

## ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

# Optimización de cultivos de hepatocitos humanos para estudios de citotoxicidad\*

## Optimization of human hepatocyte cultures for cytotoxicity studies

Drs. PATRICIO CABANÉ T.<sup>1,2</sup>, JUAN CARLOS DÍAZ J.<sup>1</sup>, JORGE ROJAS C.<sup>1</sup>, FERNANDO MALUENDA G.<sup>1</sup>, GUILLERMO RENCORET P.<sup>1</sup>, KATHERINE SAUD L.<sup>2</sup>, M. LORETO GODOY V.<sup>4</sup>, DANIELA IBACACHE A.<sup>3</sup>, ALEJANDRA LEDEZMA S.<sup>3</sup>, RAÚL CAVIEDES C.<sup>2</sup> y PABLO CAVIEDES F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Cirugía - Hospital Clínico Universidad de Chile.

<sup>2</sup>Laboratorio de Cultivo de Tejidos - Facultad de Medicina Universidad de Chile.

<sup>3</sup>Alumna 2do año de Medicina (Unidad de Investigación) - Facultad de Medicina Universidad de Chile.

<sup>4</sup>Interna Facultad de Medicina. Universidad de Chile  
Santiago, Chile.

### RESUMEN

Los cultivos de hepatocitos entregan un valioso acercamiento al estudio de las funciones metabólicas específicas del hígado, evaluación de citotoxicidad. No existen líneas humanas inmortales con función normal. La inmortalización de hepatocitos humanos con el método UCHT1 (medio de cultivo condicionado por células tumorales de tiroides) permitirá prolongar la supervivencia y función de estos, siendo útil para evaluar funcionalidad y citotoxicidad. *Objetivo:* Optimizar el cultivo de hepatocitos humanos. *Metodología:* En cultivos primarios de hepatocitos humanos, se agregó medio UCHT1 cultivando en superficies de colágeno, polilisina, gelatina y matrigel. Como control positivo, se utilizó línea Gherschenson (GER) para evaluar curva de crecimiento y producción de Glucógeno (PAS). Se evaluó citotoxicidad (LIVE/DEAD) en hepatocitos GER expuestos a Metotrexato (10, 100 y 1000 mM) a 24, 48 y 72 hrs. *Resultados:* Se realizó 3 cultivos primarios. Fue efectiva la utilización de Polilisina y Colágeno. Duración 8 meses. No se ha realizado la curva de crecimiento, ni evaluación de funcionalidad en hepatocitos humanos. La línea GER tiene un crecimiento exponencial (tiempo duplicación: 36 hrs). Se observó producción de glucógeno en condiciones de diferenciación hasta 120 hrs. La citotoxicidad por Metotrexato tiene una curva dosis dependiente, significativa en todas las concentraciones ( $p < 0,001$ ) (CL50 a 1000 mM a 24 hrs). *Conclusiones:* Se logró establecer una línea primaria de hepatocitos humanos. La polilisina y el colágeno han optimizado el establecimiento de cultivos primarios. El método PAS permitió evaluar producción de glucógeno (diferenciación). Los valores de citotoxicidad demostraron un efecto dosis dependiente en las condiciones experimentales. Logrando estandarizar el método para evaluación futura de líneas celulares humanas.

**PALABRAS CLAVE:** *Cultivos primarios de hepatocitos, Líneas continuas, UCHT1, citotoxicidad, Metotrexato (MTX), Línea Gherschenson.*

\*Recibido el 5 de Octubre de 2006 y aceptado para publicación el 4 de Enero de 2007.

Correspondencia: Dr. Patricio Cabané T.

Santos Dumont 999, Santiago, Chile

e mail: pcabane@med.uchile.cl

### SUMMARY

**Background:** Hepatocyte cultures are a valuable tool to study specific metabolic liver functions and cytotoxicity. Human hepatocyte cell lines with normal function do not exist. Immortalization of human hepatocytes with a rat thyroid cell line (UCHT1) allows long-term survival and function of these cells, becoming useful to evaluate functionality and cytotoxicity. **Aim:** To optimize long-term culture of human hepatocytes. **Material and Methods:** UCHT1 media was added to primary cultures of human hepatocytes, seeding in collagen, gelatin, matrigel and polilisine surfaces. Gerschenson cell line (GER) was used as a positive control to evaluate the growth curve and Glycogen production (PAS). Cytotoxicity was evaluated (LIVE/ DEAD) in GER hepatocytes exposed to Metotrexate (10, 100 and 1000  $\mu$ M) 24, 48 and 72 hrs. **Results:** Three primary cultures were made. The use of Polilisine and Collagen was effective. Cultures were kept for 8 months. Growth curves or evaluation of functionality in human hepatocytes, were not carried out. GER cell line had an exponential growth (duplication time: 36 hrs). Production of glycogen in differentiation conditions was observed up to 120 hrs. Cytotoxicity by Metotrexate had a dose dependent curve with a 50% lethal dose calculated as 1000  $\mu$ M at 24 hrs. **Conclusions:** A primary line of human hepatocytes was obtained. Polilisine and collagen optimized the establishment of primary cultures. PAS method allowed the evaluation of glycogen production (differentiation). Cytotoxicity demonstrated a dose dependent effect in experimental conditions.

KEY WORDS: **Hepatocyte Cultures, UCHT1, cytotoxicity, Methotrexate, Gerschenson cell line.**

### INTRODUCCIÓN

Para describir la complejidad de los sistemas biológicos, se han desarrollado estudios de cultivos celulares in vitro. Con esta técnica se logra tener aproximaciones a los fenómenos celulares, lo que permite aplicaciones diagnósticas y proyecciones terapéuticas, como en farmacología donde se puede estudiar y manipular las condiciones ambientales responsables del mantenimiento de la funcionalidad celular y probar medicamentos en cuanto a seguridad y efectividad. Las líneas celulares establecidas permiten la caracterización de una muestra homogénea, al obtener un número replicado de células idénticas, superando así el problema de heterogeneidad de los resultados asociada al uso de animales de experimentación y además, suponen una economía en el uso de reactivos o drogas, pues al realizarse en volúmenes reducidos, y con acceso directo de las células a la droga, las concentraciones requeridas son mucho más bajas que en un animal completo<sup>1</sup>.

Los tipos de cultivos celulares son:

**Cultivo primario:** cultivo establecido a partir de un tejido u órgano. Las células mantienen la viabilidad durante un periodo de tiempo limitado y no se reproducen en cultivo.

**Línea primaria:** es el primer subcultivo que se obtiene a partir de un cultivo primario. Estas líneas logran sobrevivir hasta cierto número de generaciones, entrando luego a un periodo de senescencia y muerte.

**Línea celular continua:** cuando la línea prima-

ria mantiene su potencial proliferativo ilimitado. Se trata de células "inmortales". Se pueden obtener por medio de transformación espontánea o manipulada por oncogenes y/o factores mitogénicos.

La obtención de una línea continua de hepatocitos humanos nos entrega un atractivo e importante acercamiento al estudio de las funciones específicas del metabolismo del hígado humano, las interacciones entre las células hepáticas y los agentes infecciosos, fármacos y un modelo muy importante para estudios de citotoxicidad.

Los cultivos primarios de hepatocitos humanos en adhesión mantienen su diferenciación hasta un máximo de dos semanas. Entre las metodologías utilizadas para prolongar la viabilidad y funcionalidad celular, podemos mencionar: matrices de colágeno, matrigel, sándwich de colágeno y cultivo en tres dimensiones. Mediante éstas, se ha logrado mantener cultivos primarios de hepatocitos a largo plazo por periodos que van desde 120 a 150 días (sin subcultivos), manteniendo las funciones de estos en condiciones óptimas, medidas a través de la evaluación de sus vías metabólicas, tales como, síntesis de proteínas, función enzimática y metabolización de tóxicos<sup>2</sup>. Aún así el tiempo de cultivo es limitado, no permitiendo experimentos más duraderos.

Se han descrito tres líneas continuas de hepatocitos humanos obtenidas por transformación oncogénica, pero estas no mantienen la totalidad de sus funciones metabólicas, no permitiendo extrapolar los resultados de citotoxicidad a fármacos en hígado humano sano<sup>3</sup>.

En nuestro laboratorio hemos logrado la inmortalización de distintas líneas celulares (músculo esquelético, neuronas, paratiroides, granulosa humana y tiroides), mediante la exposición de los cultivos primarios a un medio de cultivo condicionado por células tumorales de tiroides (UCHT-1)<sup>4,5</sup>. Estas líneas inmortales, mantienen sus funciones diferenciadas a largo plazo, siendo modelos *in vitro* de gran valor para la ciencia<sup>6</sup>. esperando conseguir a futuro el mismo resultado con hepatocitos humanos.

En base a estos antecedentes, el propósito de nuestra investigación es prolongar aún más el período de vida de las células en cultivo, y conservar sus funciones a largo plazo, mediante el uso del método de inmortalización y la modificación de superficies de cultivo. Además se evaluará la citotoxicidad a fármacos conocidos como hepatotóxicos (metotrexato), sirviendo de base para investigaciones futuras.

### MATERIAL Y MÉTODO

Se obtuvo tejido hepático de pacientes sometidos a una hepatectomía por patología benigna en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Usamos como criterio de exclusión pacientes con etilismo crónico, infecciones por virus de hepatitis B o C, patología autoinmune, antecedentes de cáncer, esteatosis, citomegalovirus. Se aplicó un formulario de consentimiento informado (aprobado por el comité de ética del hospital). Proyecto aprobado por la Oficina de Apoyo a la Investigación (OAIC) de nuestro hospital.

Como control positivo y estandarización de la metodología, se utilizó la línea continua de hepatocitos de rata Fisher 344 Gerschenson (GER)<sup>7</sup>.

Se trasladó las muestras en medio de cultivo a 4°C. Con técnica estéril el tejido fue manipulado bajo campana de flujo laminar, donde se perfundió el tejido con colagenasa V (sigma) a 37°C. Luego se disgregó mecánicamente, separando el tejido conectivo del parénquima. Se continuó con la disgregación enzimática en colagenasa a 37°C. Se mantuvo las células en medio DMEM/F12 suplementado con Suero Bovino al 10%, Suero Fetal Bovino al 5%, Insulina 10 mgr/ml y medio UCHT1 al 10%. (Medio Completo). Se incubó en cámara de cultivo con 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de humedad y 37°C.

Se evaluó la producción de Glucógeno por tinción de PAS como evidencia de diferenciación de los hepatocitos. Se observó en microscopio de luz y se registraron las imágenes digitales con cámara CoolSnap cf para su evaluación posterior.

La caracterización morfofocinética de los cultivos se realizó mediante una curva de crecimiento con-

trolando en triplicado a distintos tiempos de cultivo, con cámara de Neubauer. Se sembraron 10.000 células por placa de 3,5 cm de diámetro y el conteo se realizó cada 24 hrs. El tiempo de duplicación se definió como el tiempo en que se duplica el número de células en cultivo.

Para la evaluación y estandarización de un método *in vitro* de hepatotoxicidad se utilizó Metotrexato y se evaluó la citotoxicidad por método de LIVE/DEAD® (calceína/yoduro de propidio). Se sembraron los hepatocitos de cultivos primarios y de la línea Gerschenson a baja confluencia (3.000 células) sobre cubreobjetos<sup>8</sup> en placas de 3,5 cm en triplicado. Se utilizó medio DMEM/F12 sin suero con distintas concentraciones de Metotrexato (10-100-1000 mM) y a distintos intervalos de tiempo (24-48-72 hrs.). Se contaron las células en microscopio de fluorescencia, con filtro verde para calceína (células vivas) y con filtro rojo para yoduro de propidio (células muertas). De esta forma se obtuvo el porcentaje de viabilidad (células vivas/células totales x 100) y el porcentaje de citotoxicidad (células muertas/células totales x 100). Este mismo procedimiento se realizó a las 48 y 72 hrs de exposición.

Los resultados se presentan como promedio + SD (desviación estándar) de las distintas situaciones experimentales. Para determinar si existe diferencias estadísticamente significativas, se utilizó un test no paramétrico para múltiples comparaciones (análisis de varianza, ANOVA) y el test t de Student para comparaciones entre dos grupos con un límite de confianza de 95% (p<0,05).

### RESULTADOS

Optimización del cultivo primario: Se han realizado 3 cultivos primarios de hígado humano, de pacientes intervenidos por patología benigna (Quistes hidatídicos, hiperplasia nodular focal). Sólo uno de ellos fue efectivo, al utilizar superficies modificadas de cultivo. Hubo mayor eficiencia de siembra en placas con Polilisina y Colágeno, los que se mantuvieron vivos por 6 meses. Se logró realizar un subcultivo, es decir hemos logrado establecer una línea primaria de hepatocitos humanos. Sin embargo, al 8º mes el cultivo entró en senescencia.

En la evaluación de la producción de Glucógeno, se realizó la tinción de PAS en condiciones de proliferación (medio completo) y de diferenciación (medio con suero al 1%). Los hepatocitos de rata (GER) tuvieron mayor tinción de glicógeno en condiciones de diferenciación a las 120 hrs de cultivo (Figura 1).

Para la caracterización morfofocinética de los cultivos se estandarizó la obtención de una curva de

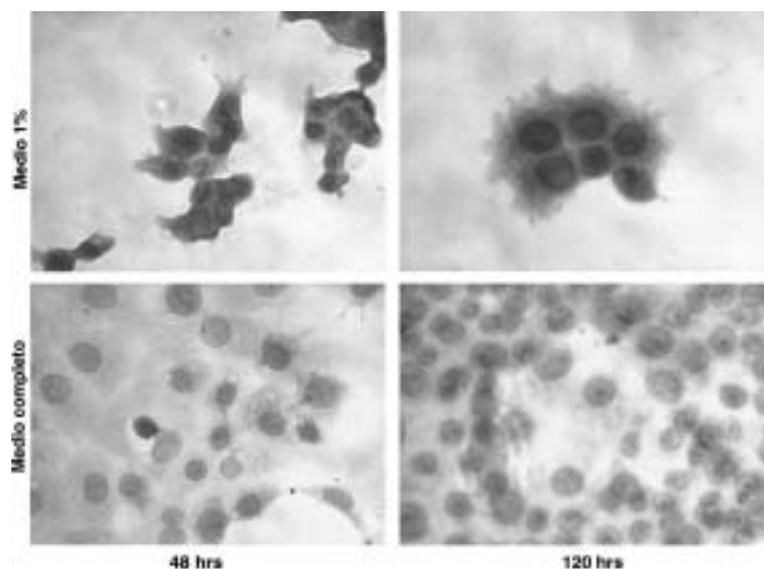


Figura 1. Tinción de Pas en condición de diferenciación (Medio 1%) v/s condición de proliferación (Medio Completo).

crecimiento, para esto se realizaron 2 experiencias en la línea continua de hepatocitos de rata GER, en que se sembraron 10.000 células en triplicado en placas de 3,5 cm y se contaron las células cada 24 hrs. por un periodo de 2 semanas, con lo que se obtuvo una curva de crecimiento exponencial típica de una línea continua, con un tiempo de duplicación de 36 hrs. (Figura 2) No se ha realizado la curva de crecimiento de los cultivos primarios.

Se evaluó citotoxicidad por MTX según el método LIVE/DEAD. Se fotografiaron las placas por separado. Se consideró como células viables las que tuvieran tinción verde, y células inviables las que tuvieran sólo tinción roja.

De acuerdo a los resultados obtenidos (Figura 3), se ve una clara tendencia a un aumento de

células muertas en relación al aumento de las concentraciones de MTX y al tiempo de exposición. A mayor tiempo de exposición, mayor número de células muertas y a mayor concentración de MTX hay también mayor número de células muertas.

El CL50 (concentración letal 50) fue de 1000 mM a las 24 hrs., es decir a las 24 hrs. de exposición a una concentración de 1000 mM, murieron el 50% de los hepatocitos en cultivo.

En relación a las rectas, las tres presentan una pendiente similar, lo que indica que el MTX a medida que aumenta el tiempo de exposición tiene una citotoxicidad proporcional a este, sin influir en la pendiente las diferencias de concentración. La diferencia entre las distintas condiciones son estadísticamente significativas con un  $p < 0.001$ .

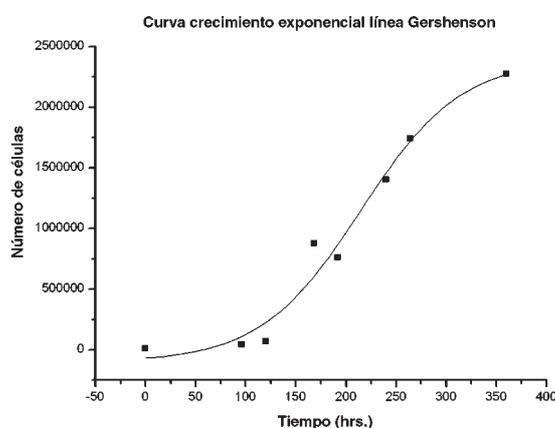


Figura 2. Curvas de crecimiento exponencial de línea Gershenson (n=3).

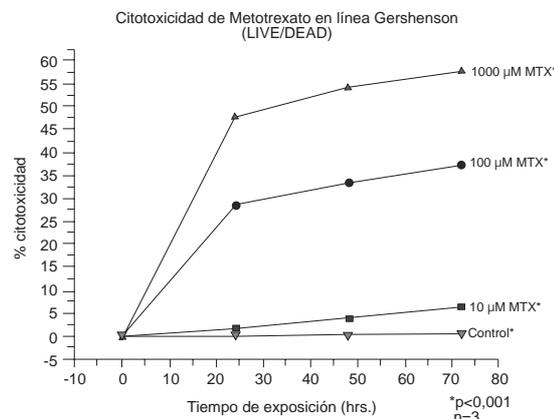


Figura 3. Curvas de Citotoxicidad a Metotrexato. Línea GER. \* $p < 0,001$  n=3

## DISCUSIÓN

Hemos logrado optimizar el establecimiento de los cultivos primarios de hepatocitos humanos mediante la utilización de superficies modificadas. Hui-Lui y otros<sup>9,10</sup> utilizaron como superficie en las placas, el sándwich de colágeno, lo que ha permitido obtener cultivos de hasta 120 días. Nosotros hemos mantenido los cultivos primarios por más de 180 días y un subcultivo, con polilisina y colágeno. Con respecto a la curva de crecimiento no se ha realizado en hepatocitos humanos, ya que estos no lograron sobrevivir para realizar más experimentos. En la línea GER se estandarizó la curva de crecimiento, obteniéndose la clásica forma de crecimiento exponencial sin senescencia, confirmando que esta es una línea continua. La detección de glucógeno por método PAS para medir funcionalidad celular ha resultado, pero ha mostrado ser un método bastante sensible a la manipulación de la técnica y no permite cuantificar la cantidad de glucógeno.

Un problema clínico importante es el daño hepático por fármacos (DHF), relacionado directamente con una intervención médica y de difícil diagnóstico. El antineoplásico Metotrexato (MTX), es el fármaco que a nivel nacional, ha generado más casos de DHF en pacientes tratados a largo plazo<sup>11</sup>. Además MTX muestra toxicidad *in vitro* en hepatocitos de rata<sup>9,12</sup>. De esta forma este fármaco nos permitirá establecer un modelo de hepatotoxicidad conocido como control.

Así como los resultados de citotoxicidad que obtuvieron Walter y cols.<sup>9</sup>, nosotros observamos que la citotoxicidad por MTX tiene una curva dosis dependiente que es significativa en las concentraciones evaluadas en el tiempo. Utilizamos un método sencillo y reproducible que permitirá evaluar la proliferación, viabilidad y citotoxicidad en nuestras líneas de hepatocitos humanos, teniendo como control una línea celular continua de hepatocitos conocida<sup>13</sup>.

Además de los mencionados beneficios en farmacología, existe también la posibilidad de establecer una fuente de células para trasplante celular, como se han utilizado en cotrasplante de islotes de Langerhans en Diabetes<sup>14</sup>. O bien, avanzar en tecnologías de soporte de la función hepática (ej: Hígado Bioartificial) en insuficiencia hepática aguda, que hasta el momento utilizan líneas celulares de hepatocitos de porcino<sup>8,12</sup>.

En suma, en el período de estudio se ha logrado establecer una línea primaria de hepatocitos humanos, y optimizar el establecimiento de cultivos primarios mediante el uso de superficies modifica-

das, siendo la más efectiva la polilisina y el colágeno. Se logró montar y estandarizar métodos de seguimiento de función celular en una línea control, para ser utilizados en caso de obtener una línea continua de hepatocitos humanos.

Se obtuvo los valores de citotoxicidad de un fármaco que muestra DHF en la clínica y que muestra una toxicidad dosis dependiente en condiciones experimentales *in vitro* en hepatocitos de rata. Mediante estas técnicas se tiene un control preciso del medio físico-químico, no precisa de grandes cantidades de fármaco y métodos como LIVE/DEAD<sup>®</sup> son de bajo costo, fácil implementación y otorgan resultados directos acerca del daño.

**AGRADECIMIENTOS:** A la Oficina de Apoyo a la Investigación Clínica del Hospital Clínico de la Universidad de Chile por su constante apoyo y asesoría. Inscrito como Proyecto OAIC 127/05.

## REFERENCIAS

1. Freshney R. Culture of Specific cell Types. In Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique. Edited by Liss A, Inc. pp 260-261. 1987. New York.
2. Hui-Ling C, Hui-Lin W, Chun-Chun F, Pei-Jer C, Ming-Yang L. Long-Term culture of hepatocytes from Human Adults. J Biomed Sci. 1998; 5: 435-440.
3. Kidambi S, Lee I, Chan C. Controlling Primary Hepatocyte Adhesion and Spreading on Protein-Free Polyelectrolyte Multilayer films. J. Am. Chem. Soc. 2004; 126: 16286-16287.
4. Caviedes R, Liberona JL, Hidalgo J, Tascon S, Salas K, Jaimovich E. A human skeletal muscle cell line obtained from an adult donor. Bioch Biophys Acta 1992; 1134: 247-255.
5. Cabané P, Rossi R, Oviedo S, Romero C, Caviedes R, Caviedes P. Cultivo Primario e Inmortalización de paratiroides humana. Rev Chil Cir 2003; 5: 617-621.
6. Cabané P, Rossi R, Oviedo S, Romero C, Caviedes R, Caviedes P. Primera Línea Celular Inmortal de Paratiroides Humana. Revista HCUCh 2006; 17: 13-19.
7. Gerschenson LE, Andersson M, Molson J, Okigaki T. Tyrosine Transaminase Induction by Dexamethasone in a New Rat Liver Cell Line. Science 1970; 170: 859-861.
8. Nyberg SL, Shatford RA, Hu WS, Payne WD, Cerra FB. Hepatocyte culture systems for artificial liver support: implications for critical care medicine (bio-artificial liver support). Crit Care Med 1992; 20: 1157-1168.
9. Walker TM, Rhodes PC, Westmoreland C. The differential cytotoxicity of methotrexate in rat hepatocyte monolayer and spheroid cultures. Toxicology In Vitro 2000; 14: 475-480.
10. Darr TB, Hubel A. Postthaw Viability of Precultured Hepatocytes. Cryobiology 2001; 41: 11-20.

11. Contreras J, Poniachik J, Planzer M, Lazarte R, Smok G, Oksenberg D y cols. Hepatitis por drogas: hallazgos clínicos y patológicos en 33 casos. Rev Méd Chile 2003; 131: 1128-1134.
12. Allen J, Hassanein T, Bhatia S. Advances in Bioartificial Liver Devices. Hepatology 2001; 34: 447-455.
13. Bünger CM, Jahnke A, Stange J, de Vos P, Hopt UT. MTS colorimetric Assay in combination with a Live/Dead Assay for testing Encapsulated L929 fibroblasts in Alginate Poly-L-Lysine Microcapsules *in Vitro*. Artificial Organs 2002; 26: 111-116.
14. Soto ML, Río R, Alvarez S, Martín A. Co-trasplante alogénico de células hepáticas e islotes en ratas diabéticas. Mapfre Medicina 2001; 12: 198-203.