¹⁴ e incubados por hora y media a 37° C. Al final de la hora y media de incubación, la suspensión de células fue centrifugada a 800 revoluciones por minuto por diez minutos. El sobrenadante se descarta y el paquete de células se lava dos veces más con solución de Hank's. Al final de estos dos lavados las células son suspendidas en un volumen conocido de solución de Hank's y una pequeña alícuota de esta suspensión es tomada para cuenta de células. Un volumen de esta suspensión que contiene aproximadamente 5,000,000 de células fue inoculada a botellas de 250 cc que contenían 50 cc de me-

dio de cultivo de Melnick¹⁵ adicionado con suero de caballo para dar una concentración final de suero de caballo al 20%. Las botellas con medio de cultivo y células fueron incubadas en posición horizontal por cinco días a 37 ° C. Las células al crecer forman una capa que se adhiere a la pared inferior de la botella. Al final de cinco días de incubación el medio de cultivo fue cambiado por otros 50 cc de medio de cultivo fresco adicionado también con la misma cantidad de suero de caballo. Se vuelven a incubar las células a 37° C en la misma posición original; en la mayor parte de los casos las células fueron estudiadas a las 48 horas de cambio de medio. Toda la técnica requiere condiciones estrictamente estériles.

En el momento en que las células se van a estudiar son desprendidas con "gendarmes" de hule y recogidas en solución salina. La suspensión de células se coloca en tubos de centrífuga y se centrifuga a 800 rpm por minutos. El sobrenadante se deshecha; las células se lavan en esta forma tres veces. Por último las células son suspendidas en un volumen conocido de solución salina y se toman alícuotas adecuadas para hacer la determinación deseada.

Nitrógeno. En todos los casos se hizo determinación de nitrógeno por el método de microkjeldahl¹⁶. La muestra por analizar es puesta a digerir por tres horas en H₂SO₄, se añade Na₂SO₄ y Cu SO₄ que actúan como catalizadores. Al final de las tres horas de digestión el nitrógeno se encuentra en forma de sulfato de amonio. Se enfría el matraz y la muestra es pasada cuantitativamente a un destilador para microdeterminaciones. Se añade NaOH al 50% para liberar el amoníaco y este es destilado al vapor y recibido en ácido bórico con indicador de shiro-tashiro. El amoníaco queda fijado así al ácido bórico; la titulación se hace con ácido clorhídrico de normalidad conocida.

Los resultados de nitrógeno en todos los casos está expresados como microgramos de nitrógeno por botella de cultivo. En los lotes 4 y 5 el nitrógeno fue estudiado en grupos de tres botellas, en los lotes 6, 7 y 9 en grupos de cinco botellas. En estos cinco lotes la determinación se hizo a las 48 horas de haberse cambiado el medio. En el lote 10 grupos de dos botellas fueron estudiadas para nitrógeno a las 0, 12, 24, 48 y 72 horas de cambio de medio.

Glucógeno. La determinación de glucógeno fue hecha con la técnica de Carrol y Longley¹⁷. El glucógeno es extraído con KOH hirviente por 30 minutos y después precipitado por etanol al 96%; el glucógeno

no precipitado se disuelve en 1 cc de agua. Se añaden 10 cc de reactivo de antrona y se coloca en baño a ebullición por diez minutos; el glucógeno al ser puesto en baño maría con la antrona forma un complejo de color cuya intensidad es proporcional a la cantidad de glucógeno. La densidad óptica de este color fue leída en un colorímetro Coleman Jr. a 620 milimicras. La curva de calibración fue hecha con cantidades conocidas de glucosa tratadas bajo condiciones similares. El factor de conversión de glucosa a glucógeno es de 0.92. Todos los resultados son expresados como microgramos de glucógeno por 100 microgramos de nitrógeno.

En los lotes 4 y 5 el glucógeno fue estudiado en grupos de tres botellas, en los lotes 6, 7 y 9 en grupos de cinco botellas. En estos lotes se estudió glucógeno y nitrógeno a las 48 horas de haberse cambiado el medio. En el lote 8 se determinó nitrógeno y glucógeno a las 6 y 48 horas de haberse cambiado el medio en grupos de dos botellas. En el lote 10 a las 0, 12, 24, 48 y 72 horas en grupos de dos botellas.

Acido ribonucleínico y desoxirribonucleínico. Se utilizó la técnica de Schmidt y Thanhauser¹⁸, modificada para la determinación de ácido ribonucleínico (RNA). Se toma una cantidad apropiada de células y se precipitan proteínas y extraen compuestos fosforados libres con ácido tricloroacético frío al 10% por tres veces consecutivas. Al último centrifugado se le extraen lípidos con lavados sucesivos con acetona, alcohol, alcohol-cloroformo 3:1, alcohol-eter 3:1 y eter. El centrifugado es tratado después con NaOH N a 37° C por 24 horas para hidrolizar el RNA a nucleótidos, quedando el ácido desoxirribonucleínico (DNA) en solución. El residuo que queda sin digerir con NaOH normal, guardando los sobrenadantes. Estos son neutralizados con HCl 5 N y tratados con medio volumen de ácido tricloroacético al 30%, precipitándose así el DNA y quedando en solución los nucleótidos de RNA. Se determina el DNA en función de desoxipentosa por el método de difenilamina de Dische¹⁹, comparando las lecturas con una curva hecha con cantidades conocidas de DNA. Los resultados se expresan como cantidades absolutas de DNA en microgramos por 100 microgramos de nitrógeno. Para determinar la cantidad de fósforo total por el método de Fiske y Sabarrow²⁰, transformando los resultados obtenidos en microgramos de fósforo en microgramos de RNA, sabiendo que este contiene un 12.8% de fósforo. Los resultados también se expresan como microgramos de RNA por 100 microgramos de nitrógeno.

Amino ácidos libres Totales. Los amino ácidos libres totales se estudiaron a las 48 horas de haberse cambiado el medio en el lote 16 a grupos de tres botellas llevadas a un volumen conocido con solución salina. El desprendimiento de las células en este caso se tiene que hacer en frío en vista de la observación de Eagle⁷ en el sentido de que la cantidad de amino ácidos puede variar cuando el desprendimiento de las células se hace a temperatura ambiente. Una alicuota de la suspensión de células es desproteinizada con H^2SO^4 y tungstato de sodio según la técnica de Folin²¹. Con una alicuota del filtrado se sigue la técnica de Frame, Russel, y Wilhemy²²; la alicuota es alcalinizada a fenolftaleína con NaOH, se añade 1 ml de tetraborato de sodio y 1 ml de 2-4 dimetilsulfonato de sodio, se coloca en baño maría por 10 minutos, se enfría, se añade 1 ml de formaldehído ácido y 1 ml de tiosulfato de sodio. Esta es una reacción colorimétrica en la que el dimetilsulfonato de sodio reacciona con los grupo amino para dar un color de intensidad proporcional a la cantidad de grupos amino presentes. La intensidad del color fue leída en un fotocolorímetro Coleman Jr. a 490 de longitud de onda. La curva de calibración fue hecha con cantidades conocidas de ácido glutámico y glicina. El blanco usado tanto para la curva como para los problemas fue agua en lugar de amino ácidos más todos los reactivos y en las mismas condiciones. Los resultados en microgramos de nitrógeno amínico por 100 microgramos de nitrógeno amínico por 100 microgramos de nitrógeno.

Cromatografía de amino ácido libres. Para la extracción de los amino ácidos se usó la técnica de Awapara²³, los amino ácidos libres son extraídos con agua caliente de las células seguido por homogeneización. Fue hecha en un homogeneizador de Potter. Después de esto, las proteínas son precipitadas por medio de etanol al 96%, se centrifuga y se desecha el precipitado. Los amino ácidos son extraídos nuevamente con cloroformo; al añadir el cloroformo se forman dos capas, la capa superior es la capa acuosa que contiene los amino ácidos. Esta capa es recogida con pipeta Pasteur y evaporada a sequedad. Los amino ácidos quedan adheridos a la pared del recipiente, se disuelven en un volumen conocido y se toma alicuotas para cromatografía.

La técnica de cromatografía usada fue la de partición en papel. Esta técnica consiste en que una serie de compuestos absorbidos (en este caso los amino ácidos) en un sólido se desplazan sobre la superficie

de este sólido por la acción de un líquido apropiado, su velocidad de movimiento será una función del grado en que están absorbidos por el sólido y de su solubilidad en la fase líquida. Cada amino ácido puede caracterizarse por un valor llamado Rf, o sea la relación que existe entre lo que se mueve el compuesto entre lo que se mueve el solvente de la fase móvil. En este caso la fase sólida fue papel Whatman¹ y la fase líquida fue una mezcla de butanol, ácido acético glacial y agua en proporciones de 4: 1: 1.

La alicuota de amino ácidos es colocada en un punto conocido del papel de cromatografía y se coloca éste en un tanque de cromatografía apropiado y previamente saturado con la mezcla de butanol, ácido acético y agua. El solvente se dejó correr a través del papel por 20 horas. Al final de las 20 horas el papel es sacado del tanque y se deja secar a temperatura ambiente. Cuando el papel se ha secado, se rocía con ninhidrina al 0.05% en butanol saturado con "buffer" de acetatos pH 7.3. Los amino ácidos aparecen entonces como manchas moradas a distintas distancias que dependen de su Rf. Los distintos amino ácidos fueron identificados comparando su Rf con el Rf de un amino ácido conocido tratado bajo las mismas condiciones.

Cuantificación de taurina, glutamina y ácido glutámico. Después de que estos amino ácidos fueron identificados por cromatografía en papel las manchas de estos impregnados con ninhidrina fueron recortadas y cortadas en pequeños pedazos. Los pedazos de papel son puestos en tubos de ensaye a los que se agrega 1 ml de ninhidrina al 2.0% en butanol saturado con buffer acetatos pH 7.3. Se coloca en baño maría a 80° C durante dos minutos. Se agregan 10 cc de acetona al 75% a cada tubo y se lee la densidad óptica en un fotocolorímetro Coleman Jr. a una longitud de onda de 500 milimicras. La curva de calibración fue hecha poniendo cantidades conocidas de ácido glutámico, glutamina y taurina puestas a correr en papel de cromatografía, bajo las mismas condiciones que los problemas. La elución y la colorimetría fue hecha bajo las mismas condiciones. Como blanco se usó un pedazo de papel de cromatografía sin amino ácidos, pero que había sido tratado en condiciones semejantes.

Glutaminasa. En el lote 13 y 14 se estudió la actividad de glutaminasa en grupos de 10 y 7 botellas respectivamente a las 48 horas de haberse cambiado el medio. Las células desprendidas en las condiciones usuales fueron llevadas a un volumen conocido con solución salina, se

tomó una alícuota para determinación de nitrógeno y otra para medir la actividad de glutaminasa. Las células fueron incubadas a 37° por 60 minutos en "buffer" de acetatos pH 4.7, como substrato se usó 0.25 cc. de glutamina 0.08 M²⁴. La actividad se puede medir cuantificando la cantidad de amoníaco liberado de la glutamina por la acción de la enzima. El amoníaco formado fue medido siguiendo la técnica de Conway²⁵. Para seguir esta técnica la incubación de la enzima se tuvo que llevar a cabo en celdillas de Conway²³. La celdilla de Conway es parecida a una caja de Petri, solo que contiene un recipiente central y que tiene la propiedad de poderse cerrar herméticamente. La glutaminasa, el substrato y el "buffer" fueron colocados en la parte externa de la celdilla de Conway; en el recipiente central de la celdilla se colocan 2.0 cc de ácido bórico con indicador de Shiro-Tashiro modificado por Conway²⁵. La celdilla es cerrada herméticamente y los componentes de la reacción enzimática son mezclados y puestos a incubar por 60 minutos. Al final de los 60 minutos la reacción se detiene con ácido tricloroacético, el cual se añade a la suspensión de células. El amoníaco fijado en el "buffer" de acetatos pH 4.7 es liberado de éste destapando ligeramente la celdilla y agregando Na₂CO₃ concentrado; la celdilla se tapa inmediatamente. Al ponerse en contacto el Na₂CO₃ con la suspensión enzimática, el amoníaco es liberado y empieza a difundirse, el amoníaco al difundirse se va fijando poco a poco en el ácido bórico, según Conway al final de dos horas prácticamente todo el amoníaco está fijado en el ácido bórico²⁵ en nuestro sistema el amoníaco tardó 24 horas en difundirse totalmente. El amoníaco al ser fijado en el ácido bórico hace subir el pH y vira el color del indicador. Al final de las 24 horas de difusión la celdilla es destapada y el ácido bórico es titulado con HCl de normalidad conocida hasta que vuelve a su color original. Conociendo el volumen de HCl gastado y su normalidad se puede calcular la cantidad de amoníaco formado por la glutaminasa en una hora. Para eliminar el posible error que pudiera existir en el caso de que existiera amoníaco previamente formado en las células se hicieron blancos bajo exactamente las mismas condiciones solo que sin agregar el substrato (glutamina 0.08 M). Los resultados para los blancos siempre fueron negativos. La actividad de glutaminasa se expresa como microgramos de amoníaco formados en una hora a 37° C por 100 microgramos de nitrógeno.

Arginasa. En el lote 16 la actividad de arginasa fue investigada según la técnica citada por Colowick y Kaplan²⁶. La determinación de la actividad enzimática requiere una incubación de las células a 37° C por 4 horas en presencia de MnSO₄ y ácido maleico; para el cuanteo de la enzima se usa arginina como sustrato e incubación por 10 minutos a 25° C y por último la determinación de la urea formada en esos 10 minutos. Las células de una botella son llevadas a un volumen conocido; de allí se toma una alícuota para determinación de nitrógeno y otra alícuota para determinación de arginasa. Las células con la enzima son activadas en las condiciones mencionadas; de esa suspensión de células, MnSO₄ y ácido maleico se toma una cantidad adecuada y se incuban a 25° por 10 minutos en presencia de arginina a pH 9.5. Al final de los 10 minutos de la reacción, se detiene por la adición de ácido acético. Se añade a la mezcla de incubación reactivo de xantidrol; este reactivo forma con la urea, dixantilurea. Cuando se agrega H₂SO₄ a la dixantilurea se forma un compuesto de color verdoso cuya intensidad es proporcional a la cantidad de urea formada en los 10 minutos. La intensidad del color fue medida en un fotocolorímetro Klett. Para eliminar el error que pueda haber por la presencia de urea dentro de las células se hizo un blanco en exactamente las mismas condiciones solo que la reacción se detiene antes de los 10 minutos de incubación a 37° C con ácido acético el valor del blanco es restado de los valores obtenidos después de los 10 minutos de incubación. La actividad de arginasa se expresa como microgramos de urea formados en 10 minutos por 100 microgramos de nitrógeno.

RESULTADOS

Nitrógeno. Los resultados de nitrógeno están expresados como microgramos de nitrógeno por botella de cultivo. Los resultados de los lotes 4, 5, 6, 7 y 9 están expresados en la tabla número 1.

TABLA 1

Número de lote	Número de determinaciones	Mcg de nitrógeno por botella
4	4	255.4 ± 42.0
5	9	388.6 ± 42.0
6	5	509.9 ± 132.0
7	6	353.3 ± 28.0
9	20	339.4 ± 51.0

El número total de determinaciones hechas fue de 44, que representan un análisis total de 194 botellas de cultivo. En los lotes 4, 5, 7 y 9 la cantidad de nitrógeno por botella de cultivo es muy semejante. La cantidad de nitrógeno se puede interpretar como índice de crecimiento celular y por los resultados obtenidos se puede decir que el crecimiento se hace dentro de ciertos límites muy parecidos de lote a lote. En el lote número se observa un aumento en la cantidad de nitrógeno por botella de cultivo algo por encima de los otros lotes, al mismo tiempo existe una dispersión muy elevada, por lo que este lote no puede ser considerado como un crecimiento celular típico.

En el lote número 10 se estudió la variación que sufre la cantidad de nitrógeno a diferentes tiempos de cultivo. La cantidad de nitrógeno se estudió a las 0, 12, 24, 48 y 72 horas. Los resultados se expresan en la tabla número 2. La cantidad de nitrógeno a las 48 horas de haberse cambiado el medio está dentro de los límites obtenidos en los análisis de nitrógeno que se hicieron en los lotes anteriores a las 48 horas, por lo que este lote se toma como un lote típico en cuanto a crecimiento celular se refiere.

TABLA 2

Horas	Número de determinaciones	Mcg de nitrógeno por botella
0	9	178.0 ± 44
12	10	151.0 ± 16
24	11	193.0 ± 9.2
48	10	204.0 ± 22
72	12	183.0 ± 13

El nitrógeno estudiado a las 12 horas muestra una disminución en cantidad en comparación con la cantidad de nitrógeno por botella de cultivo estudiada a las 0 horas; a las 24 horas la cantidad de nitrógeno ha subido a un nivel por encima de la cantidad de nitrógeno a las 0 horas, a las 48 horas el nivel de nitrógeno se encuentra aún más alto. A las 72 horas del cambio de medio la cantidad de nitrógeno empieza a disminuir, pero aún se encuentra por encima de la muestra basal. La figura 1 expresa estas variaciones.

Glucógeno. En todos los casos los resultados están expresados como microgramos de glucógeno por 100 microgramos de nitrógeno. En los lotes 4, 5, 6, 7 y 8 la cantidad de glucógeno por 100 microgramos de nitrógeno varía entre 2 y 10 microgramos. (véase tabla 3), por lo que esta relación se puede considerar bastante estable cuando los cultivos son analizados al mismo tiempo. Aún en el lote número 6 en que el crecimiento celular no fue típico la relación de glucógeno a nitrógeno se mantiene.

TABLA 3

Número de lote	Número de determinaciones	Mcg de glucógeno 100 mcg de nitrógeno
4	4	8.5 ± 2.4
5	8	2.9 ± 0.9
6	4	4.4 ± 1.7
7	5	1.6 ± 0.4
9	20	9.3 ± 1.7

217

Se consideró de interés estudiar la relación de glucógeno a nitrógeno a diferentes tiempos de incubación después de haberse cambiado el medio de cultivo a las células, se estudió la relación a las 6 y 48 horas en el lote 8. (Tabla 4 y Figura 2). Se observó una disminución en la relación de glucógeno a nitrógeno a medida que aumenta el crecimiento celular, interpretado éste como cantidad de nitrógeno.

TABLA 4, LOTE 8

Horas	Número de determinaciones	Mcg de glucógeno por 100 mcg de nitrógeno
48	29	1.8 ± 2.7
6	19	12.0 ± 0.7

TABLA 5, LOTE 10

Horas	Número de determinaciones	Mcg de glucógeno por 100 mcg de N ₂
0	6	7.5 ± 1.4
12	10	6.9 ± 2.2
12	9	6.2 ± 1.0
48	8	6.2 ± 1.7
72	8	11.7 ± 3.5

En el lote 10 se repitió este mismo tipo de experimento sólo que el análisis de esta relación se hizo en este caso a las 0, 12, 24, 48 y 72 horas después de haberse cambiado el medio de cultivo. Los resultados de este lote se expresan en la tabla 5 y en la figura 2. La cantidad de

glucógeno por 100 gamas de nitrógeno se mantiene estable desde las 0 hasta las 48 horas, a las 72 horas se observa una brusca elevación de la relación glucógeno a nitrógeno, es decir que a medida que la cantidad de nitrógeno empieza a elevarse. Esta relación de glucógeno a nitrógeno empieza a elevarse. Esta elevación no es solamente debida a la disminución del nitrógeno, ya que la baja de nitrógeno es de 10 por ciento, mientras que la elevación de la relación de glucógeno a nitrógeno es de un 57 por ciento.

Acido desoxirribonucleínico. En los lotes 11 y 12 se estudió la cantidad de ácido desoxirribonucleínico (DNA) por 100 microgramos de nitrógeno en las botellas de cultivo a las 48 horas de haberseles cambiado el medio. En el lote 12 se hizo un grupo de botellas que en lugar de tener suero de caballo en una concentración de 20 por ciento lo tenían en una concentración final de 10 por ciento; ésto coloca a las células en una situación desfavorable en cuanto a crecimiento celular se refiere. Los resultados se expresan en la tabla 6. En el lote 12 se estudió también la cantidad de ácido ribonucleínico por 100 microgramos de nitrógeno. Tabla 7.

TABLA 6

Número de lote	Número de determinaciones	Mcg. de DNA por 100 mcg de nitrógeno
11	5	15.7 ± 1.2
12	4	21.3 ± 6.9
12*	4	16.7 ± 4.0

TABLA 7

Número de lote	Número de determinaciones	Mcg. de RNA por 100 mgs de N ₂
12	4	63.9 ± 8.0
12*	4	64.3 ± 12.1

* El medio contiene 10% de suero de caballo. La cantidad de DNA por 100 microgramos de nitrógeno en todos los casos fue estrictamente comparable. La cantidad de DNA varió de 15.7 a 21.3 microgramos por 100 microgramos de nitrógeno. En el lote en que las células fueron colocadas en situaciones adversas la relación de DNA a nitrógeno se mantuvo entre estos valores. La cantidad de RNA por 100 microgramos de nitrógeno fue prácticamente la misma cuando las células fueron colocadas en situaciones adversas que cuando estas estuvieron en condiciones normales.

Amino ácidos libres. En el lote 16 se estudió la cantidad de amino ácidos libres por 100 microgramos de nitrógeno. Los resultados se expresan en la tabla 8 en forma de microgramos de nitrógeno amínico por microgramos de nitrógeno. Se hicieron un total de 5 determinaciones.

TABLA 8

Número de lote	Mcg de N ₂ amínico por 100 mcg de N ₂	Número de determinaciones		Micromolas por 100 mcg de N ₂		
				Glutamina	A. glutámico	Taurina
16	4.1 ± 1.2	5	4*	0.008 ± 0.002	0.008 ± 0.001	0.045 ± 0.007

Cromatografía de amino ácidos libres. La cromatografía reveló la presencia de 8 compuestos que dan reacción con la ninhidrina, de estos 8 compuestos 6 lograron ser identificados con seguridad: cistina, ácido glutámico, fenilalanina, leucina, glutamina y taurina. Tres de los componentes no pudieron ser identificados.

Glutamina y ácido glutámico libres. La cantidad de glutamina, ácido glutámico y taurina se expresan como micromolas de amino ácido por 100 microgramos de nitrógeno. Los valores en cada uno de estos amino ácidos también fueron bastante estables. Los resultados se expresan en la tabla 8. Los valores individuales de la glutamina variaron de 0.005 hasta 0.010 micromolas con un promedio de 0.008 — 0.002. El ácido glutámico tuvo unos valores individuales que variaron desde 0.006 hasta 0.009 micromolas con un promedio de 0.008 — 0.001. La taurina varió de 0.036 hasta 0.052 micromolas, con un promedio de 0.045 — 0.007.

Arginasa. La actividad de arginasa de las células en este sistema de cultivo de tejido fue estudiada en el lote 16, su actividad se expresó como microgramos de urea formadas en 10 minutos por 100 microgramos de nitrógeno. Tabla 9. Los valores individuales en 5 determinaciones variaron de 2.8 hasta 5.6 microgramos de urea con un promedio de 4.1 — 1.7.

TABLA 9

Número de lote	Número de determinaciones	Mcg de urea formados por 100 mcg de N ₂ en 10 min.
16	5	4.1 ± 1.0

* 3 determinaciones en el caso del ácido glutámico. Los valores son bastante constantes, varían desde 3.0 hasta 5.9 con un promedio de 3.6 y con una desviación standard de — 1.6.

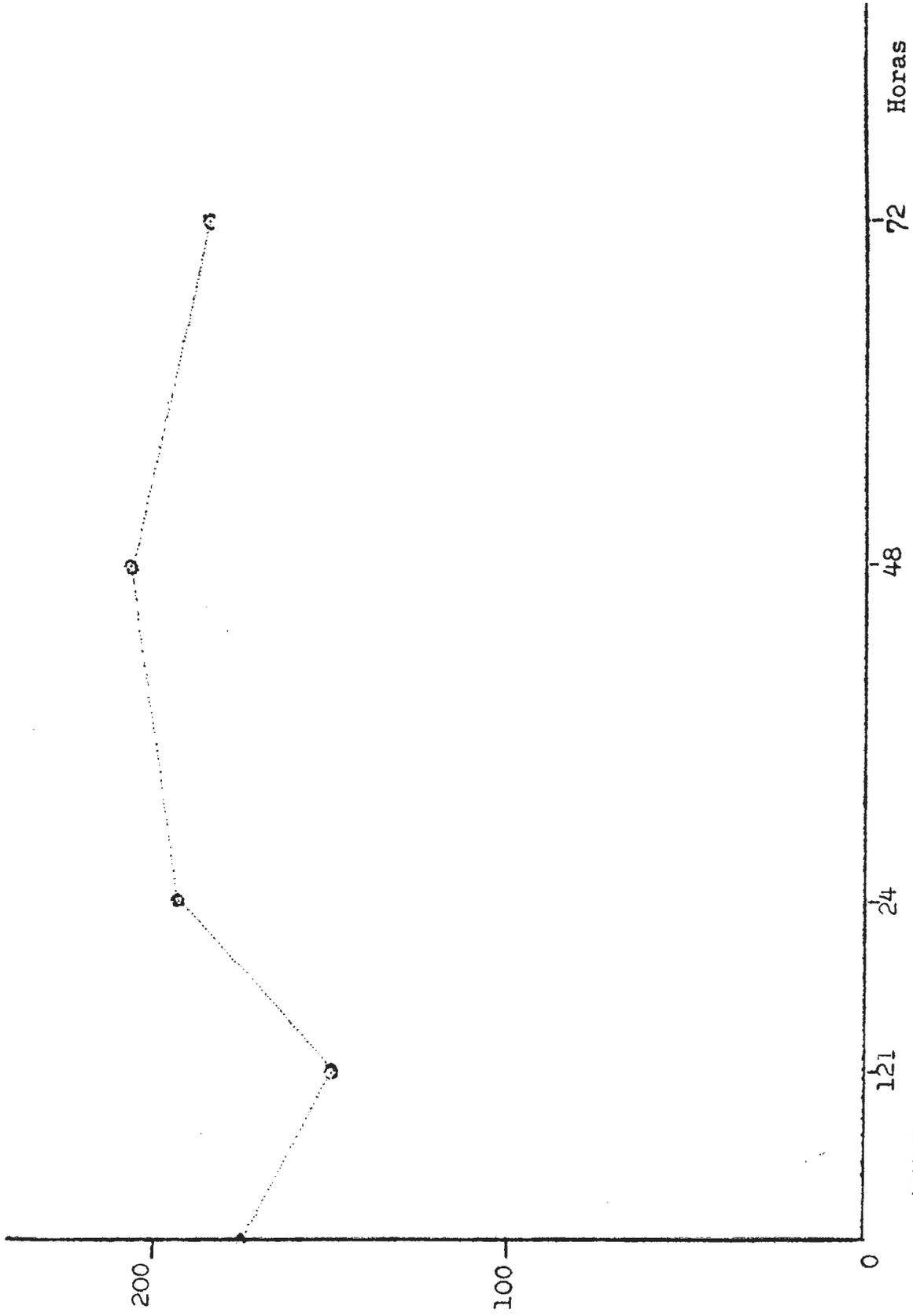


FIGURA 1 LOTE 10, VARIACION DE NITROGENO EN RELACION CON TIEMPO.

MICROGRAMOS DE NITRÓGENO POR BOTELLA

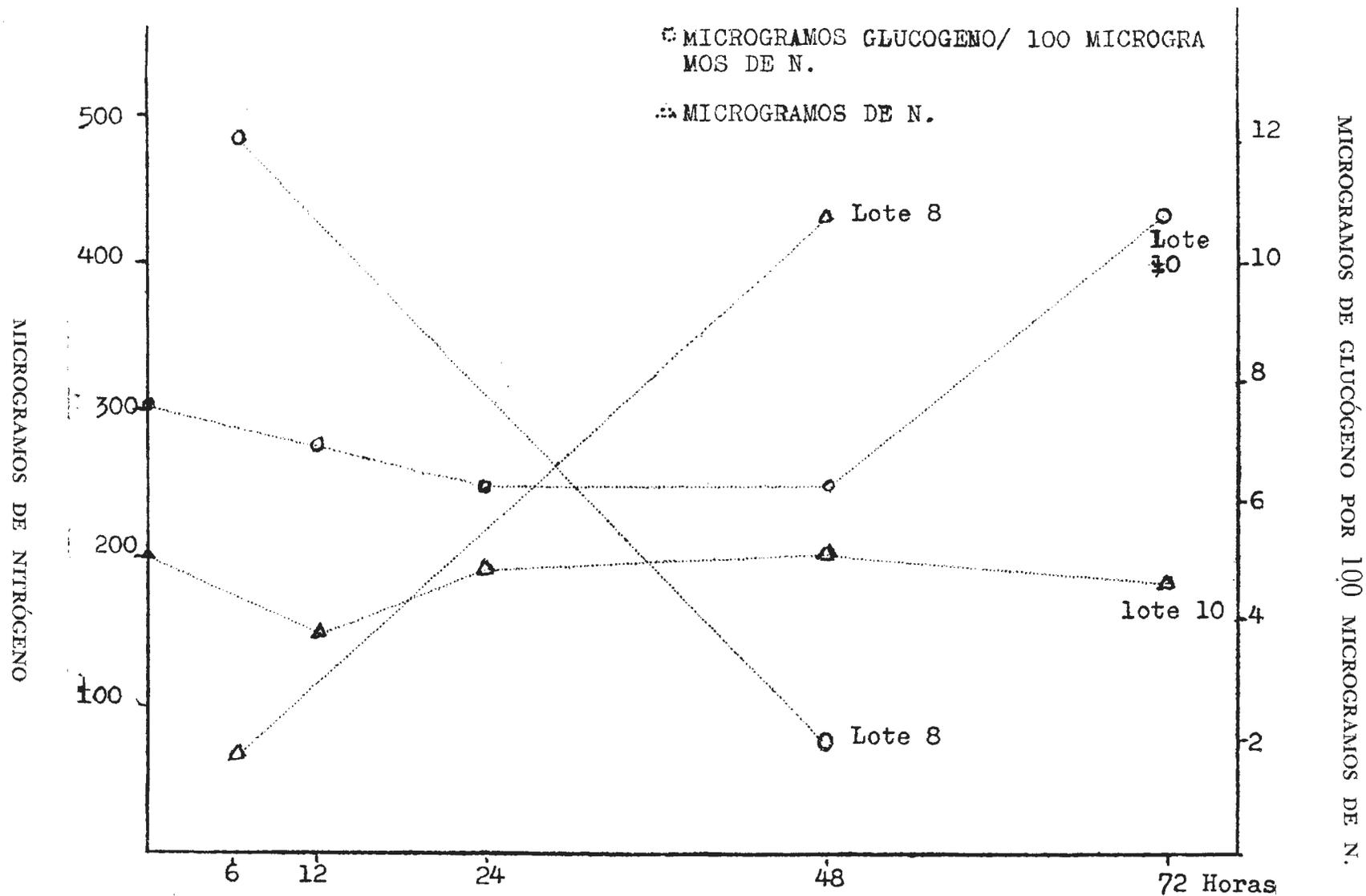


FIG.2 I. VARIACIONES DE NITROGENO A DIFERENTES TIEMPOS
 II. VARIACIONES DE LA RELACION GLUCOGENO/NITROGENO A DIFERENTES TIEMPOS.

Glutaminasa. La actividad de glutaminasa fue estudiada en dos lotes diferentes; en el lote 13 y en el lote 14, la actividad se expresó como microgramos de NH_3 formados en 60 minutos por 100 microgramos de nitrógeno. Los resultados se expresan en la tabla 9.

TABLA 9

Número de lote	Número de determinaciones	Mcg de NH_3 en 6 min. por 100 mcg de N_2
14	6	4.4 ± 1.0
13	2	8.0 ± 1.4

Los resultados dentro de un mismo lote fueron estrictamente comparables; en el lote 13 los resultados variaron de 7.0 a 9.0 microgramos de NH_3 , mientras que en el lote 14 varían de 3.3 a 5.6 con un promedio de 4.4 ± 1.0 . Los resultados de actividad de glutaminasa variaron significativamente de lote a lote por razones hasta ahora desconocidas.

DISCUSIÓN

El crecimiento celular neto puede derivarse de los resultados del análisis del nitrógeno; en general, los datos son bastante parecidos cuando los lotes de botellas de cultivo se tratan bajo condiciones similares; así, 6 lotes estudiados y el lote 10 de las 48 horas también puede ser incluido aquí 5 mostraron valores de nitrógeno parecidos.

Las cantidades de nitrógeno por botella de cultivo varían a diferentes tiempos de incubación, hecho ostensible en los resultados del lote 10; se advierte la disminución en la cantidad de nitrógeno a las 12 horas después del cambio de medio, para que después se presente una elevación gradual hasta las 48 horas, para alcanzar un nivel por encima de la cantidad de nitrógeno a las 0 horas. A las 72 horas aparece una disminución en la cantidad de nitrógeno en comparación con los datos de las 48 horas, pero todavía por encima de los valores de nitrógeno a las 0 horas. Estas variaciones pudieran ser interpretadas de la manera siguiente; la disminución del nitrógeno a las 12 horas en comparación con el nitrógeno a las 0 horas se puede deber a los cambios de medio, temperatura, etc., a que se someten las células. Que después de esto las células siguen creciendo es aparente, pues el nivel de nitrógeno se eleva a las 24 horas y a las 48 horas se encuentra aún más alto. A las

72 horas el nivel de nitrógeno empieza a disminuir, lo que puede indicar muerte celular y disgregación de la célula al medio o una disminución en la síntesis de proteína.

La constancia de la relación de DNA a nitrógeno era de esperarse. El cuanteo de DNA en cultivos de tejido se considera que es el mejor índice de crecimiento celular que existe²⁶. La determinación de nitrógeno probablemente ocupa el segundo lugar. En este caso la relación de DNA a nitrógeno fue constante en tres estudios diferentes, por lo que cualquiera de las dos determinaciones puede ser tomada como índice de crecimiento celular.

Los resultados obtenidos con el glucógeno son bastante interesantes. En dos lotes estudiados se observa una relación inversa entre la cantidad de glucógeno y nitrógeno; es decir que a medida que la cantidad de nitrógeno es mayor la cantidad de glucógeno es menor, lo inverso también sucede, cuando la síntesis de proteína disminuye, como se observa en el lote 10 a las 72 horas, la cantidad de glucógeno aumenta bruscamente. Esto es similar a los datos obtenidos por King y cols.⁶ en sus estudios sobre la relación que existe entre colesterol y nitrógeno; cuando la síntesis de proteína es activa la relación es baja y cuando estos autores bloquearon la síntesis proteica por un antagonista de la fenilalanina, la p-fluorofenilalanina, la relación subió.

Sin embargo la relación glucógeno-nitrógeno es bastante estable en un tiempo dado como lo demuestra el análisis de los lotes estudiados al mismo tiempo. En el mismo lote 10 la relación de glucógeno a nitrógeno se mantiene estable entre las 24 y 48 horas.

El cuanteo de amino ácidos libres y el patrón de amino ácidos libres obtenido cromatográficamente está de acuerdo con los resultados obtenidos por Piez y Eagle en células HeLa y conjuntiva humana⁷. Los principales amino ácidos encontrados por estos autores fueron la taurina, la glutamina y el ácido glutámico. En este estudio se encontró la glutamina, el ácido glutámico y la taurina como componentes muy importantes. La presencia de una cantidad muy importante de amino ácidos libres y un patrón cromatográfico parecido ya en cuatro tipos de cultivo diferentes es de interés desde el punto de vista de los estudios hechos por Gerarde²⁸. Este autor ha encontrado que las proteosas y los hidrolizados enzimáticos del medio de cultivo no son suficientes para llenar los requisitos de las células normales, pero que es muy significativo lo que estas grandes moléculas contribuyen a una rápida proliferación celular. El hecho de que el extracto embrionario, en altas concen-

traciones, permite nueva síntesis de proteína *in vitro* por algunas semanas, ha permitido que estos investigadores hagan estudios sobre los fragmentos de nitrógeno utilizados. Este trabajo se hizo utilizando amino ácidos marcados con C14, colocados en estado libre o unidos a las proteínas enteras del extracto de embrión y estudiaron hasta que punto el crecimiento depende de los amino ácidos libres o de los amino ácidos incorporados a las proteínas. Concluyeron que: 1) Que los amino ácidos libres son utilizados sólo cuando existen junto con moléculas más grandes y complejas como fuente de nitrógeno. 2) Que hay una utilización continua de los péptidos. 3) Que la principal utilización de los amino ácidos viene de las proteínas, aún cuando existen amino ácidos libres en el medio. La gran facilidad para utilizar moléculas grandes como fuentes de amino ácidos también está indicado por el hecho de que cuando en los cultivos de tejido la energía es desacoplada por medio de dinitrofenol o cuando se utiliza la p-fluorofenilalanina como un antagonista por competencia la incorporación de amino ácidos libres es inhibida mientras que la utilización de proteína continúa²⁹.

La importancia de la glutaminasa reside, primero, en el hecho de que esta enzima, bajo condiciones normales, actúa sobre la glutamina del riñón para formar amoníaco, el cual es excretado en la orina y segundo, que la glutaminasa puede actuar sobre la glutamina liberando su grupo amídico el cual puede ser utilizado en la síntesis del ribótido de formilglicinamidina, un compuesto intermediario en la síntesis de las bases púricas de los ácidos nucleicos. Sería interesante conocer en estos cultivos de tejido que tanto de ese grupo nitrogenado es excretado como amoníaco y que tanto es utilizado para la síntesis de las bases púricas.

Que estos cultivos de células de riñón de conejo posean actividad de arginasa es interesante, ya que el riñón en un organismo posee muy poca actividad de arginasa, siendo la principal fuente de esta enzima el hígado. Se sabe que la arginasa puede actuar sobre la arginina para formar urea y ornitina, esta última se puede transformar en citrulina (un compuesto estructuralmente intermedio entre la ornitina y la arginina) y esta a su vez en arginina y en esta forma parte del ciclo de formación de urea. Desde el punto de vista energético este ciclo es incompleto, la síntesis de urea comprende la formación de dos grupos amídicos, un proceso endergónico y el ciclo no menciona ninguna entrada de energía. El ciclo ha sido estudiado con más detalle durante los últimos años y ahora se sabe que NH_3 y CO_2 entran al ciclo en forma de un

compuesto, el carbamil fosfato y que la síntesis de éste requiere ATP y una enzima llamada la sintetasa del carbamil fosfato. Este carbamil fosfato entra al ciclo en el paso de ornitina a citrulina. En la conversión de citrulina a arginina se sabe que el ácido aspártico es el donador del grupo amonio. El ácido aspártico a su vez al ceder el grupo amonio se transforma en ácido fumárico y éste a su vez en ácido málico, después a oxalacético y éste último por una reacción de transaminación se puede volver a transformar en ácido aspártico. El dato aislado de actividad de arginasa en estas células es de poco valor en vista de lo complejo que es la formación de urea, para que este dato tenga valor sería necesario relacionarlo con la posible actividad de la sintetasa del carbamil fosfato, así como con la parte cuantitativa que desempeña el ácido aspártico.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

En vista de que las recientes técnicas de cultivo de tejidos permiten obtener suficiente cantidad de una estructura viva homogénea y no sujeta al influjo de muchas variables como las que existen en el organismo íntegro con lo que permiten tener un sistema de estudio que facilita el análisis de los efectos producidos por drogas, metabolitos virus, etc., y como, además, para estudiar los efectos se necesita conocer las constantes bioquímicas del tejido o células en cuestión, se planteó este estudio para obtener los datos cuantitativos bioquímicos de las células epiteliales de riñón de conejo que últimamente se han utilizado con creciente frecuencia para diversos estudios, especialmente en el campo de la virología.

Se hicieron 16 experimentos que comprendieron el cultivo de 50 a 150 botellas de riñón de conejo tripsinizado por experimento y colocando las células aisladas en capa única. La incubación preliminar se hizo durante 5 días al cabo de los cuales se cambió el medio nutritivo semisintético y se procedió a hacer el estudio de las siguientes constantes:

Nitrógeno: el promedio por botella fue de 255.4 a 509.9 microgramos, Glucógeno: 1.6 a 9.3 microgramos de glucógeno por 100 microgramos de nitrógeno. Acido desoxirribonucleínico: 15.7 a 21.3 microgramos por 100 microgramos de nitrógeno. Acido ribonucleínico: 63.9 a 64.3 microgramos por 100 microgramos de nitrógeno. Amino ácidos libres totales: 4.1 microgramos de nitrógeno amínico por 100

microgramos de nitrógeno. Glutamina: 0.008 mM por 100 microgramos de nitrógeno y taurina 0.045 mM por 100 microgramos de nitrógeno. Las enzimas estudiadas, relacionadas con el metabolismo proteínico fueron la arginasa y la glutaminasa. La arginasa que mostró actividades de 4.1 unidades Archibald y la glutaminasa que mostró variaciones de 4.0 a 8.8 unidades.

El conocimiento de estas constantes es muy importante, pues como ejemplo particular que puede ampliarse de modo considerable ha permitido estudiar diversos efectos de las hormonas de tipo esteroide, que se están estudiando en el laboratorio donde se llevó a cabo el presente trabajo.

REFERENCIAS

1. Zwartow, W. T., Westwood, J. C.: *Brit. J. Exp. Path.* 39: (5), 529, 1958.
2. Bailye, J. M. Gey, G. O., Gey, M. K., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 100: (4), 688, 1959.
3. Morgan, J. F., McCrone, M. A., *J. Nat.: Cancer inst.* 19: 393, 1957.
4. Eagle, H., Piez, K. A.; Fleischman, R.: *J. Biol. Chem.* 234: (3), 592, 1959.
5. Pileri, A., Ledoux, L.: *Biochim. et Biophys. Acta* 26: 309, 1957.
6. King, D. W. Socolow, E. L., Bensch, K. G.: *The J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5: (3), 421, 1959.
7. Piez, K. A., Eagle, H. J. J.: *Biol. Chem.* 231: 533, 1958
8. Burlington, H.: *Am. J. Physiol.* 197: (1), 68, 1959.
9. William, W., Manson, L.: *J. Biol. Chem.* 232: 230, 1958.
10. Woessner, J. F., Gould, B. S.: *J. Biophys. Biochem, Cytol.* 3: (5), 685, 1957.
11. Kovacks, E.: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 92: 185, 1956.
12. Waynouth, C. J. *Nat.: Cancer Inst.* 19: 495, 1957.
13. Younger, J. S.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 85: 202, 1954.
14. Hanks, J. H.: *An Introduction to Cell and Tissue Culture*. Cooperstow, N. Y., Burgess Publishing Co. Capítulo 3.
15. *Ibid*, Capítulo 4.
16. Kabat, E. A., Mayer, M. M.: *Experimental Immunochimistry*. pag. 282. Charles C. Thomas, Springfield, Ill., 1948.
17. Carroll, V. N., Longley, R. W., Rce, J. H. *J. Biol. Chem.* 220: 583, 1956.
18. Schmidt & Thannhauser, *J. Biol. Chem.* 161: 823, 1945, Citado por McIndoe, W. M., Davidson, I. N.: *The Phosphorus Compounds of the Cell Nucleus*. *Brit. J. of Cancer.* 6: 200,
19. Dische, Z.: *Microchemie*, 8: 4, 1930. Citado por Colowick S. P. and Kaplan, N. O., *Methods in Enzimology*, the John Hokins Univerity Press. 1955.
20. Fiske, C. H.; Subarrow, N. Y.: *Biol. Chem.* 375: 1925.
21. Folin, O.: *J. Biol. Chem.* 51: 377, 1922.

22. Frame, E. G., Russell, J. A., Wilhemy, A. E.: *J. Biol. Chem.* 149: 255, 1943.
23. Awapara, J.: *Arch. Biochem. Biophys.* 19: 172, 1948.
24. Colowick, S. P., Kaplan, N. O.: *Methods in Enzimology*. v. 2, pág. 380. The John Hopkins University Press, 1955.
25. Conway, E. J.: *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*. London, Crosby, Lockwood and Son. Ltd. 1947.
26. Colowick, S. P., Kaplan, N. O.: *Methods in Enzimology* v. 2 pág. 368. The University Press, 1955.
27. Healey, G. M., Fisher, D. C., Parker, R. C. *Canad. J.: Biochem. Physiol.* 32: 319, 1954.
28. Gerarde, H. W., Jones, M., Winnick, T.: *J. Biol. Chem.* 196: 56, 1952.
29. Francis, M. D., Winnick, T. *J. Biol. Chem.* 202; 273, 1953.