

I.	INTRODUCCION	
	a) Motivación .....	1
	b) Objetivo .....	1
	c) Antecedentes.....	2
	1.- De cultivo de tejidos .....	2
	2.- De radiobiología .....	12
	d) Revisión bibliográfica .....	19
II.	MATERIALES Y METODO	
	a) Material biológico .....	23
	b) Material no biológico .....	25
	c) Método de cultivo .....	25
	d) Método de carioanálisis .....	28
	e) Método de radiación y cuantificación .....	29
III.	RESULTADOS	
	a) Resultados preliminares .....	32
	b) Resultados de experimentación .....	39
IV.	DISCUSION .....	43
V.	CONCLUSIONES .....	46
VI.	BIBLIOGRAFIA .....	48

## I.- INTRODUCCION.

### a) Motivación.

El estudio de las neoplasias malignas ha sido un tremendo reto a la inteligencia humana, pero es alentador saber que esa obscuridad que rodea a la etiopatogené<sup>s</sup>is del cáncer está siendo penetrada por pequeños destellos de entendimiento que brotan de los centros de investigación tumoral. Cada aportación, que aisladamente parece ser pequeña, contribuye al mejor conocimiento de la biología de las neoplasias; su origen, su evolución y su resolución.

El estudio de la célula neoplásica propiamente dicha, ha acaparado la atención de los investigadores y son casi innumera<sup>b</sup>les los reportes de experiencias a este nivel. Sin embargo, aunque el oncocito es la "estrella" de la neoplasia, es bien sabido que su desarrollo y propagación es imposible sin la ayuda del tejido corporal especializado en soporte y nutrición.

El estudio del estroma tumoral está lejos de ser completo y es propósito de este autor, incursionar en este campo, -- buscando la buenaventura de aportar un conocimiento nuevo.

Siendo el fibroblasto la célula principal del tejido conectivo, se enfocará la atención sobre el y se estudiará su respuesta frente a un reto, en este caso: la radiación gamma.

### b) Objetivo.

El objetivo de esta tesis es determinar si existe una radiosensibilidad diferente entre los fibroblastos del estroma de un órgano sano y los fibroblastos del estroma de una neoplasia maligna.

### c) Antecedentes

Aunque la radiobiología ha sido estudiada extensamente - en fibroblastos obtenidos por cultivo de tejidos embrionario, fetal y adulto de origen animal y de origen humano, (2,3,4,12, 17,18,19) es de interés notar que tanto la disciplina de cultivo de tejidos así como la radiobiología y la radiobiopatología, han sido prácticamente desconocidos en nuestro medio. Este aparente vacío de conocimientos en esta rama de las ciencias biomédicas, ha hecho manifiesta la necesidad de dominar la técnica de cultivo tisular para aplicarla posteriormente al estudio de la radiobiología tumoral. Conviene pues, exponer algunos principios básicos del cultivo de tejidos y de la radiobiología para la mejor comprensión de esta tesis.

#### 1) Antecedentes de cultivo de tejidos.

En experimentación tisular se ha utilizado extensamente como modelo de tejido normal a los fibroblastos de tipo diploide (no alterados), los cuales tienen un tiempo limitado de vida in vitro (32). Se ha observado que si estos fibroblastos conservan su estado diploide, el número de duplicaciones que pueden llevar a cabo in vitro, varían en relación inversa a la edad del tejido de origen (12) y que la capacidad finita de éstos cultivos de duplicarse, es una manifestación de envejecimiento a nivel celular (9,11). En su estudio clásico, Hayflick (11) estableció que el potencial de doblaje para tejido fetal era de  $50 \pm 10$  doblajes; cinco años más tarde, Martín, Curtis y Sprauge (21) calcularon el coeficiente de regresión para donadores entre la primera y novena décadas de la vida. Este coeficiente de regresión se expresó como de  $-0.2$  doblajes por año, con una desviación estandar de 0.05 y con un coeficiente de correlación de  $-0.5$ . Se demostró que este coeficiente de regresión era significativamente diferente a cero.

A mayor edad cronológica del donador, menor la cantidad de doblajes que puede llevar a cabo su tejido in vitro. Esta reducción del potencial de replicación no es función única de la edad cronológica del donador sino además se ve influida por otros factores como son genotipo y exposición actínica (8).

Puesto que la disciplina de cultivo de tejidos se desarrolló en diversas escuelas, los términos que usaron los investigadores para nombrar un mismo fenómeno fueron distintas. Esto produjo confusión y no fué sino hasta 1961 en que Hay---flick y Moorhead (12) propusieron términos que fueron acepta-dos en forma general. Estos términos describieron cuatro características de los tejidos cuando son cultivados in vitro: cé-lulas primarias, la cepa celular, la línea celular y la alteración celular.

Células primarias: Son aquéllas células obtenidas del explante original que han sido cultivadas in vitro por primera intención. Si se efectúan pasajes subsecuentes de estas célu-las, estas llegaran a ser cepas celulares.

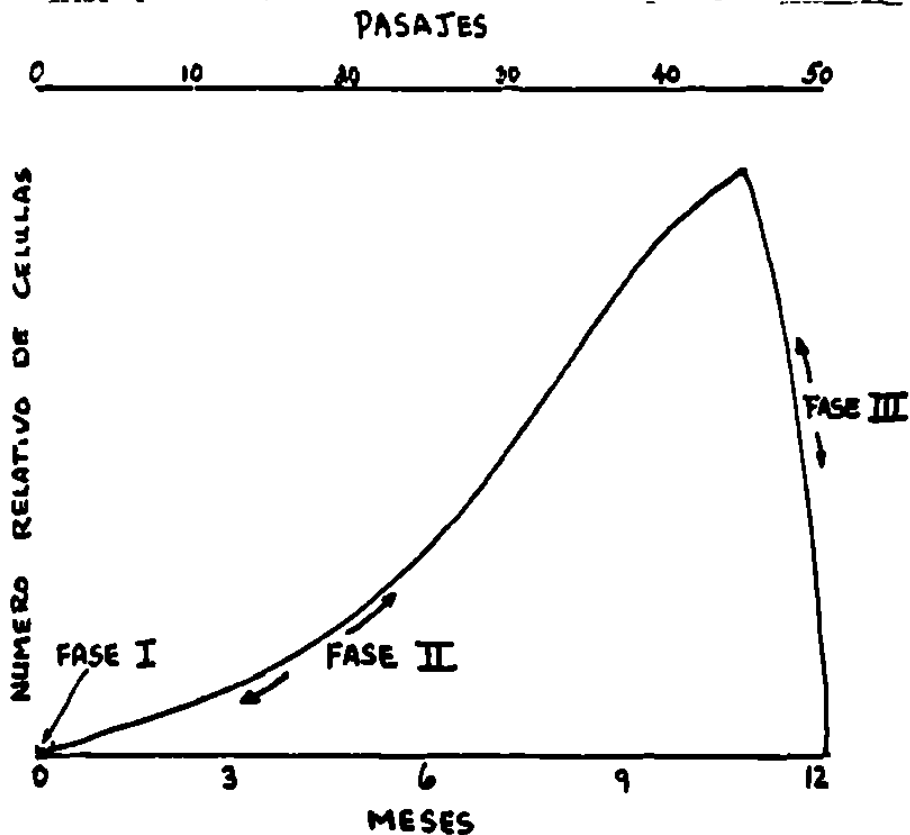
Cepas celulares: Se entiende por cepa celular aquélla población de células derivadas del cultivo de explante, que ha-yan sido subcultivadas más de una vez in vitro; su número de replicaciones es finito, no teniendo la capacidad de sufrir pasajes seriados por tiempo indefinido. Estas células conser-van el número cromosómico modal que caracteriza al tejido de origen.

Líneas Celulares: Se entiende por línea celular aquélla población de células cultivadas in vitro mediante pasajes se-riados por tiempo indefinido, con un cambio del número modal de cromosomas que caracteriza al tejido de origen. Por esta razón, los términos "línea celular establecida" y "línea celular estable" no deberan usarse, puesto que el primero es redun

dante y el segundo implica que ya no pueden ocurrir más cambios en el tejido cultivado.

La Alteración Celular: Es el cambio que sufre la cepa -- celular al pasar del estado diploide al heteroploide, adquiriendo la capacidad de sufrir pasajes seriados por tiempo indefinido. La alteración celular puede ocurrir durante la fase de crecimiento exponencial o logarítmico que ha sido nombrada como fase II.

El crecimiento de tejido in vitro no es siempre igual -- sino que pasa a través de diferentes modalidades de desarrollo. Hayflick llamó "fases" a tres distintas etapas evolutivas de los cultivos, mismas que se resumen en la siguiente gráfica:



Gráfica No. 1.- Representación gráfica de fases de crecimiento tisular en cultivo (Hayflick).

Fase I: Es la fase de crecimiento temprano que se inicia con la liberación de células del tejido y su adherencia a la superficie del frasco de cultivo. En general esta fase dura de una a tres semanas. La fase I termina con la formación de la primera capa confluyente. En este momento el cultivo esta listo para la primera disción y subcultivo ("pasaje").



Figura No. 1. Fase I. Explante rodeado de crecimiento de células primarias. 3.5X

Figura No. 2. Fase I. Explante rodeado de monocapa confluyente. Fijado, H y E. 10X



Figura No.2. Fase I. Explante rodeado de mayor crecimiento --  
primario pero aún sin confluencia en monocapa.10X

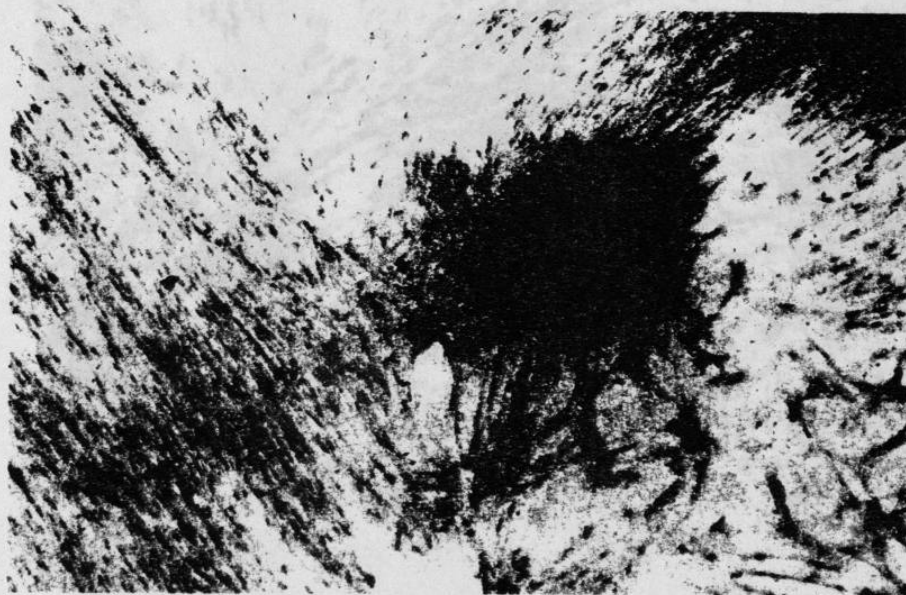


Figura No.3. Fase I. Explante rodeado de monocapa confluyente.  
Fijado, H y E. 10X



Fase II: La fase II se caracteriza por una rápida multiplicación celular, (crecimiento exhuberante, crecimiento exponencial) con gran actividad metabólica y producción de ácidos. Durante esta fase, el cultivo deberá someterse a dos pasajes por semana con una proporción de reducción de 2 a 1. (Vg. de un frasco original se obtendrán dos frascos por pasaje). El éxito del cultivo prolongado de células diploides depende de que se mantenga el cultivo en esta fase de crecimiento logarítmico el mayor tiempo posible; esto se logra con pasajes repetidos tan pronto como confluyan las monocapas. Si no se efectúa un pasaje oportunamente; el cultivo "envejece" y se inicia la formación de estratificaciones o pluricapas. La fase II dura aproximadamente 2 a 10 meses. Al irse terminando este período se inicia la degeneración celular que anuncia la llegada de la fase III o fase terminal.

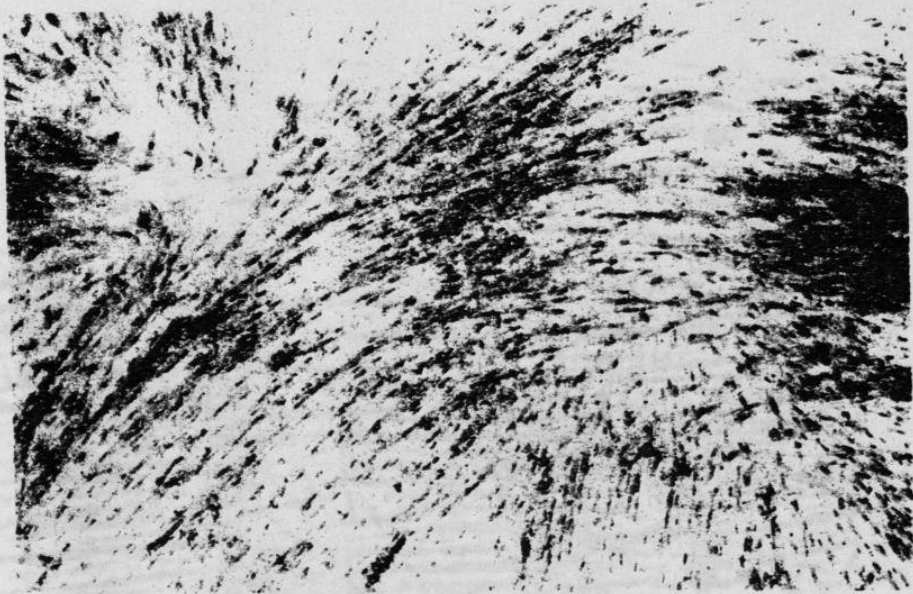


Figura No.4. Fase II. Monocapa confluyente durante fase de crecimiento logarítmico. Fijado, H y E. 10X



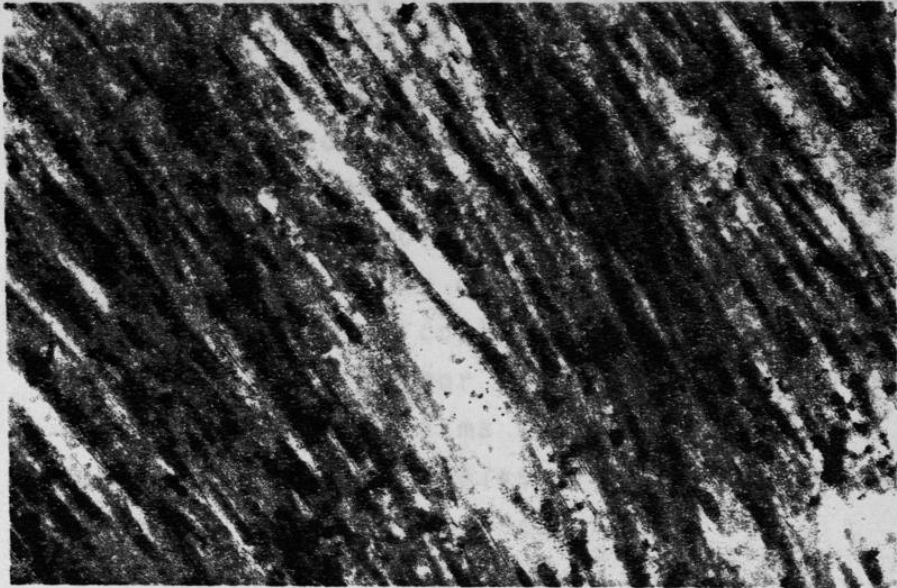


Figura No.5. Fase II. Monocapa confluyente durante crecimiento logarítmico. Fijado H y E. 40X

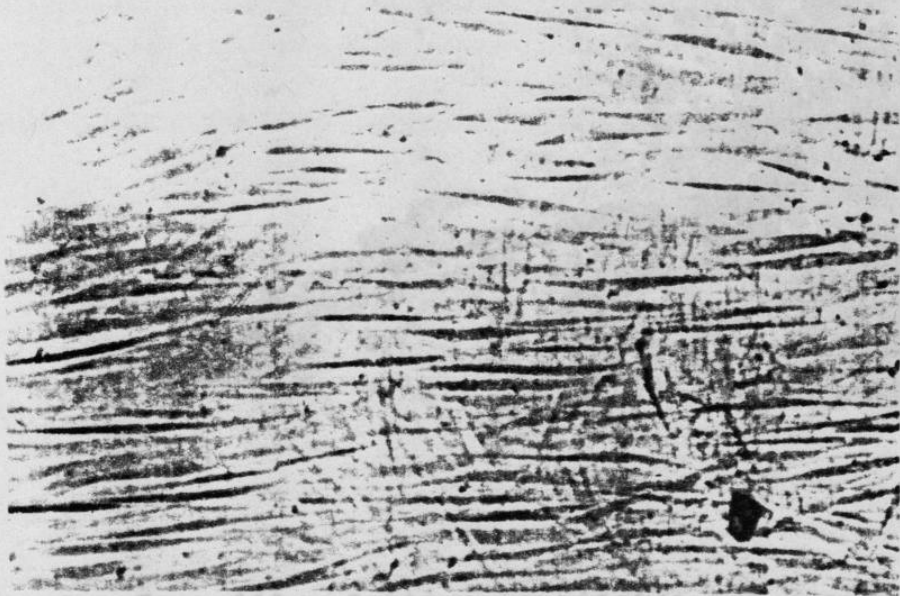


Figura No. 7. Fase III. Cultivo involucrado que muestra fenómenos degenerativos. Tejido vivo, 10X

Figura No.6. Fase II. Pluricapa temprana que muestra superposición celular. Tejido vivo, 40X

Fase III: La fase III se caracteriza por la aparición de cambios degenerativos. Empieza a acumularse detrito celular, se alarga el tiempo de generación y se reduce la actividad mitótica; consecuentemente se alarga el período de tiempo necesario para el desarrollo de monocapas confluentes. Empiezan a observarse cambios en la morfología nuclear y celular, habiendo pérdida de la orientación celular y pérdida de la capacidad de duplicación celular por el fenómeno de inhibición por contacto entre membranas celulares. El citoplasma se vuelve granuloso y en él aparecen grandes vacuolas. El cultivo decae progresivamente hasta desaparecer.

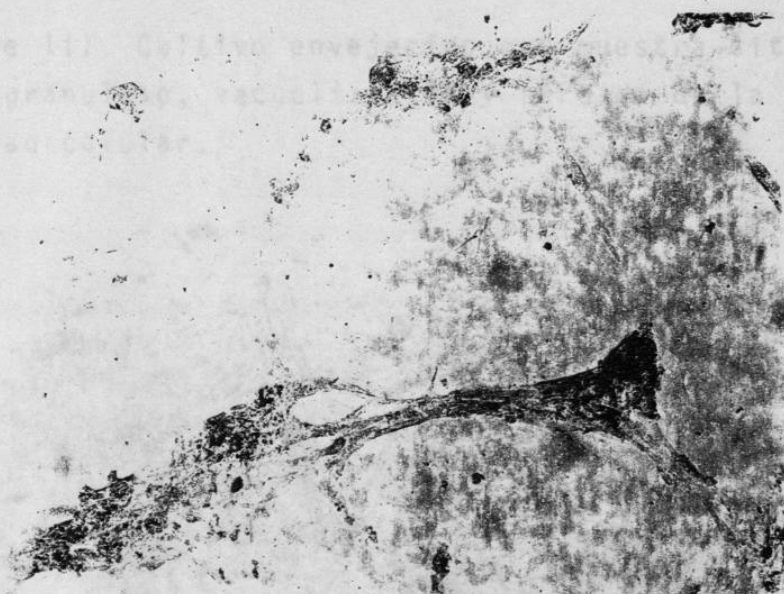


Figura No. 7. Fase III. Cultivo envejecido que muestra fenómenos degenerativos. Tejido vivo, 10X

Figura No. 8. Fase III. Cultivo envejecido que muestra pérdida de la inhibición por contacto resultando un apilamiento celular. Tejido vivo 10X



## 2) Antecedentes de Radiobiología.

Figura No.8. Fase III. Cultivo envejecido que muestra citoplasma granuloso, vacuolización y pérdida de la polaridad celular.

En radiobiología se estudia el efecto de la radiación de partículas. Algunas partículas tienen carga (alfa, beta, protones, mesones, electrones cargados) y otras no (neutrones).

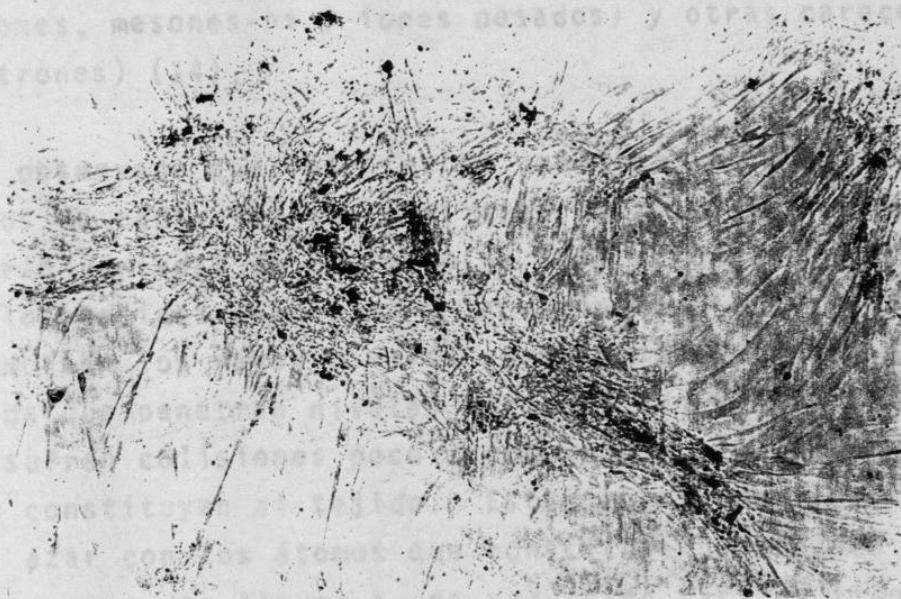


Figura No.9. Fase III. Cultivo envejecido que muestra pérdida de la inhibición por contacto resultando un apilamiento celular. Tejido vivo 10X



En el presente estudio se trabajó exclusivamente con cultivos que se encontrasen en la Fase II de crecimiento exponencial, (figuras 4 y 5) manipulados en la forma descrita por Deschavanne (4) para obtener mesetas de crecimiento ("plateau -- fase"). Esto se logró manteniendo sin nueva alimentación por quince días a las monocapas ya confluentes. En estas mesetas, la monocapa es aún vigorosa pero no se encuentra en activa replicación, puesto que el fenómeno de contacto entre membranas celulares produce inhibición de la división celular. De esta manera el tejido en cultivo se semeja más al tejido *in vivo* y los resultados de la experimentación hecha en esta fase de meseta, reflejarán con más fidelidad lo que realmente ocurre *in vivo*.

## 2) Antecedentes de Radiobiología.

En radiobiología se han utilizado experimentalmente tanto la radiación electromagnética (rayos X y rayos gamma) como la radiación de partículas. Algunas partículas tienen carga (alfa, beta, protones, mesones-pi y iones pesados) y otras carecen de ellas (neutrones) (14).

Se ha observado que los efectos cualitativos de los diferentes tipos de radiación son similares entre sí, pero que existe una gran variedad de patrones de liberación de energía dentro de los tejidos expuestos a la radiación. Las fuentes neutras como son los rayos X y los rayos gamma, pierden energía a medida que penetran niveles más profundos de tejido, debido a que sufren colisiones poco frecuentes y al azar con los átomos que constituyen al tejido. Estas colisiones poco frecuentes y al azar con los átomos que constituyen al tejido. Estas colisiones pueden llevar a una reducción casi de tipo exponencial en su energía. Sin embargo, este tipo de radiación alcanza una buena penetración a los tejidos profundos. Las partículas cargadas alfa, beta, protones y mesones-pi, pierden

energía por colisiones múltiples con los electrones del material irradiado. Estas colisiones sustraen energía hasta que la partícula se detiene. El patrón de liberación de energía de estas partículas es constante. Por esta razón, la radiación de partículas tiene una baja capacidad de penetración. Cuando la partícula se acerca al final de su curso, se aumenta la cantidad de energía por unidad lineal del curso; a esto se le llama "transferencia de energía lineal" (LET). Este fenómeno conduce a un incremento local de dosis llamado "el pico de Bragg de ionización". La profundidad que pueden alcanzar estas partículas depende de su energía inicial. Las partículas beta llegan a penetrar unos cuantos milímetros de tejido mientras que las partículas alfa penetran mucho menos. Sin embargo, si estas partículas son aceleradas en un ciclotrón, estas pueden llegar a penetrar hasta más de 20 cms. de tejido.

La "energía absorbida de la radiación en un gramo de tejido", se conoce como la "dosis". La unidad de dosis es el rad (r) que se define como "la absorción de 100 ergios de energía por gramo de material irradiado". La emisión de radiación de aparatos de rayos X se define en términos de exposición, siendo la unidad de medida el roentgen (R). Se define al roentgen como "aquella exposición que bajo condiciones determinadas liberase una unidad electrostática de iones positivos en un c.c. de aire". El aire expuesto a 1R de radiación, recibe una dosis de 0.87 rads. Además, se ha introducido una nueva medida de radiación; esta es el gray (Gy), el cual equivale a 100 rads. De esta manera, 1 centigray es igual a 1 rad.

Independientemente de cual sea la fuente de energía radiante, ésta ejerce un efecto biológico a través de la ionización de los átomos o moléculas celulares contra los cuales sufre colisión; el mecanismo completo mediante el cual se produce el efecto biológico es aún desconocido, pero se proponen dos teorías para explicar este mecanismo: la teoría directa o teoría de blanco y la teoría indirecta. La teoría directa supone

que el efecto de la radiación se produce por golpe directo a biomoléculas sensibles, como son los lazos de unión de una molécula de DNA (13,15). Esto no excluye la posibilidad de -- que el efecto biológico requiera múltiples blancos de acción o múltiples golpes a un solo blanco (27). La teoría indirecta propone que la radiación provoca la ionización del agua celular y la liberación de radicales libres "tóxicos" ( $H^+$ ,  $OH^-$ , etc.) que secundariamente interaccionan con elementos vitales como son los lípidos de membrana, las enzimas y los ácidos nucleicos (28,35,37,38).

Existe un enigma en radiobiología el cual ha sido conocido con el nombre de "efecto latente de radiación". Se entiende que la transferencia de energía a una molécula blanco ocurre en una microfracción de segundos, sin embargo su efecto biológico, morfológico o funcional pudiera no hacerse evidente -- sino hasta décadas después. Este fenómeno fue observado en los sobrevivientes de las bombas atómicas de Hiroshima y Nagasaki, que desarrollaron neoplasias radiorelacionadas más de 20 años después del bombardeo (5,6,23,24). Aún no se ha dilucidado si este fenómeno implica reacciones intracelulares en secuencia -- que finalmente alcanzan a una molécula o una función crucial, o si el primer evento físico químico es tan pequeño que su -- efecto es sólo detectable a través de la propiciación de mutaciones cada vez más severas en generaciones sucesivas de células.

Haciendo a un lado estas especulaciones, existen efectos de radiación sobre las células que sí han sido bien documentadas. Se sabe que la magnitud de la lesión celular provocada -- por la radiación depende de cuatro factores fundamentales. Estos son: la dosis, la rapidez de administración de la dosis, la transferencia de energía lineal (LET) de la radiación y la vulnerabilidad de la célula a la radiación (36).



Si todas las variables se mantienen en igualdad, la lesión celular es directamente proporcional a la dosis administrada. Sin embargo, la rapidez con la que se administra esta dosis modifica significativamente su efecto, especialmente cuando la dosis es fraccionada, como es común en radioterapia. Aunque la energía de radiación es acumulable, las células son capaces de reparar daño subletal hasta cierto límite. Esta capacidad de reparación puede estar muy disminuida en algunas variedades de células como es el caso de los pacientes con xeroderma pigmentosum. Estos individuos carecen de la endonuclease necesaria para eliminar dímeros inducidos por radiación ultravioleta y posiblemente otras enzimas necesarias para re-unificación de cabos rotos de la molécula de DNA. Al no poder reparar estos daños subletales, se acumulan mutaciones radio-inducidas que llevan a un incremento asombroso en la posibilidad de sufrir transformaciones malignas, sobre todo de la piel. En el individuo normal, si se permite el paso de suficiente tiempo entre la primera y la segunda irradiación, la célula pudiera reparar la mayor parte del daño subletal y de esa manera no sufrir efecto acumulativo (33). Por ende, las dosis fraccionadas solo ejercen efecto acumulativo si la reparación celular no se completa en el intervalo entre una dosis y otra.

En radioterapia de tumores se toma ventaja de este hecho, puesto que la reparación del daño subletal en la célula normal es más rápido que en la célula tumoral. De esta manera las células no neoplásicas no sufren el mismo efecto acumulativo que sufren las células tumorales, siendo entonces menos dañadas por exposiciones repetidas.

La transferencia de energía lineal (LET) influye sobre el efecto radiobiológico en sentido directamente proporcional. Al aumentar la LET, mayor es el efecto biológico o sea que se

requiere menor dosis para alcanzar un mismo efecto. La reparación del daño subletal también depende de la transferencia de energía lineal aunque en proporción inversa, puesto que entre mayor sea la LET menor será la capacidad de reparación. Una energía mayor conduce a una reparación celular baja y vice versa.

La vulnerabilidad de las células a la radiación es a su vez dependiente de diversos factores como son: la respuesta inherente de una célula a un pulso de radiación, la cinética de reparación celular, la oxigenación celular y el estado proliferativo de las células en el momento de recibir el pulso de radiación. Aún células de un mismo tipo y condición pueden presentar un rango amplio de severidad de lesiones a una misma exposición. La radiación no se absorbe uniformemente sino más bien al azar y por esta razón en unas células las ionizaciones pueden ser letales mientras que en otras el daño no es crítico. Una variable importante es el estado de oxigenación celular. Puesto que el oxígeno molecular presenta dos electrones no apareados, estos pueden interactuar con radicales libres radioinducidos, aumentando su efecto dañino. Este "efecto del oxígeno" es de particular importancia en el uso de radiación para la destrucción de tumores. Frecuentemente el centro de estos tumores es poco vascularizado y relativamente hipóxico y por lo tanto está "protejido" del efecto ionizante.

Aunque existen muchos sitios intracelulares de daño potencial, se acepta que la molécula de DNA es el blanco más vulnerable a la radiación. Por esta razón la inducción de necrosis post-radiación está íntimamente correlacionado con la actividad reproductiva de la célula. Esta vulnerabilidad varía marcadamente según la fase del ciclo celular en la cual se encuentre la célula. Se acepta que las fases M y G<sub>2</sub> del ciclo son

la más sensible (1,30). Si una célula está en mitosis al recibir el pulso de radiación, ésta puede seguir adelante y completar la división si la dosis no fué muy alta, pero puede resultar incapaz de sufrir nuevas divisiones (muerte reproductiva). Por estas razones, las neoplasias malignas poco diferenciadas de duplicación celular rápida, generalmente responden mejor a la radioterapia que las neoplasias bien diferenciadas de crecimiento lento. Este principio es aplicable a los diversos tipos de células corporales y los tumores que de ellas provengan. La radiosensibilidad de los diversos tipos celulares y sus tumores se compara en la siguiente tabla tomada de Rubin y Casarett (31).

RADIOSENSIBILIDAD DE CELULAS ESPECIALIZADAS  
Y SUS TUMORES

Grado	Celulas normales	Tumores
Alto	Cel. linfoides, medulares, germinales, del epitelio intestinal y del folículo ovarico	Leucemia-linfoma, seminoma, tumor de células granulosas.
Mod.	Epitelio epidérmico, orofaríngeo, urinario, esofágico, gástrico y uretral	Carcinoma espinocelelular, transicional y adenocarcinoma.
Medio	Tejido conectivo, glia, endotelio y hueso y cartilago en crecimiento	Fibrosarcomas, angiomas, sarcomas, astrocitomas. Estroma de tumores.
ReLat. Bajo	Cel. de cartilago y hueso maduras epitelio glandular y seroso, epitelio pulmonar, renal, hepático, pancreático, pituitario, tiroideo y suprarrenal.	Condrosarcoma, osteosarcoma, liposarcoma, carcinoma espinocelelular de pulmón y adenocarcinoma renal, hepático, etc.
Bajo	Células musculares y ganglionares	Rabdómiosarcoma, leiomiomasarcoma, glioneuroma.

Tabla No. 1.- Radiosensibilidad de células especializadas y sus tumores.

A pesar de ésta categorización, toda célula puede ser dañada o destruida con suficiente exposición a radiación ionizante.

El daño producido por radiación es visible tanto en el citoplasma como en el núcleo. La respuesta inicial se presenta como un edema celular con vacuolización del citoplasma; ultraestructuralmente aparece aumento del volumen de las mitocondrias así como hinchazón y fragmentación del retículo endoplásmico. Como dato curioso, los lisosomas son relativamente radioresistentes y en ocasiones parecen aumentar en número (7). Los núcleos se hinchan, sufren vacuolización y con mayor exposición presentan picnosis y cariorrexis. El envoltorio nuclear y la membrana celular pueden romperse al recibir dosis grandes de radiación. A nivel cromosómico puede verse gran diversidad de daño en las células que están dividiéndose; este consiste en deleciones, rupturas, translocaciones, interadherencias y fragmentaciones. Las figuras mitóticas pierden su orden adquiriendo aspecto caótico. Este daño al aparato genético constituye la base de la letalidad, oncogenicidad y mutagenicidad de la radiación. De hecho la radiación produce cambios nucleares y mitóticos que hacen que las células irradiadas se semejen a las células malignas; esto frecuentemente produce problemas al patólogo cuando éste hace una evaluación de tejido post-irradiación para determinar la presencia de tumor residual.

El daño por radiación repercutirá en una de las tres siguientes formas: ó mata a la célula; ó la incapacita para volverse a reproducir; ó la transforma (alteración celular).

Una buena parte del efecto de la radiación sobre los tejidos organizados se debe a los cambios que se producen en la vasculatura y en las células conectivas de esos tejidos. Durante el periodo post-irradiación temprano, los vasos suelen presentar dilatación, lo cual se hace evidente por el eritema

cutáneo. Con el aumento en dosis aparecen cambios del endote\_lio vascular caracterizados por hinchazón, vacuolización y \_aún destrucción completa. Los vasos más dañados pueden sufr\_ir ruptura, trombosis y fibrosis progresiva con estrechamien\_ to de la luz vascular. El tejido conectivo contiguo se hace\_ progresivamente más escleroso. De ésta manera las células \_parenquimatosas son privadas de aporte oxígeno-nutricional y\_ sufren atrofia y muerte (29).

La importancia de conocer mejor los cambios sufridos por el tejido conectivo vascularizado en la radioterapia de tumor\_ es, así como el descubrimiento de que los fibroblastos no se\_ comportan en forma idéntica independientemente del sitio de \_su origen (8), han influido en la motivación del presente es\_ tudio.

Se recuerda que el tejido conectivo vascularizado que \_ forma el estroma de sostén de un tumor no es parte del proce\_ so maligno mismo, pero es esencial para su desarrollo y propa\_ gación. No se descarta la posibilidad de que éste tejido co\_ nectivo prolifera en respuesta a inductores de crecimiento li\_ berados por las células malignas y que por esta razón los fi\_ broblastos "tumoraes" tienen información que otros fibroblas\_ tos "normales" no tienen, siendo esta información el resulta\_ do de la asociación e interacción con células malignas.

#### d) Revisión bibliográfica.

La literatura sobre radiobiología de fibroblastos es ex\_ tensa. Los principales investigadores son:

Deschavanne, Fertil, Malaise y Lachet del Laboratorio de Radiobiología Celular del Instituto Gustave-Roussy, en Ville\_ juif, Francia (4,10,18).

A.W. Malcom y J.B. Little, del Laboratorio de Radiobiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Harvard en Boston, Massachusetts, U.S.A. (19,20).

R. Cox, W.K. Masson, J. Thacker y D.T. Goodhead, de la Unidad de Radiobiología, Harwell, Oxon, Inglaterra (2,3,17).

C. Waldren, I. Rasco, del Instituto de Investigación Cancerológica de la Universidad de Colorado, Denver, Co., U.S.A. (35).

El grupo francés, Deschavanne, et. al., hizo una extensa revisión de la literatura y encontraron que no habfa sido reportado estudio comparativo entre fibroblastos irradiados en fase de crecimiento exponencial y fase de meseta no alimentada, sembrados inmediatamente 24 horas después de recibir la radiación. Esto permitió deducir que éste campo de investigación era virgen y que faltaban estudios de éstas características con fibroblastos normales, lo más probable es que no hubiera estudio comparativo con fibroblastos derivados de tejido neoplásico.

Con ésta suposición en mente, se comunicó a través del sistema computarizado al Centro de Informática de Ciencias Biomédicas "Medline" en Baltimore, Maryland y se solicitó una revisión de la literatura publicada en un periodo de cinco años (anteriores a la fecha de solicitud) sobre fibroblastos derivados de estroma tumoral y experimentación radiobiológica con éste tipo de fibroblastos. Además se solicitó literatura sobre radiobiología fibroblástica general.

El material recopilado por el Centro de Informática "Medline" consistió en 25 artículos sobre radiobiología general y ninguno sobre fibroblastos de origen tumoral ni su radiobiología. La necesidad de incursionar en este campo se hizo patente.

El grupo de Deschavanne, et. al., calculó la dosis letal



media ( $D_0$ ) para fibroblastos normales, entre 100 y 160 rads y una media de 120 rads y un número de extrapolación ( $n$ ) de 1.1. Recomendó el uso de la fase de meseta no alimentada para poder obtener resultados más relevantes a situaciones clínicas; comparó reparaciones de daño subletal en diferentes lapsos de tiempo entre la irradiación y la resiembra y experimentó con dosis fraccionadas en relación a reparación de daño subletal.

El grupo americano de Malcolm, Little, et. al., propuso la hipótesis de la necesidad de contacto entre membranas celulares para llevar a cabo la reparación de daño subletal producido por radiación gamma y calcularon el tiempo crítico de 10 minutos post-irradiación para que ocurriese esta reparación.

El grupo inglés de Cox, Masson, et. al., presentó una técnica de alimentación celular ("feeder cell technique") para aumentar la eficiencia de sembrado y de la capacidad formadora de colonias de fibroblastos; así mismo establecieron las densidades óptimas para sembrado. Además propusieron que los cultivos irradiados en pasajes tempranos tienen menor capacidad de reparar daño subletal que los cultivos de mayor "edad". Propusieron la existencia de un factor difusible presente en medio condicionado cuya función es de facilitar la reparación del daño subletal.

Otras contribuciones importantes fueron las de Martin, Curtis y Sprauge (21) sobre los efectos de la edad, tejido y genotipo del donador sobre el tiempo de vida duplicativa de células humanas en cultivo.

Barbara Gilchrist (8,9,) reportó sus experimentos sobre envejecimiento celular relacionado a radiación actínica tanto en fibroblastos como en queratinocitos.

Paterson, Anderson y Blake (25) reportaron el aumento de radiosensibilidad en fibroblastos de ataxia telangiectasia manifestados por defecto en la capacidad formadora de colonias y reducción de la capacidad de reparación del DNA al recibir irradiación gamma en condiciones de hipoxia.

Weichselbaum, Nove y Little (37) reportaron un aumento de radiosensibilidad en pacientes con retinoblastoma.

Yotti, Glover, Trosko y Segal (19) estudiaron los efectos de radiación sobre la reparación del DNA y mutagénesis en fibroblastos, comparando normales contra síndrome de Down. No encontraron diferencias significativas en las respuestas. La especulación de que el alto riesgo de desarrollar neoplasias en la Trisomía 21 fuese debido a fallas en la duplicación de DNA, no pudo ser fundamentada.

## II.- MATERIALES Y METODO

### a) Material biológico.

Como fuentes de tejido se utilizaron piezas quirúrgicas frescas con diagnóstico anatómico de pulmón normal y de adenocarcinoma de glándula mamaria. El tejido pulmonar se obtuvo de un paciente del sexo masculino de 14 años de edad. Este tejido pulmonar fué etiquetado como cultivo C-82-23. El tejido neoplásico se obtuvo de una paciente del sexo femenino de 70 años de edad que desarrolló un cáncer de la glándula mamaria izquierda, diagnosticado como adenocarcinoma ductal infiltrante, moderadamente diferenciado, (A.P. Q-82-003). En el laboratorio de tejidos fué etiquetado como cultivo C-82-21.

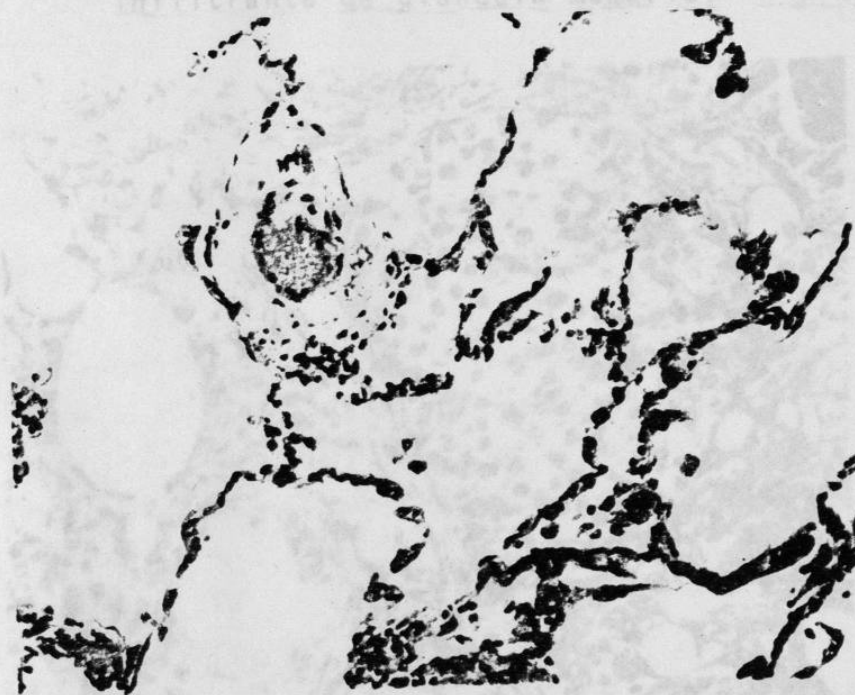


Figura No. 10. Sección histológica de pulmón normal que muestra tejido conectivo vascularizado. HyE, 10X

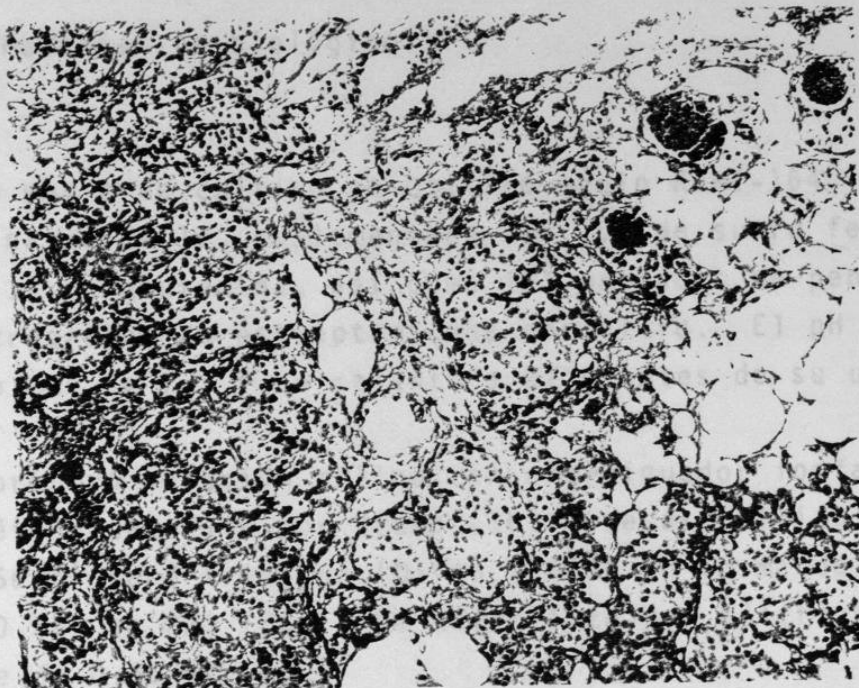


Figura No. 11. Sección histológica de adenocarcinoma ductal infiltrante de glándula mamaria. H y E, 10 X

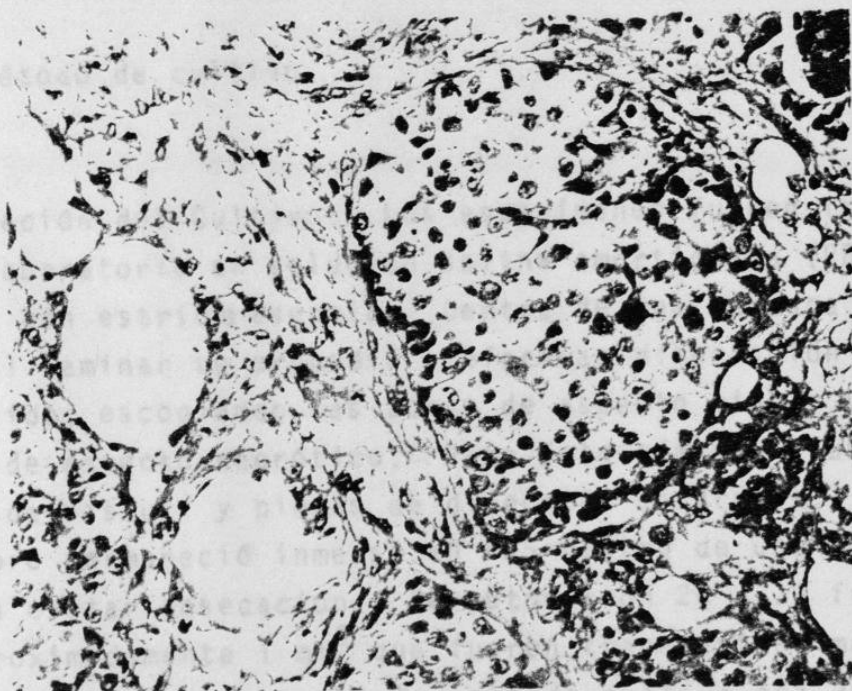


Figura No. 12. Sección histológica de adenocarcinoma mamario; obsérvese el tejido conjuntivo que rodea un islote de células malignas. H y E, 40X

b) Material no biológico.

Como medio de cultivo se utilizó medio RPMI-1640 en solución salina de Earle, suplementado con 10% de suero fetal de ternera, 1% de glutamina, así como  $10^5$  unidades de penicilina y  $10^5$  microgramos de estreptomina por litro. El pH final del medio fue de 7.3 y se calentó a  $37^{\circ}\text{C}$  antes de su uso.

Se preparó solución salina con amortiguador fosfato (PBS) por el método descrito por Kruse (16) y se esterilizó en autoclave. Se preparó tripsina (Difco 1;250) en forma de solución al 0.25% en PBS (26) y se esterilizó por filtración con micropore de 0.45 micras.

Se utilizaron frascos de poliestireno T-25 de Corning para siembra y subcultivo.

c) Método de cultivo.

Iniciación del Cultivo: Los especímenes fueron transportados al laboratorio en solución salina amortiguada (PBS) y trabajados con estricta asepsia. Dentro de una campana de flujo vertical laminar se procedió a efectuar disociación mecánica del tejido, escogiendo las zonas de aspecto viable y retirando las de aspecto necrótico. Para éste efecto se utilizaron hojas de bisturí y pinzas de disección estériles. El tejido siempre permaneció inmerso en PBS dentro de una caja de Petri para evitar desecación. Se obtuvieron 20 a 30 fragmentos de aproximadamente  $1\text{ mm}^3$  que fueron transferidos mediante el uso de pipeta Pasteur, a 3 frascos de cultivo con  $25\text{ cm}^2$  de superficie de cultivo.

Una vez colocados los explantes en los frascos, se les\_ adicionaron 2 ml. de suero fetal de ternera, 200 unidades de penicilina y 200 microgramos de estreptomina. Los frascos se cerraron y se pasaron a incubación a 37°C con atmósfera húmeda y con 5% de  $CO_2$ . Los cultivos no fueron movidos si no hasta el tercer día post-explante. Este procedimiento tu vo como objetivo permitir la adherencia del explante a la su perficie de crecimiento. De no ser así, est flota y no prospera el cultivo. Al tercer día se decantó el suero y se re puso con 3 ml. de medio RPMI-1640 suplementado en la forma antes descrita. Al cuarto o quinto día de cultivo se obser varon los primeros fibroblastos saliendo del explante; en un principio fueron pocos, pequeños y se encontraron muy cer ca del explante. Con el tiempo adquirieron mayor tamaño y mov ilidad, llegando a emigrar a partes lejanas al explante. El aumento de las exigencias metabólicas hizo necesario cam biar el medio de cultivo con frecuencia (aproximadamente ca da cuarto día) siendo la producción de ácido un indicador ú til para juzgar la necesidad de cambio. Esto fué visible por el viraje del rojo fenol a color amarillo al bajar el pH.

Paulatinamente los espacios entre una célula y otra fue ron ocupados por nuevas células hasta que al final de la ter cera semana, se estableció una monocapa confluyente y apare ció la inhibición de la reproducción celular suc itada por el con tacto entre las membranas citoplásmicas de una y otra célula. En ese momento el cultivo se en contró en condición de ser sub cultivado y de pasar así a la fase II de Hayflick.

Subcultivo de Monocapas Confluentes: Tan pronto como con fluyó la monocapa, se procedió a retirar el medio agotado y lavar el cultivo repetidamente con PBS libre de iones de cal ccio y magnesio. Puesto que éstos iones son indispensables para la agregación de unas células con otras, éstos deb ieron retirarse para permitir una mejor dispersión de las células constitutivas de la monocapa. Esta dispersión facilitó la



cuantificación celular así como una resiembra más uniforme. La disociación de la monocapa se obtuvo mediante el uso de enzimas proteolíticas; se prefirió el uso de tripsina al 0.25% en solución salina con amortiguador de fosfato (PBS). Esta solución tripsina-PBS previamente calentada a 37°C, se agregó a razón de 2 ml. por cada frasco T-25, se pasó a la incubadora y se permitió actuar por 4 a 10 minutos. El tiempo de incubación dependió de la actividad biológica de la solución enzimática, (entre más envejecida la solución se requirió más tiempo de exposición), y del tiempo que tuviera de confluída la monocapa (entre más tiempo tuviese de confluída la monocapa, más tiempo fué necesario para que la tripsina disociara a las células).

Una observación cuidadosa y el uso de pequeños golpes al frasco de cultivo revelaron el momento de desprendimiento y disociación de la monocapa. Una agitación vigorosa completó la disociación e inmediatamente se adicionaron unas gotas de suero fetal de ternera para inactivar la tripsina. Las células se centrifugaron, se lavaron con PBS libre de calcio y de magnesio y se determinó el porcentaje de viabilidad. Para conocer el porcentaje de células vivas se utilizó la prueba de exclusión de azul de tripano (16,26,34). En las series trabajadas (C-82-21 y C-82-23) el porcentaje de células viables era de  $97 \pm 2\%$ . Posteriormente las células se resuspendieron en medio fresco y se sembraron en forma reduccional, o sea que de cada frasco original se obtuvieron dos frascos de resiembra. Al efectuarse este primer pasaje, el tejido pasó a la fase de crecimiento logarítmico. La observación de los cultivos en esta fase reveló gran cantidad de células de forma esferoidea. Estas formas correspondieron a la contracción pre-mitótica que sufren los fibroblastos. Las células en fase esferoide se adherieron muy laxamente a la superficie de crecimiento y se desprendieron con facilidad. Estas células se desplazaron con movimientos pasivos del líquido nutritivo

y se establecieron en sitios lejanos al de su origen.

Como el cultivo primario pasó a constituirse en cepa celular, se abrió la posibilidad de alteración en el número modal de cromosomas. Se procedió entonces a la cariotipificación celular.

d) Método de carioanálisis.

Para determinar si los cultivos seguían siendo diploides o si habían sufrido alteración cromosómica, se procedió a efectuar carioanálisis con el método de Moorhead para fibroblastos (16) modificado en nuestro laboratorio. La modificación al método consistió en un alargamiento del tiempo de exposición a solución hipotónica. El método fue el siguiente:

Primero: Al medio de cultivo se agregó colchicina a una concentración final de 0.4 microgramos por ml. y se incubó a 37°C por 3 horas; esto produjo detención de las mitosis en metafase.

Segundo: Se retiró el medio de cultivo, se lavó en PBS libre de calcio y magnesio y se cosechó con tripsina. La suspensión se centrifugó a 200g por 5 min para formar botón.

Tercero: Después de aspirar el sobrenadante, se resuspendieron las células con 5 ml. de solución hipotónica de KCl (0.075 M), dejándose hinchar por 14 a 18 minutos. Se agregó una gota de fijador frío (metanol absoluto y ácido acético glacial 3:1 v/v). Se resuspendió y centrifugó nuevamente.

Cuarto: Se retiró el sobrenadante, se agregaron 5 ml. de fijador fresco y se fijó por 30 minutos.