

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA, VETERINARIA Y ZOOTECNIA



Obtención de Cultivo Celular Primario a partir de
Embrión de Pollo.

TESIS PROFESIONAL

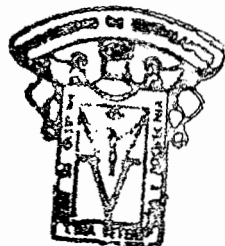
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

JESUS FRANCISCO UGALDE VALVERDE

GUADALAJARA, JAL., 1980.



OFICINA DE
DIFUSION CIENTIFICA

Quienes hicieron posible la culminación
de mi Carrera Profesional, con mucho
Carifio y agradecimiento para mis Padres

JESUS Y ANTONIA

A mis Hermanos:

MARIO
CARLOS
HILDA
JULIO
JOSE
MARCOS
JORGE
FERNANDO
con mucho aprecio.

Con profundo agradecimiento a quienes
brindaron su apoyo decidido en la - -
Asesoría de esta Tesis:

M.V.Z. RODOLFO JAVIER BARBA LOPEZ.
M.V.Z. J. JESUS CASTAÑEDA SANDOVAL.

Por su valiosa colaboración al
DR. HECTOR GOMEZ ESTRADA,

A nuestro Padrino de Generación

M.V.Z. Msc. RUBEN ANGUIANO ESTRELLA

Al Honorable Jurado:

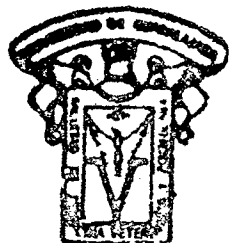
M.V.Z. ABEL BUENROSTRO SILVA.
M.V.Z. JOSE ANTONIO OROZCO SANCHEZ.
M.V.Z. FABIAN UVIÑA LUNA.
M.V.Z. VICTOR MANUEL GOMEZ LLANOS MORALES
M.V.Z. RICARDO DIAZ VILLALOBOS

Con Gratitud:

A MI QUERIDA FACULTAD.

A todos mis Maestros.

A mis Compañeros y Amigos.

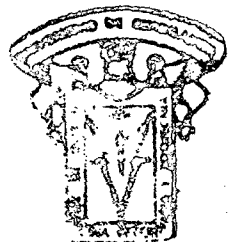


OFICINA DE

" OBTENCION DE CULTIVO CELULAR PRIMARIO
A PARTIR DE EMBRION DE POLLO"

2

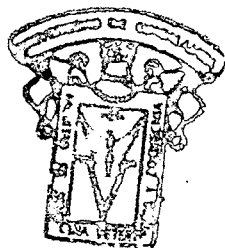
JESUS FRANCISCO UGALDE VALVERDE.



UNIVERSIDAD DE VALPARAISO

FE DE ERRATAS

Página	dice :	debe decir:
1 (Primer Párrafo)	circuntancias	circunstancias
1 (Cuarto Párrafo)	cultivo celuar	cultivo celular
3 (Primer Párrafo)	Biólogos Siglo IXI	Biólogos Siglo XIX
7 (Primer Párrafo)	plasma congelado	plasma coagulada
8 (Primer Párrafo)	actua dirigiendo	actua digiriendo
23 (Sexto Párrafo)	cutlivos	cultivos
25 (Primer Párrafo)	haber pusto	haber puesto
26 (Tercer Párrafo)	En el uso	El uso
26 (Quinto Párrafo) (cuadro # II)	tienen a dejar Cultivos Secundarios	tienden a dejar Resultados de cultivos secundarios.



OFICINA DE
COMISION CIENTIFICA

INTRODUCCION

El cultivo de tejidos es una técnica que nos permite reproducir y mantener células animales en circunstancias artificiales, y entre otras cosas es de gran utilidad para el estudio de los virus, la preparación de vacunas virales y la ejecución de pruebas de diagnóstico.

El refinamiento con el uso de monoestrato o Película celular sobre una superficie de vidrio, permite estudiar muy de cerca las células individuales y la acción que ejercen sobre ellas agentes viables y no viables. (3)

La técnica del cultivo celular se considera como un recurso bastante sofisticado para incluirlo dentro de los años básicos de estudio de la Medicina Veterinaria, pero si se detiene uno a pensar seriamente al respecto, veremos que su incorporación al programa de estudios significaría una innovación en la enseñanza.

Al citar la inclusión de ésta técnica, nos referimos claro a introducirla como auxilio a las materias más afines al cultivo celular, como son: Bioquímica, Virología, Fisiología, Farmacología, Histopatología, Genética y Embriología. Sin quitar importancia a la investigación, que una vez contando con células vivas en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica de la Universidad de Guadalajara, los trabajos pueden aumentar en su número e indudablemente en su calidad.

Se podría realizar un mayor número de trabajos de investigación y Tesis Profesionales, de cada una de las materias antes mencionadas.

Esta técnica ayudará a mejorar la calidad y cantidad de los diagnósticos, que como servicio social presta nuestra Facultad a la Ganadería Regional.

La idea de que sólo los Laboratorios o Instituciones económicamente poderosas pueden contar con éste tipo de cultivo es errónea, -- porque es relativamente fácil obtener cultivos primarios a partir de embrión de pollo (Fibroblastos de embrión de pollo), requiriéndose para ello sólo algunos cuidados, como por ejemplo la Asepsia.

O b j e t i v o :

El objetivo de éste trabajo de Tesis, es aportar una metodología en la técnica de cultivo celular, para la realización de futuros trabajos de investigación, servicios de diagnóstico y enseñanza.

Historia del Cultivo Celular.

Los biólogos del Siglo XIX, concluyeron que la muerte del organismo no es necesariamente acompañada de sus partes simples (células). El primero de ellos fué Claude Bernad, quien en 1878 formuló los principios teóricos para la creación del sistema artificial, donde los órganos pudieron sobrevivir fuera de la influencia del organismo completo (11)

Wilhelm Roux en 1885, logró conservar in-vitro la médula de un pollo en solución fisiológica, también demostró que el cubrimiento del canal medular fué debido a la actividad directa de las células. Es aquí donde se considera que la era del cultivo celular ha comenzado. (3-5-11).

Arnold en 1887, continuó estudiando la supervivencia y actividad migratoria de los leucocitos de rana mantenidos en solución fisiológica. (11).

Ljungren en 1898, mantuvo fragmentos de piel humana vivos durante muchos días y semanas, en fluido ascítico.

En 1902, Loeb publicó los resultados de experimentos que había iniciado 5 años antes y describe como fué posible mantener en el tejido subcutáneo de un conejo, pequeñas secciones de piel de cobayo embebidas en plasma coagulada.

En 1903, Jolly logró cultivar leucocitos de Salamandra por más de un mes y siguió su división por varias generaciones.

Beebe y Ewing en 1906, cultivaron explantes de un linfoma canino en suero de animales inmunizados y no inmunizados. (Idem).

Ross Harrison en 1907, realiza el primer cultivo de tejidos exitoso, obtuvo asépticamente un pequeño fragmento de la pared de una cresta neural de rana y las cultivo en linfa coagulada de rana; en este sistema crecieron activamente y observó el desarrollo de fibras nerviosas por varias semanas. (2-3-5-11).

Burrows en 1910, desarrolla una nueva técnica de cultivo de células de embrión de pollo utilizando plasma coagulada, siendo este investigador el primero en observar y describir la Mitosis in-vitro.

En 1911 Carrel y Burrows, descubren que el extracto de embrión de pollo era excelente promotor de crecimiento para ciertas células.

Al mismo tiempo en 1911 M. y W. Lewis, introducen el primer medio de cultivo líquido con algunos componentes controlados, así como diferentes sales y peptonas. Ellos también usaron agua de mar, suero y extracto de pollo en diferentes concentraciones. En este medio las células se desarrollaban en una capa delgada, excelente para las observaciones al microscopio, pero sólo por un tiempo.

Carrel, contribuyó grandemente con avances para dispersar la técnica del cultivo celular, tales como la metodología quirúrgica en la manipulación de tejidos, particularmente en las técnicas de asepsia.

En 1926 y 1928 Carrel y Baker, estudian la composición del medio para identificar las diferentes sustancias favorecedoras del creci-

miento celular y finalmente, Carrel perfecciona la técnica introduciendo los frascos de cultivo celular que actualmente llevan su nombre y se hace uso de ellos.

La mayor importancia del trabajo de Carrel, reside en el hecho de que demostró por vez primera, que cualquier tipo de tejido puede mantenerse y crecer in-vitro por un período de tiempo indefinido mediante subcultivos sucesivos.

Durante casi 30 años, Carrel fué el propagandista de esta técnica y aplicó su importancia al estudio de los problemas biológicos.

En períodos posteriores, muchos otros investigadores trabajaron sobre la misma línea de Carrel, introduciendo innovaciones a la técnica y usando nuevos medios de cultivo.

En 1917 Burrows y Neymann, estudiaron el efecto de la yema de huevo hidrolizada y, Baker en 1921, introdujo la caseína hidrolizada. En 1932 Vogelaar y Errlichman, éxitosamente introdujeron el primer medio de cultivo sintético compuesto por peptona, hemín, cistina, insulina, tiroxina y glucosa. Tiempo después este medio fué mejorado por Baker en 1936 y Ebeling en 1939. (11).

Las investigaciones para buscar un mejor medio de cultivo sintético continuaron por Simms (1936), Fischer (1939-1949), por White (1946), pero de todos el de mejores resultados fué el medio 199, introducido por Morgan y colaboradores en 1950. Todos los medios sintéticos comúnmente usados hoy en día son originados de este estudio.

Conforme el tiempo transcurría, las investigaciones avanzaban y se puso en claro los requerimientos metabólicos de las células desarrolladas in-vitro, nuevas técnicas fueron introducidas como la de Gey, que en 1933 introdujo el uso de tubos Roller para el crecimiento celular.

En 1952 Moscona, da un gran paso en la historia del cultivo celular utilizando la tripsinización de tejidos.

El cáncer fué uno de los primeros problemas para los que el cultivo de tejidos ha sido extensivamente usado. Volpino en 1910, cultivo in-vitro células de adenocarcinoma de ratón y observó que estas células re producían el tumor cuando se reinoculaban en ratón.

Carrel y Burrows en 1911, y Lambert y Henes en el mismo año, desarrollaron in-vitro el sarcoma de Rous de las aves, el cual también fué transplantable a especies homólogas; a pesar de toda esta investigación inicial no quedó algo claro sobre el problema del cáncer.

El problema de la producción de anticuerpos fué investigado precozmente en el cultivo de tejidos, Carrel e Ingebrigtsen en 1912, exitosamente estudiaron la formación de anticuerpos (hemolisinas) in-vitro. Ellos fueron seguidos por Ludke, quien en el mismo año demostrara la producción in-vitro de aglutininas para Salmonella Typhosa, usando siembras obtenidas de animales vacunados con esta bacteria.

En el año de 1913, otro problema fué estudiado en el cultivo celular y se trató de la acción de las toxinas bacterianas sobre las células y en 1930, Okabe y Teruuchi, estudiaron la neutralización de toxinas con -- antitoxinas homólogas en células in-vitro.

El primer intento del cultivo de virus en células in-vitro - fué hecho por Steinhardt, Israeli y Colaboradores en 1913, ellos demostraron que el virus de la vacuna podía sobrevivir por más de un mes en fragmentos - de córnea de conejo mantenida en plasma congelado. Estos experimentos con - virus de vacuna fueron continuados por otros investigadores como (Parker y Nye en 1925, Maitland y Maitland 1928; Li y River 1930. Desde entonces otros han trabajado con numerosos virus; Carrel (1924), con virus del sarcoma de - Rous; Findlay (1928) con viruela aviar; Andrews (1929) con virus III; Parker y Nye (1925); River, Haagen y Colaboradores (1929), y Andrewes (1930) con -- Herpes; Maitland y Maitland con el virus de la fiebre aftosa en 1931; Halla-- uer (1931), con la plaga de las aves; Haagen y Thieler (1932) con la fiebre amarilla; Bland y Canti (1935) con Psitácosis; Sabin y Oltitzky (1930) con - - Poliomielitis; Parker y Hollender (1945) con rabia; Koprowsky y Lennette - - (1946) con encefalitis del oeste del nilo. Por último el trabajo de Enders, Weller y Colaboradores en 1949 sobre el crecimiento de virus de Poliomielit-- tis.

La idea de producir vacuna por crecimiento de virus en culti- vo de tejidos, primero fué concebida por Carrel y Rivers, quienes en 1929 - produjeron una vacuna de vaccinia con esta técnica. Rivers y Ward en 1935, reportaron resultados obtenidos de vacunaciones hechas con vacunas multipli- cadas in-vitro. Desde entonces, las vacunas virales producidas in-vitro han sido de uso común, particularmente la vacuna de poliomielitis desarrollada -- por Salk en 1953.

A travez de los años, el cultivo de tejidos ha sido utilizado en conección con muchos tipos de problemas biológicos. El cultivo de teji- dos fué usado por Levaditi y Mutermich (1914), para el estudio del veneno - de serpiente, por Lewis (1920) para estudios bacteriológicos; por Champy --

(1922) para investigación sobre hormonas; por Hogus (1928) para embriología; por Fomerat, Drager y Colaboradores (1946) para farmacología; por -- Brues y Stroud (1951) para radiobiología; por Penso y Colaboradores (1961) para la estandarización de drogas quimioterápicas antivirales. (Idem.)

Tipos de cultivos Celulares.

Dentro de los cultivos celulares se distinguen tres grandes grupos que son: cultivo celular primario, cultivo celular secundario y cultivo de células bien definidas o conocidas como establecidas o continuas.

a).- Cultivo Celular Primario.- Se obtiene directamente de los tejidos animales; se colectan asépticamente y se cortan en pequeños pedazos, provocándose la disociación por medio de una solución de tripsina - que actúa dirigiendo el retículo intercelular. Las células son recolectadas de la tripsina y sembradas en botellas, aquí se sedimentan y adhieren a la superficie del vidrio, donde se empiezan a multiplicar hasta formar - un monoestrato celular; éste término se usa para indicar que la capa de celular que ha crecido en la superficie de la botella, es del grosor de una célula. Todo el proceso de las células que están multiplicándose, produce acidez del medio de cultivo y lo hace peligroso para las células, por lo que cuando las células han obtenido su crecimiento óptimo, el medio de crecimiento es cambiado por medio de mantenimiento, para disminuir su metabolismo y así en este estado de latencia, las células pueden mantenerse durante algún tiempo. (1-3-5-10-11).

b).- Cultivo Celular Secundario.- Se obtiene a partir de un cultivo primario, el cual se ha sometido a una tripsinización para facilitar la separación de las células; las células así obtenidas son colocadas nueva

mente en un medio de cultivo y son distribuidas en botellas para crecimiento, para que se inicie así la multiplicación celular, formándose el monoestrato; estos cultivos aguantan varios subcultivos. (Idem.)

c).- Cultivo de Líneas Celulares Establecidas o Continuas.-

Son células que han sido adaptadas a un crecimiento uniforme y prolongado, por medio de pasajes seriados, derivadas de células diploides transformadas o de tejidos neoplásicos; pueden ser cultivadas sin límite aparente.

Para producir monoestratos, las células deben obtenerse en condiciones ideales, como una suspensión de células individuales procedentes de tejidos ó por desintegración de un monoestrato previo para realizar el subcultivo. (Idem)

Ventajas del Cultivo Celular.

Las ventajas que nos pueden brindar los cultivos celulares son múltiples; entre las que podemos mencionar las siguientes:

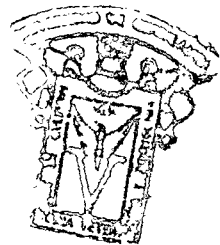
- 1.- Los cultivos celulares constituyen un sistema económico para la propagación de los virus, para su aislamiento, pruebas de neutralización o para la preparación de antígenos virales.
- 2.- Requieren menos espacio y atención que los animales de Laboratorio y embriones de pollo.
- 3.- Nos permiten intensificar los estudios de algunos virus que no se propagan en embriones de pollo o en ratones.
- 4.- Permite una investigación más fina y detallada en la realización de pruebas de suero neutralización y hemoadsorción.
- 5.- La preparación de agentes virales en cultivos celulares nos pro-

vee de suspensiones con altos títulos de virus y relativamente libres de material extraño, para el uso en la preparación de - vacunas y antígenos serológicos.

- 6.- La técnica del cultivo celular nos permite hacer estudios cuantitativos en virología. (1).

Desventajas del Cultivo Celular.-

- 1.- Con el uso de cultivos celulares, en ocasiones los virus necesitan un período de adaptación antes de que se multipliquen bien, en los cultivos celulares. Este período de adaptación puede provocar cambios en la estructura antigénica de los virus, por lo - cual, una vacuna puede no inducir los niveles adecuados de anticuerpos.
- 2.- En otras ocasiones los anticuerpos formados, van dirigidos contra los posibles mutantes de virus adaptados a cultivos de tejidos, y son inadecuados para proteger al animal en un brote natural de la enfermedad. (Idem)



SECRETARIA DE
SALUD

MATERIAL Y METODO



OFICINA DE
DIFUSION CIENTIFICA

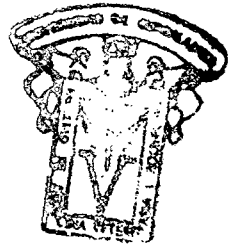
Material:

- Embrión de pollo (7 a 10 días)
- Suero de ternera.
- Medio de cultivo B.H.K. 21 (Instant Tissue Culture Powler Medium General Biochemical).
- Caldo de Triptosa Fosfato (Difco).
- Bicarbonato de Sodio
- Acido Clorhídrico 1/n (HCl 1/n.)
- Solución Buffer Fosfato con pH. 7.2
- Agua tridestilada, desmineralizada y deionizada.
- Agua bidestilada.
- Alcohól etílico al 70%
- Cristal violeta.
- Eter.
- Extrán. (detergente para material de cristalería). Merck.
- Jabón detergente en polvo.
- Tripsina 0.25%
- Antibióticos. (Estreptomfina, Gentamfina y Penicilina).
- Antimicótico. (nistatina).
- Congelador.
- Refrigerador.
- Centrífuga.
- Agitador Magnético.
- Autoclave húmedo.
- Autoclave seco (Pupinel).
- Horno (para secar material de cristalería).
- Estufa Bacteriológica (37°C)
- Flujo Laminar (campana de esterilidad).
- Baño María.
- Potenciómetro.
- Microscopio.
- Microscopio invertido.
- Lámpara de luz Ultravioleta.
- Balanza Granatoria.
- Monitores de plástico Millipore de 45 mm. de diámetro con jeringa de 50 cc. para filtrado.
- Mecheros Fisher.



OFICINA DE
OPUSCULO DE BUREAU

- Hemocitómetro.
- Termómetro.
- Garrafón Pyrex. (9 litros).
- Botellas dilutoras de leche Pyrex.
- Cajas Petri.
- Tubos de ensaye con tapón de baquelita.
- Tubos graduados para centrifuga.
- Pipetas graduadas de cristal (1 - 2 - 5 - 10 ml.)
- Probetas graduadas de 100 ml.
- Vasos de precipitado de 250 ml.
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Jeringas desechables.
- Tijeras de Mayo y Curvas.
- Pinzas de Disección.
- Mango de Bisturí (#4 con hoja núm. 22).
- Bata para cirujano, gorro y cubre boca.
- Recipientes de plástico.
- Tina metálica. (lámina galvanizada).
- Papel de estaño.
- Papel Kraff.
- Algodón.
- Maskin tape.
- Membranas (filtros) Millipore de 45 mm. de diámetro, con una porosidad de 0.8 - 0.6 - 0.4 y 0.2 micras.
- Separadores de dacrón.
- Un colador de té de Nylon.



OFICINA DE
DIFUSION CIENTIFICA

Método:

1. Procedimiento de Lavado del Material de Cristalería para cultivo celular

Cuando el material sale del cuarto de cultivo, si es que con tiene material contaminado, se le agrega una buena cantidad de jabón detergente comercial, el cual se deberá dejar actuar por lo menos durante dos -- horas; si el material no está contaminado se le podrá pasar directamente a lavado con agua solución jabonosa, tallando con escobilla y cuidando de que no se raye el mismo con el alambre del escobellón, y se envía al cuarto de esterilizado para que sea tratado con extrán como a continuación se explica:

El material será colocado en extrán durante 24 horas, a una concentración de 0.5% (10 cc. de extrán por cada 20 litros de agua), una -- vez pasadas las 24 horas, se quema el material (o sea que se deja hervir el material con extrán durante 1 hora). De aquí se pasa a enjuague con agua corrediza caliente, durante 5 veces; se pasa a una segunda tarjea para con tinuar dando los enjuagues necesarios al material, con agua caliente de la llave, por 5 ocasiones más.

Pasar a las tinas de plástico, las cuales dos tienen agua -- bidestilada y una tercera contiene agua deionizada (se dan 5 enjuagues en -- cada tina).

Se coloca el material en el horno de calor a 120°C., durante 15 a 30 minutos para que se seque.

Si se encontrara después del paso anterior material manchado, debemos de volver a lavarlo, (desde ponerlo en extrán). Cuando se es teriliza antes de pasarlo al autoclave de calor seco; se tapa el material con papel estaño y se esteriliza a una temperatura de 250 a 300 °C., duran te dos horas (1-3-4-11).

2. Procedimiento de Lavado de Tapones de Baquelita.

Se lava y enjuaga igual que el material de cristalería, pero se esteriliza con calor húmedo, igual que las pipetas, filtros, gasa y algodón (Autoclave 22 libras por 60 minutos). (1)

3. Preparación y lavado de laminillas y cubreobjetos.

- 3.1.- Colocar las laminillas y cubreobjetos en un recipiente de vidrio con éter, durante 10 minutos.
- 3.2.- Luego colocar en acétona, durante 10 minutos.
- 3.3.- Lavar con agua corriente, por 10 veces.
- 3.4.- Lavar con agua bidestilada, por 10 veces.
- 3.5.- Secar con gasa limpia sin tocarlos.
- 3.6.- Colocar en una caja de Petri.
- 3.7.- Envolver la caja de petri con papel aluminio.
- 3.8.- Esterilizar a 250°C., durante 120 minutos. (1-3).

4. Preparación de los monitores (Filtros Millipore).

Cuando se termina de utilizar el filtro debe ser lavada inmediatamente con agua corriente sin jabón, con la mano, tratando de quitarle la -- mayor cantidad posible de los residuos del filtro, luego se pasa a una tina con agua bidestilada, se enjuagan bien y pasan al horno para secarse y de -- aquí pasan a esterilización con calor (Autoclave húmedo) (Idem.)

5. Preparación del medio de cultivo B.H.K.21

Se diluyen 25.8 gramos de medio B.H.K.21 (Instant Tissue Culture Power medium General Biochemical), deshidratado, perfectamente en 1600 ml. - de agua deionizada, con el agitador magnético.

Disolver 5.5 gramos de bicarbonato de sodio perfectamente en 400 ml. de agua dionizada.

Mezclar las dos preparaciones anteriores perfectamente, obteniendo un pH. muy alcalino, al cual debemos ajustar a 6.8 ó 6.9 con adición de Acido Clorhídrico 1/N.

Se esteriliza el medio de cultivo por filtración de la siguiente manera: (El filtrado se debe realizar en un flujo laminar). Se toma un Monitor Millipore, al cual se le coloca un sándwich de membranas y con una jeringa de 50 ml. conteniendo medio de cultivo, la cual se adapta al Monitor, se hace pasar éste por medio de presión a través del filtro, obteniendo de ésta manera un producto estéril.

El sándwich de membranas se prepara como sigue: Dentro del Monitor Millipore se coloca una membrana de 0.8 micras de porocidad, luego se coloca un separador de dacrón, se pone otra membrana de 0.6 micras y un separador, otra membrana de 0.4 y un separador, por último una membrana de 0.2 micras de porocidad, siendo ésta la última membrana por donde pasa el medio de cultivo. Se envasa en frascos Pyrex (botellas de vidrio neutro), y por cada frasco se usa un sándwich nuevo y un Monitor perfectamente estériles.

Se debe de realizar prueba de esterilidad del producto, tomando 5 ml. del primer filtrado y 5 ml. del último de cada botella, éstas muestras se colocan en la estufa de incubación a 37°C., durante 48 horas. El medio de cultivo estéril es almacenado en refrigeración a 4°C., hasta el momento en que se va a utilizar (1-3).

6. Obtención y preparación del suero de Ternera.

Se recolecta la sangre asépticamente en el rastro, de becerros, de 1 a 2 días de nacidos; con el animal conmocionado, se disecciona -

la vena yugular en una extensión de 10 cms., se corta y se recolecta la sangre en un recipiente estéril; se transporta al Laboratorio y se deja en refrigeración durante 24 horas a 4°C., para que se coagule y se pueda separar el suero. Este se centrifuga tres veces a 1500 r.p.m., durante 15 minutos cada vez; luego se procede a la esterilización por filtración de la misma manera que se realizó en el medio de cultivo. El suero estéril se envasa en frascos Pyrex y se almacena en congelación a -20°C.

Se debe de realizar prueba de esterilidad de cada uno de los frascos, colocando unas gotas del primer filtrado y otras del último en tubo de ensaye conteniendo caldo nutritivo; se incuban durante 48 horas, se hace la observación para descartar el crecimiento bacteriano.

Cuando el suero se vaya a utilizar se deberá descongelar -- perfectamente, e inactivar en baño maría a 56°C., durante 30 minutos; después de ésto queda lista para ser empleado (Idem).

7. Preparación del caldo de triptosa Fosfato.

Se disuelven perfectamente 29.5 gramos de caldo de Triptosa Fosfato (Difco) en 1000 ml., de agua dionizada, en el agitador magnético, procurando que no forme burbujas. Se envasa en frascos Pyrex o de vidrio neutro, se esteriliza en el auto-clave, de calor húmedo a 15 libras de -- presión durante 15 minutos; para realizar la prueba de esterilidad, los frascos se meten a la estufa de incubación a la temperatura de 37°C., durante 48 horas. Después de esta prueba se almacenan a 4°C., hasta el momento de ser utilizado. (Idem).

8. Preparación de la solución: Buffer fosfato. (P.B.S.)

Se toman las siguientes sustancias, se pesan perfectamente y se disuelven bien una por una:

P.B.S.

Na Cl (Cloruro de Sodio)	8 grs.
K Cl (Cloruro de Potasio)	0.2 grs.
Na ₂ HPO ₄ (Fosfato disódico)	1.15 grs. (anhidro).
KH ₂ PO ₄ (Fósforo monopotásico).	0.2 grs. (Se regula el pH.
Agua Deionizada.	800 ml. (a 7.2)

una vez disueltas perfectamente se esterilizan por autoclave a 10 libras - durante 10 minutos. Se envasa en frascos de tapón de rosca y se almacena - en refrigeración a 4°C. (1-3-4-11)

9. Preparación de la Tripsina.

Se pesan 0.25 grs., de tripsina para disolver en 100 ml. de solución Buffer Fosfato, se disuelve perfectamente en el agitador magnético por una hora. Se esteriliza por filtración, utilizando membranas de 0.2 micras de diámetro y se almacena en frascos conteniendo c/u 10 ml., de solución, congelándose a -20°C.

Antes de usarse se descongela perfectamente y se precalienta a 37°C. Una vez utilizada una parte del frasco, se desecha el resto. (1-3-4).

10. Preparación del Antibiótico.

10.1 Penicilina. - Estreptomina.

Se toma un frasco de 1.000.000 u.i. de penicilina y 1 gramo de --

estreptomina (Dihidro-estreptomina Hoechst), y se disuelven en 100 ml. de agua dionizada estéril.

Se almacena en frascos en cantidades de 1 ml., conteniendo cada uno 10.000 u.i. de penicilina y 10.000 microgramos de estreptomina. Se almacena en el congelador a una temperatura de -20°C.

Para su utilización se descongela perfectamente y se emplea 1 ml., por cada 100 ml. de medio de cultivo (quedando a la concentración de 100 u.i. de penicilina y 100 microgramos de estreptomina por ml. de medio de cultivo. (Idem.)

10.2 Sulfato de gentamicina.

Se toma una ampollita de 2 ml. de gentamicina infantil, que contiene 10 miligramos por ml. de sulfato de gentamicina.

Se emplea a una concentración de 100 microgramos por ml. de medio de cultivo o sea 1 ml. por cada 100 ml. de medio de cultivo.

11. Preparación del Antimicótico.

Nistatina (Micostatín "Squibb").

Se toma un gramo de Nistatina que contiene 100.000 unidades de nistatina. Este fungicida es casi insoluble en agua. Se disuelve en 20 ml. de agua deionizada perfectamente y se almacena en cantidades de 1 ml. conteniendo 5,000 unidades cada ml., se congela a -20°C., y empleándose a una concentración de 25 u. por ml. de medio de cultivo o sea para cada 100 ml. del mismo, se aplica 0,5 ml. de la solución (1).

12. Preparación del medio de Crecimiento. (Idem.)

Suero de ternera	10 %
Caldo de Triptosa fosfato	10 %
Penicilina	100 u.i./ml.
Estreptomicina	100 Mg./ml.
Nistatina,.....	25 u. /ml.
Gentamicina	100 Mg. /ml.

(Cuando se empleó gentamicina, no se emplearon los otros antibióticos).

13. Preparación del medio de Mantenimiento. (Idem.)

B.H.K. 21	98 %
Suero de ternera	2 %

(los antibióticos y la nistatina se adicionan en la misma forma que el medio de crecimiento.)

14. Obtención y siembra de las células.

- 14.1 Para efectuar satisfactoriamente ésta acción, se debe de trabajar en un cuarto estéril con las máximas medidas de esterilidad.
- 14.2 Se desinfecta el cascarón del huevo (embriones de pollo de 7 a 10 días de edad), frotándolos con un algodón estéril, impregnado de etanol al 70% (1-2-3-4-8-11).
- 14.3 Con las tijeras curvas se corta el cascarón sobre la cámara de aire y se retira con las pinzas de disección.
- 14.4 Se rasgan y retiran las membranas expuestas del embrión con nuevas pinzas.
- 14.5 Se retira con cuidado el embrión, colocándolo en una caja de petri estéril (Idem.)
- 14.6 Se separan y eliminan las patas, cabeza y vísceras y se lava con - solución Buffer fosfato estéril el remanente.

- 14.7 Se toma una jeringa de 10 cc., se le quita el émbolo y se coloca el remanente, se vuelve a colocar el émbolo, se elimina el aire, se preciona el émbolo con el fin de triturar lo que nos quedó del embrión, colectando el triturado en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. estéril. (1)
- 14.8 Lavar con solución Buffer fosfato estéril 2 veces.
- 14.9 Se retira el último líquido del lavado y se repone por lo menos con 10 veces el volumen tisular con una solución de tripsina al 0.25% precalentada a 37°C. (1-2-3-4-8-11).
- 14.10 Se coloca el matraz en el agitador magnético, durante 10 minutos para que se produzca la disgregación de las células; formándose una suspensión. (1-4-8).
- 14.11 Se hace pasar la suspensión por un colador de té, para separar los fragmentos que no se disgregaron, del resto de la suspensión. (3)
- 14.12 Se colocan 2 ml. de suero de ternera, en un tubo de centrifuga -- graduado y se completa a 15 ml. con la suspensión de células (1)
- 14.13 Se centrifuga a 600 r.p.m., durante 10 minutos. (1-3-8-11)
- 14.14 Mientras transcurre el tiempo de centrifugado, se prepara el medio de crecimiento para las células.
- 14.15 Se decanta el sobrenadante del centrifugado y se repone con medio de crecimiento, para resuspender las células sedimentadas y así -- pasarlas a un vaso de precipitado, donde se homogenizan con el -- resto del medio de crecimiento.
- 14.16 La dilución de las células debe hacerse a una relación de 1 a 300, ó sea por cada 0.1 ml. de sedimento se debe de poner 30 ml. de medio de cultivo. (1)

14.17 Calcular la concentración de células por ml. de medio de cultivo - mediante hemocitómetro; ésta acción se realiza mezclando 0.5 ml. de medio de cultivo, conteniendo un número desconocido de células, con 0.5 ml. de cristal violeta, se homogeniza dicha suspensión para poder realizar un conteo celular perfecto, utilizando el hemocitómetro con suspensiones uniformes y contar las 4 esquinas de las 2 cámaras, utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{(N8) \cdot (.2)}{8} \times 10,000 = \text{Células / ml.}$$

N8 = Suma de las células de las ocho esq.

2 = Factor de dilución (1-8-9-11).

14.18 Ajustar la concentración de las células entre 10^8 y 3×10^5 por ml. de medio de cultivo. (8-9-11)

14.19 Sembrar en botellas de dilución en leche, colocando 15 ml. por botella y taparlas perfectamente. (1)

14.20 Se colocan las botellas en posición horizontal, en la estufa de incubación a una temperatura de 37°C ., durante 48 ó 72 horas (hasta que los monoestratos sean confluentes).

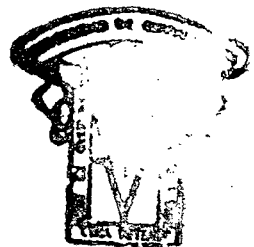
14.21 Para realizar un pase de células, se escogen las botellas que contengan un mejor monoestrato; se elimina el medio de cultivo y se -- agrega nuevo medio de cultivo, se tapa la botella otra vez bien y se agita vigorosamente con el fin de desprender las células.

14.22 Se vasean las células desprendidas en un vaso de precipitado, en donde se homogenizan con el resto del medio de cultivo.

14.23 Se realiza el conteo celular con el hemocitómetro, como se hizo en el paso número 14.17

14.24 Se realizan los pasos antes mencionados: No. 14.18, No.14.19 y -
14.20

14.25 Si se desea continuar con los pases celulares, se repiten los --
pasos No. 14.21, No. 14.22, 14.23 y 14.24 sucesivamente. (Idem.)



OFICINA DE
DIFUSIÓN CIENTÍFICA

RESULTADOS



Se realizaron 5 cultivos celulares primarios de fibroblastos de embrión de pollo y un intento de producir cultivos secundarios a partir de los cultivos primarios, con los siguientes resultados:

El medio de cultivo utilizado fué el B.H.K.21, el cual ha mostrado mayor eficiencia para el desarrollo de fibroblastos de embrión de pollo, en el trabajo cotidiano del Departamento de Producción de Biológicos del I.N.I.P. S.A.R.H. Palo alto, D.F.

La temperatura de incubación fué constante (37°C.), y la cantidad de células sembradas, variante; por lo que podemos apreciar en el cuadro I que el tiempo transcurrido para la formación de un buen monoestrato, también varía.

En general los resultados obtenidos en el cultivo celular primario expresados en el cuadro I son satisfactorios, y observamos que el tiempo que requirieron los fibroblastos para multiplicarse en un 100% fué de 35 horas aproximadamente.

Además del crecimiento de fibroblastos observamos el desarrollo de células endoteliales, las cuales se apreciaron formando pequeñas agrupaciones.

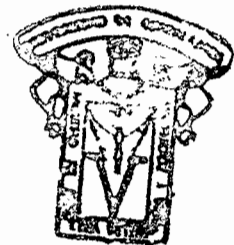
Los resultados observados en el intento de producir cultivos secundarios son expresados en el cuadro II.

En el subcultivo I de este cuadro, sólo se pudo obtener un pasaje, ya que las células no se multiplicaron y murieron.

En los cultivos II y III del mismo cuadro, pudimos observar buena formación de monostrato a las 36 horas, pero dichos cultivos sufrieron contaminación bacteriana (*Salmonella Spp.*)

En el cultivo IV, obtuvimos 3 pasajes y en el último, las células dejaron de multiplicarse y fallecieron.

En el Número V, realizamos 2 pases y las células murieron después del último pasaje.



OFICINA DE
ESTUDIOS CIENTÍFICOS

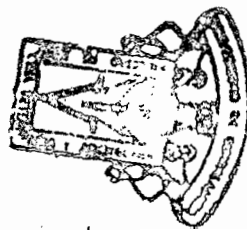
CUADRO # I

RESULTADOS DE CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS

No. DE CULTIVO	TIPO DE TEJIDO	CELULAS SEMBRADAS POR ML. DE MEDIO DE CULT.	MEDIO DE CULTIVO	HORAS FORMACION DE MONOESTRATO	CEL. COSECHADAS POR ML. DE MEDIO DE CULTIVO.
I	F.E.P.	200,000	B.H.K.21	36 HORAS	437,500
II	F.E.P.	200,500	B.H.K.21	36 HORAS	450,000
III	F.E.P.	265,000	B.H.K.21	30 HORAS	560,250
IV	F.E.P.	100,000	B.H.K.21	54 HORAS	358,000
V	F.E.P.	199,000	B.H.K.21	40 HORAS	386,666

F.E.P. = Fibroblastos de embrión de pollo.

OFICINA DE
GESTION CIENTIFICA



C U A D R O # I I

CULTIVOS SECUNDARIOS DE F.E.P. EN MEDIO DE CULTIVO B.H.K.21

No. CULTIVO	P A S E No.1			P A S E No.2			P A S E No.3		
	CL/S/ML/MC.	HRS.	CL/COS.	CL/S/ML/MC.	HRS.	CL/COS.	CL/S/ML/MC.	HRS.	CL/COS.
I	175,000	96	0						
II	180,000	36	0*						
III	225,000	36	0*						
IV	107,500	50	426,000	128,000	45	400,000	120,000	90	0
V	116,250	50	561,300	196,000	96	0			

* Contaminación por Salmonella Spp.

CL = Células.

ML = Mililitros.

S = Sembradas.

MC = Medio de cultivo.

COS = Cosechadas.

HRS = Horas de Incubación.

DISCUSION



OFICINA DE
FUSION CIENTIFICA

Este trabajo experimental fué posible en parte al atender las indicaciones del I.N.I.P.; Penso; Comming, Conningham; además de haber puesto especial énfasis en la asepsia.

La cantidad de células cosechadas estuvo regida por el número de células sembradas y el tiempo de incubación. Por ejemplo si comparamos el cultivo IV del Cuadro I con los demás cultivos del mismo cuadro, notaremos que el tiempo requerido para formarse el monoestrato fué mucho mayor, y esto porque la concentración de células por ml., de medio de cultivo fué mucho menor que en los otros cultivos, por lo que se está de acuerdo con el I.N.I.P. (1), que recomienda trabajar con una concentración de 300,000 células/ml., y Kalter, S, S. (9), quien observó que se puede obtener un buen monoestrato sembrando de 100,000 a 300,000 células por ml. de medio de cultivo.

Guyton dice que, el ciclo vital de una célula que no es inhibida en ninguna forma dura de 10 a 30 horas; desde el momento de la reproducción hasta la próxima reproducción (7); en éste trabajo se observó que aproximadamente cada 35 horas las células se multiplicaron en un 100% en el caso de los cultivos primarios.

Además del crecimiento de fibroblastos hubo desarrollo de células endoteliales, las cuales se observaron formando pequeños núcleos aislados. Swanson; describe que las células de un mismo tejido tienen la capacidad de reconocerse mutuamente cuando se hallan en suspensión en un medio líquido. (12)

En los cultivos II y III del cuadro II, obtuvimos una buena formación de monoestrato a las 36 horas de incubación, pero dichos cultivos

fueron dañados por una contaminación con *Salmonella Spp*, la cual fué trasm
tida por los embriones de pollo, ya que se utilizaron embriones de una incu
badora comercial de esta Ciudad y no embriones S.P.F., como recomienda el -
I.N.I.P. (1)

Utilizamos el sulfato de gentamicina en los cultivos IV y V,
para evitar las posibles contaminaciones con *Salmonella*, se empleo de la si
guiente manera: En el cultivo IV, los embriones se inocularon 24 horas an-
tes de ser utilizados con 100 microgramos de Sulfato de Gentamicina cada --
uno; en el cultivo V, se adicionó directamente al medio de cultivo en una -
proporción de 100 microgramos por ml. de medio de cultivo; éste último pro-
cedimiento fué más práctico e igual de efectivo.

En el uso de antibióticos en el cultivo de tejidos ha reduci
do el riesgo mayor de contaminación que confrontaban los primeros investiga
dores, empleados a niveles no tóxicos, nos brindan una protección bajo la --
cual se puede disminuir la contaminación bacteriana a proporciones conve---
nientes y no catastróficas. (3)

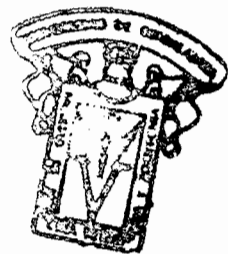
Sin embargo, Frank Fenner observó que los problemas de con--
taminación bacteriana no son mucho tiempo superables, y algunas células anti
males pueden ser cultivadas in-vitro, por lo menos por unas pocas generacio-
nes. (6)

En los cultivos IV y V del cuadro No II, se lograron realizar
3 pasajes en el IV y 2 en el cultivo V. Sin embargo, se apreció que el -
vigor de crecimiento celular, tendía a decrecer a partir del primer pase, lo
que concuerda con De Robertis, quien observó que cuando se cultivan células
normales, éstas no sobreviven durante mucho tiempo y al cabo de varios sub-
cultivos tienen a dejar de multiplicarse y mueren (5)

CONCLUSIONES

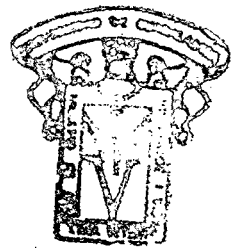
- 1.- La obtención de cultivos celulares a partir de embrión de pollo, se puede desarrollar favorablemente en Laboratorios (con fines de enseñanza).
- 2.- La técnica del cultivo de tejidos es relativamente fácil de realizar y tiene múltiples aplicaciones, tanto para propósitos de Investigación como de Enseñanza.
- 3.- La contaminación bacteriana es una limitante para la realización del cultivo celular.
- 4.- El sulfato de gentamicina empleado a la concentración de 100 microgramos por ml. de medio de cultivo, nos brindó buena protección contra Salmonella.
- 5.- La cantidad óptima de células sembradas para obtener un monoestrato en menor tiempo, es de 300,000 por ml. de medio de cultivo.
- 6.- La velocidad de crecimiento IN-VITRO de las células en los diferentes cultivos, nos ha dado la pauta a seguir para los futuros trabajos de investigación y docencia.
- 7.- Para obtener mejores resultados en la realización de futuros trabajos en esta área, sería conveniente contar con equipo más sofisticado, como lo es el Flujo Laminar (campana de esterilidad), Equipo desionizador de agua, Equipo de Filtración, Microscopio Invertido y Planta Eléctrica de emergencia.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.



OFICINA DE
ASUNTO CIENTIFICO

- 1.- Apuntes -Curso-Adiestramiento-Cultivo Celular.
Dpto. de Producción de Biológicos, I.N.I.P.
Palo Alto, D.F. (Enero 1979).
- 2.- BUSBY, H; Mac. DONALD; (1964)
Virological Techniques.
Little, Brown and Company-Boston. págs. 91-131.
- 3.- CUMMING, H. (1975)
Virología Práctica, Cultivo de Tejidos
El Manual Moderno, S.A. México. 91 Págs.
- 4.- CUNNINGHAM, C.H. (1973)
Virología Práctica.
Editorial Acribia Zaragoza. Págs. 27, 87-101
- 5.- DE ROBERTIS, SAEZ, DE ROBERTIS. (1978)
Biología Celular.
Novena Edición.
Editorial El Ateneo, Buenos Aires, Argentina. Págs. 8, 85-86.
- 6.- FENNER, F.F. (1976)
The Biology of Animal Viruses.
Second Edition.
Academic Press. Pág. 35
- 7.- GUYTON, C.A. (1977)
Tratado de Fisiología Médica.
Quinta Edición.
Interamericana, México. Pág. 36
- 8.- HSIUNG, G.D. (1964)
Diagnostic Virology.
New Haven and London, Yale University Press. Págs. 3-9.



OFICINA DE
DIFUSIÓN CIENTÍFICA

- 9.- KALTER, S.S. (1965).
Procedures for routine Laboratory diagnosis of Virus
and rikettsial diseases.
Second Edition.
Burgess Publishing Company. Págs. 33-38
- 10.- MORAG, C.T. (1975)
Notes on Medical Virology.
Fifth Edition.
Curchill Livingstone. Pág. 18
- 11.- PENSO-BALDUCCI (1963)
Tissue Cultures Biological Research.
Elsevier Publishing Company. Págs. 7-11, 65-67, 101-149.
- 12.- SWANSON, C.P. (1965)
La Célula.
Uteha-México. Pág. 24.



OFICINA DE
INSPECCIÓN CIENTÍFICA