

Los usos terapéuticos y diagnósticos de las células y los tejidos cultivados *in vitro**

I. Introducción

Salvador Said-Fernández**

El prefacio de un precioso y moderno libro titulado "*Molecular Biology of the Cell*" escrito por Bruce Alberts y colaboradores, se inicia citando la siguiente frase de EB Wilson: "La clave de cada problema biológico debe finalmente buscarse en la célula". Esta afirmación se hizo hace más de 50 años, y sigue siendo tan actual como si se hubiera pronunciado ayer, además de que ahora podemos entender el alcance de esta afirmación, ya que el uso de las células mantenidas *in vitro* sus productos constituyen una solución tangible para diversos padecimientos, mismos que han permitido el desarrollo de nuevos y revolucionarios métodos terapéuticos y diagnósticos.

Lo anterior es ahora posible gracias al impresionante desarrollo que han experimentado tanto la Biología Celular como la Biología Molecular. Estas dos ramas de la ciencia están tan íntimamente relacionadas, que no es posible pensar en la una sin la otra. Los conocimientos y tecnología que han aportado juntas permiten ahora realizar diagnósticos mediante el aislamiento y el cultivo de las células de pacientes para resolver problemas específicos, como en el caso de quemaduras graves. Aislar células de pacientes con problemas metabólicos o cáncer, cultivarlas *in vitro*, modificar su genoma y reimplantarlas en los pacientes para obtener una recesión del proceso neoplásico, o inducir la producción de proteínas funcionales. Es posible detectar problemas específicos mediante el uso de sondas moleculares en células vivas o mediante

inmunofluorescencia o microscopía inmunoelectrónica. Los modelos *in vitro* constituyen también una excelente alternativa para analizar con detalle los efectos nocivos de factores ambientales o laborales sobre la salud humana. Estos modelos han permitido el desarrollo y la validación de numerosos biomarcadores que facilitan el diagnóstico y el tratamiento oportunos de enfermedades e intoxicaciones graves.

No pretendemos en este simposio hacer un análisis exhaustivo sobre los temas mencionados. Deseamos simplemente presentar algunas de las aplicaciones que se le han dado a las células cultivadas *in vitro* en beneficio de la salud humana, como un reconocimiento a la importancia que todos estos avances representan para la Medicina Moderna.

Mehonran con su participación en este simposio el doctor Walid Kuri Harcush, distinguido profesor del departamento de Biología Celular, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, el doctor Hugo Barrera Saldaña, académico numerario, Jefe del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y la doctora Herminia Martínez Rodríguez, distinguida profesora e investigadora del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

El doctor Walid Kuri ha trabajado por muchos años en un tema de gran importancia científica y médica: el cultivo *in vitro* de epitelios humanos pa-

* Simposio presentado en sesión ordinaria el 18 de septiembre de 1996.

** Académico numerario

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Salvador Said-Fernández, Dirección de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS, Administración de Correos 4, Apartado Postal 20, Coahuila de Zaragoza, Independencia 64720 Monterrey, H. L. (8) 3444116
Correo Electrónico: ssaid@academ01.itsm.mty.mx

ra uso terapéutico en pacientes quemados. En el presente documento, él analiza este tema y comenta los resultados de sus propias investigaciones. El doctor Hugo Barrera presenta algunos de los avances más recientes sobre la construcción y uso de bancos genéticos, mismos que son el punto de partida para la identificación, aislamiento y caracterización de innumerables biomoléculas de gran interés científico y médico. La doctora Herminia Martínez Rodríguez analiza un tema de

creciente interés por las enormes posibilidades que representa: la transfección de células humanas para el tratamiento de **cáncer y enfermedades metabólicas**. Finalmente presentó un panorama general sobre el uso de modelos celulares para el estudio de efectos tóxicos de agentes xenobióticos y metales pesados.

Con todo lo anterior esperamos mostrar un panorama general de la utilidad que tienen en medicina las **células** cultivadas *in vitro*.

II. La epidermis humana cultivada *in vitro* para el tratamiento de quemaduras.

Walid Kuri-Harcuch*

Resumen

Estudios clínicos controlados, comparativos y aleatorios demostraron que el uso de los aloinjertos de epidermis humana cultivada *in vitro* promueven una más rápida epitelización de las áreas cruentas de los sitios donadores de la piel y de las quemaduras de profundidad parcial. Los aloinjertos de epidermis humana cultivada *in vitro* redujeron en un 40% los tiempos de epitelización de dichas áreas cruentas. El cultivo *in vitro* de queratinocitos humanos también ha hecho posible la producción en el laboratorio de cantidades ilimitadas de autoinjertos de epidermis humana para los pacientes extensamente quemados. Con base a nuestros resultados obtenidos en los estudios clínicos controlados y durante el uso rutinario de la epidermis cultivada en pacientes quemados, hemos desarrollado una terapia integral y combinada para la atención de estas pacientes. Esta terapia combinada consiste en: a) el uso de los aloinjertos de epidermis cultivada para una rápida y más eficiente epitelización de los sitios donadores de piel y de las quemaduras de profundidad parcial, b) el uso de autoinjertos convencionales de piel, y en los casos extensamente quemados en que fue necesario el uso de los autoinjertos de epidermis cultivada para injertar las quemaduras de profundidad total. Esta terapia combinada mejoró la terapia de los pacientes quemados reduciendo la estancia hospitalaria de los mismos en un 20% a 50%, dependiendo de la superficie corporal quemada. También se observó un aumento en la sobrevivencia de los pacientes con más del 50% de la superficie corporal quemada. Estos resultados demuestran los beneficios que se obtienen con el uso rutinario y temprano de los aloinjertos de epidermis humana cultivada *in vitro* para reducir la estancia hospitalaria gracias a una terapia más eficaz de los pacientes quemados.

Summary

Controlled, comparative and randomized clinical studies had shown that cultured epidermal allografts promote a faster epithelialization of skin donor sites and deep partial-thickness burns. Cultured epidermal allografts reduced about 40% by time the healing of such wounds. Cultivation of human epidermal keratinocytes made possible the production, under laboratory conditions, of unlimited amounts of cultured epidermal allografts for extensively burned patients. Based on our results from the controlled clinical studies and from the routine use of cultured epidermis in burned patients, we have developed a combined therapy for the burn patient. This combined therapy is comprised of: a) the use of cultured allograft to promote a faster healing of skin donor sites and deep partial-thickness burns, b) the use of split-thickness autografts, and in extensively burned patients, whenever necessary, cultured epidermal autografts, for wound closure of full thickness burns. This combined therapy improved significantly the outcome of the burn patients, since the hospital stay was reduced by 20% to 50%, depending on the burned body surface. It also increased the survival rate of patients with more than 50% burned body surface. These results show the benefit of routine and early use of cultured epidermal allografts to reduce healing time and therefore, hospital stay by means of a more efficacious therapy of burned patients.

Palabras clave: Humana, epidermis, queratinocitos, cultivos, injertos, quemaduras, terapia

Key words: Human, epidermis, keratinocyte, culture, graft, burn, therapy

* Departamento de Biología Celular. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Apdo. Postal 14-740. México D.F. 07000. México. Correspondencias solicitudes sobre otros: Dr. Walid Kuri-Harcuch. Investigador y profesor del Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN. Apdo. Postal 14-740, Col. San Pedro Zacatenango, México D.F. 07000, México. Tel: 747-7000 ext 5521. Fax: 747-7081.

Introducción

Las quemaduras conducen a una condición inestable que pone en riesgo la supervivencia del paciente. La alta mortalidad asociada a las quemaduras que ocupa más del 50% de la superficie corporal es consecuencia del desequilibrio hidroelectrolítico severo o de un proceso infeccioso extremadamente grave. El riesgo de infección y muerte aumenta con la estancia hospitalaria prolongada, debido a la ausencia de cubierta cutánea y a la carencia de áreas donadoras de piel sana para el autoinjerto. Los problemas en el manejo del paciente quemado se podrían evitar si se dispone de una cubierta cutánea permanente y suficiente para las quemaduras de profundidad total, así como de una cubierta cutánea temporal y temprana como un apósito biológicamente activo para promover una epitelialización más rápida en las quemaduras de profundidad parcial y en los sitios donadores de piel.

El objetivo del presente trabajo es examinar la tecnología del cultivo de queratinocitos epidérmicos humanos en la ingeniería de tejidos para la producción de aloinjertos y autoinjertos de epidermis humana, y su uso para la cobertura temporal y permanente de las quemaduras, y en el caso de los aloinjertos, para la epitelización acelerada en las quemaduras de profundidad parcial y en las áreas donadoras.

El cultivo *in vitro* de epidermis humana

En años recientes, los queratinocitos humanos se han cultivado en forma seriada con altos grados de expansión celular.¹ Se han obtenido epitelios estratificados y queratinizados que expresan *in vitro* marcadores específicos del proceso de diferenciación epidérmica.¹⁻³ Los epitelios obtenidos en cultivo están constituidos por 3-4 capas celulares. A diferencia de las 20-30 capas encontradas en la epidermis normal adulta, éstas conservan en sus diferentes capas celulares la orientación típica de la epidermis. Las células que están en contacto directo con la superficie de cultivo corresponden a las de la capa basal de la epidermis. Las células

más avanzadas en el proceso de diferenciación se encuentran expuestas al medio, en forma análoga al estrato córneo de la piel humana.

El cultivo de queratinocitos epidérmicos humanos se utiliza para la terapia de pacientes quemados en más de 80 centros hospitalarios de Estados Unidos, Europa y México; ya sea siguiendo la técnica de cultivo desarrollada por el grupo de Howard Green o modificaciones de ésta.⁴⁻¹⁰ Los resultados han mostrado que en el caso de los autoinjertos, a partir de una pequeña biopsia de 2-3 cm² de piel no dañada, es posible expandir en cultivo, la superficie epidérmica hasta 7 mil a 10 mil veces en un período de 3-4 semanas. De esta manera se obtienen más de 20 mil cm² de epidermis; es decir, más que el equivalente a la superficie corporal de un humano adulto.⁸

El uso de los queratinocitos humanos cultivados *in vitro*, se está convirtiendo en una terapia de rutina, debido a que la cubierta temporal con epidermis alogénica cultivada promueve una más rápida epitelialización de las áreas cruentas. Estudios clínicos controlados, comparativos y aleatorios en áreas cruentas contiguas, demostraron que los aloinjertos de epidermis cultivada reducen significativamente los tiempos de epitelialización de un 30 a un 40%, en sitios donadores de piel y en quemaduras de profundidad parcial.¹¹ Estos resultados corroboraron resultados obtenidos en estudios iniciales no controlados.^{9, 12, 13} En todos estos casos los aloinjertos de epidermis cultivada promovieron una rápida epitelialización y fueron desplazados por la piel del paciente que se formó por debajo del injerto. Los epitelios cultivados promovieron la reepitelización del área cruenta, probablemente estimulando la proliferación de queratinocitos localizados en los anexos epidérmicos profundos y en los bordes de la epidermis no dañada? La estimulación del proceso de regeneración de la superficie cutánea por los aloinjertos de epidermis cultivada podría deberse a la síntesis y secreción por estos epitelios cultivados de factores de crecimiento o de algunos componentes de la matriz extracelular, capaces de promover la proliferación de las células precursoras de los queratinocitos epidérmicos diferenciados o de células troncales (stem cells).

Terapia del paciente quemado. Estrategias en el empleo de los autoinjertos y aloinjertos de epidermis cultivada

La terapia de los pacientes quemados ha avanzado de manera notable con la implementación de la excisión temprana y tangencial, y en algunos casos la excisión profunda. Estas técnicas quirúrgicas han sido posibles con el desarrollo de cubiertas cutáneas temporales. La terapia convencional consiste en los procedimientos quirúrgicos de excisión temprana de las áreas quemadas; la cubierta temporal con sustitutos artificiales, vendajes y apósitos, tanto de las áreas escindidas como de las áreas con quemaduras de profundidad parcial; el uso de áreas donadoras sanas del mismo paciente para su uso como autoinjertos completos y mallados (en red); así como el cubrir estos sitios donadores con vendajes y apósitos hasta su re-epitelización en períodos que pueden tomar de 15-25 días para ser nuevamente utilizados para la cosecha de más autoinjertos (Figura 1). Estos procedimientos, dependiendo de la superficie corporal quemada y de la profundidad de las quemaduras, implican largas estancias hospitalarias y varias sesiones quirúrgicas repetidas hasta lograr la completa cobertura cutánea permanente. En general, se requiere de un día de estancia hospitalaria por cada grado porcentual de superficie corporal quemada.

Una estrategia terapéutica utilizando la epidermis cultivada en forma combinada con la terapia de los autoinjertos convencionales, permitiría asegurar la sobrevivencia del paciente quemado, disminuir significativamente la estancia hospitalaria del mismo, y disminuir los riesgos a los que éste puede estar sometido debido a la ausencia de cubierta cutánea suficiente.¹⁴

Se ha demostrado que las áreas cruentas de profundidad parcial (quemaduras de segundo grado) se deben cubrir, en forma muy temprana, con los aloinjertos de epidermis cultivada para lograr una epitelización rápida de estas áreas que todavía presentan, en las estructuras secundarias, células epidérmicas remanentes capaces de proliferar; el uso temprano de los aloinjertos también previene una profundización y agravamiento de estas áreas cruentas.^{9,11,14} Las áreas con quemaduras de profundidad total (tercer grado), deben

cubrirse con autoinjertos completos en las áreas especiales y con autoinjertos en red o mallados en áreas no especiales.¹⁴ Con el fin de cubrir una mayor superficie quemada, los autoinjertos mallados podrían expandirse en una proporción de 2:1, y, según algunos investigadores, hasta de 6:1 o de 9:1, si los injertos en red se cubren con aloinjertos cultivados para promover una rápida epitelización. En estos casos, los autoinjertos en red y las áreas donadoras deben cubrirse de inmediato con los aloinjertos de epidermis cultivada¹⁴ (Figura 2)

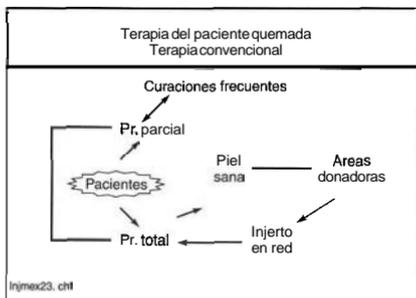


Figura 1. Terapia Convencional del Paciente Quemado. Se esquematiza el tratamiento del paciente quemado con base a la disponibilidad de injertos convencionales. En las quemaduras de profundidad parcial (Pr. parcial), el paciente es sometido a curaciones frecuentes con el riesgo de una profundización mayor. El tiempo de epitelización oscila entre 15 y 25 días. Por otra parte, para los pacientes con quemaduras de profundidad total (Pr. total), debe existir suficiente piel sana para disponer de áreas donadoras para el autoinjerto; involucra un gran número de sesiones quirúrgicas, y por lo tanto, la estancia hospitalaria es prolongada e implica un mayor riesgo para el paciente.

Los aloinjertos cultivados permiten una rápida proliferación de los queratinocitos, y por consiguiente, una rápida epitelización de los intersticios de los injertos en red y de los sitios donadores de piel. El cubrir los autoinjertos mallados con los aloinjertos de epidermis cultivada podría disminuir la formación de queloides o de cicatrización hipertrófica, debidas a las altas relaciones de expansión de los autoinjertos en red. La disminución de la posible formación de cicatrizaciones hipertróficas y el uso de los aloinjertos cultivados no se ha demostrado todavía. La cubierta de áreas donadoras con los aloinjertos cultivados permite una rápida

regeneración de estas y su recuperación más temprana para una siguiente toma de autoinjertos.^{11 14}

Si se considera necesario el uso de los autoinjertos cultivados, una biopsia de piel sana y de grosor total de unos 2-3 cm² de superficie, se debe tomar en forma inmediata para el cultivo de los autoinjertos que podrían ser trasplantados cerca de 3-4 semanas después de la toma de la biopsia. Tomando en consideración la superficie corporal quemada y la profundidad de las quemaduras, podemos suponer que si se llevan al cabo los procedimientos anteriores de uso de los autoinjertos cultivados, la necesidad de los autoinjertos de epidermis cultivada estaría limitada solamente a pacientes con más de un 60% de la superficie corporal quemada.

Resultados clínicos de la terapia combinada con epidermis cultivada

Los avances tecnológicos y la oportunidad de establecer un banco de epidermis cultivada para aloinjertos en la Unidad de Tecnología de Epidermis del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV, autorizado por la Dirección del Registro Nacional de Bancos de Organos y Trasplantes de la Secretaría de Salud, permitieron incluir la aplicación de los aloinjertos cultivados como parte de la terapia rutinaria del paciente quemado. Por medio de este banco fue posible el uso inmediato de los aloinjertos para lograr una epitelización rápida y más temprana en las áreas susceptibles a esta terapia, y esperar el período de las 3 semanas de cultivo necesarias para recibir los autoinjertos cuando estos fueran necesarios. En un estudio que se describe a continuación¹⁴ los aloinjertos y autoinjertos de epidermis humana se cultivaron en la Unidad de Tecnología en Epidermis del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV.

En un análisis comparativo y retrospectivo llevado a cabo en el Hospital Azcapotzalco Norte de Petróleos Mexicanos se trataron con epidermis cultivada cerca de 100 pacientes con quemaduras de grosor parcial y total. Se evaluaron 32 pacientes que fueron atendidos sin epidermis cultivada y 28 pacientes con epidermis cultivada. De los 28 pacientes, 12 (42.8%) sufrieron quemaduras en superficies menores al 30% del área corporal total; 9 pacientes (32.1%) tuvieron quemaduras en el 30-50% de su superficie corporal y 7 pacientes (25.1%) sufrieron quemaduras superiores al 50% del área corporal total. En todos estos casos se utilizó como terapia de rutina, una terapia combinada de autoinjertos convencionales y aloinjertos cultivados, y en algunos casos, especialmente en aquellos pacientes con quemaduras de tercer grado y con más del 50% de la superficie corporal quemada, también se utilizaron los autoinjertos cultivados.

Al comparar la duración de la estancia hospitalaria de los pacientes quemados atendidos con las técnicas convencionales solamente, con aquella registrada para los pacientes atendidos con una terapia combinada que incluyó la terapia convencional, los aloinjertos y los autoinjertos cultivados, se observó un decremento en los tiempos de

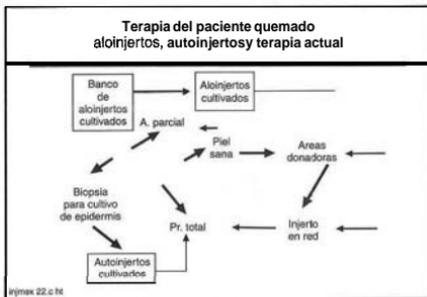


Figura 2. Estrategia terapéutica actual del paciente quemado. Utilización de autoinjertos y aloinjertos cultivados en combinación con los autoinjertos convencionales. Las áreas de profundidad parcial, áreas donadoras injertos en red, son cubiertas con aloinjertos cultivados que al estimular el proceso de epitelización de área cruenta reducen significativamente el tiempo del tratamiento. Los tiempos de epitelización son de 5-8 días. Los aloinjertos cultivados se encuentran disponibles para su rápida utilización en un banco de aloinjertos cultivados. Para los pacientes con quemaduras de profundidad total se emplea una terapia que como normales obtiene áreas donadoras, con los autoinjertos cultivados. En este caso, la población de ueratinocitos obtenidos da biopsia del paciente se utiliza para generar células suficientes para cubrir la superficie corporal del paciente. Este procedimiento conlleva a un 50% la estancia hospitalaria de los pacientes y disminuye los riesgos al que está sometido.

hospitalización, de entre 27% y 46% dependiendo de la superficie corporal quemada. (Cuadro I)

El índice de mortalidad del paciente quemado también disminuyó con el uso de la terapia combinada con epidermis cultivada. De 10 pacientes con quemaduras superiores al 50% de la superficie cutánea, que fueron atendidos con terapia convencional, solamente 2 pacientes lograron sobrevivir. En contraste, de 7 pacientes sometidos a una terapia combinada que incluyó en forma significativa la epidermis cultivada, 5 pacientes sobrevivieron, es decir, la mortalidad se redujo en un 65.0%. La causa del fallecimiento de los pacientes tratados con la epidermis cultivada estuvo asociada a quemaduras en las vías aéreas. En ninguno de los casos se observaron complicaciones ocasionadas por el empleo de los epitelios producidos *in vitro*, y no se presentaron diferencias en la eficiencia de la epitelización a pesar de que las quemaduras fueron por diversas causas.

Cuadro I. Disminución de la estancia hospitalaria en pacientes quemados tratados con epidermis cultivada			
Porcentaje de Superficie Corporal Quemada	Estancia Hospitalaria (Días)		Decremento en la Estancia Hospitalaria Promedio (%)
	Injertos Convencionales	Epidermis Cultivada	
Menos del 30%	31.8	23.1	27.3
30 al 50%	49.3	35.1	28.8
Más del 50%	77.5	41.8	46.0

Se comparó la duración promedio de estancia hospitalaria en pacientes quemados tratados con injertos convencionales (piel de grosor parcial tomada de áreas donadoras), y la estancia en aquéllos pacientes que recibieron epitelios cultivados (autoinjertos y aloinjertos) en el servicio de cirugía reconstructiva del Hospital Central Norte de Petróleos Mexicanos. Para la laborar estas estadísticas se sumieron los resultados obtenidos en el tratamiento de 28 pacientes atendidos dentro del programa de epidermis cultivada (hecho del 1987-1992). Las estadísticas correspondientes a los pacientes tratados con injertos convencionales es 32 pacientes, los resultados obtenidos en el mismo nosotro por el mismo grupo quirúrgico, para los años 1984 y 1987.

En la mayoría de los casos, el uso de los aloinjertos cultivados ocupó una mayor proporción que el de los autoinjertos cultivados en la terapia de cada uno de los pacientes. Con los aloinjertos cultivados se logró una cobertura temprana de las áreas cruentas y una re-epitelización rápida y tem-

prana de las quemaduras de profundidad parcial, y de los sitios donadores. Las diferencias observadas fueron significativas y congruentes con las experiencias reportadas por diversos grupos clínicos y de investigación en todo el mundo en los últimos 7 a 10 años. Durante este tiempo, cerca de mil pacientes quemados han recibido la epidermis cultivada como parte de su tratamiento. Estos datos deben ser considerados tomando en cuenta la imposibilidad de llevar a cabo estudios clínicos controlados de estancia hospitalaria y sobrevivencia.

Conclusión

La terapia combinada de la epidermis cultivada y con los autoinjertos convencionales permitió asegurar una mejor terapia de rutina al paciente quemado, menores riesgos de infección y complicaciones, así como probablemente mejores resultados estéticos. Además se observó una reducción de la estancia hospitalaria, que en muchos casos podría llegar a ser menor hasta en un 50%, comparado sólo con la terapia convencional actual, y por consiguiente, una disminución significativa en los costos terapéuticos, tanto para los pacientes como para las instituciones de atención al paciente quemado.

La disponibilidad de la epidermis cultivada en cantidades virtualmente ilimitadas hace de este recurso la solución para numerosos problemas de cicatrización y de cirugía reconstructiva. En la actualidad se intenta su aplicación en forma rutinaria no sólo en pacientes quemados, sino en individuos con problemas recurrentes como el complejo de pierna⁵⁻¹⁷ (Bolívar-Flores, resultados no publicados), o en dermoabrasiones y otros aspectos de la cirugía plástica y reconstructiva. Del mismo modo, la técnica se emplea en la cobertura de áreas donadoras y quemaduras de profundidad parcial.^{11, 14} De modo potencial podría emplearse en el tratamiento de patologías como la epidermolisis bullosa y en tratamientos quirúrgico-cosméticos de afecciones hipertróficas, así como en diversos casos en que se presentan daños epidérmicos como consecuencia de radioterapia y quimioterapia. La experiencia disponible y la que se acumulará en los años por venir, permitirán desarrollar métodos más adecuados para

reducir la contracción de las heridas, así como entender los mecanismos que están involucrados en la regeneración de la epidermis y otros epitelios.

Referencias

1. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975;6:331.
2. Sun TT, Green H. Differentiation of the epidermal keratinocyte in cell culture: formation of the cornified envelope. *Cell* 1976;9:511.
3. Green H. The keratinocyte as differentiated cell type. En: *The Harvey Lectures, Series 74*, Academic Press, New York, 1980, pp 101-139.
4. O'Connor NE, Mulliken JB, Banks-Schlegel S, Kehinde O, Green H. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1981;1:75-78.
5. Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H. Permanent coverage of large wounds with autologous cultures human epithelium. *N Engl J Med* 1984;311:448-451.
6. Pittelkow MR, Scott RE. New techniques for the *in vitro* culture of human skin keratinocytes and perspectives on their use for grafting of patients with extensive burns. *Mayo Clin Proc.* 1986;61:771.
7. Teepe RGC, Ponc M, Kreis RW, Hermans RP. Improved grafting method for treatment of burns with autologous cultured human epithelium. *Lancet* 1986;1:385.
8. Kuri-Harcuch W, Bolívar-Flores YJ, Marsch-Moreno M, Arkuch S. Autoinjertos de piel obtenidos por el cultivo *in vitro* de células epidérmicas. *Rev. Invest. Clín. (Méx.)* 1987;39:5.
9. Bolívar-Flores J, Poumian E, Marsch-Moreno M, Montes de Oca R y Kuri-Harcuch W. Use of cultured human epidermal keratinocytes for allografting burns and conditions for temporary banking of the cultured allografts. *Burns* 1990;16:3.
10. Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:5665.
11. Rivas-Torres MT, Amato D, Arámbula-Alvarez H, Kuri-Harcuch W. Controlled clinical study on skin donor sites and deep partial thickness burns treated with cultured epidermal allografts. *Plast Reconstr Surg* 1996;98:279-287.
12. Madden MR. Clinical experience in the use of cultured allogeneic epidermis grafted on patients with partial and full thickness burns. En: *Cultured Epithelial Grafts in wound closure: Proceedings of An Update Symposium*. Gallico GG, O'Connor NE, Green H (Organizers) Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School. New Orleans, Louisiana 1989.
13. De Luca M, Albanese E, Bondanza S, Megna M, Ugozzoli L, Molina F, Cancedda R, Santì PL, Bormioli M, Stella M, Magliacani G. Multicentre experience in the treatment of burns with autologous and allogeneic cultured epithelium, fresh or preserved in a frozen state. *Burns* 1989;15:303-309.
14. Nuñez-Gutiérrez H, Castro-Muñozledo F, Kuri-Harcuch W. Combined use of allograft and autograft epidermal cultures in therapy of burns. *Plast. Reconstr. Surg.* (1996) En Prensa.
15. Leigh IM, Purkis PE, Navsaria HA, Phillips TJ. Treatment of chronic venous ulcers with sheets of cultured allogeneic keratinocytes. *Brit. J. Dermatol.* 1987;117:591.
16. Phillips TJ, Kehinde O, Green H, Gilchrist BA. The treatment of skin ulcers with cultured epidermal allografts. En: *Cultured epithelial grafts in wound closure. Proceedings of An Update Symposium*. Gallico GG, O'Connor NE, Green, H. (Organizers). Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School. New Orleans, Louisiana, 1989.
17. Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC, Remensnyder JP, Kehinde O, Green H. Cultured epithelial autografts for giant congenital naevi. En: *Cultured epithelial grafts in wound closure. Proceedings of An update symposium*. Gallico GG, O'Connor NE, Green H (Organizers). Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School. New Orleans, Louisiana. 1989.

III. La construcción y el uso de bancos genéticos

Hugo A Barrera-Saldaña*

Resumen

La investigación biomédica se ha beneficiado en gran medida de las herramientas aportadas por la Biología Molecular y por la tecnología del ADN recombinante. En la gran mayoría de dichas investigaciones se usa al ADN de los individuos (bancos de ADN) como punto de partida. El ADN de cada individuo se analiza directamente por técnicas tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), o se fragmenta e inserta en vectores de clonación que se propagan generalmente en bacterias, para constituir una colección de clones, referida como banco de genes.

Mientras que a la primera opción, y gracias a la gran sensibilidad de la PCR, se recurre cada vez más para investigar mutaciones en genes conocidos, a la segunda se hace para aislar nuevos genes.

Palabras clave: Bancos genéticos, clonación molecular, PCR

Summary

Biomedical research has greatly benefited from molecular biology and recombinant DNA tools. In most current research projects, the DNA from each individual in a family or in a collection of individuals serves as the start-up material (DNA bank). Each sample is either directly analyzed with techniques such as polymerase chain reaction (PCR) or each DNA fragment is inserted and fractionated into cloning vectors transformed, generally in bacteria, to constitute a collection of clones, referred to as a gene bank. While the first approach is used to screen for mutations in the population, the second leads to the isolation of new genes.

Key words: Gene banks, molecular cloning, PCR.

Introducción

El sentido que deseo darle aquí a los bancos genéticos, es uno amplio que abarque tanto las colecciones de microorganismos recombinados, poseedores de todos los productos de una fragmentación representativa de un genoma (bancos de genes), como a una colección de tubos de laboratorio (bancos de ADNs) conteniendo cada uno el ADN genómico purificado a partir de sangre periférica, o de algún otro tejido, de una población de individuos con una enfermedad de interés.

Clonación molecular

Hasta antes de los años 70's era imposible analizar o purificar genes de los llamados de copia sencilla, que son los que codifican para la gran mayoría de las proteínas que soportan la estructura y el funcionamiento celular. La dificultad estaba en que además de que una célula humana contiene cantidades ínfimas de ADN, un gen humano de tamaño promedio (digamos 3 mil pares de bases o 3 kbp), representa tan solo una millonésima del genoma humano. De hecho, se ha esti-

*Académico numerario. Jefe del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Correspondencia y solicitudes de sobre título: Dr. Hugo Barrera Saldaña, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Avenida Madero y Dr. E. Aguirre Pequeño, Apartado postal 3-4125, Monterrey, N. L. México.

mado que para obtener un miligramo de un gen de 2 kbp, como es el caso del de la b-globina humana, se tendría que emplear como material de arranque ADN de todas las células de 24 personas.¹

En la década del 70 se originó la técnica de aislamiento de genes por clonación molecular, la cual permite acceder a los genes de organismos superiores. Esta técnica consta de tres procedimientos. Primero se genera una colección de microorganismos (generalmente *Escherichia coli*) que portan secuencias nucleotídicas del organismo de interés, luego se recurre a una de múltiples estrategias para identificar cuál de las miles y miles de clonas posee las secuencias nucleotídicas de interés y finalmente, esta clona es propagada en gran volumen y de ella recuperada dicha secuencia nucleotídica.

El invaluable aporte de estos procedimientos es doble: 1) hace posible expandir en forma clonal un gen particular y generar por ejemplo un miligramo del mismo, simplemente recuperando éste a partir de un litro de cultivo de la bacteria recombinada, y 2) cuando son aplicados al genoma completo de un organismo, la colección de clonas generadas se convierte en un banco o biblioteca de genes del mismo, constituyendo el material de arranque para cualquier proyecto dirigido a descifrar la información contenida en el ADN del organismo en cuestión.²

Bancos de genes

Existen básicamente dos tipos de bancos de genes, cuando son clasificados de acuerdo a la fuente del ADN a propagar: los bancos genómicos y los de ADN complementario (ADNc).

Los bancos genómicos son los que contienen clonas representativas de todas las secuencias del genoma de la especie en estudio. Los de ADNc, por el contrario, contienen sólo aquellas secuencias que en el genoma del organismo sirven para codificar las proteínas de algún tejido u órgano en particular. Estos últimos son construidos partiendo de las moléculas de ARNm del tejido en cuestión y convirtiéndolas en ADNc por acción de la transcriptasa reversa. Así, un banco de ADNc de hígado contendrá aquellas secuencias de ADN expresadas como proteínas en este tejido.

Los bancos de genes son también clasificados de acuerdo al vector que porta los insertos. En virtud de que los varios tipos de vectores acomodan insertos de diferentes tamaños, su selección dicta las características y usos particulares de cada banco.

En general se recurre a cuatro tipos de vectores para construir bancos de genes de organismos superiores; éstos y sus principales características se describen en el cuadro I.

Cuadro I. Clasificación de bancos de genes humanos de acuerdo al vector.		
Vector:	Inserto: Clones por genoma:	
1 Plásmidos	4 kpb	750.000
2 Bacteriófago	12-22 kpb	150.000
3 Cósmidos	40 kpb	75.000
4. YACs*	200-400 kpb	7.500
*Abreviatura de "Yeast Artificial Chromosomes"		

Mientras que para aislar un gen generalmente se recurre a bancos construidos con vectores derivados del bacteriófago lambda, el proyecto del genoma humano, cuyo principal objetivo fue construir un mapa físico de cada cromosoma humano,³ descansa en vectores del tipo de los cromosomas artificiales de levadura (conocidos como YACs, por las siglas del inglés), cuyos largos insertos hacen el proceso del mapeo más rápido y fácil.

Las cepas de bacterias y levaduras usadas como hospederos de los vectores requieren de poseer ciertas características. A saber:

- 1) Fáciles de introducirles las moléculas recombinantes.
- 2) Convenientes para tamizarlas cuando son usadas para propagar un banco de genes.
- 3) Modificadoras lo menos posible de los insertos.

Particularmente este último punto es de cuidado y las nuevas cepas de *Escherichia coli* se procuran carentes de enzimas de restricción, de metiltransferasas y de enzimas de recombinación.

Bancos de ADN

Con la "molecularización" de la Genética y de la Medicina, el ADN genómico de un individuo ya no sólo se usa para construir bancos para aislar genes en busca, por ejemplo, de mutaciones, sino que también se convirtió en el material de arranque para estudios de hibridación **primero**, de amplificación por la Reacción en Cadena de la **Polimerasa (PCR)** después, y recientemente de técnicas rápidas basadas en esta última, para tamizar mutaciones o para determinar la secuencia nucleotídica del gen o región génica de interés.⁴

Con los problemas asociados a recolectar muestras de sangre periférica de los miembros de una familia afectada con alguna enfermedad hereditaria, así como con las posibilidades cada día mayores de identificarlos genes causantes de muchas enfermedades genéticas (proceso acelerado con el proyecto del genoma humano), se desprendió la necesidad de preparar un juego de viales conteniendo el ADN de cada uno de los miembros de las familias en estudio.

El poseer un banco de ADN genómico de las familias de interés para el estudio de alguna enfermedad hereditaria, brinda un beneficio doble: primero, permite, la colección de familias que integra el banco de ADN es numerosa, usar dichas muestras para contribuir a un estudio colaborativo del tipo de los muchos concluidos y los más en proceso, orientados a identificar el gen o genes causantes de alguna enfermedad en particular. El poseer varios cientos de colecciones de familias preferentemente numerosas y de varias generaciones, ha sido el factor clave para el éxito de dichos proyectos, donde el paradigma es sin duda el de la cacería del gen causante de la Corea de Huntington, donde las armas moleculares fueron entre otras las caminatas cromosómicas.

Asimismo, el contar en el laboratorio con un banco de ADN de pacientes, permite recurrir a éste para rastrear mutaciones en el nuevo gen recién descubierto como causa de la enfermedad bajo consideración, o buscar la(s) nueva(s) mutación(es) recién reportada(s) en otra(s) población(es), en aquellos miembros afectados del banco que resultaron negativos para la detección de las mutaciones previamente conocidas.

Por último, en los casos de enfermedades complejas en las que se sospecha que influyen más de un gen, pero que se sabe existe asociación con algún polimorfismo genético, al avanzar los estudios encaminados a precisar qué genes están involucrados y cómo es que éstos lo hacen, el banco es una vez más reevaluado para precisar el peso que en la población representada tiene cada uno de los loci genéticos implicados.

Preparación y conservación de bancos de ADN

Unos cuantos mililitros (incluso algunas gotas) de sangre venosa periférica fresca y anticoagulada con EDTA, bastan para procesar la muestra. Esto se logra a través de una sucesión de pasos para lisar los glóbulos rojos, cosechar las células blancas, lisar éstas y degradarles sus proteínas, limpiar el ADN liberado por extracciones orgánicas (opcional), precipitar éste con etanol y finalmente, resuspenderlo en TE.

El ADN obtenido por cualquier método puede guardarse en viales de plástico nuevos, de preferencia con tapón de rosca, debidamente etiquetados y sus datos completos deben quedar registrados en una libreta de laboratorio. Dichos viales pueden agruparse en conjuntos de familias con la misma enfermedad y conservarse a 4°C. También, y sobre todo cuando no se van usar frecuentemente (para evitar ciclos de congelación y descongelación que tienden a romper la hebra del ADN), pueden almacenarse a -20°C o inclusive a -70°C.

Usos comunes de bancos de ADN

Tres son los principales usos actuales de un banco de ADN preparado a partir de un grupo de pacientes afligidos con una enfermedad genética y de sus familias:

- 1) Estudios de ligamiento para identificar el gen (es) responsable(s) del padecimiento en cuestión.
- 2) Pruebas para rastrear las posibles mutaciones que pudieran estar afectando al gen en estudio (identificado previamente).

- 3) Pruebas de tipificación de polimorfismos que indirectamente permitan un diagnóstico de portadores o establecer asociaciones entre dichos polimorfismos y predisposición o susceptibilidad al padecimiento investigado.

Aunque en algunas de las pruebas de laboratorio incluidas en estos tres tipos de investigaciones aun se recurre a la técnica de hibridación descrita por Edwin Southern en 1975,⁷ cada vez que es posible se procura reemplazar ésta por la más fácil, rápida, sensible y barata técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.⁸ Esta requiere generalmente de 100 ng del ADN del paciente para practicarse, pero puede aplicarse aun hasta con el ADN obtenido de una sola célula (unos cuantos picogramos). Así pues, el ADN de una muestra del banco será fuente abundante para múltiples ensayos con la técnica de PCR, como el descrito en el cuadro II.

Cuadro II. Ingredientes de un ensayo típico (50 ml) de PCR.	
Reactivo	Concentración final
H ₂ O	-
Tris-HCl, pH=9	10 mM
KCl	50 mM
Tritón X-100	0.1 %
MgCl ₂	0.5 a 2.5 mM
Iniciadores	0.2 a 0.5 mM (c/u)
dNTP's	0.2 mM
ADN	100 a 500 ng
Enzima	2.5 U

Conclusiones

Hasta hace poco era costumbre de los investigadores precavidos coleccionar sueros de pacientes. La revolución genética de los años 70's ha transformado, sobre todo en los últimos 10 años, a la Genética y a la Medicina. Del estudio del fenotipo se pasó al nivel bioquímico, ensayando enzimas y midiendo proteínas. Ahora ambas disciplinas se manejan al nivel molecular y el ADN, los genes, las mutaciones, los polimorfismos, las dosis génicas, las improntas genómicas, las expansiones trinucleotídicas, las huellas genéticas, y demás nuevos conceptos que el médico tiene que tratar de asimilar día a día, dominan el horizonte.

Ahora a un paciente (o preferentemente a toda su familia) con diagnóstico presuntivo de alguna enfermedad hereditaria de causa conocida o aun desconocida, se le debe recuperar su ADN para con él, si se cree que pudiera ser particularmente valioso (familia numerosa y con varias generaciones, presencia de translocaciones cromosómicas interesantes, características fenotípicas únicas o peculiares, etc.), incluirlo en un estudio de identificación del gen causa de su afección, o si éste ya se descubrió, caracterizarles su mutación.

Es así que ahora el médico y el investigador biomédico deben pensar en el ADN del paciente como el "expediente hereditario" permanente, fuente de presentes y futuras investigaciones, y un valioso aliado en la lucha contra la enfermedad.

Agradecimientos

Agradezco apoyos del CONACyT, SEP y UANL, así como valiosos.

Referencias

- Deaven LL. Libraries En: Los Alamos Science. Cooper GN (Ed.). Los Alamos National Laboratory. Los Alamos NM. 1992. Cap. 20, pp 219-235.
- Barrera-Saldaña HA. Información Genética: estructura, función y manipulación. CONACyT, Colección Ciencia Básica. México D.F, 1992, pp 1-87.
- Figuera LE, Barrera-Saldaña HA, Cantú-Garza JM. El proyecto del Genoma Humano. Ciencia y Desarrollo 1995;XXI:32-37.
- Barrera-Saldaña HA, González-Garay ML, Rivera-Pérez JA, Rojas-Martínez A, Vázquez-Alema RM. Genética Molecular Humana en México. Ciencia y Desarrollo 1991;XVII:68-80.
- Collaborating Group for the Huntington's Disease Research. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. Cell 1993;72:971-983.
- Sambrook J, Fritsch ET, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY. 2a. Ed. 1989.
- Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 1975;98:503-517.
- Barrera-Saldaña HA, Ortiz-López R, Rojas-Martínez A, y Reséndez-Pérez D. Reacción en Cadena de la Polimerasa: una nueva época dorada en la Biología Molecular. Ciencia y Desarrollo 1993;XVIII:50-80.

IV. Transfección de células humanas para el tratamiento de cáncer y de enfermedades metabólicas

Herminia Mariñez-Rodríguez*, Salvador Said-Fernández**

Resumen

Transfección es la introducción de DNA exógeno a una célula receptora. La transferencia de genes ha hecho posible que se perciban nuevos horizontes en el tratamiento de muchas enfermedades. Aquí se revisarán las opciones para el tratamiento de enfermedades hereditarias (metabólicas) y del cáncer.

En las enfermedades metabólicas, el defecto radica en la deficiencia o ausencia de una proteína debida a un gen dañado o ausente y la corrección consiste en introducir una copia del gen sano.

En lo que se refiere al tratamiento del cáncer, lo que se busca mediante manipulaciones genéticas es destruir las células que han perdido la regulación normal del crecimiento. Los genes supresores de tumores, los que codifican para interleucinas, interferones, o para antígenos que refuerzan la inmunidad del paciente se han utilizado para este fin. También se ha estudiado el efecto del factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés) y de marcadores de resistencia a drogas.

Aunque la terapia génica ha dado resultados promisorios existen dificultades importantes que tendrán que superarse antes de que ésta esté disponible para su utilización en la práctica clínica. Considerando el grado y la velocidad de desarrollo de esta nueva tecnología es muy probable que la terapia génica será un procedimiento exitoso y de rutina en la Medicina Molecular del próximo siglo.

Palabras clave: Enfermedades metabólicas, cáncer, terapia génica, transfección

Summary

Transfection consists the exogenous DNA introduction into a recipient cell. Gene transference is a powerful tool that has made it possible to perceive new horizons in the treatment of a great number of diseases. In the present paper, the current options to the inherited (metabolic) diseases and cancer treatments are described.

In metabolic diseases, the cellular defect consists of a deficiency or absence of a protein coded by a damaged or absent gene. Thus, the correction consists the introduction into the cells a copy of the intact gene.

With respect to the cancer treatment, the aim is to destroy, by means of genetic manipulations, the cells that have lost normal growth regulation. The genes that codify to interleucins, interferons, or those antigens that reinforce patient immunity have been used with this objective. In addition, the tumoral necrosis factor (TNF) effect, and that of drug-resistance markers have also been studied.

Although gene therapy has yielded promissory results, there are still considerable difficulties that need to be overcome before can gene therapy be available for clinical use. Considering the level and velocity by which this new technology is developing, it is probable that gene therapy will be a current, successful procedure in Molecular Medicine during the next century.

Key words: Metabolic diseases, cancer, gene therapy, transfection.

Maestro investigador de tiempo exclusivo. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.
* Académico Numerario, investigador Titular de la División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Correspondencia y solicitudes sobre tirones: Herminia Martínez Rodríguez. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. Avenida Maderoy José Eleuterio González. Apartado postal 1563. Monterrey, N.L. México.

Introducción

Transfecciones la introducción de DNA exógeno a una célula receptora. El DNA introducido puede expresarse en forma permanente o transitoria, dependiendo de si se integra o no al genoma de la célula receptora.¹

Hay una gran variedad de técnicas para la transferencia de genes que emplean el DNA solo o combinado con DEAE-Dextran, fosfato de calcio, lípidos catiónicos o utilizando vectores virales que aumentan la eficacia de la transfección.²

Mediante estas técnicas puede introducirse DNA de la misma especie o de otra diferente en una célula receptora y analizar su expresión, es decir, la síntesis de una proteína que la célula no podía hacer con anterioridad. Esto tiene aplicaciones muy importantes en la investigación básica para estudiar la regulación de la expresión génica y la biología del desarrollo y además tiene aplicaciones en la medicina, ya que pueden introducirse en células en cultivo, genes que codifican para hormonas, enzimas, factores de crecimiento, factores de coagulación y anticuerpos monoclonales, los cuales se pueden producir a gran escala por biotecnología y emplearse para el tratamiento de muchas enfermedades.³ Otra aplicación médica sobresaliente de la transferencia de genes, es sin lugar a duda la terapia génica. Es decir, la modificación de células de un individuo para que produzcan una proteína que normalmente no producen. La terapia génica tiene aplicaciones en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, infecciosas, hereditarias (metabólicas) o adquiridas? Se revisará aquí lo referente a las aplicaciones en enfermedades metabólicas y cáncer.

Enfermedades metabólicas

Hay más de 4500 enfermedades metabólicas en las que los pacientes tienen algún impedimento genético para producir una proteína estructural, enzimática u hormonal.⁵ En muchos casos, el tratamiento, si lo hay, se limita a tratar de reducir al máximo las necesidades del organismo por la proteína faltante; ya sea modificando la dieta o los hábitos de vida. De esta manera se evita que los productos metabólicos tóxicos se acumulen en el

organismo. Otra estrategia de tratamiento consiste en administrar de alguna fuente exógena la proteína faltante; por ejemplo, el factor VIII de la coagulación en la hemofilia A, o la hormona de crecimiento humana en casos de enanismo hipofisario. Desafortunadamente, los preparados de estos compuestos, que se administran a los pacientes, pueden estar contaminados con los virus del sida o de la hepatitis B.⁶

Las posibilidades de la terapia génica de células somáticas son muy prometedoras; considerando que el DNA exógeno puede introducirse *in vivo*, directamente al tejido apropiado; o puede introducirse primero *in vitro* en las células apropiadas e injertar éstas subsecuentemente a un sitio fisiológicamente importante en el organismo.⁷ Hace relativamente poco tiempo se aprobó un protocolo de investigación para el tratamiento de inmunodeficiencia hereditaria, mediante terapia génica. Los niños afectados por esta enfermedad tienen una deficiencia o la ausencia de la enzima adenosina desaminasa (ADA). Estos pacientes sufren de infecciones recurrentes de la piel, sistema nervioso central, tracto gastrointestinal y sinopulmonar, diarrea crónica, malabsorción y alta incidencia de linfomas. Por ello, la mayoría de los infantes que no encuentran un donador histocompatible de médula ósea mueren tempranamente. El tratamiento más común consiste en la administración de ADA de bovino, tratada con polietilenglicol para hacerla menos inmunogénica y retardar así su eliminación del torrente sanguíneo. En 1990, el primer protocolo aplicado de terapia génica se realizó en una niña de 4 años que sufría de una inmunodeficiencia hereditaria severa.

En este protocolo, se tomaron linfocitos de la niña, se les introdujo el gen de la adenosina desaminasa en un vector retroviral y luego los linfocitos tratados se devolvieron a la circulación. Se encontró que el gen se expresaba.⁸ Sin embargo, el uso de linfocitos T corregidos requiere de infusiones repetidas. Esto se debe a que se piensa que las células T sólo sobreviven unos cuantos meses. Posteriormente en dos niños tratados para deficiencia de ADA se encontraron evidencias de las células corregidas en la sangre y esto correlacionó con un mejoramiento importante del funcionamiento inmune.⁹ Este protocolo tiene importancia histórica porque fue el primero en

realizarse. Ahora hay muchos ejemplos más de tratamientos por terapia génica.

Cabe una mención especial para uno de ellos, publicado muy recientemente para la corrección de tirosinemia tipo I en un modelo animal. Esta enfermedad se debe a la deficiencia de la enzima fumarilacetato hidrolasa que actúa en el último paso del catabolismo de la tirosina. Los pacientes afectados con esta deficiencia sufren de disfunción hepática progresiva durante la infancia, daño tubular renal, crisis neurológicas tipo porfirias y desarrollo temprano de carcinoma hepatocelular. El sustrato de la enzima (fumarilacetato) y de su precursor (maleilacetato) son hepatotóxicos y carcinogénicos. En este trabajo se seleccionaron positivamente hepatocitos mutantes corregidos *in situ* por transferencia de genes mediada por retrovirus, y tan solo 1000 de estas células fueron capaces de repoblar el hígado ya que tenían una fuerte ventaja de crecimiento competitivo con las células mutantes.¹⁰ Este trabajo es muy trascendente, porque el hígado es un importante órgano blanco para la terapia génica de enfermedades metabólicas. Sin embargo, muchos de los trabajos previos eran relativamente ineficientes para obtener hepatocitos corregidos, capaces de mostrar efectos clínicos significativos. El éxito del modelo de preselección de hepatocitos mutantes corregidos *in situ* consiste en que estos hepatocitos crecen más rápidamente que los hepatocitos mutantes, pudiendo competir con ventaja y repoblar el hígado por expansión clonal.¹¹

Muchos tejidos han sido manipulados para su modificación genética, entre ellos piel, músculo, células sanguíneas, hepatocitos, etc. Los mecanismos más eficientes para introducir el DNA han sido desarrollados empleando vectores virales modificados que portan el gen de interés y que no causan daño en el paciente.

Cáncer

En el caso del cáncer el problema es muy diferente al de las enfermedades metabólicas. Las células tumorales han perdido la regulación del crecimiento normal, lo que se debe en la mayoría de los casos a múltiples mutaciones que involucran tanto la activación de oncogenes como la inacti-

vación de genes supresores de tumores. Estas mutaciones suceden a lo largo de la vida y se ha visto que la frecuencia con la que suceden se aumenta mucho por factores ambientales y/o genéticos.¹² Por lo tanto, la probabilidad de acumular el número suficiente de mutaciones para desarrollar un cáncer es más alta cuanto más avanzada es la edad de un individuo. No obstante, éste también puede presentarse a cualquier otra edad. Dado que las mutaciones son múltiples, ha sido muy interesante observar que para combatir un tumor, con frecuencia es suficiente la restauración de la función de un solo gen supresor de tumores para inhibir las propiedades tumorigénicas de muchas clases de células tumorales y no es necesario contrarrestar cada una de las mutaciones.⁷ Además, un solo tipo de terapia puede ser empleada para diversos tipos de tumores.¹³ Lo cual es muy conveniente, sobre todo si se compara con el caso de las enfermedades metabólicas, en las que para cada enfermedad debe tenerse caracterizado el gen y el tratamiento sólo sirve para esa enfermedad.

Se han intentado principalmente tres estrategias para la terapia génica el cáncer: 1) inactivar oncogenes, 2) administrar genes supresores de tumores sanos que sustituyan los que se perdieron por mutación y 3) aumentar la respuesta inmune del organismo para destruir las células tumorales. Aunque quizás las últimas dos son las más empleadas. Hay muchos ejemplos de protocolos clínicos aprobados para su aplicación en humanos para cada una de ellas. Para la primera estrategia hay varios protocolos aprobados en el que introduciendo RNA antisentido (un RNA con secuencia complementaria a los productos de la transcripción del oncogen), se ha intentado inactivar algunos oncogenes, como c-fos o c-myc.¹⁴ En el caso de la activación de genes supresores, p53 es tal vez el más estudiado y se ha probado para el tratamiento de diversos tipos de tumores, empleando vectores retrovirales.¹⁵ En lo que concierne a la tercera estrategia, vale la pena hacer algunas consideraciones: cada mutación que va sufriendo una célula la va haciendo un poco más diferente con respecto a las demás células del mismo tejido. Sin embargo, una célula tumoral no es lo suficientemente diferente a las células normales para que el sistema inmune la reconozca como

extraña y la destruya, este es el gran problema de la inmunoterapia.¹⁶

Entonces, lo que se ha intentado es hacer las células tumorales más extrañas al organismo por la introducción *in vitro* de genes que codifican para algunos antígenos. Por ejemplo, los de histocompatibilidad. Estas células modificadas se reinoculan en el organismo, el cual destruye ahora no solo las células modificadas sino el resto de las células tumorales. Lo anterior tiene implicaciones muy importantes, ya que una de las complicaciones más severas del cáncer son las metástasis. Y éstas, muchas veces son detectables solo cuando ya el mal está muy avanzado. Esta opción de tratamiento permite destruirlas aún cuando están como micrometástasis. Este tipo de terapia también se ha intentado por manipulación *in vivo*. Lo cual tiene la ventaja de no requerir del cultivo de las células del paciente. El cultivo de células, aunque sea transitorio, hace el tratamiento caro y difícil de aplicar a un número grande de enfermos.¹⁷

Otras estrategias que se han empleado para el tratamiento del cáncer son las siguientes: reforzar el sistema inmune, tratando linfocitos T específicos de tumores con genes que codifican para interleucinas;¹⁸ modificación genética de células tumorales, introduciendo moléculas de ADN complementario (cDNA, por sus siglas en inglés), que codifican para interferones, e incluso para factor de necrosis tumoral para aumentar la respuesta inmune antitumoral.

Algunos vectores empleados en terapia génica

Hay diversos vehículos moleculares que se utilizan para introducir el DNA exógeno a las células que se van a tratar por terapia génica. Entre ellos, los más empleados son los retrovirus modificados. Estos contienen un genoma de RNA que por transcripción reversa se copia a una doble cadena de cDNA. El genoma del virus está flanqueado por elementos idénticos llamados repeticiones terminales largas (LTR, por sus siglas en inglés). Estas regiones contienen secuencias regulatorias necesarias para la expresión de los genes situados entre ellas; incluyendo un promotor, un potenciador, señales de terminación de la transcripción y de poliadenilación. El DNA de do-

ble cadena integrado en la célula huésped (llamado provirus), es heredable, se integra establemente en sitios al azar del genoma del huésped como una sola copiacolinear con el genoma viral original. Para producir un vector retroviral, algunos genes virales son eliminados del provirus y reemplazados con el gen de interés terapéutico. En la mayoría de los casos, la cantidad de DNA que puede incorporarse en el vector entre los LTR está limitada a 7-8 kb, permitiendo la incorporación de la mayoría de los cDNA, pero de muy pocos genes de longitud genómica completa.⁷

Como los vectores retrovirales se integran al azar en el genoma del huésped, en ocasiones podrían inactivar genes celulares esenciales. La integración de un vector retroviral defectuoso en replicación puede representar un efecto mutacional que dispare el cambio de una célula preneoplásica a una célula neoplásica a través de la activación de un protooncogen previamente silencioso, o por la inactivación de un gen supresor de tumores. El hecho de que la mayoría de los cánceres humanos con toda probabilidad resultan de múltiples mutaciones, junto con el hecho de que tales genes blanco son muy raros, dan algo de seguridad de que el riesgo de una neoplasia resultante de la integración de un provirus es extremadamente bajo?

Los retrovirus requieren que la célula que van a infectar se replique para poder integrarse. Esto limita el tipo de células en las que pueden emplearse como vectores. Hay otros virus que también se utilizan con los mismos propósitos, tales como son los adenovirus y los virus adeno-asociados, que no requieren que las células se repliquen. Estos últimos se han empleado en protocolos de terapia de fibrosis quística y algunas enfermedades respiratorias. Sin embargo, ellos tienen el inconveniente de que se replican en el organismo y pueden infectar otras células. Se han empleado también herpes virus y parvovirus aunque con menor frecuencia. El tipo de vector que se utiliza depende del tipo de células que se desee infectar.

También se han empleado vectores no virales, como plásmidos²⁰ y liposomas. Estos últimos se forman al mezclar lípidos con DNA. Tienen la ventaja de no ser potencialmente infecciosos, aunque su uso ha sido muy limitado hasta la fecha.²¹ Recientemente se han empezado a usar vectores llamados virosomas que contienen liposomas catiónicos que aumentan la transducción retroviral.²²

Dificultades a superar

Es ampliamente aceptado que se han obtenido resultados muy promisorios en varios protocolos clínicos de terapia génica. Sin embargo, para que esta tecnología llegue a ser una herramienta de uso cotidiano en Medicina, deberán superarse algunas dificultades que hagan posible los siguientes requisitos indispensables: 1) que la terapia génica pueda realizarse mediante manipulaciones *in vivo*, 2) que sea posible dirigir el vector específicamente a las células blanco, 3) que se logre la integración sitio-específica del DNA que se está introduciendo y 4) que sea posible regular la expresión del gen.

Lo anterior, en su conjunto, haría innecesario tomar muestras de células de los pacientes para cultivarlas y modificarlas con el vector *in vitro*. Lo que facilitaría tratar un mayor número de pacientes a un costo mucho menor. Además al ser posible dirigir específicamente el vector al órgano blanco se eliminarían los riesgos inherentes a infectar otras células que no son las que se desean modificar. Con la integración sitio-específica se evitaría la posibilidad de inactivarse secuencias esenciales de la célula huésped o causar mutagénesis por inserción del virus en sitios inadecuados. Por último, la posibilidad de regular la expresión del gen introducido permitiría que la expresión del gen se realice sólo en los niveles y durante el período de tiempo requeridos; tal y como sucede en un organismo sano.

Se está realizando una investigación tan activa en el campo de la terapia génica, que es muy probable que en pocos años ésta constituya una alternativa terapéutica real en la práctica médica.

Referencias

1. Lewin B. Rearrangement and amplification in the genome. In: *Genes V*. Oxford University Press 1994: 1057-1100.
2. MacDonald C. Genetic engineering of animal cells. in: *Mammalian cell Biotechnology. A practical approach*. M. Butler (ed.). IRL Press 1991;57-84.
3. Koths K. Recombinant proteins for medical use: the attractions and challenges. *Curr Op Biotech* 1995;6:681-687.

4. Blau HM, Springer ML. Molecular Medicine Gene Therapy. A novel form of drug delivery. *New Eng J Med*. 1995; 333; 18: 1204-1205.
5. McKusick VA. Mendelian inheritance in man. 8th ed. John Hopkins University Press, Baltimore 1988.
6. Standbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JL, Brown MS. The metabolic basis of inherited disease. Fifth Ed. Mac Graw Hill. 1983. p3-59.
7. Roemer K, Friedman T. Concepts and strategies for human gene therapy. *Eur. J Biochem*. 1992;208:211-225.
8. Karson EM, Polvino W, Anderson WF. Prospects for Human Gene Therapy. *J Repr Med*. 1992;37:508-514.
9. Blease RM, Culver KW, Anderson WF. The ADA human gene therapy clinical protocol. *Hum Gene Ther*. 1990;1:331-362.
10. Overturf K, Al-Dhalimy M, Tanguay R, Brantly M, Ou C, Finegold M, Grompe D. Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nature Genet*. 1996;12:266-273.
11. Wilson JM. Round two for liver gene therapy. *Nature Genet*. 1996;12:232-233.
12. Weinberg R. Is cancer a disease of chaos?. in: *Genes and Cancer*. Published by Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg. 1994;14-15.
13. Culver KW. The potential for genetic healing. *Pulse* 1992;268:1768.
14. Sharma HW, Narayan R. The therapeutic potential of antisense oligonucleotides. *BioEssays*, 1995;17:1055-1063.
15. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Wilson. JK, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild type p53. *Science* 1990;249:912-915.
16. Zatloukal K, Schmidt W, Cotten M, Wagner E, Stringl G, Birnstiel ML. Somatic gene therapy for cancer. The utility of transferinfection in generating "tumor vaccines". *Gene* 1993;135:199-207.
17. Nabel GJ, Chang A, Nabel EG, Plautz G, Fox BA, Huang L, Shu S. Immunotherapy of malignancy by in vivo gene transfers into tumors, *Clinical Protocol*. In: *Human Gene Therapy*. Mary Ann Liebert Inc. Publishers. 1992;3:399-410.
18. Nakamura Y. Adoptive immunotherapy with murine tumor specific T lymphocytes engineered to secrete interleukine 2. *Cancer Res*. 1994;54:5757-5760.
19. Owen CA. Recent advances in somatic gene therapy for hereditary respiratory diseases. *Thorax* 1992;47:315-316.
20. Parker SE, Khatibi S, Margalith M, Anderson D, Yankauckas M, Gmmkowski TL, Lew D, Marquet M, Manthorpe M, Hobart P, Hersh E, Stopeck AT, Norman PJ. Plasmid DNA Gene Ther. Studies with the human interleukin-2 gene in tumor cells in vitro and in h e murine B16 melanoma model in vivo. *Cancer Gene Therapy*, 1996;3:175-185.
21. Lasic DD. Liposomes. *Science and Medicine*, 1996;3:34-43.
22. Hodgson CP, Solaiman F. Virosomes: cationic liposomes enhances retroviral transduction. *Nature Biotech*. 1996; 14:339-342.

V. Modelos celulares para el estudio de efectos tóxicos de fármacos y metales pesados

Salvador Said-Fernández,¹ Ma. del Pilar Carranza-Rosales,² Adriana Elizondo-Herrera,³ Javier Vargas-Villarreal,⁴ Diego González-Ramírez,⁵ Herminia Martínez-Rodríguez⁶

Resumen

La exposición ocupacional o en el ambiente general a agentes xenobióticos constituye un problema grave de salud pública. Sus efectos sobre la salud humana se están estudiando intensamente. El uso de biomarcadores ha mostrado ser muy útil para estos fines y para detectar oportunamente procesos patológicos o valorar procedimientos terapéuticos.

De manera tradicional, el uso de animales de experimentación ha sido indispensable para la detección y la validación de biomarcadores, para el estudio de los efectos tóxicos de agentes xenobióticos, de procesos patológicos o para el desarrollo de nuevos medicamentos. Sin embargo, restricciones éticas y limitaciones técnicas han hecho necesario el uso de modelos alternos de investigación in vitro. Las células aisladas de organismos y las líneas celulares en cultivos constituyen una de las mejores alternativas. En nuestro laboratorio implementamos un modelo in vitro para analizar el efecto del mercurio y otros metales pesados sobre la posible reabsorción tubular renal de proteínas. Esto, con el propósito de identificar y validar biomarcadores de daño renal a nivel de los túbulos contorneados proximales, antes de que las células epiteliales hayan sido lisadas. Además, el modelo in vitro aquí descrito podría ser útil para analizar sistemáticamente los primeros daños producidos por otros agentes nefrotóxicos.

Summary

Occupational and environmental exposures to xenobiotics is a serious Public Health problem. Their effects on human health is the subject of intensive research. The biomarkers have been demonstrated to be very useful tools for these purposes, and also to detect with opportunity, pathological processes or to evaluate certain therapeutic regimens. Traditionally, the use of laboratory animals has been essential to identify and validate biomarkers, to analyze xenobiotic effects and pathologic processes, or to develop new therapeutic drugs. However, ethical restrictions and technical and economical limitations have made it necessary to make use of in vitro research models as an alternative to the laboratory use of animals. The cells isolated from organisms and cell lines established in culture represent one of the best alternatives to the laboratory use of animals. We have implemented in our laboratory an in vitro model to analyze the effect of mercury and other heavy metals on the albumin protein tubular reabsorption in order to identify and validate biomarkers of renal damage at the proximal tubule level, before the epithelial cells become lysed. In addition, the in vitro model here described, could be useful to systematically analyze the early damage produced by other nephrotoxic agents.

División de Biología Celular y Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social.

¹ División de Postgrado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

² Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León.

³ División de Farmacología, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social.

⁴ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

⁵ Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Salvador Said Fernández, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Administración de Correos 4, Apartado 20, Colonia Independencia, 64720 Monterrey, N.L. (018) 344-4116.

Correo Electrónico: ssaid@academ01.mty.itesm.mx

Introducción

En el agua, el aire y la tierra de nuestro planeta se acumulan diariamente numerosas sustancias nocivas para la vida, conocidas como xenobióticos (del griego *xenos*, extraño; *bios*, vida; e *ico*, relativo a).¹ La presencia de xenobióticos constituye uno de los problemas más importantes de Salud Pública.² Además de los contaminantes químicos, los organismos vivos están expuestos a agentes físicos, como las radiaciones ionizantes.³ Actualmente hay más de 200 mil xenobióticos producidos por el hombre que están perjudicando seriamente a la biosfera.¹ De tal magnitud es el problema de la contaminación ambiental que Robert Murray (un eminente profesor de Bioquímica) postuló que "...de no controlarse en forma directa la contaminación química, en un futuro no muy lejano ya no habrá bioquímica por qué preocuparse".¹

Desde el punto de vista médico, los agentes xenobióticos más importantes son diversos medicamentos, aditivos para alimentos, pesticidas y desechos o materias primas industriales.^{1,4} La mayor parte de los xenobióticos producen sus efectos nocivos actuando directamente en el organismo, donde causan lesiones a nivel celular o molecular. Hace poco tiempo se descubrió que algunos pesticidas organoclorados, contaminantes de alimentos de origen vegetal, mimetizan actividades hormonales femeninas. Por eso se les ha llamado "xenoestrógenos". Se ha postulado que estos factores son promotores de cáncer mamario en la mujer.⁴ Esta propuesta es aún controversial.

En una revisión que realizamos en época reciente sobre investigaciones relacionadas con el tema, publicadas en los últimos tres años, observamos que los xenobióticos de mayor importancia médica producen trastornos metabólicos, lesionan órganos y tejidos o son promotores de cáncer. Algunos autores estiman que el 90% de los casos de cáncer fueron inducidos por un agente xenobiótico. En la mayor parte de los casos mencionados (si no es que en todos) se producen o liberan moléculas características, que pueden ser detectadas en los laboratorios de análisis clínicos. A estas moléculas indicativas de problemas causados por xenobióticos se les llama biomarcadores.

Los biomarcadores pueden ser ácidos nucleicos, proteínas con diversas funciones biológicas, incluyendo una amplia variedad de enzimas, aductos de DNA o proteínas y metabolitos de muy diversa índole. Se conocen como aductos a complejos de biomoléculas con productos tóxicos. Muchos de ellos son cancerígenos.

La importancia médica de los biomarcadores consiste en que su detección oportuna en el hombre o en los animales permite hacer una evaluación de la gravedad de los daños ocasionados por algún agente xenobiótico, a nivel individual o colectivo. También permite detectar oportunamente un problema de intoxicación, o de la presencia de cáncer, en sus fases más tempranas, cuando aún es alta la probabilidad de que el tratamiento específico sea exitoso.² Los biomarcadores permiten también valorar el progreso del tratamiento específico. Por las razones expuestas, el desarrollo de nuevos biomarcadores es un importante foco de interés del mundo científico, biotecnológico e industrial.

Los sujetos de estudio para la valoración y validación de los biomarcadores son, entre otros, las poblaciones humanas expuestas ocupacionalmente a los agentes xenobióticos, personas con cáncer o enfermedades metabólicas, sujetos sanos, animales de experimentación, órganos y tejidos aislados y células obtenidas directamente de hombres o animales, de cultivos primarios o de líneas celulares en cultivo.

En los últimos años, los modelos *in vitro* han cobrado una extraordinaria importancia y la tendencia de su uso es ascendente. La razón es que estos modelos forman parte importante del conjunto de métodos alternativos al uso de animales de laboratorio para estudiar el efecto de agentes xenobióticos y para el desarrollo de biomarcadores y medicamentos que se llevan al cabo actualmente. En el mundo existe una fuerte presión para que se usen lo menos posible, animales de laboratorio para investigación, por razones éticas, técnicas y económicas.⁵

Los modelos *in vitro* son particularmente útiles para analizar con detalle las relaciones de las vías metabólicas y las características farmacodinámicas de xenobióticos y medicamentos en desarrollo,⁶ como se muestran en los cuadros I y II. Una mención especial merece en los cuadros *in vitro* de hepatocitos,

considerando su papel crucial en los procesos de intoxicación/destoxicación de diversos compuestos. Esta ventaja y las restricciones éticas ya mencionadas han hecho de los cultivos de hepatocitos un modelo muy útil en la evaluación preclínica de nuevos compuestos,²⁶ como se muestra en el cuadro I. También se están utilizando

cultivos mixtos. Por ejemplo, de embriones de *Xenopus laevis* y hepatocitos para evaluar efectos teratogénicos de sustancias que deben ser metabolizadas para producir efectos mutagénicos (ver cuadro II). En el cuadro I se muestran también varias aplicaciones de las células en la validación *in vitro* de biomarcadores.

Cuadro I. Ejemplos de empleo de células de mamífero para la detección de efectos tóxicos producidos por agentes xenobióticos			
Células	Uso específico		Referencia
Células T gamma/delta	Reactividad a metales pesados		7
Linfocitos B y T	cuantificación de metales pesados acumulados		8
Hepatocitos de epitelios renales	Transporte de metales pesados		9
Embriones de rana	Efecto teratogénico de extractos acuosos de tierra		10
Hepatocitos embrionarios humanos (WRL-68)	Efectos tóxicos de cadmio y mercurio		11
Células de hígado renal: LLC-PK, y MDCK	Citotoxicidad de mercurio		12
Células uroteliales	Detección de aductos de DNA		13
Embriones de <i>Xenopus laevis</i>	Tamizaje de xenobióticos que producen lesiones en el DNA		14
Células hemopoéticas totipotenciales	Análisis de factores cancerígenos epigenéticos (radiación ionizante)		3
Hepatocitos	Modelos <i>in vitro</i> para el análisis de efectos hepatotóxicos de medicamentos en desarrollo		15
Linfocitos T y B	Monitoreo de la evolución de inmunosupresión terapéutica		16
Co-cultivos de hepatocitos y embriones murinos	Análisis de efectos tóxicos de agentes xenobióticos y medicamentos que deben ser metabolizados para activarse		17
Polen de <i>Tradescantia sp</i>	Efectos mutagénicos de químicos presentes en basura. humos de incineradores y desechos industriales		18
Cultivos primarios de células embrionarias de cerebro y retina	Efectos tóxicos de químicos ambientales para tasar el grado de riesgo en industrias contaminantes		19

Cuadro II. Utilidad de las células en cultivo como modelos para el desarrollo de medicamentos			
Modelo Celular	Estrategia terapéutica	Uso específico	Referencia
Xenoinjerto de células humanas de cáncer de próstata en ratones	Terapiagénica contra el cáncer de próstata	Modelo experimental de cáncer de próstata humana	20
Células de ratón de cáncer de mama MX1. Células de cáncer de vejiga T24 y J82	Desarrollo de drogas anticancerosas y monitoreo de las ya existentes	Efecto antineoplásico de <i>Vinca alkaloides</i>	21
Xenoinjerto de linfocitos humanos. B-CLL	Modelo murino preclínico para el desarrollo de medicamentos contra leucemia	Tamizaje. Análisis de efectos secundarios	22
Células de diversos tumores de ratón Leucemia (L1210, S180 y AKR) Melanoma (B16). Cáncer de pulmón (Lewis)	Drogas anticancerosas (40,000 compuestos por año)	Efecto citotóxico	23
Diversas líneas celulares	Drogas contra micobacterias	Efecto letal y bacteriostático	24
Células CaCo-2 de epitelio intestinal humano	Expilentes surfactantes	Efectos tóxicos generales	25

Es importante destacar que los modelos *in vitro* son útiles para el ensayo de compuestos químicos, pero no sustituyen totalmente a los animales de laboratorio. Esto se debe principalmente a que los cultivos celulares *in vitro* son en realidad una sobresimplificación de los modelos animales para estudios farmacológicos y toxicológicos. Lo cual, en muchas ocasiones impide hacer extrapolaciones directas de datos obtenidos *in vitro* a lo que sucede *in vivo*.²⁶ Algunos fármacos anticancerosos que muestran ser muy potentes *in vitro* son poco efectivos *in vivo*. Ello, en algunos casos se debe a que en los cultivos *in vitro* las drogas son fácil y rápidamente internalizadas por las células, en tanto que *in vivo* éstas se distribuyen y concentran en diferentes proporciones en los diferentes órganos y tejidos y se metabolizan y excretan a diferente velocidad de como lo hacen en líneas celulares puras cultivadas *in vitro*.²⁶

En nuestro laboratorio hemos enfocado nuestro interés al estudio de los efectos nefrotóxicos del mercurio, con la idea de identificar una proteína como biomarcador para detectar una disfunción renal antes de que haya ocurrido ya un daño a nivel del túbulo contorneado proximal. Por ello, en las próximas líneas, nos referiremos a este tema en especial.

El mercurio metálico se ha utilizado desde la antigüedad con diversos fines. Los más conocidos son el beneficio del mineral para extraer y purificar oro, la fabricación de amalgamas para uso dental, la fabricación de termómetros y de lámparas. Algunos compuestos orgánicos se han usado como fungicidas. Esto último ha ocasionado algunos episodios de intoxicación en poblaciones humanas numerosas.^{27, 28}

El mercurio metálico tiene una alta presión de vapor por lo tanto se mezcla rápida y eficazmente con los componentes del aire de donde es absorbido por los seres vivos.²⁹ El metil-mercurio se absorbe fácilmente por el organismo. Ambas formas del metal se acumulan en diversos órganos, pero preferentemente en el riñón,³⁰ donde puede producir toxicidad renal. Se ha sugerido que ésta se debe a una vasoconstricción y a un daño celular directo.³¹ El sitio más susceptible al efecto tóxico del mercurio en la nefrona es la *par. recta*; pero si se usan dosis de mercurio mayores que las que afectan a las *pars recta* resultará afectada la parte

proximal de la nefrona.³¹ Estas lesiones se manifiestan por proteinuria (microalbuminuria y excreción por orina de proteínas de bajo peso molecular).³⁰

Se han usado con éxito animales y órganos aislados para estudiar los efectos tóxicos de los agentes nefrotóxicos. Sin embargo, por las razones ya comentadas, con estos modelos de estudio es difícil analizar el mecanismo citopatogénico de los agentes nefrotóxicos a nivel celular o molecular. Por ello, en los últimos años se ha recurrido para este propósito a rebanadas de riñón, túbulo contorneado aislados y en mucho menor grado a monocapas de células de riñón de diversas especies de mamífero cultivadas *in vitro*.³² En el caso específico de intoxicación por cloruro de mercurio o metil-mercurio (0.1 μM a 5 mM) se han utilizado como modelos *in vitro* túbulo proximal aislados de conejo,³³ células murinas de leucemia L5178Y³⁴ y líneas celulares tubulares de cerdo (LLC-PK) y de perro (MDCK).¹²

En términos generales, en los trabajos arriba citados se observó que el mercurio no orgánico es tomado y liberado por las células mucho más rápido que el metil mercurio. Ambos tipos de compuestos producen lesiones membranales, mitocondriales y liberación de enzimas (por ejemplo, lactato deshidrogenasa y deshidrogenasa mitocondrial), y disminución de síntesis de DNA, por lo tanto disminución de la velocidad de multiplicación celular, y citólisis. Sin embargo, no se ha descrito con detalle cual es el efecto que ejerce el mercurio u otros metales pesados sobre el transporte de proteínas por monocapas celulares *in vitro*, lo cual es objeto de nuestro interés.

A modo de antecedentes sobre este tema en especial, en seguida hacemos un breve recordatorio de los aspectos de anatomía y fisiología renales relacionados con la reabsorción de proteínas: La unidad fisiológica y anatómica del riñón es la nefrona, que consiste del glomérulo renal, el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle, el túbulo contorneado distal y el túbulo colector. En forma simplificada se puede decir que el glomérulo es un ovillo formado por un vaso aferente, fenestrado y otro eferente. Ambos incluidos en la cápsula de Bowman. Es en esta porción de la nefrona donde se lleva a cabo la filtración glomerular.³⁵

El túbulo contorneado proximal se encuentra contiguo al glomérulo y recibe el filtrado glomerular,

el cual pasa luego por el asa de Henle y prosigue al túbulo contorneado distal. A continuación, entran en coalescencia hasta ocho de los túbulos distales para formar el túbulo colector, cuyo extremo se aparta de la corteza renal y pasa hacia abajo por el espesor de la médula, sitio en el que se convierte en conducto colector. Los conductos colectores se vacían en la pelvis renal.

Al fluir el filtrado glomerular por los túbulos, cerca de 99% de su agua y cantidades variables de sus solutos se reabsorben normalmente hacia el sistema vascular, y también se secretan ciertas cantidades de algunas sustancias hacia los túbulos. El agua tubular restante y las sustancias disueltas en ella se convierten en orina.³⁵

Las características de la membrana basal de la cápsula de Bowman impiden que se filtren los elementos formes de la sangre, así como las proteínas con un peso molecular mayor de 70 kDa. Sin embargo, el filtrado glomerular contiene numerosas proteínas con un peso molecular menor de 70 kDa que luego se reabsorben con una altísima eficacia en sujetos sanos y jóvenes. Por ejemplo, la albúmina se reabsorbe en un 98% y la β_2 microglobulina en un 100%.³⁶

A nivel tubular, la nefrona tiene entre otras, una función secretora. Mediante este mecanismo de secreción tubular se transportan en forma activa sustancias que se suman al filtrado que se encuentra en la luz del túbulo. Este proceso de secreción tubular es más aparente y eficaz en la región del túbulo contorneado proximal. Los solutos útiles al organismo son reabsorbidos a lo largo de los túbulos contorneados proximal y distal, pero principalmente a nivel del contorneado proximal.³⁵ Se conoce bien el proceso de reabsorción de la albúmina por túbulos contorneados aislados. Este proceso consiste en la internalización de la albúmina en vesículas endocíticas, mediante un proceso de pinocitosis, probablemente en dos formas: mediante la unión a receptores de membrana y en el líquido de las vesículas endocíticas.³⁷

Dentro de las células, las vesículas endocíticas se fusionan con los lisosomas, se forman los fagolisosomas y la proteína se digiere.³⁸ Los productos de hidrólisis (principalmente amino-ácidos libres) son transportados hacia el exterior del lisosoma.³⁸ Enseguida, estos productos de hidrólisis son transportados hacia la cara externa de los túbulos

contorneados proximales.³⁹ Lo que sugiere que estos aminoácidos se reintegran a la circulación sanguínea general, vía capilares eferentes. El mecanismo mencionado aún no se conoce con detalle.

En sujetos sanos, las proteínas del plasma contribuyen con un 10-20% del contenido de proteínas en la orina. Los principales componentes de la proteinuria normal son la glicoproteína de Tamm-Horsfall y proteínas que provienen de la descamación del epitelio que recubre al tracto urogenital.³⁶

En la hipertensión arterial, la diabetes mellitus o intoxicaciones por mercurio, cadmio, plomo, disolventes orgánicos o medicamentos como los salicilatos, se puede producir un daño renal desde leve hasta muy severo.³⁹ Varias proteínas de alto o bajo peso molecular presentes en la orina se usan ampliamente en la clínica como biomarcadores de daño renal.⁴⁰ Además, el tipo de proteínas detectadas en la orina permite saber si el daño ocurrió a nivel del glomérulo o de los túbulos contorneados proximales. La presencia en orina de proteínas de peso molecular mayor a 70 kDa o un porcentaje alto de albúmina (mayor al 20% del total de las proteínas detectadas en orina) son indicativas de lesiones a nivel del glomérulo,³⁷ en tanto que, la presencia de proteínas de bajo peso molecular indican lesión del túbulo contorneado proximal.³⁶

Por otro lado, la presencia de proteínas lisosomales, como la N-acetilglucosaminidasa, se debe a que las membranas lisosomal y plasmática de las células de la nefrona han sido lesionadas.⁴¹

Una albuminuria mayor de 3.5 g/día, asociada con edema (síndrome nefrótico) se debe a un lesión a nivel glomerular. Si la albuminuria es menos importante, pero clínicamente significativa (> 0.5 g/día), es posible que exista una falla en la reabsorción tubular.⁴² Cuando la albuminuria es menor de 0.5 g/día ésta se denomina microalbuminuria o pautal albuminuria, y se le asocia con frecuencia a formas crónicas de nefropatías desarrolladas como consecuencia de una intoxicación o de padecimientos como diabetes mellitus o hipertensión incipientes.⁴²

La concentración de N-acetilglucosaminidasa en orina se eleva en enfermedades con daño renal causado por medicamentos^{43,44} y metales pesa-

dos tales como cadmio,⁴⁵ plata⁴⁶ y plomo.⁴⁷ Por otro lado, se sabe que en casos de intoxicación grave con mercurio aparece proteinuria, consistente principalmente en liberación de albúmina, proteínas de bajo peso molecular⁴² y proteínas de origen lisosomal.⁴⁸ Como ya antes comentamos, entre estas últimas, la más usada como marcador de daño renal es la N-acetilglucosaminidasa y por lo tanto es un biomarcador de lesiones celulares serias. Sin embargo, de acuerdo con la experiencia de uno de nosotros (González-Ramírez, D., datos no publicados) las personas ocupacionalmente expuestas, con síntomas leves de intoxicación por mercurio no presentan proteinuria evidente con métodos convencionales. Esto puede deberse a que, a pesar de que el riñón esté siendo afectado, los métodos empleados no tienen la suficiente sensibilidad para detectar microconcentraciones de proteínas. Posiblemente en las fases muy tempranas del cuadro de intoxicación por mercurio aparecen en orina albúmina y ciertas proteínas de bajo peso molecular por inhibición del mecanismo de reabsorción de proteínas, pero no necesariamente porque ya hubo una destrucción de los túbulos contorneados, sino porque los receptores específicos de las células tubulares han perdido afinidad por ellas. Nuestra suposición se apoya en que existe un transporte selectivo dependiente de la constante de afinidad (T_m) de proteínas a nivel tubular⁴⁹ y en que el mercurio se combina con grupos sulfhidrilo que inhiben gran cantidad de enzimas⁵¹ y que podrían interferir con la unión de las proteínas con sus receptores, en una forma selectiva. Nuestro propósito es identificar una proteína como marcador temprano de intoxicación renal por mercurio, utilizando un método mucho más sensible que los convencionales. Ello permitiría detectar una disfunción a nivel de túbulos contorneados proximales, antes de que éstos sean lesionados severamente y permitan la liberación de proteínas de las propias células tubulares.

En nuestro laboratorio hemos elegido como modelo experimental a los epitelios de células de túbulos contorneados proximales para analizar sistemáticamente el efecto de mercurio y de otros metales pesados sobre el transporte transepitelial de proteínas de alto y bajo peso molecular, empezando con albúmina, por ser uno de los biomarcadores de daño renal mejor estudiados. Nuestra

hipótesis consiste en que el mercurio y otros metales pesados, administrados a los cultivos en dosis sublétricas inhibirán el mecanismo de reabsorción de la albúmina (internalización y excreción de los productos de hidrólisis). Utilizando monocapas de células de túbulo proximal de riñón de zarigüeya americana, llamadas OK por sus siglas en inglés (*Opossum Kidney*).⁵⁰ Estas células se organizan *in vitro* como los epitelios tubulares originales, conservando su polaridad estructural y funcional, y muchas de las características de los epitelios tubulares. Las monocapas que forman *in vitro* las células OK muestran una resistencia transepitelial de 41 - 63 ohms/cm².⁵¹

Nuestro modelo de estudio consiste en utilizar unos anillos de poliestireno que sostienen en uno de sus bordes un filtro de unos 6 mm de superficie libre. Estos insertos, colocados con el filtro hacia abajo, dejan un hueco que puede ser llenado con medio de cultivo y la proteína cuyo transporte se quiere investigar. El inserto se coloca dentro de un pozo del mismo material, el cual se llena parcialmente con medio de cultivo. Quedan entonces dos compartimentos, el del hueco formado por el filtro y el anillo y el inferior constituido por el pozo, dentro del cual se aloja el anillo. Las células crecen sobre la superficie del filtro y orientan su cara apical (borde de cepillo) hacia la superficie libre del inserto. Entre la cara lateral de cada célula queda un espacio (espacio paratubular) y también se forman las uniones herméticas, típicas de los epitelios tubulares. La cara basal de todas las células queda adherida al filtro.

En experimentos de transporte transepitelial utilizamos [³H]-inulina y [¹²⁵I]-sero albúmina bovina. La inulina es un polisacárido que no se transporta por vía transepitelial, sino entre las paredes laterales de las células epiteliales; y por eso la usamos como testigo negativo. A la fecha hemos encontrado que el [¹²⁵I] con el que marcamos la seroalbúmina es transportado transepitelialmente por las células OK en sentido apical-basolateral y en menor grado en el sentido opuesto.

Nuestro modelo nos permitirá analizar con detalle los efectos de dosis sublétricas de mercurio sobre la reabsorción de proteínas; y si, como esperamos, este efecto consiste en la inhibición de la reabsorción de proteínas, investigar si el mecanismo de transporte transepitelial está afectado a nivel de endo-

citosis, formación del fagosoma, delfagolisosoma, de la hidrólisis de las proteínas o de la excreción de los productos de hidrólisis.

Las perspectivas de este trabajo consisten en que el mismo modelo celular sería útil para analizar el efecto de éste y de otros metales pesados y fármacos sobre el transporte de proteínas biomarcadoras de daño renal, a nivel de reabsorción de los túbulos contorneados proximales.

Desde un aspecto más práctico, esperamos que el modelo que estamos implementando permita identificar nuevos biomarcadores de intoxicación renal, y por otro lado, se convierta en una buena alternativa para el estudio de efectos tóxicos de diversas sustancias, sin necesidad de sacrificar animales de laboratorio.

Agradecimientos

La parte experimental del trabajo aquí presentado se está realizando con apoyo parcial de CONACyT. Proyecto F328 M9212.

Referencias

1. Murray RK. Metabolismo de xenobióticos. En: Murray RK, Mayes PA, Granner DK, Rodwell, eds. *Bioquímica de Harper 13^a edición*. Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V. México, D.F., 1994; 843-849.
2. Henderson RF. Strategies for use of biological markers of exposure. *Toxicol Lett* 1995; 82- 83:379-83).
3. Trosko JE. Biomarkers for low-level exposure causing epigenetic responses in stem cells. *Stem Cells Day*; 1995; 13 (supl 1) :231-239.
4. Davis DL, Bradlow HL. Can environmental estrogens cause breast cancer?. *Scient Am* 1995; 273:144-148.
5. Adolphe M. Alternative methods to animal experimentation. Scientific and ethical problems. *Bull Acad Ntl Med*. 1995;179:1009-1016.
6. Chiu SH. The use of in vitro metabolism studies in the understanding of new drugs. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1993;29:77-83.
7. Nordlind K, Linden S. Gamma/delta T cells and human skin reactivity to heavy metals. *Archmatol Res*. 1995;287:137-141.
8. Steffensen IL, Mesna OJ, Andruchow E y cols. Cytotoxicity and accumulation of Hg, Ag, Cd, Cu, Pb and Zn in human peripheral T and B lymphocytes and monocytes in vitro. *Gen Pharmacol* 1994;25:1621-1633.
9. Shaik ZA, Blazka ME, Endo T. Metal transport in cells: cadmium uptake by rat hepatocytes and renal cortical apical cells. *Environ Health Prospect*. 1995; 103 (Supl 1): 73-75.
10. Fort DJ, Stover EL, Norton D. Ecological hazard assesment of aqueous soil extracts using FETAX. *Prog*

embryo teratogenesis assay-Xenopus. *J Appl Toxicol*. 1995;15:183-191.

11. Bucio L, Souza B, Albores A y cols. Cadmium and mercury toxicity in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology*. 1995;102:285-299.
12. Bohets H-H, Van Thienen MN, Van Der Biest y cols. Cytotoxicity of mercury compounds in LLC-PK₁, MDCK and human proximal tubular cells. *Kidney International*. 1995;47:395-403.
13. Vineis P, Talaska G, Malaveille C y cols. DNA adducts in urothelial cells: relationship with biomarkers of exposure to arylamines and polycyclic aromatic hydrocarbons from tobacco smoke. *Int J Cancer*. 1996;65:314-316.
14. Stringer BK, Blankemeyer JT. Measurement of DNA integrity and structure in Xenopus embryos in the presence of hydroxyurea, actinomycin-D, and triethylenemelamine using the fluorescent probe Hoechst 33258. *Teratol Carcinog Mutagen*. 1995;15:53-63.
15. Ulrich RG, Bacon JA, Cramer CT y cols. Cultured hepatocytes as investigational models for hepatic toxicity: practical applications in drug discovery and development. *Toxicol Lett*. 1995;82-83:107-115.
16. Kahan BD. The evolution of therapeutic immunosuppression and the potential impact of drug concentration monitoring. *Ther Drug Monit*. 1995; 17: 560-563.
17. Ozolins TR, Oglesby LA, Wiley MJ y cols. In vitro murine embryotoxicity of cyclophosphamide in embryos co-cultured with maternal hepatocytes: development and application of a murine embryo-hepatocyte co-culture model. *Toxicology*. 1995;18:102:259-274.
18. Sadowska A, Pluygers E, Narkiewicz M y cols. Environmental genotoxicity and cancer risk in humans: a combined evaluation correlating the results of the Tradescantia micronucleus assay in the field and human biomarker assessments in serum. I. The TRAD-MCN assay. *Eur J Cancer Prev*. 1994;3:69-78.
19. Reinhardt CA. Neurodevelopmental toxicity in vitro: primary cell culture model for screening and risk assessment. *Reprod Toxicol*. 1993;7(Suppl 1):165-170.
20. Cheng L, Sun J, Pretlow TG, Culp J, Yang NS. CWR22 xenograft as an ex vivo human tumor model for prostate cancer therapy. *J Ntl Cancer Inst* 1996;88:607-611.
21. Pawels O, Kiss R, Pasteels JL y cols. Cytotoxicity, cell cycle kinetics and morphonuclear-induced effects of Vinca alkaloid anticancer agents. *J Pharm Pharmacol*. 1995;47 870-875
22. Nohammad RM, Mohamad AN, Hamdan MY y cols. Establishment of a human B-CLL xenograft model: utility as a preclinical therapeutic model. *Leukemia* 1996;10:130-137.
23. Pratt WB, Ruddon RW, Ensminger WD y cols. *Anticancer Drug Development. En: The Anticancer Drugs*. Pratt, WB, Ruddon RW, Ensminger WD, Maybaum J (Eds.). Oxford University Press. 2a. Edición New York, 1994, pp 265-284.
24. Orme IM, Roberts AD, Furney SK, Skinner PS. Animal and cell culture models for the study of mycobacterial infections and treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1994;13:994-999.
25. Anderberg EK, Nyström Ch, Artursson P. Epithelial transport of drugs in cell culture. VII. Effects of pharmaceutical

- surfactant exipients and bile acids on transepithelial permeability in monolayers of human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J Pharm Sci.* 1992;81:879-887.
26. Jain RK. Transport of molecules across tumor vasculature. *Cancer Met Rev;* 1987;6:559-593.
 27. Clarkson TW, Small H, Norseth, T. Excretion and Reabsorption of Methyl Mercury After Polythiol Resin Treatment. *Arch Environ Health* 1973;26:1437-1476.
 28. Bakir, F, **Damluji SF**, Amin-Zaki **L**, **ycols**. Methylmercury Poisoning in Irak. An Interuniversity Repoti. *Science* 1973;181:230-241.
 29. Aposhian HV, Maiorino RM, **González-Ramírez, D** y **cols**. Mobilization of heavy metals by newer, therapeutically useful chelating agents. *Toxicol* 1995;97:23-38.
 30. World Health Organization. Inorganic Mercury Environmental Health Criteria 118 1991. WHO, (Geneva).
 31. **Hook JB, Hewitt WR**. Chap.11. Toxic responses of the kidney. En: Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons. 3rd. Edition. Klaassen CD, Amdur MO, Doull J (eds.) Mcmillan Publishing Compa New York. 1986. pp. 310-329.
 32. **Tarloff JB**, Goldstein RS. *In vitro* assessment of nephrotoxicity. *In Vitro Toxicology*. Gad SC. (ed.) Raven Press, Ltd., New York, 1994. pp 149-193.
 33. Zalups RK, Barfuss DW. Transport and toxicity of methylmercury along the proximal tubule of the rabbit. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 1993;121:176-185.
 34. Nakasawa N, Makino F, Okada S. Acute effects of mercuric compounds on cultured mammalian cells. *Biochem Pharmacol.* 1975;24:489-493.
 35. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*. 9th. Ed. W.B. Saunders, Co. 1996. pp 315.
 36. Mogensen CE. Microalbuminuria. *Science and Medicine* 1996;3:14-23.
 37. Schegler JS, Heppelmann B, Mildenerger S y **cols**. Receptor-mediated endocytosis of albumin in cultured opossum kidney cells: a model for proximal tubular protein reabsorption. *Eur J Physiol.* 1991;418:383-392.
 38. Carone FA, Peterson DR, Oparil S, Pullman TN. Renal tubular transport and catabolism of proteins and peptides. *Kidney Int.* 1979;16:271-278.
 39. Park CH, Maack T. Albumin absorption and catabolism by isolated perfused proximal convoluted tubules of the rabbit. *J Clin Invest.* 1984;73:767-777.
 40. Piscator M. Markers of tubular dysfunction. *Toxicol Letters.* 1989;46:197-204.
 41. Herrera GA. Low molecular weight proteins and the kidney: Physiologic and pathologic considerations. *Ultrastruct Pathol.* 1994;18:89-98.
 42. Bernard A, Lauwerys R. Proteinuria: Changes and mechanisms in toxic nephropathies. *Crit Rev Toxicol.* 1991;21:373-404.
 43. Lockwood TD, Bossman HB. The use of urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase in human renal toxicology. II. Elevation in human excretion after aspirin and sodium salicylate. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1979;49:337-345.
 44. Proctor RA, Kunin CM. Salicylate-induced enzymuria, comparison with other antiinflammatory agents. *Am J Med.* 1978;65:987-993.
 45. Mueller PW. Detecting the renal effects of cadmium toxicity. *Clin Chem.* 1993;39:743-745.
 46. Rosenman RD, Seixas KD, Jacobs NI. Potential nephrotoxic effects of exposure to silver. *Br J Ind Med.* 1987;47:267-272.
 47. **Endo G**, Horiguchi S, Kiyita I. Urinary N-acetyl-b-D-glucosaminidase activity in lead-exposed workers. *J Appl Toxicol.* 1990;10:235-238.
 48. Goyer RA. Chap. 19. Toxic effects of metals. En: Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. 3rd. edition. Klaassen C, Amdur MO y Doull J. McMillan Publishing Company. New York. 1986. pp 582-635.
 49. **Sumpio BE, Maack T**. Kinetics, competition, and selectivity of tubular absorption of proteins. *Am J Phys* 1982;243:F379-F392.
 50. Koyama H, Goodpasture C, **Miller M** y **cols**. Establishment and characterization of a cell line from the American opossum (*Didelphys virginiana*). *In Vitro.* 1978;14:239-246.
 51. Hori R, Okamura M, Takayama A y **cols**. Transport of organic anion in the OK kidney epithelial cell line. *Am Physiol Soc* (1993);F975-F980.