

1985-I

REG. No. 077324607

---

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

FACULTAD DE CIENCIAS



EFFECTOS DE LA REUTILIZACION DE MATERIAL  
PLASTICO DESECHABLE EN CULTIVOS DE LINFOCITOS  
HUMANOS PARA OBTENER CARIOTIPOS.

FRANCISCO DAMY MARTINEZ

*EFFECTOS DE LA REUTILIZACION DE MATERIAL  
PLASTICO DESECHABLE EN CULTIVOS DE  
LINFOCITOS HUMANOS PARA OBTENER CARIOTIPOS.*

*Director de Tesis*

*M. en C. Juan Mora-Galindo.*

*Parte de esta Tesis fue realizada en el  
Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la  
División de Biología del Desarrollo:*

*U.I.B.O. - I.M.S.S.*

**D E D I C A T O R I A S**

**A DIOS**

*Con profundo agradecimiento.*

**A MIS PADRES**

*Con cariño y respeto*

**A GLORIA A. ANGULO C.**

*Con amor.*

## A G R A D E C I M I E N T O S

- Al M. en C. Juan Mora-Galindo, quien por su crucial apoyo y la fineza en la dirección del manuscrito logré llevar a término este trabajo.
  
- Al Dr. Enrique Corona Rivera, por la valiosa oportunidad que me brindó al permitirme hacer gran parte de este trabajo, - en el Laboratorio de Citogenética Humana de la Facultad de Medicina de la U. de G. Así también a la Dra. Silvia Totsuka -- Sutto y Alfredo Corona R. por su amistad y su tiempo.
  
- Y a la Bióloga Araceli Rolón de Ponce, - cuya vasta experiencia es superada sólo por su extraordinaria calidad humana.

# I N D I C E

	<i>Página</i>
<i>JUSTIFICACION</i> . . . . .	1
<i>ANTECEDENTES</i> . . . . .	1
<i>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</i> . . . . .	7
<i>OBJETIVO</i> . . . . .	9
<i>HIPOTESIS</i> . . . . .	10
<i>MATERIAL Y METODOS</i> . . . . .	11
<i>RESULTADOS</i> . . . . .	19
<i>DISCUSION Y CONCLUSIONES</i> . . . . .	22
<i>RESUMEN</i> . . . . .	26
<i>TABLAS</i> . . . . .	28
<i>FIGURAS</i> . . . . .	32
<i>BIBLIOGRAFIA</i> . . . . .	34
<i>CARTA DE ACEPTACION DEL TEMA DE TESIS</i> . . . . .	37
<i>CARTA DE Vo.Bo. DEL DIRECTOR DE TESIS</i> . . . . .	38

## J U S T I F I C A C I O N

Tomando en cuenta la dificultad para obtener frascos de cultivo desechables en nuestro país, es necesario determinar si el método de lavado y esterilización de frascos de plástico desechables utilizados para el cultivo de la línea celular de fibroblastos 3T3, es útil para la reutilización de material plástico desechable en cultivo de linfocitos humanos para la obtención de cariotipos.

Si el procedimiento de lavado y esterilización para la reutilización de los frascos de cultivo marca Costar en el cultivo de linfocitos resulta adecuado, se obtendrán beneficios económicos en los laboratorios que utilicen el material mencionado.

Además, la técnica puede aplicarse posiblemente a otros tipos de material desechables que se requieren para el cultivo de otras líneas celulares.

## A N T E C E D E N T E S

La ciencia de la Genética mantiene íntima relación con la Biología Celular a partir del redescubrimiento de las leyes de Mendel por Correns, Tschermack y De Vries en 1901, -



importantes para la herencia y la evolución. Así, de la convergencia de la Biología Celular y la Genética surge la ciencia de la Citogenética; la cual trata de relacionar los procesos celulares, especialmente aquellos relacionados con los cromosomas y los fenómenos genéticos que implican el estudio de las enfermedades congénitas observando defectos cromosómicos mediante la técnica de cariotipo. El término cariotipo (1), se refiere al grupo de características que permiten la identificación de un conjunto cromosómico, como lo son el número, tamaño relativo, posición del centromero y longitud de los brazos, entre otras características. Es particular de una especie, de un género o de un grupo más amplio; y se representa por la serie ordenada de los pares de cromosomas homólogos de mayor a menor tamaño.

Para el estudio del cariotipo humano se han empleado cultivos de fibroblastos, médula ósea, piel y sangre periférica. El más utilizado para el estudio del cariotipo humano de 46 cromosomas, es el cultivo de sangre periférica (2). Este tipo de cultivo a corto plazo tiene como ventajas la rapidez, la relativa facilidad de las técnicas de cultivo, y además la facilidad para obtener el espécimen a ser cultivado. Algunas desventajas son, la variabilidad en la respuesta mitógena y la corta duración de los cultivos, por lo que no pueden ser mantenidos para estudios posteriores.

Aunque el índice mitótico (proporción de divisiones celulares) es bajo en linfocitos circulantes, se ha demostrado que varios agentes mitógenos, pueden inducir la división celular y la reacción blastóide en células de menor maduración (en este caso los linfocitos). El estallamiento de los linfocitos en mitosis es utilizado para el estudio de cromosomas en metafase.

Las dos formas principales de estas células son los linfocitos B y los linfocitos T; mide 5 a 15 micrometros de diámetro, son redondeados, móviles, no fagocíticos y tienen una vida media que depende de la necesidad del tejido por dichas células y que va de 100 a 300 días o quizá años (3). Se le puede encontrar además en linfa y tejidos conectivos y se distinguen por su origen, tipos de macromoléculas superficiales, patrones circulatorios e interacciones con los antígenos y por su participación en la inmunidad humoral y celular respectivamente.

La fitohemaglutinina (PHA) de Phaseolus vulgaris es una glucoproteína del tipo de las lectinas, compuesta por dos diferentes subunidades (E y L). En la actualidad se conocen cinco diferentes tipos de esta lectina. ( $L_4$ ,  $L_3E$ ,  $L_2E_2$ ,  $LE_3$ ,  $E_4$ ) que aparentemente tienen su origen de todas las posibles combinaciones tetraméricas de éstas dos subunidades (4). La-

*lectina interacciona específicamente con residuos de N-acetilgalactosamina (5) azúcares de las glucoproteínas de la superficie celular de los linfocitos T (6), lo que provoca la formación de vesículas endocíticas en la superficie celular que se fusionan para convertirse en cuerpos multivesiculares intracitoplasmáticos, que provocan la transformación blastóide de las células en un período de 36 a 48 hs. y a continuación la exocitosis de dichos cuerpos multivesiculares conteniendo restos de PHA (5). En consecuencia, los linfocitos T comienzan su división mitótica aproximadamente a las 48 y 72 hs. (7-8) de estar en contacto con mitógenos como la fitohemaglutinina, concanavalina A o la aglutinina del germen del trigo (9).*

*La obtención de los cromosomas en metafase para el estudio del cariotipo se produce mediante la administración de colchicina o su derivado colcemida (10) al cultivo de linfocitos, con lo que se inhibe la formación de los microtubulos del uso mitótico y los cromosomas quedan libres (11).*

*De gran importancia para el cultivo de líneas celulares es el lavado y esterilización del material utilizado -- (12). Los artículos se remojan inmediatamente después de su uso en una solución detergente y se lavan después con agua para eliminar toda etiqueta o marca de lápiz. A continuación --*

se enjuagan con agua destilada y por último son secados y almacenados y/o preparados para su esterilización a 121°C y 15 libras de presión durante 20-30 min. siempre y cuando el material sea de cristal.

La demanda mundial de productos médicos desechables tiene una tasa de crecimiento anual de 10 por ciento. Actualmente el 25 por ciento de la producción total se esteriliza por radiación; se estima que en breve esta cifra ascenderá -- hasta el 80 por ciento (13). El método radiactivo es particularmente útil para artículos desechables de plástico que no pueden esterilizarse por ebullición o vapor pues no deben ser expuestos a temperaturas elevadas. Este tipo de radiación (p. ej. rayos gamma) presenta algunos inconvenientes como dificultad en el manejo, peligro inminente para el operador, alto -- costo, pero son rápidos y seguros en cuanto a calidad de resultados. La irradiación con micro-ondas es una alternativa para la esterilización de material plástico desechable (14), ya que se utiliza una radiación no ionizable (15), que no presenta peligro a su exposición, en comparación con la radiación ionizable derivada de la energía nuclear (rayos gamma) -- que una de sus aplicaciones más comunes es la esterilización de productos farmacéuticos, instrumental quirúrgico y equipo médico.

*La radiación por iones, produce reacciones químicas a nivel molecular, que provocan cambios biológicos en los microorganismos, impidiendo su desarrollo y reproducción, y la mayoría de los materiales expuestos a este tipo de esterilización no se vuelven radiactivos pues sólo los electrones y no el núcleo se ven afectados. En cambio, las microondas queman a los microorganismos, o bien, los barren.*

## Planteamiento del Problema

Habitualmente los cultivos de linfocitos humanos para la obtención de cariotipos se realizan en frascos de cristal. Pero, debido a circunstancias aún no conocidas por completo; durante el transcurso del año se presentan periodos de tiempo en que los cultivos de linfocitos no presentan inducción blastóide, motivo por el cual existe la imperiosa necesidad de utilizar frascos de plástico desechables para el cultivo de los linfocitos; hasta que puedan cultivarse nuevamente en los frascos de cristal (previamente determinado por diversas pruebas). Puesto que es impredecible cuanto tiempo se deben cultivar los linfocitos en frascos desechables; y como és to puede ocasionar que en un momento determinado se agoten -- las existencias (ya que rutinariamente sólo pueden ser utilizados dichos frascos por una vez, hasta el momento) para el cultivo de células, es necesario tener un método de lavado y esterilización para su reutilización.

Una alternativa sería desarrollar un método de lavado y esterilización de frascos de plástico marca Costar, previamente utilizados para cultivar linfocitos. No sólo es importante determinar las condiciones de lavado y esterilización, sino determinar si se producen o no modificaciones en parámetros como: proliferación celular, viabilidad, inducción

blastóide, índice mitótico, calidad de la mitosis y morfología, con lo cual se determinaría la utilidad del procedimiento.

En la actualidad existen estudios para el proceso de lavado y esterilización de frascos de plástico realizados por algunos investigadores y en especial un proceso de lavado y esterilización de frascos de plástico utilizados en el cultivo de fibroblastos. Este será utilizado como base para desarrollar el que resulte adecuado para cultivar linfocitos humanos.

## O B J E T I V O S

*Probar la eficacia de los frascos para cultivo de la marca Costar desechables después de ser utilizados, lavados y esterilizados mediante microondas para cultivar linfocitos y obtener cariotipos.*



## H I P O T E S I S

*El cultivo de linfocitos humanos para obtener cariotipos se puede realizar en frascos de plástico lavados y esterilizados después de haberlos utilizado para el mismo fin.*

## Material y Métodos

### Condiciones de lavado y esterilización:

Los frascos de plástico desechables de la marca Costar para el cultivo de líneas celulares que habían sido utilizados con anterioridad, se lavaron y esterilizaron de la siguiente manera:

- a) Se sometieron por 24 hrs. a la acción de la solución blanqueadora de hipoclorito de sodio al 5%.
- b) Se almacenaron en agua corriente durante 72 hrs.
- c) Se sometieron de nuevo a la acción de la solución blanqueadora de hipoclorito de sodio al 5% durante 24 hrs.
- d) Se lavaron con agua corriente a presión, 5 veces.
- e) Se sometieron por 24 hrs. a la acción de HCl 0.1 N.
- f) Se lavaron con agua corriente a presión, 5 veces.
- g) Se lavaron 3 veces con agua bi-destilada.
- h) Los frascos se secaron con calor a una temperatura no mayor de 40°C y se almacenaron con sus respectivas tapas en bolsas de plástico selladas con calor para su esterilización.
- i) Los frascos de plástico desechables se colocaron en un horno de micro-ondas doméstico marca Whirpool Mod. R.F.M. 7 300 para su esterilización con irradiaciones de micro-ondas a temperatura media/alta.

Los paquetes conteniendo los frascos de plástico desechables que se colocaron en el horno, se irradiaron 10 veces durante 30 seg. cada vez, con intervalos de 15 min. sin irradiar, con el fin de evitar el calentamiento de los frascos y su deformación.

Se utilizaron además, frascos de cristal lavados con hipoclorito de sodio al 5% y HCl 0.1 N y se sometieron al mismo procedimiento de lavado, pero se esterilizaron con autoclave a 121°C durante 30 min. y 15 libras de presión.

Otro grupo de frascos de cristal fueron lavados con solución detergente Dinalimpia, se dejaron por 48 hrs. en contacto con dicha solución, se lavaron con agua destilada y se esterilizaron con autoclave.

*Variantes de lavado:*

- a) Frascos de plástico nuevos marca Costar (control).
- b) Frascos de cristal marca Gibco lavados con solución Dinalimpia y esterilizados por autoclave.
- c) Frascos de cristal lavados con hipoclorito de sodio al 5% y HCl 0.1 N y esterilizados por autoclave.
- d) Frascos de plástico desechables de la marca Cos-

tar previamente utilizados, lavados con hipoclorito de sodio al 5% y HCl 0.1 N y esterilizados por microondas.

*Condiciones de cultivo:*

El cultivo de linfocitos humanos se realizó con sangre concentrada, y se llevó a cabo de la siguiente manera: Se extrajo 6 ml. de sangre de un sólo donador y con jeringa heparinizada (0.1 ml. de heparina como anticoagulante) para el -- cultivo de linfocitos en cada uno de los frascos de trabajo.

Después, se procedió a la siembra en campana de flujo laminar, en condiciones asépticas, y a cada frasco estéril se agregaron:

- 6 ml. de medio de cultivo Mc Coy's 5a modificado.
- 8 gotas de fitohemaglutinina.
- Una gota de antibiótico de trabajo (estreptomicina y penicilina 1:1).
- 8 gotas de sangre agregadas con jeringa sin aguja.
- Se sellaron los frascos y se incubaron a una temperatura de 37°C, y se dejaron en esas condiciones hasta las 48 hrs.

*Parámetros para valorar la eficacia de los diferentes frascos para el cultivo de linfocitos:*

- 1. Proliferación celular.*
- 2. Viabilidad.*
- 3. Inducción blastóide.*
- 4. Índice mitótico.*
- 5. Calidad de la mitosis.*
- 6. Morfología.*

*Al inicio de cultivo se realizó la cuantificación del número total de leucocitos en cámara de Neubauer, que se inocularon a los cultivos, así como la viabilidad celular. A las 48 hrs. se destaparon los cultivos en condiciones asépticas y en la campana de flujo laminar, para obtener alícuotas de cada uno de los frascos de cultivo; para la cuantificación de los parámetros proliferación celular y viabilidad, repitiéndose esta misma operación a las 72 hrs. de cultivo. Para esto, se colocó la alícuota de 0.5 ml. que se extrajo de cada frasco en tubos de ensayo y se centrifugó a 1 200 r.p.m. durante 10 min; se descartó el sobrenadante y del botón precipitado se aspiró hasta la marca 0.5 de una pipeta para leucocitos; se limpió bien la punta de la pipeta y se aspiró solución colorante de azul de tripano hasta la marca de 1.0; de nueva cuenta se limpió bien la punta de la pipeta y se aspi-*

ró ácido acético al 2% hasta la marca 11 y se mezcló bien en el bulbo de la pipeta con vortex, con lo cual quedó la sangre en relación 1:20 con el azul de tripano y el ácido acético al 2%. Después se incubó por 10 min. a 37°C para la inclusión del colorante por los leucocitos no viables y se cuantificó posteriormente en la cámara de Neubauer o hematómetro (16) en los cuadros grandes la proliferación celular, y la viabilidad por exclusión del colorante.

A las 72 hrs. se llevó a fin el cultivo celular con la cosecha de los linfocitos de la siguiente manera:

- a) Después de agitar suavemente los cultivos, se añadió 0.1 ml. de colchicina como inhibidor de la mitosis a cada frasco, disolviendo suavemente y se volvió a incubar a 37°C por un período de 90 min.
- b) Cada cultivo se vertió en tubos cónicos y se centrifugó a 1 200 r.p.m. durante 10 min.
- c) Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón con golpes suaves y se agregó lentamente 10 ml. de KCl 0.075 M agitando con vortex.
- d) Se dejó en reposo cada tubo con cultivo en suspensión durante 15 min. a temperatura ambiente.
- e) Se centrifugó por segunda vez a 1 200 r.p.m. por 10 min.
- f) Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón en-

*solución fijadora Carnoy (metanol y ác. acético en proporción 3:1) recientemente preparada y fría. Se agitó con vortex continuando la adición de dicha solución hasta completar 10 ml.*

- g) Se dejó en reposo cada tubo 20 min. a temperatura ambiente.*
- h) Se centrifugó por tercera ocasión a 1 200 r.p.m. durante 10 min.*
- i) Se descartó el sobrenadante y se agregó 5 ml. de solución Carnoy, se resuspendió el botón y se centrifugó inmediatamente por cuarta vez a 1 200 r.p.m. durante 10 min.*
- j) Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón con solución Carnoy en proporción al botón celular obtenido.*

*Condiciones de fijación sobre porta-objetos:*

*Sobre porta-objetos lavados con anterioridad en metanol frío al 70%, se procedió a la fijación de las células colocando de dos a tres gotas del botón resuspendido en solución Carnoy, y sobre un medio húmedo para posteriormente realizar la tinción y el bandeo cromosómico.*

*Tinción simple y bandas G:*

*A las 72 hrs. de la fijación sobre porta-objetos de los linfocitos se procedió a realizar la tinción simple con el colorante Giemsa y bandeo G de la manera siguiente:*

Se sumergió cada porta-objetos en una mezcla de 45-ml. de solución PBS y 5 ml. de tripsina por un periodo de -- tiempo de 13 seg. a 37°C e inmediatamente después se enjuagaron por dos ocasiones en solución PBS, y por último se sumergieron en colorante Giemsa por un periodo de tiempo de 3 y -- 1/2 minutos. Posteriormente se procedió a la evaluación de -- los cuatro siguientes parámetros como se detalla adelante.

La inducción blastoide (I.B.) se determinó mediante la observación al microscopio de contraste de fases de -- las características notables de células que sí sufrieron inducción (17-18) por el contacto con el mitógeno fitohemaglutina, respecto a células que no presentaron dicho fenómeno y se mantuvieron visualmente íntegras. Características como mayor diámetro, circunferencia irregular, menor grado de impregnación del colorante Giemsa y núcleo vacuolado o grumoso, se tomaron en cuenta para la identificación de las células en -- etapa blastoide. Para la evaluación de este parámetro se contaron células que sí sufrieron inducción y que se mantuvieron íntegras por 100 células que no sufrieron inducción blastoide. Se reportó el resultado en porcentaje.

$$\frac{\text{número de células blastoides}}{100 \text{ células no blastoides}} \times 100 = \text{I.B.}$$



El índice mitótico (I.M.) (19), se determinó tomando en cuenta 100 células nucleadas en relación al número de botones de cromosomas (mitosis) de células que estallaron al momento de la fijación al porta-objetos y se excluyeron las células no íntegras. El resultado se reportó en porcentaje:

$$\frac{\text{número de mitosis}}{100 \text{ células nucleadas}} \times 100 = \text{I.M.}$$

La calidad de la mitosis se evaluó con el fin de proporcionar información para posteriores cultivos en dichos frascos desechables y sus consecuentes reportes en Genética clínica; para lo cual se tomó en cuenta el bandeo claro y legible de los cromosomas, la buena impregnación del colorante, el tamaño adecuado de los cromosomas (preferentemente de pre-metáfase), no empalmados, libres de la capa de protoplasma que frecuentemente los enciema y amontona y botones mitóticos en número mínimo requerido de más de 15 por porta-objetos.

Por último, la morfología se evaluó mediante fotografías al microscopio de contraste de fases y por medio del método comparativo entre el grupo de frascos de control nuevos y el grupo de frascos de plástico lavados y esterilizados por el método de prueba.

## RESULTADOS

El cultivo de linfocitos se prolongó por 72 hrs. y se hicieron conteos celulares al inicio, a las 48 hrs. y al final, y no así a las 24 hrs. por no aparecer cambios significativos. Tanto en los frascos de plástico nuevos como en los frascos de plástico procesados no se apreció diferencia significativa, según la prueba "t" (20), en la cuenta inicial y final del número celular por cultivo a medida que el mitógeno-fitohemaglutinina desencadenaba la división del linfocito (tabla I), por lo que las condiciones de los frascos procesados fueron muy similares a los frascos de control nuevos. La cinética de proliferación celular fue también similar en los frascos de cristal lavados con solución Dinalimpia, excepto los frascos de cristal lavados con hipoclorito de sodio al 5% y ácido clorhídrico 0.1 N que presentaron una cantidad menor en el número celular a las 72 hrs. (Tabla I).

La viabilidad celular también se mantuvo en condiciones similares en los frascos de control; frascos de plástico procesados y frascos de cristal lavados con solución Dinalimpia (Tabla II), excepto en los frascos de cristal lavados con hipoclorito de sodio al 5% y ácido clorhídrico 0.1 N donde el número de células que excluyeron el colorante azul de tripano fue menor en relación a los cultivos de los otros-

frascos.

En el número de células que sufrieron inducción - - blastóide en relación a las que se mantuvieron intactas a la fitohemaglutinina, tampoco se apreció diferencia significativa (Tabla III), ya que las características que se tomaron en cuenta para la evaluación de dicho parámetro como son: diámetro celular, mayor impregnación del colorante por el núcleo, - regularidad de la circunferencia celular y núcleo de apariencia grumosa o vacuolada, fueron muy similares en los frascos - de control y los procesados, aunque se apreció una cantidad - mayor de células que no sufrieron inducción blastóide en los - frascos de cristal lavados con hipoclorito de sodio al 5% y - ácido clorhídrico 0.1 N.

En el índice mitótico también los resultados fueron muy similares entre los frascos de control nuevos, los frascos de plástico procesados y los frascos de cristal lavados - con solución Dinalimpia, excepto con los frascos de cristal - lavados con hipoclorito de sodio al 5% y ácido clorhídrico - - 0.1 N (tabla IV). De la misma manera se tomaron en cuenta cé - lulas nucleadas en relación a botones de cromosomas (mitósis) y descartando células que no resistieron la fijación al porta - objetos y sufrieron algún desprendimiento.

En la calidad de la mitósis (o botones de cromosomas de células que estallaron al momento de la fijación) procedentes de los frascos de plástico lavados y esterilizados - se notó una diferencia mínima en relación con los frascos nuevos de control al encontrarse en un número ligeramente mayor de botones de cromosomas de los primeros, una película transparente que probablemente es el protoplasma de la célula que empalmó los mismos y dificultó un poco la visualización. Este probable protoplasma residual al parecer se debe a la tensión superficial de la célula que muy probablemente se pueda remover aumentando las condiciones de humedad al momento de la fijación.

En la evaluación de la morfología celular se utilizó el método comparativo entre el grupo control y el grupo de prueba de frascos de plástico procesados, principalmente, y no se observaron diferencias al microscópio de contraste de fases entre las células y botones de mitósis de ambos grupos. (Fig. 1 y 2).

## *Discusión y Conclusiones*

*Los resultados descritos muestran que el procedimiento de lavado y esterilización de los frascos de plástico de la marca Costar que fueron utilizados previamente para el cultivo de linfocitos humanos, permite la reutilización de los mismos por más de una vez con las consiguientes ventajas económicas, y posiblemente la aplicación de éste método a otros materiales de plástico desechables que se requieran en condiciones estériles.*

*Los parámetros utilizados para la evaluación de la eficacia del método de lavado de frascos para cultivo de linfocitos; como son la proliferación celular, viabilidad, inducción blastóide, índice mitótico, morfología y calidad de la mitosis, fueron similares entre los de cultivos obtenidos de frascos de plástico nuevos y aquellos obtenidos de frascos de plástico reutilizados y son suficientes para demostrar que este método puede utilizarse en el lavado y esterilización de frascos de plástico desechables para el cultivo de linfocitos humanos y obtener cariotipos para el diagnóstico clínico de errores congénitos.*

*La cinética de proliferación celular de los cultivos celulares en frascos de plástico procesados por este método*

do, así como en frascos nuevos estériles y frascos de cristal lavados con solución Dinalimpia fue similar; por lo que el mitógeno fitohemaglutinina estimuló en condiciones semejantes - a las células que de acuerdo a diversos autores son en su mayoría del tipo T (5), las que presentan inducción blastoide - (17-18). Sin embargo los frascos de cristal lavados con hipoclorito de sodio al 5% no mantuvieron por lo menos, la viabilidad esperada; sino por el contrario presentaron un descenso respecto al número celular inicial y posiblemente el efecto - del mitógeno disminuyó también o no se presentó, por lo que - de la misma manera la inducción blastoide de las células cultivadas en los frascos lavados con dicha solución se vió afectada.

Al momento de la cosecha, a las 72 hrs. el índice - mitótico y la calidad de la mitosis, fueron similares entre - los cultivos en frascos nuevos (control) y los frascos de - plástico procesados por el método que aquí se reporta, ya que la lectura del cariotipo obtenido se evaluó sin tomar en cuenta errores al momento de la fijación, puesto que este error - sería independiente de la eficacia del método de lavado y es - terilización de los frascos y de las condiciones de cultivo.

La eficacia del método pudo ser valorada también mediante la comparación morfológica de las células cultivadas -

en frascos procesados en relación con el cultivo control, donde los resultados fueron prácticamente iguales.

No es claro el motivo por el cual los cultivos en los que se utilizaron frascos de cristal lavados con hipoclorito de sodio al 5% y ácido clorhídrico 0.1 N y que se esterilizaron con autoclave, la viabilidad disminuyó notablemente. Una posible causa del efecto que se reporta en este método de lavado de frascos de cristal, sería el diferente tipo de material de estos frascos en relación a los de plástico, o probablemente la concentración de las soluciones de hipoclorito de sodio y ácido clorhídrico debería ser diferente.

El procedimiento aquí descrito es adecuado para el lavado y esterilización de los frascos de plástico de la marca Costar, para el cultivo de linfocitos humanos, y los resultados son similares a los descritos por Kuri-Harcuch y Col. (14), quienes utilizaron otra línea celular. Además, para -- apoyar lo anterior, trabajos de Latimar y Matsen (21), y Sanborn y col. (22), reportan resultados positivos sobre la utilidad de las micro-ondas como forma de esterilización.

El método de lavado y esterilización de los frascos de plástico es rápido y económico, por lo tanto se adapta a -- los requerimientos actuales, ya que se estima que en corto -- tiempo la esterilización con radiación se incrementará en gra

do notable. El método de irradiación por micro-ondas es segu  
ro en comparación con la radiación ionizante; ésta ofrece se-  
guridad a la exposición a la piel y la aalidad de los resulta-  
dos aumenta proporcionalmente en tanto que aumenta el área de  
exposición a dichas micro-ondas.



## Resumen

Para el estudio del cariotipo humano se emplean entre otros métodos: cultivos de linfocitos de sangre humana periférica, por su rapidez, relativa facilidad en las técnicas de cultivo y una rápida obtención del espécimen a ser cultivado.

Los mitógenos procedentes de plantas son específicos para diversos azúcares que forman parte de glucoproteínas de la membrana celular de los linfocitos B y T. Sin embargo, la respuesta de estos dos tipos celulares es distinta; y provoca la transformación blastóide de estas células en un período de 36 a 48 horas de cultivo in vitro. La obtención de cromosomas en metafase para su estudio se produce mediante la administración de un inhibidor de la formación del uso mitótico de células en división al cultivo.

Los linfocitos T no proliferan en frascos de cultivo cuyas condiciones de esterilidad no sean considerables, ya que son muy sensibles a la contaminación, de ahí que el procedimiento de lavado y esterilización debe ser el adecuado.

Este trabajo estableció adecuar un procedimiento de lavado y esterilización de frascos de plástico desechables pa

ra cultivar linfocitos humanos y reutilizarlos por más de una vez.

Para esto se analizaron parámetros como proliferación celular, viabilidad, inducción blastóide, índice mitótico, calidad de la mitosis y morfología de los linfocitos T.

Los resultados demostraron que las células cultivadas en los frascos de plástico desechables procesados y reutilizados presentaron respecto a los cultivos en los frascos -- control, proliferación celular y viabilidad similares, así como índice mitótico, calidad de la mitosis, inducción blastóide y morfología sin diferencia significativa. Sin embargo, en los cultivos en frascos de cristal por medio del mencionado procedimiento se observó una considerable disminución en la proliferación celular y la viabilidad; no así en los frascos de cristal lavados con una solución detergente comercial.

Este procedimiento es adecuado para el lavado y esterilización de frascos de plástico desechables para el cultivo de linfocitos humanos, y los resultados son similares a -- los reportados por otros investigadores por lo que probablemente también para algunos otros tipos de cultivo celulares.

Tabla I

Proliferación celular de cultivos de linfocitos en frascos lavados y esterilizados por diferentes procedimientos.

Grupos de Cultivo	Células/ml. <sup>(a)</sup> x 10 <sup>5</sup>			n
	0 hrs.	48 hrs.	72 hrs.	
Frascos de plástico nuevos (control).	61.80	64.25 ± 1.768	65.20 ± 0.424	2
Frascos de cristal (hipoclorito de Na al 5%).	61.80	58.50 ± 2.121	56.25 ± 0.354	2
Frascos de cristal lavados con Dinalimpia.	61.80	63.50 ± 1.414	64.55 ± 1.344	2
Frascos de plástico procesados y reutilizados.	61.80	61.10 ± 3.732	61.90 ± 3.110	5

(a) promedio ± desviación estándar.

Tabla II

*Viabilidad celular de cultivos de linfocitos en  
frascos lavados y esterilizados por diferentes procedimientos.*

Grupos de Cultivo	% de células viables/ml. (a)			n
	0 hrs.	48 hrs.	72 hrs.	
Frascos de plástico nuevos (Control).	99.7	65.1 $\pm$ 4.60	68.8 $\pm$ 1.10	2
Frascos de cristal (hipoclorito de Na al 5%).	99.7	13.2 $\pm$ 4.88	39.3 $\pm$ 0.85	2
Frascos de cristal lavados con Dinalimpia	99.7	52.8 $\pm$ 1.06	61.4 $\pm$ 0.78	2
Frascos de plástico procesados y reutilizados.	99.7	64.4 $\pm$ 11.38	67.6 $\pm$ 10.96	5

(a) promedio  $\pm$  desviación estándar.

Tabla III

*Inducción blastóide de linfocitos cultivados en frascos lavados y esterilizados por diferentes procedimientos.*

<i>Grupos de Cultivo</i>	<i>Células blastóides/100 céls. no blastóides.</i> <sup>(a)</sup> <i>n</i>
<i>Frascos de plástico nuevos (control)</i>	$70.5 \pm 7.78$ 2
<i>Frascos de cristal (hipoclorito de Na al 5%).</i>	$35.8 \pm 28.64$ 2
<i>Frascos de cristal lavados con Dinalimpia.</i>	$58.5 \pm 0.71$ 2
<i>Frascos de plástico procesados y reutilizados.</i>	$63.6 \pm 17.76$ 5

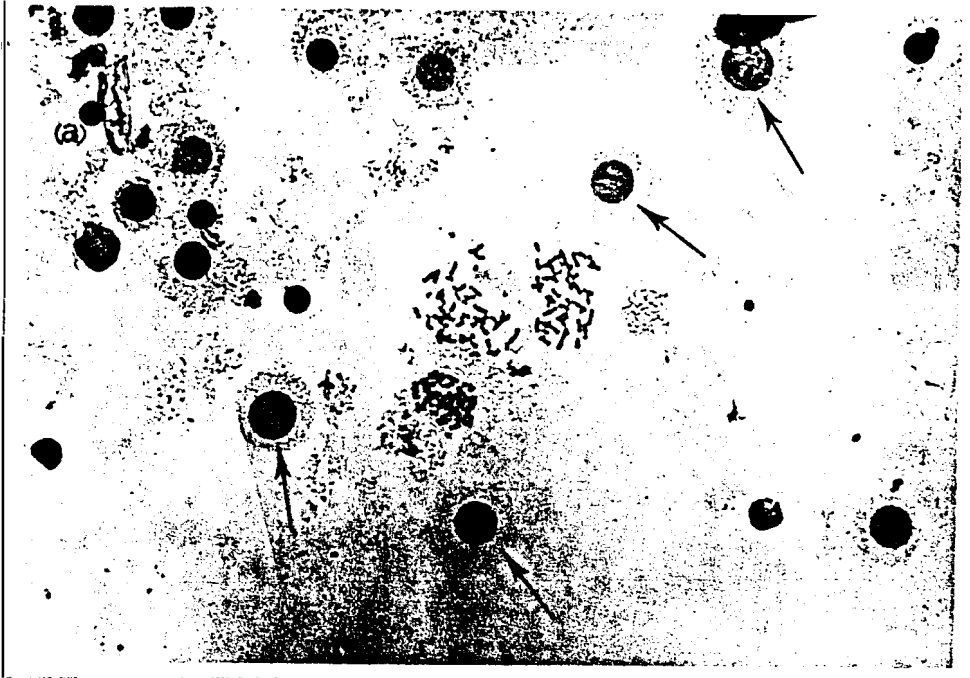
(a) *Promedio  $\pm$  desviación estándar.*

Tabla IV

Indice mitótico de linfocitos cultivados en frascos lavados y esterilizados por diferentes procedimientos.

Grupos de Cultivo	Botones mitóticos/100 células nucleadas. (a)	n
Frascos de plástico nuevos (control)	10 $\pm$ 1.41	2
Frascos de cristal (hipoclorito de Na al 5%).	5 $\pm$ 5.66	2
Frascos de cristal lavados con Dinalimpia.	9 $\pm$ 0	2
Frascos de plástico procesados y reutilizados.	8.8 $\pm$ 3.42	5

(a) promedio  $\pm$  desviación estándar.



*Fig. 1* Morfología de linfocitos humanos cultivados en frascos de plástico nuevos (control). Se observan dos botones de cromosomas dispersos, junto a otro botón de cromosomas de una célula que al momento de aplicar el inhibidor mitótico se encontraba en la fase final de la metafase (cromosomas pequeños). Las flechas indican células que sufrieron transformación blastoide, - se observan íntegras y en buenas condiciones. La letra (a) indica una célula que permaneció en estado de latencia; notese el menor diámetro y la mayor impregnación del colorante. Giemsa 525 X.



*Fig. 2.- Morfología de linfocitos humanos cultivados en frascos de plástico procesados por el método de prueba. Se observan dos botones de cromosomas juntos; note-se que practicamente no se observa diferencia significativa en relación a los cultivos en frascos nuevos, en la calidad de la mitósis (botones de cromosomas). La flecha indica una célula que no sufrió inducción blastóide. Giemsa 525 X.*



## B I B L I O G R A F I A

1. De Robertis, E.D.P., De Robertis, E.D.F., (1981) *Biología Celular y Molecular*. Editorial El Ateneo, Buenos Aires, Argentina, p. 331.
2. Priest, Jean H., (1977) *Medical Cytogenetics and Cell Culture*. Lea & Febiger, Philadelphia, p. 9.
3. Guyton, Arthur C., (1977) *Tratado de Fisiología Médica*. Editorial Interamericana, México, p. 67.
4. Glad, C., et al, (1984) Affinity of Phytohemagglutinin (PHA) Isolectins for Serum Proteins and Regulation of the Lectin-induced Lymphocyte transformation. *J. Immunol.*, 133: 2126-2132.
5. Linthicum, D.S., et al, (1977) Endocytosis and Exocytosis of Phytohemagglutinin (PHA) Cell Surface receptors of Human Lymphocytes during blast transformation. *Exp. Cell Res.*, 110: 237-250.
6. Davis, Bernard D., (1978) *Tratado de Microbiología*. Salvat Editores, Harper and Row Medical Publisher Inc, de Hagerstown, Maryland. pp. 596-597.
7. Yunis, Jorge J., (1974) *Human Chromosome Methodology*. Academic Press, Minneapolis, Minnesota, pp. 105-108.
8. Fudenberg, H. Hugh; Stites, Daniel P.; Caldwell, Joseph L; Wells, Vivian J., (1980) *Inmunología Clínica*. Editorial El Manual Moderno, S.A, México, pp. 160-161.

9. Gordon, L.K. et al. (1980) *The Activation of Blast Transformation and DNA Synthesis in human peripheral blood lymphocytes by wheat germ agglutinin*, *J. Immunol.*, 125: 814-819.
10. Hamerton, John L., (1982) *Human Cytogenetics, General Cytogenetics*. Academic Press, New York and London, p. 9.
11. Lehninger, Albert L., (1982) *Bioquímica*. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España, p. 781.
12. Priest, Jean H., (1977) *Medical Cytogenetics and Cell Culture*. Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 263-266.
13. *Información Científica y Tecnológica*, (1981) *Esterilización por Radiación*. México, p. 16.
14. Kuri-Harcuch, Walid, et al., (1983) *A simple procedure for washing and sterilizing plastic-tissue culture dishes for reuse*. *J. of Tissue Methods*. 8: 173-176.
15. Hallmark, Clyton L., (1977) *Microwave oven Service & Repair*. Tab. Books, United States of America. p.14.
16. Davidsohn, Israel, F.A.C.P.; Henry, John Bernard, (1972) *Diagnóstico Clínico por el Laboratorio*. Todd Sanford, Salvat Editores, Barcelona, España. pp. 151-152.
17. Davis, Bernard D., (1978) *Tratado de Microbiología*. Salvat Editores, Harper and Row Medical Publisher Inc. de Hagerstown, Maryland, pp. 595-597.
18. Yunis, Jorge J., (1974) *Human Chromosome Methodology*. Academic Press. Minneapolis, Minnesota, p. 106.

19. Nowell, Peter C., (1960) *Phytohemagglutinin: An Initiator of Mitosis in Cultures of Normal Human Leukocytes*. *Cancer Res.*, 20: 462.
20. Mayer, Paul L., (1973) *Probabilidad y Aplicaciones Estadísticas*. Fondo Educativo Interamericano, México, pp. 313-315.
21. Latimar, J. M.; Matsen, J.M., (1977) *Microwave oven as a Method for Bacterial Decontamination in a Clinical Microbiology Laboratory*. *J. Clin. Microbiol.*, 6: 340-342.
22. Sanborn, M.R.; Wan, S.K.; Bulard, P.A., (1982) *Microwave Sterilization of plastic tissue cultures vessels for reuse*. *Appl. Environ, Microbiol.* 44. pp. 960-964.



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
Facultad de Ciencias

Expediente .....  
258/85  
Número .....

Sr. Francisco Damy Martínez  
P r e s e n t e . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido -  
aprobado el tema de tesis "Efectos de la reutilización de -  
material plástico desechable en el cultivo de linfocitos hu  
manos para obtener cariotipos" para obtener la Licenciatura  
en Biología, con Orientación en Biomédica. \*

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido ---  
aceptado como Director de dicha Tesis el M. en C. Juan Mora  
Galindo.



A T E N T A M E N T E  
"PIENSA Y TRABAJA"  
Guadalajara, Jal., Mayo 30 de 1985.

El Director

*Se [Signature]*  
Ing. Edmundo Ponce Adame.

El Secretario

Arq. Mario Patricio Castillo Paredes

- c.c.p. El M.en C. Juan Mora Galindo, Director de Tesis.-Pte.
- c.c.p. El Dr. Enrique Corona Rivera, Jefe del Laboratorio de Citogenética Humana de la Facultad de Medicina.-Pte.
- c.c.p. El expediente del alumno.

'mjsd.

Guadalajara, Jal., Mayo 19 de 1986.

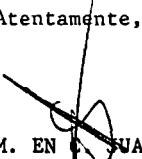
DR. CARLOS ASTENGO OSUNA  
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE  
CIENCIAS,  
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA,  
P r e s e n t e.

Estimado Dr. Astengo Osuna:

Por este conducto comunico a usted que el señor Francisco Damy Martínez, pasante de la Licenciatura en Biología, ha concluido satisfactoriamente el trabajo experimental de su proyecto de tesis: EFECTO DE LA REUTILIZACION DE MATERIAL PLASTICO DESECHABLE EN EL CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS PARA OBTENER CARIOTIPOS", realizado en parte en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la División de Biología del Desarrollo, Unidad de Investigación Biomédica de Occidente, I.M.S.S.

Al mismo tiempo informo a usted que he revisado el manuscrito de la tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad y lo presentamos a su consideración.

Atentamente,

  
M. EN C. SWAN MORA GALINDO  
Director de Tesis.