

TECNICA PARA LAS CULTURAS DE TEJIDOS, SEGUIDA POR EL PROFESOR BORREL, DE ESTRASBURGO

Comentarios a un curso seguido en el Instituto Pasteur de dicha ciudad

por el doctor

A. FERRER CAGIGAL

Catedrático de la Facultad de Medicina de Barcelona

El gran Profesor, emplea para sus culturas una técnica muy parecida a la que realiza para las culturas de bacterias:

1.º Ante todo, utiliza unos frascos, cuya característica es presentar una cavidad análoga a una placa de Petri, con un largo cuello; su forma es aplanada de contorno circular y paredes muy planas y delgadas, una



Adeno Carcinoma

de ellas es movable y se adhiere mediante albúmina de huevo a los bordes, la otra es fija, y su diámetro, variable, oscila entre 4 y 12 centímetros.

Estos frascos se esterilizan al autoclave o en estufa seca y después se les adhiere la laminilla circular a su abertura con albúmina de huevo (para que sea fácil el desprenderla), que se deja secar y se refuerza con la cre o bien con parafina o bálsamo del Canadá.

2.º El tejido a cultivar, es cortado muy finamente en fragmentos de 1 ó 2 milímetros, para lo cual basta

(1) *Preparación del líquido de Tyrode*: los componentes del líquido de Tyrode están repartidos en dos recipientes: una redoma de Roux y una redoma de 150 a 200 cm. c.

Redoma de Roux
Carbonato sódico seco 1'26 gr.
Agua destilada c. s. p. 900 cm. c.
Filtrar, esterilizar en el autoclave; añadir en cada frasco, con una pipeta estéril, 4'55 cm. c. de ClH titulado al 10 p. 100.

Redoma pequeña
Cloruro sódico 8 gr.
Glucosa 1 gr.
Solución B 10 cm. c.
Agua destilada c. s. p. 100 c. c.
Filtrada y esterilizada en el autoclave.

Al usarlas, regular el contenido de la redoma pequeña con el de la redoma de Roux. La solución B, en una solución mineral concentrada que contiene en 100 cm. c. de agua destilada: ClK, 20 gr.; Cl₂Ca, 20 gr.; Cl₂Mg, 10 gr.; Po₄H Ca, 5 gr. La solución debe esterilizarse al autoclave.

realizar estos cortes con unas tijeras finas o bien con bisturí y unas pinzas (las ayudantas del Profesor BORREL así lo realizan con gran facilidad y pericia, pues todos los fragmentos vienen a tener estas dimensiones).

Estos fragmentos o papilla, se depositan en un tubo de ensayo, que contenga líquido Tyrode (1), se agita varias veces y se deja decantar, lo que se realiza pronto tirando el exceso, hasta la obtención de fragmentos que estén en un líquido completamente transparente.

3.º El *jugo embrionario*, se prepara triturando embriones jóvenes (de 7 a 8 días) de pollo, en un tubo grueso, de paredes resistentes, de cristal, que contenga perlas de vidrio de unos 4 milímetros de diámetro. Basta agitar fuertemente para obtener su fragmentación y licuación, en seguida se le asocia líquido Tyrode (20 c. c. por 1 gramo de embrión), se emulsiona durante una media hora, agitando suavemente y se centrifuga para separar todos los fragmentos o células embrionarias. El líquido claro que resulta es el llamado *jugo embrionario*.

Según el Profesor BORREL, éste es uno de los tiempos más importantes de la cultura de tejidos, tras la dilución y centrifugación que deben durar una media hora a 6.000 vueltas, pueden aún quedar restos celulares; si tal ocurre, es preciso recurrir al empleo de una bujía muy porosa y utilizar mayor cantidad de jugo embrionario en las culturas.

Los fragmentos a cultivar, después de la decantación en el líquido Tyrode, son depositados en el jugo embrionario.

El plasma es obtenido directamente de la gallina, por introducción de una cánula parafinada en la carótida, recogida la sangre en tubos se someten a centrifugación, recogiendo el plasma mediante pipetas de ampolla para distribuirlo inmediatamente.

Veamos ahora el modo de realizar la cultura:

Se introduce en el frasco de cultura o placa de Petri un centímetro cúbico o dos de jugo embrionario, que contiene los fragmentos de tejido en suspensión (por regla general cada c. c. 20 ó 30 fragmentos). Es preciso emplear 1, 2 ó 3 c. c., según la capacidad del frasco de cultura.

Se añade el plasma necesario para que por coagulación forme una película en la superficie de la cara inferior del frasco, que englobe y fije en el sitio a los fragmentos de tejidos, generalmente de 5 a 10 gotas, hasta 2 c. c.; 7 para los frascos de 12 c. de diámetro.

Durante el tiempo que el plasma tarda en coagularse, los fragmentos se decantan, en contacto con la superficie del vidrio.

Una vez obtenida la coagulación se llevan a la estufa, previo su tapado con algodón flameado y un capuchón de caucho.

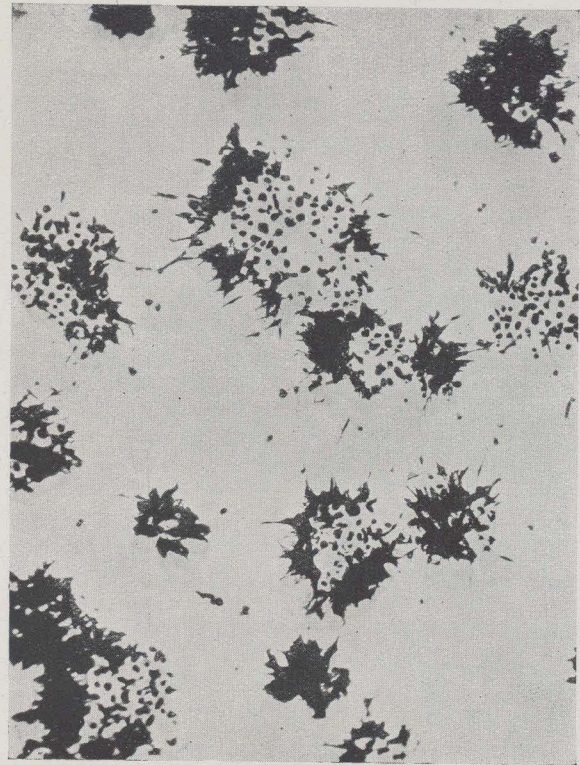
La estufa se sostiene a 38° y a las 6.^a y 7.^a hora comienzan a proliferar los elementos celulares.

Después de 24 horas conviene introducir en los frascos unas gotas de jugo embrionario con Tyrode (la misma mezcla que habíamos realizado), al objeto de que por desecación no se adhiera demasiado al cristal la película de plasma que engloba las colonias.

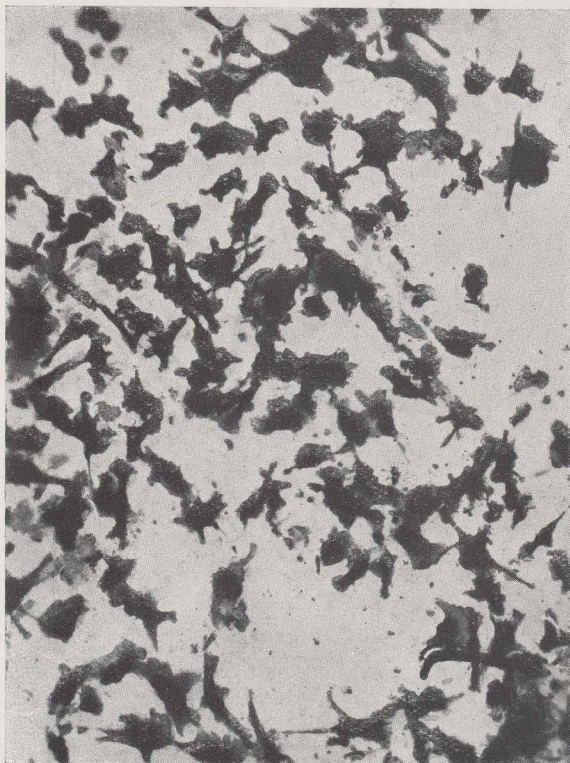
Las culturas se observan macroscópicamente con gran vigor, viendo surgir de los bordes una serie de radiaciones que avanzan progresivamente y que amenazan unirse con las próximas, cubriendo toda la superficie y espesor del terreno. Cada fragmento es un epicentro de radiación, y si son muchos, pronto formarán un todo unido.

LEWIS señaló la necesidad de la existencia de pocos fragmentos, para que no se produzca la asfixia de muchos y el aniquilamiento o esquilmamiento de la colonia. Asimismo conviene la pequeñez, ya aconsejada, de cada fragmento al objeto de que no se asfixie el cen-

Para hacer preparaciones histo-citológicas, se puede utilizar la parte superior de la película gelatinosa o bien la inferior, siendo más apta para histología la superior y para citología la inferior.



Sarcoma de Roux



Sarcoma de Giemsa

tro del mismo; se pueden conservar los cultivos entre 24 horas a 15 días, si se renueva convenientemente el líquido del frasco.

* * *

Se pueden seguir dos sistemas para obtener buenos preparados: Desprender la película y realizar con ella todas las operaciones de fijación, coloración, aclaramiento, etc., como si se tratase de una membrana orgánica cualquiera, o bien utilizar la laminilla de cristal (pared del frasco), previo desprendimiento del laere, cosa muy sencilla de realizar y colorearla como si se tratase de una extensión bacteriana en porta o cubre.

Se suele utilizar como fijador el ácido ósmico o el formol, y como colorante, cualquiera de los métodos de coloración utilizados en Citología o Bacteriología.

* * *

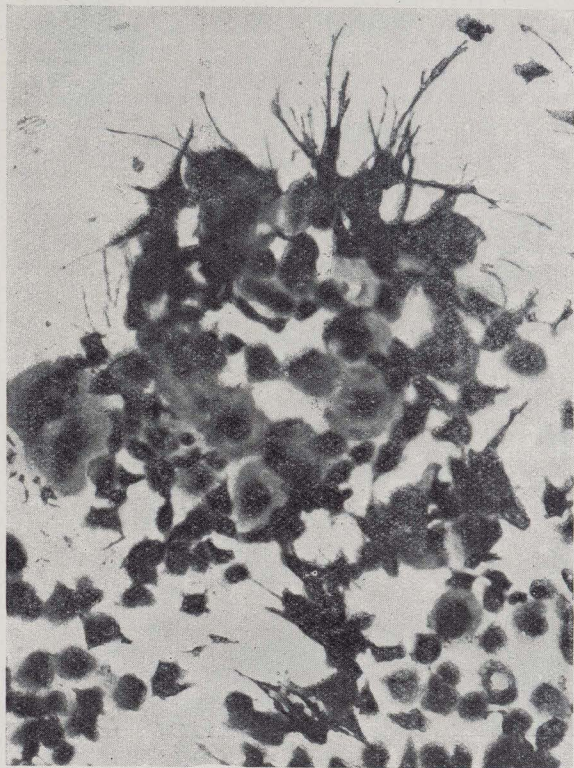
Por este sencillo método estudia el Profesor BORREL el sarcoma de Roux y los tumores cancerosos en general, así como los tejidos embrionarios y las estructuras mitocondriales más delicadas.

En los fragmentos de fibras cardíacas se pueden observar contracciones hasta después de una semana, así como en los fragmentos de intestino movimientos peristálticos.

Las células nerviosas y sus terminaciones dan excelentes observaciones.

Las colonias pueden renovarse añadiendo nuevo plasma y pueden durar mucho tiempo.

Dice BORREL que, una de las posibles aplicaciones más prácticas de estos métodos sería la posibilidad de hacer actuar sobre las colonias métodos de coloración con mordientes, análogos a los utilizados para la demostración de los cilios bacterianos y para el estudio



Sarcoma de Roux

de los gérmenes invisibles. En 1904, presentó el Profesor BORREL a la Sociedad de Biología, la coloración de cilios bacterianos, al *Tanato de hierro*, y posteriormente fué por él aplicada al estudio del *molluscum contagiosum* y del *epitelioma contagioso*, determinando la coloración de partículas cromoidales, coloreables por este sólo método y que parecían ser agentes virulentos.

Dice el mismo Profesor, "la célula del *epitelioma contagioso* de los pájaros y la célula del *molluscum contagiosum* humano, deberán ser consideradas como una *célula simbiótica hipertrofiada*, conteniendo microbios innumerables".

"El tumor de las nudosidades de las leguminosas nos da un ejemplo de simbiosis, una célula hipertrófica, que contiene millones de gérmenes, pero que no son visibles por los métodos ordinarios, ni cultivables."

"Nosotros empleamos este método de la sobre-coloración con mordientes para el germen de la peripneumonía, que no se colorea por los procedimientos usuales."

"La dificultad del método estriba, en que se colorean todos los granos que acompañan a las células o gérmenes, es decir, la falta de selección."

Para el estudio de la vacuna se recurre a inoculación por varias escarificaciones en la córnea del ojo del conejo, a las 24 horas comienza el proceso y a las

48 las pústulas están constituidas y pueden verse macroscópicamente. Entonces se extirpa ampliamente y se conserva en atmósfera húmeda en una caja de Petri durante 2, 4 ó 6 horas a 37°.

Al momento de extirparlo se aplica una lámina según el método de EAWING, se obtienen preparaciones fragmentarias, trozos de epitelio y gotas de plasma, pero al cabo de 2 a 4 horas de estufa y siguiendo el mismo método se pueden obtener láminas enteras de descamación corneal, adherentes a la lámina como una calcomanía. Seguramente se produjo una proteólisis de los elementos intercelulares.

Hasta 10 preparaciones sucesivas pueden hacerse y en las primeras por el proceder de GIEMSA obtenerse muy bellas preparaciones; en cambio en las últimas, se obtienen muy buenas; observándose multitud de granos que no se ven con ningún otro procedimiento.

También se empleó este procedimiento al estudio del cáncer, obteniendo buenas preparaciones a base de conseguir células en capa uniforme y sin serosidad, así fué empleado en el estudio del sarcoma de ROUX y el de GENSEN, de las ratas.

El sarcoma de PEYTON ROUX, presenta una particularidad, caracterizada por la presencia de una sustancia viscosa, en la cual son las células como los núcleos de la masa principal.



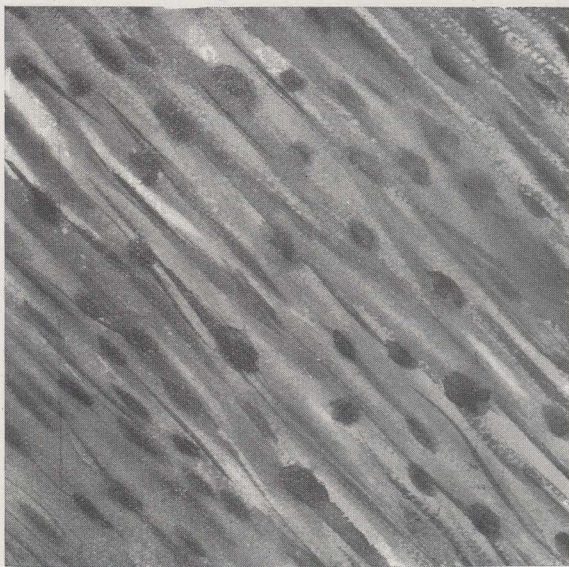
Sarcoma de Roux

Todo el frotis de tumor fresco fijado y coloreado, por MAY GRÜNWARDL y GIEMSA, muestran esta sustancia eosinófila muy abundante alrededor de las células y en el interior de las mismas. Los grandes mononucleares muestran también grandes masas de ella. Esta misma

substancia se obtiene bajo la forma de granulaciones en cultivos de 2 a 6 días a la par que existen otras granulaciones perinucleares de naturaleza lipoidea. Muy visibles en las gigantes células polinucleares que suelen formarse en el centro de la colonia.

Con la fijación con líquido de FLEMING fuerte (sin ácido acético y con cloruro de platino) y coloreándolas por la tionina se obtienen excelentes preparaciones en especial en el sarcoma de ROUX, en las que pueden estudiarse dos tipos celulares, tal como las describía BORREL: los macrófagos de tipo esférico y fibroblastos fusiformes o estrellados. Ambas células tienen unas dimensiones mucho mayores que las normales, y en el centro de las colonias se encuentran enormes macrófagos que contienen cientos de núcleos, de 50 a 600 micras de diámetro y con abundantísimo armazón mitocondrial. En el interior del protoplasma de los macrófagos, se encuentran granulaciones de grasa, finas y gruesas.

La sobrecoloración por fijación por MAY GRÜNWARD, lavado, tanato de hierro, lavado; fuchina fenicada en caliente, o bien rápida fijación en sublimado-alcohol y sobrecoloración consecutiva, se puede apreciar que la substancia eosinófila que pasa desapereibida por los métodos corrientes, tiene existencia muy marcada en los fibroblastos y macrófagos gigantes, bajo la forma de granos pequeñísimos tales como se observan en la vacuna y en el molluscum contagiosum. Dice el prof. BORREL, que no afirma sean tales granulaciones un virus vivo, pues puede tratarse de una secreción celular eosinófila y específica, pero que nunca se encuentran en las células embrionarias normales.

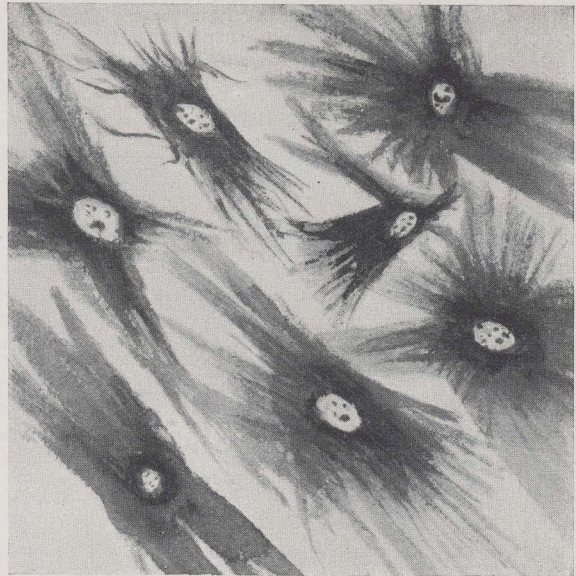


Cultivo de tejido muscular liso

Estima el sabio bacteriólogo, que si bien no puede aceptarse hoy un virus que explique el cáncer, tampoco puede admitirse la herencia ni el movimiento anárquico y bacteriofágico de célula a célula.

El estima que el cáncer es de una causa externa y no

hereditaria: la prueba los cánceres parasitarios de los animales descritos por él: a saber, el cáncer del hígado de la rata, por el cisticercio de la tenia crasicola y el cáncer de estómago de la rata y del ratón por la filaria; el cáncer del alquitrán y tantos otros que se producen en terrenos preparados por parásitos, nevus, cicatrices, quemaduras, sífilis, rayos X. Nuestro Profesor es partidario de que todas esas causas precancerosas, interesan un sistema celular especial que él designa con el nombre de trofopigmentario, y que el Profesor ASCHOFF, de Friburgo, con el de retículo-endotelial. Este



Células de sarcoma de Roux procedentes de un cultivo

sistema se modificaría por aquellos agentes en edades tempranas de la vida.

El Prof. BORREL aduce como demostrativo de esta hipótesis, el caso del estudiante VACLou, inoculado en minúscula lesión que no tardó en generalizarse.

Nosotros hemos seguido la técnica del Prof. de Estrasburgo y hemos obtenido excelentes colonias de tejidos por este sencillo método, desprovisto del gran aparato que el Prof. BORREL y EBELING, exigían con sus métodos de cultura.

Merced a estos métodos se pudieron deducir grandes hechos biológicos, a saber: la posibilidad de obtener en una colonia de linfocitos, células análogas, fibroblastos y células de caracteres epiteliales. Aseveran estos hechos las experiencias de POLICARD y de DUBREULH; es decir, no sólo el tejido conjuntivo se somete a las leyes de metaplasia, sino que el epitelial puede ser originado por el conjuntivo.

Las sustancias *estimuladoras* del crecimiento y multiplicación de células se llamarían trofonas y serían producto de la secreción celular. Dichas sustancias se estiman de secreción leucocitaria y serían termolábiles, destruyéndose a 65° o por desecación. Existirían otras sustancias que son termoestables y actuarían de *inhibidoras* del crecimiento. Con la edad del sujeto las primeras disminuyen, las segundas aumentan. Los cam-

bios que según la edad presentan los sueros en sus preparaciones proteínicas, serían debidos a la mayor o menor abundancia de estas substancias y a igual solución el suero de un animal viejo sería más *inhibidor*, ante una cultura de tejidos.

De este modo, el tejido, bañado o el estroma afecto de senectud tendría reducido al *mínimum* su actividad de crecimiento. CARREL lo designa con el nombre de *índice de crecimiento*, de un suero controlando el crecimiento de una cultura de fibroblastos en el suero a estudiar y en el líquido de Tyrode como testigo. Aumentando proporcionalmente el poder inhibitor del primer mes al catorce año, el valor *varía de 1 a 0*.

Por estos procedimientos se obtuvieron culturas, no ya solo de leucocitos, fibroblastos y tejido epitelial sino de cartílagos y glándulas de secreción interna en especial tiroides. FISHER obtuvo en 1921 una cultura de epitelio del iris que duró en constante renovación un año. Luego la reprodujo EBELING con mucha mayor duración. A base de que sea solo epitelio, pues si existen fibroblastos invaden la colonia y desaparecen los elementos epiteliales por lisis, tal ocurre en los cultivos de piel, en que el tejido conjuntivo del dermis invade el epitelio y los destruye por disolución. Las culturas de fibroblastos obtenidos por la escuela americana han podido ser sostenidas durante 12 años. El hecho de obtener *culturas tiroideas*, hace pensar la derivación industrial del método para obtener productos endocrinos, de elaboración *natural artificial*.

Existen una serie muy interesante de experiencias realizadas por FISHER, que consisten en cultivos de sistemas de tejidos, es decir de órganos a saber: trozos de corazón de pollo, secciones circulares de intestino, se siembran determinando un crecimiento global en el que predomina el crecimiento fibroblástico o epitelial, perdiendo la forma originaria, convirtiéndose en una masa pulsátil. En el mismo Instituto Rockefeller de Copenhague, pudo determinar el mismo Profesor, la dificultad de obtener culturas puras de una especie celular, es más fácil obtener una masa tisular que las células en zógleas o masas. Sin embargo, las experiencias de CARREL y las de BORREL demostraron que pueden obtenerse culturas puras de fibroblastos, de células epiteliales y de leucocitos, conservándose puras mucho tiem-

po. También FISHER trató de controlar el modo de comportarse las culturas ante la presencia de antígenos diversos, es decir, probar la reacción biológica de defensa, *ante albúminas heterólogas*. Y parece que sus observaciones fueron concluyentes, las culturas tratadas reiteradamente por un suero de otro animal resistían más a su poder *lísico*, que otras culturas testigos no tratadas.

Con estas experiencias coinciden los datos encontrados por CARREL al aumentar el poder *formador* o *trófico*, por la mezcla de caseína, al terreno de cultura.

En presencia de gérmenes específicos como el bacilo de Koch los tejidos cultivados reaccionan, determinando la producción de células gigantes multinucleadas (experiencias de SMITH). En general puede decirse que los tejidos muy separados del tipo originario, por elevación de categoría histológica: el muscular y el nervioso, tienden por el cultivo a sufrir a una desdiferenciación volviendo al tipo embrionario y coincide con este *salto atrás*, la aparición de movimientos fagocíticos y la forma esférica. Se dice en tesis general que tienden a *monocitarse*, a constituir el tipo *histiocítico* o célula indiferenciada que es el más corriente como tipo estable de tejido cultivado.

Podríamos seguir extractando opiniones y deducciones muy interesantes de los trabajos de: CHAMPI, ROUX, CARREL, BORREL, LEO, LOEB, GOLDSCHMIDT, FAURE-FREMIET, POLICARD, HERELLE, C. BOHN, CARLETON, COUTIERE, A. H. DREVO, pero nos saldríamos de los límites que queríamos dar a este artículo, que no tiene otra finalidad que la divulgación de un método práctico y asequible a todo biólogo o histólogo que le interese el asunto, de estudios generales cito-histológicos, para los cuales constituye un método excelente, para poderse apreciar células vivas de dimensiones considerables y con detalles de fina estructura nuclear y mitocondrial de extraordinario interés. Morfología celular, métodos de coloración, multiplicación, en una palabra un excelente método experimental en biología y con aplicación aclaratoria de la etio-patogenia del cáncer y los tumores malignos, así como derivaciones de índole terapéutica y patogenética, que es posible descubran en un porvenir no lejano, las grandes incógnitas que rodean a las neoplasias malignas.