

LOS CULTIVOS CELULARES Y DE TEJIDOS

Revisión

- **Dr. Armando Soto Escalona.**
Sección de Virología.
Instituto de Investigación Clínica.
Facultad de Medicina.
Universidad del Zulia.
Maracaibo.

- **Dr. Gilberto Olivares.**
Cátedra de Farmacología.
Facultad de Medicina.
Universidad del Zulia.
Maracaibo.

I. Introducción.

II. Tipos de cultivo.

III. Requerimientos básicos para los cultivos celulares.

- 1.— Sales.
- 2.— Cristalería.
- 3.— Agua.
- 4.— Presión osmótica.
- 5.— pH.
- 6.— Oxígeno.
- 7.— Energía.
- 8.— Temperatura.

IV. Métodos de cultivo.

- 1.— Cultivo de células.
- 2.— Cultivo de órganos.

V. Requerimientos nutritivos de las células cultivadas.

- 1.— Aminoácidos.
- 2.— Vitaminas.
- 3.— Suplementos proteicos.

VI. Preparación de algunos cultivos celulares.

- 1.— Riñón embrionario humano.
- 2.— Células epiteliales amnióticas humanas.
- 3.— Fibroblastos de embrión de pollo.

VII. Cultivo seriado de células.

VIII. Utilización de los cultivos celulares.

- 1.— Utilización en Virología.
- 2.— Utilización en Farmacología.

1. INTRODUCCION

Con la sola excepción de la neurona, todas las células pueden ser cultivadas *in vitro* por variables períodos de tiempo gracias a los trabajos pioneros de un grupo de investigadores que transformaron la técnica de los cultivos celulares y la pusieron al alcance de la mayoría de los laboratorios.

Los primeros intentos de cultivo fueron hechos en 1906 por Beebe y Ewing², quienes describieron el cultivo de un linfosarcoma canino en sangre de animales susceptibles y resistentes. Se acepta generalmente a Harrison como el verdadero iniciador de los cultivos celulares, con trocitos de tejidos sobre coágulos de linfa³. Más adelante, Burrows⁴ cambió el coágulo de linfa por uno de plasma. Carrel introdujo las técnicas de asepsia a los cultivos, en una época en que no se conocían los antibióticos, logrando demostrar que las células animales podían crecer indefinidamente si eran mantenidas en medios libres de toda contaminación. De esta manera, Carrel, mantuvo una línea celular por 34 años⁷.

La técnica de cultivar células animales sobre una superficie sólida con una cubierta líquida, fue desarrollada por Earle y col.¹⁴ Más adelante Owens y col.⁴³ demostraron que la célula podía multiplicarse en suspensión. Wallace y Hanks⁵⁴ cultivaron líneas celulares y células primarias, en medios nutritivos solidificados con agar. Durante las dos décadas pasadas, el cultivo de tejidos se ha transformado en uno de los procedimientos experimentales más utilizado en las ciencias biológicas. Las aplicaciones son numerosas, particularmente en virología, citología, histología, embriología, farmacología, fisiología celular, patología celular, inmunología, genética, radiobiología y el estudio de tumores.

II. TIPOS DE CULTIVOS

Generalmente las células cultivadas se multiplican por un período de tiempo, luego de lo cual detienen su crecimiento y degeneran. Dependiendo de la clase de tejido, esto puede suceder en una semana, meses o un año. Las células de un tejido, liberadas por tripsina o por medios mecánicos, y cultivadas in vitro, constituyen un **cultivo celular primario**. Si estas células son capaces de multiplicarse y de ser sembradas en otros recipientes en forma seriada, dan lugar a lo que se ha llamado **cepa celular**²⁸. Posiblemente el 99% de los cultivos primarios llegarían a formar cepas²⁴. Las cepas celulares poseen características especiales: a) tienen el mismo número de cromosomas que las células del tejido original; b) las células derivadas de tejidos normales tienen propiedades de tejidos normales; c) son mortales. En un momento dado, las células detienen su multiplicación y mueren.

TABLA I

CELULAS DIPLOIDES PROPAGADAS SERIADAMENTE

NOMBRE	TEJIDO	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA
WI-26	Fibroblastos de pulmón embrionario humano	(28)
WI-38	Fibroblastos de pulmón embrionario humano	—
00N	Pulmón de hamster (Cricetulus griseus)	—

Las **líneas celulares** provienen de alteraciones "espontáneas" de cepas celulares; lo que da lugar a transformaciones que conducen a la aparición de un tipo morfológicamente diferente. Las líneas celulares tienen características especiales: a) son heteroploides. No tienen el cariotipo de las células que las originaron. La cromatina sexual desaparece en las líneas de origen femenino;

b) tienen propiedades de células cancerosas, sin relación con el tejido original. Estas células son capaces de producir metástasis al ser inoculadas en pacientes con cáncer terminal⁵⁴ y producen tumores en el repliegue mucoso de la mejilla del hamster, sitio este caracterizado por no presentar reacción inmunológica al-

TABLA II

CELULAS HETEROPLOIDES PROPAGADAS
SERIADAMENTE DERIVADAS DE TEJIDOS NORMALES

NOMBRE	TEJIDO	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA
WISH	Amnios humano	(25)
A-39	Aorta humana	(3)
AV-3	Amnios humano	—
FL	Amnios humano	(17)
DETROIT-98	Médula esternal humana	(4)
BS-C-1	Riñón de mono africano cercopithecus aethiopsis	(52)
L-929	Fibroblastos de ratón	—
Intestino 407 (CCL-6)	Intestino embrionario humano	(31)
HIGADO	Hígado humano de adulto	(8)
BHK-21	Fibroblastos de riñón de hamster	(34)

TABLA III

CELULAS HETEROPLOIDES PROPAGADAS
SERIADAMENTE DERIVADAS DE TEJIDOS MALIGNOS

NOMBRE	TEJIDO	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA
Helo	Carcinoma de cuello uterino	(19)
Helo S-3	Derivado de Helo	(47)
J-III	Leucemia monocítica	(42)
KB	Carcinoma de nasofaringe	(12)
HEP-2	Carcinoma de laringe	(39)
DETROIT-6	Médula esternal humana	(5)
DETROIT 116P	Líquido pleural de paciente con linfosarcoma	(4)

guna a cuerpos extraños; c) son inmortales. En las tablas I, II, y III se presentan algunas cepas y líneas celulares de utilización universal; la mayoría de las cuales pueden ser adquiridas comercialmente.

III. REQUERIMIENTOS BASICOS PARA LOS CULTIVOS CELULARES

Ante todo hay que llenar dos requisitos básicos e indispensables: a) que estén rodeados de un ambiente adecuado; b) evitar cualquier tipo de contaminación (bacteriana, por hongos, u otros organismos). En los últimos años los antibióticos han ofrecido la solución al segundo de los postulados. Su uso ha conducido a eliminar las técnicas asépticas en el manejo de los cultivos, lo que puede traer como consecuencia que éstos se contaminen con otros microorganismos tales como virus y micoplasmas. Además, los antibióticos son biológicamente activos y pueden afectar el crecimiento celular.

Para el logro de un ambiente adecuado para las células, es necesario observar una serie de condiciones que se enumeran detalladamente.

1.— Sales. Los tejidos tienen necesidades mínimas de sales. Las soluciones salinas preparadas según estas necesidades pueden ser luego suplementadas con elementos nutritivos vitales para el crecimiento celular. Las soluciones salinas más usadas las describimos en la tabla IV.

El sodio se utiliza para dar la osmolaridad requerida. El potasio es igualmente usado para la tonicidad; y además, es un activador de los sistemas enzimáticos que intervienen en el metabolismo celular. El calcio y el magnesio son esencialmente activadores de enzimas; pero el calcio está también íntimamente ligado a los mecanismos de adherencia de las células a la superficie del vidrio. Los fosfatos forman parte del sistema amortiguador del medio, pero más importante aún es su función almacenadora de energía. En la formación de ciertos fosfatos como el ATP, se utiliza una cantidad de energía para la formación de las uniones entre el fosfato y el resto de la estructura. En estas uniones es donde se almacena esta energía que es utilizada al degradarse el ATP a sus formas más simples.

TABLA IV

SOLUCIONES SALINAS DE MAYOR USO EN CULTIVOS CELULARES LAS CIFRAS REPRESENTAN LOS GRAMOS DE LA SAL NECESARIOS PARA PREPARAR UN LITRO CONCENTRADO DIEZ VECES

	HAMMERSI	LAURELICI	PUCRIANI	REYI20I	PREYI3I	FRYLE
NaCl	80	68	80	70	80	64
KCl	4	4	4	3.7	2	4
Glucosa	10	10	10	10	-	4.50
CaCl ₂	14	2	-	-	1	2.60
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	1	-	-	-	4
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1	1	-	-	1	-
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.52	-	-	3.010	28.98	-
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	-	-	-	-	-	1.20
KH ₂ PO ₄	0.6	-	-	0.037	2	-
Nitrato férrica al 0.02 %	-	-	-	-	-	5 ml
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	-	14	-	-	-	-
Rojo fenol	16 ml	20 ml	20 ml	20 ml	10 ml	10 ml

2.— Cristalería. Condición indispensable para el cultivo de células es la extrema limpieza a la que debe ser sometida toda la cristalería utilizada. El detergente no debe dejar residuos en la superficie del vidrio. En nuestro laboratorio este material es sometido a tratamiento con un detergente comercial (7X. Linbro Chemicals. New Haven, Conn.) al cual se le añade una mezcla de carbonato y fosfato de sodio (Calgon. Calgon Corporation, Pittsburgh, Pa.). Todo el material es cepillado en caliente y enjuagado varias veces con agua destilada.

3.— Agua. El agua utilizada para preparar las medias de crecimiento y las soluciones salinas debe ser pura, obtenida de destiladores de vidrio. No recomendamos el uso de desionizadores pues se sabe que ciertas bacterias crecen en estas resinas y además la resina misma puede solubilizarse en el agua.

4.— Presión osmótica. La presión osmótica del medio debe ser adaptada a la del animal cuyo tejido se cultiva. Sin embargo, se conoce que algunas células en el organismo están sometidas a osmolaridad mayor que las del resto del cuerpo; como es el caso de las células de las pirámides renales. En experimentos con linfocitos, se ha observado que viven mejor en medios hipotónicos.

5.— pH. La regulación del PH en la vecindad de la célula es muy importante. En líneas generales se acepta, que el pH óptimo para el crecimiento celular está en las cercanías de 7.4. Se utilizan como sistemas amortiguadores las mezclas de fosfatos, de bicarbonato-CO₂, veronal y tris [hidroximetil aminoetano].

6.— Oxígeno. Actúa de diferente manera dependiendo del tejido cultivado. Por ejemplo, los fibroblastos humanos necesitan cierta cantidad de oxígeno; en cambio, la retina sucumbe a elevadas concentraciones del mismo.

7.— Energía. En la preparación de un medio de cultivo, generalmente se incluye una fuente de energía, la cual es glucosa. La mayoría de las células toleran concentraciones de glucosa mayores que las existentes en la sangre y muchas se benefician de este exceso.

8.— Temperatura. Se acepta que las células en cultivo pueden ser mantenidas a la misma temperatura del animal de donde provienen; aunque posiblemente, a temperaturas un poco más bajas, el crecimiento celular sea mejor. Las células pueden ser mantenidas en congelación, en estado de vida latente, si el medio de suspensión contiene glicerol (10-30%) o dimetilsulfóxido (10%). En estas circunstancias se mantienen a -80°C por tiempo indefinido y estarán en condiciones de multiplicarse de nuevo, si se les permite volver a 37°C en un tiempo suficientemente corto.

IV. METODOS DE CULTIVO

1.— Cultivo de células.

A) — **Dispersión celular.**— Los principios sobre aislamiento de células vivas de tejidos han sido objeto de una reciente revisión⁴⁹. Se utilizan con este fin diferentes métodos: mecánicos, químicos y enzimáticos. El más comúnmente empleado es el de la tripsina, aunque últimamente se han empleado otras enzimas.

Digestión enzimática. La colagenasa fue utilizada por Hinz y Syverton⁵² para preparar cultivos de pulmón los cuales son de difícil digestión por tripsina. Según estos autores, la colagenasa se puede usar en concentraciones de 0.01% en una solución de glucosa, cloruro de sodio y cloruro de potasio. Según Porterfield⁴⁵, las células obtenidas con colagenasa crecen en forma de

células epiteliales o mesoteliales, mientras que las obtenidas con tripsina adoptan la forma de fibroblastos.

La pronasa es una enzima del *Streptomyces griseus*. Fue usada orinalmente por Mintz³⁸ y ha sido utilizada en la preparación de varios tipos de cultivos.

La tripsina, como agente disociador de células, fue utilizada por primera vez por Rous y Jones en 1916⁴⁶, y descubierta para la virología por Dulbecco¹¹. Se prepara en concentraciones de 0.25%. Una buena solución de tripsina es la siguiente: Tripsina 1-300, 2.5 grs.; glucosa, 4.5 grs.; cloruro de sodio, 6.8 grs.; cloruro de potasio, 0.4 grs.; fosfato monosódico monohidratado, 1.4 grs.; rojo fenol al 1%, 2.0 ml.; agua destilada, c.s.p. 1.000 mls.

Acción sobre la matriz intercelular con agentes quelantes.

Este tipo de agentes se usa principalmente para la disociación de cultivos secundarios y líneas celulares estables. El más comúnmente usado es la sal disódica del ácido etilendiamintetracético (EDTA, Verseno). Las soluciones habituales se preparan al 1:1.500 en solución salina fosfatada (PBS), sin iones de calcio ni de magnesio.

Disociación mecánica. La dispersión por medio de homogeneizadores o por cortes muy pequeños hasta hacer una papilla, o forzar el tejido a través de una trama rígida, puede dar lugar a una buena cantidad de células y de agregados celulares. Tiene la ventaja de no poner a la célula en presencia de agentes químicos que la puedan alterar; pero el mismo mecanismo de disociación produce destrucción de muchas células con liberación de enzimas intracelulares que pudieran afectar a las sobrevivientes.

Células derivadas de la sangre. Se conocen varios métodos de separación de leucocitos. Gresser y Chany²¹ inoculaban óxido de hierro en la circulación de animales de laboratorio, y luego separaban los macrófagos y polimorfonucleares, por un potente electroimán; quedando los linfocitos en el sobrenadante. Con el mismo fin se utiliza la fitohemaglutinina, obtenida del *Phaseolus vulgaris*⁴⁴. Alexander y Sprigg¹ describen un método de separación con el uso de bajas concentraciones de dextrán. Una excelente revisión sobre estos aspectos ha sido hecha recientemente por Rubin⁵¹.

B) — **Contaje celular.** — Una vez obtenidas las células por algunos de los métodos descritos, se separan por centrifugación y se resuspenden en un medio de crecimiento. El número de células en este medio debe alcanzar una cantidad óptima, la cual es determinada luego de contar las células. El contaje puede hacerse en un contador electrónico, tipo Coulter Counter o bien en una cámara de Neubauer bajo observación microscópica. Las células se hacen fácilmente visibles mezclándolas con colorantes. El azul tripán, preparado al 0.5% en solución salina, es rechazado por la célula viva y tomado por la célula muerta; por lo cual es fácil distinguirlas. El cristal violeta es también usado con cierta frecuencia. Este se prepara al 0.1% en ácido cítrico 0.1M.

Se cuentan las células colocadas sobre los cuatro cuadrados externos de la cámara de Neubauer. Cada cuadrado puede ser observado completamente con el objetivo de 16 mm. La cifra obtenida es multiplicada por el factor de dilución que introduce el uso del colorante y dividida por el número de cuadrados contados. Todo es multiplicado por 10.000, para referir la cifra a 1 ml. La suspensión celular se ajusta a la cantidad óptima, añadiendo medio nutritivo hasta obtener la dilución deseada.

2. — Cultivo de órganos.

Dentro de este tipo de cultivo deben diferenciarse dos subtipos: el cultivo de órganos embrionarios y el de órganos maduros³⁷. El cultivo de órganos embrionarios se usa con el propósito de observar su crecimiento, forma y diferenciación. Estos cultivos deben hacerse sobre una superficie sólida y no sumergidos en medio líquido, porque necesitan el oxígeno para su desarrollo. Esta condición es mucho más notable para cultivos de órganos maduros, puesto que los tejidos embrionarios pueden obtener su energía por glicólisis. Cuando se utilizan tejidos ya maduros, se trata de mantener el estado de diferenciación celular y, realmente, no se debe aplicar el término de cultivo sino el de mantenimiento *in vitro*. Se pueden estudiar de esta manera, los procesos metabólicos, patológicos o fisiológicos de un trozo de tejido. Estos cultivos necesitan de una adecuada oxigenación y su tamaño debe ser lo suficientemente pequeño para evitar la necrosis central por anoxia. Los tejidos pueden ser cultivados suspendidos en un medio líquido con una fase gaseosa controlada,

o bien sobre un coágulo de plasma. Modernamente se realiza sobre agar, el cual contiene el medio nutritivo adecuado.

V. REQUERIMIENTOS NUTRITIVOS DE LAS CELULAS CULTIVADAS

Los requerimientos nutritivos, para el crecimiento *in vitro* de las células, varían. En líneas generales necesitan glucosa, vitaminas, aminoácidos y sales esenciales. Algunos de estos compuestos han sido discutidos en otra sección de esta revisión.

1.— Aminoácidos. Pueden ser suplidos por la adición de cantidades medidas de cada uno de ellos en los medios sintéticos y semisintéticos, o bien pueden incorporarse en extractos de tejidos y productos biológicos. El nivel de aminoácidos en un medio es un factor crítico; en cantidades muy pequeñas puede que no sea suficiente para el crecimiento celular, pero en concentraciones muy altas pueden ser inhibitorias. Eagle¹⁴ describió las cantidades mínimas de aminoácidos necesarios para una gran variedad de células. Estas necesitan de los aminoácidos esenciales y utilizan adecuadamente los no esenciales, cuando son añadidos al medio. Pero son capaces de sintetizar estos últimos, cuando están ausentes, sin causar modificaciones, aparentemente, en la producción de proteínas ni en el crecimiento celular. Es de hacer notar que los aminoácidos utilizados en la elaboración de los medios, deben ser levógiros; puesto que los dextrógiros, aunque no son tóxicos, son inactivos.

2.— Vitaminas. Son parte esencial de la estructura de las coenzimas relacionadas con el metabolismo celular. Las vitaminas esenciales son: inositol, riboflavina, tiamina, piridoxina, ácido pantoténico, nicotinamida, ácido fólico, y colina.

3.— Suplementos proteicos. La mayoría de los cultivos primarios necesitan de factores poco conocidos, presentes en productos biológicos tales como el suero sanguíneo y extractos de tejidos. Las proteínas séricas actúan en la adherencia de las células a la superficie del vidrio y en la multiplicación celular. La utilización de varias fracciones del suero ha sido discutida recientemente por Healy y Parker¹⁵.

Para la preparación de un medio de cultivo se debe tomar en cuenta el uso que se dará a las células cultivadas. Un medio simple y barato puede ser usado en laboratorios de diagnóstico,

mientras que para estudios de biología celular se necesitan medios sintéticos definidos químicamente, que puedan ser preparados con exactitud y que sean reproducibles. Un medio simple consta generalmente de una solución salina balanceada, una fuente de aminoácidos y vitaminas, bicarbonato de sodio y antibióticos. Ejemplo de este tipo son los medios de lactalbúmina de Earle y Hanks cuya composición detallamos.

Medio ELS (Earle-Lactalbúmina-Suero). Agua destilada estéril, 746 ml. solución de Earle 10X, 100 ml.; hidrolizado de lactalbúmina al 5%, 100 ml.; suero de ternera, 20 ml.; bicarbonato de sodio 7.5%, 30 ml.; rojo fenol 0.5%, 4 ml.; penicilina, 200.000 U.; estreptomycin, 200 mgs.

Medio HLS (Hanks-Lactalbúmina-Suero). Agua destilada, 769 ml.; solución de Hanks 10X, 100 ml.; hidrolizado de lactalbúmina 5%, 100 ml.; suero de ternera, 20 ml.; rojo fenol 0.5%, 4 ml.; penicilina, 200.000 U.; estreptomycin, 200 mgs.

Un medio sintético se utiliza principalmente cuando se necesita conocer la totalidad de la composición del medio y estudiar los requerimientos mínimos de las células. Cuando se usa hidrolizado de lactalbúmina no se conocen las cantidades de aminoácidos presentes. Diferentes autores han preparado medios químicamente definidos, los cuales pueden ser adquiridos comercialmente. Egle ideó el medio basal¹³, el cual fue luego modificado por el mismo autor bajo el nombre de medio mínimo esencial¹⁴. En 1950, Morgan y col.¹⁰ describieron el medio 199, de extraordinaria complejidad, pero que era capaz de soportar el crecimiento de una gran variedad de células sin adición de suero ni de otros productos biológicos. Otros medios de renombre son el NCTC 109, el medio CMRL 1066, el recién producido CMRL 1415²⁹, y el medio de Neuman y Tytell⁴¹.

VI. PREPARACION DE ALGUNOS CULTIVOS CELULARES

1.— **Riñón embrionario humano.** Tyrrel y col.⁵⁵ describen un procedimiento para la obtención de células epiteliales, el cual se detalla a continuación. Los riñones se obtienen de fetos humanos, productos de abortos. Son decapsulados, y se elimina la pelvis. Se cortan en pequeños trocitos, los cuales son lavados varias veces con solución salina de Hanks. El tejido es luego colocado en un frasco de tripsinización, con tripsina al 0.25%. Se agita por 5 mi-

nutos y se descarta el sobrenadante. Se le añade nueva tripsina y se agita por 20 minutos a temperatura ambiente; luego de lo cual se recoge el sobrenadante y se guarda a 4°C mientras se hacen más extracciones con nueva tripsina. Las partes decantadas son centrifugadas a 4°C a 600 r.p.m. por 30 minutos. Se elimina la tripsina y las células son resuspendidas en el medio de cultivo, a razón de 600.000 células por ml.

2.— Cultivo de células epiteliales de la membrana amniótica humana. La posibilidad de utilizar estas células para la propagación de virus fue primeramente observada por Zitcer y col.⁵⁹, y luego ha encontrado amplio uso en diagnóstico virológico. Los tejidos son fáciles de obtener y no hay problemas con virus contaminantes. La técnica aquí descrita es de Wilt y col.⁵⁷, con algunas modificaciones.

La placenta, de un alumbramiento normal, es recogida, en solución salina de Hanks, con doble cantidad de antibióticos y fungizona. Se traslada al laboratorio donde se suspende, por el cordón, de una barra transversal. Se hace un corte circular en la base de implantación del cordón y se desprende la membrana amniótica, por colgajos que se depositan en un recipiente con solución salina balanceada. A medida que se van desprendiendo los colgajos, la placenta debe ser bañada con solución de Hanks.

Una vez obtenidos los trozos de membrana amniótica, se lavan con solución salina, para desprender coágulos y otras impurezas. Se cortan las membranas en trozos pequeños que se sumergen en solución de verseno preparada de la siguiente manera: verseno (sal disódica), 1 gr.; fosfato dibásico de sodio, 1.15 grs.; fosfato monopotásico, 0.2 grs.; agua destilada, c.s.p. 1.000 ml. En esta solución, la membrana es agitada fuerte y continuamente por 5 a 10 minutos. Este tratamiento elimina los restos de moco y sangre, y la hace más sensible a la ulterior extracción con tripsina.

Se trasladan los trozos a un recipiente con tripsina al 0.25% y se incuba estacionariamente a 34°C en baño de agua, con agitación manual cada 15 minutos. Al cabo de una hora hay una gran cantidad de células libres en la solución de tripsina. Aún se puede obtener un mayor número de células, agitando la membrana brevemente, en cierta cantidad de medio de crecimiento, antes de descartarlo. Se centrifugan ambas suspensiones celulares a 600 r.p.m. por 30 minutos, se suspenden las células en medio

de crecimiento y se inoculan a razón de 600.000 células por ml. El medio de cultivo preconizado por Wilt y col. es el siguiente: suero de caballo, 200 ml.; caldo de fosfato de triptosa, 200 ml.; glucosa al 10% 20 ml.; solución salina de Hanks, 500 ml.; antibióticos y fungicidas. Se le añade bicarbonato de sodio inmediatamente antes de su uso para obtener un pH de 7.4. Hsiung¹³ utiliza un medio que ofrece buenos resultados: está compuesto por medio HLS (Hanks-Lactalbúmina-Suero), 810 ml.; suero de ternera, 180 ml.; medio 199, 10 ml.

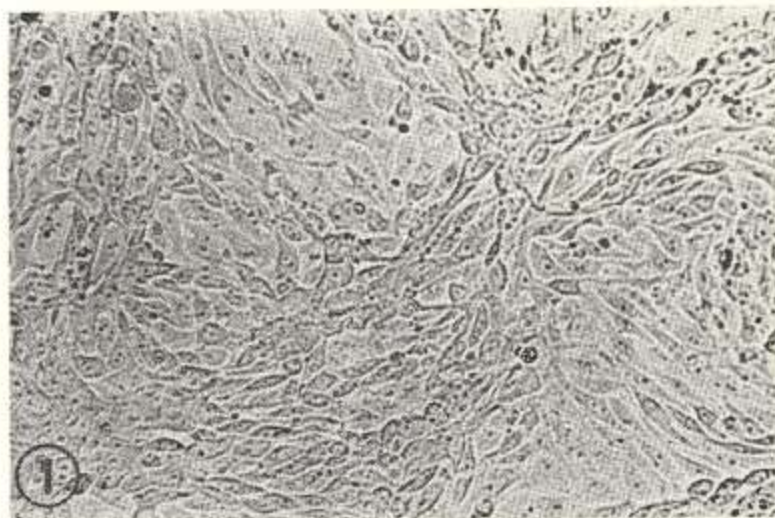


Fig. 1. Cultivo de células primarias de riñón de mono.

3.— Cultivo de fibroblastos de embrión de pollo. Se utilizan huevos embrionados de gallina de 9 días de incubación. Los embriones se extraen en forma aséptica a través de la cámara de aire. Se les desprenden las patas y las alas así como el pico y los ojos. Se lavan con una solución de Hanks. Se colocan en una jeringa y se hacen pasar a través de ella hacia un frasco de tripsinización, donde la papilla es lavada una vez con solución de Hanks y luego tratada con tripsina al 0.25% por una hora a temperatura ambiente. Las células se separan por centrifugación a 600 r.p.m. por 30 minutos. Se resuspenden en medio nutritivo a razón de 1×10^6 células. Las células pueden ser cultivadas en medio 199

con suero de ternera, o en una mezcla de medio 199 con hidrolizado de lactalbúmina al 0.5% en solución de Hanks y suero de ternera. En la preparación de otros tipos de células primarias puede intentarse la técnica de extracción con tripsina a 4°C por 18 horas.

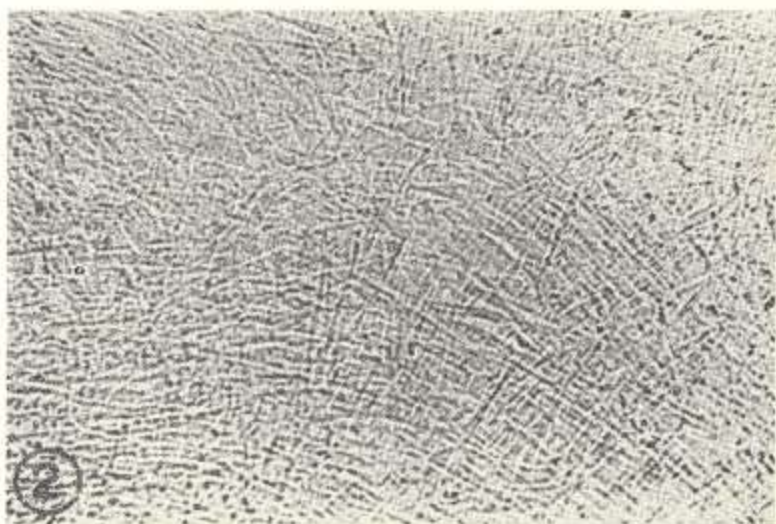


Fig. 2. Células diploides fibroblásticas, derivadas de pulmón humano.

VII. CULTIVO SERIADO DE CELULAS

Tanto las cepas celulares como las líneas celulares estables tienen su origen en un cultivo celular primario. El tratamiento de las células para subcultivos se hace de manera diferente. Las uniones intercelulares y con el vidrio, son tratadas con tripsina o con verseno o con una mezcla de ambos. La técnica seguida en nuestro laboratorio es la siguiente: se descarta el medio nutritivo de un cultivo celular en fase activa. Se enjuaga la capa celular con 2 ml. de tripsina, la cual se elimina de inmediato. Se añaden 2 ml. de tripsina y se permite su acción hasta que las células suelten sus uniones. En este momento se añaden 5 ml. de medio nutritivo con suero de ternera, el cual detiene la acción de la tripsina. Las células son dispersadas uniformemente por pipeteo fuer-

te. Este punto es de importancia, porque las células se multiplican mejor cuando están separadas que cuando forman grupos. Hyflick²⁷, recientemente, aconseja el uso de Aureomicina en dosis de 50 μ g por ml. en lugar de penicilina y estreptomycin, en un intento de minimizar las oportunidades de contaminación con micoplasmas.



Fig. 3. Cultivo de líneas celulares estables. Células BHK-21. Se observan dos tipos de células, a pesar de que la línea proviene de una sola célula madre.

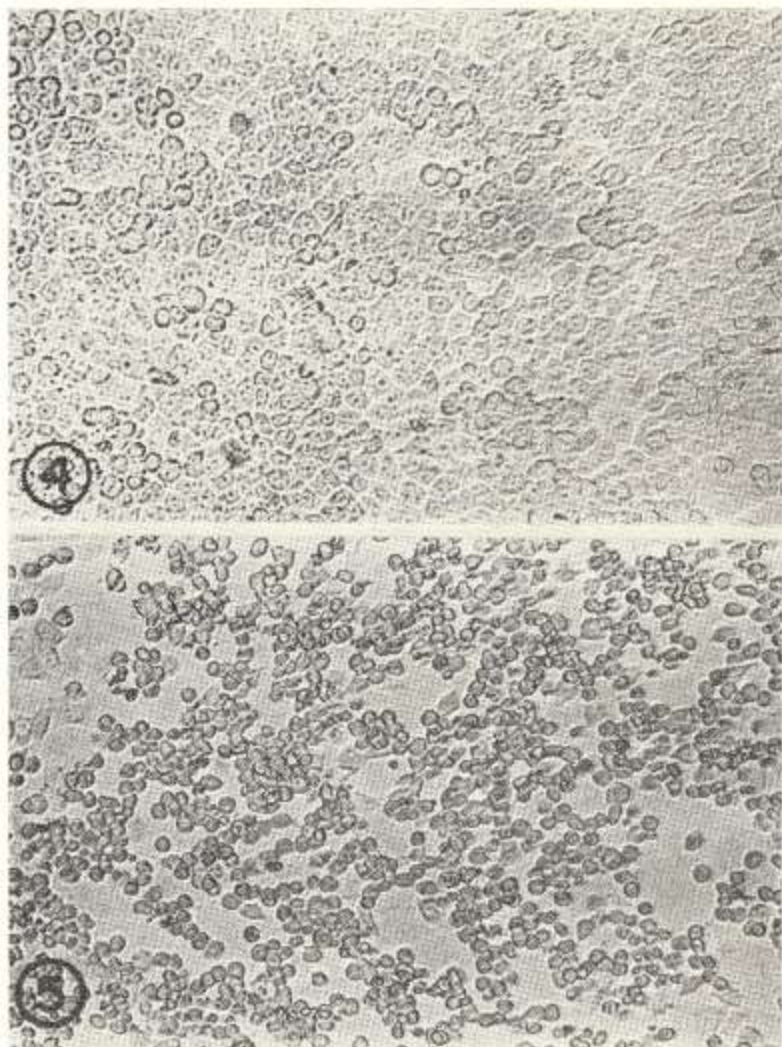
VIII. UTILIZACION DE LOS CULTIVOS CELULARES

1.— **Utilización en Virología.** El uso de los cultivos celulares ha facilitado grandemente el aislamiento e identificación de los virus. Con el advenimiento de estos métodos se descubrieron nuevos grupos de virus entre los que podemos citar los echovirus y los rinovirus y se amplió el conocimiento sobre otros ya conocidos. Ha permitido también el estudio de los virus oncogénicos, capaces de transformar células cultivadas normales en células con propiedades neoplásicas.

Aislamiento de virus.— Se puede intentar aislar un virus, de casi cualquier tipo de material: orina, heces, hisopados de farin-

ge y de recto, sangre, esputo, material de biopsia, lesiones, autopsia. La muestra, generalmente, es sometida a un proceso de homogenización y clarificación a baja velocidad. El sobrenadante se trata con antibióticos y se inocula sobre las células cultivadas. La clase de células utilizadas varía con la sospecha clínica. En líneas generales, el material proveniente de humanos es inoculado en células de igual origen. Pueden ser epiteliales (amnios, riñón fetal), fibroblastos (pulmón fetal), o líneas celulares estables; con preferencia HEp-2, KB, Hela. Las células epiteliales de riñón de mono también tienen un gran uso en el aislamiento e identificación de virus que infectan al hombre.

Los cultivos son observados diariamente en la búsqueda de un indicio que denuncie la presencia del virus. Tales indicios varían de acuerdo con los diferentes virus. Podemos enumerar varios: **Efecto citopático.** Se refiere a los cambios inducidos en la célula por la multiplicación del virus. Este efecto puede ser observado en el microscopio de luz. Una de las formas más evidentes es la lisis de las células, que culmina con la destrucción de la capa celular. En algunos casos es posible tener una idea del tipo de virus infectante de acuerdo al aspecto del efecto citopático. Por ejemplo, los adenovirus dan aspecto característico a las células infectadas: éstas aumentan de tamaño, se redondean, se hacen refringentes y tienden a agruparse. **Formación de sincicios.** Los virus de sarampión, parainfluenza y parotiditis, entre otros, causan la formación de sincicios por fusión de las membranas de células contiguas. Este efecto es también observado in vivo. **Vacuolización.** Algunos de los llamados virus de simios producen un efecto citopático muy peculiar, el cual consiste en la aparición de numerosas vacuólas en el citoplasma de la célula afectada. **Formación de placas**¹⁰. Las placas son zonas de células muertas por el efecto de la multiplicación del virus. Para obtener este tipo de lesión, se debe limitar la difusión del virus en el medio nutritivo, lo cual puede lograrse cambiando el medio líquido por uno solidificado con agar. De esta manera el virus que se multiplica en el interior de una célula es liberado e infecta a las células contiguas; por lo que pueden observarse zonas de células muertas rodeadas de zonas de células vivas. **Hemadsorción.** Muchos virus son capaces de multiplicarse en el interior de una célula sin causar un daño apreciable. Algunos de estos virus, a su vez, poseen la propiedad de aglutinar eritrocitos, al combinarse con sitios específicos de su superficie. Basándose en esta propiedad se puede poner de manifiesto



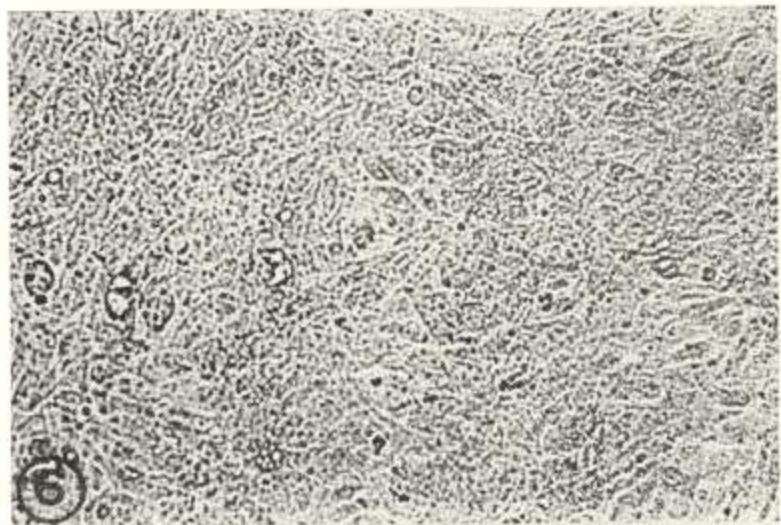
Figs. 4 y 5. Efecto citopatogénico de un virus. Se observa un cultivo de la línea celular HEP-2; y luego, el mismo cultivo, afectado por la multiplicación de un poliovirus.

la presencia de un virus. Al añadir una suspensión de eritrocitos sobre una capa celular infectada, los virus fijarán a éstos sobre la célula y no podrán ser desprendidos por enjuagues posteriores. **Efecto metabólico.** Las células cultivadas poseen, como es lógico, un metabolismo activo; lo cual conduce a la producción de ácidos provenientes de la actividad glicolítica. Como todos los medios contienen rojo fenol como indicador de pH, éste se torna amarillo a medida que se van acumulando estos productos. La multiplicación del virus detiene el metabolismo celular por lo que no se observará cambio en el color del medio. Esta diferencia de color entre los medios nutritivos de la célula cultivada infectada y no infectada, dio lugar al desarrollo de la prueba de inhibición por Melnick y Opton³⁵.

Como resultado de las observaciones descritas, se puede hacer una caracterización antigénica de los virus aislados, tratando de inhibir alguno de los efectos enumerados por medio de inmunosueros conocidos.

2.— Cultivo de tejidos en Farmacología. Mientras que la Farmacología Fisiológica utiliza animales y estudia el efecto de drogas en ellos, como un todo, determinando las variaciones en diferentes sistemas y aparatos, mediante registros apropiados, la moderna Farmacología Molecular utiliza el cultivo de tejidos para estudiar el modo de acción biológica de las drogas en la forma más íntima posible, utilizando las diversas técnicas derivadas de las ciencias biológicas.

La acción de una droga en cultivos celulares puede ser estudiada bajo el aspecto morfológico o citológico (modificaciones de la forma celular, de la estructura, crecimiento, multiplicación, diferenciación), y bioquímicamente (utilizando técnicas químicas, estudios de incorporación isotópica, de precursores de macromoléculas). Los estudios morfológicos se han perfeccionado con el desarrollo de métodos y técnicas superiores al microscopio de luz, tales como microscopio de contraste de fases, microscopía de interferencia, microscopio electrónico, y técnicas de coloración. Se ha estudiado el efecto de drogas sobre células cardíacas contrayéndose²³, e incluso se han observado las alteraciones que producen las drogas en el ritmo de las células cultivadas³⁸. Igualmente se ha utilizado el cultivo de células esqueléticas y cardíacas para estudios electrofisiológicos⁹. Pueden realizarse estudios sobre la mitosis celular, la duración de las diversas fases, el intervalo intermitótico, uti-



Figs. 6 y 7. Efecto citopatogénico de un virus. Cultivo de la línea celular SIRC (córnea de conejo) y el efecto de la multiplicación del virus de rubeola.

lizando drogas que afectan la mitosis (como colchicina), y puede ser medido directamente o calculado por autorradiografía⁴⁰. El crecimiento o multiplicación celular se determina en diferentes formas. Bien contando las células en un hemocitómetro (previa coloración) o en un contador electrónico, midiendo el peso seco, con métodos turbimétricos; o determinando químicamente algún componente celular, como las proteínas o el ácido desoxirribonucleico. Desde el punto de vista bioquímico, la acción de las drogas sobre las células cultivadas, puede ponerse de manifiesto midiendo la utilización de glucosa o aminoácidos, la producción de ácido láctico o ketoácidos, la incorporación de precursores marcados con isótopos (P^{32} , C^{14} , H^3 en fosfatos, bases púricas o pirimídicas), la utilización del oxígeno medido por el aparato de Warburg.

En Farmacología, pueden utilizarse diferentes tipos de células (líneas celulares estables o no) u órganos (secciones de tejidos con diferentes tipos de células), según el experimento plani-

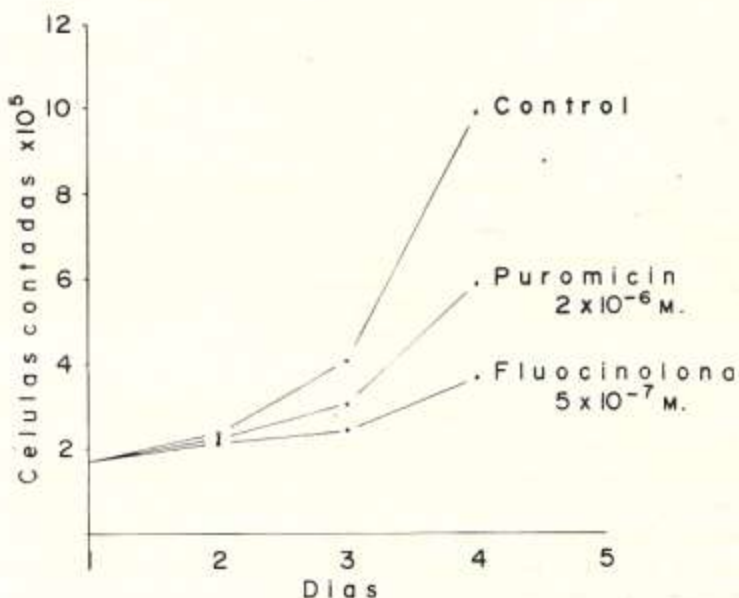


Fig. 8. Efecto del puromicin y fluocinolona sobre el crecimiento de células L (fibroblastos de ratón). Abscisa: días en que se hizo el conteo. Ordenada: número de células.

ficado. Muchas han sido las aplicaciones del cultivo de tejidos en Farmacología; una de las más frecuentes es la de probar el efecto de drogas para estudiarlas mejor o descartarlas. Este medio de estudio, por ejemplo, ha sido adoptado por el Cancer Chemotherapy National Service Center, donde se estudian miles de compuestos y se trata de establecer la relación entre la citotoxicidad en cultivos celulares y actividad antitumoral *in vivo*⁵³. Otra aplicación es el estudio de los mecanismos de resistencia a drogas anticancerosas⁵⁰.

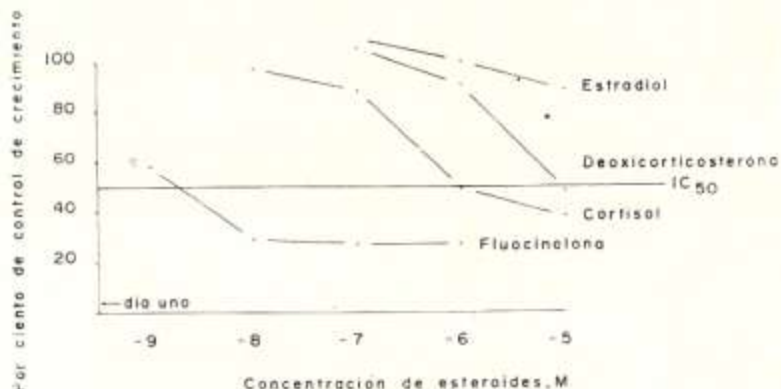


Fig. 9. Curva de dosis respuesta, de fibroblastos de ratón, a diferentes esteroides. Cada curva representa el porcentaje de crecimiento de las células tratadas con esteroides, en relación con las mismas células tratadas sólo con el solvente del esteroide (100%). Abscisa: es el exponente de la cifra 1×10 y expresa la concentración del esteroide. Ordenada: porcentaje del control de crecimiento celular. IC_{50} : concentración inhibitoria del 50%.

Nosotros hemos utilizado líneas celulares estables (fibroblastos de ratón o células L, linfoma de ratón o ML-388 y células Hela) en nuestros experimentos. Cultivamos las células en botellas de prescripción de seis onzas en 15 ml. de medio. La cantidad de células sembradas varía según la viabilidad. Con células L se utiliza de $1-2 \times 10^5$ células por botella. El control del crecimiento puede hacerse cada día hasta que se alcance un máximo o plateau; o el día 5 ó 6, cuando ya se ha alcanzado un buen crecimiento. Las drogas se agregan al día siguiente (día uno) de haberse distribuido las células en las botellas, y sus efectos sobre

el crecimiento pueden seguirse a diario (Fig. 8); o bien, cuando se estime que el control ha alcanzado un buen crecimiento. Si utilizamos diferentes concentraciones de una misma droga, podremos establecer una relación o curva de dosis respuestas (Fig. 9). El efecto podrá expresarse como un porcentaje del control (sin droga pero con el solvente) o bien directamente mediante el conteaje celular. El conteaje puede realizarse con un contador electrónico, previa suspensión de las células en solución salina que contiene tripsina al 0.15%, o con el hemocitómetro³⁶. Generalmente se utilizan tres botellas por cada droga a concentración utilizada y tres para el control, determinándose el error standard. El efecto que la droga tenga en diferentes parámetros celulares, se estudiará de acuerdo a su relación con los mecanismos celulares. Así por ejemplo, la acción sobre síntesis de proteínas o macromoléculas, podemos seguirla mediante determinaciones químicas del nitrógeno

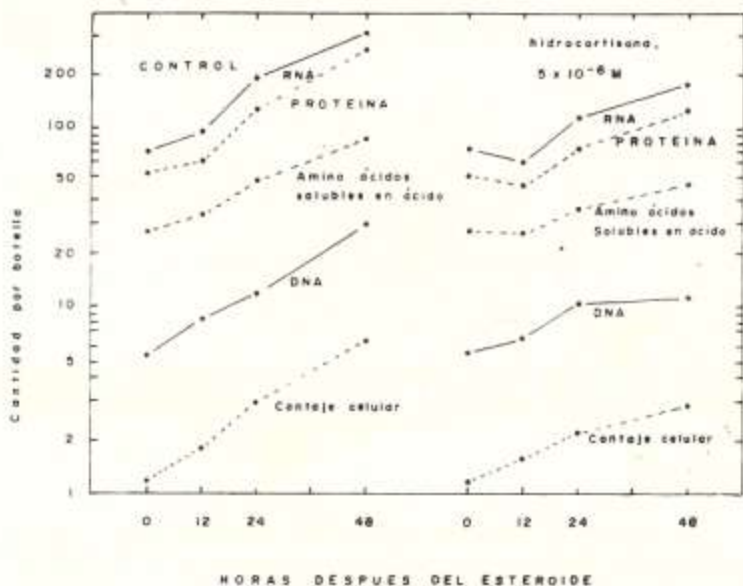


Fig. 10. Efecto de la hidrocortisona sobre la acumulación de elementos celulares en cultivos in vitro de células ML-388. El conteaje celular está expresado $\times 10^5$; el DNA como $m\mu$ mol. de desoxirribosa en la fracción soluble en ácido; los aminoácidos, en $m\mu$ mol. de material que reacciona con la ninhidrina (equivalentes de leucina). Las proteínas están expresadas en μ grs. de nitrógeno proteico (Gabourel y Aronov)¹⁵.

proteico, ribosa o desoxirribosa (Fig. 10)¹⁰, o utilizando precursores marcados con isótopos, los cuales podemos seguir y determinar a diferentes intervalos de tiempo (Pratt, W.; Aronow, L. Por publicar) (Fig. 11).

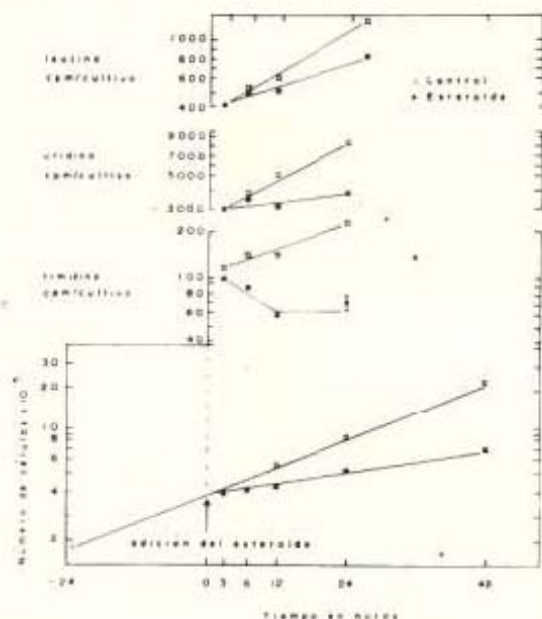


Fig. 11. Ilustración de los efectos de un esteroide sobre la incorporación de precursores marcados y el crecimiento celular (Pratt y Aronow. Por publicar).

SUMMARY

A review of different aspects of tissue culture methods is made, with discussion on basic requirements of salts and nutritive substances important for keeping osmolarity, pH and life conditions in vitro. A description of the techniques used for culturing amnion cells, chick embryo fibroblasts and fetal human kidney cells is presented besides a brief outline of continuous culture of cell strains. Finally an explanation of uses of cell culture in Virology and Pharmacology is offered.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.— ALEXANDER, R.F.; SPRIGG, A.I. "The differential diagnosis of tumour cell in circulating blood". *J. Clin. Pathol.* 13: 414. 1960.
- 2.— BEEBE, S.P.; EWING, J. "A study of the biology of tumor cells". *Brit. Med. J.* 2: 1559. 1906.
- 3.— BEHBEHANI, A.M.; MELNICK, J. L.; DEBAKEY, M. "Continuous cell strains derived from human atheromatous lesions and their viral susceptibility". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 118: 759. 1965.
- 4.— BERMAN, L.; STULBERG, C.S. "Eight culture strains (DETROIT) of human epithelial-like cells". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 92: 730. 1956.
- 5.— BERMAN, L.; STULBERG, C.S.; RUDDLE, F.H. "Long term culture of human bone marrow. I. Report of isolation of a strain of cells resembling epithelial cells from bone marrow of a patient with carcinoma of the lung". *Blood.* 10: 896. 1955.
- 6.— BURROWS, M.T. "The cultivation of tissues of the chick embryo outside the body". *J. Amer. Med. Ass.* 55: 2057. 1911.
- 7.— CARREL, A. "The permanent life of tissues outside the organism". *J. Exp. Med.* 15: 516. 1912.
- 8.— CHANG, R.S. "Continuous subcultivation of epithelial-like cells from normal human tissues". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 87: 440. 1954.
- 9.— CRAIN, S.M. "Resting and action potentials of culture chick embryo spinal ganglion cells". *J. Comp. Neurol.* 104: 285. 1956.
- 10.— DULBECCO, R. "Production of plaques in monolayer tissue culture by single particles of an animal virus". *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 38: 747. 1952.
- 11.— DULBECCO, R.; VOGT, M. "Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses". *J. Exp. Med.* 99: 167. 1954.
- 12.— EAGLE, H. "Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 89: 362. 1955.
- 13.— EAGLE, H. "The minimum vitamin requirements of the L and Hela cells in tissue culture, the production of specific vitamin deficiencies, and their cure". *J. Exp. Med.* 102: 595. 1955.
- 14.— EAGLE, H. "Aminoacid metabolism in mammalian cell cultures". *Science.* 130: 432. 1959.

- 15.— EARLE, W.R. "Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells". *J. Nat. Cancer Inst.* 4: 165. 1943.
- 16.— EARLE, W.R.; SCHILLING, E.L. "Production of malignancy in vitro. X. Continued description of cells at the glass interface on the cultures". *J. Nat. Cancer Inst.* 10: 1067. 1950.
- 17.— FOGH, J.; LUND, R.C. "Continous cultivation of epithelial cell strain (FL) from human amniotic membrane". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 94: 532. 1957.
- 18.— GABOUREL, D.J.; ARONOW, L. "Growth inhibitory effects of hydrocortisone on mouse lymphoma ML-388 in vitro". *J. Pharm. Exp. Therap.* 136: 213. 1962.
- 19.— GEY, G.O.; COFFMAN, M.T. "Tissuë culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium". *Cancer Res.* 12: 264. 1952.
- 20.— GEY, G.O.; GEY, M.K. "The maintenance of human normal cells and tumor cells in continous culture. I. Preliminary report: cultivation of mesoblastic tumors and normal tissues and notes on methods of cultivation". *Am. J. Cancer.* 27: 45. 1936.
- 21.— GRESSER, I.; CHANY, C. "Multiplication of poliovirus type I in preparations of human leukocytes and its inhibition by interferon". *J. Immunol.* 92: 889. 1964.
- 22.— HANKS, J.H.; WALLACE, R.E. "Relation of oxigen and temperatures in the preservation of tissues by refrigeration". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 71: 196. 1949.
- 23.— HARARY, L.; FARLEY, B. "In vitro studies of single isolated beating heart cells". *Science.* 131: 1674. 1930.
- 24.— HARRISON, R.G. "Observations on the living developing nerve fiber". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 4: 140. 1907.
- 25.— HAYFLICK, L. "The stablishment of a line (WISH) of human amnion cells in continous cultivation". *Exp. Cell Res.* 23: 14. 1961.
- 26.— HAYFLICK, L. "Advances in tissue culture methods important to viral disease problem". *Postgrad. Med.* 35: 503. 1964.
- 27.— HAYFLICK, L. "The limited in vitro life time of human diploid cell strains". *Exp. Cell Res.* 37: 614. 1965.
- 28.— HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P.S. "The serial cultivation of human diploid cell strains". *Exp. Cell Res.* 25: 585. 1961.

- 29.— HEALY, G.M.; PARKER, R.C. "An improved chemically defined medium (CMRL-1415) for newly explanted mouse embryo cells". *J. Cell Biol.* 30: 531. 1966.
- 30.— HEALY, G.M.; PARKER, R.C. "Cultivation of mammalian cells in defined media with protein and nonprotein supplements". *J. Cell Biol.* 30: 539. 1966.
- 31.— HENLE, G.; DEINHARDT, F. "The stabliment of strains of human cells in tissue culture". *J. Immunol.* 79: 54. 1957.
- 32.— HINZ, R.W.; SYVERTON, J.T. "Mammalian cell cultures for study of influenza virus. I. Preparation of monolayer cultures with collagenase". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 101: 19. 1959.
- 33.— HSIUNG, G.D. "Use of human kidney cultures in the study of enteroviruses". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 102: 612. 1959.
- 34.— MACPHERSON, L.; STOKER, M. "Polyoma transformation of hamster cell clones. An investigation of genetic factors affecting cell competence". *Virology.* 16: 147. 1962.
- 35.— MELNICK, J.L.; OPTON, E.M. "Assay of poliomyelitis neutralizing antibody in disposable plastic panels". *Bull. W.H.O.* 14: 129. 1956.
- 36.— MERCHAND, J.; KALM, D.; RAYMOND, H.; MURPHY, H.W. "Handbook of cell and organ culture". Burgess. Minnesota. 1965.
- 37.— MOSCONA, A.; TROWELL, D.A.; WILLMER, E.N. "Cells and tissues in cultures. Methods, biology and physiology". Vol. 1. Pág. 79. E.N. Willmer, editor. Academic Press, New York. 1965.
- 38.— MINTZ, B. "Experimental study of the developing mammalian egg: removal of the zone pelucida". *Science.* 138: 594. 1962.
- 39.— MOORE, E.A.; SABACHEWSKY, L.; TOOLAN, H.W. "Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells". *Cancer Res.* 15: 598. 1955.
- 40.— MORGAN, J.F.; MORTON, H.J.; PARKER, R.C. "Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 73: 1. 1950.
- 41.— NEUMAN, R.E.; TYTELL, A.A. "Serumless medium for cultivation of cells of normal and malignant origin". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104: 252. 1960.
- 42.— OSGOOD, E.E.; BROOKE, H.J. "Continuous tissue culture of leukocytes from human leukemic bloods by appli-

- cation of "gradient" principles". *Blood*. 10: 1010. 1955.
- 43.— OWENS, O.H.; GEY, M.K.; GEY, G.O. "Growth of cells in agitated fluid medium". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 58: 1039. 1954.
- 44.— PARKER, R.C. "Methods of tissue culture". Pág. 137. Harper & Row. New York. 1964.
- 45.— PORTERFIELD, J.S. "Methods in virology". Maramorosh, K.; Koprowsky, H., editors. Vol. 1. Pág. 525. Academic Press. New York. 1967.
- 46.— PUCK, T.T.; CIECIURA, S.J.; FISHER, H.W. "Clonal growth in vitro of human cells with fibroblastic morphology. Comparison of growth and genetic characteristics of single epitheloid and fibroblast-like cells from a variety of human organs". *J. Exp. Med.* 106: 145. 1957.
- 47.— PUCK, T.T.; MARCUS, P.I.; CIECIURA, S. J. "Clonal growth of mammalian cells in vitro. Growth characteristic of colonies from single Hela cells with and without a feeder layer". *J. Exp. Med.* 103: 273. 1956.
- 48.— ROUS, P.; JONES, F.S. "A method for obtaining suspensions of living cells of the fixed tissues, and for the plating out of individual cell". *J. Exp. Med.* 23: 546. 1916.
- 49.— RINALDINI, L.M.J. "The isolation of living cells from animal tissues". *Inter. Rev. Cytol.* 7: 587. 1958.
- 50.— ROSENOER, V.M.; JACOBSON, W. "Cells and tissues in cultures. Methods, biology and physiology". Vol. 3. Pág. 351. E.N. Willmer, editor. Academic Press. New York. 1966.
- 51.— RUBIN, A.D. "The human lymphocytes in short-term tissue culture". *Postgrad. Med.* 41: 244. 1967.
- 52.— SANFORD, K.K.; EARLE, W.R.; LIKELY, G.D. "The growth in vitro of single isolated tissue cells". *J. Nat. Cancer Inst.* 9: 229. 1948.
- 53.— SCHEPARTZ, S.A.; MacDONALD, M.M.; LEITER, J. "The use of cell culture as a presumptive screen for antitumor agents". *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.* 3: 265. 1961.
- 54.— SOUTHAM, C.M.; MOORE, A.E.; RHOADS, C.P. "Homotransplantation of human cell lines". *Science.* 125: 158. 1957.
- 55.— TYRREL, D.A.J.; BYNOC, M.L.; HITCHCOK, G.; PEREIRA, H.G.; ANDREWS, C.H. "Some virus isolations from common colds. I. Experiments employing human volunteers". *Lancet.* 1: 235. 1960.

- 56.— WALLACE, J.H.; HANKS, J.H. "Agar substrates for study of microepidemiology and physiology in cells in vitro". *Science*. 128: 658. 1958.
- 57.— WILT, J.C.; MILLER, D.; RUITER, J. "Human amnion for tissue culture". *Canadian J. Microbiol.* 10: 169. 1964.
- 58.— WOLLENBERGER, A.; HALLE, W. "Specificity of the effects of cardiac glucosydes on the rhythmic contractions of single cultured cardiac muscle cells". *Nature*. 188: 1114. 1960.
- 59.— ZITCER, E.M.; FOGH, J.; DUNNEBACKE, T.H. "Human amnion cells for large-scale production of polio virus". *Science*. 122: 30. 1955.
-

"Debemos practicar nuestros poderes de observación, de modo que se desarrolle esa actitud mental que consiste en estar siempre a la expectativa de lo imprevisto y formarnos el hábito de examinar cualquier posibilidad que nos ofrezca la casualidad. Los descubrimientos se hacen prestando atención a todos los indicios por pequeños que estos sean. La actitud mental del científico, que requiere evidencias convincentes, debe reservarse para la etapa de prueba de la investigación".

W. I. B. Beveridge

"El Arte de la Investigación Científica".

"No hay nada reprochable en cometer un error, siempre que se descubra y corrija a tiempo. Aquel científico que es excesivamente prudente, es poco probable que cometa errores o realice descubrimientos. Whitehead lo ha expresado de la siguiente manera: 'El miedo al error es la muerte del progreso'".

"La sensibilidad emocional es tal vez un valioso atributo para un científico; en todo caso el científico notable debe ser considerado como un artista creador, y es del todo falso pensar que el científico es un hombre que simplemente sigue las leyes de la lógica y de los experimentos".

W. I. B. Beveridge

"El Arte de la Investigación Científica".