



A  
N  
U  
A  
R  
I  
O

1971-1973

INSTITUTO BOLIVIANO  
DE  
BIOLOGIA DE ALTURA

UNIVERSIDAD MAYOR  
DE SAN ANDRES.

MINISTERIO DE PREVISION  
SOCIAL Y SALUD PUBLICA.

COOPERACION TECNICA  
DE FRANCIA.

LA PAZ - BOLIVIA

# Modificaciones de las condiciones del cultivo celular en la altura

L. Malaspina, J. C. Quillici y J. Ergueta Collao  
(Instituto Boliviano de Biología de la Altura)

Durante los últimos meses del año 1968, hemos realizado cultivos de leucocitos en habitantes de las grandes alturas, con ocasión de realizar una encuesta sobre el cariotipo de los Amerindios Aymara y Quechua, quienes habitan en el altiplano boliviano-peruano. Estos trabajos fueron realizados en el Instituto Boliviano de Biología de Altura (La Paz) y en el Hospital Núñez Butrón de Puno (Perú). Al comienzo utilizamos la microtécnica clásica que aplicamos rutinariamente en los laboratorios del Centro de Hemotipología del C.N.R.S. (Toulouse) (1).

En el curso del trabajo, no tuvimos buenos resultados, hecho que determinó la revisión de los diferentes parámetros con objeto de adaptar esta microtécnica a las condiciones ecológicas particulares en las que se desarrollaba esta encuesta.

**MATERIAL Y METODO.**— La técnica clásica de cultivo de leucocitos, se realiza poniendo unas doce gotas de sangre humana total dentro de un medio nutritivo al que se adiciona fitohemaglutinina. Los tubos de cultivo son incubados durante 72 horas a 37° C. Al cabo de este tiempo se efectúa un bloqueo de las mitosis, utilizando colchicina; luego se procede a realizar un choque hipotónico con objeto de obtener una buena dispersión de los cromosomas; posteriormente se fija la preparación usando Carnoy acético.

Las preparaciones así obtenidas generalmente permiten observar un número de 50 a 100 mitosis en período de pseudometafase por cada lámina revisada.

Al efectuar nuestro trabajo en el Instituto Boliviano de Biología de Altura en La Paz, así como en el Laboratorio de Citogenética de Puno, luego de haber obtenido unos sesenta preparados, obtuvimos resultados bastante pobres, pues solamente observamos una o dos mitosis por cada lámina. Con estos resultados deficientes, decidimos prolongar el tiempo de incubación de los cultivos aumentando 24 horas. Con esta modificación de la técnica clásica logramos obtener mitosis mucho más numerosas.

Luego, tratamos la posibilidad todavía de mejorar la técnica variando algunos detalles; de esa manera reglamos el método siguiente:

**TECNICA.**— Añadir 15 gotas de sangre venosa o arterial a un medio de cultivo que contenga 15 ml. de TC199 (Instituto Pasteur), antibióticos, y 5ml de suero humano O Rh positivo, o suero bovino, 4 gotas de Fitohemaglutinina, 3 gotas de Fitohema glutinina P, 4 gotas de Liquemine Roche, siempre que se siga la técnica habitual, anotamos que el suero AB ha sido reemplazado por el suero O Rh positivo, como también puede ser reemplazado por el suero bovino mencionado. Las frecuencias muy relativas del grupo ABO en los aymaras del altiplano, no permiten prácticamente disponer de suero AB.

Los cultivos dan muy buenos resultados con el suero O, los anticuerpos anti-A y anti-B no parecen frenar en nada el progreso celular (anotamos además que, la casi totalidad de los sujetos examinados pertenecían al grupo O).

Los tubos de cultivo son puestos en una estufa a 37°C durante 96 horas (en lugar de 72 horas). Estos tubos son agitados durante dos veces al día. Posteriormente, transcurrido ese tiempo se añade en cada tubo de cultivo 2.5 ml. de una solución de colchicina al 0.04% y se vuelven a colocar tubos en la estufa durante 1 hora 30 minutos. Al cabo de este tiempo se efectúa el choque hipotónico, para ello después de una centrifugación se añade al sedimento celular 15 a 20 ml. de una solución hipotónica que puede ser una solución de citrato de sodio al 0.95% o de suero bovino diluido al 1/7 en agua destilada. Las células son puestas en suspensión y colocadas a 37°C durante 10 minutos.

A continuación, la preparación se continúa de acuerdo a la técnica clásica: fijación en Carnoy, exposición a la llama, hidrólisis mediante ácido clorhídrico diluido calentado a 60°C y finalmente la coloración con Giemsa.

**RESULTADOS.**— Cada cultivo bloqueado por la colchicina luego de 96 horas de incubación a 37°C, dió un elevado número de mitosis, suficientes para hacer un estudio preciso del cariotipo de un sujeto dado.



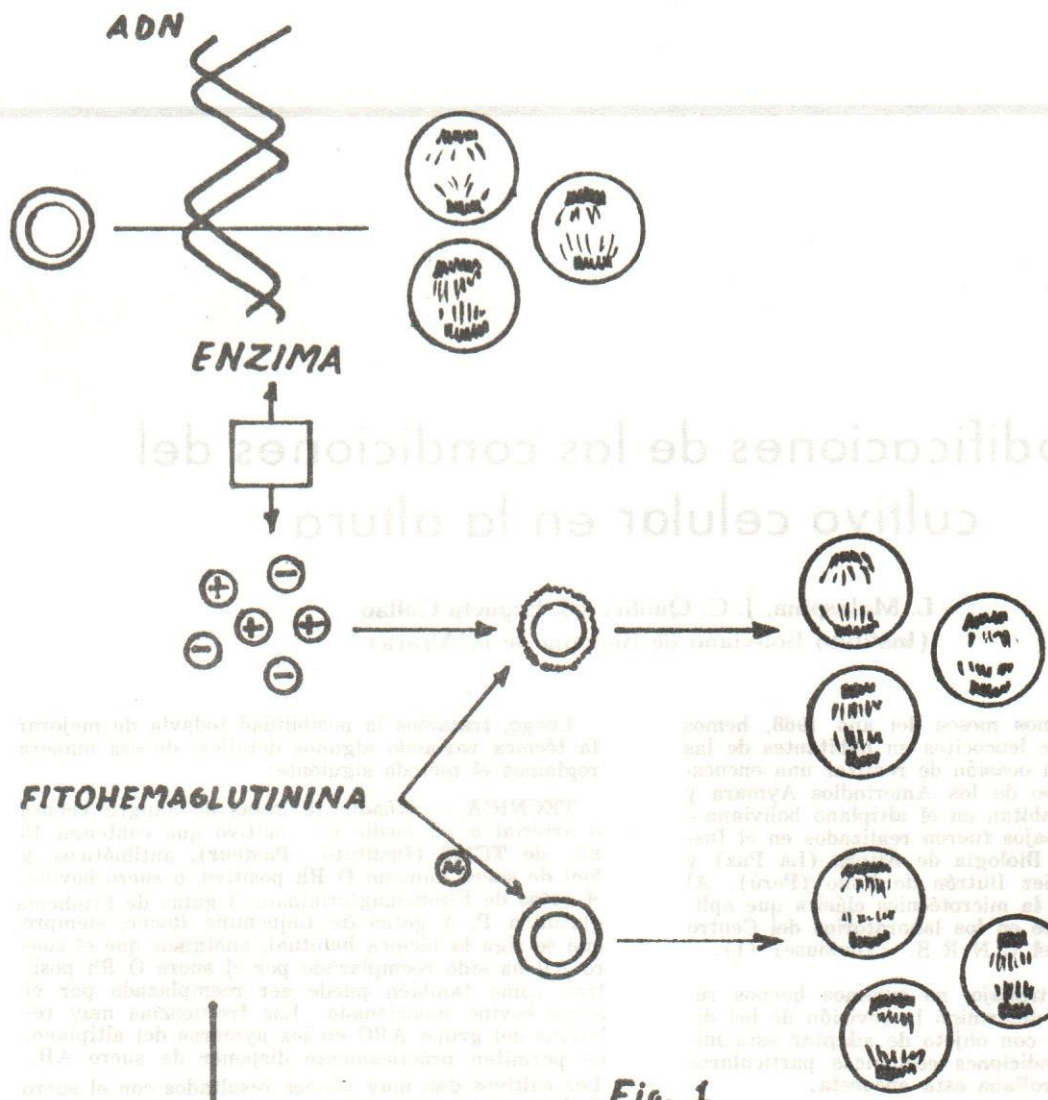


Fig. 1

**FICOHEMAGLUTININA**

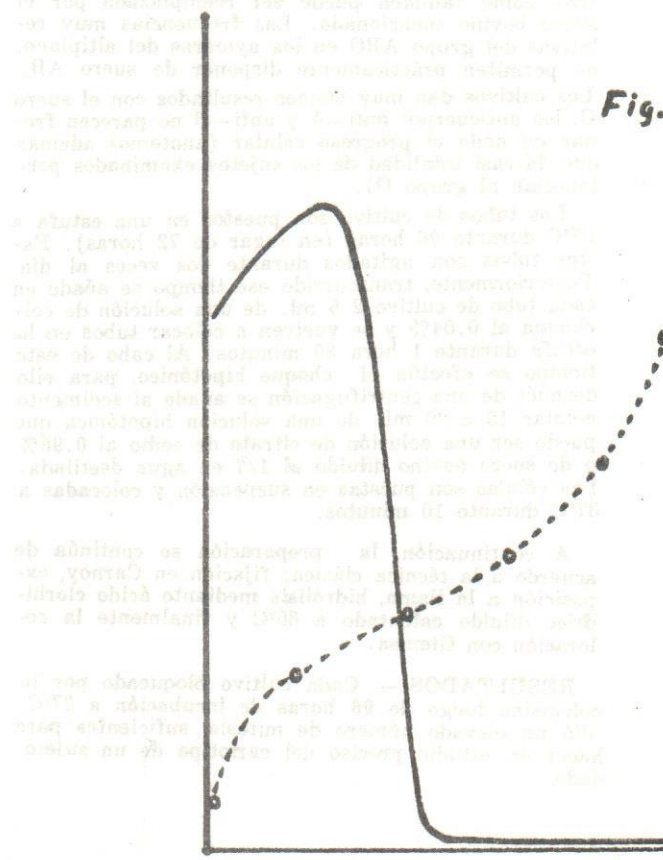


Fig. 2

En el curso de las investigaciones realizadas en el laboratorio de Biología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Tucumán, se ha observado que la Ficohemaglutinina (FHA) actúa como un inhibidor de la división celular en células de mamífero y de plantas superiores. Este efecto se manifiesta al aplicar la FHA a cultivos de células en fase de crecimiento activo, lo que resulta en un arresto de la división celular y, por consiguiente, en una disminución del número de células. Este efecto se ha observado tanto en células de mamífero como en células de plantas superiores, lo que sugiere que la FHA actúa como un inhibidor general de la división celular. El mecanismo de acción de la FHA se ha estudiado en detalle y se ha observado que actúa sobre la enzima que cataliza la síntesis de DNA, lo que impide la replicación del material genético y, por lo tanto, la división celular. Este efecto se ha observado tanto en células de mamífero como en células de plantas superiores, lo que sugiere que la FHA actúa como un inhibidor general de la división celular.

**MATERIAL Y MÉTODO** — La técnica clásica de cultivo de tejidos se realizó durante un período de seis meses en el laboratorio de Biología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Tucumán. Los cultivos se realizaron en medio de cultivo de Ham's F-10 en presencia de suero de caballo fetal (FCS) en una concentración del 10%. Los cultivos se realizaron en presencia de la FHA en una concentración de 10<sup>-6</sup> g/ml. El efecto de la FHA se evaluó mediante el recuento de células y la observación de la división celular. Los resultados se expresaron como el número de células por campo de visión y como el número de células que se dividieron durante un período de 24 horas. Los resultados se expresaron como el número de células por campo de visión y como el número de células que se dividieron durante un período de 24 horas.

Las preparaciones se obtuvieron convenientemente por medio de un método de cultivo de células en presencia de suero de caballo fetal (FCS) en una concentración del 10%. Los cultivos se realizaron en presencia de la FHA en una concentración de 10<sup>-6</sup> g/ml. El efecto de la FHA se evaluó mediante el recuento de células y la observación de la división celular. Los resultados se expresaron como el número de células por campo de visión y como el número de células que se dividieron durante un período de 24 horas. Los resultados se expresaron como el número de células por campo de visión y como el número de células que se dividieron durante un período de 24 horas.

Nosotros en esa forma hemos efectuado con éxito 160 cultivos y preparaciones para hacer el estudio de los cariotipos de las poblaciones andinas. Nuestros resultados están consignados en la figura 2 (indica las frecuencias y la intensidad de las pruebas positivas a 4.000 mts. de altura). Muchas hipótesis pueden ser sugeridas para tratar de explicar la causa de este fenómeno:

1.— Se puede pensar que se trata de una retardación de la división celular, la misma que estaría ligada a una disminución de la presión de oxígeno. Esta hipótesis es bastante aceptable y sólo demandaría ser verificada en el laboratorio. Desde luego, se ha notado que a la altura en que se encuentra el altiplano, los procesos de cicatrización demandan más tiempo en producirse. Es posible que la disminución de la presión de oxígeno provoque una disminución global del metabolismo celular y por supuesto de la velocidad de duplicación del ADN.

2.— Conviene discutir también la acción de fitohemaglutinina; para el efecto se han entrevisto dos posibilidades:

a) Una que las fitohemaglutininas actuarían mediante un mecanismo inmunológico. El añadido de fitohema a un medio de cultivo que contiene un antígeno de un sujeto sensibilizado creará un conflicto antígeno—anticuerpo que desencadenaría una respuesta linfocitaria que daría una multiplicación de células. Como nosotros ya señalamos, la tasa disminuida de gamma globulinas es un hecho constata-

do en los Amerindios del Altiplano (2). Una disminución de la intensidad y de la rapidéz de la reacción antígeno—anticuerpo permitiría explicar ese retardo de la división.

b) Otros autores ante respuesta constante de los linfocitos al contacto de la fitohemaglutinina, piensan que esta reacción no es inmunológica pero sí físico—química: la fitohemaglutinina produciría modificaciones de la membrana celular que induciría a la división.

Es posible que la disminución de la presión parcial de oxígeno entrañe una modificación del equilibrio iónico que produciría esa disminución en el ritmo de las mitosis.

#### BIBLIOGRAFIA.—

1.— J. Ducos et P. Colombies. C. R. Soc. Biol. 1967, 161, p. 1452.

2.— J. Ruffié, G. Larrouy et H. Ergnes, Nouv. Rev. Fr. Hemt., 1966, t. 6.

3.— A. M. Salles—Mourlan, Contribution a l'étude de l'influence de quelques modifications des conditions de prolevement, de conservation et de culture sur de multiplication "in vitro" D.E.S. Faculté de Sciences de Toulouse, 1967.