

# OBSERVACIONES HISTOLÓGICAS SOBRE CULTIVOS DE TEJIDOS EN PIEL DE FETOS DE BOVINOS CON VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA

EDUARDO ENRIQUE PALMA \* y BERNARDO EPSTEIN \*\*

Dado el interés que despierta el estudio de los cultivos de tejidos al poner frente a los virus células receptoras que permiten hacer la experimentación desde el doble punto de vista teórico-aplicado, en la lucha contra la fiebre aftosa, sea por la elaboración de vacunas al hidróxido de aluminio, SCHMIT-JENSEN, 1936; empleo del virus de cultivo como virus fijo, FRENKLEN, 1938; preparación de sueros hiperinmunizantes partiendo de virus de cultivo, FOGEDBY, 1947, y recientes trabajos que no citamos, todos ellos tienden a solucionar el aspecto inmunológico de esta virosis.

Es por ello que nos animamos a dedicar estas observaciones sobre el desarrollo de los cultivos de piel de fetos de bovinos en presencia del virus de la fiebre aftosa, por controles histológicos, iniciado ya hace algún tiempo \*\*\* por creer así contribuir con un aspecto dentro de los múltiples que presentan las técnicas de cultivos de tejidos aplicadas al estudio de los virus tan actualizada en este caso al problema de la fiebre aftosa.

## TÉCNICA UTILIZADA PARA EL CULTIVO DE VIRUS AFTOSO

Hemos utilizado, como es de práctica en nuestro Laboratorio, la piel de fetos de bovinos de tres meses de edad. El útero es sometido a una desinfección prolija con iodo y alcohol en toda su superficie, procediéndose a la apertura de uno de los cuernos, poniendo el máximo de precauciones, con las pinzas de Musseux. Se toma el feto en la región del cuello o cabeza, cuidando de no traumatizar otras partes, se coloca en un cristizador esterilizado y ya preparado. El feto ideal es de una medida aproximada de 0,15 de longitud desde el occipital al cóccix.

---

\* Subdirector del Instituto Nacional de la F. Aftosa. Bs. As. Ministerio de Agricultura de la Nación. Rep. Argentina.

\*\* Patólogo del Laboratorio de Biología Animal (Pando). Dirección de Ganadería. Ministerio de Ganadería y Agricultura. R. O. del Uruguay.

\*\*\* Instituto Nacional de la Fiebre Aftosa, 1948, Buenos Aires.

Se efectúan dos incisiones longitudinales superficiales sobre el dorso de ambos lados de la columna vertebral, tratando de no inferir los tejidos conjuntivo y muscular, y se extrae la piel, que es colocada en un recipiente conteniendo una solución isotónica de Ringer.

Se extrae el tejido muscular que cubre la región de la tabla del cuello, dorso, lomo, grupa y muslo, conjuntamente con la masa del cerebro y cerebelo. El todo es sometido a un lavado en una solución isotónica de Ringer con el objeto de eliminar todo vestigio de sangre, y para luego ser triturado, convirtiéndose en una papilla uniforme a la cual se le agrega solución de Ringer en la proporción de 1 a 3. Se traspasa la mezcla y se centrifuga a 3.000 revoluciones por minuto durante 20 minutos. El líquido sobrenadante utilizado en una proporción del 20 %, viene a constituir el jugo o extracto embrionario poseedor de las substancias denominadas trefonas.

Obtenida la piel de feto se procede a cortar pequeños trozos de la misma con un bisturí de hoja recta; estos cortes deben ser netos con el objeto de no provocar desgarramiento o traumatizar el tejido. Los trozos cortados deben tener 2 por 2 ½ mm. más o menos de superficie. Obtenido un número suficiente, son introducidos en una cápsula de Petri, en cuyo interior hay solución isotónica de Ringer, constituyendo esta operación un primer lavado.

Luego se impregna el tejido con el virus, durante un tiempo de 60 minutos. Se agrega una cantidad determinada, según la capacidad del recipiente, de plasma de bovino, agitando suavemente el Erlenmeyer de manera que el plasma cubra toda la superficie de la base del mismo. Se agrega la mezcla de trefona y Ringer, en cantidad que también determina el volumen del recipiente, que se va a usar. Se imprime a este recipiente en suave movimiento de rotación, para evitar que se formen burbujas, y con el objeto de que se uniformen homogeneizándose las mezclas, de inmediato, con una espátula apropiada, se introducen los trozos de tejidos que estaban en impregnación con el virus, evitando que los mismos se superpongan, pues en este caso, el tejido es asfixiado. Al cabo de dos o tres minutos de haberse implantado el tejido, se produce la coagulación, quedando firmemente adherido al plasma.

Por último se agrega una cantidad de plasma y Ringer (en proporción del 10 %) con el fin de nutrir y provocar un ambiente higroscópico al medio y se procede a colocar los tapones a los recipientes, los que son llevados a la estufa durante 96 horas a 37° C.

#### CONTROL DEL CRECIMIENTO DE TEJIDO EN SALEROS ESPECIALES

Para nuestras observaciones sobre el desarrollo de los cultivos de piel de feto, utilizamos un tipo especial de salero para histocultivo, que hasta ahora nos ha dado excelentes resultados.

Con un bisturí de hoja recta se cortan pequeños trozos de piel de una dimensión que puede variar entre  $\frac{1}{2}$  y 1 mm. sometiéndolos a un lavado en solución isotónica de Ringer para eliminar todo vestigio de sangre. Se colocan tres trocitos de esta piel sobre uno de los ángulos de la tapa de vidrio del salero. En la parte media de la misma se deposita una gota de plasma y acto seguido otra de la mezcla de trefona y Ringer. Con una espátula apropiada se mezclan los tres trocitos disponiéndolos separados dentro de la mezcla de plasma y trefona, de manera que pueda identificarse cada trozo fácilmente en la observación. La coagulación se produce al cabo de pocos minutos quedando de esta manera fijados.

En el fondo del salero se coloca una gota de Ringer para mantener un medio higroscópico, se invierte la tapa y se parafinan sus bordes con el objeto de impedir la formación de aire que pudiera ser causa de infección.

#### HISTOLOGÍA DE LA PIEL DE FETOS DE NOVENTA DÍAS

Nuestras primeras observaciones se realizaron sobre trozos de piel de fetos extirpados asépticamente, seccionadas para utilizar en los cultivos, complementando éstas con trozos de piel correspondientes a cultivos a término.

Lo observado por nosotros en esos trozos de piel es lo ya consignado por los distintos histólogos que se ocuparon del desarrollo de la piel desde sus estructuras embriológicas en las distintas especies.

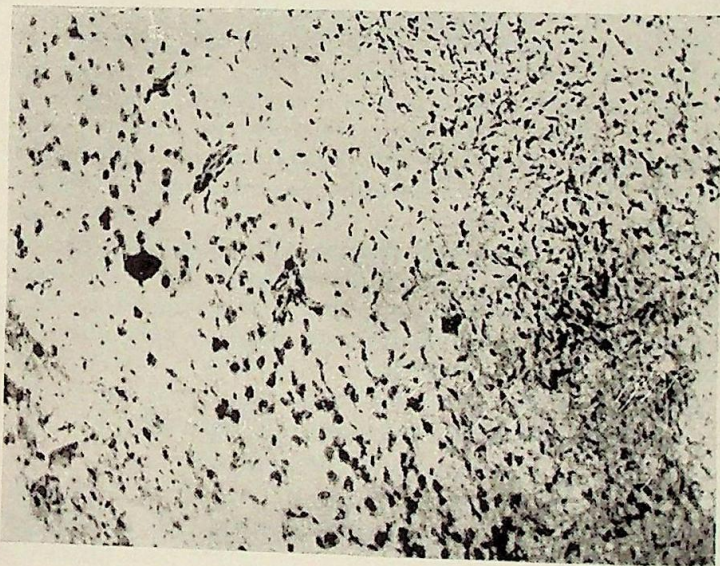


Fig. 1.

En estos preparados se destaca una epidermis multiestratificada formada por capas superpuestas, siendo las superficiales a expensas de células aplanadas y la profunda por células poliédricas. Dominan los elementos conjuntivos jóvenes con sus caracteres de núcleo y citoplasma, distribuyéndose además en forma regular las células poliédricas en distintas etapas de su desarrollo, con núcleos hipercromáticos y granuloso que se destacan en las vistas panorámicas con pequeños aumentos (fig. 1).

### TÉCNICAS HISTOLÓGICAS UTILIZADAS

Los materiales destinados al estudio histológico fueron fijados en nueve partes de Ringer y 1 de formol neutro con testigos de las mismas series, fijados en Zenker, estos trozos se incluyeron en parafina practicando cortes de 3 micras, quedando en casi todos los casos fijados e incluidos con la piel el plasma coagulado del cultivo.

Las coloraciones se practicaron con las corrientes de anilinas, tricrómico Cajal-Gallegos, eosina compuesta-hematoxolina Carazzi, complementando con coloraciones lentas de Giemsa, variante de Wolbach, utilizando también las técnicas de carbonato de plata de del Río Horteiga adaptada a la impregnación en portas, empleamos para esta última materiales fijados en formol al 10 %.

### CULTIVOS DE PIEL CON VIRUS AFTOSO

La observación de los cultivos de piel de 48 horas, consistió, en hacer un estudio comparativo con los desarrollados normalmente sin virus.

Con nuestros elementos de juicio, fué imposible uniformar los conceptos interpretativos sobre todos los preparados, ya que en las series estudiadas notamos diferencias en su crecimiento, la proliferación en unas colonias es más intensa a expensas de fibroblastos, contrastando con otras en que existe un marcado desarrollo de células epiteliales.

Por las causas señaladas le damos significación al tejido matriz o al fragmento de tejido explantado del organismo, apuntando los elementos más interesantes por su disposición y morfología, sin descuidar las áreas centrales y periféricas en la densidad de células multiplicadas.

La estructura de estos tejidos está formada por células de aspecto reticular que toman el carbonato de plata, existe dificultad en distinguir nitidamente la estructura nuclear que se proyecta borrosa en sus bordes sobre el citoplasma, y nos hace pensar en un cambio de afinidad por los colorantes. En las áreas periféricas de estos preparados, o sea sobre el límite con el plasma del cultivo, encontramos los detalles histológicos o histopatológicos que consideramos más interesantes.

Con aumentos medianos, se destacan conglomerados celulares formados por células epiteliales y fibroblásticas, éstas toman el aspecto de un retículo denso de células entrelazadas que visto a inmersión ocupa varios campos.

Otros elementos que se analizan regularmente en esos cortes, que se distribuyen dentro del conglomerado celular y en torno de las células epiteliales, disminuyendo en cantidad hacia los centros del preparado son: formaciones que miden media micra, oscilando en su tamaño, ya que las hay más pequeñas; estas formaciones toman perfectamente los colorantes básicos, son circulares, de bordes nítidos, y algunas muy pequeñas eosinófilas.

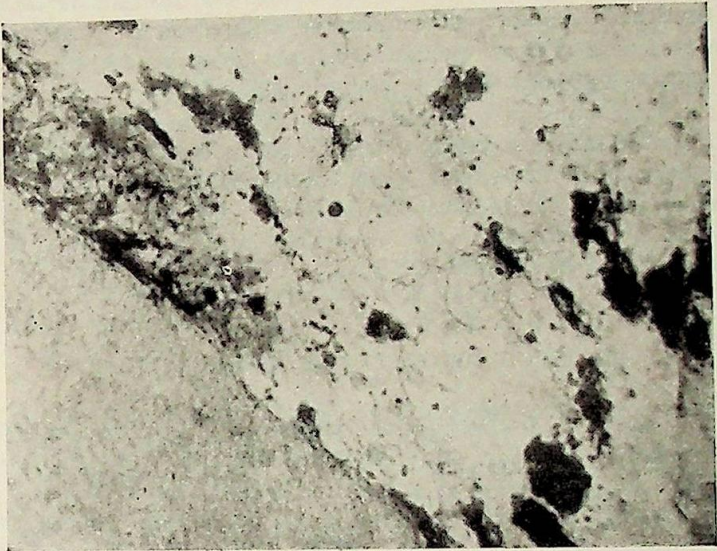


Fig. 2.

Los protoplasmas de estas células epiteliales están formados por masas homogéneas o pulverulentas (fig. 2) rodeadas por una sustancia granulosa. Los bordes celulares son irregulares, encontrándose en algunos casos adosadas unas a otras con un aspecto esponjoso que las hace típicas y con tendencia a hacerse borrosas.

No obstante interpretarse este cuadro como un aspecto regresivo de sus células integrantes, se observa en los mismos campos una rica proliferación de fibroblastos que invaden el plasma de cultivo formando cordones abigarrados que crecen en las colonias de 48 horas, que comparadas con colonias del mismo tiempo de cultivo sin virus aftoso, resultaron con mejor desarrollo.

### CONSIDERACIONES GENERALES

En esta comunicación nos ocupamos preferentemente del aspecto histológico, tratando de interpretar en los cultivos de piel de F. B. su aspecto morfológico, utilizando, para ese fin, tejidos fijados con métodos corrientes y técnicas de coloración habituales dentro de la histología. Es por ello que describimos solamente las características celulares de los tejidos cultivados en distintas condiciones, destacando un cambio de afinidad de las células frente a las anilinas, describiéndose un proceso regresivo de determinadas células que no se evidencian en las mismas cultivadas sin impregnación del virus. Se observa también conglomerados celulares, que interpretamos como reacción frente al medio con virus, por no encontrarse en los tejidos testigos y no corresponder a etapas embriológicas del desarrollo de la piel.

Insistiremos con las formaciones granulosas regresivas hasta encontrar una interpretación aceptable, ya que por el momento no lo identificamos como gránulos cromáticos ni restos de nucléolos en regresión y tampoco como corpúsculos de inclusión, hasta no visualizar elementos de juicio más concluyentes.

Estudiaremos más detalladamente estos elementos que consideramos de interés por observarse de manera regular donde existe mayor proliferación de los cultivos en presencia de virus.

### RESUMEN

1º) Descríbese la técnica utilizada para el cultivo del virus aftoso, utilizando piel de feto de bovino de tres meses de edad.

2º) Se detalla el procedimiento seguido para el cultivo del virus aftoso en saleros especiales.

3º) Descríbese la estructura de la piel de fetos bovinos de noventa días en trozos de piel extirpados y en cultivos de veinticuatro y cuarenta y ocho horas.

4º) Se realiza un estudio comparativo entre cultivos de tejidos de P. F. Bov. de cuarenta y ocho horas con similares de la misma especie y tiempo cultivados en presencia del virus aftoso.

5º) En los cultivos con virus aftoso se observa un proceso regresivo de las células epiteliales, conglomerados celulares y dispersión en todo el preparado, particularmente en las zonas de crecimiento del cultivo y en torno a las células epiteliales de partículas.