

## Tesis de Licenciatura

# Caracterización citogenética de una línea celular humana infectada persistentemente con HIV-1

Guazzone, Vanesa Anabella

Tesis presentada para obtener el grado de Licenciado en  
Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis de licenciatura de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Six-Year Bachelor's Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Guazzone, Vanesa Anabella. (). Caracterización citogenética de una línea celular humana infectada persistentemente con HIV-1. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000696\\_Guazzone](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000696_Guazzone)

#### Cita tipo Chicago:

Guazzone, Vanesa Anabella. "Caracterización citogenética de una línea celular humana infectada persistentemente con HIV-1". Tesis de Licenciado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. .  
[http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario\\_nBIO000696\\_Guazzone](http://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO000696_Guazzone)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**Universidad de Buenos Aires**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**  
**Departamento de Biología**

**Caracterización citogenética de una línea celular  
humana infectada persistentemente con HIV-1**

**Autora: Vanesa Anabella Guazzone**  
**Directora: Dra. María Susana Merani**

**Laboratorio de citogenética**  
**C.I.R. Facultad de Medicina**  
**Universidad de Buenos Aires**

**Tesis para optar por el título de Licenciada en Ciencias Biológicas**  
**Diciembre de 1999.**

A Mariano, a Mariel y a Malena

## Agradecimientos

A la Dra. Susana Merani por aceptarme en su laboratorio y por iniciarme en el camino de la investigación. Camino que espero seguir transitando.

Al Dr. Daniel Rabinovich por cederme las líneas celulares, por revisar mi tesis y por dedicarme su tiempo en cada oportunidad que golpeé su puerta.

A María Inés, Victoria, Adela, Mónica, Cecilia y Carolina por responder siempre mis dudas, por transmitirme sus respectivas experiencias y por haberme ayudado a recortar los queridos cromosomas.

A mi tía Bocha y a mi tío Juan Carlos por haberme aceptado en su hogar cuando empecé a dejar La Plata con la firme idea de querer estudiar Biología.

A mis amigos Sandra, Martín, Mariana, Facundo, Gonzalo y Guillermo por compartir tantas horas de estudio y de meriendas en el pastito soñando con este momento que se hizo desear largos años. Y hoy ya alejados de esos días, por brindarme su amistad.

A todos aquellos (que saben muy bien quienes son y que no enumero porque la lista sería muy larga) que cuidaron de mis hijas para que yo pudiera estudiar, trabajar y así no renunciar a uno de mis grandes sueños, recibirme.

A mi mamá y a mi papá por haberme apoyado y acompañado cuando decidí estudiar esta carrera pese a no entender demasiado de que se trataba y si era tan necesario irme de La Plata (ciudad con tantas facultades) para lograrlo.

A mi hermano Fede por compartir este y otros tantos momentos importantes de mi vida.

Y por último a mi gran amor Mariano por estar siempre a mi lado y a veces por no estar, así me quedaba tranquila en casa recortando cromosomas (parte adoptada de la familia).

A todos: sinceramente muchas gracias.

<b>RESUMEN</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<i>Características típicas de la variabilidad cariotípica de las células en cultivo</i>	6
<i>Los rearrreglos cromosómicos numéricos y estructurales no son azarosos</i>	6
<i>Pérdida de uno de los cromosomas sexuales</i>	7
<i>Constancia en el número de NORs-Ag<sup>+</sup> y en su distribución en los cromosomas de células normales y tumorales</i>	7
<i>Balance del set cromosómico en células de tumores y en células de leucemias en cultivo</i>	8
<i>Persistencia de disomía en los autosomas de la mayoría de líneas celulares de tumores y leucemias</i>	8
<i>Historia de la Línea celular H9</i>	9
<i>Características principales de H9</i>	10
<i>Importancia del estudio citogenético de las líneas celulares</i>	10
<i>Hipótesis de trabajo</i>	12
<b>OBJETIVOS</b>	<b>13</b>
<i>Objetivo general</i>	14
<i>Objetivos particulares</i>	14
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>15</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>20</b>
<i>Línea celular H9</i>	21
<i>Línea celular H9/HTLV-III<sub>B</sub></i>	28
<i>Línea celular H9/HTLV-III<sub>MN</sub></i>	30
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>37</b>
<i>Conclusiones</i>	42
<b>APENDICE</b>	<b>43</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>45</b>

## **Resumen**



## Resumen

La línea celular H9 deriva por clonación de HUT78, obtenida a partir de un linfoma de células T cutáneo. La línea celular H9/HTLV-III<sub>B</sub> se caracteriza por poseer antígenos de HIV demostrables por inmunofluorescencia en un 95-97% de células, mientras que H9/HTLV-III<sub>MN</sub> muestra un 20% de células infectadas. Ambas se encuentran persistentemente infectadas y son productoras. La caracterización citogenética de las mismas en distintos pasajes dió resultados que podrían ser elementos válidos para discriminar estas consecuencias.

Se determinó el número cromosómico a partir de metafases de cultivos con tratamientos citogenéticos convencionales para técnicas de bandas G, C, DA/DAPI, NOR y FISH. Las líneas resultaron todas aneuploides, diferentes entre sí y sin diferencias significativas en los diferentes pasajes. H9 presentó un  $2n=70$  con un rango entre 60 y 74, el de H9/HTLV-III<sub>B</sub> fue 67 con un rango entre 60 y 75 mientras que el de H9/HTLV-III<sub>MN</sub> fue 64 con un rango entre 46 y 70. No se observó la presencia de los cromosomas del set normal 4, 5, 6, 7, 10, 13, 18, 19, 20 y los sexuales (X e Y). Por medio de bandas G fueron identificados los cromosomas involucrados en la formación de marcadores. Al igual que H9 ambas líneas presentaron los cromosomas marcadores M20 der(7), H10 der(10), H2 t(2q;1q) y M7 i(18) entre otros. H9/HTLV-III<sub>MN</sub> no presentó los marcadores H1 der(1), M31 t(5q;6q), M32 t(5p;6p) ni otros en los cuales se encuentra involucrado el brazo q del cromosoma 6. Posiblemente esta diferencia sea la que se encuentre más relacionada con el menor porcentaje de infección de la línea infectada con la cepa HIVMN.

## **Introducción**



## Introducción

La validez de los cultivos celulares como modelo de las funciones fisiológicas *in vivo* es reconocida en el mundo científico<sup>1,2</sup>.

Un cultivo se obtiene por crecimiento de las células que componen un fragmento de tejido o directamente por disgregación mecánica o enzimática del mismo<sup>2</sup>. Este es el primer paso en la obtención de una línea celular. En el primer método mencionado, la selección actúa sobre la capacidad de las células de migrar desde el explanto, mientras que en el segundo solamente aquellas células que sobrevivan a la técnica de disgregación y se adhieran para formar la monocapa asentarán las bases de un cultivo primario. Para el caso de un tejido linfóide basta con crecer un número apropiado de células.

A partir de este cultivo primario se realiza un primer subcultivo; el cual pasa a denominarse línea celular y puede propagarse y subcultivarse varias veces<sup>2</sup>.

La mayoría de las líneas celulares pueden multiplicarse sin modificar su composición cromosómica por un número limitado de generaciones celulares, más allá de las mismas mueren o dan lugar a una línea celular continua<sup>2</sup>. La habilidad de una línea celular de crecer infinitamente refleja su capacidad de variación genética. Existen líneas celulares que permanecen predominantemente euploides a lo largo de su vida en cultivo y nunca dan lugar a una línea celular continua, mientras que otras, en general cultivos celulares de tumores animales y humanos, originan cultivos continuos que mayormente son aneuploides<sup>2</sup>. Esta alteración en la constitución cromosómica de la línea se denomina “transformación *in vitro*” y ocurre espontáneamente o se induce por sustancias químicas o virus oncogénicos<sup>2</sup>.

El término “transformación” se aplica al proceso de formación de una línea celular continua. La transformación implica importantes cambios genéticos que dan, como principal resultado, la desregulación del ciclo celular<sup>1</sup>. Una célula transformada no responde a las señales inhibitorias de la proliferación (como la inhibición por contacto). Además logran evadir el mecanismo de muerte celular programada (apoptosis), característico del cultivo de células normales luego de un número de duplicaciones que oscilan los 50 ó 60<sup>1</sup>. La característica más interesante, desde el punto de vista citogenético, que presenta una línea celular continua es su desviación del número cromosómico normal.



### ***Características típicas de la variabilidad cariotípica de las células en cultivo***

#### ***Los rearrreglos cromosómicos numéricos y estructurales no son azarosos***

Las técnicas de bandeo de alta resolución<sup>3</sup> han demostrado que las células malignas de la mayoría de los tumores y leucemias analizados muestran anomalías cromosómicas características<sup>4</sup>. Más de 70 aberraciones cromosómicas han sido descritas en varios tumores malignos humanos<sup>5</sup>. Los tipos más habituales de anomalías no aleatorias son: translocaciones equilibradas, deleciones de cromosomas, inversiones, monosomías y trisomías<sup>5</sup>.

La principal prueba en favor del carácter no aleatorio de los cambios cromosómicos numéricos y estructurales en líneas celulares permanentes es el mantenimiento *in vitro* de muchas de las alteraciones cromosómicas específicas encontradas en material proveniente de tumores y de leucemias a partir del cual la línea celular fue obtenida<sup>6</sup>. Las translocaciones específicas t (8; 14), t (2; 8), y t (8; 22) encontradas en pacientes con linfoma de Burkitt también se observan en las líneas celulares procedentes del mencionado linfoma<sup>7</sup>. En líneas celulares establecidas de células hematopoyéticas de pacientes con leucemia mieloide crónica, el cromosoma Philadelphia es frecuentemente retenido<sup>8</sup>. En la mayoría de las líneas celulares originadas de neuroblastomas, deleciones ubicadas en el brazo corto del cromosoma 1 están presentes, mientras que en líneas celulares derivadas de tumores primarios de pulmón ocurre lo mismo en el cromosoma 3<sup>9</sup>.

Otra prueba convincente a favor de la no aleatoriedad de los rearrreglos cromosómicos estructurales es la diferente distribución de puntos de ruptura cromosómicos durante la formación de marcadores en líneas celulares de distinta histogénesis. En sublíneas de la línea celular HeLa las regiones centroméricas de los cromosomas 1, 3 y 5 son mayormente dañadas y los cromosomas 8 y 11 nunca participan en la formación de marcadores<sup>6</sup>. En cambio, en la línea celular Raji (establecida a partir de linfocitos B de un paciente con linfoma de Burkitt) el cromosoma 8 y el 11 son los más involucrados en la formación de marcadores y las regiones centroméricas de los restantes cromosomas nunca participan en la formación de los mismos (excepto el cromosoma 18)<sup>10</sup>. El mismo patrón de distribución de puntos de ruptura cromosómica se observa al analizar líneas derivadas de leucemias de linfocitos B<sup>11</sup>.

En líneas celulares de glioma humano el patrón de rupturas es muy diferente: en la formación de marcadores se hallan involucradas predominantemente regiones proximales del

brazo largo del cromosoma 12 y medias del brazo largo del 13 y 14<sup>12</sup>.

El patrón de distribución de los “hot spots” en los cromosomas y cambios en el número de ciertos cromosomas son manifestaciones morfológicas de procesos bioquímicos-moleculares conectados con cambios en el número y estructura de diferentes genes, incluyendo los oncogenes<sup>6</sup>.

#### *Pérdida de uno de los cromosomas sexuales*

La pérdida de uno de los cromosomas sexuales es un evento frecuente en neoplasias de células sanguíneas, de médula ósea y en otros tumores malignos humanos. La pérdida del cromosoma X o Y es un hecho regular en el cultivo de líneas celulares humanas y animales, ocurre tanto en estadios tempranos como tardíos del establecimiento de la línea<sup>6</sup>.

#### *Constancia en el número de NORs-Ag<sup>+</sup> y en su distribución en los cromosomas de células normales y tumorales*

El número de cromosomas positivos al bandeo NOR (nucleolar organizer region) varía entre células de diferente tejido de un mismo organismo y entre células del mismo tejido<sup>6</sup>. Esta diferencia se reporta en el análisis de células de médula ósea de pacientes sanos y de pacientes enfermos y también en linfocitos normales y en fibroblastos de un mismo individuo. La causa es la diferente actividad funcional de los genes ribosomales propia de los tejidos y del nivel de diferenciación celular para la misma histogénesis<sup>13</sup>.

Completamente diferente es el patrón de tinción NOR que se observa en las líneas celulares. Aunque el número de NORs activos puede variar en las células de una dada línea, un patrón típico de tinción de los cromosomas con plata (Ag<sup>+</sup>) puede encontrarse fácilmente. Dado que las células son similares en número, intensidad y distribución de NORs-Ag<sup>+</sup> se puede individualizar cualquier línea celular aún en ausencia de marcadores<sup>6</sup>.

En líneas celulares humanas los NORs sobre los cromosomas marcadores pueden localizarse intersticialmente y en telómeros. El patrón de localización de los NORs sobre los cromosomas marcadores junto con el patrón de los cromosomas normales constituye una característica única de una línea celular<sup>6</sup>.



*Balance del set cromosómico en células de tumores y en células de leucemias en cultivo*

En la progresión tumoral se manifiestan cambios en el cariotipo de las células tumorales que son particularmente notables en las células metastásicas. En los estados iniciales de la enfermedad, suelen encontrarse rearrreglos estructurales simples en las células malignas que incrementan su complejidad a medida que el tumor se desarrolla. Los múltiples cambios numéricos y estructurales en las células tumorales dan lugar a la formación de nuevos clones celulares<sup>5</sup>.

El análisis de estos clones revela que existen entre ellos diferencias en el contenido de ADN y en su composición cromosómica, lo cual indica la ausencia de un balance genómico en las células estudiadas. En cambio, las líneas celulares continuas presentan la característica más importante de las células en cultivo que es el balance del material cromosómico. Según Mamaeva se entiende por balance del material cromosómico a las semejanzas de los “reconstructed karyotypes”(RK) entre las líneas celulares, es decir, a las similitudes del material cromosómico total de diferentes células dentro del mismo clon, de células de diferentes clones de la misma línea y de células de la línea como un todo. Y define a un RK como el cariotipo normal que se arma a partir de los fragmentos cromosomales normales contenidos en los cromosomas marcadores<sup>6, 14</sup>.

*Persistencia de disomía en los autosomas de la mayoría de líneas celulares de tumores y leucemias*

Las células tumorales *in vivo* presentan un cariotipo con monosomía parcial o total de ciertos autosomas. En las neoplasias humanas las monosomias más frecuentes involucran a los cromosomas 1, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 17, 20 y 22. Además, han sido descriptos casos de tumores con clones celulares cercanos a la haploidía, caracterizados por monosomía de muchos autosomas y un número modal de 23-34<sup>5</sup>.

En cambio, la mayoría de las líneas celulares humanas y animales retienen la disomía de todos sus autosomas<sup>6</sup>. Significa que cuando una línea celular permanente se establece lo logra por selección de un clon preexistente con diploidía del set autosomal y con un alto potencial proliferativo o por evolución gradual del cariotipo de células hipodiploides iniciales. Según Mamaeva el 85% de las líneas celulares analizadas presentan al menos dos homólogos por cada autosoma. El 15% restante serían ejemplos de líneas celulares que aún no alcanzaron su estabilización cariotípica *in vitro*. Estas líneas compensarían su falta de material genético a



través de : (1) poliploidización de células con monosomía, (2) amplificación de oncogenes, con predominio de la familia *myc* y (3) extracopiado de autosomas completos o de sus fragmentos<sup>6</sup>.

La amplificación de genes es identificada citogenéticamente en forma de dobles diminutos o regiones homogéneamente teñidas<sup>15</sup>.

### ***Historia de la Línea celular H9***

En Mayo de 1984, Robert Gallo anunció: el aislamiento del virus causante del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), denominado por su grupo HTLV-III y la obtención en grandes cantidades del mismo, hecho imposible hasta ese momento dado que no existía una línea celular sobre la cual el virus pudiera replicarse. Cabe aclarar que posteriormente se conoció que se trataba del mismo virus aislado por Luc Montagnier y denominado LAV. En ese trabajo no se menciona quien había establecido la línea celular. A partir de este momento una gran discusión giró en torno del origen de H9<sup>16, 17</sup>.

En el trabajo “Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS”(Mayo de 1984)<sup>18</sup> se menciona que una población de linfocitos T derivada de un adulto con leucemia linfóide, susceptible a la infección con HTLV-III (human T-lymphotropic retroviruses), fue cultivada con el fin de seleccionar aquellos clones permisivos a la infección viral, que conserven altas tasas de crecimiento y de producción viral. La línea celular a partir de la cual se realizó la selección fue denominada por ellos HT. H9 resultó ser el clon que mejor resistió los efectos citopáticos y además fue un buen productor del virus.

Posteriormente se publica otro trabajo que compara todas las líneas celulares en donde se creció el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1, también conocido como HTLV-III). En el mismo no se menciona si HT o H9 tienen relación con alguna otra línea previamente establecida<sup>19</sup>.

Pero años más tarde, luego de una investigación interna del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH) se conoció que HT había sido clonada a partir de una línea celular establecida por Adi Gazdar y a la cual había denominado HUT78<sup>16,20</sup>. La misma se obtuvo a partir de un linfoma de células T cutáneo de pacientes con Síndrome de Sezary. Estas células expresan el receptor de IL-2 y secretan IL-2 y factor de inhibición de la migración.

El establecimiento de una línea celular con las características de H9 fue importante porque permitió la detección de variantes citopáticas de HTLV en pacientes con SIDA y

además el análisis inmunológico y molecular del virus.

### ***Características principales de H9***

La línea celular H9 deriva, como se mencionó anteriormente, por clonación de la línea celular HUT78. El clon H9 fue seleccionado por ser permisivo a la replicación de HIV y ha sido usado para aislar y propagar HIV de sangre de pacientes con SIDA y con síntomas que preceden al SIDA (pre-SIDA).

HUT78 y H9 resultaron ser genéticamente idénticas cuando se analizó su patrón aloenzimático (isoenzimas alélicas) y de “fingerprint” de ADN (ácido desoxirribonucleico)<sup>21</sup>. Citogenéticamente también se puede sustentar el origen común de estas dos líneas ya que comparten 21 marcadores cromosómicos, la pérdida de 8 cromosomas normales y contienen 21 cromosomas con el mismo número de copias<sup>22,23</sup>.

La línea celular H9 presenta un cariotipo muy complejo. Su número modal es igual a 69 y su rango cromosómico es 64-74. El 65% de sus cromosomas son marcadores siendo los más frecuentes t(3p;4q), t(5q;6q), t(5p;6p), i(18q), i(18p), t(4q;7p) y del(7) (q32). Los cromosomas normales N4, N5, N6, N7, N10, N13, N18, N19, N20, X e Y están ausentes<sup>22,24</sup>.

Existen líneas celulares persistentemente infectadas con HIV, entre ellas H9/HTLV-III<sub>B</sub> infectada con una cepa viral HIVHXB-2<sup>25</sup> y H9/HTLV-III<sub>MN</sub> infectada por HIVMN<sup>26</sup>. Ambas cepas virales son inductoras de sincicios, linfotrópicas y de replicación rápida.

H9/HTLV-III<sub>B</sub> se caracteriza por poseer antígenos de HIV, demostrables por inmunofluorescencia, en un 95-97% de células<sup>27</sup>. En cambio, H9/HTLV-III<sub>MN</sub> muestra un 20% de células infectadas<sup>28</sup>.

### ***Importancia del estudio citogenético de las líneas celulares***

El uso de líneas celulares permanentes en varios campos de la biología, medicina, y biotecnología han estimulado el estudio citogenético intensivo de las células en cultivo. Esta disciplina es utilizada en función de la necesidad de desarrollar criterios de pureza y estabilidad



Durante los cultivos prolongados las líneas celulares cambian algunas de sus características originales, incluyendo su cariotipo. Desafortunadamente, estos eventos pueden resultar en la pérdida de propiedades fundamentales por las cuales las líneas celulares fueron mantenidas<sup>6</sup>.

Cuando se trabaja con cultivos celulares hay otro problema que se debe tener en cuenta: pueden ocurrir contaminaciones intraespecies o interespecies de líneas mantenidas en el mismo lugar<sup>23, 29</sup>. Tal contaminación puede abolir muchos años de esfuerzo de usar tales líneas celulares como principal objeto de estudio. Planteada esta situación, deben desarrollarse criterios de pureza y autenticidad de las líneas, así como controles de estabilidad de las mismas.

En la actualidad, se utiliza DNA fingerprinting y análisis citogenético como criterios de autenticidad, pureza y estabilidad. Ambos métodos pueden ser útiles para revelar peculiaridades específicas de una línea y para establecer su pureza. Sin embargo, el análisis citogenético es un mejor método debido a que permite la individualización de cualquier línea o sublínea celular animal o humana<sup>6,23</sup> en cualquier pasaje de la misma aunque hasta ese momento no se haya realizado ningún tipo de caracterización. En cambio, para que un DNA fingerprinting demuestre que una línea determinada no está contaminada es necesario contar con dicho patrón en el momento que la línea se estableció para luego poder realizar una comparación de los mismos.

Por último, los estudios citogenéticos en líneas celulares darían una pista que podría asociar un cambio cromosomal sutil con una expresión fenotípica<sup>23</sup>.

***Hipótesis de trabajo***

Dado que las líneas celulares modifican su cariotipo a través de reordenamientos cromosómicos, especialmente si están infectadas con virus, se espera encontrar que tanto H9/HTLV-III<sub>B</sub> como H9/HTLV-III<sub>MN</sub> presenten una composición cromosómica muy diferente al cariotipo normal humano y con diferencias respecto a la línea sin infectar. Además se podría esperar que ambas líneas infectadas difieran entre sí con respecto a ciertos cromosomas que tienen relación con el mecanismo de infección de HIV-1.

## **Objetivos**

## **Objetivos**

### ***Objetivo general***

Caracterizar citogenéticamente a las líneas celulares H9, H9/HTLV-III<sub>B</sub> y H9/HTLV-III<sub>MN</sub> luego de varios pasajes en el país.

### ***Objetivos particulares***

- Obtener el número cromosómico modal de las tres líneas celulares.
- Construir los cariotipos de las mismas.
- Identificar por medio del bandeo G los marcadores característicos de cada una.
- Comparar la línea celular sin infectar con respecto a la infectada persistentemente para estudiar si existen diferencias cariológicas de las mismas atribuibles a la acción del virus.
- Comparar la línea celular H9 persistentemente infectada con la cepa HIVHXB<sub>2</sub> con respecto a la infectada con la cepa HIVMN para determinar si en la constitución cromosómica de las mismas se encuentra la causa que determina los diferentes porcentajes de infección cuando se analizan sus antígenos por inmunofluorescencia.

## **Materiales y métodos**



## **Materiales y métodos**

### ***Soluciones utilizadas***

#### **PBS (pH: 7)**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (fosfato dibásico de sodio dodecahidratado): 0,92 gs.

$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (fosfato monobásico de potasio): 0,2 gs.

$\text{NaCl}$  (cloruro de sodio): 8,00 gs.

$\text{KCl}$  (cloruro de potasio): 0,2 gs.

Se lleva a un litro con agua bidestilada.

#### **SSC 2X**

$\text{NaCl}$  (cloruro de sodio): 17,53 gs.

Citrato de sodio: 8,82 gs.

Se diluye en un litro de agua bidestilada.

#### **Buffer de Sorensen**

a)  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  (fosfato de potasio) 1/15 M: 4,53 gs. en 500 ml. de agua bidestilada

b)  $\text{PO}_4\text{NaH}$  (fosfato de sodio) 1/15 M: 9,47 gs. en 500 ml de agua bidestilada

El buffer se prepara en las siguientes proporciones, 70 ml. de la solución a) y 30 ml. de la solución b) para que tenga un pH igual a 7.

### ***Líneas celulares***

Fueron utilizadas 3 líneas celulares depositadas en el Centro Nacional de Referencia para el SIDA (Facultad de Medicina) y gentilmente cedidas por el Dr. Daniel Rabinovich.

1) La línea celular H9 que deriva por clonación de la línea celular HUT 78<sup>13</sup> obtenida de un linfoma de linfocitos T cutáneo. Este clon susceptible a la infección por HIV-1 fue estudiado en 3 pasajes diferentes. Entre el primero y segundo transcurrieron 4 pasajes y entre éste y el tercero 28. Esta línea fue provista en 1995 por Dana Gallo del Viral and Rickettsial Diseases Laboratory de California (EE.UU).

2) La línea H9/HTLV-III<sub>B</sub> deriva de la línea celular H9 persistentemente infectada con la cepa HIVHXB2<sup>25</sup>. Fue suministrada por el NIH en 1995. Fue estudiada en 2 pasajes diferentes, transcurriendo entre ambos 4 pasajes.



3) La línea H9/HTLV-III<sub>MN</sub> deriva de la línea celular H9 persistentemente infectada con la cepa HIVMN<sup>26</sup>. Se la estudió en 3 pasajes distintos. Entre el primero y segundo transcurrieron 4 pasajes y entre éste y el tercero 24. Fue provista en 1996 por Dana Gallo del Viral and Rickettsial Diseases Laboratory de California (EEUU).

Las tres fueron mantenidas en medio RPMI 1640 (Gibco) con 10% de suero fetal bovino (Sigma), glutamina al 0,09% (Gibco) y NaHCO<sub>3</sub> al 0,08% en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Se repican cada 7 días en una dilución al tercio.

### ***Obtención de metafases de las líneas celulares***

Los cultivos celulares se trataron durante 2 horas con colchicina, en concentración final 1µg/ml de cultivo, luego de transcurrir 48 horas posteriores al repique. Pasado este tiempo se recogió toda la suspensión en un tubo de centrifuga para centrifugarlo 5 minutos a 800 rpm. Se descartó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 2 ml. de solución hipotónica de KCl 0,07 M. Se incubó 10 minutos a 37°C y se centrifugó nuevamente 5 minutos a 800 rpm. para eliminar la solución hipotónica. Las células se fijaron con 2 ml. de metanol:ácido acético en proporción 3:1.

Se dejó aproximadamente 30 minutos el tubo en la heladera. Transcurrido este tiempo las células ya fijadas fueron resuspendidas y se las lavó con fijador fresco las veces que se consideró necesario.

Los extendidos se realizaron dejando caer unas gotas de la suspensión sobre portaobjetos limpios y fríos. Se dejó secar al aire, según la técnica del air-drying<sup>30</sup>.

### ***Análisis de las metafases***

Los preparados se tiñeron con solución de Giemsa al 3% en agua para observar, dibujar y contar el número de cromosomas de cada metafase. Se coloreó de 3-5 minutos y luego se enjuagó cada portaobjetos con agua.

El número modal fue el número de cromosomas de mayor frecuencia.

Las metafases primero se seleccionaron a bajo aumento (10 X) por la integridad de citoplasma, se señalaron sus coordenadas y se pasó a un objetivo de inmersión (100X) para contar su número cromosómico. Se contaron 5 metafases y se agregaron 5 por cada número cromosómico nuevo encontrado, hasta llegar a un máximo de 25 metafases. De esta manera ninguna población celular queda fuera del recuento<sup>31</sup>.

Además de estudiarse la ploidía, se analizó la presencia de marcadores cromosómicos aplicando técnicas de bandeo G y C.

### ***Bandeo G***

Se utilizó la técnica de Seabright, M<sup>32</sup>.

Los portaobjetos se incubaron 5 minutos en PBS a temperatura ambiente. Luego se trataron con tripsina (GIBCO) 0,1 % en PBS libre de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  durante un tiempo variable dependiente de la morfología cromosómica y del estado del preparado. Se lavaron con PBS y se colorearon con Giemsa a pH 7 al 4% preparada en buffer de Sorensen alrededor de 3 minutos.

### ***Bandeo C***

Fue realizado según la técnica de Sumner, A.T.<sup>33</sup>

Los preparados se incubaron en HCl 0,2 N durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron con agua destilada y se trataron con una solución saturada de  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  a 50°C durante un tiempo variable dependiente de distintos factores, entre ellos el tiempo de envejecimiento del preparado. Se enjuagaron con abundante agua destilada y se los sumergió en solución SSC 2X 1 hora a 60°C. Se lavaron con agua destilada y se colorearon con Giemsa 2% a pH 7 en buffer de Sorensen durante 30 minutos.

### ***Tinción con nitrato de plata***

Se realizó según la técnica de Howell y Black<sup>34</sup>.

Colocar 2 gotas de una solución de nitrato de plata (al 50% en agua bidestilada), agregar una gota de gelatina (gelatina al 2% = ácido fórmico 1%) y cubrir con un cubreobjetos. Colocar sobre una placa térmica a 40 °C hasta que la preparación se vuelva color marrón dorado. Quitar el cubreobjetos sumergiendo la preparación en agua destilada y lavar cuidadosamente.

Esta técnica argéntica permite identificar los organizadores nucleolares activos. Para células humanas, se localizan en los cromosomas 13, 14, 15 (grupo D) y 21, 22 (grupo G).



### ***Hibridación in situ por fluorescencia (FISH)***

La técnica de FISH se efectuó empleando sondas del total del cromosoma. Se desnaturalizó el preparado en formamida 70% en 2xSSC a 72°C durante 2 a 5 minutos. La deshidratación se realizó en una serie creciente de alcohol: etanol 70%, 85% y 100% y se dejó secar al aire. Se desnaturalizó la sonda a 70°C durante 10 minutos y se colocó sobre el preparado. Se incubó durante toda la noche a 37°C. Se lavó con formamida 50% y luego con 0,1xSSC y 2xSSC a 43°C para quitar la marcación inespecífica. Se contracoloró con ioduro de propidio y se observó en un microscopio de epifluorescencia con filtros apropiados.

### ***Tinción con distamicina A/ 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DA/ DAPI)***

Se realizó según la técnica de Schweizer et al.<sup>35</sup>.

Se colocó sobre los preparados unas gotas de DA y se los cubrió con un cubreobjetos. Se tiñó en oscuridad entre 10-15 minutos. Se enjuagó con agua destilada y se dejó secar. Luego se colocó sobre los portaobjetos unas gotas de DAPI, se cubrió con cubreobjetos y se tiñó en oscuridad 20-30 minutos.

El fluorocromo DAPI es específico de pares de bases A-T.

### ***Fotografía***

Las metafases seleccionadas, representativas del recuento, se fotografiaron con el objetivo de inmersión en un microscopio Zeiss, utilizando una cámara Olympus adaptada a dicho microscopio. Se utilizó película ortocromática Kodalith de 32 ASA. Se reveló con Dektol (proporción 1:2 de agua) en un tanque individual durante aproximadamente 2 minutos y se fijó con fijador Ronex durante 4 minutos. Luego de enjuagar con abundante agua se dejó secar.

Las fotos fueron ampliadas en una ampliadora Magnifax 4a. A partir de las mismas se realizaron los cariotipos. Los cromosomas correspondientes al set normal fueron ordenados de acuerdo a lo establecido por el "Sistema Internacional de Nomenclatura para Citogenética Humana"<sup>36</sup>. Los cromosomas marcadores identificados fueron ubicados dentro del grupo del cual derivaron y los no identificados se ordenaron de mayor a menor al final del cariotipo.

## **Resultados**

## Resultados

### *Línea celular H9*

La línea celular H9, derivada de un linfoma de células T cutáneo y seleccionada por permitir la replicación de HIV-1, crece en suspensión y presenta una morfología de tipo linfoblástica (figura 1). El análisis de tres pasajes diferentes de la misma en un lapso de ocho meses demostró que la línea se mantuvo estable desde un punto de vista citogenético, ya que no se observaron transformaciones que se reflejen en el número cromosómico o en las alteraciones estructurales determinadas en el primer estudio.

El recuento cromosómico realizado sobre 25 metafases de cada pasaje teñidas con Giemsa (figura 2), estableció que la línea celular H9 es aneuploide y presenta un número modal igual a 70 en el 28% de las células analizadas, con un rango cromosómico de dispersión de 60 a 74 (figura 3).

Los cromosomas 4, 5, 6, 7, 10, 13, 18, 19, 20 y los sexuales (X, Y) del set normal resultaron como tales siempre ausentes, encontrándose fragmentos de los mismos involucrados en la formación de los marcadores de la línea (ejemplo: M31, M32, M18). El resto de los cromosomas correspondientes en morfología y patrones de bandas a los cromosomas normales 1, 3, 11 y 22 siempre se hallaron de a pares. Mientras que, el cromosoma 2 sólo se lo encontró en monosomía, el 21 y el 17 apareado o en trisomía y los cromosomas 8, 9, 12, 14, 15 y 16 indistintamente en monosomía o como pares.

El estudio de las metafases con bandas G mostró que dicha línea presenta un cariotipo muy complejo, el 68% del total de elementos por célula son cromosomas provenientes de alteraciones estructurales (figura 4).

Esta línea presentó en el total de metafases analizadas un marcador muy característico del cariotipo, que denominamos H1 (figura 19). Apareció siempre como un único elemento y fue el cromosoma de mayor tamaño. De acuerdo a su morfología fue submetacéntrico, con un brazo corto (p) igual al del cromosoma 1 y un brazo largo (q) que presentó alterada la banda 1q(31) probablemente por inserción de una región de menor tinción en esa zona.

Los marcadores M31 t(5q;6q) (de a par en el 67% de las metafases) (figura 19), M32 t(5p;6p), M20 der (7), M22 del (12) (p12 p13), M7 i(18) y M18 der(20) que se encuentran en el 100% de las metafases coincidieron con los ya descriptos por Chen T.R. y por tal motivo se mantuvo su nomenclatura.



Además se observó H4 t(3p;4q) (2 elementos en el 100% de las metafases), H7 del(7)(q33) (67% en monosomía y 33% apareado), H10 der (10) (67% en monosomía), H63 t(6q;3p) (presente en todas las metafases, 67% en monosomía), H5 der (5) t(5q; ?) (en todas las metafases, 67% en disomía y 33% en monosomía), H2 t(2q;1q) (apareado en 33% de las metafases), H3 t(2p;3q) (67% en monosomía y 33% de a par) (figura 19). Otros cromosomas provenientes de reordenamientos estructurales fueron H6 der (6), H8 der (7), H9 der (6), H12 der (13), H13 der (13), H14 der (X) y H15 der (X).

Las bandas C que producen una tinción selectiva de la heterocromatina constitutiva mostró en todos los cromosomas la región centromérica teñida intensamente (figura 5).

La técnica de fluorescencia DA/DAPI que permite identificar regiones heterocromáticas mostró la presencia de los cromosomas 1, 9, 15 y 16. No se observaron cromosomas con marca intersticial. Confirmó que el cromosoma marcador H1 deriva del cromosoma 1 dado que presentó una tinción DA/DAPI característica del 1, marca fluorescente en la constricción secundaria. También se observó claramente que el brazo q de H1 es de mayor tamaño que el brazo q del 1, confirmando así que en H1 ocurrió una inserción de un fragmento de ADN (figura 6).

El bandeo Ag-NOR que tiñe exclusivamente las regiones de los organizadores nucleolares (NORs) mostró la presencia de 10 cromosomas con sitios activos, correspondientes 3 de ellos al grupo D y 3 al grupo G del cariotipo humano. Los restantes cromosomas visualizados probablemente corresponden a cromosomas rearrreglados (figura 7).

La hibridación *in situ* (FISH) realizada para el cromosoma X confirmó la ausencia de éste como cromosoma entero normal. Se observaron fragmentos del mismo formando parte de otros cromosomas. Un fragmento corresponde a una región centromérica y otro a un brazo (figura 8).

También se realizó la técnica de FISH para el cromosoma 6. Se confirmaron los resultados obtenidos por bandas G, ausencia del 6 normal y parte del mismo formando otros cromosomas (figura 9).

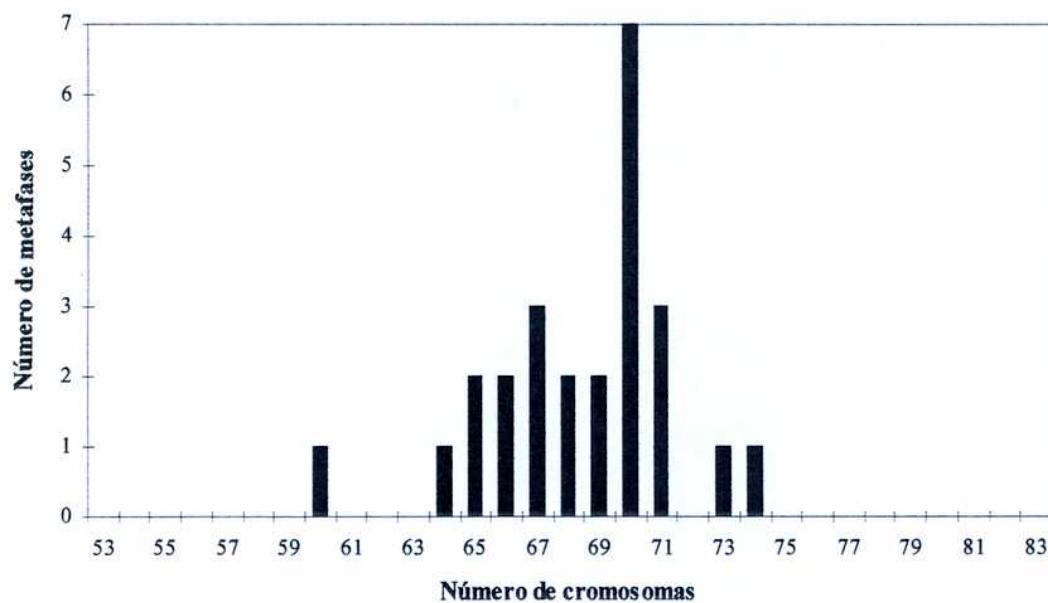
El cariotipo presentó otros cromosomas provenientes de rearrreglos estructurales que no han podido ser identificados con certeza hasta el momento.



**Figura 1.** Morfología de la línea celular H9. Negativa para la IFI contra antígenos de HIV.  
Tinción positiva: isotiocianato de fluoresceína. Colorante de contraste: Azul de Evans.  
Aumento objetivo: 40x.



**Figura 2.** Metafase de la línea celular H9 teñida con Giemsa.



**Figura 3.** Histograma de la distribución del número de cromosomas observado en la línea H9.



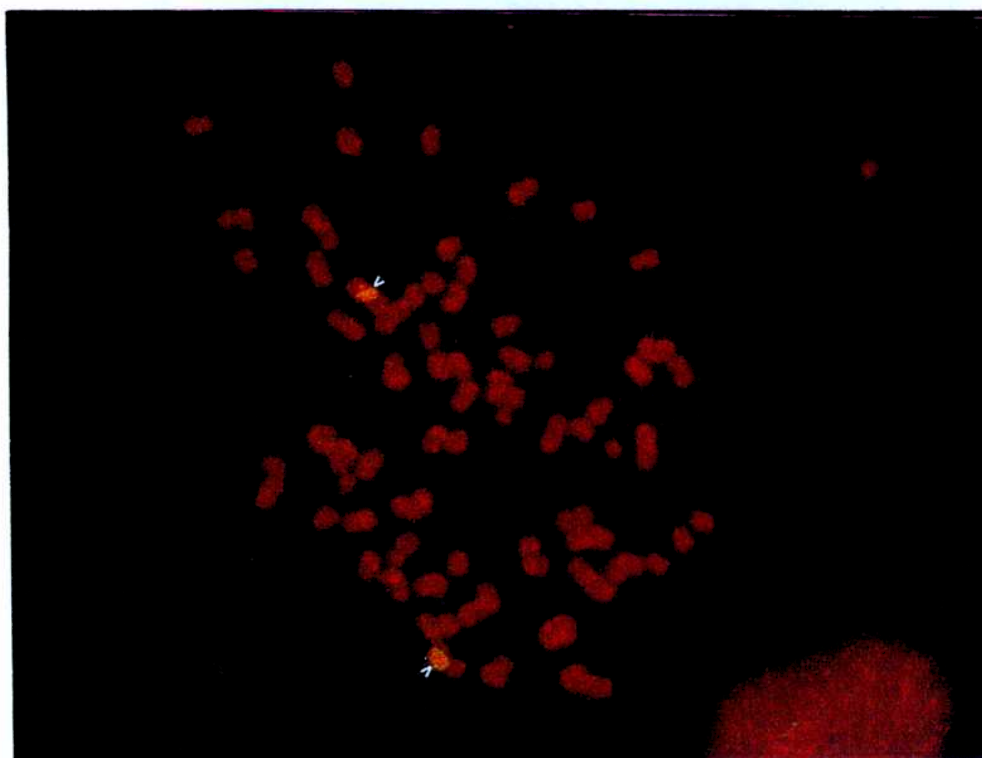
**Figura 4.** Cariotipo de bandeo G de la línea celular H9. En la línea inferior se muestran los cromosomas no identificados.



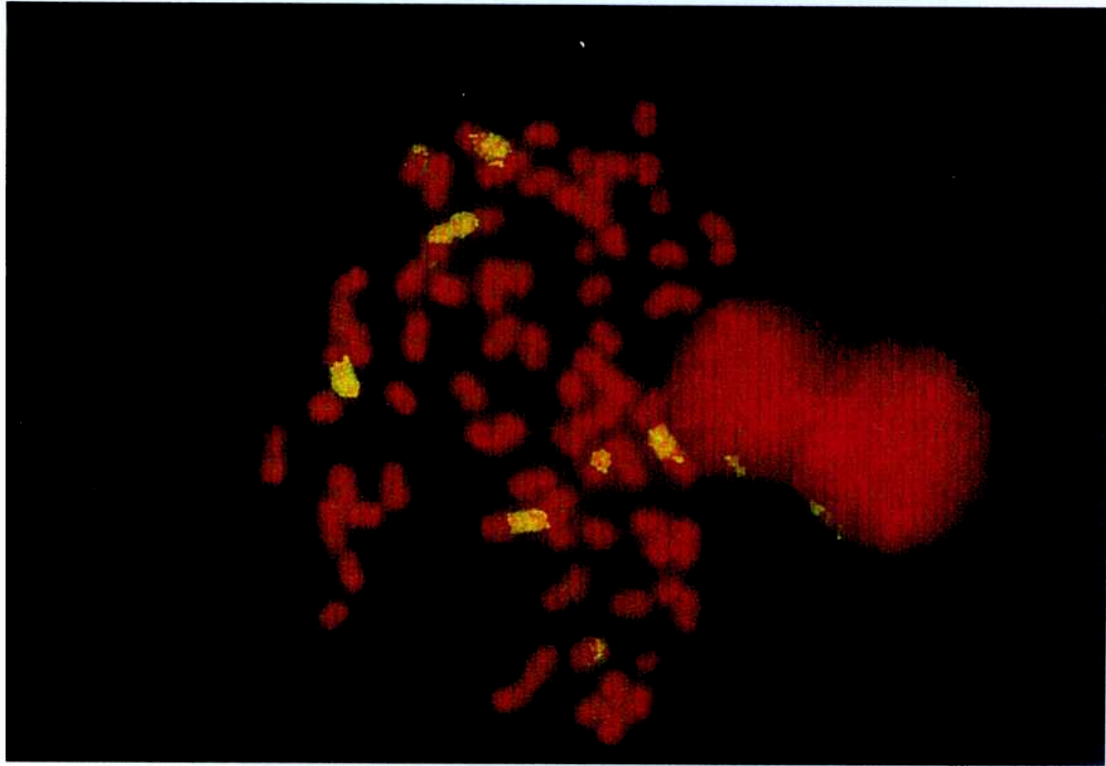
**Figura 5.** Bando C de cromosomas de la línea celular H9.



**Figura 7.** Tinción con Nitrato de Plata, que permite observar los organizadores nucleolares (bandeo NOR) de los cromosomas de la línea celular H9. Se indican los cromosomas pertenecientes a los grupos D y G.



**Figura 8.** FISH del cromosoma X. de la línea celular H9. Se indica con flechas una región centromérica y un brazo correspondientes al cromosoma X.



**Figura 9.** FISH del cromosoma 6 de la línea H9. Las marcas amarillas corresponden al cromosoma 6.



### ***Línea celular H9/HTLV-III<sub>B</sub>***

La línea celular H9/HTLV-III<sub>B</sub> infectada persistentemente con HIV-1, que por inmunofluorescencia revela un 95-97% de células positivas para antígenos de HIV, muestra una morfología linfoblástica sin observarse la formación de sincicios característicos de una infección aguda. El recuento cromosómico en 25 células de cada pasaje teñidas con Giemsa (figura 10), para dos diferentes pasajes, demostró un rango de aneuploidía que osciló entre 60 y 75, con un número modal igual a 67 (28%) (figura 11).

Al igual que en la línea celular H9, los cromosomas 4, 5, 6, 7, 10, 13, 18, 19, 20, X e Y normales resultaron ausentes en todas las metafases. Cuando se analizó el bandeo G, fragmentos de los mismos fueron hallados formando parte de ciertos marcadores. A modo de ejemplo se puede mencionar el marcador H10 y el H63 (figura 12 y 19).

Los cromosomas 3, 8, 9, 14, 15 y 22 se observaron siempre de a pares. El 1, 2, 12 y 16 en el 67% de las metafases estaban apareados y en las restantes en monosomía. El cromosoma 11 se observó siempre de a par, excepto en una metafase que se encontró en trisomía. En cambio, los cromosomas 17 y 21 estaban indistintamente de a par o en trisomía.

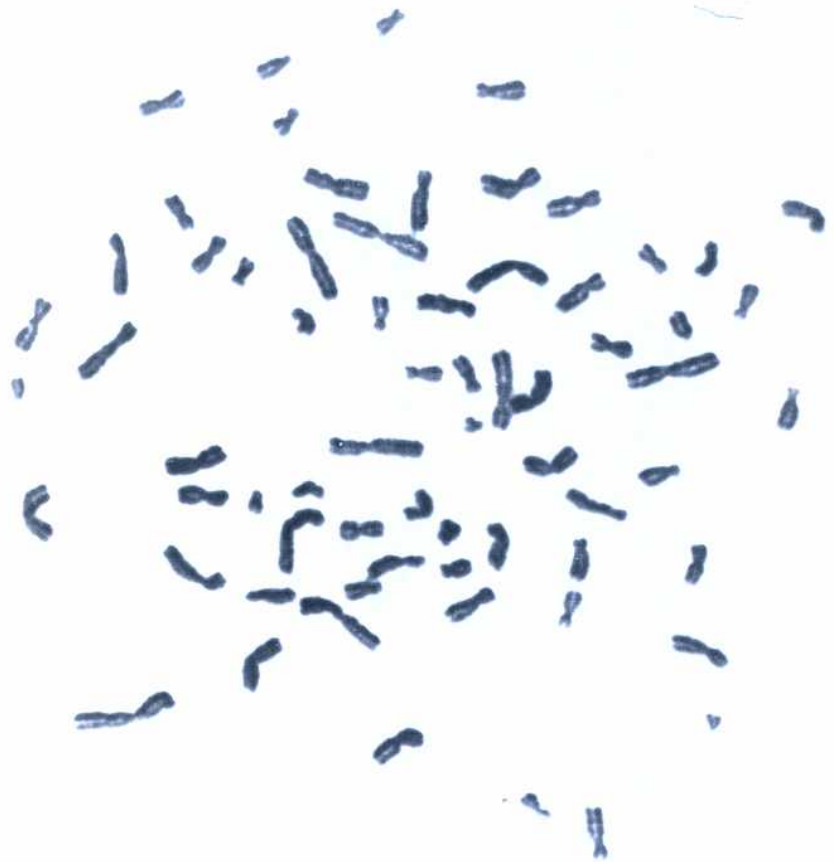
El bandeo G permitió dilucidar que en esta línea el 60% de los cromosomas que constituyen su cariotipo son derivados de rearrreglos cromosómicos (figura 12).

Los marcadores H1 ins (1q31), H2 t(2q;1q), M20 der (7), M22 del (12) (p12 p13), H63 t(6q;3p), H6 der (6), H9 der (6), H7 del (7) (q33), H3 t(2p;3q) y H12 der (13) fueron hallados en todas las metafases analizadas en monosomía. M31 t(5p;6p), H13 der (13) y H5 der (5) t(5q;?), fueron encontrados en el 67% de las metafases de a par. Siempre se observó al marcador H10 der (10) (de a par) y al M7 i(18) (en monosomía). M32 t(5p;6p), H14 der (X) y H15 der (X) se encontraron un 67% de veces.

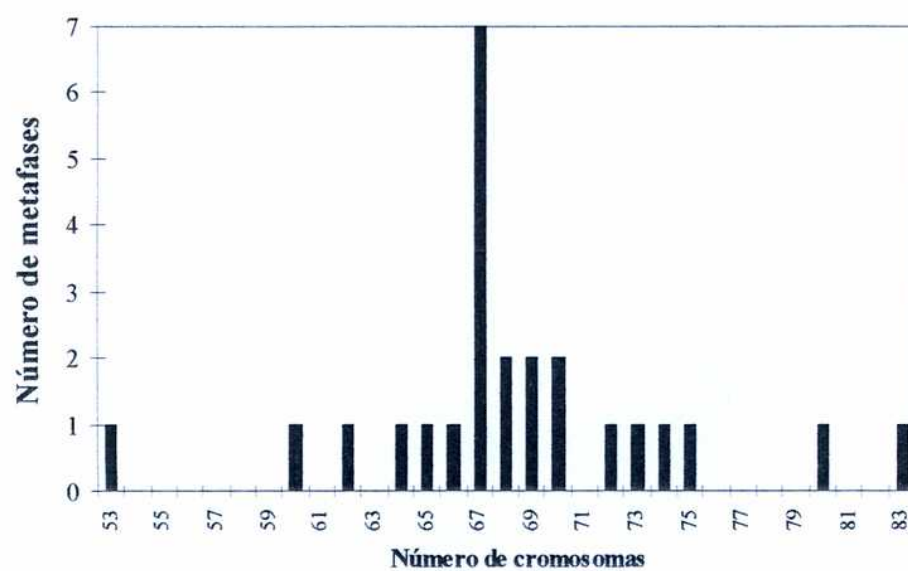
Durante los meses de trabajo, la línea celular H9/HTLV-III<sub>B</sub> estuvo contaminada en más de una oportunidad, por tal motivo fue muy difícil de recuperar y así obtener el material óptimo para llevar a cabo otras técnicas de identificación de bandas además de la G. No obstante, dado que mediante las bandas G se comprobó que prácticamente no existen diferencias entre esta línea y H9 consideramos que no era necesario esperar otros resultados para concluir esta primera etapa del estudio.

Se hallaron otros cromosomas que no han sido identificados con certeza en su origen y derivación.

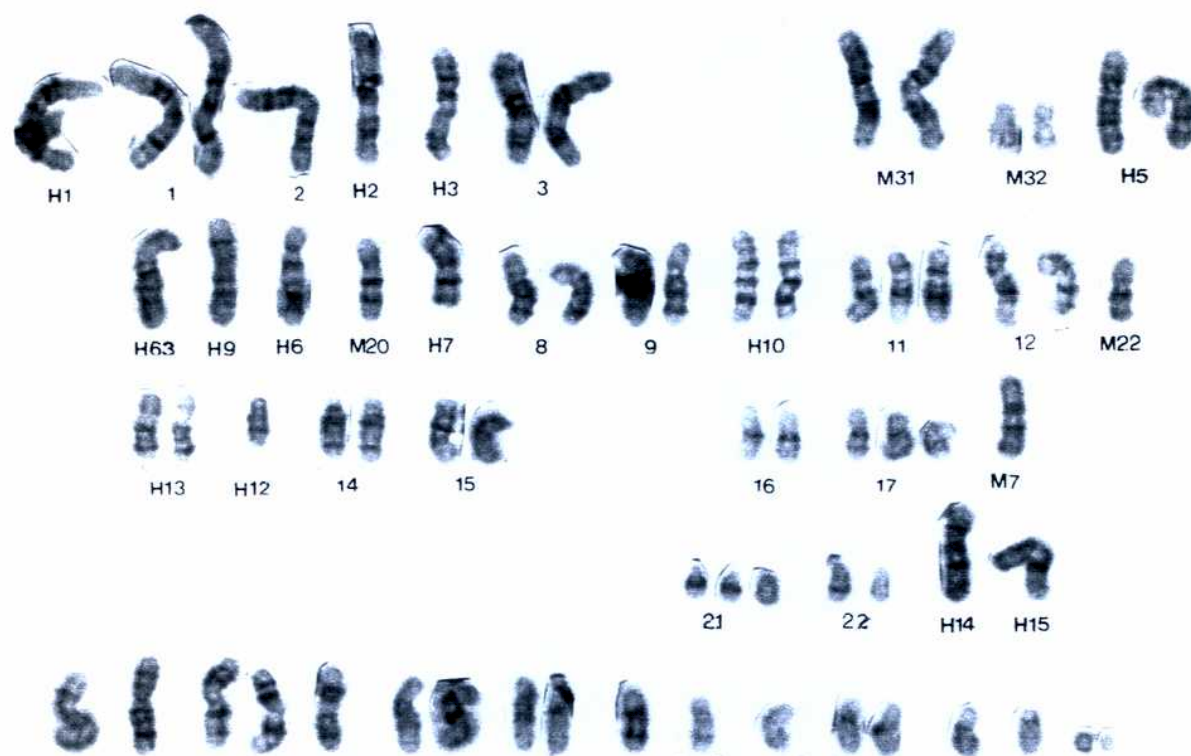




**Figura 10.** Metafase de la línea celular H9/HTLV-III<sub>B</sub> teñida con Giemsa.



**Figura 11.** Histograma de la distribución del número de cromosomas observado en la línea H9/HTLV-III<sub>B</sub>.



**Figura 12.** Cariotipo de bandeo G de la línea celular H9/HTLV-III<sub>B</sub>. En la línea inferior se muestran los cromosomas no identificados.

### ***Línea celular H9/HTLV-III<sub>MN</sub>***

La línea celular H9/HTLV-III<sub>MN</sub> infectada persistentemente con HIV-1 (cepa MN) presenta en cultivo las mismas características morfológicas que la línea H9/HTLV-III<sub>B</sub> (figura 13). Esta línea que demostró por inmunofluorescencia un 20% de células infectadas, se caracterizó por ser aneuploide. Presentó un número modal igual a 64 (figura 14) en el 24% de las células analizadas en metafase con un rango cromosómico de dispersión de 46 a 70 (figura 15).

Los cromosomas 4, 5, 6, 7, 10, 13, 18, 19, 20, X e Y normales para un cariotipo humano no se observaron en ninguna de las células analizadas en metafase. Con excepción del 19, los restantes cromosomas arriba mencionados fueron hallados formando parte de marcadores identificados.

Los otros cromosomas del set normal fueron hallados de a pares o en monosomía, salvo casos aislados de trisomía del 3 o del 11. En todas las metafases el 1, 8, 9, 17, 21 y 22 se visualizaron con su correspondiente homólogo. En cambio, el 2, 12 y 14 siempre aparecieron como únicos elementos.

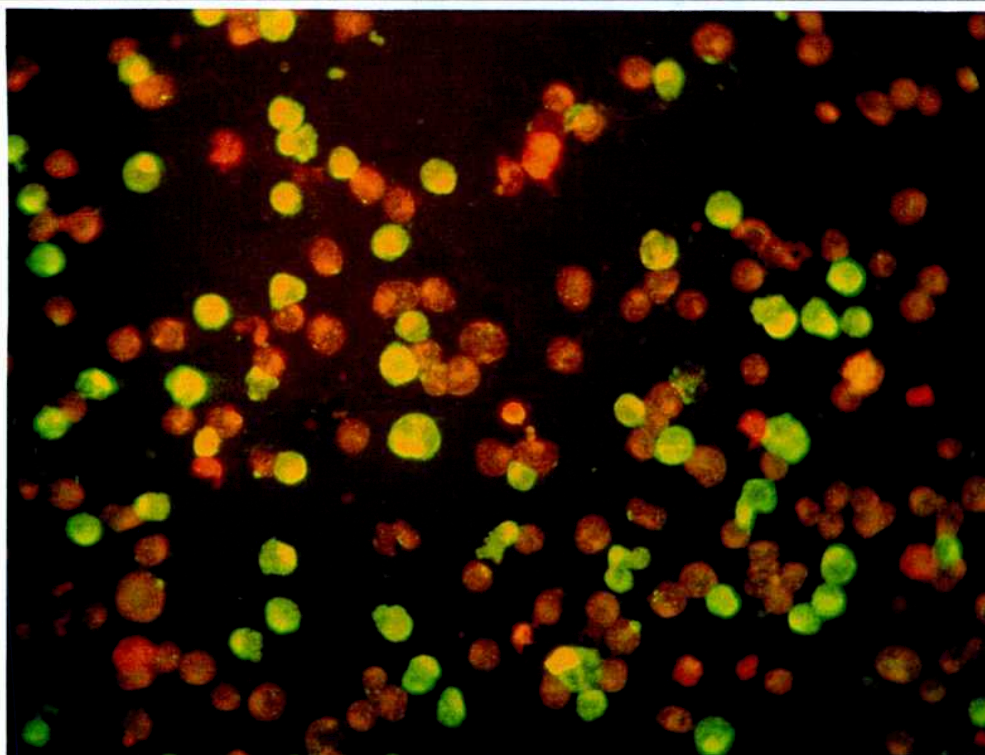
La aplicación de la técnica de bandas G permitió la caracterización de los cromosomas marcadores de la línea (figura 16). Esta línea comparte con H9 y con H9/HTLV-III<sub>B</sub> los siguientes marcadores que se hallaron siempre en monosomía: H2 t(2q;1q), H3 t(2p;3q), H4 t(3p;4q), H5 der (5) t(5q;?), H63 t(6q;3p), M20 der (7) y H15 der (X). Además tienen en común los cromosomas marcadores H10 der (10) y M7 i(18), pero los mismos se hallan indistintamente de a par o en monosomía, excepto una célula que presentó trisomía de H10. El cromosoma H8 der(7) y el M18 der (20) lo comparte sólo con la línea H9, siempre como únicos elementos en todas las metafases.

Se observaron una serie de cromosomas no identificados hasta el momento en lo que respecta a su origen.

La técnica de DA/DAPI confirmó la ausencia del marcador H1, característico de la línea celular H9. En las metafases analizadas siempre se observó el par 1, pero nunca ningún otro cromosoma submetacéntrico de mayor tamaño que el 1 y con su patrón de tinción (figura 17).



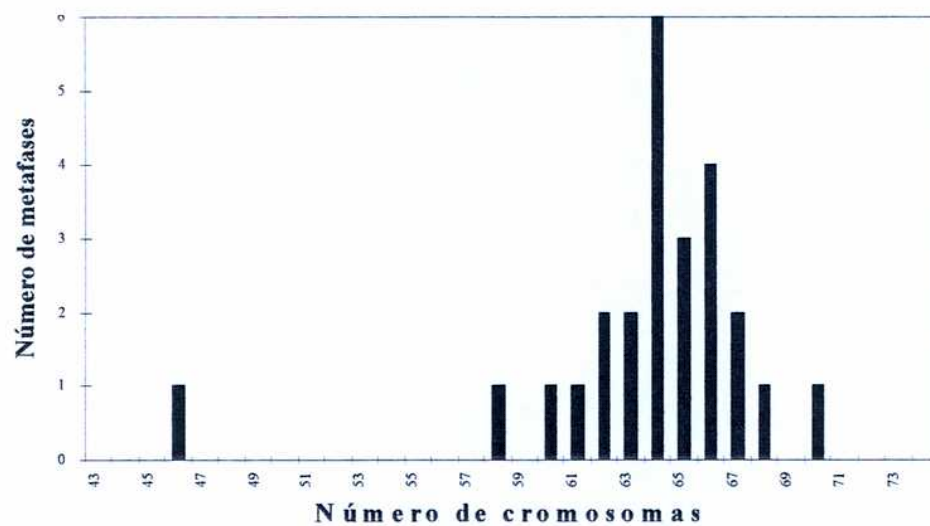
La tinción con nitrato de plata demostró la presencia de cinco elementos con NORs activos ubicados en sus respectivos telómeros. Estos cromosomas pertenecen, de acuerdo a su morfología y tamaño, 4 al grupo D y 1 al grupo G (figura 18).



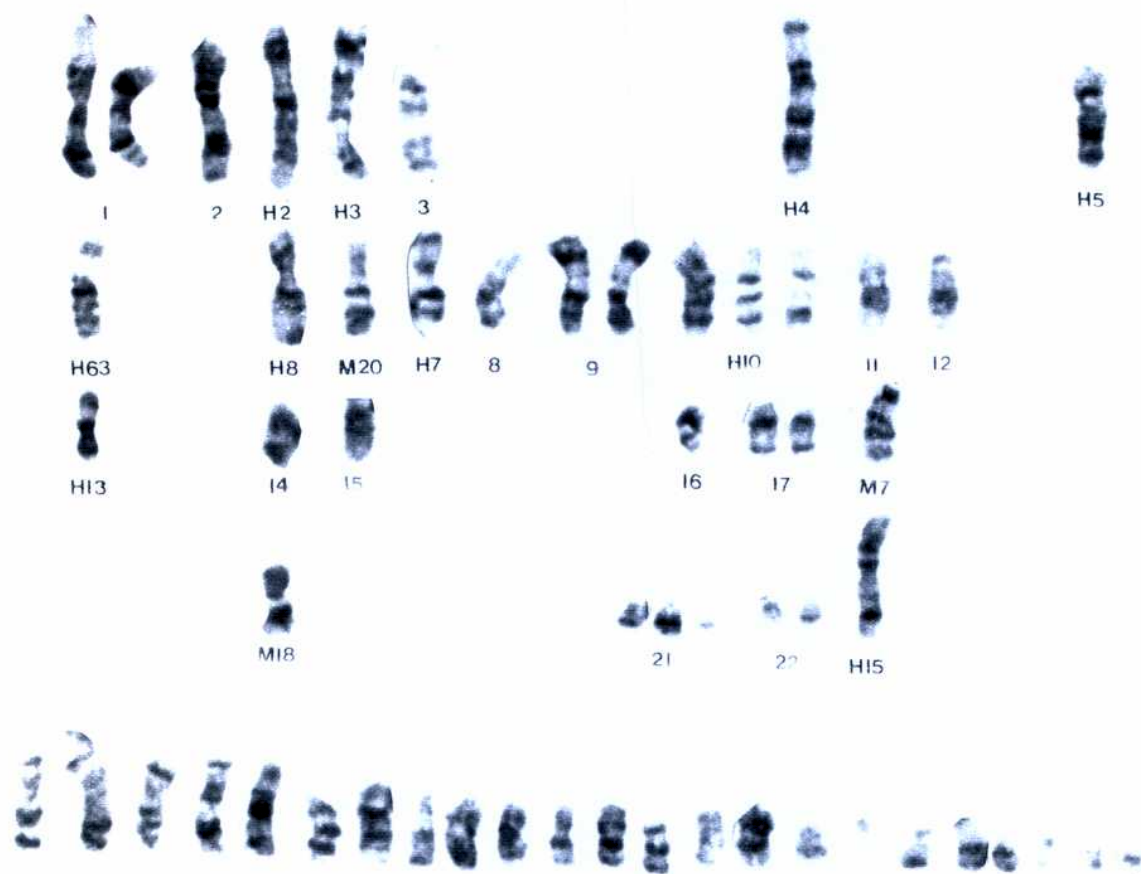
**Figura 13.** Morfología de la línea celular H9/HTLV-III<sub>MN</sub>. Las células infectadas se revelan de color verde por IFI. Tinción positiva: Isotiocianato de fluoresceína. Colorante de contraste: Azul de Evans. Aumento objetivo: 40x.



**Figura 14.** Metafase de la línea celular H9/HTLV-III<sub>MN</sub> teñida con Giemsa.



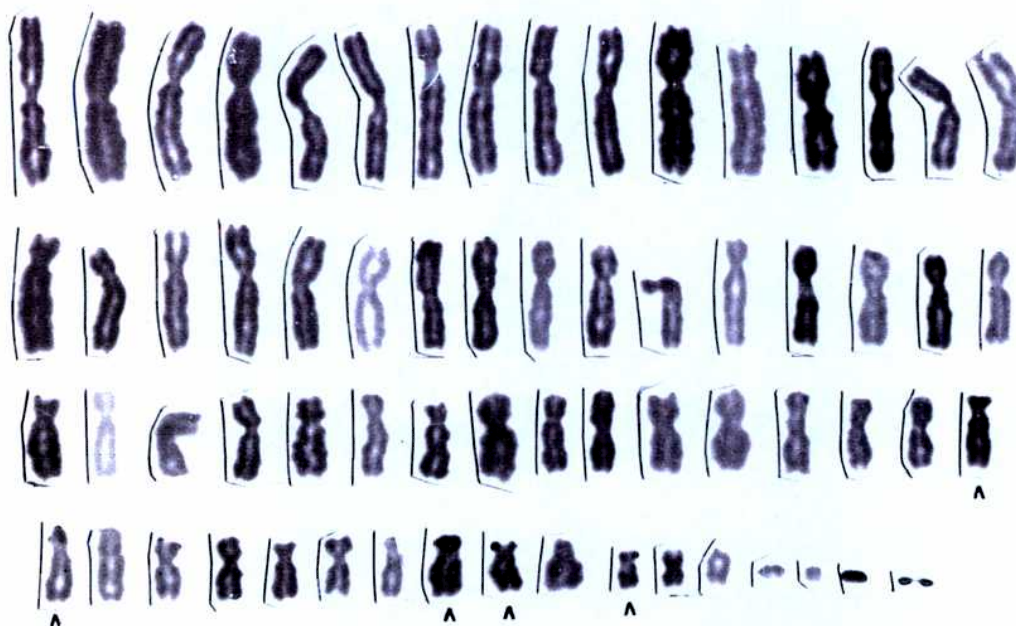
**Figura 15.** Histograma de la distribución del número de cromosomas observado en la línea H9/HTLV-MN.



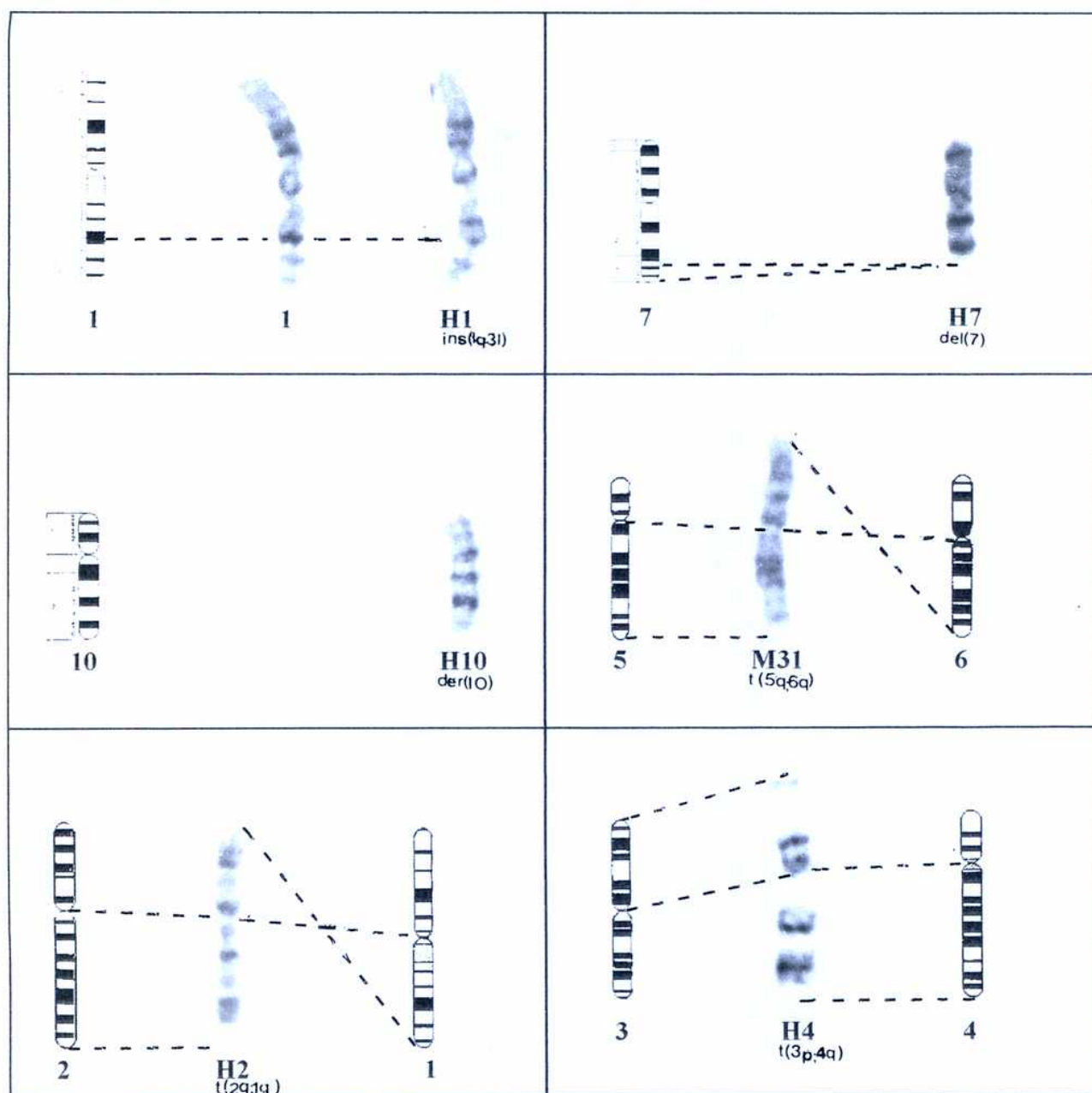
**Figura 16.** Cariotipo de bandeo G de la línea celular H9/HTLV-III<sub>MN</sub>. En la línea inferior se muestran los cromosomas no identificados.



**Figura 17.** Tinción DA/DAPI de cromosomas de la línea celular H9/HTLV-III<sub>MN</sub>.



**Figura 18.** Tinción con Nitrato de Plata (bandeo NOR). Se indican los organizadores nucleolares de los cromosomas de la línea celular H9/HTLM-III<sub>MN</sub>.



**Figura 19.** Marcadores característicos presentes en las líneas celulares estudiadas.

## **Discusión**



## Discusión

Los estudios citogenéticos realizados en líneas celulares han demostrado que las anomalías cromosómicas presentan una distribución no aleatoria en el genoma. Los mismos han permitido detectar alteraciones citogenéticas estrechamente asociados al diagnóstico y pronóstico, especialmente en neoplasias<sup>5</sup>. Las ubicaciones primero y luego el análisis molecular de los puntos de ruptura previamente asociados a cáncer, permitió detectar la presencia en ellos de oncogenes y genes supresores del tumor. Estas alteraciones constituirían un hecho clave en la génesis de la neoplasia<sup>37</sup>. Por estas razones, la caracterización citogenética de las líneas celulares que se utilizan en ensayos biomédicos es de suma utilidad, especialmente si provienen como es el caso de material heterogéneo.

El establecimiento de la línea H9 en 1984 fue fundamental en la identificación y caracterización del virus causante del SIDA dado que permitió la replicación *in vitro* del mismo<sup>18</sup>. Este clon derivado de un linfoma de células T humano fue el que mejor resistió los efectos citopáticos del virus. Esta propagación *in vitro* del HIV fue el avance científico que permitió el desarrollo de reactivos inmunológicos para detectar su presencia en muestras de sangre<sup>38</sup> y el desarrollo de medicamentos. En la actualidad estudios biológicos y moleculares que utilizan estas líneas como modelo permiten tener un mejor conocimiento del retrovirus para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. En el Centro Nacional de Referencia para el SIDA (Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires), la línea celular H9 y sus análogas persistentemente infectadas son empleadas desde mediados de la década del '90 y hasta el momento nunca se había llevado a cabo una evaluación citogenética de las mismas.

Según King<sup>39</sup> existen 10 niveles de análisis cromosómico, cuya numeración indica sofisticación en las técnicas empleadas. Estos incluyen desde estudios con coloración convencional (niveles 1 a 3), técnicas de bandeo C, G, Q, R, tinción argéntica y con fluorocromos (niveles 4 a 8) y el uso de enzimas de restricción y de hibridización *in situ* (niveles 9 y 10). Este seminario caracterizó a nivel 10 según King, las tres líneas celulares del Centro Nacional de Referencia para el SIDA: la línea H9 sin infectar, H9 infectada persistentemente con la cepa HIVHXB2 y H9 infectada persistentemente con la cepa HIVMN.

H9, H9/HTLV-III<sub>B</sub> y H9/HTLV-III<sub>MN</sub> resultaron aneuploides, con números modales cromosómicos diferentes al de una célula normal humana, hecho esperable dado que las líneas celulares continuas frecuentemente tienen su complemento cromosómico entre un valor diploide y tetraploide<sup>2, 23</sup>. Las tres presentaron un valor modal cercano a la triploidía. El



número modal de H9, 70 con un rango cromosómico de (60-74), concuerda con los ya reportados por Chen T.R.<sup>22</sup>, Glukhova L.A.<sup>23</sup>, Manolov G.<sup>42</sup> y Whang-Peng J.<sup>43</sup>. H9/HTLV-III<sub>B</sub> presentó un número modal de 67 (60-75) que resultó acorde con el descrito por Manolov G.<sup>42</sup>. El número modal de H9/HTLV-III<sub>MN</sub> fue 64 (46-70) y no se encontró ninguna bibliografía que describa citogenéticamente esta línea.

Estudios cariológicos (comparación de los números modales, de número y estructura de marcadores) llevados a cabo sobre distintas líneas de tipo linfoblásticas T con diferente susceptibilidad a HIV demostraron que las mismas tienen una tendencia a sufrir poliploidización tanto durante su formación (MT-4, Molt-3 y Molt-4) como durante los cultivos prolongados (H9 and HUT 78)<sup>23</sup>. Además otros estudios publicados recientemente<sup>40</sup>,<sup>41</sup> indican que el *Vpr*, gen accesorio de HIV-1, induce anormalidades en el ciclo celular con acumulación de células en la fase G2/M e incremento de la ploidía. Células pseudodiploides se vuelven aneuploides después de la expresión de *Vpr*. Sería interesante evaluar la responsabilidad de este gen en la aneuploidía que se observó en los cultivos persistentemente infectados.

Nuestros estudios realizados sobre la línea celular H9 arrojaron resultados coincidentes en su mayoría con los obtenidos por Chen T.R.<sup>22</sup>. Ausencia de los cromosomas 4, 5, 6, 7, 10, 13, 18, 19, 20 y los sexuales del set normal (figura 4) y presencia de los marcadores por él identificados como M31, M32, M20, M22, M18 y M7. Con respecto a los cromosomas sexuales, cabe mencionar que en el trabajo de Whang-Peng J.<sup>43</sup> se indica que H9 presenta dos copias del X y una copia del cromosoma Y. Nosotros confirmamos el resultado de Chen T.R. - ausencia de cromosomas sexuales normales- dado que el análisis de hibridización *in situ* para el cromosoma X no reveló ningún cromosoma marcado en su totalidad correspondiente al set normal. Sólo se revelaron dos fragmentos, uno de brazo y otro centromérico, en cromosomas no individualizados y para los cuales sería interesante realizar bandeo G-FISH secuencial. Por otro lado, con técnicas de bandeo G y C se descartó la presencia del Y.

Mediante los bandeos G y C y las tinciones con nitrato de plata y DA/DAPI identificamos un cromosoma, que presenta su brazo p idéntico al del cromosoma 1 y su brazo q es el del 1 más la inserción de una región clara para el bandeo G. A nuestro parecer esta es otra coincidencia con respecto a los resultados de Chen T.R., dado que su trabajo muestra un cromosoma denominado M41 mediante el cual logra diferenciar a H9 de la línea HUT78 de la cual derivó. El mismo está ubicado al lado del par 1 en el cariotipo de bandeo G mostrado y es similar en tamaño y morfología a H1. En el trabajo nunca se menciona el tipo de alteración que



originó dicho cromosoma. Esta identidad es importante porque junto con las anteriormente mencionadas nos confirman que realmente esta línea H9 es la misma que se halla depositada en la American Type Culture Collection (ATCC) con el número: HTB-176.

El análisis citogenético comparativo realizado por Manolov G.<sup>42</sup> sobre la línea H9 y la línea H9/HTLV-III<sub>B</sub> informa que ambas presentan un alto número de arreglos estructurales que involucran  $\frac{3}{4}$  del complemento y que sólo existen pequeñas diferencias entre ambas. Este autor no muestra ningún cariotipo ni describe cromosomas, razón por la cual no pudimos realizar ninguna comparación con nuestros resultados. Nosotros encontramos que estas dos líneas son muy similares, salvo que en H9/HTLV-III<sub>B</sub> no se observaron los marcadores denominados M18, H4 t(3p4q) y H8 der(7) y que el marcador H2 t(2q1q) es observado con mayor frecuencia. Por otro lado, Whang-Peng J.<sup>43</sup> llevó a cabo un estudio cromosómico donde compara H9 sin infectar con respecto a H9 infectada con el sobrenadante de un cultivo celular productor de HIV-1 (KB/HTLV-III<sub>B</sub>) mostró que las células infectadas presentan los mismos rearrreglos cromosómicos que las no infectadas más 2 copias extras del cromosoma 17 y las siguientes deleciones, del(2) (p21), del(7) (q32). Cabe mencionar que en el trabajo publicado por Glukova L.A.<sup>44</sup> se indica que secuencias provirales de HIV-1 se localizaron integradas en el brazo q del cromosoma 17, además de encontrarse en otros tres loci de los cromosomas 2, 7 y 19 de una línea celular persistentemente infectada (HTHIV-27). De acuerdo a nuestros resultados, copias extras del cromosoma 17 ya se encontraron en la línea H9 sin infectar, por lo tanto no podemos adjudicarle al virus relación alguna con dicha alteración numérica.

Al comparar la línea celular H9/HTLV-III<sub>MN</sub> con respecto a su análoga H9, la diferencia más evidente al observar las metafases teñidas por bandeo G y DA/DAPI es la ausencia del marcador H1 característico de la línea H9, que como ya describimos deriva del cromosoma 1 y es el de mayor tamaño. Tampoco se observaron M32 t(5p6p), M22 del (12), H12 der (13) y H14 der (X). Es de resaltar que en la línea infectada con la cepa HTLV-III<sub>MN</sub>, el cromosoma 12 siempre se encontró en monosomía mientras que en la otra línea siempre estaba de a par. Algo similar sucedió con el cromosoma 11, que en un alto porcentaje se encontró en monosomía y una única vez en trisomía. El 3 fue el otro cromosoma que se halló en trisomía en una sola oportunidad. Otros marcadores que resultaron ausentes son aquellos que involucran al brazo q del cromosoma 6, como ser M31, H9 y H6. Esta diferencia es interesante porque posiblemente podría guardar relación con el menor porcentaje de infección (20%) observado en la línea H9/HTLV-III<sub>MN</sub>. Se conocen que en este cromosoma residen genes que codifican para cofactores necesarios para que tenga lugar la función Rev de HIV-1,



relacionada con el transporte y traducción de mensajeros de RNA<sup>45</sup>. Los próximos trabajos serían (1) separar las poblaciones celulares que componen la línea -las que presentan antígeno de superficie de las que no presentan- para analizar desde un punto de vista citogenético las diferencias que reúnen y (2) infectar a la línea H9 con la cepa HIVMN para comparar su cariotipo con el de la línea persistentemente infectada. Estas experiencias aportarían mayores datos para inferir el rol del cromosoma 6 en la infección de HIV-1.

## ***Conclusiones***

- ✓ Las tres líneas celulares resultaron cromosómicamente estables en los distintos pasajes analizados.
- ✓ Presentaron un número modal cercano a la triploidía.
- ✓ Alrededor del 60% de su cariotipo fueron cromosomas rearrreglados.
- ✓ En todas las metafases analizadas resultaron ausentes los cromosomas normales 4, 5, 6, 7, 10, 13, 18, 19, 20 y los sexuales (X,Y) como tales.
- ✓ El cariotipo de H9 resultó ser muy similar al de H9/HTLV-III<sub>B</sub>, excepto que esta última no presentó los cromosomas marcadores H4 t(3p4q), H8 der(7), M18 der(20).
- ✓ El marcador H1 der(1) ins(q31), característico de H9 resultó siempre ausente en la línea H9/HTLV-III<sub>MN</sub>. Otra diferencia importante es la ausencia de aquellos marcadores que involucran el brazo largo del cromosoma 6. Podríamos inferir que esta característica se correlaciona con el menor porcentaje de infección, dado que en el cromosoma 6 se encuentran genes que codifican para cofactores relacionados con la función Rev viral.





## **Apéndice**

p=brazo corto del cromosoma

q=brazo largo del cromosoma

t=translocación

der=derivado

i=isocromosoma

del=delección

ins=inserción

IFI=inmunofluorescencia indirecta

## **Bibliografía**

## Bibliografía

- <sup>1</sup> Gómez D.E, Alonso D.F. (1998). Introducción a la oncología molecular (1ra. edición). Editorial Universidad Nacional de Quilmes. Capítulo 5.
- <sup>2</sup> Ian Freshney R. (1987). Culture of animal cells. A manual of basic technique (2nd. edition). Wiley-Liss, New York. Chapter 2.
- <sup>3</sup> Yunis J.J. (1976). High resolution human chromosomes. *Science* **191**, 1268-1270.
- <sup>4</sup> Yunis J.J. (1983). The chromosomal basis of human neoplasia. *Science* **221**, 227-236.
- <sup>5</sup> Heim S. and Mitelman F. (1987). Cancer Cytogenetics. Alan R. Liss, New York.
- <sup>6</sup> Mamaeva S.E. (1998). Karyotypic evolution of cells in culture: A new concept. *International Review of Cytology* **178**, 1-40.
- <sup>7</sup> Bernheim A., Berger R., Lenoir G. (1981). Cytogenetic studies on African Burkitt's lymphoma cell lines: t (8; 14), t (2; 8) and t (8; 22) translocations. *Cancer Genet Cytogenet* **3**, 307-315.
- <sup>8</sup> Raskind W.H., Distche C.M., Keating A., Singer J.W.. (1987). Correlation between cytogenetic and molecular findings in human chronic myelogenous leukemia lines EM-2 and EM-3. *Cancer Genet Cytogenet* **25**, 271-284.
- <sup>9</sup> Whang-Peng J. and Lee E.C. (1985). Cytogenetics of human small cell lung cancer. *Recent Results Cancer Res.* **97**, 37-46.
- <sup>10</sup> Savelyeva L. and Mamaeva S. (1988). Population analysis of karyotypic heterogeneity of the Raji, Burkitt lymphoma cell line: Analysis of 100 karyotypes. *Cancer Genet. Cytogenet.* **34**, 63-75.
- <sup>11</sup> Shade M., Woodward M.A. and Steel C.M. (1980). Chromosome aberrations acquired in vitro by human B-cell lines. II. Distribution of break points. *J. Natl. Cancer Inst.* **65**, 101-109.
- <sup>12</sup> Mark J., Westermarck B., Ponten J. and Hugosson R. (1977). Banding patterns in human glioma cell lines. *Hereditas* **87**, 243-260.
- <sup>13</sup> Mamaev N. and Mamaeva S. (1990). Nucleolar organizer region activity in human chromosomes and interphase nuclei of normal, leukemic, and tumor cells, as evaluated by silver staining. *Int. Rev. Cytol.* **121**, 233-266.
- <sup>14</sup> Savelyeva L. and Mamaeva S. (1987). Heterogeneity and balance of chromosomes in human cell line M-HeLa-76: Analysis of 100 karyotypes. *Cancer Genet Cytogenet* **28**, 311-325.
- <sup>15</sup> Cowell J.K. (1982). Double minutes and homogeneously staining regions: Gene amplification in mammalian cells. *Ann. Rev. Genet.* **16**, 21-59.
- <sup>16</sup> Rubinstein E. (1990). The untold story of HUT78. *Science* **248**, 1499-1507.
- <sup>17</sup> Maddox J. (1992). More on Gallo and Popovic. *Nature* **357**, 107-109.
- <sup>18</sup> Popovic M., Sarngadharan M.G., Read E. and Gallo R.C. (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**, 497-500.
- <sup>19</sup> Popovic M., Read-Connole E. and Gallo R.C. (1984). T4 positive human neoplastic cell lines susceptible to and permissive for HTLV-III. *The Lancet* **II**, 1472-1473.
- <sup>20</sup> Gazdar A.F. (1980). Mitogen requirements for the in vitro propagation of cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* **55**, 409-417.
- <sup>21</sup> Gilbert D.A., Reid Y.A., Gail M.H., Pee D., White C., Hay R. and O'Brien R. (1990). Application of DNA fingerprints for cell line individualization. *American Journal Human Genetics* **47**, 499-514.
- <sup>22</sup> Chen T.R. (1992). Karyotypic derivation of H9 cell line expressing human immunodeficiency virus susceptibility. *J. Natl. Cancer Inst.* **84**, 1922-1926.
- <sup>23</sup> Glukhova L.A., Kiseleva I.A., Korneeva M.N., Nosik D.N., Kushch A.A., Mamaeva S.E. and Ashe B. (1991). Karyological approach to the identification of true cell lines susceptible to the human immunodeficiency virus (HIV). *Biomedical Science* **2**, 293-297.
- <sup>24</sup> Catálogo American Type Culture Collection (ATCC) Number: HTB-176 Organism: Homo sapiens (human).
- <sup>25</sup> Ratner L., Haseltine W., Patarca R., Livak K.J., Starcich B., Joseph S.J., Doran E.R., Rafalski J.A., Whitehorn E.A., Baumeister K., Ivanoff L., Petteway S.R., Pearson M.L., Lautenberger J.A., Papas T.S., Ghrayer J., Chang N.T., Gallo R.C. and Wong-Staal F. (1985). Complete nucleotide sequence of the AIDS virus HTLV-III. *Nature* **313**, 277-284.
- <sup>26</sup> Shaw G.M., Hahn B.H., Arya S.K., Groopman J.E., Gallo R.C. and Wong-Staal F. (1984). Molecular characterization of Human T-cell Leukemia (lymphotropic) Virus Type III in the Acquired Immune Deficiency Syndrome. *Science* **226**, 1165-1171.
- <sup>27</sup> Ceballos A. (1996). Eficiencia de la inmunofluorescencia como prueba diagnóstica de la infección por HIV. Tesis de licenciatura.
- <sup>28</sup> Marquina S. Comunicación personal.



- <sup>29</sup> Nelson-Rees W.A., Daniels D.W. and Flandermeyer R.R. (1981). Cross-contamination of cells in culture. *Science* **212**, 446-452.
- <sup>30</sup> Rothfels K.H. and Siminovitch L. (1958). An air drying technique for flattening chromosomes in mammalian cell grown in vitro. *Stain Technol.* **33**, 73-77.
- <sup>31</sup> Mahalanovich A.J.S. (1969). Methodological process for cytogenetic quantification. *Chromosoma* **28**, 211-244.
- <sup>32</sup> Seabright M. (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* **II**, 971.
- <sup>33</sup> Sumner A.T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* **75**, 304-306.
- <sup>34</sup> Howell W.N. and Black D.A. (1980). Controlling silver-staining of nucleolus organizing region with a protective colloidal developer: a one step method. *Experientia* **36**, 1014-1015.
- <sup>35</sup> Schweizer D., Ambros P. and Andrie M. (1978). Modification of DAPI banding on human chromosomes by prestaining with a DNA-binding oligopeptide antibiotic, distamycin A. *Exp. Cell Res.* **111**, 327-322.
- <sup>36</sup> ISCN (1985). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Harnden D.G., Klinger H.P. (Eds.). Cytogenetics and Cell Genetics. S. Karger, Basel.
- <sup>37</sup> Rabbitts T.R. (1994). Chromosomal translocation in human cancer. *Nature* **372**, 143-149.
- <sup>38</sup> Bunn P.A. and Foss F.M. (1996). T-cell lymphoma cell lines (HUT102 and HUT78) established at the National Cancer Institute: history and importance to understanding the biology, clinical feature, and therapy of cutaneous T-cell lymphomas (CTCL) and adult T-cell leukemia-lymphomas (ATLL). *J. Cell Biochem. Suppl.* **24**, 12-23.
- <sup>39</sup> King M. (1990). Animal cytogenetics Vol 4: Chordata 2-Amphibia. Gebruder Borntraeger, Berlin.
- <sup>40</sup> Shimura M., Tanaka Y., Nakamura S., Minemoto Y., Yamashita K., Hatake K., Takaku F. and Ishizaka Y. (1999). Micronuclei formation and aneuploidy induced by *Vpr*, an accessory gene of human immunodeficiency virus type 1. *FASEB J.* **13**, 621-637.
- <sup>41</sup> Shimura M., Onozuka Y., Yamaguchi T., Hatake K., Takaku F. and Ishizaka Y. (1999). Micronuclei formation with chromosome break and gene amplification caused by *Vpr*, an accessory gene of human immunodeficiency virus. *Cancer Research* **59**, 2259-2264.
- <sup>42</sup> Manolov G., Argirova R. and Manolova Y. (1994). Chromosome studies of H9/HTLV-III<sub>B</sub> cells and blood lymphocytes infected with human immunodeficiency virus (HIV-1). *Hereditas* **121**, 113-114.
- <sup>43</sup> Whang-Peng J., Chen Y.M.A., Knutsen T., Zhao W-P. and Tsai S. (1993). Chromosome studies in HTLV-I, -II, and HIV-1, -2 cell lines infected in vivo and in vitro. *Journal of AIDS* **6**, 930-940.
- <sup>44</sup> Glukhova L.A., Zoubak S.V., Rynditch A.V., Miller G.G., Titova I.V., Vorobyeva N., Lazurkevitch Z.V., Graphodatskii A.S., Kushch A.A. and Bernardi G. (1999). Localization of HTLV-1 and HIV-1 proviral sequences in chromosomes of persistently infected cells. *Chromosome Research* **7**, 177-183.
- <sup>45</sup> Shukla R.R., Marques S.M.P., Kimmel P.L. and Kumar A. (1996). Human chromosome 6- and 11-encoded factors support human immunodeficiency virus type 1 Rev function in A9 cells. *Journal of Virology* **70**, 9064-9068.

