

## Tesis de Posgrado

# Cultivo in vitro de células normales de exudado peritoneal de conejo

Rusconi, Renata

1959

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Rusconi, Renata. (1959). Cultivo in vitro de células normales de exudado peritoneal de conejo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1010\\_Rusconi.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1010_Rusconi.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Rusconi, Renata. "Cultivo in vitro de células normales de exudado peritoneal de conejo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1959.  
[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1010\\_Rusconi.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1010_Rusconi.pdf)

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

RENATA RUSCONI

MADRIÑA DE TESIS:

DRA. EUGENIA SACERDOTE DE LUSTIG

PROF. TITULAR DE LA CATEDRA DE BIOLOGIA DE LA FACULTAD DE  
CIENCIAS EXACTAS FÍSICAS Y NATURALES.

---

BUENOS AIRES, OCTUBRE DE 1959.

TESIS: 1010

**CULTIVO "IN VITRO" DE CELULAS NORMALES DE  
CIUDADO PERITONEAL DE CONEJO.**



ESTE TRABAJO HA SIDO REALIZADO EN LOS LABORATORIOS DE INVESTIGACION DE H.R. SQUIBB & SONS ARGENTINA (MARTINEZ, F.C.N.G.B.H.) QUE NOS HA FACILITADO EL LUGAR DEL TRABAJO, LOS MATERIALES Y LOS EQUIPOS NECESARIOS PARA SU REALIZACION.

QUERREMOS EXPRESAR A ESTA INSTITUCION NUESTRO AGRADECIMIENTO Y EN PARTICULAR AL DR. A. SORDELLI, DR. V. DEULOFFU, DIRECTOR CIENTIFICO DE LOS LABORATORIOS DE INVESTIGACION, DR. A. VIICHES, DR. A.L. DURLACH, DIRECTOR DE DIVISION DE BIOLOGIA, DR. JULIO M. BOGRA, QUIEN ESTA A CARGO DE LA SECCION CULTIVO DE TEJIDOS DE DICHO LABORATORIO, QUE CON SU AYUDA Y CONSEJOS GUIO LA REALIZACION DEL PRESENTE TRABAJO, Y A LA DRA. EUGENIA SACERDOTE DE LUSTIG, TITULAR DE LA CATEDRA DE BIOLOGIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS FISICAS Y NATURALES DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES.

---

## INTRODUCCION

### Breve historia del cultivo "in vitro" de células de Exudado Peritoneal de mamíferos con especial referencia al uso de colorantes.

Desde principios de 1900 se inicia el estudio sistemático de las células y de los tejidos "in vitro".

En 1916 Maximow (1) obtiene cultivos de tejido conectivo de exudado peritoneal de mamíferos adultos que se usan ya desde este momento para la investigación biológica y patológica.

En los años subsiguientes se describen métodos simplificados para los cultivos de células "in vitro" mientras que el estudio citológico llega a resultados positivos a través de observaciones comparativas y separaciones de los varios tipos de células por medio de cultivos puros y con las nuevas técnicas de coloraciones vitales (3-4-5-6-7-8-9-10).

En 1925 Junkin (32) hace una reseña de los métodos usados para estudiar el origen de los fagocitos mononucleares del exudado peritoneal. Sabin había sostenido el origen endotelial, pero más tarde Sabin, Doan y Cunningham concluyen que estas células derivan en parte del retículo endotelio, en parte de una célula específica del mesénquima, presente en la pulpa esplénica. Más interesante para este tipo de trabajo es la descripción hecha por Sabin, Doan y Cunningham de varios tipos de células de exudado valiéndose de las coloraciones extravitales. Los fagocitos mononucleares del exudado peritoneal se pueden dividir en tres grupos: "Células hialinas" con afinidad variable para el Neutral Red; "Células en rosetas" (rosette cells) con Neutral Red en focos; "Células no en rosetas (non rosette cells) con gránulos del colorante difundidos en el citoplasma.

Todas estas células se obtuvieron inyectando en el peritoneo de un conejo, sangre total de conejo.

En 1931 Benjamin y Rivers (11) estudiaron un método para cultivar virus mixotico y a partir de células obtenidas del exudado de un conejo.

Se describe aquí la técnica por ser una de las primeras usadas siguiendo el método de Gay y Clark (Arch. Path 1926 I, 848) para células de exudados en cavidades serosas.

Se inyecta en la cavidad pleural derecha de un conejo normal una mezcla estéril de 5 cc de extracto de carne y goma acacia; 62 horas después se abre la cavidad asepticamente y se aspira el fluido. Se agrega heparina (1 cc de una solución 1:1000 para cada 10 cc de fluido pleural) al exudado para prevenir la coagulación y se centrifuga durante 5' a baja velocidad. El sedimento se resuspende en solución de Tyrode y se vuelve a centrifugar. Finalmente las células de 5-10 cc de exudado se suspenden en una mezcla de suero de conejo (1 parte y solución Tyrode (3 partes) y se siembran frascos de Carrel con 3cc. e/u.

Keen (9) en 1935 trabaja con cobayos y aísla células mononucleares de tipo monocitario del exudado pleural. En cultivo "in vitro" sin típicos macrófagos, pero una pequeña proporción toma características de fibroblastos y produce colonias puras de éstos, que mantienen sus características morfológicas a través de varios subcultivos. Se sugiere que el desarrollo de células mononucleares en cultivo está condicionado al tiempo del explante. Se puede suponer, dice el autor, que estos dos diferentes tipos celulares son estadios de uno mismo por el hecho de que se encontraron formas transitorias entre los macrófagos y los fibroblastos.

En los años entre el 1940 y el 1946 se estudia el efecto de drogas y agentes bacteriocidas citotóxicos sobre cul-

tivo de tejido, así como las actividades de los antibióticos.

Beard (13), Hall (14), Jacoby (15-16), Parker (17) y Faff (18) contribuyen al estudio de las relaciones y características de los varios tipos celulares encontrados en los exudados.

En 1947-49 Bucher (19) describe una técnica de cultivo "in vitro" de células de conejo, de cobayos y del hombre.

Así se llega al año 1950 con estudios más especializados. Bloom, Cummings y Michael (20) estudian la resistencia natural de ratones y conejos a la tuberculosis, haciendo recuentos comparativos de leucocitos y células fagocitarias mononucleares extraídas del exudado peritoneal.

En 1952 (21) Zaucherman (22) describe un método para cultivo de macrófagos y fibroblastos del exudado peritoneal de ratón y los utiliza para mantener parásitos intracelulares obligados.

En 1952 (23) describe una técnica para cultivo "in vitro" de células mononucleares normales en porta objetos sumergidos en medio líquido. Estas células monocitarias se infectan con bacilos tuberculosos.

En 1955 (24) Bareki, Messore y Tepine muestran que el cultivo "in vitro" de células peritoneales de conejo ofrece una fuente constante e inagotable de material sensible a los virus.

En 1956 Glick, Boatman y Ben Beer (25) describieron una técnica de centrifugación diferencial para la rápida separación de los Mastzellen del exudado peritoneal de ratón. Las células obtenidas se pusieron en suspensión en una solución de sacarosa gelatina e hidróxido de sodio, centrifugándose en este medio los Mastzellen, mientras que las células menos densas fueron retenidas en las capas medianas.

En 1956 Wegelius, Asboe y Hansen (26) inyectan sola-

ción salina fisiológica y solución Tyrode en el peritoneo de ratones y obtienen Mastzellen en estudios diferentes de degranulación citoplasmática, que muestran fenómenos intensos de metacromacia y un número variable de macrófagos con gránulos metacromáticos en su citoplasma, fenómeno interpretado como fagocitosis de gránulos de Mastzellen.

En 1956 Ginsberg y Blanckmon (27) describen un método para obtener leucocitos polimorfonucleares del exudado peritoneal de cobayos, que sirven como base para estudios sobre acción de virus.

En 1957 Barski y Robbe Fossat (29) consideran la multiplicación del virus poliomiélfítico en cultivos "in vitro" de células exudativas de monos.

En 1958 Esten (28) estudia un método para obtener leucocitos polimorfonucleares del exudado de cobayos.

En 1958-59 Furness (30-31) trabaja con ratones para obtener cultivos de macrófagos en la proporción del 40 % para el estudio de *Salmonella Typhi Murium*, y al mismo tiempo estudia el papel de los macrófagos en la inmunidad natural.

Con esta breve síntesis se ha deseado dar a conocer algunos de los principales aspectos tratados por diferentes investigadores en el curso de estas últimas décadas.

En este trabajo se describe un método para obtener - del conejo un exudado peritoneal rico en células migratorias y su cultivo posterior "in vitro". Se estudia y desarrolla:

- 1) una técnica para el tratamiento del animal previo a la extracción de la suspensión celular;
- 2) los materiales, técnicas y medios de cultivo utilizados;
- 3) la citología del exudado peritoneal inicial y durante un período de cultivo de algunas semanas a través de observaciones microscópicas directas y recurriendo a las coloraciones celulares supravitales y panópticas. Se prueba también medios



selectivos en un intento de obtener variantes nutricias en las células.

Estas experiencias se realizaron sobre una serie de varios consejos.

## C A P I T U L O I.

### MATERIAL, SOLUCIONES SALINAS, MEDIOS DE CULTIVO

#### MATERIAL:

Una descripción detallada sobre su elección y preparación ya ha sido descripta. (32). En el presente trabajo se han observado las mismas normas usando material de vidrio Pyrex, - Jena Q20 y Neutralglass, goma para y latex. El lavado hecho en C y H fué seguido de tratamiento apiretágeno. La esterilización realizada en horno (calor seco 180°C 1 hora y media) o Autoclave (camisa de acero inoxidable) 20° a 15 lb.

#### SOLUCIONES SALINAS FISIOLÓGICAS:

Se ha usado agua tridestilada - por vidrio Pyrex. Tratándose de aguas duras primero desionizadas por resina, luego bidestiladas en recipientes de vidrio Pyrex. Se han utilizado las siguientes soluciones salinas balanceadas (A.S.S.):

##### Solución salina balanceada de Hanks (33-34-35-36)

Para 1000 cc finales.

##### Solución a:

NaCl	8 gr.
KCl	0,40 gr.
SO <sub>4</sub> Mg. 7H <sub>2</sub> O	0,20 gr.

Disolver sucesivamente por agitación cada sal en 400 cc de agua bidestilada por vidrio.

##### Solución B:

Cl <sub>2</sub> Ca. 2H <sub>2</sub> O	0,18 gr.
---------------------------------------	----------

Disolver en 100 cc de agua bidestilada por vidrio.

##### Solución C:

PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,075 Gr.
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	0,06 gr.
Glucosa	1 gr.

Disolver sucesivamente en 400 cc de agua. Juntar agitando las -

tres soluciones.

Agregar 10 cc de solución de rojo fenol al 0,2% llevar a volumen final un litro, con agua bidestilada por vidrio.

Las soluciones A, B y C se pueden preparar juntas 10 x concentradas; con el objeto de conservarlas en heladera a 4°C, se agrega 2 cc % de cloroformo.

Solución de glucógeno al 0,002 % en Hanks.

Solución Stock 10 veces concentrada al 0,02%.

Glucógeno 0,02 gr.

Hanks' Gas 100 cc.

Esterilizar en frasco manadera en autoclave durante quince minutos.

Conservar en heladera a 4° C.

Solución de glucógeno al 0,002 % a usar:

Solución Stock de Glucógeno 0,02 % 30 cc

Hanks BSS 270 cc

Esterilizar en equipo inyector en autoclave durante 15 m.

Solución Heparina 5 unidades en Hanks BSS/

Heparina 10 mg. (950 u.)

H2O 100 cc.

Solución de Heparina 5 u en Hanks para usar:

Solución Stock Heparina 0,5 cc

Hanks BSS 200 cc.

Esterilizar en autoclave quince minutos en equipo inyector.

SOLUCION DAS DELORSO (37)

(excluyendo los iones calcio y magnesio)

Se utiliza para tripsinados:

NaCl 8 gr.

KCl 0,2 gr.

Na2H CO3 1,15 gr.

KH2 PO4 0,20 gr.

H2O para 1000 cc.

Solución rojo fenol 0,2 % 10 cc.

Esterilizar en autoclave, mantener la temperatura a 4° C.

Solución de NaH CO<sub>3</sub> al 7,5 %

NaH CO<sub>3</sub> 7,5 gr.  
H<sub>2</sub>O bidestilada 100 cc (a 60°)

Disolver bien por agitación. Agregar un exceso de agua de 8 ml. Agitar bien. Filtrar por filtro clarificante de vidrio. Esterilizar al autoclave 10 minutos. Conservar a + 4° C. La reposición de CO<sub>2</sub> se hace por gaseado con carbogeno.

Solución normal de NaOH

NaOH 4 gr.  
H<sub>2</sub>O bidestilada hasta 100 cc. en un matraz alforado.

Agitar hasta disolución completa.

Solución de NaOH 0,1 N

Solución NaOH N 10 cc.  
H<sub>2</sub>O bidestilada 90 cc.

Filtrar por filtro clarificante de vidrio. Esterilizar en autoclave 10 lb. 10 minutos. Conservar a + 4° C.

Solución Rojo fenol al 0,2 % para 200 cc

Rojo fenol (MW 354,37) 0,4 gr.  
Sol. NaOH N/20 22,0 ml.

Disolver en agua bidestilada por vidrio hasta completar 200 cc. Se tritura el rojo fenol en mortero hasta obtener un polvo finísimo, agregando progresivamente en pequeños volúmenes la solución de NaOH n/20 y luego el agua bidestilada. Filtrar por papel "ash free". Usar 1 ml. por cada 100 cc. de la solución a preparar. Esterilizar en autoclave 10° a 15 lb.

Solución de mantenimiento de Tripaina al 0,10% en BSS para 100 cc.

Solución de antibióticos.  
(Penicilina, estreptomicina) 1 cc.  
20000 u. / cc

Solución NaHCO<sub>3</sub> 7,5 1,8 cc

solución de hidrolizado  
de lactoalbumina 5% (\*) 10 cc  
Solución de tripsina 2 %  
en PBS (Dulbecco) 15 cc.

(\*) La solución de hidrolizado de lactoalbúmina al 5 %  
se prepara:

- polvo de hidrolizado 5 gr.
- solución de Hanks 95 gr.

Agitar para disolver en baño maría  
a 70/80°C.

Esterilizar en autoclave 15 minutos, a 15 lb.

Conservar congelado a menos 25°C.

---

MEDIOS DE CULTIVO

En términos generales están formados por una solución salina fisiológica, antibióticos, suero de mamíferos, debiendo enriquecerse con aminoácidos, vitaminas, factores de crecimiento etc.

Se utilizaron los siguientes medios:

HANKS SUERO 40 % para 100 cc

Hanks' BSS 60 cc

sol. de antibióticos

(penicil./estreptomic.)

20000 u./cc 1cc

sol. NaHCO<sub>3</sub> 7,5 % 0,20 cc

Suero equino 40 cc

MEDIO BASAL DE RAGGE CON HIDROLIZADO DE LACTOALBUMINA 0,5% Y

SUERO

Hanks' BSS 70 cc

Sol. antibióticos 1 cc

Sol. Na. HCO<sub>3</sub> 7,5 % 1,4 cc

Sol.stock A1 (aminoácidos 40X) 2,5 cc

Sol.stock A2 (tirosina-cistina) 2,5 cc

Sol.stock A3 (glutamina 100X) 1 cc

Sol.Hidrolizado lactoalbumina 5% 10 cc

Sol NaOH 0,1 N 2,8 cc

Suero equino 20 cc pH 7,3 - 7,4

FORMULA GENERAL DEL MEDIO DE WAYSOUTH MB752/1 (46)

SI

<u>Sustancias</u>	<u>mg o/o</u>
NaCl	600
KCl	15
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	12
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	24
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	20
Dextrosa	500

Acido Ascorbico	1,75
Cisteina HCl	9,0
Glutatiene	1,5
Colina HCl	25,0
Hipoxantina	2,5
Glutamina	35,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	30,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,0
NaHCO <sub>3</sub>	224,0

S2

<u>Sustancias</u>	<u>mg c/o</u>
Tiamina	1,0
Pantotenato de Calcio	0,1
Riboflavina	0,2
Piridoxina HCl	0,1
Acido Fólico	0,04
Biotina	0,002
m-Inositol 2H <sub>2</sub> O	0,1
Nicotinamide	0,1
Vitamina B12	0,02

S1

<u>Sustancias</u>	<u>mg c/o</u>
L-Lisina HCl	24,0
L-Istidina HCl	15,0
L-Acido Glutámico	15,0
L-Treonina	8,5
L-Arginina HCl	7,5
L-Valina	6,5
L-Acido Aspartico	6,0
Glicina	5,0

<u>Sustancias</u>	<u>mg. o.º</u>
L-Prolina	5,0
L-Leucina	5,0
L-Metionina	5,0
L-Fenilalanina	5,0
L-Tirosina	4,0
L-Triptofano	4,0
L-Isoleucina	2,5
L-Cistina	1,5

NaOH (apH 7,4)

MEDIO SIEMPRENICO DE WYBOUTH MB 752/I (46-47-48) para 100cc

Sol. stock S1 2X conc. (sales, glucosa, ac. ascorbico, cisteina, glutatone, colina, hipoxantina, glutamina)	50,0 cc
Sol. stock S2 40 X conc. (vi- taminas)	2,5 cc
Sol. stock S3 10 x conc. (aminocidos)	10,0 cc
Agua bidestilada	37,5 cc
Antibioticos (penicilina- estreptomicina 20000u/cc)	1,0 cc
NaHCO3 7,5 %	1,0 cc

Esterilización: Las soluciones stock se esterilizan por fil-  
tros de porcelana o por filtros Seitz y se conservan en helade-  
dera por tiempo indeterminado a 4°C., con excepción de la so-  
lución stock S1 que se mantiene solo hasta 3 semanas.



FORMULA GENERAL DEL MEDIO BASAL DE EAGLE (38)

S A1

<u>Aminoácidos</u>	<u>Mg%</u>
L/Arginina HCl	21
Histidina HCl	9
L-Isoleucina	26
Leucina	26
Lisina	36,4
Metionina	7,4
Fenilalanina	16
Treonina	23,8
Triptofano	4
Valina	23,4

S A2

Tirosina	18
Cistina	12

S A3

Glutamina	300
-----------	-----

Vitaminas

S V

Biotina	0,24
Colina	0,12
Acido fólico	0,44
Nicotinamida	0,12
Acido Pantotémico	0,21
Piridoxal HCl	0,23
Tiamina	0,38
Riboflavina	0,051
Inositol	0,18

Además:

<u>Sustancias</u>	<u>mg%</u>
NaCl	5,84
KCl	0,372
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,138
$\text{NaHCO}_3$	1,68
$\text{CaCl}_2$	0,11
$\text{MgCl}_2$	0,047
Glucosa	1.000

MEDIO BASAL DE EAGLE (EBM) (38-39-40-41-42-43-44-45)

Hanks' BSS	70 cc
Solo antibióticos (penicil/estrepto/ 20.000 u/cc)	1 cc
Sol. $\text{NaHCO}_3$ 7,5 %	1,4 cc
Sol. Stock A <sub>1</sub> (aminoácidos 40 x)	2,5 cc
Sol. Stock A <sub>2</sub> (tirosina-cistina) 40 x	2,5 cc
Sol. Stock A <sub>3</sub> (Glutamina 100 x)	1 cc
Sol. Stock V (Vitaminas 100 x)	1 cc
Sol. NaOH 0,1 N	0,6 cc
(suero equino	20 cc( PH 7,4

Todas las soluciones Stock se esterilizan por filtros de porcelana esterilizantes.

SUERO EQUINO

(49-50-51-52)

El suero equino, obtenido de animales jóvenes y sanos (3 á 5 años de edad), esterilizado por filtración (bujías por celama), es usado después de haber sido probado en cultivos - testigos y demostrado su buen poder nutritivo y falta de toxicidad. Se conserva a 4°C hasta 2 meses, y es centrifugado cada vez antes de usar a 1500 RPM x 15'

CAPITULO II.

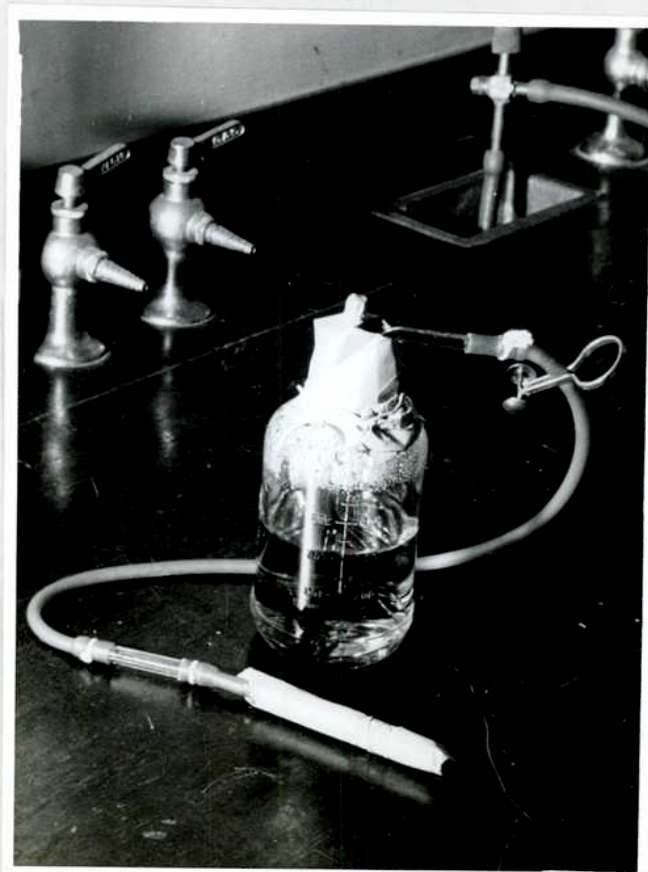
- a) OBSENCION DE CELULAS DEL EXUDADO PERITONEAL DEL CONEJO Y -  
PRIMER CULTIVO "IN VITRO"
- b) SUBCULTIVOS.

Para este primer paso de la experiencia se sigue la técnica descrita por Barski, Messori y Lepine (24) con algunas modificaciones. Se usa una solución de glucógeno como agente quimiotáctico para la producción de células de exudado peritoneal. Su acción se ejerce sobre las células migratorias y se elige por ser un componente de los tejidos normales.(54)

A un conejo sano de alrededor 3 kg. se le inyectan en el peritoneo por tres días consecutivos, 300 cc por vez de una solución estéril de glucógeno al 0,00 2 % en Hanks BSS -- (36) calentada a 37°C.

El equipo inyector está constituido por un frasco Baxter de 500 cc de capacidad, con tubuladura de vidrio y de goma que termina en una aguja calibre 20. (Fig. I)

Fig. I.



El lugar de inyección es sobre el lado derecho del abdomen aproximadamente a 5 cm. por debajo del margen costal y a 2 cm. a la derecha de la línea media. Puede elegirse también un punto que diste de 2 á 3 cm. por debajo de la línea costal, pero sobre el lado izquierdo del animal. (Fig. II)

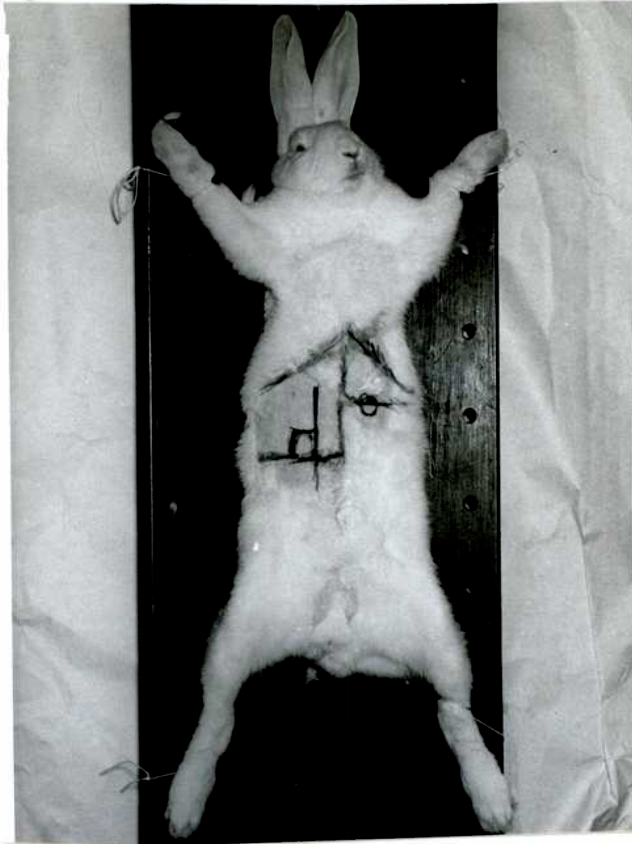


Fig. II.

Al cuarto día se le inyectan por la misma vía 200 cc de solución de Hanks BSS con 5 unidades de heparina y antibióticos. Transcurridos 5 ó 10 minutos y luego de un masaje suave del abdomen, el animal es sacrificado previa anestesia, por exanguino.

El conejo debe recibir una dieta alimenticia con abundante cantidad de agua durante los días del tratamiento, para evitar una deshidratación acentuada que condicionaría una absorción rápida de toda la solución que se quiere extraer como fuente de células.

Por otra parte es aconsejable no hacer la inyección de solución de Hanks agregada de heparina "post mortem", ya que el relajamiento y distensión de las vísceras puede dificultar

tar la introducción del líquido en el peritoneo.

Por un ojal hecho en la pared del abdomen, se extrae en por medio de una pipeta aproximadamente 150 cc de un líquido opalescente, ligeramente rosado que se recoge en un frasco de centrifuga de 250 cc de capacidad, estéril previamente enfriado a 4°C y mantenido en baño de hielo con el propósito de evitar fenómenos de coagulación.

Cada individuo de una respuesta variable en cuanto a rendimiento celular siendo las fluctuaciones de 10, 20, 30 y hasta 40 millones de células.

Sigue el filtrado de líquido por gaza. La suspensión celular es centrifugada 10 minutos a 500 RPM, el sedimento o "Pellet" celular que es blanquecino con una línea superior de glóbulos rojos, se resuspende y lava con Hanks suero por tres veces consecutivas centrifugando siempre 10 minutos a 500 RPM. Las células son finalmente resuspendidas en medio de cultivo en una relación 1: 50, referida al volumen del "pellet" extrayéndose una muestra de la misma para su observación en la cámara cuantacélulas. La muestra de la suspensión celular es mezclada V/V con la solución del colorante (Solución 0,1% de cristal violeta en solución 0,1 M de ácido cítrico). Después de agitar suavemente a fin de homogeneizar lo más correctamente posible, se carga la cámara de Neubauer y se examina en el microscopio anotándose el grado de separación celular, individualización y número de células. Hecho el recuento en base a elementos monocitarios, el inóculum de siembra se ajusta a  $1 \times 10^6$  por cc de medio de cultivo.

El plan de siembra está siempre determinado por la utilización posterior de los cultivos. Para la realización de este trabajo fué el siguiente:

- 1°) - Tubos de ensayo, de 0,7 á 1 cc de inóculum. Se destinan al examen en fresco y luego para coloraciones.
- 2°) - Frascos, tipo Kolle de 250 cc, placa de cultivo 12 cc,



para sub-cultivos.

3°) - Cajas de Petri, 4,5 cm. con cubre para colocaciones y -  
microscopía de fase.

Descripción de los tipos celulares del exudado: Momentos antes de la siembra, la población celular que integra el exudado es tá representada por células de origen sanguíneo (globulos rojos, linfocitos, leucocitos) y no sanguíneo de tipo monocitario.

La coloración con cristal violeta pone en evidencia la morfología nuclear, siendo los leucocitos polimorfonucleares de núcleo lobulado y los monocitos de núcleo oval o redondo, pudiéndose apreciar también el tamaño celular que en los primeros llega a medir de 7 á 10 micrones y en los segundos más de 15. (Ver Fig. III y IV.)

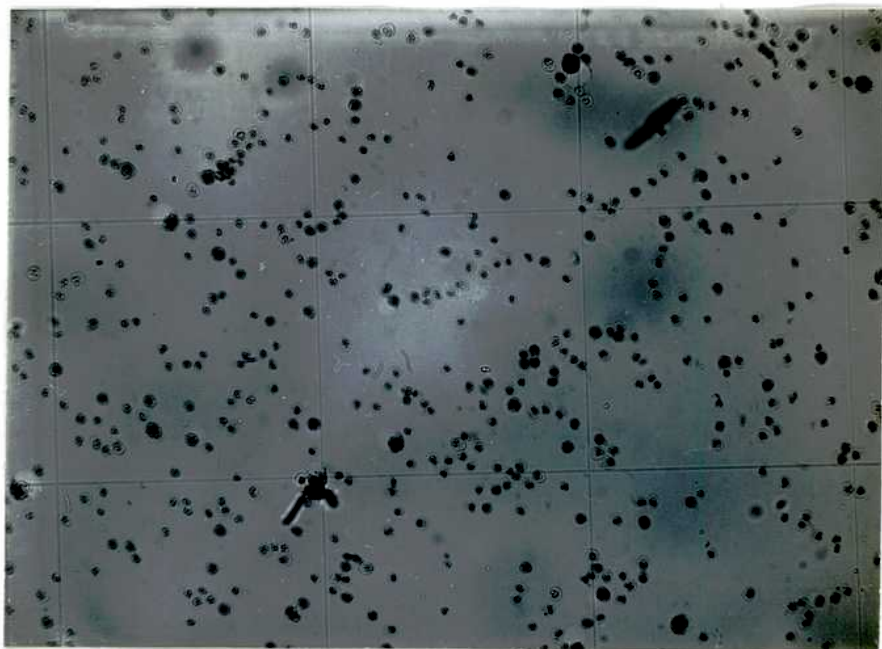


Fig III.

Objetivo 10 x

Coloración: Cristal violeta.

Varios tipos celulares que integran la población.  
del exudado peritoneal del conejo.

Una vez realizada la siembra inicia el cultivo "in vitro" a temperatura de 37°C. Al cabo de las primeras 5 horas las células mantenidas en posición horizontal inmóvil, empieza a adherir y a extenderse sobre la superficie del vidrio. Transcurridas 24 horas el metabolismo celular acidifica el medio a pH 7 - 6,9 (pH inicial 7,4 - 7,6) y los tubos y frascos necesitan de un lavado con Hanks suero 20 %, para arrastrar las impurezas presentes y de un cambio de medio a pH 7,6 que se realiza aspirando el medio acidificado y reponiendo el nuevo en las mismas condiciones de siembra.

Al cabo de 72 horas de cultivo vuelve a presentarse la situación descrita, pero la observación microscópica directa muestra un gran número de células adheridas al vidrio, fusiformes con prolongaciones, que tienden a dar un "Sheet" confluyente y células redondeadas refringentes bien adheridas (ver Fig. V.)

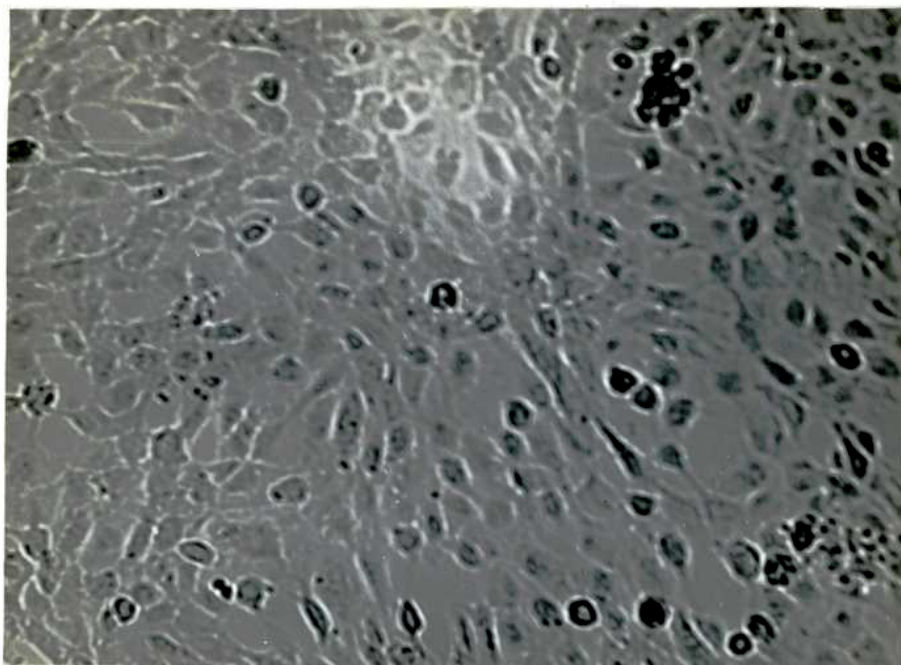


Fig V.

Objetivo 10 x

Microfotografía directa del tubo de ensayo, que muestra un cultivo de 72 horas en evolución en el medio Mb -- 752/1 con 20 % de suero equino.



Al quinto día el "Sheet" puede considerarse completo. Las células compactamente unidas forman una membrana que cubre el pand de los tubos, alcanzándose a ver a simple vista como una película blanquecina.

El medio de mantenimiento requerido ahora tiene pH alto (7,7 - 7,8) y un porcentaje de suero equino menos (de 20 % baja a 10 % y a 5%).

De tal forma ha sido logrado el primer paso del cultivo "in vitro", el acostumbramiento de las células a la sobrevivencia y a la proliferación en condiciones ambientales nuevas. A continuación será tratado el problema de su mantenimiento por tiempo indeterminado a través de subcultivos sucesivos y periódicos.

Subcultivos: Al octavo o décimo día de cultivo, la población tiene aspecto muy denso, las células empiezan a disponerse en capas superpuestas, el metabolismo es tan intenso que se requerirían cambios de medio frecuentes a intervalos de pocas horas. Además existe la amenaza del desprendimiento más o menos extenso de la placa de cultivo.

Ha llegado el momento de obtener subcultivos por medio de trasplantes o repiques a otros tubos y frascos. Para desprender las células del vidrio se utiliza tripsina al 0,30 % en solución de mantenimiento (ver la preparación en páginas anteriores) dejándola actuar una hora a 37 °C. Esta solución digiere a la sustancia intercelular y a las células muertas; puede utilizarse también para el mismo fin el Versene al 0,02% en solución bufferizada de fosfatos (PBS Dulbecco)(37)-(53), libre de calcio y magnesio dejándola actuar 30 minutos a 37°C. Esta sustancia tiene la propiedad de despejar las células del vidrio sin efecto digestivo (Chelating Agent). La suspensión de células se lleva a tubo cónico, centrifugado 10 minutos a 500 RPM y obteniendo un "pellet" firme que es suspen-

dido en el medio elegido para la siembra en la proporción 1:50

La observación en la cámara de Neubauer muestra un estado celular muy bueno, elementos separados de formas redondeadas entre las cuales se diferencian tres tipos:

Tipo 1.) - Células redondas de 15 á 20 micrones de diámetro de núcleo ovalado o redondo en relación normal - con la masa citoplasmática.

Tipo 2.) - Células redondas de 13 á 15 micrones de núcleo - periférico arrinconado.

Tipo 3.) - Algunas células gigantes de más de 30 micrones a veces binucleadas.

El rendimiento celular es generalmente de 1 : 3 y el nuevo inoculum requiere 100.000 células por cc por estar ya acostumbradas a la vida "in vitro".

La evolución de estos cultivos es rápida pues a las 24 horas el "Sheet" tiende a ser confluente, las células son transparentes hialinas sin granulaciones y mantienen su relación normal de núcleo/citoplasma con tipos fusiformes, poliédricos con prolongaciones y redondeados. La multiplicación es activa y el metabolismo intenso determina al cabo de otra semana la necesidad de un nuevo repique.

Con esta técnica las células se mantuvieron en cultivo por un período de más de dos meses a través de ocho trasplantes sucesivos. En el capítulo sobre Citología se darán más detalles sobre la evolución de estos cultivos.

C A P I T U L O III.

CITOLOGIA DEL EXUDADO PERITONEAL Y DE LOS CULTIVOS "IN VITRO"

a) Preparación de los colorantes

b) Coloraciones y observaciones microscópicas de las células

a) Solución de cristal violeta:

para 100 cc. finales.

- Pesar 2,1014 gr. de ácido cítrico. Disolver en 100 cc de agua bidestilada por vidrio (agitar suavemente).

- Pesar 0,100 gr. de cristal violeta. Moler en pive fino y agregar sucesivamente la solución de ácido cítrico hasta disolver. Llevar a volumen final 100 cc con la solución de ácido cítrico.

- Filtrar por papel "Ash free" y conservar a temperatura ambiente.

Colorantes supravitales: Neutral Red (National aniline Division N.Y.)

Janus Green (B.D.H.)

Soluciones Stock:

A) - Solución Stock de Neutral Red:

Neutral Red 125 mg )  
( (Concentración del colorante  
Alcohol absolute 50cc) 0,25%)

B) - Solución Stock de Janus Green:

Janus Green 125 mg. )  
( (Concentración de colorante 0,20%)  
Alcohol absolute 62,5 cc.)

C) - Solución diluida de Neutral Red:

Solución A) 1,1 mg.  
Alcohol absolute 10 cc.

D) - Solución diluida de Janus Green:

Solución B) 1,2 cc  
Alcohol absolute 9 cc

E) - Solución mezcla:

Antes de usar agregar:

Solución A) 3 cc  
Solución B) 0,4 cc.

(esta mezcla no es estable)

Técnica de coloración: Se prepara cubre-objetos limpios que se colorean con una gota de las soluciones diluidas. Se dejan secar y sobre un porta se depositan dos o tres gotas de la suspensión celular, invirtiendo sobre él el cubre que contiene el colorante desecado. Se parafinan los bordes del preparado haciendo las observaciones al microscopio.

Colorantes nanópticos: May Grünwald - Giemsa

May Grünwald (Merck) 0,30 gr.  
Alcohol metílico 100 cc.  
Giemsa (polve) (B.D.H.) 1,14 gr.  
Alcohol metílico 112,5 gr.

Agitar en frasco bien cerrado y llevar a la estufa a 37°C por 48 horas. Luego llevar a temperatura ambiente por otras 48 horas. Filtrar por papel y envasar en ampollas.

Técnica de coloración:

May Grünwald - Giemsa (57) para extendidos de eritrocitos peritoneales:

Depositar una gota de suspensión celular sobre un porta y extender.

Dejar secar.

- 1) - May Grünwald
  - a) fijación (alcohol metílico) 3 minutos
  - b) agregar un número de gotas de agua corriente igual al número de gotas de May Grünwald. Coloración un minuto.
- 2) - Escurrir el preparado.
- 3) - Giemsa 1: 50
  - c) 1 cc de Giemsa
  - 25 cc de agua destilada
  - 25 cc de agua corriente.
  - Dejar actuar de 15 á 20 minutos.
- 4) - Lavar.

5) - Deshidratar

d) Acetona

e) Acetona Xilol

f) Xilol - 5 minutos.

6) - Montar.

Modificación de la técnica de May Grunwald - Giemsa para estudios de repique (53):

Preparar agua bufferizada de fosfatos a pH 6,8:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  21,57 gr. - Disolver en 1.000 cc de agua destilada.

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  9,07 gr. - Disolver en 1.000 cc de agua destilada.

Juntar a volumen final: 2.000 cc.

Para usar: 90 cc de agua bufferizada

9 lt. de agua destilada.

Coloración:

1) - Fijación en alcohol metílico 10 minutos

2) - Lavar y tratar el preparado con agua bufferizada durante 30 minutos a 37°C.

3) - Coloración con May Grunwald:

M.G. 1 parte )

Buffer 5 partes )

Dejar actuar de 10 á 15 minutos.

4) - Lavar con Buffer.

5) - Coloración con Giemsa:

G. 1 parte )

Buffer 10 partes )

Dejar actuar de 1 á 12 horas, con control microscópico.

6) - Lavar con Buffer.

7) - Diferenciar con glicerina - éter hasta eliminar el exceso de colorantes. Controles microscópicos.

8) - Lavar con Buffer y deshidratar. Tratar con xilol. Montar.

Colorantes Hematoxilina + Eosina

Cristales de Hematoxilina (Coleman & Ball Co.) 5 gr.

Alcohol absoluto 50 cc.

Alumbre anónico e potásico	100 gr.
Agua destilada	1.000 cc.
Oxido de Mercurio	2,5 gr.

Disolver la Hematoxilina en alcohol, el alumbre en agua con calor. Quitar del calor y mezclar ambas soluciones. Llevar a ebullición rapidamente. Quitar del calor y agregar el Oxido de Mercurio levemente. Tan pronto como la solución toma un color púrpura oscuro colocar el frasco en agua fría. La tinción está lista para el uso cuando enfriada.

La adición del 4% de ácido acético aumenta la precisión de la tinción nuclear.

Resina (National Anilin Division)	1 gr.
Agua	25 cc.
Alcohol 95°	41 cc.
Agua destilada	125 cc.

Filtrar antes de usar.

#### Preparación del líquido de Bouin:

Formalina	250 cc.
Sol. saturada de ácido pícrico (10 gr. de ácido pícrico p/750 cc. de agua)	750 cc.

Antes de usar agregar 5 cc. de ácido acético glacial a 100 cc. de Bouin.

#### Coloración Hematoxilina + Resina de los cultivos en tubo de ensayo.

##### previa inclusión en Parlodion (59):

Cultivo sobre vidrio:

- 1) - volcar el medio
- 2) - lavar con Hanks BSS
- 3) - fijar con Bouin 5 minutos
- 4) - lavar con alcohol 80°
- 5) - deshidratar hasta alcohol 95°
- 6) - poner parlodion 4% (en dos partes de alcohol y una parte de éter)

Dejar no menos de dos horas hasta varios días.

**Obtención del corte de Parlodion:**

- 1) - volcar el parlodion agotando bien
- 2) - evaporar el éter sin dejar secar completamente
- 3) - llenar el tubo con agua
- 4) - despegar la película
- 5) - cortar el segmento a colorear.

**Coloración:**

- 1) Hematoxilina (Harris) 10 minutos.
- 2) Lavado abundante con agua corriente (viraje)
- 3) Si está sobre coloreado:
  - a) alcohol ácido (1% HCl en 70 cc Etanol) una inmersión rápida y pasaje por agua.
  - b) agua amoniacal (5 gotas de amoniaco por 100 cc de agua) inmersión y pasaje por agua.
- 4) Lavado con agua corriente.
- 5) Kosina 3 ó 5 minutos.
- 6) Lavado con agua corriente.

**Deshidratación y montaje:**

- 1) Alcohol 95° dos baños: Sumergir 3 ó 4 veces.
  - 2) Aceite de tomillo: Sumergir no menos de media hora.
  - 3) Xilol: sumergir no menos de media hora.
  - 4) Montar en porta-objeto y cubrir con bálsamo.
-

b) Coloraciones y observaciones microscópicas de las células:

Coloraciones supravitales: (Anudado peritoneal)

Neutral Red: Este colorante es tomado por el sistema microvacuolar del citoplasma de las células vivas. Por esta razón hay que usarlo en concentración no tóxica. La solución preparada para los fines de esta técnica tiene la concentración final de 1 : 4.000 (ver la descripción en páginas anteriores). Diluciones hasta 1 : 10.000 se obtienen depositando 2 ó 3 gotas de suspensión celular sobre un porta-objeto e invirtiendo el cubre con el colorante. Se parafinan los bordes para evitar la evaporación y desecación y se hacen observaciones al microscopio siguiendo la coloración celular durante una hora a temperatura ambiente.- El Neutral Red tiene que respetar siempre los núcleos, siendo éste un buen indicio para juzgar que la coloración ha sido bien llevada.

Si el núcleo está coloreado las células se consideran muertas y las observaciones no tienen valor.

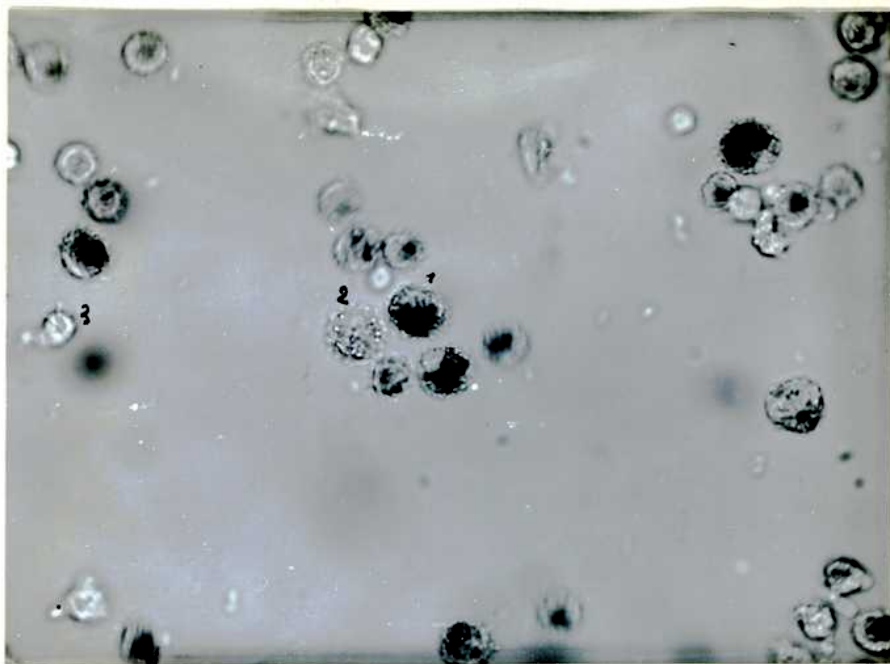
Observaciones usando el objetivo de inmersión 90 x

- Tipo 1 - Células grandes, redondas que miden más de 15 micrones, sistema de microvacuolas en todo el citoplasma, intensamente e pálidamente teñidos por el Neutral Red. Núcleos redondeados, céntricos y sin coloración.
- Tipo 2 - Células pequeñas redondas que miden de 7 á 10 micrones. Sistema microvacuolar coloreado limitado a una zona circunscripta del citoplasma.
- Tipo 3 - Células pequeñas redondas de 10 micrones. El citoplasma está coloreado intensamente. Núcleo periférico.
- Tipo 4 - Células grandes redondas de más de 15 micrones no coloreadas. Núcleo central.
- Tipo 5 - Células pequeñas redondas de 10 micrones, sistema microvacuolar no coloreado. (Fig. VI. y VII.).



MICROFOTOGRAFÍAS

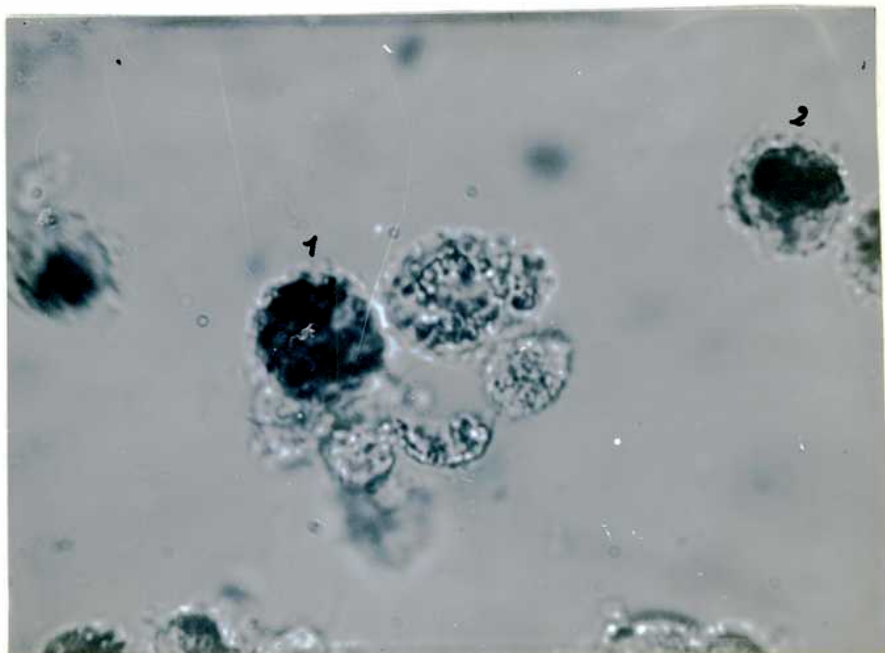
Fig. VI.  
Objetivo 42 x



Coloración del exudado peritoneal del conejo con Neutral Red

Notar: Células grandes de más de 15 micrones intensamente(1)  
debilmente coloreadas(2); células pequeñas de 7 á 10 -  
micrones no coloreadas.(3).

Fig. VII  
Objetivo de  
inmersión 95 x



Detalle de la coloración usando Neutral Red.

Notar: Células grandes de más de 15 micrones de diámetro con  
su sistema microvacuolar completamente(1) y parcialmen  
te(2) coloreado.

Coloración con Neutral Red de células de repique después de un cultivo de una semana.

Observaciones usando el objetivo de inmersión 90 x:

Tipo 1 - Células redondeadas de más de 15 micrones de diámetro de núcleo núcleo periférico arrinconado o redondo con el citoplasma que ha tomado intensamente el colorante.

Tipo 2 - Células de 20 micrones o más con uno o dos núcleos y con sus microvacuolas coloreadas en todo el citoplasma.

Tipo 3 - Células de 20 micrones o más de diámetro, de núcleo ovalado y microvacuolas muy palidamente coloreadas, e no.

Janus Green: Este colorante es uno de los mejores para demostrar la presencia del condrioma en las células vivas. Se prepara con la misma técnica descrita para el Neutral Red, pero siendo más tóxico que éste, la concentración final a usarse sobre los cubre-objetos será de 1 : 6.000. Se logrará una dilución de 1 : 15.000 con dos o tres gotas de suspensión celular que se pondrán en contacto con el colorante (Ver la descripción en páginas anteriores).

Observaciones microscópicas con objetivo de inmersión:

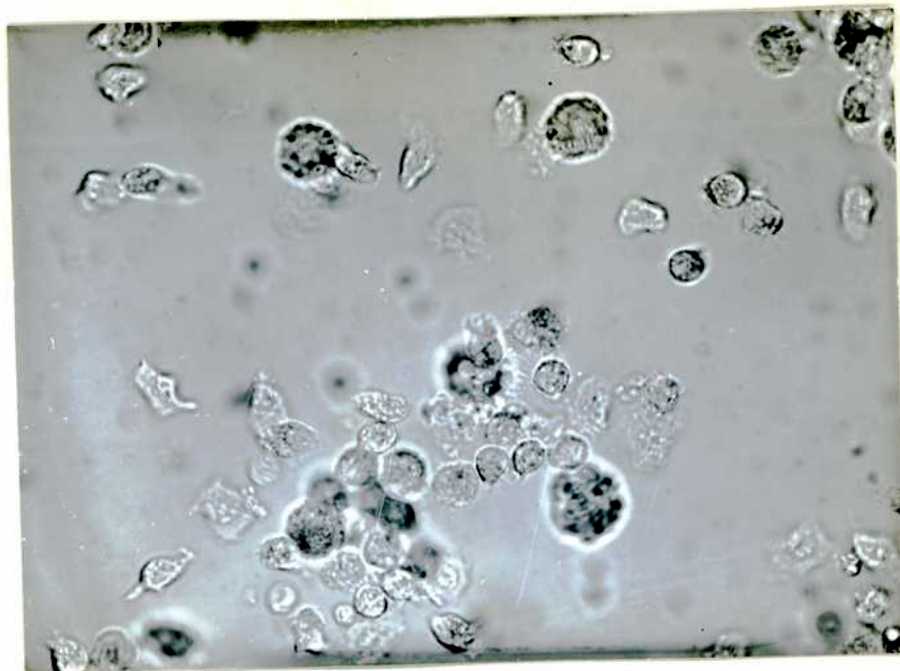
Tipo 1 - Células grandes de 15 á 20 micrones de diámetro. Mitocóndrias grandes, verdes, en forma de corona en el citoplasma.

Tipo 2 - Células pequeñas de 7 á 10 micrones de diámetro con granulos de mitocondrias esparcidos en el citoplasma.

Tipo 3 - Células grandes, escasas, generalmente agrupadas, de más de 15 micrones de diámetro con granulaciones metacromáticas rojo rosadas (Fig. VIII.y IX.)

MICROFOTOGRAFÍAS

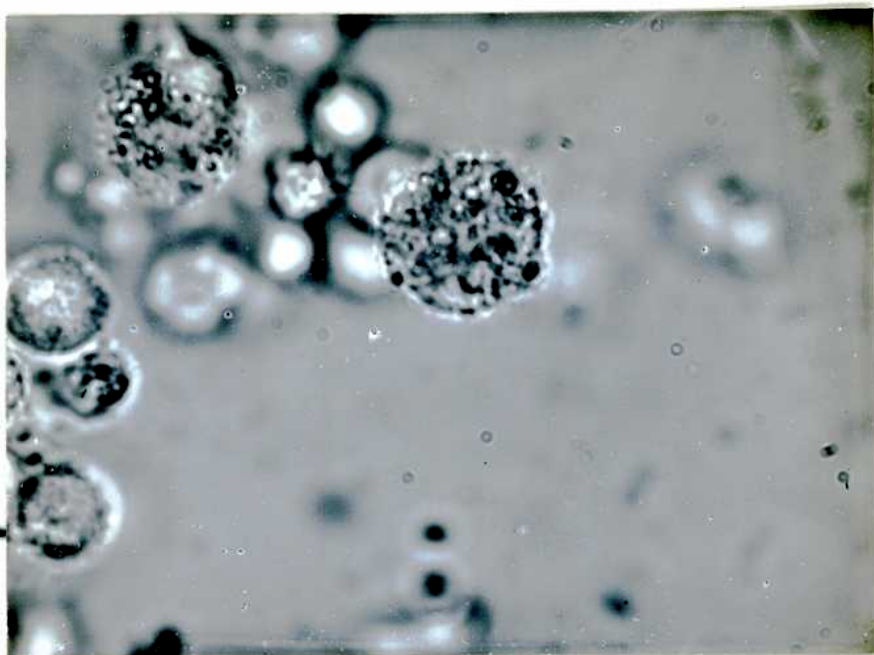
Fig. VIII.  
Objetivo 42 x



Coloración con Janus Green

Notar el sistema de mitocondrias de las células.

Fig. IX  
Objetivo de inmersión 95 x



Detalle de una coloración celular con Janus Green.

Coloración con Janus Green de células de reviana después de una semana de cultivo.

Se confirman los tipos celulares observados en las células del exudado excepción hecha por las de 7 micrones de diámetro que no aparecen.

Definición del poder fagocitario de las células exudativas con respecto a micropartículas.

Se ha usado la tinta china que provee de partículas coloreadas en una solución coloidal diluida 1 : 1 en BSS y filtrada por pg pel. Se ponen en contacto 3 cc de suspensión celular con dos gotas de solución de tinta china incubándose en la estufa a 37° - durante 10 minutos.

Centrifugar a baja velocidad, lavar dos veces con BSS y depositar una gota del "pellet" entre porta y cubre.

Observaciones microscópicas:

Tipo 1 - Células grandes de más de 15 micrones de diámetro con partículas coloreadas en su citoplasma.

Tipo 2 - Células pequeñas de 7 á 10 micrones con su citoplasma lleno de partículas coloreadas.

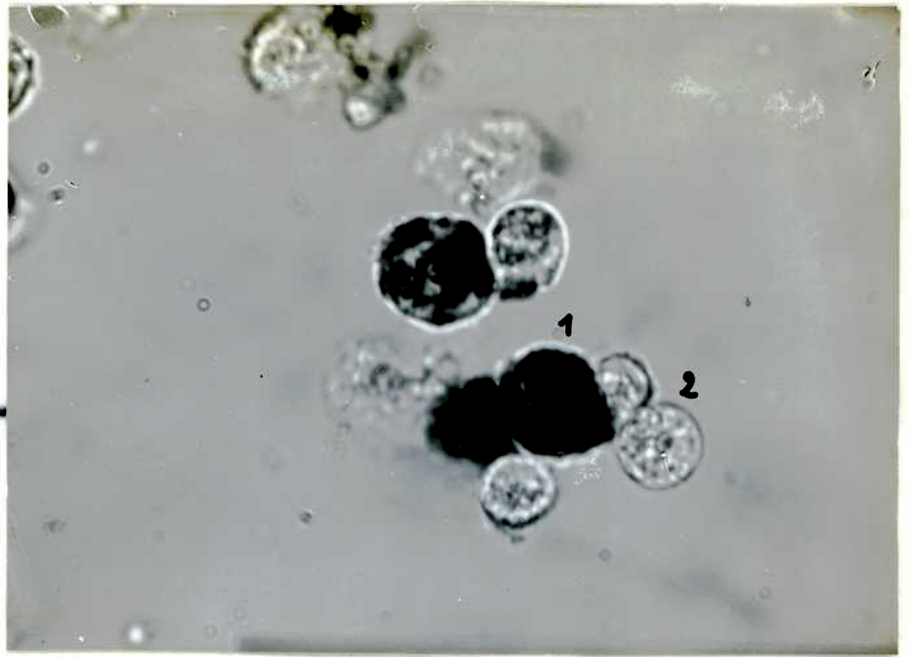
Tipo 3 - Células grandes de más de 15 micrones sin partículas en el citoplasma.

Tipo 4 - Células pequeñas de 7 á 10 micrones sin partículas coloreadas en el citoplasma (Fig. X.)

Todas estas observaciones se hicieron durante el curso de una hora.



Fig. X.  
Objetivo de inmersión 95 x



Notar: Células que fagocitan la tinta(1) en contraste con las células claras no fagocitarias(2).

May Grunwald-Siemsa:

En los extendidos coloreados con la técnica descrita anteriormente se observan:

- 1) - granulocitos: células redondas de 7 micrones de diámetro - con núcleo con dos o tres lóbulos y granulaciones citoplásmáticas en su mayoría neutrófilas y eosinófilas.
- 2) - Linfocitos: células redondas de 8 á 10 micrones de diámetro de núcleo redondo, de cromatina densa, rodeados por una estrecha banda de citoplasma azul.
- 3) - Monocitos: Células redondas de 15 micrones de diámetro, de núcleo redondo de 7 micrones con cromatina palidamente coloreada y rodeada por un citoplasma azul abundante.
- 4) - Células redondas de 15 á 20 micrones, de núcleo oval, a veces con escotadura reniforme, de 15 micrones de largo, de cromatina medianamente densa, por lo general excéntrico y con citoplasma fuertemente coloreado en azul, en el cual se pueden distinguir elementos vacuolares. Por las características

/tica morfológicas, este tipo debe corresponder al de los macró-  
5) - Células grandes de más de 20 micrones de diámetro con cito-  
plasma claro, de núcleo redondo, con uno o dos nucleólos. Po-  
siblemente corresponden a las células mesoteliales.

May Grunwald-Siemsa en extendidos de "pellet" celular obteni-  
do de repiques al cabo de 7 días de cultivo "in vitro".

Se usa la técnica de coloración modificada por Culling (ver pági-  
nas anteriores), por haber notado que las células en cultivo ne-  
cesitan de un tratamiento con agua bufferizada para poderse colg  
rear satisfactoriamente.

La observación microscópica muestra la desaparición de los granu-  
locitos neutrófilos y eosinófilos, así como de las células con -  
características de linfocitos y monocitos. La población celular  
se reduce a dos tipos: "Round Cells" o células redondas de 15 á  
18 micrones de diámetro, de núcleo entre redondeado y oval, de -  
cromatina densa y citoplasma intensamente basófilo.

"Flatt Cells" o células planas, de más de 20 micrones de diámetro  
de citoplasma débilmente basófilo, claro y de núcleo generalmente  
redondo.

Red cromática abierta, con uno o dos nucleólos.

Se suelen observar también células binucleadas (Fig. XI. y XII.)

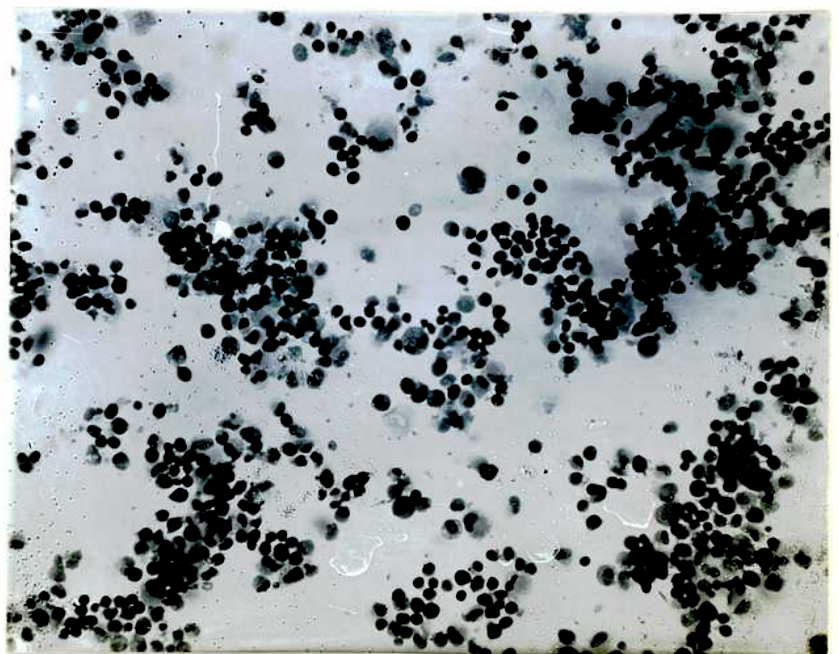


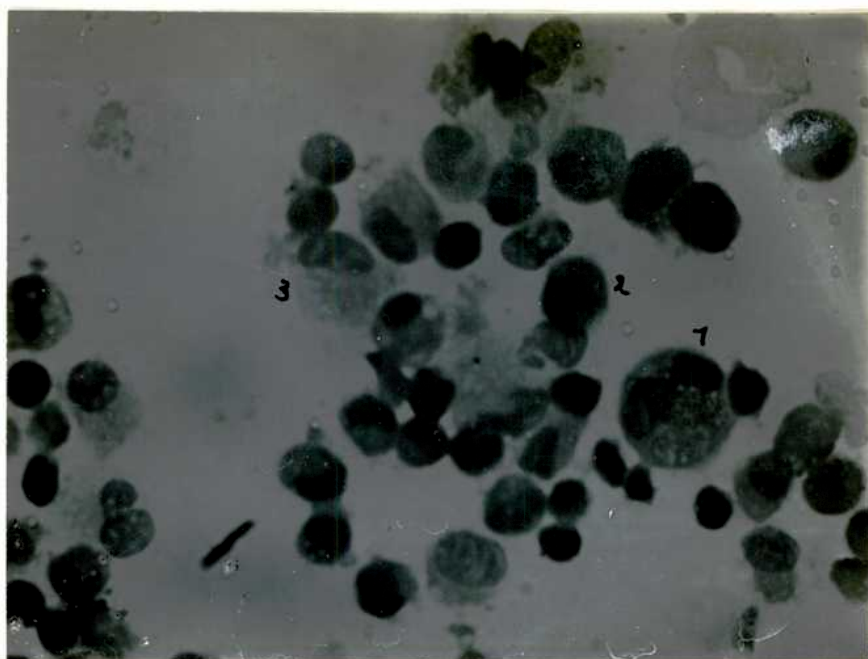
Fig. XI.

Objetivo 10 x

Coloración May Grunwald-Siemsa:  
Población celular de un extendido de repique.



Fig. XII.  
Objetivo 42 x



**Coloración May Grunwald-Giemsa:**

Detalle de un extendido de repique.

Notar: (1) células grandes de 20 micrones de diámetro binucleadas y (2) células de 15 micrones con citoplasma intensamente coloreado y núcleo denso. (3) Células con citoplasma debilmente coloreado.

**Hematoxilina - eosina:**

La técnica de coloración se describe en páginas anteriores.

En un preparado de un cultivo de 24 horas, se observa:

- 1) - un regular número de granulocitos de tipo neutrófilo, de núcleos lobulados.
- 2) - células eosinófilas y monolinfocitarias.
- 3) - células de más de 10 micrones de diámetro, con núcleos arrinconados en la zona periférica del citoplasma.
- 4) - Algunas células que se extienden sobre la pared del vidrio aplanándose y emitiendo dos o más prolongaciones ramificadas.

**Cultivo de 48 y 72 horas:**

Los granulocitos neutrófilos y eosinófilos así como los linfocitos han desaparecido totalmente. Han aumentado notablemente en su número las células extendidas, que presentan formas muy variadas, elongadas con ramificaciones por lo general, otras te--

diendo más a forma poliédrica, con citoplasma claro debilmente coloreado por la eosina. Hay algunas células vacuoladas a veces con una y hasta varias vacuolas. Núcleo céntrico oval en las primeras, redondas en las segundas, con dibujo cromático fino y nucleólos.

#### Cultivo de una semana:

Se observa una densa placa de células en la cual se definen dos tipos:

Tipo 1) - Semejante a los fibroblastos: Células que tienden a ser fusiformes, más o menos anchas, con dos o más proyecciones ramificadas como las ya vistas, de 40/50 micrones de largo.

Tipo 2) - Células más redondeadas con citoplasma más condensado y núcleo desplazado del centro y más cromático, en el cual es difícil a veces distinguir el nucleólo. Son células de 20 micrones de diámetro.

#### Mitosis:

Las figuras de mitosis que se ven desde el tercer día de cultivo presentan características normales en sus distintos estadios;

Profase: Condensación de cromatina y organización del ovillo cromosómico.

Prometáfase: Desintegración de la membrana nuclear. Inicio del movimiento de traslación de los cromosomas, redondeamiento celular.

Metafase: Los cromosomas se encuentran ordenados en la placa equatorial.

Anafase: Movimiento de divergencia de las mitades longitudinales de los cromosomas que se separan dirigiéndose hacia los polos.

Telofase: Reorganización nuclear y reconstrucción citoplasmática en dos células hijas.

Se observaron mitosis anormales.

Para terminar, se describen también algunos tipos de células - -



gigantes, de más de 40 micrones de diámetro, de núcleos grande redondo, céntrico o desplazado, con dos o más nucleólos y citoplasma pálido, vacuolado, de formas irregulares; se notan también células binucleadas, redondas con uno o dos nucleólos por cada núcleo.

VARIANTES MORFOLOGICAS OBTENIDAS POR ACCION DE DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO:

Las microfotografías XII, XIV y XV muestran las variantes morfológicas obtenidas en tres cultivos de diez días, mantenidos "in vitro" en diferentes medios.

La figura N° XIII. está tomada de un cultivo crecido en el medio de Eagle adicionado de hidrolizado de lactoalbúmina al 0,5%. El tipo celular predominante es el fibroblástico, con sus características de células alargadas, fusiformes y con prolongaciones largas y numerosas.

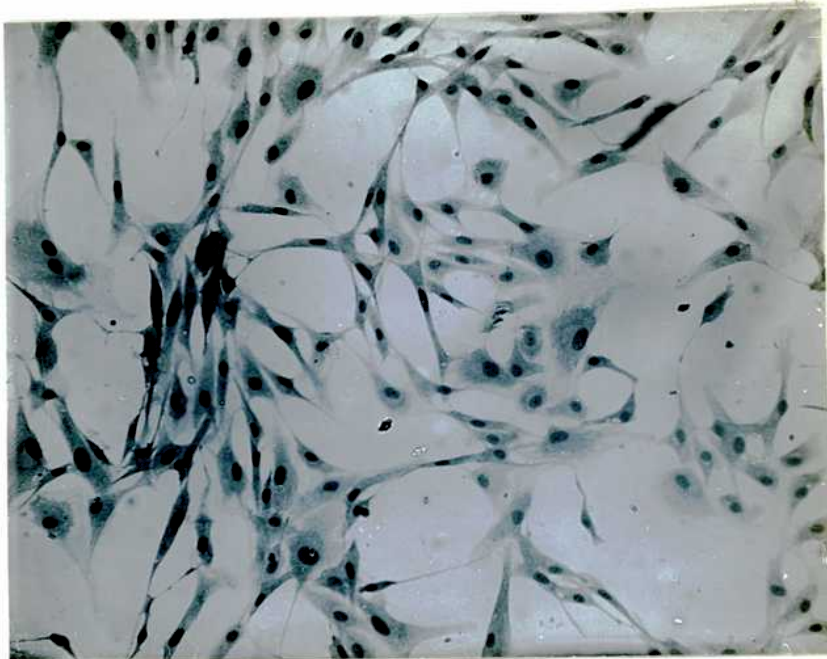


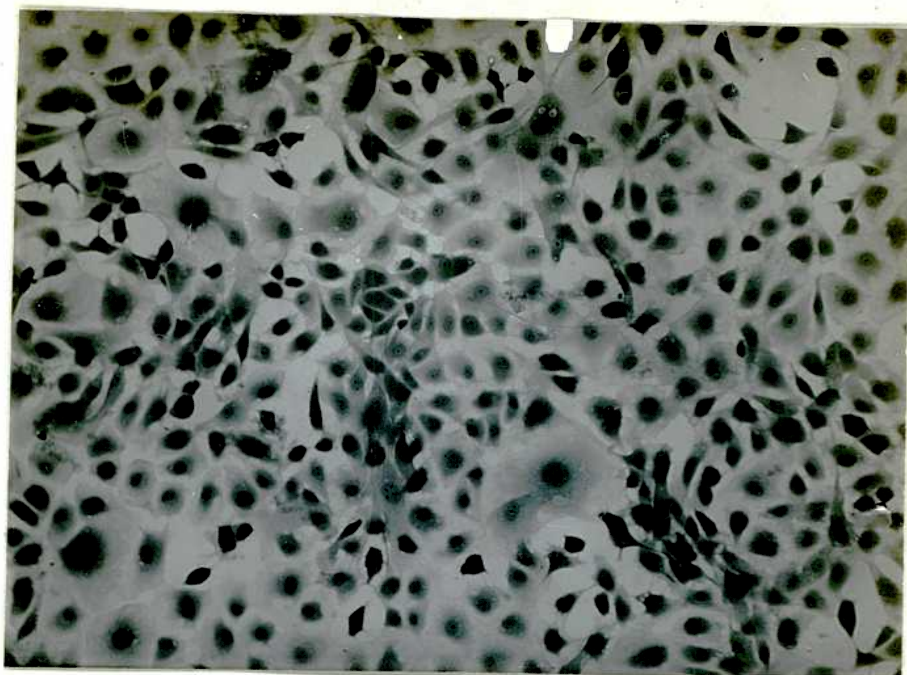
Fig. XIII.  
Objetivo 10 x

HBM - 20 HLa 0,5%

La figura n° XIV está tomada de un cultivo crecido en medio de Eagle simple y muestra el predominio de las células de tipo fagocitario, redondeadas y poliédricas sin o casi sin prolongaciones.

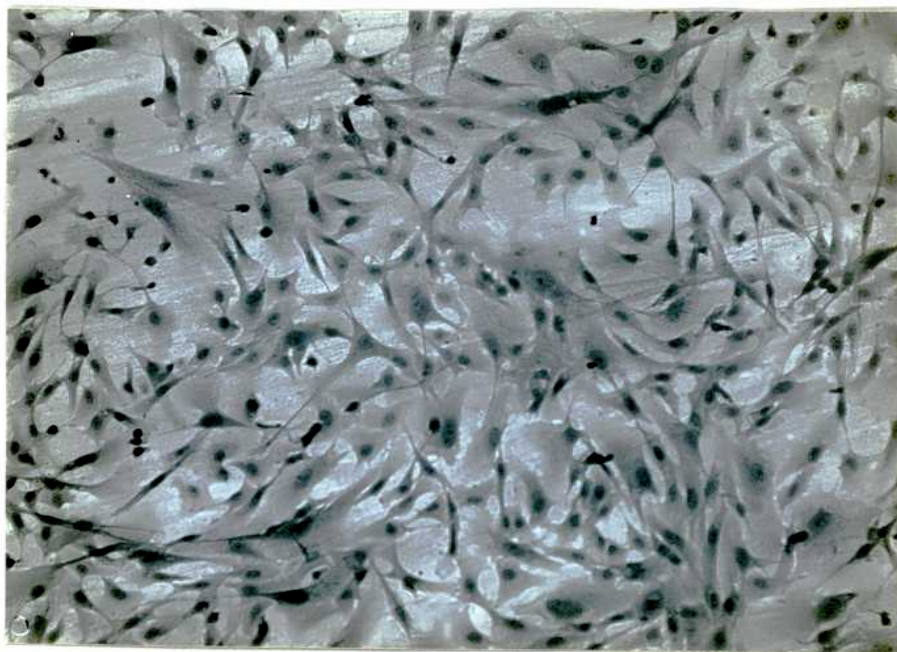
ciones.

Fig. XIV.  
Objetivo 10 x  
M B M-20



Por otro lado células cultivadas en el medio de Waymouth (MB - 752/1) aparecen como en la figura XV donde los tipos celulares descriptos anteriormente parecen ser igualmente representados.

Fig. XV.  
Objetivo 10 x  
M B 752/1



Se ha probado también como medio el Hanks suero 40% en cultivos en evolución, pero no se obtuvieron otras variantes morfológicas, notándose solamente un crecimiento más lento con respecto al medio M B 752/1. (60-61-62).



## CAPITULO IV.

### CITOPLEGIA EN CONTRASTE DE FASE

Para realizar las observaciones con contraste de fase se usó la siguiente técnica:

- 1) Sembras (en cajas de Petri de 4,5 cm. de diámetro, con un cubre objeto) la suspensión celular de un repique "in vitro"
- 2) Colocar en un desecador que en su parte inferior tiene un algodón mojado en agua a fin de mantener el grado de humedad ambiente necesario.
- 3) Gasear con carbógeno (95 % de oxígeno y 5 % de anhídrido carbónico), cerrando herméticamente e incubando a 37°C durante 48-72 horas. Terminada la incubación, sobre un portaobjeto se dibuja un marco de 1 mm. de profundidad con una mezcla de parafina (1 parte) y cera de abejas (2 partes), depositándose en esta pequeña cámara unas gotas del medio de cultivo. Sobre ella se invierte el cubreobjeto (18 mm.) y se sella con la misma mezcla de parafina y cera, cuidando que no queden burbujas de aire. (Shaechter - Vitology VJ-3 1 p. 160 febr. 1957). La observación se hace en microscopio Leitz (modelo Cytolar contraste de fase). Se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 1 hora.

#### Observaciones:

Células fusiformes y poliedricas con prolongaciones.

Medidas: 26 micrones de ancho x 250 micrones de largo.

Membrana celular con ramificaciones gruesas y otras más delgadas hasta filiformes.

Hialoplasma transparente, homogéneo con granulaciones finas.

En el endoplasma refringente y en densado se destacan granulaciones redondas, negras y otras brillantes, blancas que se encuentran también en las prolongaciones citoplasmáticas

acumuladas en la zona perinuclear en hilera o en grupos del tamaño de menos de 1 micrón, detadas de movimiento perceptible solamente en esta zona nuclear. Se han notado cambios de índice de refracción con variaciones del color del blanco brillante al negro. Citoplasma con filamentos finos del tipo de las mitocondrias, distinguiéndose también una zona cerca del núcleo luminosa, que corresponde a la ubicación del aparato de Golgi y Centrosoma. Algunos elementos grandes de condensación, oscuros, perinucleares, dispuestos en forma de cascote en uno de los polos del núcleo.

Núcleo oval de 15 micrones, con gruesa membrana; dos o tres formaciones redondeadas oscuras (nucleolos) del tamaño de 3-4 micrones. Se distingue una masa de cromatina sobre un fondo homogéneo.

Estas células han sido cultivadas en el medio de WAYMOUTH MB 752/1 con 20 % de suero equino.

Microfotografía



Fig. XVI  
Objetivo 90 X

- (1) Membrana celular.
- (2) Hialoplasma.
- (3) Endoplasma.

- (4) Complejo microgranulovesicular.
- (5) Complejo microvesicular en casco.
- (6) Membrana nuclear.
- (7) Nucleolos.

Confrontando estas observaciones con las descritas por Rose (63-64-65) En Rose: Células de la Cepa HeLa (derivadas de un carcinoma de cuello uterino Gay 1953) podemos interpretar su similitud con el fenómeno de "pinocitosis" y actividad microgranulovesicular, cuyo resumen exponemos a continuación: Se entiende por "pinocitosis" (cell drinking) un fenómeno generalizado de digestión intracelular de microgotas probablemente relacionado con el medio ambiental. Rose describió dos variantes de este fenómeno:

- 1) - en células cultivadas en fluido pleural o ascítico;
- 2) - en células cultivadas en suero humano.

En la forma normal de "pinocitosis", las microgotas grandes - que entran a través de la membrana celular, reducen rápidamente su tamaño y se redondean al atravesar el citoplasma (son de 1 a 3 micrones). Su índice de refracción se altera cambiando - su color con la optica de contraste de fase, del blanco brillante al negro. Las gotas entran entonces a formar parte del agregado perinuclear de granulos negros y refringentes. La "pinocitosis" que se observa en cultivos con suero humano varía de - la forma habitual en cuanto las microgotas (de 4 a 25 micrones no reducen su tamaño, pero sí muestran un índice diferente de refracción, siendo su variación del blanco al negro (V) cello. Cuando la "pinocitosis" es activa se distinguen siempre en el citoplasma pequeños granulos negros (microkinesoferas de 0,3 a 0,6 micrones) que se mueven rápidamente. Un organoide que - se observa solo en las "V" Cells", aparece ocasionalmente cerca de la superficie de las microgotas (V granulos) como pequeñas granulaciones negros (V satélites de 3 micrones de diámetro). Se supone que las microkinesoferas pueden ser una fuente celular de enzimas que son llevadas a la microgotas. Esta

idea es desarrolló porque las gotas se colorean con el Neutral Red, colorante indicador de la posible presencia de tripsina, Erepsina y Pepsina. Se tuvo la impresión de que las microkinesomas no se combinan ni con el Neutral Red ni con el Janus Green, no se consideraran entonces como parte del contenido. Sin embargo existiría una relación con éste.

Tratando de dar una explicación a este fenómeno se supone que las microgotas de las células VP contienen componentes del suero, y el suero humano contiene enzimas inhibitorias; éste puede ser un factor que influencia la formación de los gránulos VP. Se puede suponer que las enzimas llevadas a las microgotas de las células VP por las microkinesomas son neutralizadas por la enzima inhibitoria del suero también en las gotitas. Estas no son digeridas hasta más tarde y cambian su índice de refracción por la reacción enzimática. Después de la neutralización de la enzima inhibitoria la función digestiva prosigue y los granulos VP se disuelven en 1 ó 2 días. (Rose G.J. et al. *Biophys. & Biochem. Cytology*) (V 3, N°5: 697-704, 1957)

---

### RESUMEN Y CONCLUSIONES

La estimulación con una solución de glucógeno en la cavidad peritoneal del conejo permite obtener una población celular heterogénea, constituida por: micrófagos, macrófagos y elementos histiocitarios en número suficiente como para iniciar un cultivo "in vitro".

Los micrófagos desaparecen en las primeras 48 horas, adaptándose a las nuevas condiciones de vida solo los elementos histiocitarios y macrófagos que crecen en poblaciones mixtas, permitiendo subcultivos por una duración mayor de dos meses.

Durante todo este período de tiempo mantienen sin mayor alteración sus características morfológicas normales de núcleo y citoplasma y de relación nucleo-citoplásmica, siendo sus figuras de mitosis también normales. Pueden observarse algunas células gigantes y células binucleadas.

El ensayo de distintos medios de cultivo, cuya diferencia está principalmente en su contenido en aminoácidos y vitaminas, manteniendo constante la proporción de suero equino permite obtener variantes morfológicas con predominio de un tipo celular sobre otro: (Tipo fibroblástico sobre tipo macrófago e inversamente), mezclas iguales de ambos tipos, población mixta en igual proporción, no lográndose sin embargo en ningún momento por este método a la obtención de cultivos puros de una línea de células.

Se podrían explicar en cierto modo las variaciones de los tipos celulares obtenidos, comparando los medios de cultivo utilizados.

El medio de Waymouth tiene sus aminoácidos en concentraciones superiores a los del medio de Eagle, llegando a ser

dobles en muchos casos. Es sabido que los fibroblastos, sufren por este aumento, y tienden a desaparecer del cultivo. La arginina por ejemplo se encuentra en concentraciones superiores al "optimum" (asimismo otros aminoácidos: Histidina- lisina- glutamina) y llega a ser un factor limitante para el crecimiento de ciertas cepas de fibroblastos. Sería esta una razón para explicar la transformación en células estalladas que toma un cultivo después de algunos pasajes en el medio MB 752/1. Por otro las concentraciones de vitaminas duplicadas, y el agregado de vitamina B12 (0,02%) tienden a aumentar el crecimiento celular, explicándose la mayor proliferación de las células cultivadas en MB 752/1 (Waymouth), en contraste con el crecimiento menor observado en cultivos mantenidos en el medio MB (Bagle).

Tenemos la esperanza de poder confirmar estas suposiciones en siguientes trabajos.

Pero es indudable que toda vez que se parte de una población celular compleja para obtener líneas de cultivo puros, es necesario recurrir a las técnicas de aislamiento clonales a partir de una sola célula. Pudo, por la simple modificación de las condiciones de cultivo, como puede ser por enriquecimiento o empobrecimiento de los principios nutricios, solo se consigue la atenuación de un tipo celular, pero no su desaparición total. Por otro lado tampoco es posible asegurar que no se trate simplemente de variantes morfológicas. El estudio de las colonias supravivales y el uso de partículas coloidales es índice sencillo para apreciar el número de macrófagos que integran un cultivo.

---

*Renate Pissotti*

Buenos Aires, Octubre de 1959.-

*E. S. de Lusty*



BIBLIOGRAFIA

- (1) Maximow, A.A. The cultivation of connective tissue of adult mammals "in vitro". Arkh.anat.gist. embriol (arch.russes anat.histol) 1,105-162, 1916.
- (2) Baitsell, C.A. A simplified method for the cultivation of living tissue "in vitro". Anat.rec.v.31,327, 1925.
- (3) Rhoads, C.P. and Parker, F.Jr. Observations on incubated tissues and exudates. Amer.journ.path. vt.375-386, 1928.
- (4) Sabin, F.R. Doan, C.A. & Cunningham, H.H. The separation of the phagocytic cells of the peritoneal exudate into two distinct types. Soc. exper.Biol.med.proc. v21.330-332,1923-24.
- (5) Strombeck, D.H. A comparative study of leucocytes and fibroblasts cultivated in vitro. Brit.ass.adv.sci.rep v96. 561,1928;biol.abstr.5, No 5854,1931.
- (6) De Jong, B.J. Invloed van bevriescen op de cultuur van exudaatcellen Nederland.tijdschr.geneesk.v79,411-1120,1935.
- (7) Chambers, F. Borquist, M. "In vitro observations of living monocytes and clasmatocytes with reference to phagocytosis and physical properties. Nat.tuberc assoc.trans.v24,259,263, 1928.
- (8) Weissmann, G. Die einwirkung von Pleura und peritonealer gassen auf gewebe kulturen. Hamnyn Schriedberg's Arch. exper.Path.pharmakol. v 190,196,1938.
- (9) Moore, J.K. The development of pure culture of fibre blasts from single nucleolar cells, J.exper.Med v61, 247,260,1935, Biol.abstr. 10, No 11911, 1936.

- (10) Seherwood, H. E. A method for preserving and counter staining vitally stained cells. Soc. Exper. Biol. Med. Proc. v23, 622, 625, 1925-26.
- (11) Benjamin, B. and Rivers, T. M. Regeneration of virus myxomatosa (Semarelli) in the presence of cells of exudates surviving in vitro. Soc. Exper. Biol. and Med. Proc. v28. 791-1930-31.
- (12) Zwainum, J. Sur la caractéristique des fibroblasts et des cellules migratrices (histiocytes et lymphocytes) basée sur la coloration vitale. Arch. exper. cellforsch. v22. 95. 1938.
- (13) Beard, J. W. and Ross, F. The character of Kupffer cells living in vitro. Journ. Exper. Med. v59, 593, 607, 1934. Biol. Abstr. 10. N° 9390, 1936.
- (14) Hall, J. W. and Furth, J. Cultural studies on the relationship of lymphocytes to monocytes and fibroblasts. Arch. Path. Chicago v. 25, 46, 59, 1938. Biol. Abstr. 12, N° 7223, 1938.
- (15) Jacoby, F. Speeding up of cell divisions of macrophages in vitro. J. Physiol. 100, 2P, 3P, 1941/1942.
- (16) Jacoby, F. A method of obtaining permanent preparations for cytological studies of pure cultures of macrophages with special reference to their mode of division. J. Path. Bact. v56, 430, 440, 1944, 1st. Abs. 19 N 4820. 1945.
- (17) Parker, R. C. The effect of serum on fibroblasts cultivated in vitro. Biol. Abstr. 9 N° 1724, 1935.
- (18) Paff, G. H., Bloom, F. and Reilly, G. The morphology and behavior of neoplastic Mast Cells cultivated in vitro. J. Exper. Med. v66, 117, 124, 1947.

- (19) Bucher, U. Technique des cultures de tissus de lapin de cobaye et d'homme in vitro. Bull. Histol. Appliq. Physiol. et Tech. Microsc. v24, 190, 1947. Excerpta Med. Sec. I Anat. 3 N°555, 1949.
- (20) Bloom, W. L., Cummings M. M., Michael M. Macrophage content of oil induced peritoneal exudate in rats and rabbits Proc. Exper. Med. and Biol. v75, 171, 1950.
- (21) Ashermann, W. A new host virus system. Proc. Exper. Biol. Med. v81, 421, 1952.
- (22) Zuckerman, A. Culture of mononuclear cells from rats peritoneal exudate. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. v82, 469, 1953.
- (23) Suter, H. The multiplication of tubercle bacilli within normal phagocytes in tissue culture. J. Exper. Med. v96, 137, 1952.
- (24) Baraki, G., Messere, G., Levine, P. L'exudat peritoneal artificiel source de cellules pour la culture des virus in vitro. Ann. Inst. Pasteur v89, 366, 1955.
- (25) Glick, D., Bounting, L., Don Beer, D. Use of density gradient for isolation of mast cells. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. v92, 357, 1956.
- (26) Waxelius, O., Asboe, C., Hansen Mast cells and tissue studies on living connective tissue in the Hamster cheek pouch. Exper. Cell Research vii, 437, 1956.
- (27) Ginsberg, H. S., Blackmon, R. Reactions of influenza viruses with guinea pig polymorphonuclear leucocytes. Virology v2 (5), 618, 1956.
- (28) Eaton, F. L. A method for obtaining polymorphonuclear leucocytes from intraperitoneal exudates. Blood, vi3 (12), 192 Nov. 1953.

- (29) Baraki, G. Robba Rosset, F. Multiplication du virus poliomyelitique dans les cultures in vitro de cellules exudatives de singe, sans effet cytopathogene generalise. Ann. Inst. Pasteur v92 (3-)301, 1957.
- (30) Furness, G. Interaction between Salmonella Typhimurium and phagocytic cells in cell culture. J. of Infect. diseases: 103, 272, 1958.
- (31) Furness G. and Ferreira, L. The role of macrophages in natural immunology to Salmonella J. of Infect. Diseases, 104 (203) 1959.
- (32) Leistra, J. Tesis de doctorado en medicina veterinaria. Cultivo "in vitro" de células de cortical de riñón de cerdo. Buenos Aires, 1958.
- (33) DeLaury, A. and Thomas, A. Les facteurs de la croissance cellulaire, cap. II, 41, Masson, 1957.
- (34) Weller, J. H. and Anders, J. F. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. v 69 124, 1948.
- (35) Anders, J. F. Journ. of Immunol v69, 645, 1952.
- (36) Hanks, J. H. Relation of oxygen and Temperature in the preservation of tissues by refrigeration. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. v71, 196, 1946.
- (37) Dulbecco, R. Plaque formation and isolation of pure lines with Poliomyelitis viruses. Journ. Exper. Med. v99, 167, 1954.
- (38) Castle, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. Science v22 (3168) 501, 504, 1955.
- (39) Castle, H. The salts requirements of mammalian cells in tissue culture. Arch. Biochem. Biophys. v61, 356, 366, 1958.
- (40) Castle H. and Abel, E. The nutritional requirements for the propagation of Poliomyelitis virus by the HeLa cells, Journ. Exper. Med. v104(2), 271, 287, Aug. 1956.

- (41) Earle, H., Ovans, V. I., Levy, H. Myo-inositol as an essential growth factor for normal and malignant human cells in tissue culture. *J. Biol. Chem.* 226 (1), 191, 203, May 1957.
- (42) Earle, H. Relative growth promoting activity in tissue culture of cofactors and parent vitamins. (22262) *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* v91, 350, 361, 1956.
- (43) Earle, H., Ovans, V. I., Levy, H., Frenkel, A. The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. *J. Biol. Chem.* v215, 607, 1956.
- (44) Earle, H. The specific amino acid requirements of a mammalian cell (strain L) in tissue culture. *J. Biol. Chem.* v 214, 839, 1955.
- (45) Earle, H. Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma strain EB (21811). *J. Exper. Biol. Med.* v89, 362, 1955.
- (46) Waymouth, C., Roscoe, B. Rapid proliferation of sublines of HCTC clone 929 (strain L) mouse cells in a simple chemically defined medium (MB 752/1). *J. Nat. Cancer Inst.* v22 (5), May 1959.
- (47) Waymouth, C. Simple nutrient solutions for animal cells. *Texas Reports of Biol. Med.* v13 (3), 522-556, fall 1955.
- (48) Waymouth, C. A Serum free nutrient solution sustaining rapid and continuous proliferation of strain L (Earle) mouse cells. *J. Nat. Cancer Inst.* v17(3) 315, 323, Sept 1956.

- (49) Weiss, L. Studies on cellular adhesion in tissue culture. Experim. cell research v47, 499, 515, 1959.
- (50) Sanford, K.F., Walts, H.K.,  
Vans V., Shannon J., and  
Carle, G. The effects on ultrafiltrates and residues of horse serum and chick embryo extract on proliferation of cells "in vitro". J. Nat. Cancer Inst. v13, 121, 137, 1952.
- (51) Callahan, R., Hoard, D., Zitcer,  
and Chemical composition of some sera and cells used in Tissue Cultures. Texas rep. on Biol. and Med. v15(2), 250, 259, 1957.
- (52) Callahan R., Kirk, P.L. Some factors affecting the growth promoting properties of serum in Tissue Culture. Texas rep. on Biol. and Med. v15 (2), 227, 249, 1957.
- (53) Zwilling, E. Dissociation of Chick Embryo cell by means of a chelating compound, science v120, 219, 1954.
- (54) Suter, E. The multiplication of the tubercle bacilli within normal phagocytes in Tissue Culture. J. Exper. Med. v96, 137, 1952.
- (55) Conn, H.J. Biological Stains, Geneva N.Y. 1953.
- (56) Conn, H.J., Darrow, E.A. Staining procedures Biotech. publications, Geneva N.Y.
- (57) Lezzeron, M. Precis de microscopie (615-619) Masson et Cie., 1949.
- (58) Gullinz, C.F.A. Hand book of histopathological technique pg. 269, Butterworth, London, 1957.
- (59) Enders Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. v80 277, 1954.

- (60) Carrel, A., Dolinz, A. H. The fundamental properties of the fibroblast and the macrophages. J. Exper. Med. v44 (2) 261, 305, 1926.
- (61) Carrel, A. Comparaison des macrophages normaux et des macrophages transformées en cellules malignes. Soc. Biol. Cont. Rend v92, 584, 1925
- (62) Corucci B., Hugues Y. Sur la transformation des fibroblastes en macrophages Soc. Biol. Compt. Rend. v105, 697, 699. 1930
- (63) Ross, G. J. A variant pinocytic cell (VP cell of Gay's strain HeLa selectively produced and stimulated by human serum nutrient, Texas reports on Biol. and Med. v13 N3, 475, 439, Fall 1955.
- (64) Ross, G. J. Observations on the dynamics of pinocytic and variant pinocytic cells in Gay's human malignant epidermoid strain HeLa. Texas reports on Biol. and Med. v 15 N2, 313, 311, Summer 1957.
- (65) Ross, G. J. Microkinetospheres and VP satellites of pinocytic cells observed in tissue cultures of Gay's strain HeLa with phase contrast cinematographic techniques. J. of Bioph. and Biochem. Cytol. v3, N5, 697-704, 1957.

OTRA BIBLIOGRAFIA CONSULTADA:

- (66) Aberscrombie and Abrams Interference microscope studies of cell contacts in tissue culture. Exper. cell research v15, 332, 245, 1958.
- (67) Cunningham, A. W. B. Simple tissue culture technique for quantitating free migration of reticulo endothelial cells. science v 128 (3319) 306, 1958.

- (68) Tilo J. Puck, T.S. Genetics of somatic mammalian cells. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. J. Exper. Med. v108, 259, 268, 1958.
- (69) Pasiaka, A.S.; Morton, R.J.; Mof. Sh., J.S. The metabolism of animal tissue cultivated in vitro. Can Journ. Biochem. Physiol. v36, 771, 1958.
- (70) Sutar, S. Interaction between phagocytes and pathogenic microorganisms. Bacter. Rev. v20 (2), 94, 1956.
- (71) Bloom Macrophages content of oil induced peritoneal exudate in rats and rabbits. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. v75, 171, 1950.
- (72) Kelly, J.W.; Bloom, G. A quantitative spectrometric study of the mast cells. Exper. Cell Research. v16, 538, 568, 1959.
- (73) Morvan, J.F.; Morton, R.J. Studies on the sulphur metabolism of tissues cultivated in vitro. Interrelationship between cysteine, methionine, cysteamine and cystamine. Canad. J. Biochem. Physiol. v35. 786, 794, 1957.
- (74) Morvan, J.F. Tissue culture nutrition. Bact. Rev. v22, 20, 45, 1958.
- (75) Haff, R.F.; Swin, H.H. The amino acid requirement of rabbit fibroblasts, strain R M 3-56. J. Gen. Physiol. 41, 91, 100, 1957.
- (76) Mercant, D.J.; Rahm, R.H. Fiber formation in suspension cultures of L strain fibroblasts. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. v 97, 359, 362, 1958.
- (77) Sanford E.F.; Nestfall, H.N.; Micranonti, S.C. The effect of serum fractions on the proliferation of strain mouse cells in vitro (mouse fibroblasts). J. Nat. Cancer Inst. v16, 739, 802, 1955.



- (78) Westfall, E.D. & Peppers E.V.  
Sanford. The aminoacid content of the ultrafiltrate from horse serum. J.Nat.Cancer Inst. v15, 27-35, 1954.
- (79) Hon, A.W. Tratado de Histologia, Ed. Interamericana, Mexico. 1954.
- (80) Varola, M.E. Lecciones de Morfologia, El Ateneo, Buenos Aires, 1938.
- (81) Parker, B.C. Methods of tissue culture, Hoeber, Inc., New York 1950.
- (82) Dugas, J. Les animaux de laboratoire, Ed. Médicales Flammarion, Paris 1953.
- (83) The staff of the Tissue Culture  
Course 1949-1953 An introduction to cell and tissue culture, 1949-1953, - Cooperstown, N.Y.
-

<u>INTRODUCCION:</u>	<u>Pags.</u>
Breve historia del cultivo "in vitro" de células de exudado peritoneal de mamíferos con especial referencia al uso de conejos.....	1
<u>CAPITULO I:</u>	
Material, soluciones salinas, medios de cultivo	6
<u>CAPITULO II:</u>	
a) Obtención de células de exudado peritoneal del conejo y primer cultivo "in vitro".....	16
b) Subcultivos.....	29
<u>CAPITULO III:</u>	
Citología del exudado peritoneal y de los cultivos "in vitro"..	
a) Preparación de los colorantes .....	23
b) Coloraciones y observaciones microscópicas de las células .....	28
<u>CAPITULO IV:</u>	
Citología en contraste de fase .....	39
<u>RESUMEN Y CONCLUSIONES:</u> .....	43
<u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	45

---

