

facultad de odontología

u n a m

124-A

2g

tesis
recepional

maría luisa saleta gómez serna



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Odontología

EL METODO DE CULTIVO DE TEJIDOS
EN LA
INVESTIGACION BIOMEDICA
DE LA
CAVIDAD ORAL

M^o Luisa Saleta Gómez Serina

TESIS RECEPCIONAL

1987

INDICE

| | |
|---------|--|
| Páginas | |
| 1 | Dedicatoria y Agradecimientos . |
| 9 | Justificación del Tema . |
| 11 | Introducción . |
| 14 | Consideraciones Generales sobre Histología de la - Mucosa Oral . |
| 21 | Antecedentes Históricos del Cultivo de Tejidos . |
| 26 | Características y necesidades de un Laboratorio de Cultivo de Tejidos . |
| 36 | La Siembra - Técnica de Siembra y Cultivo . |
| 48 | Líquidos y Medios Biológicos . |
| 57 | Incubación de los Cultivos . |
| 58 | Equipo Optico . |
| 61 | Observación de los Cultivos . |
| 64 | Material y Método . |
| 68 | Resultados . |
| 79 | Discusión . |
| 85 | Conclusiones . |
| 87 | Resumen . |
| 89 | Ilustraciones . |
| 90 | o Pies de Figura . |
| 115 | Bibliografía . |

Justificación del Tema

A lo largo de la exposición de este trabajo se podrán apreciar numerosas y variadas razones que justifican sobradamente el haber escrito este tipo de Tesis; sin embargo, quiero con respeto y cariño a mi Facultad, a mis Maestros y a mis Compañeros hacer saber algunas de las principales razones por las cuales me atreví y me decidí a escribir este trabajo en la forma que ahora, con entusiasmo les ofrezco.

- a) Entusiasmada y maravillada por la Metodología del Cultivo de Tejidos y en base a la experiencia que adquirí a lo largo de varios años como colaboradora del Departamento de Cultivo de Tejidos y Morfología Experimental del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", sentí la necesidad de aplicar la tecnología y conocimientos a los tejidos de la Cavidad oral.
- b) Como estudiante de Odontología y en atención al cariño y vocación que siento por mi carrera, busqué, a través del Cultivo de Tejidos, ampliar el horizonte de la investigación biomédica de la Odontología mediante las posibilidades que prometen la Morfología Diná-

mica a través del Cultivo de Tejidos in vitro.

- c) El deseo, hecho ahora realidad, de contribuir con un trabajo de investigación en las áreas de Ciencias básicas a la Odontología, como respuesta rectificadora a la crítica continua y mordaz de que los Odontólogos somos casi siempre simples trabajadores manuales, casi alfareros de la Medicina, al caricaturizar las especialidades de Prostodoncia, Prótesis, Ortodoncia, Clínica Integral (amalgamas, incrustaciones, etc.), cuando la realidad es completamente distinta, ya que durante la carrera y en el plan curricular recibimos suficiente información y estímulo para incursionar en las áreas de ciencias básicas biomédicas.
- d) Por el anhelo de que nuestra querida Facultad de Odontología de la Ciudad Universitaria, se cree un Departamento de verdadera Biología Celular basada en la Morfología Dinámica a través del Cultivo de Tejidos.

Confío en la benevolencia de quienes deban opinar sobre este trabajo y espero vean con simpatía el anhelo de crear e incorporar un Departamento de Biología Celular, que abra nuevos senderos en la investigación celulo tisular de la cavidad oral.

INTRODUCCION

Aún cuando la cavidad oral, tanto en sus componentes como en su contenido, es de fácil acceso a los procedimientos exploratorios clínicos y terapéuticos, así como para la obtención de material biológico de interés para estudios de laboratorio, llama la atención que en el campo del cultivo de tejidos existe relativamente poca información y aún un tibio interés.

El cultivo de tejidos como rama de la biología celular apareció en el horizonte científico en la década de 1905 a 1915, con los geniales trabajos de Harrison (26), Burrows (3), y Carrel (5 y 6), pero sus antecedentes históricos se iniciaron en la década de 1850 a 1860 con Recklinghausen (62), Roux (65), Arnold (1) y Ljunggren (39). Tan pronto como el cultivo de tejidos apareció, despertó gran interés científico y desde entonces goza de peculiar simpatía y atractivo entre todos los investigadores científicos de las áreas biomédicas y, prácticamente, no hay células o tejidos animales o humanos que no se hayan sembrado y cultivado, incluyendo a aquellos de difícil acceso y gran dificultad técnica para su cultivo. Dentro de este abun-

dantísimo y variado material llama la atención la escasez de los tejidos procedentes de la cavidad oral aprovechados con los recursos que el cultivo de tejidos ofrece, cuando resulta relativamente fácil el acceso y toma de los fragmentos para siembra, comprendidos dentro de las mismas maniobras de la exploración de la cavidad oral y práctica y tecnología Odontológicas.

En la bibliografía de las últimas dos décadas aparecen ya - más comunicaciones referentes al cultivo de tejidos, sin embargo siguen siendo escasas y desorganizadas sobre el inmenso campo de investigación biomédica que la cavidad oral ofrece. También el desarrollo de nuevas ramas biomédicas o la creación de algunas otras, - como la genética, que han venido a establecer contacto con la clásica odontología clínica, el cultivo de tejidos representa un sólido puente - de unión entre las diferentes especialidades biomédicas.

Por otro lado conviene dejar anotado que el cultivo de tejidos no es una simple técnica de manipulación celular, ni siquiera constituye un simple reservorio de células vivas con las cuales construir modelos biológicos celulo-tisulares experimentales, con cierto grado de virtuosismo técnico y atractivos resultados. El cultivo de tejidos es una rama científica de la morfología y biología celulares, tanto normal como patológica, humana como comparativa, en donde la armonía morfodinámica in vivo es no sólo el atractivo, sino la ventaja no igualada -

por ningún otro recurso de la investigación científica para estudiar -
las células y tejidos vivos.

La cavidad oral y el cultivo de tejidos

Desde el punto de vista el cultivo de tejidos, todos los tejidos y células de cualquier organismo vivo, tanto animal como vegetal, son susceptibles de cultivarse in vitro, de manera que los tejidos que constituyen la cavidad oral no son una excepción.

Desde luego que el hueso, con su médula, endostio y periostio, así como las piezas dentales, pulpa y tejidos periodontales (vasos, ligamentos, tejido conectivo, etc.), son susceptibles de sembrarse y cultivarse in vitro; lo mismo puede decirse de la lengua, glándulas salivales y masas musculares de la región.

Sin embargo, en este trabajo nos referiremos, en base a su sentido práctico, sólo a los tejidos blandos de la cavidad oral y sobre todo a la mucosa.

La mucosa que reviste la cavidad oral y sus estructuras es fácilmente accesible, por ello nuestro material biológico está representado por biopsias de mucosa oral.

Consideraciones generales sobre histología de la mucosa oral.

La cavidad oral está revestida de una membrana mucosa que según la zona, muestra particularidades estructurales; así reconocemos, 1) la mucosa que rodea a las piezas dentarias y que recibe el nombre de encía. 2) la mucosa que cubre el dorso de la lengua, contiene las papilas gustativas y se extiende y continúa con la mucosa de la faringe y vías anexas. 3) la mucosa de revestimiento del paladar duro, llamada mucosa masticatoria, Esquema I.

Encía

De acuerdo con la relación que esta mucosa guarda con las piezas dentarias se consideran 3 clases de encía:

- a) la marginal o libre.
- b) la insertada y
- c) la interdientaria.

Encía marginal.

Esta encía rodea a los dientes a modo de collar, es libre mide 1mm de anchura, y se extiende hasta el surco marginal que la separa de la Encía insertada. Histológicamente está constituida por tejido conectivo fibroso denso cubierto por epitelio plano poliestratif-

ficado escamoso. El epitelio del borde libre o cresta gingival y el de la superficie externa de la encía marginal son en algunos sitios queratinizados y en otros lugares paraqueratinizados; pudiéndose encontrar sitios con los dos tipos de cornificación. Este epitelio contiene prominentes prolongaciones epiteliales que se continúan con el epitelio de la encía insertada. En cambio, el epitelio de la superficie interna de la encía es de tipo plano poliestratificado no queratinizado y sin prolongaciones epiteliales; y que recubre el surco gingival.

El tejido conectivo de la encía marginal es del tipo densamente colágeno; contiene un sistema importante de fascículos de fibras colágenas, fibras gingivales, que mantienen la encía marginal firmemente adosada contra el diente, proporcionando así la rigidez necesaria -- para soportar las fuerzas durante la masticación sin llegar a separarse de la superficie dentaria y, en cambio, unen la encía marginal o libre con el cemento de la raíz y con la encía insertada adyacente.

Entre los canales y espacios que dejan los fascículos de las fibras conectivas gingivales y en la vecindad de los vasos se identifican y circulan elementos celulares variados, entre los cuales podemos advertir abundantes mastocitos o células cebadas que, estando presentes en todo el organismo, son notablemente, más numerosas en el tejido conectivo de la mucosa oral. Estas células contienen una gran variedad de sustancias biológicamente activas, entre las cuales se han identifi-

cado histamina, enzimas proteolíticas, enzimas esterolíticas ("substancias de reacción lenta") y lipolecitinas que pueden intervenir durante los procesos inflamatorios gingivales; también contienen en forma especial heparina que, además de ser una substancia anticoagulante, es un factor de reabsorción ósea.

Con el nombre de mucosa del surco gingival se conoce a la encía marginal que forma la pared blanda del surco gingival, que se encuentra unida al diente en la base del surco por la adherencia epitelial. El epitelio del surco es una estructura delgada cubierta con epitelio escamoso estratificado muy delgado, no queratinizado y sin prolongaciones.

El epitelio del surco gingival es extremadamente importante puesto que actúa como una membrana semipermeable a través de la cual pasan hacia la encía numerosas y variadas substancias, entre otras, productos bacterianos y medicamentos.

El líquido gingival contiene proteínas plasmáticas adhesivas que mejoran la adhesión de la adherencia epitelial al diente; posee además propiedades anti-microbianas y puede ejercer actividad de anticuerpo en los mecanismos de defensa de la encía. Sin embargo también sirve de medio biológico para la proliferación bacteriana y contribuye a la formación de la placa bacteriana dental y depósitos tartáricos.

Adherencia epitelial.

La adherencia epitelial es una estructura fibroepitelial con epitelio poliestratificado y escamoso que rodea a las piezas dentarias a modo de collar. Al comienzo de la vida sólo muestra 3 ó 4 capas de espesor, pero con la edad puede alcanzar hasta 10 ó 20 capas.

La adherencia epitelial es una estructura de autorrenovación constante con gran actividad proliferativa en todas sus capas celulares, por lo cual es común observar frecuentes figuras de división celular mitótica; las células epiteliales de regeneración se desplazan hacia la superficie dentaria y a lo largo de ella, en dirección coronaria hacia el surco gingival y proporcionan una adherencia continúa y desplazable a la superficie del diente. La adherencia epitelial se une al esmalte por una lámina basal comparable a la que une el epitelio a los tejidos de cualquier parte del organismo.

Encía insertada.

La encía insertada es una continuación de la encía marginal que se fija más firmemente a las piezas dentarias y al plano óseo mediante poderosas fibras conectivas que se disponen en grupos fasciculares gingivodentales.

El epitelio de esta porción de la encía está compuesto por una capa basal de células cuboideas, una capa de células espinosas poligonales, otra más de células granulares aplanadas con gránulos de queratohialina y núcleo intensamente teñido y reducido de tamaño; otra capa de cornificación paraqueratinizada y finalmente, otra capa queratinizada.

El epitelio gingival de tipo epidermoide muestra estructuras celulares relacionadas con el sexo; así, en la mujer se ha encontrado una gran partícula Feulgen-positiva denominada cuerpo de Barr, en la vecindad de la membrana nuclear en 75% de los casos; en cambio, en el hombre existe una partícula similar, pero más pequeña que sólo está presente en el 1% de las células.

Membrana basal.

Todo el epitelio de la mucosa oral se une al tejido conectivo subyacente por una bien definida lámina basal que en los sitios de mayor tracción mecánica se refuerza volviéndose más densa; los hemidesmosomas de las células epiteliales basales se apoyan contra esta lámina lúcida y penetran en ella.

Lámina propia.

El tejido conectivo de la encía se conoce como lámina propia y está formada por fibras colágenas densas y pocas fibras elásticas.

Las fibras argirófilas de reticulina se ramifican entre las fibras colágenas y se continúan con la reticulina de las paredes de los vasos sanguíneos. En la lámina propia se distinguen dos porciones:

- 1) una, la capa papilar, subyacente al epitelio, que se compone de proyecciones papilares entre las yemas epiteliales y
- 2) una capa reticular, contigua al periostio del hueso alveolar al cual se une firmemente.

Vasos y nervios de la mucosa oral

La mucosa oral es una estructura muy vascularizada tanto por vasos sanguíneos como por linfáticos.

Los vasos sanguíneos arteriolas y capilares son muy numerosos en la mucosa oral, sobre todo en la encía. Por debajo del epitelio de la superficie gingival externa, los capilares se extienden hacia el tejido conectivo papilar, entre los brotes epiteliales, en forma de asas terminales en horquilla, con ramas eferentes y aferentes espiraloides y varicosas; en ocasiones, las áreas se unen por vasos comunicantes cruzados que dan origen a numerosos capilares colapsados que funcionan como vasos de reserva cuando aumenta la circulación.

Linfáticos

El drenaje linfático de la encía comienza en los linfáticos de las papilas del tejido conectivo y se dirige hacia los nódulos linfáticos regionales del grupo submaxilar.

Inervación

La inervación de la mucosa oral deriva principalmente de fibras procedentes del nervio trigémino y del glossofaríngeo.

Las siguientes estructuras nerviosas están presentes en el tejido conectivo; una red de fibras argirófilas terminales, algunas de las cuales se extienden dentro del epitelio; corpúsculos táctiles del tipo de Meissner; bulbos terminales del tipo de Krause que son termo receptores y husos encapsulados; las papilas gustativas en el dorso de la lengua.

Como se advierte el componente nervioso propio de la cavidad oral y sus estructuras en ella comprendidas es numeroso y variádo en corpúsculos y terminaciones nerviosas y complejo, cuya función y significado en la fisiología normal de la cavidad oral nos es tóavía desconocida en su mayoría.

Antecedentes Históricos del Cultivo de Tejidos.

Los trabajos de Harrison (26) y Burrows (3.) de 1905 son publicaciones clásicas con las cuales el Cultivo de Tejidos aparece en el concierto metodológico de la Biología; sin embargo antes de ellos, existen segmentos históricos no articulados en el desarrollo del Cultivo de Tejidos, como son las aportaciones de von Recklinghausen (62), en 1866, sobre la conservación de células sanguíneas de anfibio durante 35 días.

Roux (65) en 1885 aisló la lámina medular de embrión de pollo y la conservó viva por varios días en solución salina.

Arnold (1) en 1887, cultivó leucocitos de batracios. Clavaba astillas de madera en el saco linfático de ranas, después extraía las espinas y las colocaba en cristales de reloj con solución salina o humor acuoso; los leucocitos que se habían adherido a la espina de madera se soltaban y flotaban en el líquido y se fijaban a la superficie del vidrio de reloj. Por medio de este ingenioso procedimiento Arnold logró observar divisiones mitóticas en sus leucocitos así cultivados.

Ljunggren en 1898 mantuvo vivos fragmentos de piel en líquido de ascitis, los cuales fueron empleados, con cierto éxito en transplantas.

Sin embargo, cultivar in vitro células separadas del organismo que les dió origen, se debe al botánico Haberlandt, quien en 1902 sentó las bases de lo que hoy conocemos como Cultivo de Tejidos, término propuesto por Burrows.

En el terreno de los tejidos animales, fué Harrison (26), Zoólogo, quien logró en 1903, cultivar neuroblastos de rana.

Dos años después Burrows (3) y Harrison (26) introdujeron el uso de la linfa en lugar de plasma sanguíneo para cultivar células.

En 1912 apareció el nombre de Carrel (3), al principio trabajando con Burrows (6) e introduciendo el uso de los extractos embrionarios como factores de promoción en la nutrición y crecimiento celulares. También se debe a Carrel las medidas de esterilidad durante el manejo de los tejidos y en los medios de cultivo.

Fué Carrel quien más contribuyó al desarrollo del cultivo de células y tejidos hasta llevarlo a ser considerado como un método de investigación.

Carrel, Burrows y Harrison dominaron durante 30 años el horizonte histórico del método de cultivar in vitro tejidos y células, tanto animales como vegetales. Sus métodos fundamentales así como las modificaciones particulares en cada caso, son sencillos y fáciles de reproducir en todo momento.

En torno a 1921, Carrel (7), junto con Ebeling (5) y Baker (8 y 9), Fischer (14) y Demuth (14), iniciaron el estudio de los componentes nutritivos de los medios de cultivo en relación con problemas de nutrición y metabolismo celulares.

Casi al mismo tiempo, Warren y Margaret Lewis (40,41,42) se interesaron por el estudio de los constituyentes nutritivos y los efectos de las soluciones salinas, los problemas de la ósmosis, de la dispersión electrolítica, etc.

Por otra parte, los cultivos de tejidos vegetales, tan brillantemente iniciados por Haberlandt en 1902 tuvieron un receso de casi 20 años, hasta que Molliard (56) emprendió con éxito el cultivo de fragmentos de embriones de plantas y con Kotte (35^{34,}) discípulo de Haberlandt y Robbins (63^{23,}), en 1922, mantuvieron fragmentos explantados de raíces vegetales por varias semanas. Sin embargo fue hasta 1934, con White (87,88 y) y Gautheret (21^{19,20}) cuando se realizaron trabajos en serie en el campo

de los cultivos vegetales y cuando se obtuvieron resultados brillantes.
87, 88
White (89) reconsideró las bases teóricas emitidas por Haberlandt y en cierta manera seguidas por Molliard y demostró que era posible obtener cultivos de tejidos vegetales y cultivos de órganos vegetales. Algunos cultivos de raíz de tomate iniciados por él en 1934 aún existen y han resistido más de 1000 resiembras o trasplantes.

19, 20
Sin embargo, fué hasta 1939 cuando Gautheret (21), en París,
87, 88
Nobécourt (59) en Grenoble y White (89) en Princeton, con diferencia de seis semanas, publicaron lo que se puede considerar los verdaderos primeros cultivos vegetales a partir de cambium de zanahoria y tabaco. Estos trabajos y los de White (89) sobre la nutrición de las raíces resultan ser en los cultivos vegetales tan clásicos como los de Harrison, Carrel y Burrows para el cultivo de tejidos animales. Gautheret y White iniciaron también los estudios sobre crecimiento de tumores vegetales y los efectos de las llamadas sustancias promotoras de crecimiento.

12,
Por otra parte, en Inglaterra, la Dra. Fell (13), inició en 1928 el cultivo de tejidos y órganos, tales como huesos, dientes, ojos y glándulas.

En el cultivo de órganos se pretende conservar la congregación celular y tisular lo más coherente posible evitando la dispersión celular. En este campo de cultivo de órganos figuran nombres tan prominentes como los de Gaillard (17), Martinovitch (46), Carpentier (4) y Strangeways (79), entre otros.

Actualmente existen muchas y nuevas orientaciones en el cultivo de células, tejidos, órganos y aún intentos por cultivar organismos completos y las técnicas originales descritas por los pioneros han sido muy modificadas y ampliadas. Los nombres de los investigadores de esta época son contemporáneos, por ello no los mencionamos en este breve resumen histórico, sin embargo, merece especial mención el Dr. Charles M. Pomerat, quién a más de su gran calidad como notable investigador en el Cultivo de Tejidos y Dinámica Celular, fué un grande y generoso amigo de México, gracias a su especial interés, México cuenta hoy con especialistas en este campo formados en sus ya históricos laboratorios de Cultivo de Tejidos de la Universidad de Texas, en Galveston y de Pasadena, de la Universidad de California.

**Características y necesidades de un
Laboratorio de
Cultivo de Tejidos**

A. Esterilidad

Las contribuciones de Carrel en este terreno fueron definitivas para el auge cada vez mayor del cultivo de tejidos. Antes de él, las contaminaciones eran la regla y ni siquiera se consideraba la posibilidad de evitarlas. Carrel introdujó en la técnica los cuidados de asepsia y antisepsia transportándolos de la técnica quirúrgica humana. De manera que las ilustraciones de la época muestran a Carrel y sus ayudantes con vestuarios de cirujano sembrando sus tejidos en quirófano y siguiendo todos las reglas de asepsia y antisepsia.

Para fines prácticos los gérmenes que tienen interés como contaminantes son los no patógenos, ya que los patógenos no suelen desarrollarse en los cultivos ordinarios; por el contrario, las levaduras y los hongos son los que llegan a constituir verdaderas plagas de contaminación en los laboratorios de cultivo de tejidos.

Las medidas de esterilización se refieren al ambiente o atmósfera, al material de cristalería, a los medios y materiales biológicos y al operador.

Para la esterilización del ambiente se recomienda emplear, mí nutos antes de empezar a trabajar, las emanaciones de energía ultravioleta y evitar movimientos de grandes volúmenes de aire, evitar así mismo, corrientes aéreas durante la siembra. Sin embargo, el empleo de la energía ultravioleta tiene sus limitaciones, empezando por que se trata casi siempre de instalaciones costosas y sobre todo, porque las frecuentes y prolongadas irradiaciones ultravioletas producen ionización del aire, que a su vez resulta perjudicial para la viabilidad celular.

En la práctica es recomendable realizar limpieza de pisos y paredes con agua y jabón, una o dos horas antes de empezar a sembrar los tejidos. Evitar al extremo las corrientes de aire; procurar trabajar en cuartitos pequeños con ventanas y puertas de deslizamiento y no de hojas batientes. Tener a la mano todo el material que se va a emplear con objeto de no estar abriendo y cerrando las ventanas y puertas durante la siembra. Estas medidas tan simples, bien observadas, son suficientes en la práctica para evitar las contaminaciones por levaduras y mohos. No es recomendable el empleo de desinfectantes o de vapores letales pues su efecto se extiende a las células y tejidos que interesa cultivar.

Es conveniente que la mesa de trabajo tenga cubierta de cristal, esto permite un lavado más eficiente y rápido.

En la práctica, muchos laboratorios, emplean con ventaja, pequeñas vitrinas como cámaras de siembra, las cuales además de ser fácilmente lavables, se les puede equipar con tubos de energía ultravioleta.

La cristalería e instrumental se esterilizan, según el caso, en autoclave, en horno o con soluciones antisépticas. Toda la cristalería se puede esterilizar en el horno. Los tapones y artículos de hule y plástico al autoclave, instrumentos metálicos, tijeras y cuchillos se esterilizan en baños de solución antiséptica, tipo benzal.

Los medios biológicos y las soluciones que se emplean durante la siembra de los tejidos o durante la incubación de los cultivos se esterilizan por filtración ya que la mayoría de ellos contienen sustancias termolábiles o precipitables por el calor. El filtro más empleado es el de papel tipo Seitz con filtración al vacío o por presión. El grado de esterilización que se consigue con estos filtros es muy grande; sin embargo, en algunos casos puede intentarse la esterilización de sueros, plasmas y medios biológicos por medio de lámparas de energía ultravioleta. Recientemente los filtros denominados . . . "Millipore" ofrecen ventaja de comodidad y gran seguridad en la esterilización por filtración de los medios biológicos.

Los cuidados personales en relación a la esterilización son relativamente sencillos, aún cuando varían de un laboratorio a otro. En términos generales es suficiente con un lavado enérgico de las manos y antebrazos con agua y jabón. No es necesario el uso de guantes. El empleo de tapabocas queda indicado solamente si durante las maniobras de siembra se habla o se explica a estudiantes, en tal caso el aliento contamina con relativa frecuencia los cultivos. Si el trabajo se realiza en silencio, no es necesario el uso de tapabocas. El gorro sólo se indica en caso de pelo largo. En los preparativos personales para -- sembrar y manejar tejidos resulta mucho más importante el empleo de bata de media manga, cuello alto y cerrable por detrás. Esta bata se esteriliza al autoclave y debe ponerse en el momento de entrar a la -- sala de siembras.

El problema de la ventilación del cuarto de siembras, sobre -- todo cuando trabajan varias personas al mismo tiempo, es complicado ya que las corrientes de aire están contraindicadas, de manera que lo único que puede hacerse es ventilar el cuarto antes y después de sembrar; durante la siembra no debe haber movimiento de aire. El em-- pleo de sistemas de aire acondicionado es aceptable solamente cuando se realiza con aire filtrado y sin producir corrientes aéreas notables.

En todo caso, la certificación de esterilidad debe hacerse por medio de pruebas bacteriológicas en caldos o medios de agar.

Finalmente, conviene recordar que lo prudente es evitar las contaminaciones, ya que una vez contaminado un cultivo o un lote de cultivos lo mejor es fijarlo y teñirlo o desecharlo, pues resultan inútiles los esfuerzos por limpiarlo y la posibilidad de que todo se contamine a partir de tales cultivos es muy grande.

Consideraciones especiales merecen el cuidado y cumplimiento de esterilidad de los tejidos. Los explantes procedentes de las masas tisulares y de órganos internos y protegidos por las envolturas naturales suelen estar estériles y hasta sólo el manejarlos con cuidado para no contaminarlos; pero los tejidos que constituyen las envolturas y las que revisten las cavidades y tubos en comunicación con el exterior, están siempre contaminados y requieren maniobras especiales para ser sembrados. Este problema se presenta entre otros cultivos con los de piel, tracto digestivo, árbol respiratorio, revestimiento génitourinario, etc. Los explantes se recogen en solución salina balanceada a la que se añade penicilina, estreptomicina y en ocasiones micostatín; se hacen varios cambios de estas soluciones y se continúa con la siembra. No es conveniente usar antisépticos tópicos pues se compromete la vitalidad de los explantes.

B. Características de un laboratorio para Cultivo de Tejidos.

Desde la conformación general del laboratorio variará dependiendo del espacio que se disponga y los fines para los cuales se destine; pero en términos generales un Laboratorio de Cultivo de Tejidos debe constar de las siguientes partes: a) un cuarto destinado a sembrar los tejidos, b) un cuartito para manejo de animales y obtención de los tejidos, c) cuarto para la preparación de medios biológicos, d) un cuarto para manejo de los tejidos desde el punto de vista histológico, preparación de reactivos y técnicas histológicas, e) cuarto para la estufa y equipo de esterilización, f) cuarto para microcine y microfotografía.

Este mínimo de 6 cuartos o secciones se pueden arreglar y disponer de la manera que mejor convenga al espacio que se disponga, pero es recomendable que queden en continuidad práctica que facilite el desplazamiento entre ellos sin interferir el trabajo de uno con el del otro. Por otra parte es recomendable que todas las atenciones se centren en las características del cuarto de siembras, de manera de asegurar su esterilización e independencia de los otros cuartos.

Hay que recordar que vapores de sustancias, tales como formalol, amoníaco, ácido acético, tan empleados en laboratorios de histología pueden dañar a los cultivos e impedir definitivamente que se desarrollen los tejidos y células.

Las improvisaciones pueden hacerse sin límite con la única condición de que conduzcan a obtener células y tejidos vivos. Es evidente que las características del laboratorio variarán mucho de acuerdo con las actividades y el nivel de los estudios que se planea hacer. La práctica demuestra que obtener ocasionalmente células y tejidos vivos es relativamente fácil, mientras que trabajar rutinariamente con células y tejidos vivos ya es más complicado y planear un laboratorio de Citología e Histología Dinámica es mucho más complejo.

C. Cristalería e Instrumental Metálico.

La cristalería y el instrumental varían mucho de acuerdo con la técnica de siembra que se desee seguir y las adaptaciones con el material básico suelen ser la regla.

Por lo que se refiere a la cristalería quizá resulte más importante considerar características generales del lavado y su preparación en relación a los requerimientos biológicos. Por ejemplo, las células son muy susceptibles a la acción del sodio o del potasio contenido en los jabones, de manera que es aconsejable no emplearlos -

en la limpieza de la cristalería. Es preferible lavar sólo con agua corriente y escobillones y enjuagar con agua destilada. De emplear jabones o detergentes como el 7X o similares, es necesario lavar después con abundante agua corriente.

La esterilización de la cristalería requiere del autoclave o del calor seco del horno, pero que no exceda de 150°C . pues temperaturas por encima de ésta liberan alcalinidad a expensas del sodio que contiene el cristal.

Es aconsejable evitar la desecación de materiales biológicos o soluciones salinas en la cristalería pues se forman residuos difíciles de eliminar y que obligan a emplear detergentes o aún la mezcla crómica. La costumbre de colocar los frascos, botellas, tubos, etc. que han contenido materiales biológicos, en recipientes con agua, facilita la limpieza ulterior de la cristalería.

El material de cristalería que vaya a estar en contacto con sangre, puede, una vez limpio, recibir un baño con silicón y esterilizarse posteriormente en el horno, o emplear heparina y esterilizarse en el autoclave.

El instrumental metálico empleado en los laboratorios de cultivo de tejidos varía mucho de acuerdo con las finalidades y pretensiones del laboratorio, pero consiste principalmente en instrumental de

disección de proporciones adecuadas para emplearse directamente durante la siembra (pinzas, tijeras y cuchillas).

Por lo que se refiere al instrumental empleado durante la siembra sólo tiene interés recordar que debe ser de tal naturaleza que permita manejar los tejidos con suavidad y cortarlos sin traumatizarlos. El desgarrar, aplastar o maltratar los tejidos y fragmentos de siembra es la causa más común de fracaso en el cultivo de tejidos. El material metálico debe tener un revestimiento de cromo, níquel o ser de algún material que no se oxide y herrumbre.

La esterilización del instrumental metálico se realiza mediante baños en benzal.

Con frecuencia las pinzas y las tijeras presentan modificaciones en su extremidad de prensión o corte con propósito de facilitar el manejo de los tejidos y ciertos objetos, como los cubreobjetos.

La Siembra

Técnicas de Siembra y Cultivo

Técnicas de Siembra y Cultivo

Desde las comunicaciones de Harrison, Burrows y Carrel, hasta nuestros días, se han publicado numerosos métodos para cultivar los tejidos, muchos de ellos son originales y muchos otros no representan sino modificaciones a una técnica principal; de cualquier manera se ha llegado a tal versatilidad técnica que ya se dispone de libros especializados sólo en este aspecto técnico. Existen numerosas razones que justifican la diversidad técnica de la siembra, basta con pensar que actualmente cualquier tejido es susceptible de sembrarse y cultivarse; pero aún cuando son aparentemente numerosas y diferentes las técnicas a que hacemos mención todas ellas pueden quedar comprendidas en los siguientes métodos fundamentales que a continuación describimos.

Según los propósitos que se persigan, las técnicas de cultivo requieren de cristalería e instrumental especial. La Fig. 1 muestra algunos ejemplos de la cristalería más comunmente empleada: tubos de ensaye, de Leighton, matraces, cajas de Petri, botellas, como la de Carrel, cubre y portaobjetos, cámaras especiales, etc.

A continuación nos referimos a las técnicas de siembra y cultivo más comunes.

1) Técnica del Portaobjeto Excavado

Uno de los métodos más antiguos para sembrar y cultivar tejidos es tal vez el del portaobjeto excavado con gota pendiente, Fig. 2.

Para este propósito se siembran pequeños fragmentos de tejidos en cubreobjetos, habitualmente cuadrados, empleando el coágulo de plasma de gallo y extracto embrionario de pollo. Una vez que se ha formado el coágulo se coloca el cultivo en la excavación de un portaobjeto excavado de Maximow. El cultivo se suele sellar con parafina o con vaselina.

La cámara así formada se coloca de manera que los fragmentos sembrados queden hacia abajo suspendidos en el coágulo de plasma. No se suele añadir medio nutritivo, sobre todo si los cultivos se planean a corto plazo; pero para cultivos a largo plazo o para estudios farmacodinámicos se pueden agregar unas gotas de medio nutritivo. Estos cultivos ofrecen muchas ventajas, pero la principal limitación que tienen es la dificultad de renovar los nutrientes y la facilidad con que se contaminan. Sin embargo, son muy útiles para observaciones en que se desea determinar valores porcentuales o comparar velocidades de crecimiento durante la exploración de efectos citológicos de fármacos. Desde el punto de vista óptico la imagen in vivo es pobre

debido a que existe una cámara de aire que distorciona la marcha de los rayos luminosos, en particular cuando se intenta el contraste de fases y se desea tomar registros foto y cinematográficos.

2) Técnica de la laminilla con coágulo de plasma.

Este método, tan empleado hoy día, representa una modificación al método anterior de la siembra en portaobjetos excavado. Para esta técnica se emplean laminillas, cubreobjetos de 11mm. por 44mm. La siembra se puede hacer por medio de materiales adherentes como el plasma que, además de fijar los explantes a la superficie del cubreobjetos, aporta nutrientes muy útiles para el cultivo celular. Otro material muy empleado en este método para adherir las células a la superficie de las laminillas es la colágena y, finalmente, suele emplearse el agar-agar.

En el caso de emplear plasma, se usa con preferencia el de gallo, pero cualquiera otro puede servir. En todo caso se depositan dos o tres gotas de plasma, se colocan los fragmentos explantados o las suspensiones celulares y se agregan dos o tres gotas de extracto embrionario, generalmente de embriones de pollo, y se deja reposar esperando la coagulación del plasma, Fig. 4. Las laminillas así preparadas se introducen en tubos de ensaye y se les nutre con dos o tres mililitros de medio nutritivo. La incubación puede hacerse a la temperatura deseada y con o sin movimientos.

En el caso de emplear colágena el procedimiento técnico es casi el mismo, sólo que en lugar del plasma se emplea colágena li-

quida diluida y después de mezclarla con los explantes o con las células se deja en reposo en una atmósfera de amoníaco muy diluido y se espera hasta que la colágena se reconstituye y se transforma en gel.

El agar agar se emplea solo y la siembra se debe hacer con cierta rapidez manteniendo líquido el agar en baño María. La temperatura ambiente lo solidifica. Este procedimiento tiene sus limitaciones cuando los cultivos se van a incubar a 38°C .

Finalmente, este procedimiento de cultivar empleando laminillas tipo cubreobjetos puede usarse aún sin sustancias adherentes como las mencionadas. En tal caso la suspensión celular se deposita directamente en la superficie del cubreobjeto y se deja reposar esperando que las células, sin llegar a desecarse, se adhieran al cristal.

Este método con las variantes mencionadas y aún con adaptaciones especiales, según los tipos celulares y propósitos del cultivo, es de gran utilidad en la Citología Dinámica ya que permite manejar a los tejidos y células en superficie plana, en vidrio ópticamente adecuado para toda clase de observaciones. Las células se adaptan de tal manera a la superficie que se aplanan y extienden en grado máximo permitiendo una exhibición maravillosa de todos sus componentes. En los proyectos técnicos para cultivar células debe pensarse siempre en este procedimiento antes que en otros e intentar las adaptaciones ne-

cesarias según los tejidos a cultivar porque sus resultados son los que mejor se pueden aprovechar y registrar fotocinematográficamente.

3) Cultivo en Tubos.

El cultivo de tejidos y células en tubos se ha realizado desde hace mucho tiempo, es uno de los métodos pioneros. Las suspensiones celulares o los fragmentos tisulares se adhieren a la pared del tubo, ya sea por sí solas o por medio de plasma o de los adhesivos mencionados. Los cultivos pueden incubarse en reposo o en tamborres rotatorios y a la temperatura deseada. Sobre la pared del tubo se desarrollan rápidamente las láminas celulares. Este método tan útil para cultivar y conservar células, tiene limitaciones muy importantes para la observación, especialmente microscópica de las células, ya que la pared del tubo distorciona la imagen.

Una modificación a este método de cultivo en tubos y con el propósito de resolver las dificultades de observación es el tubo de Leighton. Este tubo, similar al de ensaye, tiene una parte aplanada en la cual se pueden sembrar las células o colocar laminillas cubreobjetos con células. De esta manera se pueden observar detalles citológicos que permiten un mejor estudio e interpretación de los cultivos. El tubo de Leighton representa una transición entre la siembra directa en la pared del tubo de ensaye y el método de la laminilla cubreobjetos.

4) Técnica de Cultivo en Botellas.

Las botellas o recipientes de paredes planas ofrecen superficie adecuada para el desarrollo de cultivos en delgadas y extensas capas. El método es sencillo. En las botellas se coloca una cantidad de medio nutritivo que cubra en delgada película o capa de superficie de cristal de la botella colocada sobre una de sus caras planas. Las células se colocan a manera de inoculaciones por suspensión o en forma de pequeños fragmentos tisulares. Es necesario que las botellas permanezcan en reposo para asegurar que las células emigradas de los fragmentos o las células ya libres de la suspensión se adapten por estereotropismo a la superficie. El cambio de medio se realiza según las variaciones de pH. En tiempo variable para cada tejido, pero más o menos dentro de los primeros diez días, la superficie basal de las botellas se encuentra prácticamente cubierta por una delgada película de células que es visible a simple vista y observable al microscopio con objetivos de pequeño poder.

Cuando las células cubren la superficie tan ampliamente como se ha descrito, suele empezar la licuefacción en focos múltiples, este fenómeno marca el momento de resebrar los cultivos. Para tal propósito se desprenden las células por medio de un agitador de

vidrio con extremo de hule, para facilitar el desprendimiento suele añadir soluciones débiles de tripsina o verseno, lo cual favorece la separación y la homogenización de la suspensión celular. Esta maniobra es seguida de lavados en soluciones salinas y centrifugaciones a bajas revoluciones (700-1000 r.p.m.) y por poco tiempo (10 min.); - el sedimento se diluye en la proporción que se desee y se procede a la resiembra en nuevas botellas. Este material se puede emplear -- también para resembrar en laminillas o en cámaras de Rose o usarse para estudios de bioquímica o citoquímica.

En todo caso el método del cultivo en botellas es el ideal para desarrollar cepas celulares ya que después de varios pasos o resiembras suele establecerse una línea celular con predominio sobre otras variedades celulares. Este método de las botellas permite obtener y mantener células en grandes cantidades, por largo tiempo y con frecuencia con carácter de colonias puras. Por otro lado, los costos de trabajo de este método son bajos, requiere poco espacio y equipo relativamente sencillo.

Variaciones poco significativas a este método de cultivo en botellas son las siembras en matraces y cajas de Petri. En estas modificaciones el método de siembra es semejante al de las botellas y su significado biológico el mismo. En la práctica las siembras en - cajas de Petri y en matraces ofrecen dificultades para observar --

los cultivos in vivo ya que no es fácil observar matraces o cajas de Petri al microscopio, aún a pequeño aumento.

5) La Cámara de Rose.

Una de las grandes adquisiciones técnicas que ha recibido el cultivo de tejidos fué el diseño y realización de la cámara de George Rose en 1953. Se trata de un ingenioso dispositivo que permite cultivar las células y tejidos, cambiar medio o perfundir sustancias a las células y poder tomar registros fotocinematográficos, todo esto durante incubaciones prolongadas. Para tal propósito se siembran los fragmentos explantados o las células en suspensión en una lamina cubreobjetos, siguiendo el método del coágulo de plasma o el depósito directo sobre superficie de cristal. A continuación se coloca una junta de hule natural (latex) con una perforación central. El grosor del hule y el diámetro de la perforación (2 a 3 cm.) determinan la capacidad de la cámara. Por encima de esta junta se coloca otro cubreobjetos semejante al que empleamos para sembrar nuestros tejidos y queda así formada una cámara cerrada, de paredes de cristal plano con cualidades ópticas compatibles con los sistemas ópticos de los microscopios más empleados en la observación. El acceso a la cámara se logra a través de la junta de hule por medio de agujas finas y largas. La cámara de cristal y hule adquiere solidez

por medio de dos placas perforadas de acero inoxidable que se colocan en ambas caras de la cámara, Fig. 3.

La cámara de Rose permite observaciones y fotografías con - contraste de fases de material vivo que no han sido superadas aún ni - siquiera con las improntas o frotis cubiertos. Además, con cuidado - se puede mantener el contenido de la cámara de Rose en condiciones - estériles.

Los componentes de la cámara de Rose permiten armarlos aún con laminillas de cultivo que se estén desarrollando en los tubos.

Las limitaciones de este maravilloso recurso de cultivo de cé- lulas y tejidos se refieren al grosor de la junta de hule y a la experien- cia técnica para ensamblar los componentes.

6) Cultivos Tridimensionales.

Los métodos de cultivo tisular y celular hasta aquí mencionados conducen a la obtención de cultivos en forma de láminas, generalmente en monocapa, cuando más en espesores de 2 a 5 capas celulares; pero existen otros recursos técnicos que permiten cultivar tejidos y célu- las en capas numerosas y aún en volúmenes considerables.

El empleo de soportes de plástico o de esponjas de fibrina permi

te crecimientos celulares multidireccionales y desarrollo organoide. Estos métodos ofrecen ventajas en el cultivo de órganos y de esbozos embrionarios, por lo que se emplean mucho en morfogénesis y embriogénesis experimentales.

Líquidos y Medios Biológicos.

a) Soluciones Salinas.

Durante el manejo de los tejidos y células que se van a sembrar y en particular durante la incubación de los cultivos se plantea el problema de los líquidos en los cuales deben conservarse y nutrirse las células.

Cuando los tejidos son explantados deben colocarse de inmediato en medio líquido para evitar la deshidratación. La desecación suele ser una causa muy frecuente de fracasos en los cultivos tisulares. El líquido en que las células se han de depositar debe llenar ciertos requisitos físicos y químicos. Desde hace mucho tiempo se emplearon soluciones acuosas salinas, principalmente de cloruro de sodio como el llamado suero fisiológico y el líquido de Ringer, que han servido de base a numerosas modificaciones hasta llegar a las actuales soluciones salinas hoy recomendadas, como el líquido de Gey, la solución de Hanks o de Tyrode, etc. en estas soluciones las sustancias empleadas y el modo de prepararlas aseguran isotonicidad osmótica, isoelectricidad o dispersión electrolítica y aportan un nutriente de alta energía, la glucosa. A estas soluciones se suele agregar un grupo de sales amortigua

doras para regular y mantener el pH en niveles adecuados durante el metabolismo celular. El siguiente cuadro, ofrece y compara las composiciones de los líquidos más empleados para tejidos de animales de sangre caliente o fría.

Soluciones salinas para tejidos de animales de sangre caliente según:

| | Tyrode | Gey | Earle | Hanks | Carrel | Locke | Ringer |
|---|--------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|
| NaCl | 8.00 | 8.00 | 6.80 | 8.00 | 8.00 | 9.00 | 9.00 |
| KCl | 0.20 | 0.30 | 0.40 | 0.40 | 0.20 | 0.42 | 0.42 |
| CaCl ₂ Anhidro | 0.20 | 0.275 | 0.20 | 0.20 | 0.20 | 0.24 | 0.25 |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 0.10 | 0.210 | - | - | 0.10 | - | - |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | - | - | 0.10 | 0.20 | - | - | - |
| NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O | 0.05 | - | 0.125 | - | 0.05 | - | - |
| Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O | - | 0.150 | - | 0.06 | - | - | - |
| KH ₂ PO ₄ | - | 0.025 | - | 0.06 | - | - | - |
| Glucosa | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | - | - |
| NaHCO ₃ | 1.0 | 0.250 | 2.20 | 0.35 | - | 0.20 | - |
| Roj o Fenol | - | - | 0.05 | 0.02 | - | - | - |

Cantidades para un litro de agua

El pH se ajusta entre 7.2 a 7.4

Soluciones salinas para tejidos de animales de sangre fría.

CUADRO

| | Holtfreter (Peces de agua dulce y anfibios.). | Ringer (Anfibios) | Agua de mar (Almejas y Calamares) | Locke (Insectos). |
|--------------------|--|----------------------|---|-----------------------|
| NaCl | 3.50 | 6.50 | 27.27 | 9.00 |
| KCl | 0.05 | 0.14 | 0.76 | 0.42 |
| CaCl ₂ | 0.10 | 0.12 | 1.22 | 0.25 |
| MgCl ₂ | - | - | 2.36 | - |
| MgSO ₄ | - | 0.20 | 3.44 | - |
| NaHCO ₃ | 0.20 | - | 0.21 | 0.20 |
| Glucosa | - | - | - | 2.50 |

Cantidades para un litro de agua.

El pH de estas soluciones se determina por el potenciómetro o por medio de colorantes indicadores, de los cuales el más usado es el rojo fenol. El pH más adecuado para tejidos de mamífero es de 7.2 a 7.4 . De todas maneras conviene recordar que casi todas las células animales requieren de pH en torno a 7, ligeramente alcalino o ácido - (6.7, 7, 7.6 a 7.7) por debajo o encima de estos valores la vida celular suele ser precaria. De aquí el gran interés que tiene preparar - cuidadosamente las soluciones salinas y asegurarse que los amorti - guadores sean efectivos. En condiciones favorables la neutralidad o

ligera modificación de nuestros medios biológicos indican gran actividad con buen crecimiento celular.

La isotonicidad, que puede medirse con el osmómetro, resulta más fácil de evaluar prácticamente por medio de su efecto sobre las células, por ejemplo, poniendo eritrocitos en la solución y observando su efecto sobre el tono celular. Si se observa retracción se trata de solución hipertónica, por el contrario, si se hinchan los eritrocitos, la solución es hipotónica. Esta elemental y sencilla valoración es muy útil y práctica porque no requiere otro instrumento que un microscopio.

Desde luego que las soluciones salinas, como los demás medios biológicos, deben ser estériles, lo cual plantea ciertos problemas o por lo menos requiere de maniobras especiales. Como la mayor parte de las soluciones salinas contienen entre sus amortiguadores bifosfato y bicarbonato de sodio, está contraindicada la esterilización por ebullición o al autoclave ya que tales sales se precipitan. Para evitar este inconveniente se recomienda esterilizar al autoclave en dos grupos los componentes de la solución, en particular el bicarbonato de sodio aparte de los demás ingredientes, después se dejan enfriar y se mezclan. Este procedimiento se ha visto superado en rapidez y seguridad por el empleo de filtros de poro fino, por ejemplo en los filtros Seitz por filtración o en los Millipore que permiten este-

rilizar las soluciones ya preparadas.

Los fragmentos tisulares o las células pueden permanecer durante varias horas en solución salina en espera de maniobras especiales. También se emplean las soluciones salinas para lavar los tejidos durante las perfusiones con fármacos o después de recién cortados y preparados los explantes con objeto de eliminar las enzimas autolíticas liberadas por la destrucción celular durante las maniobras de fragmentación.

b) Plasma de Gallo.

Para fijar los explantes a las laminillas o a los cubreobjetos en las cámaras de Rose es necesario emplear plasma de gallo que se obtiene de sangre de gallos jóvenes por sangrado de carótida o por punción cardíaca. Los cuidados que hay que tener durante la preparación del plasma son: Esterilidad y manejo tal que evite la coagulación de la sangre o del plasma empleando anticoagulante en muy baja proporción. Para este propósito se usan jeringas y tubos con pared humedecida en heparina diluida. Se procura trabajar a temperaturas entre 5 a 10°C., y se emplea centrifuga con refrigeración.

Estos cuidados suelen ser suficientes para que el plasma pueda ser empleado durante la siembra y que coagule en el momento deseado al contacto con el extracto embrionario.

El plasma se puede emplear de inmediato o almacenar en congelación hasta dos meses. También se puede emplear el plasma liofilizado.

Otros plasmas, inclusive el humano, pueden prepararse y emplearse como el de gallo, pero con ciertas desventajas, por ejemplo, el plasma humano, además de su mayor costo o dificultad para obtener donadores, se caracteriza por su rápida y extensa licuefacción al entrar en contacto con el explante.

c) Extracto Embrionario de Pollo

Otro medio biológico muy empleado en el cultivo de tejidos, es el extracto de tejidos embrionarios. Desde Carrel (6) se sabe de su efecto benéfico en la proliferación tisular y desde entonces se insiste en su empleo casi obligatorio, rutinario, en toda técnica de cultivo celular. Estudios comparativos directos e indirectos ponen de manifiesto el efecto y bondad del extracto embrionario.

Se han empleado diversos embriones para preparar el extracto, incluyendo embriones humanos; sin embargo, los embriones de pollo son los que mejores resultados ofrecen. Para este propósito se utilizan huevos embrionarios de 3 a 9 días. Embriones menores de esta edad son muy pequeños y la cantidad de extracto que de ellos se obtiene es muy escasa, por otro lado, embriones de edad mayor, re-

sultan inadecuados debido a que empiezan a aparecer plumones en la piel, lo cual se considera desventajoso debido a que la queratina tiene efecto inhibitor en el crecimiento celular.

Los embriones se extraen del huevo con el cuidado necesario para evitar contaminaciones microbianas y con los materiales de la yema. Los embriones se lavan en solución salina. El jugo embrionario se obtiene por medio de la destrucción tisular ya sea a través de fragmentación sucesivamente más pequeña o, lo que es más cómodo, haciendo pasar los embriones por una jeringa. Se obtiene así un licuado de los embriones. También se han empleado licuadoras de aspas y desintegración supersónica de tejidos y células. El material se centrifuga y se aprovecha el sobrenadante considerando como jugo puro de embriones. El sedimento se redisuelve en solución salina en proporción de 2 a 3 c.c. por cada embrión. Se deja reposar una hora en el refrigerador y se vuelve a centrifugar. Estas maniobras se repiten dos veces más y se obtiene así extracto embrionario de diferentes graduaciones.

El preparado en la forma descrita se puede almacenar en congelación durante 3 a 4 meses sin que se altere su potencia como estimulante del crecimiento y proliferación celular. Por otra parte, también se ha empleado la liofilización para conservar el extracto embrionario.

d) Medio Nutritivo

La nutrición de los cultivos se ha hecho empleando diversos - medios según fórmulas en las cuales se combinan en proporciones va- riables tres componentes fundamentales a los que se les suele añadir complementos nutritivos muy variados. Los ingredientes básicos de las fórmulas nutritivas son: a) solución salina equilibrada, b) proteí- nas y c) estimulantes del crecimiento y proliferación celular.

Una fórmula muy conocida, preparada por Pomerat y que pro- porciona magníficos resultados es la de:

| | |
|---|-----|
| Solución salina equilibrada (Hanks, Gey o Tyrode) | 50% |
| Líquido de Ascitis | 45% |
| Extracto Embrionario | 5% |

Las proporciones de estas mezclas pueden variar considera- - blemente y aún son frecuentes las substituciones, en particular en lo que se refiere a la dotación de proteínas, las cuales son agregadas en forma de suero de mamíferos (suero de caballo, de ternera, etc.), en forma de albúminas y globulinas y finalmente, como aminoácidos. Estas combinaciones dan origen a numerosos medios llamados sinté- ticos o especiales para ciertos propósitos. Entre estos últimos son muy conocidos los medios de Eagle, el 199, el de Enders, etc. Hay también medios especiales para tejidos de animales marinos, como el de Holtfreter, o para tejidos vegetales como el de White, etc.

Después de probar la larga lista de medios nutritivos que existen, llama la atención la bondad y simplicidad de la mezcla la solución salina con ascitis y extracto embrionario y el medio de Eagle. En estos medios se cultivan prácticamente todos los tejidos, además el costo es el más reducido.

Existen medios, como el 199, que enriquecidos especialmente en alguno o algunos de sus ingredientes se recomienda para cultivos singulares, por ejemplo, en el caso citado, para cultivo de linfocitos humanos con interés de obtener de ellos cromosomas o estudiar la transformación blastoide.

A los medios de cultivo se les suele añadir antibióticos, penicilina y estreptomina, y un indicador de pH, el rojo fenol. Aún cuando las cantidades de antibióticos recomendados estén muy lejos de ser tóxicas, conviene tener mucho cuidado porque en particular los linfocitos son muy sensibles al efecto de los antibióticos.

El medio nutritivo, igual que los demás medios biológicos conviene almacenarlo en pequeñas cantidades y guardarlo a bajas temperaturas. En el momento de emplearse se lleva a temperatura ambiente. Hay que evitar frecuentes variaciones en las temperaturas pues se corre el peligro de la desnaturalización del medio.

Incubación de los Cultivos

Realizados los cultivos y nutridos de la manera más conveniente para cada caso, se procede a esperar que las células, después de un período de adaptación, empiecen a multiplicarse y formar colonias celulares. Esto es lo que constituye propiamente el cultivo de tejidos y células y para lo cual se han hecho los preparativos mencionados. Durante este período los cultivos pueden estar sometidos a muchas variaciones, pero de inmediato podemos considerar dos factores muy importantes, la temperatura y el movimiento; los tejidos procedentes de animales de sangre fría se incuban a temperatura ambiente, mientras que los procedentes de animales de sangre caliente, se incuban a $37.5^{\circ}\text{C}.$, también podemos dejarlos en reposo o someterlos a movimientos que aseguran recambio en los líquidos en la superficie de cultivo, por ejemplo, el tambor rotatorio. En este último caso el movimiento debe ser suave y uniforme, de otra manera, los movimientos bruscos e irregulares actúan inhibiendo el crecimiento celular.

EQUIPO OPTICO

Los recientes avances de la Optica aplicada a la Biología ofrecen muy variados y ventajosos sistemas que permiten observar vivos a las células y a los tejidos cultivados in vitro. Desde luego que el empleo del tradicional sistema de campo claro, diafragmando en exceso o bajando el condensador, permite observar material vivo en fresco, pero en condiciones precarias y sin recursos que conduzcan al estudio de la subestructura fina celular. Por ello es indispensable contar en los modernos Laboratorios de Cultivo de Tejidos con sistemas ópticos como los de Contraste de Fases, Interferencia de la Luz y Contraste de Interferencias, los cuales ofrecen detalles inimaginables en la precisión estructural, tanto en contrastes y gamas de blanco, negros y grises con el Contraste de Fases, como imágenes policromas con los dos sistemas de Interferencia. En la serie de láminas que ilustran este texto podrá el lector advertir las ventajas que tales sistemas ofrecen.

Con cualquiera de los sistemas mencionados pueden visualizarse detalles de la membrana celular, aspecto estructural del citoplasma (gránulos, filamentos, vacuolas, etc.), neurofibrillas, miofibrillas, vacuolas pinocíticas, retículo endoplásmico, mitocondrias,

huso acromático, cromosomas, etc. todas estas estructuras *in vivo*.

Con el recurso de la Cámara de Rose podemos realizar observaciones periódicas de un mismo cultivo, de un mismo campo y aún de la misma célula durante días, semanas y aún meses.

Es recomendable que el sistema de contraste de fases disponga de condensadores de larga distancia focal, lo que permitirá ir más allá del grosor de los portaobjetos habituales y observar, sin distorsiones, las Cámaras de Rose o similares.

Además de contar con los sistemas ópticos mencionados (campo claro, contraste de fases, interferencia de la luz y contraste de interferencias) es conveniente disponer de equipo de Energía Ultra-violeta, ya que actualmente existen numerosas técnicas citológicas que se basan en las propiedades fluorescentes de algunas sustancias y componentes celulares.

Este equipo óptico es necesario combinarlo con equipo de cinematografía. No hay que olvidar que una de las principales ventajas del Cultivo de Tejidos consiste en disponer de células vivas y observar los cambios morfológicos que acompañan a las funciones celulares. Seguir cinematográficamente, con espaciador, el proceso de una división mitótica por medio de contraste de fases, es un espectáculo maravilloso que convence a adquirir un equipo de microcine-

matografía.

Aparatos de microcinematografía los hay muy variados y de componentes diversos, pero todos ellos ofrecen las mismas posibilidades básicas, es decir, primero, fuentes luminosas suficientemente poderosas para los requerimientos de sensibilidad de las películas que se van a emplear, segundo, dispositivos mecánicos o eléctricos que aseguran exposiciones seriadas con intervalos variables desde 24 imágenes por segundo hasta una imagen cada 24 horas, advirtiendo que la velocidad más empleada es la de 4 exposiciones por minuto. También es conveniente que las cámaras microcinematográficas cuenten con cámaras de mantenimiento térmico pues con frecuencia es necesario seguir incubando los cultivos durante la toma de la película.

Otro aparato que ofrece valiosa ayuda en los Laboratorios de Cultivo de Tejidos es el Micromanipulador con sus accesorios propios para la factura de microinstrumentos. Al micromanipulador también es conveniente agregarle dispositivo de foto y microfotografía.

Desde luego que el instrumental y equipo óptico varían y se complican de acuerdo con los diseños de los experimentos, pero el aquí descrito se considera el básico y de utilidad para cualquier estudio sobre Histología y Citología Dinámica.

Observación de los Cultivos

Los fragmentos explantados y cultivados según las técnicas -- mencionadas pueden observarse de diferentes maneras y para evaluar los resultados del cultivo, un método no excluye a otros.

La observación a simple vista de los tubos, botellas, cámaras de Rose, etc., permite obtener datos muy valiosos para la interpretación de lo que sucede en los cultivos. El cambio de color en el indicador empleado en el medio nutritivo informa de la acidez o alcalinidad del medio de cultivo. En la mayoría de los casos un cultivo exitoso se acompaña de neutralidad o cierto grado de acidez debido a una mayor actividad respiratoria con liberación de bióxido de carbono. Sin embargo, cambios muy marcados y bruscos sugieren suministro de nuevo medio de cultivo.

Por otra parte, el hecho de que los fragmentos explantados se mantengan en su sitio o se desprendan, permite considerar el grado de licuefacción del plasma o la vitalidad de tales explantados. Fragmentos que se desprenden suelen indicar fenómenos necróticos y autolíticos que exageran la licuefacción del plasma.

A simple vista también se pueden observar halos celulares en

torno a los fragmentos explantados o nebulosidades que cubren las superficies de cultivo y que indican emigración y multiplicación celular.

La observación con el microscopio en sistema de campo claro y con muy pocos aumentos se ha empleado desde un principio y aún se usa con resultados prácticos. Sin embargo, el advenimiento del sistema óptico de contraste de fases permite observaciones en fresco, in vivo, de las células, no sólo a pequeños y medianos aumentos, sino, muy ventajosamente, a grandes aumentos con objetivos de inmersión. De esta forma se obtienen imágenes detalladas de la estructura del citoplasma in vivo con notable ventaja sobre material fijado y teñido.

Otros sistemas ópticos, como el campo oscuro y la interferencia, se pueden utilizar en la observación de las células cultivadas obteniéndose imágenes particularmente bellas y útiles en el conocimiento de la estructura celular.

Por otra parte, la adaptación del registro cinematográfico a los descritos permite captar el dinamismo celular con detalles impresionantes, en especial cuando se emplean dispositivos espaciadores y después se proyecta la película a velocidad normal.

Para la microcinematografía ofrece ventajas especiales la Cámara de Rose, ya que permite mantener las células cultivadas vivas

bajo el microscopio por largos períodos de tiempo cambiándoles el -- medio nutritivo a través de la junta de hule.

La combinación de la interferencia de la luz y las películas de color permite imágenes policromas de la estructura celular in vivo - sin necesidad de emplear colorantes que, aún los llamados vitales, - comprometen la vida celular y alteran la morfología.

Desde luego que con las células y tejidos cultivados se pueden hacer estudios de la histología, citología, histoquímica, bioquímica, etc., como se podrían realizar con los tejidos y células no cultivadas.

Finalmente, con las células cultivadas se pueden hacer micro manipulación, estudios de electrofisiología y citofarmacología.

Material y Método

Material y Método

El material biológico empleado para la elaboración e ilustración de este trabajo procedió de las paredes de la cavidad oral, en particular de las mucosas gingival, vestibular y palatina, tanto de individuos humanos como de algunos animales (rata). El método de trabajo fué el propio del cultivo de tejidos, según las técnicas de siembra en laminillas flotantes, en tubos de ensayo, el método de la cámara de Rose y el de las botellas de Carrel.

Los fragmentos de mucosa gingival, palatina y vestibular se recibieron en solución salina (Hepes) estéril, con antibiótico (penicilina-estreptomicina) y después de lavados fueron finamente tallados hasta obtener fragmentos matrices o explantes que fueron sembrados según la técnica del coágulo de plasma de gallo y extracto embrionario sobre laminillas. Los cultivos así preparados se incubaron en tubos de ensayo a 37°C en medio nutritivo preparado con líquido ascitis y se agitaron suavemente en tambores rotatorios.

Cultivos semejantes se prepararon en Cámaras de Rose que se

incubaron a 37^o C, en el mismo medio nutritivo y en reposo.

Los cultivos se observaron diariamente al microscopio con luz tangencial. Se hicieron apreciaciones de cambios de pH en el medio (según el indicador empleado) y del crecimiento de halos celulares - neoformados en torno a los fragmentos.

Los cultivos se incubaron hasta 4 semanas.

De los cultivos óptimos se hicieron estudios y observaciones - con los sistemas ópticos de Contraste de Fases, de campo obscuro, de Interferencia policromática de la luz y Contraste diferencial de interferencias. De otros cultivos se practicaron, previa fijación en alcohol metílico, tinciones según la técnica de Jacobson (técnica panóptica a base de May-Grünwald-Giemsa).

Del material vivo y del teñido con resultados más demostrativos se hicieron registros fotomicrográficos y fotomicrocinematográficos. Con las mejores imágenes se ilustra este trabajo.

En este trabajo, como en cualquier otro de su género, el capítulo de material y método quedaría suficientemente desarrollado con lo escrito, pero es mi propósito, en atención a aportar y facilitar información real y práctica al lector interesado en este tipo de Temas, ampliar los capítulos referentes a Historia y Metodología del Cultivo de

Tejidos, sobre todo porque, así, a manera de información como crítica metodológica especializada, se abre el panorama de posibilidades del método en la investigación de la cavidad oral a toda persona interesada en esta especial área biomédica.

Resultados

Resultados

Salvadas las dificultades y peligros que encierran las contaminaciones derivadas de la procedencia de los explantes, los cultivos obtenidos a partir de la mucosa oral, en particular de la gingival, son espectacularmente bellos en base a la gran proliferación celular que de ellos deriva, en especial del epitelio.

Durante las primeras 12 a 24 horas de cultivo in vitro se advierte en los bordes de los fragmentos matrices la salida de células en forma de yemas de crecimiento.

La fig. 11 ilustra la emergencia de un grupo de histiocitos, mientras, que la fig. 12, muestra un grupo de células epiteliales emigrando del fragmento matriz y empezando a formar el halo de crecimiento. En uno y otro caso son notables la limpieza del cultivo y la vitalidad de las células, así como la diferenciación celular entre uno y otro prototipo celulares.

Pasadas 24 a 48 horas de cultivo la proliferación celular es muy activa; tanto epitelial como conectiva, de manera que suelen formar-

se láminas epiteliales sobre las cuales crecen a su vez células conectivas, fibroblastos, como la ilustra la fig. 13, ó la lámina crece con selectividad, como se advierte en la fig. 14, en donde se observa dominancia del prototipo epitelial.

Dependiendo de la profundidad de la biopsia y de los componentes celulares e histológicos contenidos en los fragmentos matrices, pueden advertirse en los bordes de los explantes o en el halo de emigración y crecimiento, además de los histiocitos y de las células epiteliales, elementos o yemas de crecimiento tales como tejido muscular estriado, células endoteliales y musculares lisas procedentes de los vasos; con frecuencia se reconocen células adiposas. Es notable que las células amiboides libres, tipo leucocitos y macrófagos son escasas desde el principio de los cultivos.

Entre 72 y 100 horas de cultivo se pone de manifiesto la dominancia del epitelio sobre cualquier otra variedad celular. Las figuras 15, 16, 17 y 18 que conforman la Lámina V ilustran diferentes sitios en torno al fragmento matriz o explante en los cuales se observan las diversas maneras de iniciarse la formación de las láminas epiteliales. La fig. 15 muestra la forma más común de crecimiento, proliferación y formación de láminas epiteliales a partir de una yema que emerge del fragmento matriz y, en forma continua, sin interrupciones de espa

cio, origina amplísimas láminas celulares epiteliales.

Las figs. 16, 17 y 18 ilustran, por el contrario, células epiteliales aisladas que, poco a poco mediante activa proliferación se reúnen y forman así los mosaicos epiteliales.

La Lámina VI ilustra con cuatro bellas microfotografías diversos sitios del halo epitelial a las 3 semanas de cultivo in vitro. Durante este tiempo la actividad proliferativa con gran número de divisiones celulares mitóticas es el hecho morfodinámico más destacado de los cultivos. Esta particular actividad mitótica se extiende de la segunda a la cuarta semana de cultivo.

Una vez estabilizados los cultivos el halo de crecimiento y proliferación está constituido prácticamente sólo por células del prototipo epitelial, figs. 19, 20, 21 y 22. Los mejores cultivos, de donde proceden nuestras ilustraciones corresponden a material humano. Conviene destacar que tratándose de material humano, los explantes de encía proporcionaron hermosos cultivos con notable predominancia de células epiteliales. Cuando los fragmentos matrices se obtuvieron en forma superficial y en ellos no quedaron comprendidos porciones de las papilas y estructuras conectivo vasculares, los cultivos obtenidos fueron de una extraordinaria pureza y limpieza, constituidos prácticamente sólo por células epiteliales, en forma tal que el crecimiento y forma

ción del halo de proliferación semeja y recuerda a los observados en los cultivos de cepas puras, figs. 21 y 22. En todo caso, en nuestra experiencia, estos cultivos superan a otros de explantes epiteliales como los procedentes de piel, mucosa intestinal o glándulas.

Las células epiteliales, de tamaño y morfología muy regular y semejante entre sí, crecen en delgadas láminas dispuestas en monocápa, en forma de mosaico. Las células recuerdan, por su morfología y disposición, a las del estrato espinocelular del cuerpo mucoso de los epitelios planos poliestratificados, con o sin capas de cornificación, fig. 23.

Entre las células se advierten espacios a manera de pasillos o canales de notable regularidad que se ven cruzados por finas y delgadas prolongaciones celulares que establecen relaciones y contactos intercelulares y que recuerdan a las epiteliofibrillas del estrato espinoso de los epitelios, figs. 23, 24, 25 y 26. Observaciones prolongadas de estas células mediante sistemas ópticos que no alteran la estructura de la materia viva, tales como el contraste de fases, la interferencia policromática y el contraste diferencial de interferencias, permiten ver que las finas prolongaciones espinocelulares de las células epiteliales no son estructuras rígidas, sino, por el contrario, prolongaciones celulares citoplásmicas muy cambiantes; comparar las imágenes 23 a la 26.

Los magníficos cultivos en monocapa que se obtienen a partir de los explantes de encía humana permiten observar en el halo de crecimiento muchos de los procesos morfodinámicos que tienen lugar en las relaciones celulares. Así, hemos podido observar que las prolongaciones celulares del tipo epiteliofibrillas son cambiantes y no estáticas o permanentes como parecen sugerirlo las imágenes histológicas en los cortes de los epitelios. Después hemos podido ver como los canales intercelulares también cambian de dimensiones y contienen líquido que, en muchos casos, se convierten en depósitos lacunales de líquidos, figs. 23 a la 26.

Estas células epiteliales de tipo espinocelular tienen una muy activa ingestión de líquidos, Pinocitosis; de manera que en su citoplasma se observan numerosas vacuolas que capturadas en la superficie celular se dirigen hacia el centro de la célula. Con la ayuda que representa la microcinematografía asociada al microscopio y a los modernos sistemas ópticos resulta impresionante la morfología dinámica de este fenómeno celular de endocitosis.

La membrana plasmática de estas células manifiesta una gran actividad, no sólo en los procesos de pinocitosis, sino también, como ya lo anotamos, en la emisión de prolongaciones filamentosas que establecen contacto con las células vecinas y en activos movimientos de ges-

ticulación que auspician la ingestión de los líquidos (medio nutritivo) que rodea a las células.

El citoplasma de estas células epiteliales es notablemente claro, transparente, en él se advierten abundantes estructuras finas en forma de gránulos, grumos, vacuolas, vesículas y canales, figs. 23 a la 30, todas ellas conformando la dotación de organitos (organelos) que se relacionan con los momentos de actividad celular; durante el reposo de la célula suelen ser escasos y consisten sólo en gránulos y finas vacuolas; en cambio, durante los momentos de mayor actividad celular suelen ser numerosos y de morfología más compleja y dispuestos densamente en torno al núcleo en donde suelen constituir el aparato yuxtannuclear de Golgi, de singular nitidez y belleza en estas células.

Dependiendo de la edad del cultivo y en relación a los cambios de medio nutritivo pueden observarse numerosas figuras de división celular mitótica cariocinética, figs. 23, 28, 29 y 30. Con la ayuda de la microcinematografía pueden registrarse los cambios y todo el proceso morfodinámico de la célula desde el principio de la mitosis hasta el momento en que las dos células se separan. Lo más notable de este proceso celular son los cambios morfodinámicos que tienen lugar en el núcleo y que culminan con la formación de los cromosomas. En las diferentes microfotografías que forman las Láminas VII y VIII

que ilustran nuestros resultados se pueden apreciar numerosas figuras de división mitótica cariocinética, desde la aparición del filamento cromosómico (profase), la fragmentación y formación de los cromosomas (metafase), el movimiento de los cromosomas y su orientación en el huso acromático con desplazamiento hacia la placa ecuatorial (anafase), hasta la constitución de las placas hijas (telofase) con la formación de las dos células hijas. La circunstancia de disponer de células vivas cultivadas y observadas con sistemas ópticos que no afectan a la materia viva, tales como, el contraste de fases, permite observar toda la belleza que constituye la morfología dinámica de tan delicada función celular. Las mitosis son numerosas y frecuentes, el tiempo promedio de una cariocinesis es de 5 a 10 minutos, y en una hora pueden advertirse centenares de ellas en el halo de crecimiento.

Los cambios de medio nutritivo de los cultivos son generalmente seguidos por una mayor actividad mitótica; sin embargo, en buenos cultivos prácticamente siempre es posible advertir las mitosis en cualquier parte del halo; lo mismo se observan en la periferia, borde libre del halo, que en la parte media o en la porción profunda del halo y en la vecindad del fragmento matriz.

El núcleo de las células epiteliales es grande, vesiculoso, claro, suele ser único en cada célula.

La membrana nuclear es muy nítida y aún con las limitaciones de resolución de los sistemas fotónicos puede advertirse su estructura de doble membrana. Algunos núcleos presentan vacuolas claras que contrastan con zonas vecinas más densas y oscuras; figuras de las Láminas VII y VIII.

Irregularmente distribuidas en el halo de crecimiento se advierten algunas células epiteliales cuyos núcleos son polimorfos, segmentados, con lobulaciones muy irregulares; cada segmento o lóbulo nuclear suele tener un corpúsculo central a manera de nucleolo. El nucleolo es grande, generalmente múltiple, pero en todo caso, muy grande y, al contraste de fases, muy denso y oscuro.

El estudio del halo de proliferación y crecimiento epitelial mediante otros sistemas ópticos, en especial con los de interferencia policromática y de contraste diferencial de interferencias, resalta la existencia de estructuras finamente granulares en el citoplasma de las células epiteliales, Lámina IX, figuras 31 a la 34. Estas granulaciones son irregulares en cantidad, tamaño, aún cuando predominan las de pequeño y mediano tamaño; son muy diferentes a los organelos celulares (mitocondrias, vacuolas, etc.), no parecen tener estructura alguna, son anhistos, hialinos, densos al contraste de fases y hacen firme relieve al contraste diferencial de interferencia. Sus principales características tintoriales histoquímicas les identifican con gránulos de eleidina y queratohialina en el proceso de queratinización.

La Lámina X ilustra algunos de los principales aspectos que toman los cultivos que podríamos considerar "viejos", es decir, cuando han transcurrido más de 4 a 6 semanas de cultivo in vitro. Las dos primeras imágenes, las Figs. 35 y 36, formadas por cultivos fijados en alcohol metílico y teñidos según la técnica panóptica de Jacobson, muestran los fragmentos matrices en el centro y, rodeados de magníficos halos de proliferación prácticamente constituídos por mosaico epitelial; en la Fig. 36, se advierten también algunas puntas filamentosas de células conectivas que han crecido sobre la lámina principal epitelial. También en el fragmento matriz de la Fig. 36 se observan

cavidades alveolares (en blanco).

Las Figs. 37, 38 y 39 corresponden a detalles de cavidades alveolares que crecen o se desarrollan en el espesor de las láminas de cultivo, en especial en la vecindad de los fragmentos matrices. En la Fig. 37, correspondiente al borde de una de esas cavidades alveolares se distingue con precisión el borde cavitario revestido, a su vez, por células epiteliales. También se aprecia una fibra que plantea la determinación de su origen, pensando que no puede ser nada más que conectiva precolágena o nerviosa. En cultivos subsecuentes se tratará de poner en claro este hallazgo.

Aún cuando el crecimiento de las células epiteliales sea exuberante y pertenezca a cultivos "viejos" pueden observarse secciones del halo en las cuales las células epiteliales muestran su característico aspecto de prototipo epitelial. Como se ilustra en la Fig. 38.

La Fig. 39, muestra el borde de otra cavidad areolar fraguada en el espesor del crecimiento epitelial yuxta fragmento matriz. Estas cavidades y en conjunto, el aspecto de las ilustraciones que conforman la Lámina X sugieren fenómenos de diferenciación histioide y organoide en los cultivos viejos, desde luego que sin advertir ningún plan de arquitecturación definida. En todo caso, es muy atractiva la conducta de los fragmentos de mucosa gingival cultivada in vitro ya que su crecimiento celular es abundante, muy diferenciado, dominante

Discusión

Discusión

En lugar de una discusión concerniente a los resultados obtenidos al sembrar y cultivar in vitro los tejidos de la cavidad oral, me parece más indicado hacer algunos comentarios encaminados a exaltar las ventajas que el método del Cultivo de Células y Tejidos representa y ofrece en la investigación biomédica de la cavidad oral, no sólo desde el punto de vista de la Estomatología, sino muy en especial de la Odontología.

Por los resultados obtenidos y ampliamente ilustrados en las láminas que acompañan al texto, puede advertirse que los tejidos procedentes de la cavidad oral, en especial, la mucosa gingivodental, son viables, se adaptan a las nuevas condiciones microecológicas que representa el Cultivo in vitro y rápidamente se expresa su vitalidad en amplios halos celulares, al principio de emigración, después de proliferación seguida de diferenciación celular. La abundancia de divisiones mitóticas en los cultivos es el mejor exponente de esta actividad proliferativa en relación a la gran viabilidad de los explantes. También, de particular importancia biológica resulta la diferenciación celular que se advierte en las células del halo de crecimiento. Aún cuando en algunos cultivos se observan abundantes fibroblastos, por cierto, en actividad fibrogénica, la mayor parte de las células que constituyen

el halo de crecimiento son del prototipo epitelial, variedad basal y espinoso; en estas células poligonales, en mosaico, laminares, son muy notables las epiteliofibrillas, y recuerdan rápidamente a las células que integran el cuerpo mucoso de Malpighio de la epidermis y de las mucosas. De manera que las células derivadas de los explantes gingivodentales no sólo han resistido el traumatismo que representa la toma de la biopsia, las manipulaciones propias de la siembra y del cultivo, sino que se han adaptado rápida y profundamente a las nuevas condiciones microecológicas del cultivo, in vitro, llegando, por encima de la proliferación, a la diferenciación morfológica propia de su prototipo, pero además, a la diferenciación funcional, ya que muchas de estas células exhiben en su citoplasma figuras de cornificación en su nivel de gránulos de heleidina y de queratohialina, sin llegar a la cornificación total.

Estos hechos biológicos descritos rápidamente en los cultivos de explantes de la cavidad oral, son suficientes por si mismos, para indicar y aplicar el procedimiento del Cultivo de Tejidos y Células a la cavidad oral. Con estos cultivos se puede proyectar y construir modelos biológicos celulares experimentales que permiten estudiar las respuestas celulares, tisulares, ante cualquier estímulo natural o patológico.

La conocida rápida regeneración y cicatrización de la mucosa oral, en especial de la gingivodental, parece encontrar bases y explicación biológicas en la proliferación y diferenciación celulares en los cultivos in vitro.

Especial comentario merece la actividad proliferativa de las células cultivadas, con abundancia de figuras mitóticas, ya que constituyen un material celular biológico ideal para estudios de citogenética pues estos cultivos tratados con colchicina proporcionan numerosas figuras mitóticas en anafase.

Las observaciones al microscopio pueden hacerse con sistema óptico de Contraste de Fases o, después de fijar los cultivos en alcohol metílico, se pueden teñir con las técnicas convencionales de Jacobson o del Rojo neutro y observarse en Campo Claro. En ambos casos las imágenes de los cromosomas son particularmente bellas y con ellas se pueden construir valiosos cariotipos. Con estos comentarios no se pretende desplazar o substituir al cultivo de leucocitos por el de la mucosa gingival, pero ambos procedimientos podrían completarse uno al otro, en especial en el caso de alteraciones disgenéticas, en atención a la que la biopsia de la mucosa gingival es tan sencilla y simple como tomar una muestra de sangre. La biopsia de mucosa gingival puede sembrarse y cultivarse en cámara de Rose lo cual permite observaciones repetidas, casi diarias, al microscopio sin dañar

a las células. Este procedimiento unido a la microfotografía y a la microcinematografía nos proporciona una secuencia morfodinámica de la división celular muy superior en su valor y significado biológico a la información que ofrece el cariotipo derivado del cultivo de linfocitos sanguíneos.

Sin embargo, el campo de estudio e investigación al que los modelos biológicos contruïdos con las células cultivadas in vitro a partir de los explantes de tejidos bucales, ofrece mayores posibilidades de explorar con resultados originales y de gran aplicación a la Clínica Odontológica, es el del estudio de la acción farmacodinámica de las células y de los tejidos bucales a sustancias y materiales que se emplean en Odontología durante las maniobras propias de la Prótesis Total, Prótesis Parcial, de la Endodoncia, Ortodoncia, Parodoncia, - Odontología Preventiva, Odontología Integral (Amalgamas, incrustaciones, resanar, silicatos, cementos abrasivos, etc.).

La lista de las sustancias que se podrían explorar se antoja muy larga, casi infinita, pero en ella podrían figurar los antibióticos, tanto de aplicación tóptica, local, como los de distribución sanguínea; al lado se podrían estudiar extractos y sustancias derivadas de bacterias y flora y fauna normal y flora y fauna normal y patológica de la cavidad oral.

Mediante estos estudios es de esperarse poder entender me-

por ese grupo de reacciones celulares y tisulares de la boca en los cuales no siempre es fácil, y sobre todo, seguro, saber si se trata de reacciones tóxicas, procesos inflamatorios, respuestas bacterianas, intolerancia a medicamentos o materiales dentales, fenómenos de inmunorespuesta, etc.

A continuación ofrecemos una lista, muy incompleta, pero sugerente de los principales sustancias que empleándose en la cavidad oral, pueden estudiarse en su acción farmacodinámica sobre las células y tejidos gingivodentales y mucosa bucal cultivadas in vitro.

Corticosteroides (pomadas tópicas en encía).

Anestésicos inyectados y spray (tópicos).

Astringentes.

Dentríficos.

Enjuagatorios (menos agresores que los astringentes).

Apósitos.

Desensibilizantes (al dolor de la dentadura).

Materiales dentales (como cemento, curaciones temporales, antisépticos).

Vasoconstrictores.

Cementos dentales.

Formocresol (momificador del nervio).

Paramouofenol alcanforado (momificador del nervio).

Drogas.

Cigarros.

Prótesis fija y removible (metales oro, cromo, resinas, acrílicos, porcelana).

Puentes, placas, Corega (adherentes).

Aparatos de Ortodoncia.

Obturaciones (amalgama, incrustaciones de metal silicatos, resinas).

Alcohol.

Fármacos.

Endodoncia (gutapercha).

Conclusiones

1. La mucosa que reviste la cavidad oral, en todos sus diferentes tejidos y en cualquiera de sus situaciones, constituyen magnífico material biológico para ser cultivados in vitro.
2. Con el propósito de relacionar el Cultivo de Células y Tejidos in vitro con la Odontología, los fragmentos explante cultivados se tomaron de la mucosa gingival, lo que se logra mediante muy sencilla técnica quirúrgica.
3. Los tejidos de la cavidad oral permiten cultivos primarios de largo término (de 4 a 8 semanas) lo que permite observaciones prolongadas de histio y citodiferenciación, sin necesidad de recurrir a trasplantes.
4. En los fragmentos explantados de mucosa gingival predomina la proliferación epitelial con el desarrollo ulterior de amplios y magníficos halos formados por mosaicos laminares epiteliales.
5. Los halos epiteliales son del más puro prototipo epitelial y morfodinámicamente recuerdan al estrato espinocelular de los epitelios poliestratificados, inclusive se observan figuras citológicas de cornificación.

6. Durante las fases de crecimiento del halo con gran proliferación celular son abundantes las divisiones mitóticas que lucen en toda su magnificencia la belleza de los detalles de las fases de la división celular. Esto constituye un magnífico material para estudios genéticos con la formación de idiogramas y cariotipos humanos.
7. Los registros, microfoto y microcinematográfico proporcionan imágenes que muestran y exaltan las propiedades dinámicas vitales de las células que revisten la cavidad oral y sus posibilidades reactivas a procesos biológicos como la cicatrización.
8. Estos cultivos in vitro representan valioso material para construir modelos biológicos celulares experimentales con los cuales estudiar la biología de las células y tejidos de la cavidad oral así como las respuestas y conducta biológica ante la acción de fármacos, sustancias y materiales empleados durante las maniobras y tratamientos odontológicos.
9. Quizá la principal conclusión de esta Tesis sea la proposición de que el Cultivo de células y tejidos in vitro se aplique, con las adaptaciones correspondientes, a la Investigación y Enseñanza en la Odontología. Los resultados son seguros, el procedimiento es sencillo y con él se pueden construir todo género de modelos biológicos experimentales.

Resumen

En esta Tesis me he propuesto poner de manifiesto la particular indicación y ventajas que tienen el Cultivo de Células y Tejidos in vitro en el estudio de la biología de la cavidad oral, muy en especial, desde los puntos de vista de la Odontología, tanto de las necesidades de la Investigación biomédica como de los recursos de la Enseñanza.

Los tejidos de la cavidad oral resultan de muy fácil acceso y la toma de explantes para cultivos in vitro son muy fáciles de realizar dentro de las maniobras del ejercicio Odontológico.

El caudal de información morfodinámica biomédica que el Cultivo de Células y Tejidos in vitro proporciona es muy abundante y de valiosa contribución al mejor conocimiento de la biología, patología y farmacología de los tejidos de la cavidad oral.

En una primera parte, además de una amplia información histórica, me permití una rápida y breve exposición de la esencia, requerimientos y técnicas del cultivo de células y tejidos, enfocando siempre todo ello hacia la posibilidad de aplicarlo, iniciarlo y desarrollarlo en la Odontología, en nuestra Facultad.

El Cultivo de Células y Tejidos in vitro, como rama de la Biología, se inició hace poco más de 80 años y de una manera u otra

ha penetrado en las diversas ramas y especialidades de la Medicina y de la Biología; contrastando con su escasa aplicación en la Odontología, cuando con las células y tejidos cultivados se pueden armar espléndidos modelos biológicos celulares experimentales que podrían resolver muchos de los problemas de conducta celular y tisular de la cavidad oral.

Esta Tesis va acompañada de bellas láminas con imágenes de los resultados celulares obtenidos en el cultivo in vitro de explantes de mucosa gingival y, para la exposición temática, se dispone de registros microfotocinematográficos que proporcionan extraordinarias imágenes de conjunción morfodinámica en células vivas.

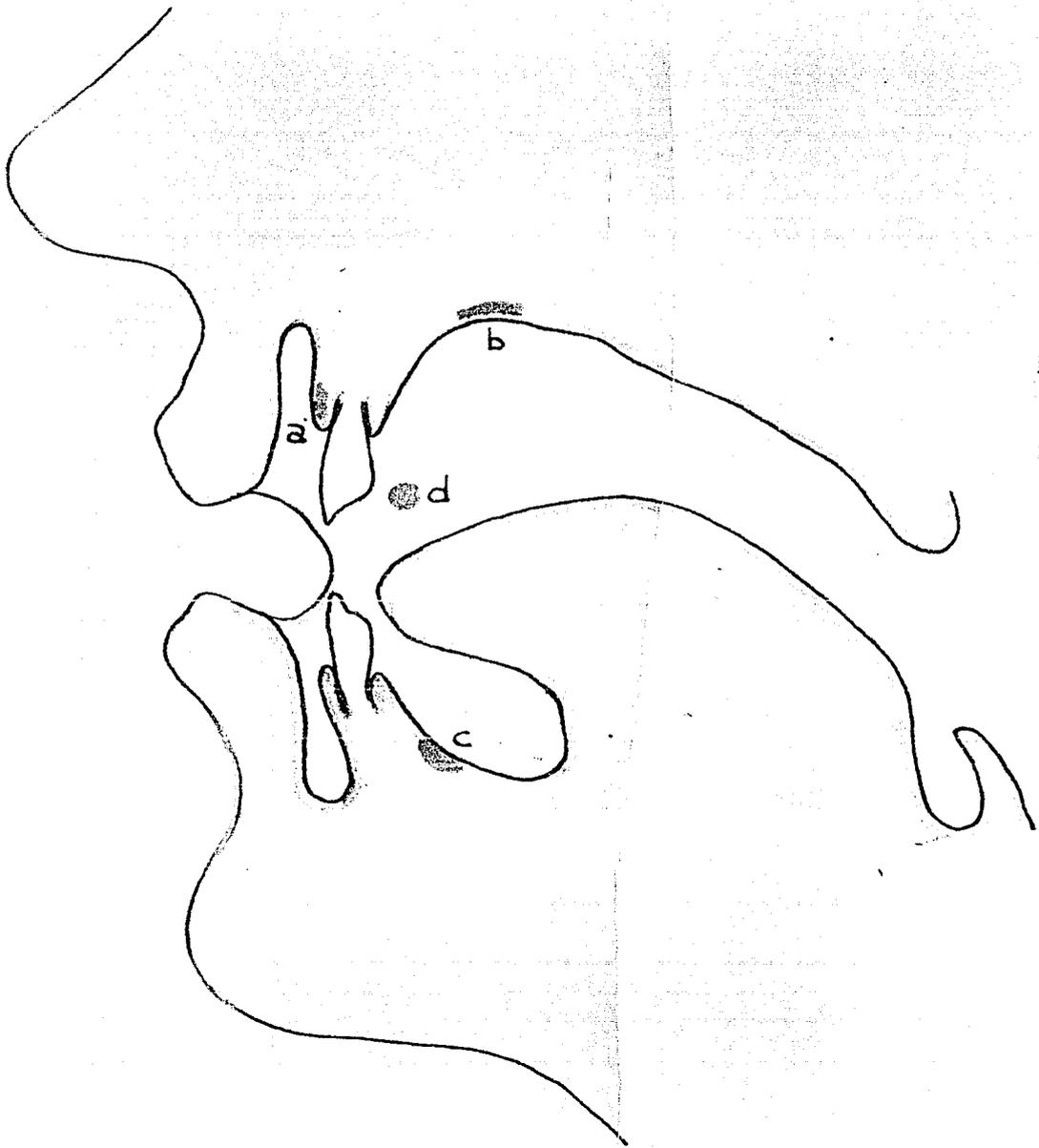
Ilustraciones

ESQUEMA I

En este esquema se señalan los 4 sitios de los cuales proceden las biopsias de la mucosa oral que fué cultivada in vitro.

- a) Encía libre o encía marginal.
- b) Mucosa palatina lateroanterior.
- c) Mucosa piso de la boca o surco sublingual.
- d) Mucosa vestibular bucal.

Esquema I

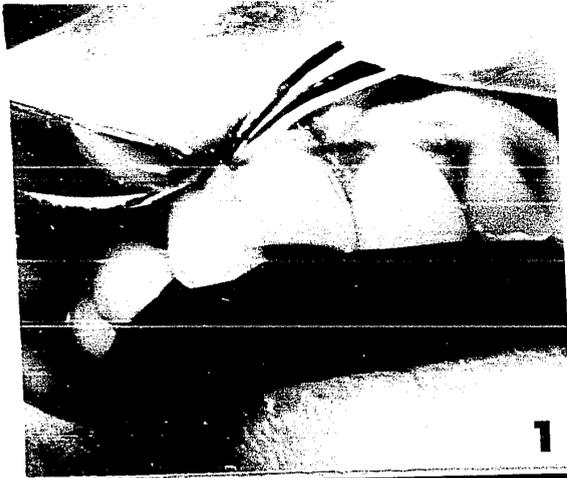


LAMINA I

Maniobras para la toma de la biopsia de los diferentes tipos de mucosa oral, sólo se emplearon pinzas de punta fina y curva; el corte se hizo con bisturí. No fué necesario el empleo de anestesia. La hemostasis fué por simple compresión.

1. Biopsia de encía libre o encía marginal.
2. Biopsia de mucosa del techo palatino.
3. Biopsia de la mucosa del vestíbulo bucal.
4. Biopsia de mucosa del piso de la boca (surco sublingual).

Lámina I



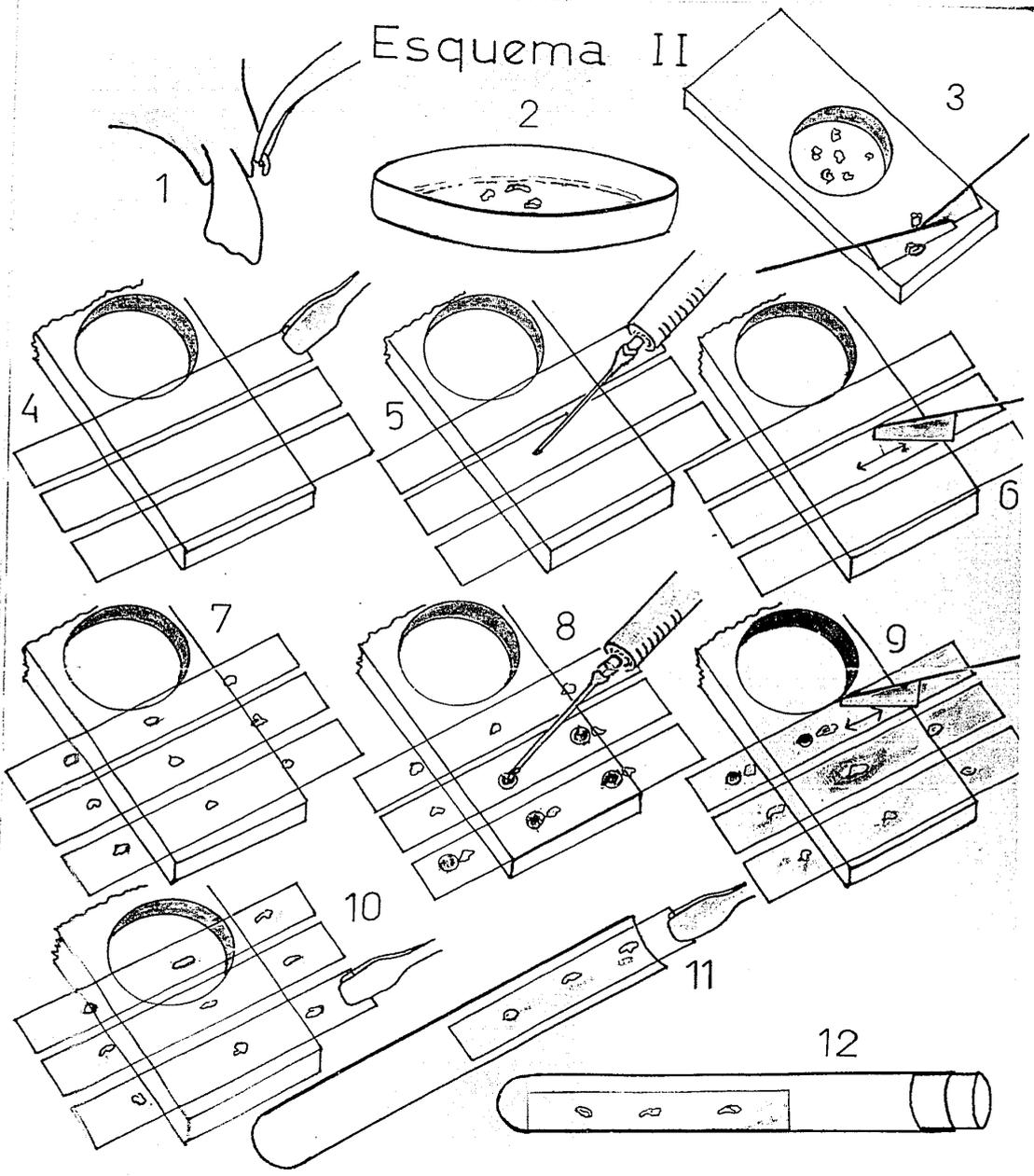
7. En cada laminilla se colocan 3 explantes de la biopsia.
8. Se agrega una gota de extracto embrionario de pollo por cada fragmento.
9. Se mezclan las gotas del extracto embrionario con el plasma y los explantes.
10. Después de reposar los cultivos, 10 minutos, se forma un coágulo, laminar, firmemente adherido a la laminilla y que contiene los explantes.
11. Mediante pinzas con "punta de palita", las laminillas, - portando los explantes en el coágulo, se introducen a los tubos de ensayo donde se cultivaran.
12. Las laminillas-cultivo se dejan reposar unos 15-20 min. en el tubo de ensayo tapado con tapón de hule neutro. Finalmente, se agrega el medio nutritivo, 2 ml. por tubo.

ESQUEMA II

Principales pasos técnicas del cultivo de tejidos según
"laminilla flotante".

1. Toma de la biopsia.
2. Los tejidos se reciben en Caja de Petri con solución salina balanceada, estéril, pH-7.2.
3. En un portaobjetos excavado de Maximow se tallan los pequeños fragmentos de la biopsia y se preparan los explantes.
4. Se colocan las laminillas sobre el portaobjetos de Maximow.
5. En cada laminilla se colocan 3 gotas de plasma de gallo.
6. Con una navajita se extienden las gotas de plasma para formar una película sobre el cubreobjetos.

Esquema II



LAMINA II

Algunas de las técnicas más frecuentes en el Cultivo de -
células y tejidos .

- Fig. 5. Tallado y preparación de explantes tisulares.
- Fig. 6. Siembra de fragmentos en laminilla flotante con coágulo de plasma.
- Fig. 7. Siembra en Cámara de Rose. Este método es particularmente útil para seguir la evolución de los fragmentos, permite ver con detalle el crecimiento celular y nos permite hacer registros cinematográficos.
- Fig. 8. Cultivo en Botellas. El Cultivo de células y tejidos en botellas (de Carrel) permite obtener células en grandes cantidades creciendo en monocapa.

Lámina II

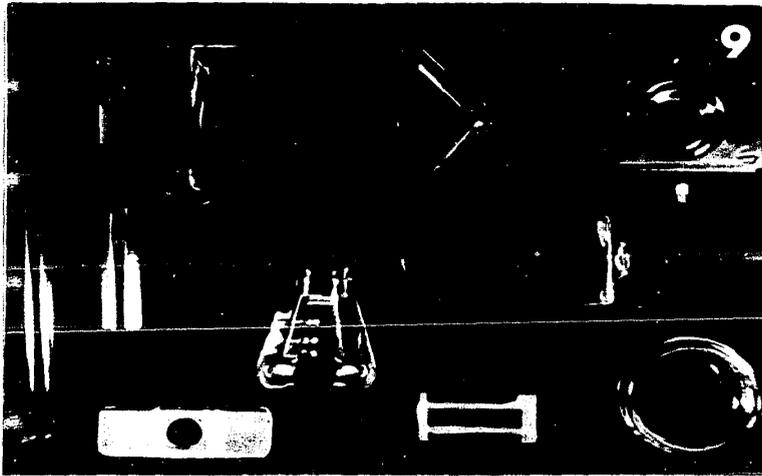


LAMINA III

Fig. 9. Diverso material de cristal que se emplea en los métodos de Siembra más comunes. Laminillas y Portaobjetos. Portaobjetos de Maximow. Cajas de Petri. Matraces. Tubos de ensayo. Botellas (de Carrerl), Cámara de Rose.

Fig. 10. El empleo de bata y mascarilla tapa-bocas, facilita la antisepsia durante las maniobras de siembra.

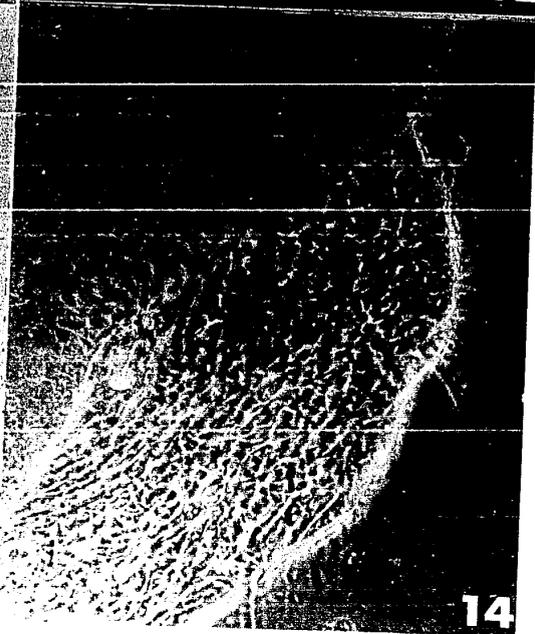
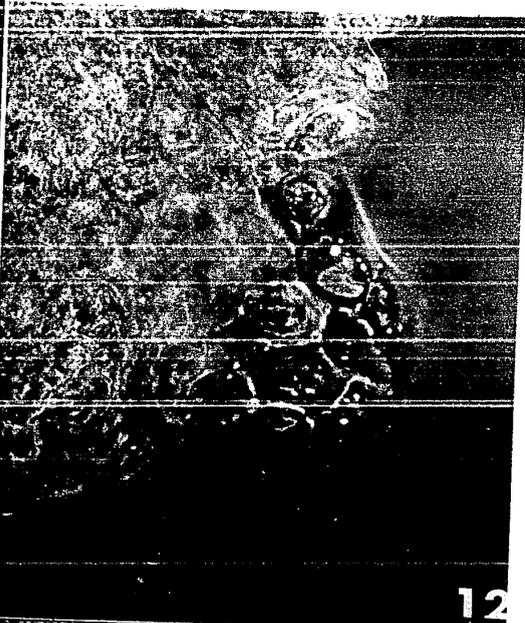
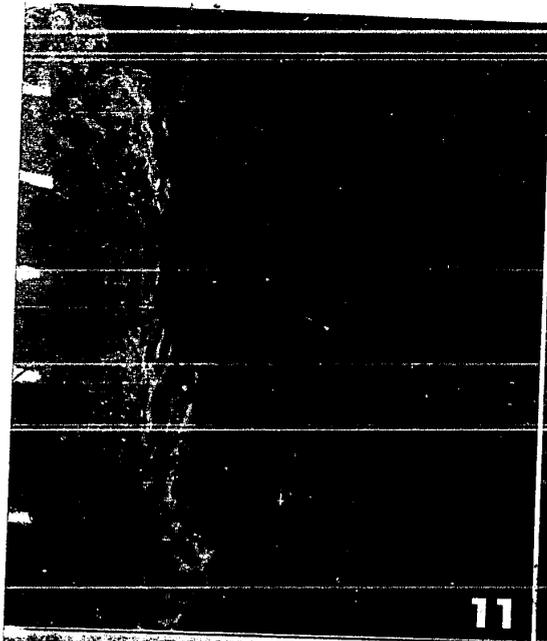
Lámina III



LAMINA IV

- Fig. 11. Mucosa gingival humana. Fragmento Matriz. Emergencia de histiocitos en el borde del explante. Contraste de Fases. 72-100 hrs. de cultivo.
- Fig. 12. Mucosa gingival humana. Fragmento Matriz. Lámina de células epiteliales empezando a formar el halo de crecimiento. Contraste de Fases. 72-100 hrs. de cultivo.
- Fig. 13. Mucosa gingival humana. Fragmento Matriz. Lámina epitelial constituyendo el halo de activo crecimiento, la cual brotes de células conectivas (fibroblastos) forman un segundo plano de proliferación. Contraste Diferencial de Interferencias. 24-48 hrs. de cultivo.
- Fig. 14. Mucosa gingival humana. Borde del fragmento matriz. Predominación del prototipo epitelial.

Lámina IV



LAMINA V

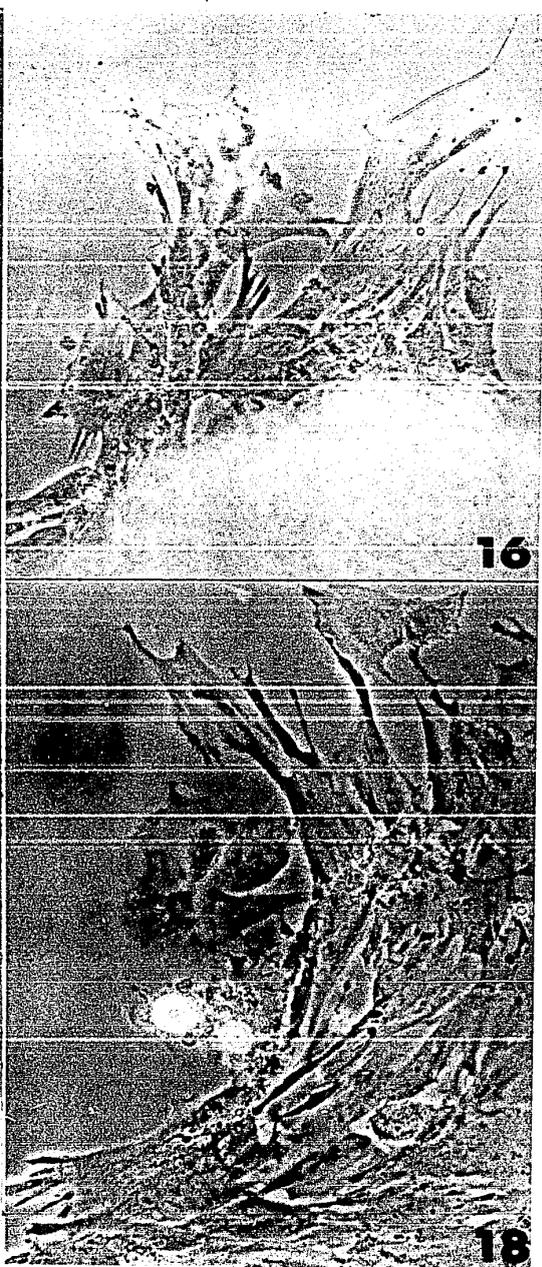
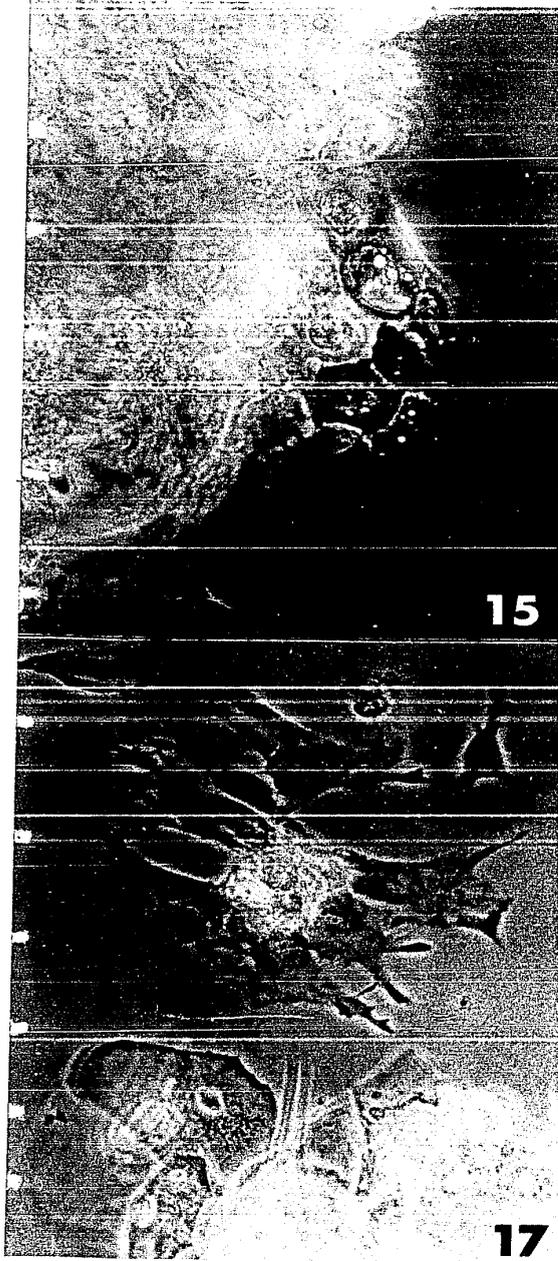
Figs. 15, 16, 17 y 18. Mucosa gingival humana. Secuencia del crecimiento epitelial desde la formación inicial de yemas laminares hasta el desarrollo y predominación de láminas y células epiteliales puras. Estas imágenes provienen de cultivos entre 72 y 100 horas.

La Fig. 15 es ejemplo del crecimiento laminar regular continuo del epitelio, mientras que las Figs. 16, 17 y 18 ilustran, por el contrario, células epiteliales aisladas, sueltas, que poco a poco, mediante activa proliferación se reúnen y forman mosaicos epiteliales.

Contraste de Fases

72-100 horas de Cultivo.

Lámina V



LAMINA VI

Fig. 19, 20, 21 y 22. Mucosa gingival humana. Halo epitelial a las 3 semanas de Cultivo in Vitro.

Extraordinaria pureza de las células epiteliales que forman el halo de crecimiento.

Contraste de Fases.

3 Semanas de Cultivo.

Lámina VI



19

20

22

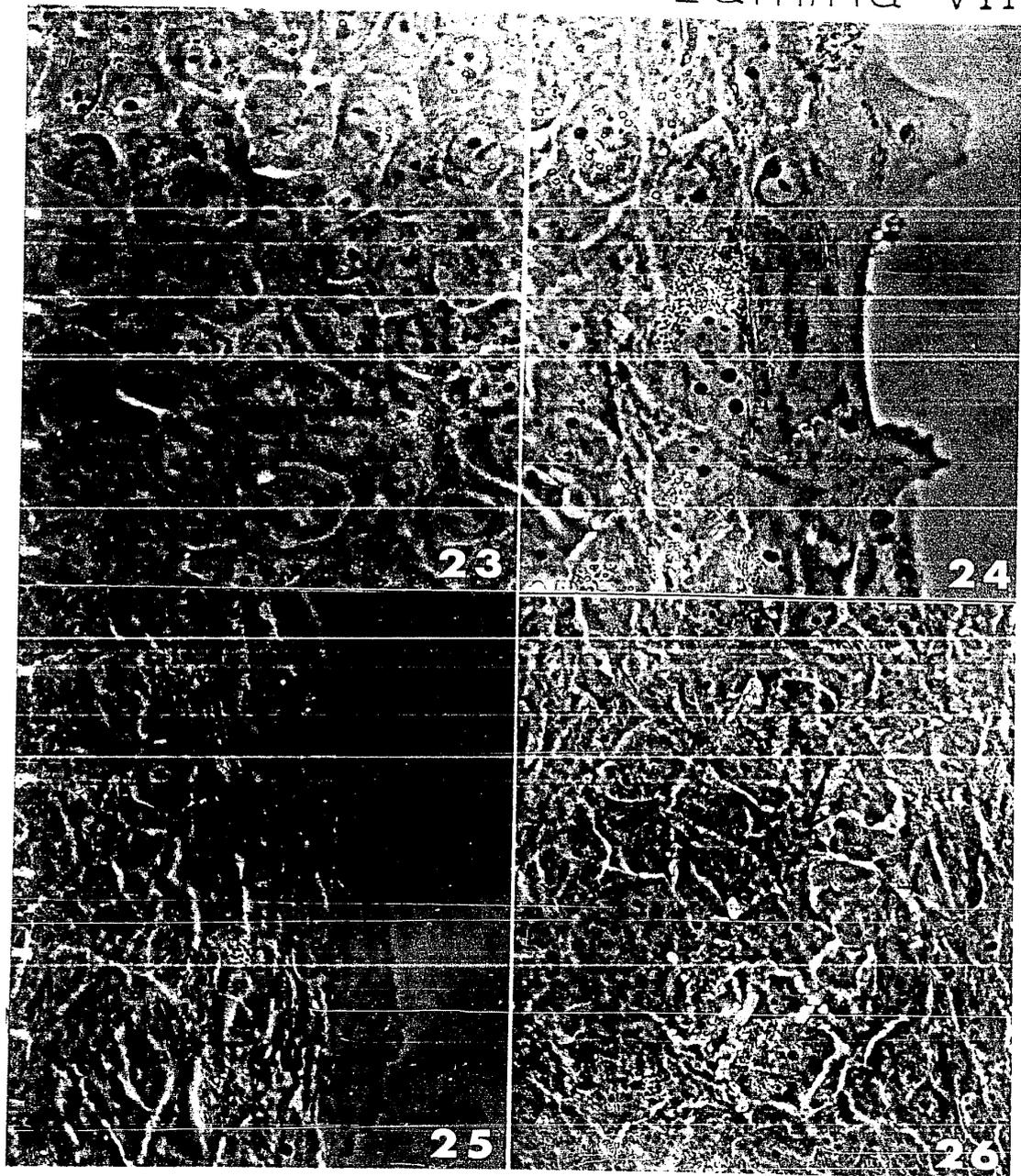
LAMINA VII

Figs. 23, 24, 25 y 26. Mucosa gingival humana. Halo epitelial. Las figuras ilustran con lujo de detalles, las láminas epiteliales en las cuales las células recuerdan por su morfología y relaciones a las del estrato espinoso de los epitelios poliestratificados (cuerpo mucososo de Malpighi). Los detalles celulares son particularmente hermosos, así como los canales intercelulares cruzados por las epiteliofibrillas.

Contraste de Fases.

3 Semanas de Cultivo.

Lámina VII



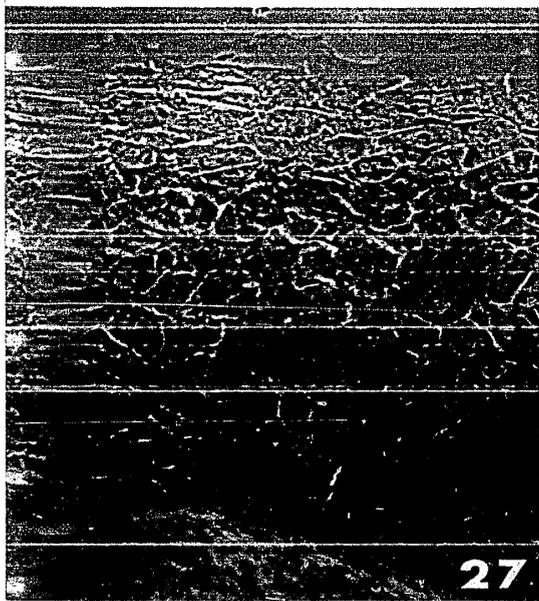
LAMINA VIII

Figs. 27, 28, 29 y 30. Mucosa gingival humana. Magníficos detalles de las células epiteliales del halo de crecimiento. Cambios - morfodinámicos entre los que se distinguen los relativos a los núcleos en fases del proceso de Multiplicación Celular por el mecanismo de - Mitosis.

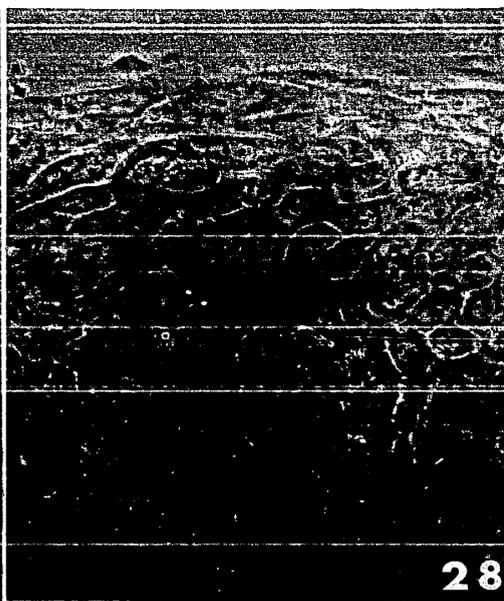
Contraste de Fases.

3 Semanas de Cultivo.

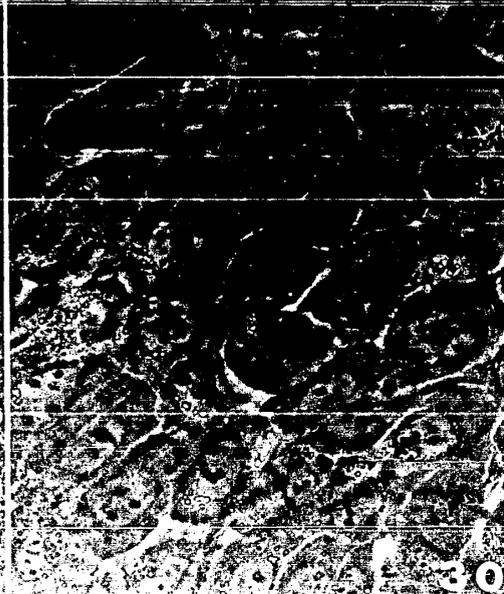
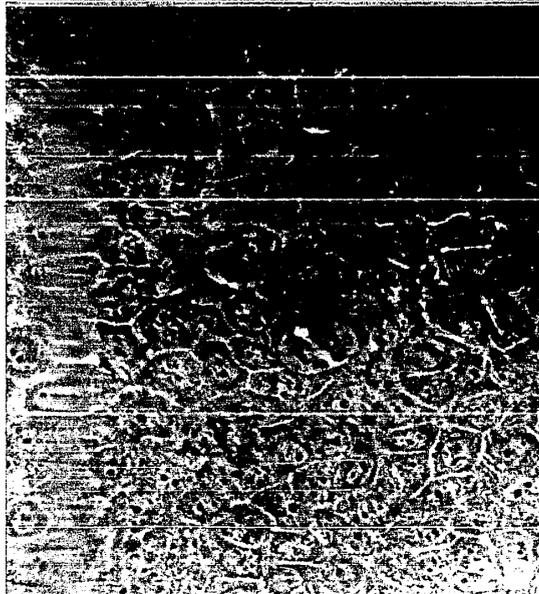
Lámina VIII



27



28



30

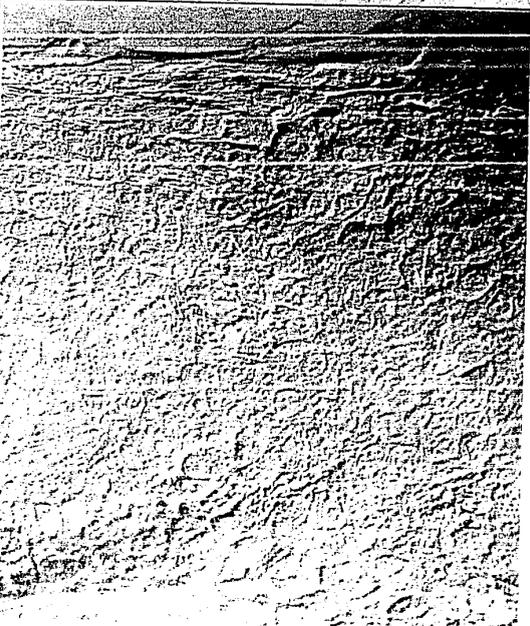
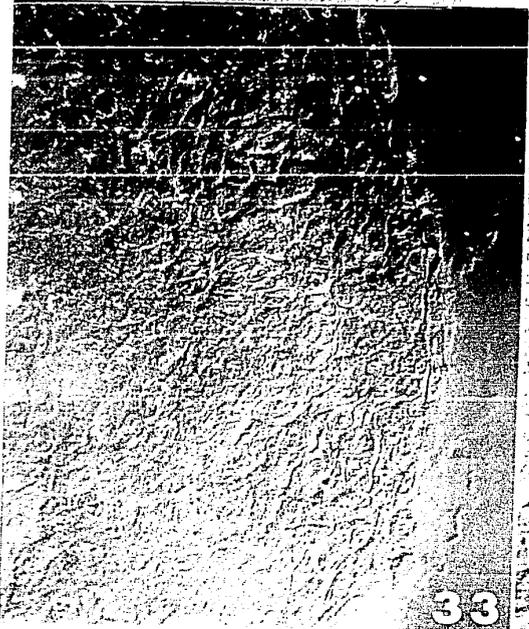
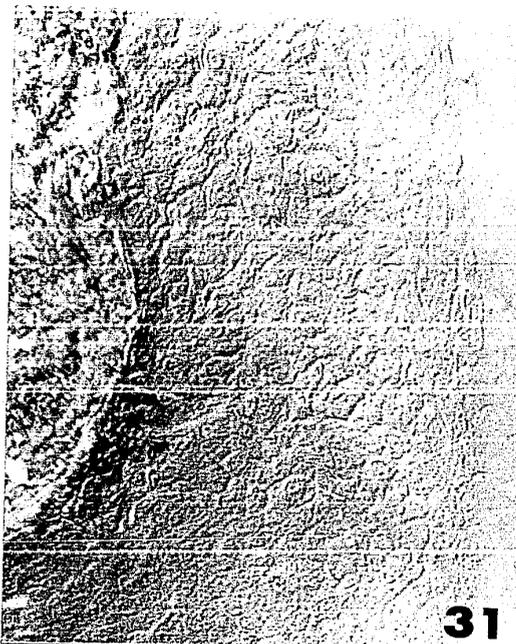
LAMINA IX

Figs. 31, 32, 33 y 34. Mucosa gingival humana. Halo de crecimiento epitelial. Granulación de heleidina y de queratohialina en el proceso de queratinización.

Contraste Diferencial de Interferencias.

3 a 4 Semanas de Cultivo.

Lámina IX



LAMINA X

Figs. 35 y 36. Mucosa gingival humana. Imágenes panorámicas de dos fragmentos de mucosa gingival cultivadas in vitro durante 4 a 5 semanas. En ambas imágenes es notable la exuberación de crecimiento del halo de proliferación epitelial. Adviértase en la Fig. 36, el crecimiento filamentososo de células conectivas.

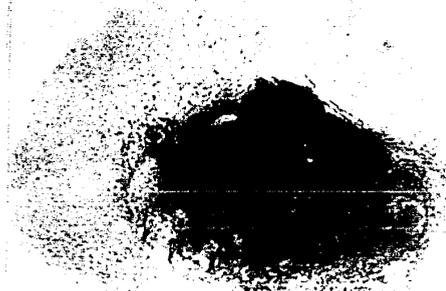
Figs. 37, 38 y 39. Cambios morfodinámicos histiogénicos y organoides según las cuales se forman cavidades y condensaciones en el espesor del halo de crecimiento.

Figs. 35 y 36. Técnica de Jacobson.

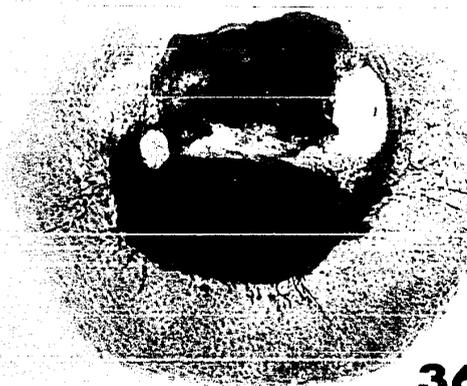
Figs. 37, 38 y 39. Contraste de Fases.

5 - 6 Semanas de Cultivo.

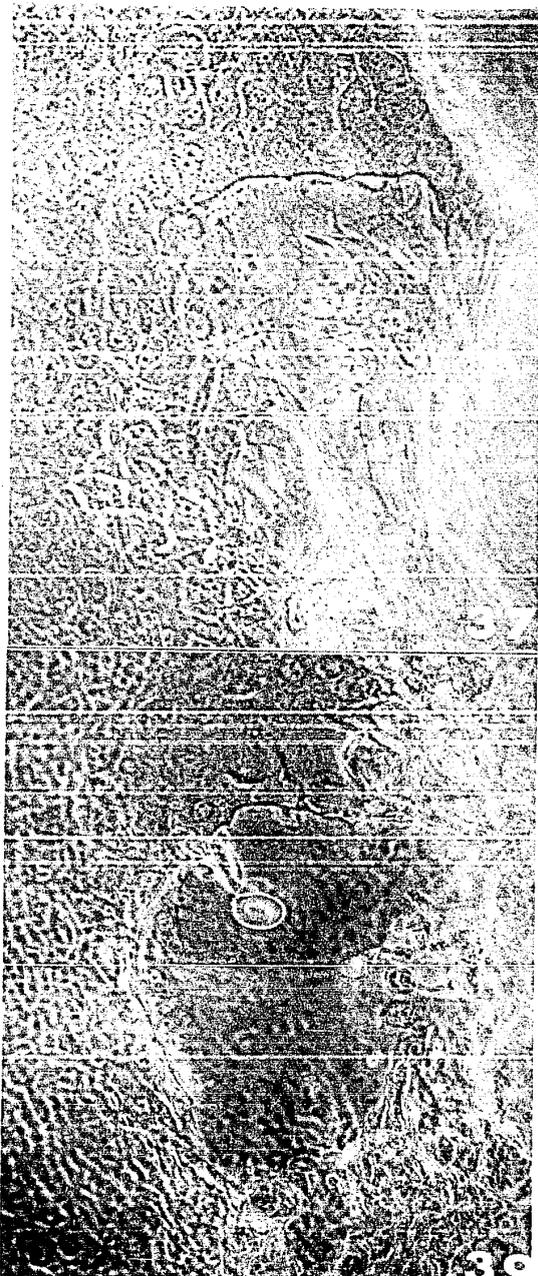
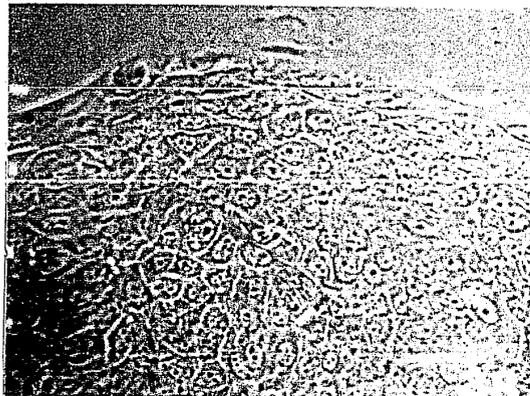
Lámina X



35



36



38

BIBLIOGRAFIA

1. Arnold, J. Ueber Theilungsvorgänge an den wanderzellen, ihre progressiven Metamorphosen.
Arch. mikr. Anat. 30: 205-326, 1887.
2. Bernaldo de Quirós, E. El Cultivo de Tejidos como Método de investigación en la Biología Celular Experimental. Tesis Recepcional. Facultad de Ciencias, UNAM 1968.
3. Burrows, M. T. The cultivation of tissues of the chick embryo outside the body.
Am. Med. Assoc. J. 55: 2057-2058, 1910.
4. Carpentier, E. Growth and differentiation of avian femur rudiments on clots containing either dried plasma or fraction I fibrinogen and thrombin of bovine origin.
Anat. Rec. 103: 432, 1949.
5. Carrel, A., Baker, L.E. y Ebeling, A.H. The effect of certain pure chemicals on the growth of the tissues of the body.
Am. Med. Assoc. J. 55: 1379-1381, 1910.
6. Carrel, A. Technique for cultivating a large quantity of tissue.
J. Expert. Med. 15: 393-396, 1912.
7. Carrel, A. Tissue culture and cell physiology.
Physiol. Rev. 4: 1-20, 1924.
8. Carrel, A y Baker, L. E. Chemical nature of substances required for the growth of fibroblasts and epithelial cells.
Soc. Expert, Biol. Med. Proc. 23: 627-628, 1925-1926.
9. Carrel, A. y Baker, L. E. y Ebeling, A. H. The effect of certain pure chemical substances on the multiplication of sarcomatous rat fibroblasts.
Arch. exper, Zellforsch. 5: 125-127, 1927-1928.
10. Carrel, A. Modern techniques of tissue culture and results.
Arch. exper. Zellforsch. 6: 70-81, 1928.

11. Carrel, A. Some new techniques for the cultivation of tissues (Cinema film).
Arch. exper. Zellforsch. 11: 364, 1931.
12. Fell, H. B.: The development in vitro of the isolated otocyst of the embryonic fowl.
Arch. exper. Zellforsch. 7: 69-81, 1928.
13. Fell, H.B.: The application of tissue culture in vitro to embryology.
Roy Micr. Soc. J. ser. 3, 60: 95-112, 1940.
14. Fischer, A. y Demuth, F. Eiweissabbauprodukte als wachstumsfördernde Substanzen.
Arch. exper. Zellforsch. 5: 131-142, 1927.
15. Fleisch, L.: A comparative study of the buccal and lingual gingival tissues of the vervet monkey.
J. Periodontal Res. 9 (2): 95-99, 1974.
16. Forsslund, G.: Structure and Function of Capillary System in the Gingiva in Man. Development of Stereophotogrammetric Method and Its Application for Study of the Subepithelial Blood Vessels in vivo.
Acta Odont. Scandinav., 17: 9, Suppl. 26, 1959.
17. Gaillard, P. J.: Methods for study of organized growth in vitro. Organ culture technique using embryologic watch glasses. Methods in medical research.
Chicago. The Year book publishers, 4: 241-246, 1951.
18. Gateiner, D., Walter, S., Krawczyk and David G.: Immunofluorescence of-anti actin antibody in gingival epithelium.
J. Periodontal Res. 12 (6) 436-443, 1977.
19. Gautheret, R.J.: Culture du tissu cambial.
Acad. sci. Paris. Compt. rend. 198: 2195-2196, 1934.
20. Gautheret, R. J.: Action de l'acide indol-B-acétique sur le développement de plantules et de fragments de plantules de Phaseolus vulgaris.
Soc. biol. Compt. rend. 126: 312-314, 1937.

21. Gautheret, R. J.: Recherches sur l'action de diverses substances sur la croissance de cultures de tissus de carotte.
Acad. sci, Paris. Compt. rend. 210: 186-188, 1940.
22. Golditch, M., Barnes, P. R. and Schneir M.: Rabbit palatal mucosa sialoglycoproteins: Solubilization and biosynthesis in vitro.
Arch. Oral Biol. 19 (1): 65-70, 1974.
23. Haberlandt, G.: Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen.
Akad Wissensch. Vienna, Bot. Zeitung. 60: 252-264, 1902.
24. Hamilton, A. I. and Blackwood, H. J. J.: Cell renewal of oral mucosa epithelium of the rat.
J. Anat. 117 (2): 313-327, 1974.
25. Hansen, E. R.: Mitotic Activity of the Gingival Epithelium in Colchicinezed Rats.
Odont. T. 74: 229, 1966.
26. Harrison, R.G. Observations on the living developing nerve fiber.
Anat. Rec. 1: 116-118, 1906.
27. Hassell, R.: The development of rat palatal shelves in vitro: An Ultrastructural analysis of the epithelial cell death and palate fusion by the epidermal growth factor. Dev. Biol. 45 (1): 90-102, 1975.
28. Hodge, H. C.: Gingival Tissue Lipids.
J. Biol. Chem. 101: 55, 1933.
29. Jansa, P.; Cermakova M; and Skoupilova, M.: Histological picture of inflamed at gingiva after surgical and medicamentous treatment.
Acta Univ. Palscki. Olomuc. Fac. Med. 70: 139-144, 1974.
30. Janson, W. A.; Catanzaro-Guimaraes and Passanezi, E.: Nuclear size and cytochemical changes during autolysis in free gingival autograft epithelium.
J. Periodontal Res. 10 (1): 12-18, 1975.
31. Karring, T., Lang and Harald L.: The role of gingival connective tissue in determining epithelial differentiation.
J. Pedidontal Res. 10 (1): 1-11, 1975.

32. Kennedy, J. E.: Effect of inflammation on collateral circulation of the gingiva.
J. Periodontal Res. 9 (3): 147-152, 1974.
33. Kempson, S. A.: Ultrastructural observations on the keratohyalin granules of the rat oral epithelium.
Arch. Oral Biol. 19 (11): 1011-1024, 1974.
34. Kotte, W.: Kulturversuche mit isolierten Wurzelspitzen.
Beitr. allgem. Bot. 2: 413-434, 1921.
35. Kotte, W.: Wurzelmeristem in Gewebekultur.
Deutsche bot. Ges. Ber. 40: 269-272, 1922.
36. Lange, D., and Camelleri, G. E.: Cytochemical Demonstration of Lysosomes in the Exfoliated Epithelial Cells of the Gingival Cuff.
J. D. Res. 46: 625, 1967.
37. Lee, H., Pappelis G. A., and Kaplan, H. M.: Nuclear dry mass and area in binucleated human buccal mucosa cells.
Trans. ill State Acad. Sci. 67 (2): 148-150, 1974.
38. Listgarten, M. A.: The Ultrastructure of Human Gingival Epithelium.
Am. J. Anat. 114: 49, 1964.
39. Ljunggren, C. A. Von der Fähigkeit des Hautepithels, ausserhalb des Organismus sein Leben zu behalten, mit Berücksichtigung der Transplantation.
Deutsche Zeitschr. Chir. 47: 608-615, 1897.
40. Lewis, M. R. y Lewis, W. H. The cultivation of tissues from chick embryos in solutions of NaCl, CaCl₂, KCl and NaHCO₃.
Anat. Rec. 5: 277-293, 1911.
41. Lewis, M. R. y Lewis, W. H. The cultivation of tissues in salt solutions.
Am. Med. Assoc. J. 56: 1795-1796, 1911.
42. Lewis, M. R. Importance of dextrose in medium of tissue cultures.
J. Exper. Med. 35: 317-322, 1922.

43. Løe, H., and Karring, T.: Mitotic Activity and Renewal Time of the Gingival Epithelium of Young and Old Rats.
J. Periodont. Res. Suppl. 4: 18, 1969.
44. Løe, H., and Karring, T.: A Quantitative Analysis of the Epithelium Connective Tissue Interface in Relation to Assessments of the Mitotic Index.
J. D. Res. 48, 634, 1969.
45. Lusem, R.: A cytological Study of the Cornification of the Oral Mucosa in Women.
Oral Surg., Oral, Med., Oral Path. 3: 1516, 1950.
46. Martinovitch, P. N.: Methods for study of organized growth in vitro. Technique of grafting tissues and organs, including those cultivated in vitro, into anterior eye chamber of rats and mice. Methods in medical research. Chicago, The Year book publishers, 4: 240-241, 1951.
47. Marwah, A. S., and Weimann, J. P.: A Sex Difference in Epithelial Cells of Human Gingiva.
J. Periodont, 26: 11, 1955.
48. McHugh, W.D.: Keratinization of Gingival Epithelium in Laboratory Animals.
J. Periodont. 35: 338, 1964.
49. Melcher, A. H.: Gingival Reticulin: Identification an Role in Histogenesis of Collagen Fibers.
J. D. Res. 45: 426, 1966..
50. Mello, M. L. S., Vidal, B. C. and Valdrighi, L.: Histophotometric analysis of basophilia on collagen bundies of the rat periodontium.
Rev. Bras. Biol. 33 (2): 179-182, 1973.
51. Meyer, J., Marwah, A. S. and Weimann, J. P.: Mitotic Rate of Gingival Epithelium in Two Age Groups.
J. Invest. Derm. 27: 237, 1956.
52. Mignon, M. L., Malet, A. P., Perissel, B. and Geneix, A.: Ultrastructure of the gingival epithelium in the new born cat:Some characteristics of the intercellular junctions.
J. Dent. Res. 53 (6) 1484-1490, 1974.

53. Miller, S.C., Soberman, A. and Stahl, S.: A study of the Cornification of the Oral Mucosa of Young Male Adults. J. D. Res. 30:4, 1951.
54. Mlinek, A., and Buchner, A.: In vitro cultivation of adult human gingiva I. Primary epithelial outgrowth from gingival explants. J. Periodontal Res. 10 (2) 73-78, 1975.
55. Moermann, W., Regolati, B., and Muehleemann, H. R.: The --gingivitis fluorescein test. Helv. Odontol. Acta 18 (1): 1-6, 1974.
56. Molliard, M.: Sur le développement des plantules fragmentées. Soc. biol. Compt. rend. 84: 770-772, 1921.
57. Montgomery, P. W.: A Study of Exfoliative Citology of Normal Human Oral Mucosa. J. D. Res. 30: 12, 1951.
58. Mori, M., and Kishiro, A.: Histochemical Observation of Aminopeptidase Activity in the Normal and Inflamed Oral - Epithelium. J. Osaka Univ. D. Sch. 1: 39, 1961.
59. Nobécourt, P.: Cultures en série de tissus végétaux sur milieu artificiel. Acad. Sci., Paris, Compt. rend. 205: 521-523. 1937.
60. Page, R. C., Ammons, W.F., Schectman, L.R. and Dillingham, L.A.: Collagen fiber bundles of the normal marginal gingiva in the marmoset. Arch. Oral Biol. 19 (11): 1039-1043, 1974.
61. Pisani, M., Rucocco, V., Villano, P. A. et al.: Culture in vitro di epitelioцитi pemfigois persistenza e regressone dei citodismorfismi acantolitici. Clin. Dermatol. 112 (10): 573-578, 1977.
62. Recklinghausen, F.D. von Ueber die Erzeugung von rothen Blutkörperchen. Arch. mikroskop. Anat. 2: 137, 1866.

63. Robbins, W. J.: Cultivation of excised root tips and stem tips under steril conditions.
Bot. Gaz. 73: 376-390, 1922.
64. Rose, G.G. and Cattoni, M.: Human gingiva cultivated in circumfusion systems.
Arch. Oral Biol. 19 (2): 113-123, 1974.
65. Roux, W. Die Entwicklungsmechanik. Ein neuer Zweig der biologischen Wissenschaft.
Leipzig. W. Engelmann, 283, 1905.
66. Ruch, J. V. Fabrel, M., Karcher M., Djuricio, V. and Staeubli A.: The effects of L-azetidine-2-carboxylic acid (analogye of proline) on dental cytodifferentiations in vitro.
Differentiation 2 (4): 211-220, 1974.
67. Ryan, E. J., Toto, P.D., and Sarguilo, A. W., Anthony, W.: Aging in human attached gingival epithelium.
J. Dent. Res. 53 (1): 74-76.
68. Saglie, R., Johanse, J. R., Tollefsen, T.: Scanning electron microscopic study of human gingival epithelial cells on the surface of Teeth and glass slides.
J. Periodont Res. 10 (4): 191-196, 1975.
69. Schenk, P.: Melanocytes, Langerhans and Merkel cells in oral epithelium.
Acta Oto Laringol. 80 (3/4): 301-311, 1975.
70. Schilli, W.: The Most Superficial Zone of the Stratum Corneum of the Gingiva.
Oral Surg., 25: 896, 1968.
71. Schmid, G. H., Schell, H., Hornstein, O. P. et al.: Studies on the duration of the nuclear DNA synthesis in the buccal mucosa of adult male rats.

II. 17 (2): 177-184, 1974.

72. Schmid, G. H., Schell, H., Hornstein, O. P., Meisell, H. U., Zeissler, H. J.: Studies on the duration of the nuclear DNA synthesis in the buccal mucosa of adult male rats: 1. Comparative evaluation of two autoradiographic methods in vivo. *Virchows Arch. B. Cell Pathol.* 17 (2): 169-175, 1974.
73. Schroeder, H. E.: Ultrastructure of the Junctional Epithelium and Human Gingiva. *Helv. Odont. Acta.* 13:65, 1969.
74. Sebelova, J. and Malantova, M.: The nature of galvanic potential in the oral mucosa. *Acta Fac. Med. Univ. Brun.* 46, 115-118, 1973.
75. Simpson, W.: Pathways for glucose metabolism in the rat gingiva: II. In vitro studies of the fate of glucose UL-14C. *J. Dent. Res.* 54 (1): 190, 1975.
76. Smulow, J. B. and Glickman, I.: In Vitro Cultural and Histochemical Characteristics of Human Oral Mucosa. *Arch. Oral Biol.* 11: 1143, 1966.
77. Soni, N. N., Silberkweit, M. and Hayes, R. L.: Pattern of Mitotic Activity and Cell Densities in Human Gingival Epithelium. *J. Periodont.* 36: 15, 1965.
78. Squier, C. A. and Waterhouse, L. P.: The Ultrastructure of the Melanocyte in Human Gingival Epithelium. *J. D. Res.* 46: 112, 1967.
79. Strangeways, T. S. P.: Technique of tissue culture in vitro. Cambridge, England. W. Heffer & Sons. 80, 1924.
80. Trott, J. R., and Gorenstein, S. L.: Mitotic Rates in the Oral and Gingival Epithelium of the Rat. *Arch. Oral Biol.* 8: 425, 1963.
81. Tyler M. S. and Koch, W. E.: Differentiation of the secondary palate from 12 day mouse embryos. *Anat. Rec.* 182 (3): 297-303, 1975.

82. Ussing, M. J.: The development of the Epithelial Attachment.
Acta Odont. Scandinav., 13: 123, 1956.
83. Valderhaug, J.: Epithelial cells in the periodontal membrane of teeth with and without periapical inflammation.
Int. J. Oral Surg. 3 (1): 7-16, 1974.
84. Valchrighi, L.: The collagen desintegration in the human gingival inflammatory process.
Ann. Histochem. 19 (4): 253-264, 1974.
85. Vogan, J. W.: Immediate repair of gingival biopsy sites.
Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. 40 (3): 333-335, 1975.
86. Weinmann, J. P. et al.: Occurrence and Role of Glycogen in the Epithelium of the Alveolar Mucosa and of the Attached Gingiva.
Am. J. Anat. 104: 381, 1959.
87. White, P. R.: Plant tissue culture. A preliminary report of results obtained in the culturing of certain plant meristems.
Arch. exper. Zellforsch. 12: 602-620, 1931.
88. White, P. R.: Influence of some environmental conditions on the growth of excised root tips of wheat seedings in liquid media.
Plant. Physiol. 7: 613-628, 1932.
89. White, P. R.: Growth hormones and tissue growth in plants.
Survey. Biol. Prog. 1: 267-280, 1949.
90. Wolley, D. E., Christine, A., Evanson, J. M. Soames, J. V., and Davies, R. M.: Characterization and serum Inhibition of neutral collagenase from cultured dog gingival tissue.
Biochim Biophys. Acta. 522 (1): 205-217, 1978.
91. Wechman, H. B., and Astrup, T.: Inhibition by hydrocortisone of plasminogen activator production in rat tongue cultures.
Lab. Invest. 30 (4): 427-433, 1974.
92. Zachrisson, B. U.: Mast Cells of the Human Gingiva. IV. Experimental Gingivitis.
J. Periodont. Res. 4: 46, 1969.