

---

## COMPORTAMIENTO DE LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO I.—CINCO MODIFICACIONES A LA TECNICA CONVENCIONAL

---

MAURICIO BONILLA NUÑEZ,  
MA. TERESA BENÍTEZ  
RODRÍGUEZ Y JESÚS  
MANUEL LEÓN CÁZARES  
MAURICIO BONILLA NUÑEZ  
Facultad de Ciencias, U.N.A.M.  
MA. TERESA BENÍTEZ  
RODRÍGUEZ  
Facultad de Ciencias, U.N.A.M.  
JESÚS MANUEL LEÓN  
CÁZARES  
Laboratorio de Genética  
Animal,  
Instituto de Biología, U. N. A.  
M.

### INTRODUCCIÓN

Cuando se cultivan linfocitos humanos a partir de sangre periférica, con objeto de obtener figuras mitóticas para análisis de cromosomas, es un hecho que los factores intrínsecos que originan su división no son directamente controlables; sin embargo, existe una serie de factores constituidos por los componentes característicos del sistema artificial en que se cultivan, que sí son susceptibles de control, pudiéndose modificar tanto para juzgar el efecto de cada uno de los elementos, como para obtener una mayor eficiencia en la producción de figuras mitóticas analizables. Por otro lado, este sistema permite investigar aspectos importantes de la Fisiología Celular.

Tomando como Técnica Base la ideada por Moorhead *et al.* 1960 modificada por Edwards, 1961 y por Froland en 1962, en el presente trabajo se analiza el comportamiento de los linfocitos frente a las variaciones a que se somete el medio de cultivo, encontrándose diferencias cuali y cuantitativas que hacen pensar en la posibilidad de controlar los procesos de división celular *in vitro*.

### MATERIAL Y MÉTODO

Las variaciones que se experimentaron fueron en torno al dato técnico de Edwards y Froland, esto es, múltiplos crecientes y decrecientes de las cantidades de los componentes del medio y relaciones graduales también crecientes y decrecientes de los mismos. Así, se experimentaron modificaciones en cuanto al tipo de medio, cantidad de sangre, tiempo de acción de la colcemida, cantidad de estimulante y concentración de suero, obteniéndose los siguientes resultados:

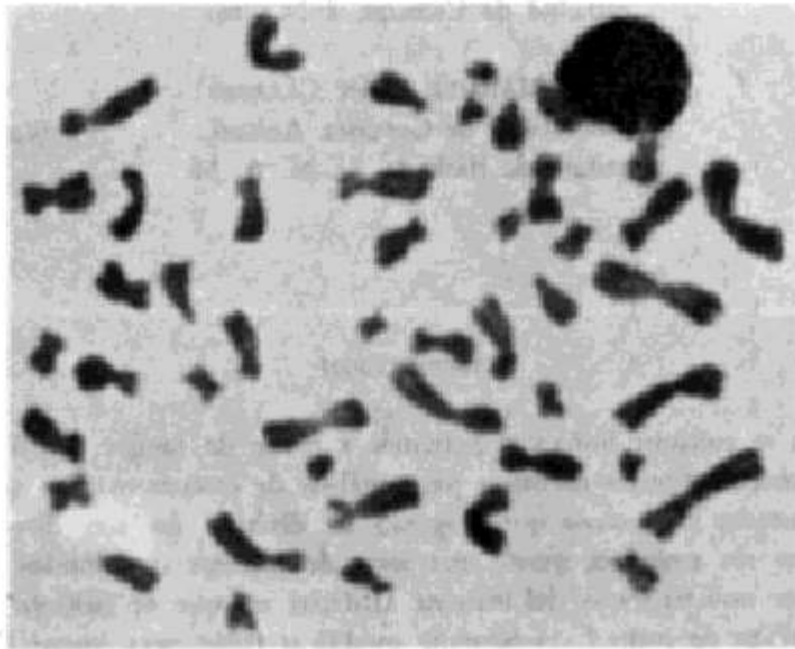


Fig. 1, Cromosomas obtenidos con medio Basal de Eagle.

## RESULTADOS

### Modificación I.—Tipo de Medio

En la Técnica Base, se recomienda el uso del medio nutritivo TC-199, por lo que se estimó conveniente probar el medio Basal de Eagle, que se diferencia del primero en el menor número de componentes que lo forman y en poseer antibióticos.

En el histograma de la Fig. 2, se puede apreciar la respuesta tan elevada que se produce con el medio Basal de Eagle en comparación con la dada por el TC-199. En ambos casos se utiliza a razón de cuatro mililitros por cultivo, manteniéndose constantes los demás factores de la Técnica Base.

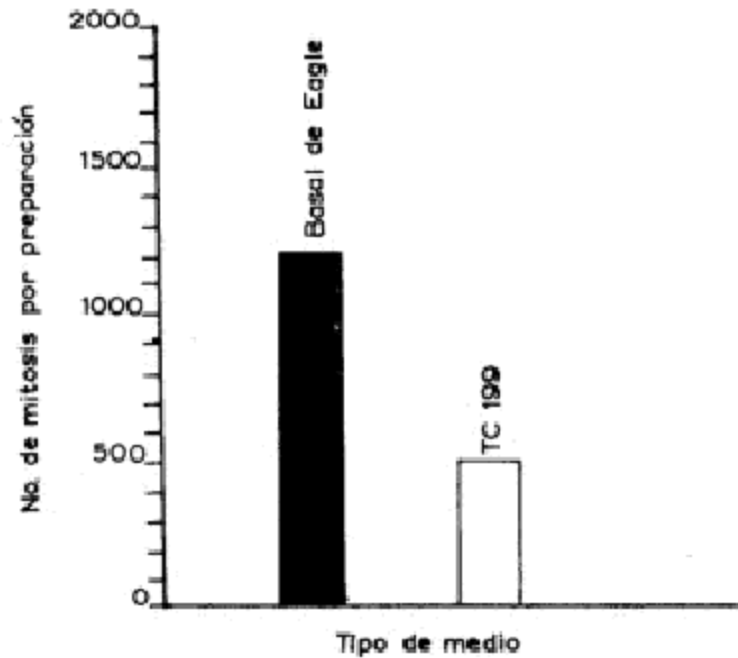


Fig. 2. Obsérvese la gran diferencia en el número de mitosis producidas por uno y otro tipo de medio nutritivo.

#### Modificación II.— Cantidad de sangre

El 0.5 ml de sangre por cultivo de la Técnica Base se varió en forma creciente y decreciente, probando con: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 ml por cultivo, sin llegar a los límites marcados por Ling, (1968) quien establece un límite mínimo y uno máximo en cuanto al número de células por cultivo.

En la Fig. 4 se ve la clara respuesta de aumento en el número de mitosis al incrementarse gradualmente la cantidad de sangre.

#### Modificación III.—Tiempo de Colcemida

De acuerdo con la Técnica Base, el tiempo de acción de la colcemida en el medio de cultivo antes de iniciarse la cosecha, es de 3 horas. Así pues, las modificaciones consistieron en cambiar este tiempo por 12, 24 Y 48 horas.

La Fig. 5 demuestra claramente el aumento de células en división que se obtienen al aumentar el tiempo de exposición.

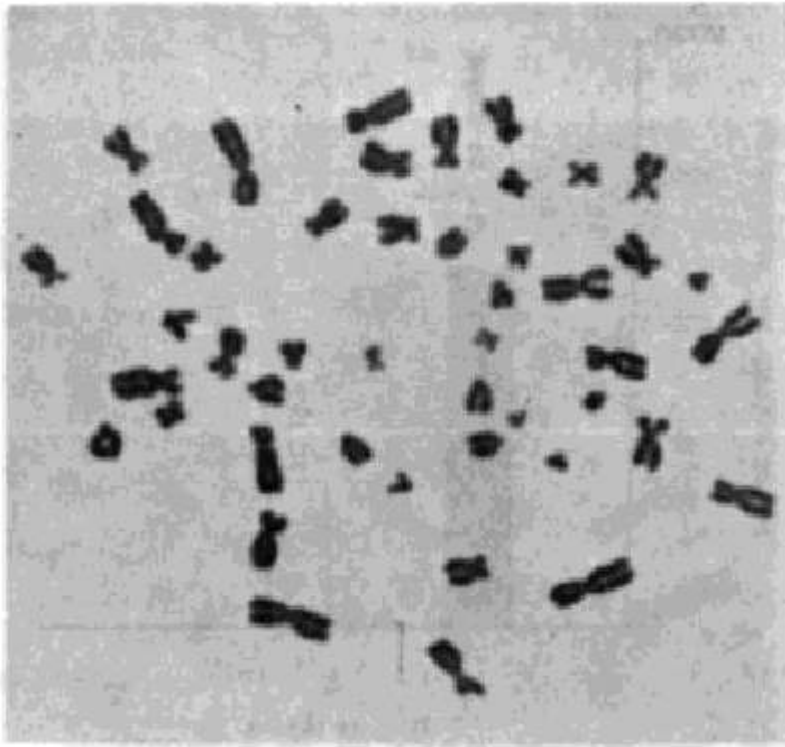


Fig. 3, Cromosomas obtenidos con 1.0 ml de sangre.

#### Modificación IV.—Cantidad de Fitohemaglutinina

Para observar el efecto de ese factor, se utilizaron como indicadores los medios nutritivos siguientes: Basal de Eagle y TC 199, obteniéndose como resultados respuestas totalmente inversas, ya que mientras el medio Basal de Eagle trabaja perfectamente con 0.1 ml de PHA por cultivo, proporcionando alrededor de 1,200 mitosis por preparación, el medio TC 199 en cambio, a esta misma dosis no da ninguna respuesta mitogénica. Las respuestas con el medio Basal de Eagle fueron disminuyendo al aumentar en forma gradual la cantidad de estimulante a 0.2, 0.3 y 0.4 ml por cultivo, al grado de producirse un gran coágulo a partir de los 0.3 ml por cultivo, impidiendo la evolución del mismo, lo que se observa en la Fig. 6.

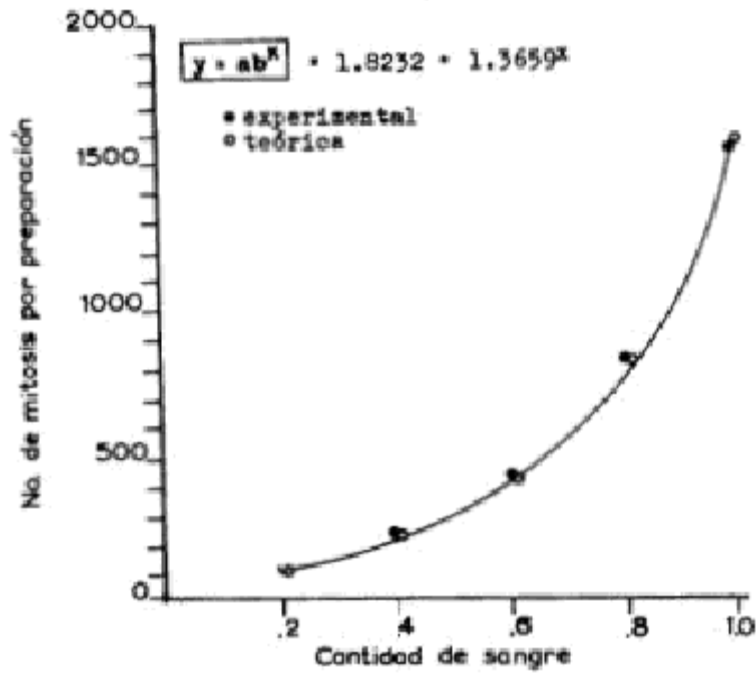


Fig. 4, Véase que el incremento en el número de mitosis depende de la cantidad de sangre que se utiliza.

En cambio, las respuestas fueron aumentando con el medio TC 199 al incrementar también la cantidad de estimulante, como lo muestra la Fig. 7.

#### Modificación V—Concentración de Suero

En la Técnica Base la concentración de suero es de 20%, esto es, 4 ml de medio nutritivo (TC 199) por 1.0 ml de suero liofilizado y rehidratado de ternera fetal forman un total de 5 ml, que constituyen el 100%. Las variaciones se realizaron sin perder la proporción inicial, efectuándose las siguientes pruebas:

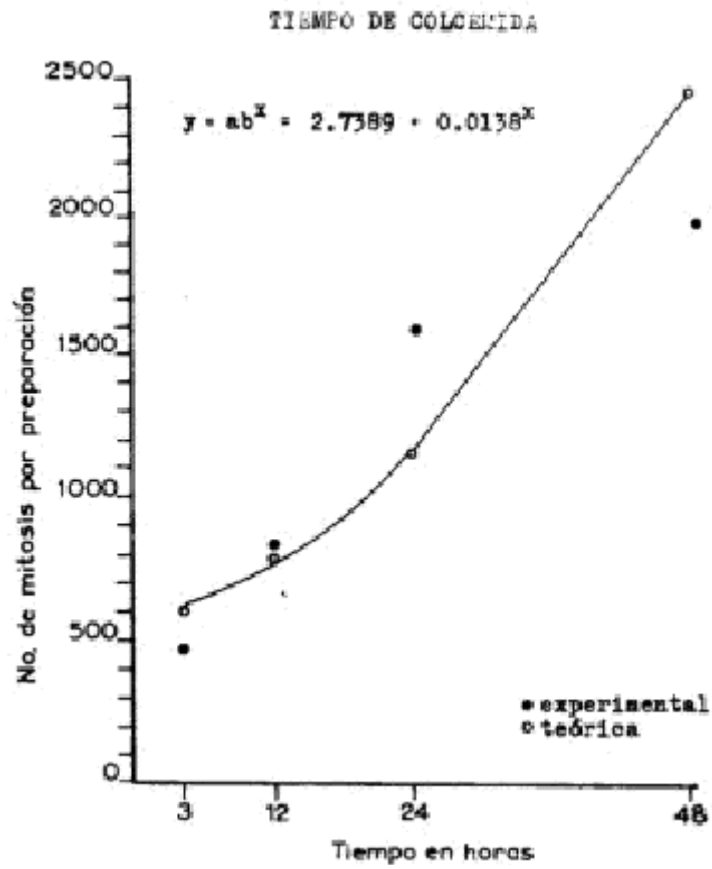


Fig. 5, Un mayor tiempo de acción de la colcemida produce la acumulación de más células en metafase. Entre las 24 y 48 horas ya se encuentran algunas endomitosis.

	Concentración		Proporción	
	Suero	Medio	Suero	
Técnica Base .....	15%	4.25 ml	0.75 ml	
	20%	4.00 ml	1.00 ml	
	30%	3.50 ml	1.50 ml	
	45%	2.75 ml	2.25 ml	

CANTIDAD DE PHA CON MEDIO DE EAGLE

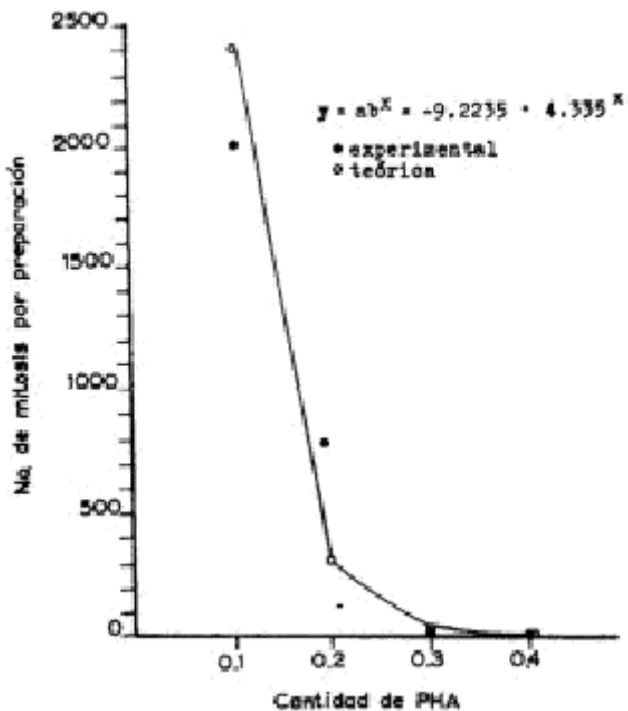


Fig. 6, Obsérvese la gran cantidad de mitosis que se obtienen con 0.1 ml de PHA por cultivo. El aumento a 0.2 ml por cultivo, produce coagulación, aunque la cantidad de mitosis es aun significativa. De 0.3 ml en adelante, la coagulación es máxima e impide la mitosis.

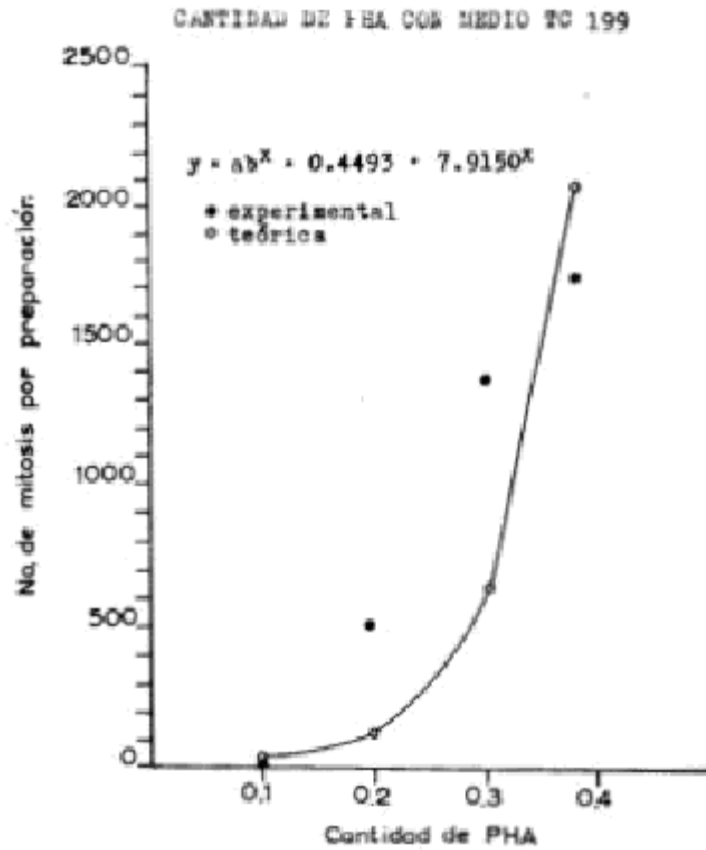


Fig. 7, Obsérvese la clara respuesta de los linfocitos al aumento en la cantidad de estimulante (PHA), traducido en el número de mitosis que se va obteniendo en cada incremento del mismo. En la curva teórica no se grafica la desviación por tener un valor muy pequeño.

Se obtuvo que a una concentración de 15%, el número de mitosis fue de 1,000 por preparación, lo que es bastante significativo si se compara con la Técnica Base que produjo 500 mitosis, y más aún con el de 30 y 45%, en los que no se observaron células en división (Fig. 8).



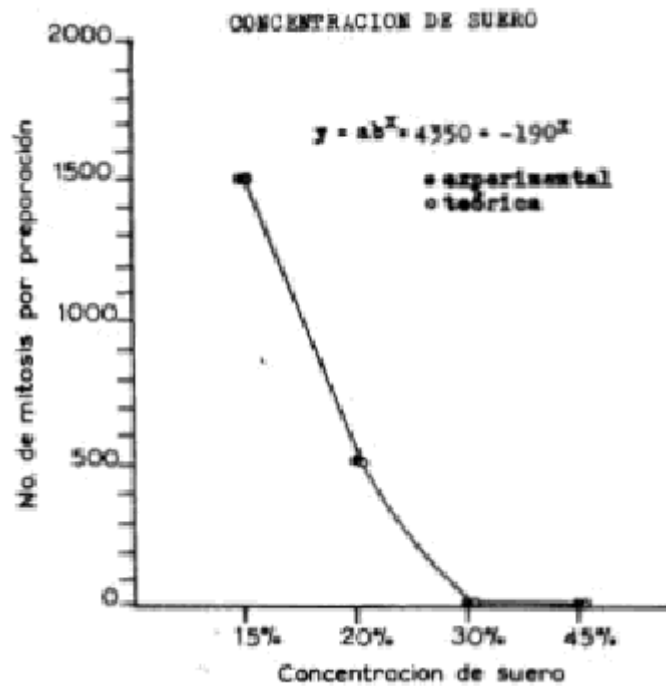


Fig. 8, Obsérvese la disminución del número de mitosis conforme va aumentando la concentración del suero. Experimento realizado con suero de ternera fetal, liofilizado y rehidratado.

#### DISCUSIÓN

No obstante las modificaciones a que se sometió la Técnica Base, los resultados indican que ésta tiene una gran maleabilidad y que las células en división responder a estas modificaciones tanto en términos de la cantidad de mitosis obtenidas, como en lo que a su calidad para análisis se refiere, pues no solamente se aumenta el número de células en división, sino que dada su calidad, el número de células analizables se incrementa. La siguiente tabla muestra los efectos producidos por cada una de las variantes:

Modificación Tipo	Control	Modificación (Cantidad)	Resultado <sup>1</sup>
I.—Tipo de medio.	TC 199	Basal de Eagle	1,200
II.—Cantidad de sangre.	0.5 ml	0.2 ml	180
		0.4 ml	221
		0.6 ml	424
		0.8 ml	814
		1.0 ml	1,504
III.—Tiempo de colcemida.	3 horas	12 horas	840
		24 horas	1,624
		48 horas	1,980
IV.—Cantidad de estimulante.	0.2 ml	0.4 ml (TC 199)	1,183
		0.1 ml (Eagle)	2,091
		0.75 ml (15%)	1,000

V.—Concentración de suero.	1.0 ml	1.50 ml (30%)	negativo
		2.75 ml (45%)	negativo

<sup>1</sup> Los resultados están expresados en números de mitosis por preparación, obtenidos a partir del promedio de 4 experimentos.

La modificación I demuestra que no es la cantidad de elementos que intervienen en un medio nutritivo factor limitante de la división celular, sino por el contrario, se obtienen mejores resultados con un medio que contiene un 50% menos de elementos constitutivos que el otro medio utilizado.

En la modificación II, los resultados indican que en las condiciones en que se llevaron a cabo los cultivos, a mayor cantidad de sangre se obtuvo una mayor cantidad de células en división.

En la modificación III, los resultados muestran que el tiempo óptimo de efecto de la colcemida se encuentra alrededor de las 24 horas, ya que al término de las 48 horas las células sometidas a esta sustancia muestran un comportamiento anormal al producirse endomitosis.

En la modificación IV, al aumentar la cantidad del estimulante empleado y comparar los resultados obtenidos con los dos medios utilizados, se demuestra que tal efecto es función de los componentes específicos de cada uno de los medios. Así, el TC 199 permite un incremento notable del volumen de estimulante, mientras que el medio de Eagle no requiere más que cantidades mínimas de este mismo elemento. El efecto comparado a que se ha hecho mención se muestra en las gráficas No. 6 y 7.

En el caso de la modificación V, se nota que la proporción empleada en la Técnica Base parece estar entre los límites del óptimo ya que las modificaciones introducidas que fueron más allá de esta proporción, no produjeron resultados, mientras que, cuando se probó una proporción menor (15%) los resultados obtenidos fueron satisfactorios.

## CONCLUSIONES

A continuación se hace la recopilación de las partes sobresalientes de las modificaciones propuestas y que en conjunto llamamos Técnica "A".

### TECNICA "A"

Factor	Tipo recomendado	Cantidad por cultivo
Medio nutritivo	Basal de Eagle	4.0 ml
Sangre	Periférica total	1.0 ml
Estimulante	Fitohemaglutinina-M	0.1 ml
Suero	Autólogo	0.75 ml (15%)
Mitostático	Colcemida	0.02 ml (24 horas).

Los factores no indicados (glutamina, antibióticos y heparina), se emplearon siguiendo la Técnica Base.

#### LITERATURA CITADA

- CASTAIRS, K. 1961. Transformation of the small lymphocytes in culture. *Lancet*, ii: 984.
- EDWARDS, J. H. and YOUNG, R. B. 1961. Chromosome analysis from small volume of blood. *Lancet*, i: 48-49.
- FROLND, A. 1962. A micromethod for chromosome analysis on peripheral blood cultures. *Lancet*, ii: 1281-1282.
- JOHNSON, G. J. and RUSSELL, P. S. 1965. Reaction of lymphocytes in culture to components of the medium. *Nature* 208: 343-345.
- LING, N. R. 1968. *Lymphocyte Stimulation*. John Wiley and Sons. Inc. New York. 290 pp.
- MOORHEAD, S. B. et al. 1960. Chromosome Preparation of leukocytes cultured from human peripheal blood. *Exptl. Cell Res.* 20:613-616.
- SHARMA, A. K. and SHARMA A. 1965. *Chromosome Techniques. Theory and Practice*. Butterworths, London. 474 pp.
- TJIO, J. H. and LEVAN, A. 1956. The chromosome number in man. *Hereditas*.42: 1.