

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**"EVALUACION DE TECNICAS DE CULTIVO DE
LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA EN BOVINOS
PARA ESTUDIOS CROMOSOMICOS"**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

JOSE HECTOR CORNEJO GONZALEZ

GUADALAJARA, JALISCO, 1981

TEMA DE TESIS.

"EVALUACION DE TECNICAS DE CULTIVO DE
LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA EN
BOVINOS PARA ESTUDIOS CROMOSOMICOS"

TESISTA P.M.V.Z: JOSE HECTOR CORNEJO GONZALEZ

ASESOR: M.V.Z: ROGELIO ALONSO MORALES.

I N D I C E .

INTRODUCCION.	1
OBJETIVO.	3
MATERIAL Y METODOS.	4
MATERIAL.	6
RESULTADOS.	11
DISCUSION.	14
CONCLUSIONES.	16
RESUMEN.	17
BIBLIOGRAFIA.	18

INTRODUCCION.

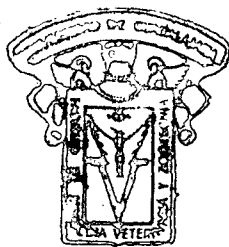
Los estudios cromosómicos en la especie bovina son necesarios para el diagnóstico de una amplia gama de patologías en el plano reproductivo, tales como el freemartin, o las translocaciones robertsonianas (3), sobre todo en aquellos sementales que serán destinados para la inseminación artificial como una medida para evitar la difusión de material genético anormal. Además, estudios citogenéticos serán vitales para la nosologización de entidades malfomativas mal comprendidas (75).

Por lo tanto, la obtención de preparaciones cromosómicas de buena calidad y de forma rutinaria se hace necesaria una buena preparación cromosómica en la que se requiere el obtener las células en estado de metafase, que es el período en el cual los cromosomas adquieren su forma característica y es posible estudiarlos. El cultivo invitro de células ha sido la fuente principal de metafase, empleándose para esto: biopsias de piel, cultivos de órganos y linfocitos, tanto de médula ósea como de sangre periférica (2). Para estudios rutinarios, el método más operativo parece ser el de linfocitos de sangre periférica, ya que es un tejido de fácil acceso, y por que requiere menos gastos en material, equipo y manejo.

La literatura está plagada de un buen número de --

técnicas que al fin de cuentas sólo son (1,6,4) modificaciones de aquella descrita por Moorhead y col. en 1960 (8) sin embargo, las condiciones óptimas para preparaciones excelentes han sido poco detalladas o incluso a ser confusas.

Se han descrito el empleo de varios medios de cultivo, tales como el medio mínimo de Eaglés, Connaughts H597, Ham's F 10 y el medio 199 (1,4,9,6,). Por otro lado, algunos autores informan buenos resultados empleando suero fetal de ternera para enriquecer el medio, mientras otros señalan que no es necesario o que posee efectos tóxicos (9,4).



OFICINA DE
DIFUSION CIENTIFICA

OBJETIVO.

El objetivo del presente trabajo es el de analizar ciertas variables en el cultivo in vitro de linfocitos de -- sangre periférica del ganado bovino para la obtención de Mitosis para estudios citogenéticos.

MATERIAL Y METODOS.

Se utilizó sangre heparinizada (100 U/10 cc), obtenida por punción yugular, la cual se mezcló en condiciones de esterilidad en una solución conteniendo: medio 199 (PH 7.3), phitohemaglutinina, suero fetal de ternera, glutamina, heparina y antibióticos, usando como constantes: la misma cantidad de medio 199, phitohemaglutinina y antibióticos; y como variables la cantidad de sangre, suero fetal de ternera glutamina (29.2 mg/ml) y la heparina (1,000 U/ml), según se muestra en la tabla No. 1.

TABLA No. 1.

MEDIO 199 PH (7.3)	SUERO FETAL DE TERNERA	SANGRE PERIFERICA DE BOVINO	GLUTAMINA (1 GOTTA)	HEPARINA (0.2)
1 8 cm ³	---	2 cm ³	---	---
2 " "	---	2 "	---	+
3 " "	1 cm ³	1.5 cm ³	---	+
4 " "	1 cm ³	2 cm ³	---	---
5 " "	2 cm ³	.5 cm ³	---	---
6 " "	2 cm ³	.5 cm ³	---	+
7 " "	---	1.5 cm ³	+	---
8 " "	---	1.5 cm ³	+	+
9 " "	1 cm ³	1.5 cm ³	+	+
10 " "	1 cm ³	1.5 cm ³	+	-

NOTA: Todos los cultivos llevan .09 ml. de solución de anti-

biótico y 0.5 cm^3 de phitohemaglutinina.

La técnica 1 y 2 la reportó Smith (10); la técnica 3 y 4 es una variante de las dos anteriores en donde se prueba el grado de toxicidad del suero fetal de ternera.

Las técnicas 5 y 6 las reportó Moorhead (9); así a su vez las 7 y 8 son variantes de las 9 y 10 reportadas por Halnan (4), con el fin de probar la glutamina y con variante a la heparina.

MATERIAL.

JERINGA DESECHABLE.	10	5	3 ml.
PIPETAS	10	1	ml.
MATRACES ERLLENMEYER	125		ml.
TUBOS DE ENSAYO.	15		ml.
PROBETAS GRADUADAS.	250		ml.
PIPETAS PASTEUR.			
BOMBILLAS DE GOMA.			
TAPONES DEL No. 5.			
MECHERO DE BUNSEN.			
CHAROLAS DE PELTRE.			
GASAS.			
GORRO Y CUBREBOCAS.			
BATA.			
GUANTES DE HULE			
FENOL AL 5%.			
ESTUFA DE 37°C.			
COLCHICINA.			
SOLUCION BUFFER.			
CENTRIFUGA.			
GRADILLAS.			
PORTA OBJETOS.			
CUBRE OBJETOS.			
METANOL.			



OFICINA DE
DIFUSION CIENTIFICA

LAPIZ DE PUNTA DE DIAMANTE.

SOLUCION HIPOTONICA.

ALCOHOL ETILICO.

ALCOHOL AL 70%.

HEPARINA.

GLUTAMINA.

GIEMSA.

AGUA BIDEUTILADA.

LAMPARA DE 150 WATTS.

MEDIO 199 PH. (7.3).

SUERO FETAL DE BOVINO.

SOLUCION ANTIBIOTICO.

La solución de antibióticos se utilizó con el fin de bloquear el crecimiento bacteriano o cualquier tipo de germen bacteriano que pueda alterar los resultados de las siembras.

SOLUCION STOCK.

Dosis: Penicilina 100,000 U/ml. de H₂O
Estreptomina 0.25 gms/ml. H₂O.

SOLUCION DE USO:

2 ml. de Stock/8 ml. de H₂O.

Cada uno de los experimentos fueron realizados 4 veces, las muestras de sangre se procesaron de la siguiente manera:

1. Los ingredientes se depositaron en matraces Erlenmeyer de 125 ml., y se taparon con tapones de hule del No.5.
2. Se incubaron durante 72 hrs., a 37°C.
3. Previo al término del cultivo se le agregaron .03 cm³ - de una solución de colchicina (5.34 mg/500 cm³ de H₂O - destilada), durante una hora.
4. Enseguida se centrifugaron a 1,200 RPM., durante 7 minutos, desechando el sobrenadante.

5. Al botón celular se le dió un choque hipotónico poniéndole a cada cultivo 10 cm^3 de una solución de KCl al -- 0.75 molar y se incubó durante 20 minutos.
6. Se centrifugó y nuevamente se desechó el sobrenadante, y al botón se le fijó con 10 cm^3 de solución fría car--noy; ésto es: 3 partes metanol, 1 de ácido acético, re--suspendiéndose suavemente y dejándose reposar por 10 mi--nutos, ésto se repite otra vez.
7. Se centrifugó y se eliminó el sobrenadante dejando úni--camente el doble volúmen del botón celular.
8. Se preparan las laminillas goteando desde una altura de .5 mts., aproximadamente sobre el portaobjetos humedeci--do en alcohol de 70° previamente desengrasados y seca--dos ante una lámpara de 150 watts.
9. Una vez secas las laminillas, se tiñeron en una solución de Giemsa al 2% en BUFFER de fosfatos Ph-6.8 durante 5--minutos lavándose con h_2O destilada.
10. Se secaron al aire, se montaron y observaron al micros--copio.

Todo el material de vidriería se lavó de la siguien--te manera:

LIMPIEZA DE MATERIAL:

1. Colocar el material usado en tinas de plástico conteniendo 4 1/2 lts. de agua de la llave + 125 ml. de jabón-EXTRAN (MERCK).
2. Sumergir perfectamente el material en el agua y dejarlo en la solución jabonosa de 1 1/2 hrs. a 12 hrs.
3. Cepillar perfectamente el material con esta solución.
4. Enjuagar 7 veces con agua de la llave.
5. Enjuagar 3 veces con agua destilada.
6. Escurrir perfectamente todo el material y secar en la estufa durante 30 minutos.
7. Envolver, etiquetas y esterilizar.

Una vez lavado y secado, se envuelve y se esteriliza durante 15 minutos a 250°C en la autoclave.

RESULTADOS.

El promedio de mitosis por placa (NO. 4) en cada uno de los experimentos se muestra en la tabla 2.

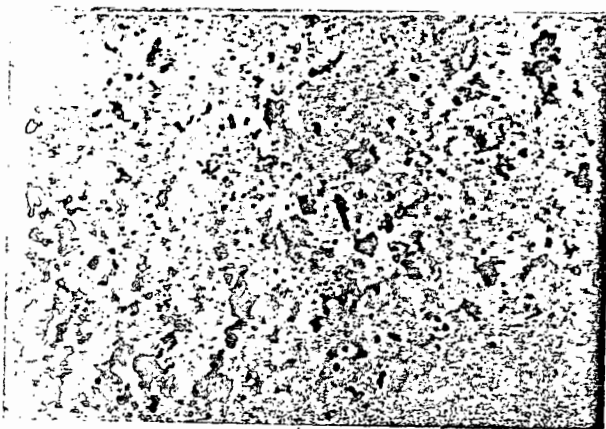
En general en todos los experimentos se obtuvieron células, siendo el paquete celular proporcional a la cantidad de sangre cultivada. Así mismo, en la medida que se utilizaba más sangre completa se encontraba mayor cantidad de detritus compuestos principalmente por Fibrina, aún en aquellos cultivos que se les agregaba heparina, se encontró muchos problemas de contaminación en los cultivos, debito tanto a bacterias como con hongos:

TABLA NO. 2.

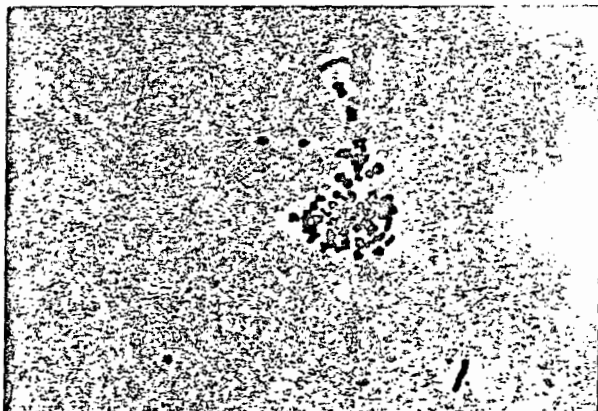
EXPERIMENTO	PROMEDIO DEL NUMERO DE MITOSIS/PLACA (4)
1	-
2	-
3	-
4	49
5	-
6	-
7	-
8	-
9	-
10	-

La figura No.1 muestra micrografías en algunos de los cultivos en donde no se obtuvo resultados; note las células picnóticas y los depósitos de fibrina.

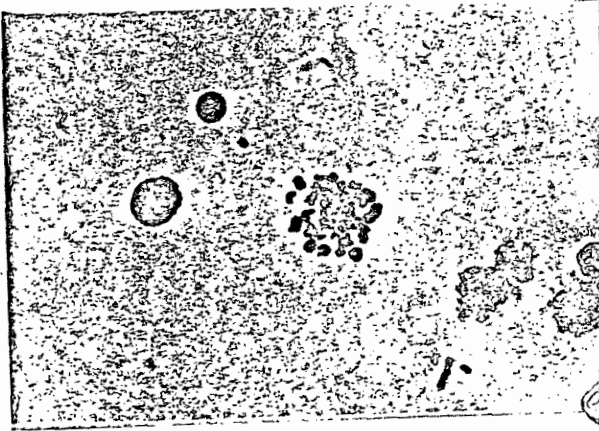
Aumento -- (10 x 0.25).



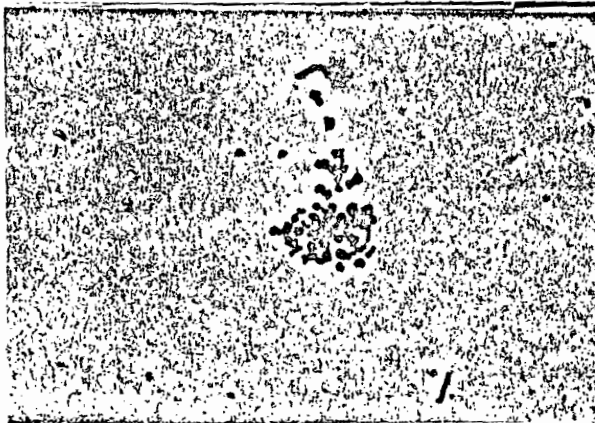
En la figura No. 2, se muestra una composición de 4 micrografías en los cultivos en donde se obtuvieron imágenes de células en metafase (Exp.4) (40 x 0.65).



EXPERIMENTO No. 4.
(40 x 0.65).



EXPERIMENTO No. 4.
(100 x 1.25).



OFICINA DE
DIFUSIÓN CIENTÍFICA

DISCUSION.

El hecho que sólo se haya encontrado mitosis en -- uno de los experimentos (No.4), nos dá una clara idea de la dificultad para inducir a la mitosis de los linfocitos de -- bovino tal como los reportó Halnan en 1977 (4) nuestros resultados nos sugieren que al agregar glutamina para enriquecer el medio o heparina para evitar la formación de fibrina, no mejora en nada los resultados, (Experimento No. 7, 8, 9, y 10), notamos que la adición de poca cantidad de suero fetal de ternera, indujo a la aparición de mitosis en los cultivos de linfocitos; cuando se agregan grandes cantidades de sangre, siendo ésto necesaria, ya que sin el suero no existe mitosis en estado de metafase (Experimentos No. 1 y 2). Contradiciendo los resultados de Smith, et al (10).

El cultivo de poca cantidad de sangre y grandes -- cantidades de suero fetal de ternera (Experimentos 5 y 6) -- con nullos resultados, tal vez sea debido a que el suero posee efectos tóxicos a grandes cantidades, tal como lo reportó el mismo Halnan (4).

Desde luego nuestros resultados no son concluyentes y hace falta mayor número de observaciones y experimentos probados con otras variables, tales como:

- Otros medios de cultivo.

- Otros enriquecedores.
- La cisteína y la tirosina.
- El aislamiento de linfocitos a partir de la sangre completa.
- O probando otros mitógenos, etc.

Las técnicas de cultivo de células, de ninguna manera son de fácil manejo y estandarización, sino que requieren de condiciones muy bien controladas; razón por la cual -- creemos que sólo técnicos experimentados y especializados -- pueden hacer el manejo rutinario de cultivos celulares y de las preparaciones cromosómicas, así como de su análisis.

Esto es importante, dado que los problemas cromosómicos en los bovinos cada vez ganan más importancia, ya que se han asociado a alteraciones reproductivas, de diferenciación sexual, y morfológicas, así como con mecanismos evolutivos de las especies (5). Por lo tanto, el análisis citogenético es indispensable como una herramienta para el diagnóstico y la erradicación de esta patología genética, mal evaluada y que por lo consiguiente, no se realiza ningún esfuerzo para controlarla.

CONCLUSIONES.

Data la problemática que implica el inducir la mitosis, los linfocitos de bovinos, debe de contarse con personal técnico y el material adecuado, el cual debe de seguir las normas de esterilidad establecidas para este cultivo, ya que sólo de esta forma se puede obtener mejores resultados.

Después de varios experimentos se logró perfeccionar una de las técnicas (No. 4)(Tabla No. 1) en la cual se obtuvieron resultados favorables, dado que fue en la única en la que se observó metafases en un número adecuado, ya que es la etapa que nos interesa para cualquier estudio relacionado con la citogenética.

RESUMEN.

El el presente trabajo se evalúan 10 variantes para el cultivo de linfocitos de sangre periférica de bovino - adulto (Tabla No.2). Obteniéndose que bajo nuestras condiciones de trabajo solamente una de las variantes es útil para un posterior análisis citogenético (Tabla No. 2).

Se tomaron muestras de sangre de ganado bovino -- adulto de ambos sexos para el total de los experimentos. El recuento se hizo por placas en microscopio biocular bajo el objetivo seco débil; ésto en base al número de mitosis por placa, quedando como técnica única la No. 4.

EXPERIMENTO No. 4.

MEDIO 199 PH (7.3).	SUERO FE TAL DE - TERNERA.	SANGRE PERIFERICA DE BOVINO.
8 cm ³	1 cm ³	2 cm ³

1. BOSMAN, F.T.; VAN DER PLOEG; SCHBERG, A: AND DUIJIN, P.
CHROMOSOME PREPARATIONS OF HUMAN BLOOD LIMPHOCYTES EVALUATION OF TECHNIQUES. GENETICA 45: 425-422 (1975).
2. EGOZCUE, J.
TECNICAS EN CITOGENETICA, ED. ESPAXS, 1971.
BARCELONA, ESPAÑA.
3. HALNAN, C.R.E.- CROMOSOMES OF CATTLE; PRESENT CLINICAL STATUS AND PROMISE. VET. REC. 96: 148-151 (1975).
4. HALNAN, C.R.E. AND IMPROVED TECHNIQUE FOR THE PREPARATION OF CROMOSOMES FROM CATTLE WHOLE BLOOD. RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE, 22: 40-43 (1977).
5. HARE, W.C.D. CYTOGENETICS IN: CURRENT THERAPY IN THERIOGENOLOGY. ED. MORROW. D.A. W.B. SAUNDERS COMPANY, PHILADELPHIA (1980).
6. KING, W.A.; LINARES, T; GUSTABSSON, I AND GANE, A PRESUMPTIVE TRANSLOCATION TYPE IN EMBRYOS Sired BY BULLS - HETEROZYGOUS FOR THE 1/29 TRANSLOCATION, HEREDITAS 92: 167-169 (1980).
7. LIN, C.C.; NEWTON. D.R.: SMITH, W.K. AND CHURCH, R.B. A

RAPID AND SIMPLE METHOD FOR THE INSOLATION AND CULTURE
OF LEUKOCYTES FOR CHROMOSOME ANALYSIS IN DOMESTIC ANI--
MALS.

CANADIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE. 56: 27-32 (1976).

8. LOUGE, D.N.; BREEZEE, R.C.; HARVEY, M.J.A. ARTHROGRYPOSIS
PALATOSCHISIS AND A 1/29 TRANSLOCATION IN A CHAROLAIS -
HERD. VET. REC. 100: 509-510 (1977).
9. MORHEAD, P.S.; MELLMAN, W.J. ET AL CHROMOSOMES PREPARA-
TIONS OF LEUCOCYTES CULTURED FROM HUMAN PERIPHERAL
BLOOD. EXP. CELL RES. 20: 613-616 (1960).
10. SMITH, A.L. WEAT HERSBEE, P.S. AND LODGE, JR. WHOLE
BLOOD LEUKOCYTE CULTURE TECHNIQUE FOR MAMMALIAN CYTOGE-
NETIC ANALYSIS. LABORATORY ANIMAL SCIENCE, VOL. 26 NO.
6, PO; 936-938.