

Tesis de Posgrado

Estudio citogenético de células tumorales y de híbridos somáticos interespecíficos "in vitro"

Durán-Troise, Graciela

1973

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en 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 doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Durán-Troise, Graciela. (1973). Estudio citogenético de células tumorales y de híbridos somáticos interespecíficos "in vitro". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1425_DuranTroise.pdf

Cita tipo Chicago:

Durán-Troise, Graciela. "Estudio citogenético de células tumorales y de híbridos somáticos interespecíficos "in vitro"". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1973. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1425_DuranTroise.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

"ESTUDIO CITOGENETICO DE CELULAS TUMORALES Y DE HI-
BRIDOS SOMATICOS INTERESPECIFICOS "IN VITRO"

Graciela Durán-Troise

142

Tesis presentada para optar al título de
Doctor en Ciencias Biológicas

Leg. 142

Directora de Tesis: Dra Eugenia S. de Lustig
Consejero de Estudios: Dr Jorge M. De Carlo

Quiero expresar mi profundo
agradecimiento a la Dra Eugenia S. de
Lustig, cuyo consejo oportuno y constan-
te apoyo hicieron posible la realización
de este trabajo.

Agradezco también:

A mi Consejero de Estudios, Dr Jorge M. De Carlo, Profesor Titular de Histología de la Facultad de Ciencias Exactas y Natureles

Al Dr Georges Barski, Jefe del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y de Virología del Instituto Gustave-Roussy de Villejuif, Francia, de quién recibí valiosas enseñanzas.

A las Srtas Catalina Sasko y Lidia Castelluccio y al Sr Isidoro Tolcachir, por su eficiente colaboración técnica.

INDICE

I	- INTRODUCCION.....	- 1 -
II	- BREVE GLOSARIO.....	- 6 -
III	- ESTABLECIMIENTO Y ESTUDIO CITOGENETICO DE UNA LINEA CELULAR HUMANA PROVENIENTE DE UN TUMOR MIXTO DE LA GLANDULA PAROTIDA.....	- 13 -
IV	- OTRAS OBSERVACIONES REFERENTES A LA PULVERIZACION CROMOSOMICA.....	- 23 -
V	- MITOSIS Y CELULAS MULTINUCLEADAS EN CULTIVOS DE TUMORES OSEOS GIGANTO-CELULARES HUMANOS.....	- 30 -
VI	- ESTUDIO CITOGENETICO DE UN NEUROBLASTOMA CA- NINO.....	- 40 -
VII	- HIBRIDACION ENTRE UNA LINEA TUMORAL HUMANA Y UNA LINEA NORMAL DE RATON.....	- 45 -
VIII	- NUEVA TECNICA DE ANALISIS CITOGENETICO.....	- 71 -
IX	- IDENTIFICACION DE LOS CROMOSOMAS DE UN HIBRIDO HAMSTER-RATON MEDIANTE EL METODO DE DIGESTION ENZIMATICA.....	- 80 -

INTRODUCCION

1

En los organismos normales superiores el mantenimiento de la integridad genética de las células somáticas y de sus descendientes parece ser una regla fundamental en el gobierno de su compleja organización histotípica y organotípica.

Las células somáticas de los vertebrados obedecen normalmente este principio a pesar del permanente e íntimo contacto, en tejidos y órganos, entre células con diferente grado y formas de diferenciación.

En las células tumorales, en cambio, la pérdida del control genético lleva a un crecimiento incontrolado, propiedad que se transmite a la descendencia celular. Este carácter hereditario sugiere que la alteración responsable de ese crecimiento desmedido se sitúa a nivel cromosómico.

En 1891 Von Hansemann fue el primero en observar las irregularidades mitóticas presentes en tejidos cancerosos y les atribuyó un rol importante en la proliferación maligna. En 1914 Boveri formuló la Teoría Cromosómica del Cáncer según la cual el crecimiento maligno se originaría en células somáticas que hubieran recibido un contenido cromosómico anormal como consecuencia de mitosis "asimétricas". Tal el nombre por el utilizado para indicar las divisiones celulares que distribuyen irregularmente los cromosomas en las células hijas.

Posteriormente, la introducción de la técnica de cultivo de tejidos, que permitió el estudio "in vitro" de las células y el mejoramiento de los métodos de análisis citogenético contribuyeron al estudio de las anomalías cromosómicas de las células tumorales.

Dos hechos de importancia fueron la asociación en un mismo individuo de anomalías cromosómicas y de una neoplasia, y la existencia de aberraciones cromosómicas constantes en ciertos procesos malignos. Con respecto a esto último, es decir a la asociación de una determinada neoplasia con una alteración cromosómica repetida y precisa, un descubrimiento de gran trascendencia lo constituyó las observaciones de Nowell y Hungerford (1960) en la leucemia mieloide crónica. Estos autores vieron que uno de los cromosomas del grupo G - del par 22 según se determinó recientemente mediante la técnica de fluorescencia - presenta una delección del 40% de su brazo largo. Este cromosoma amputado, llamado cromosoma de Filadelfia o Ph₁ pues en esta ciudad fue observado por primera vez, es efectivamente un cromosoma "marcador" asociado a la leucemia mieloide crónica pues se lo encuentra en las células sanguíneas y medulares de los enfermos y jamás en las células que no pertenecen al sistema hematopoyético, como la piel o las aponeurosis.

El cromosoma de Filadelfia no es constitucional o hereditario según lo prueba su presencia en solamente el miembro portador de la leucemia mieloide crónica de parejas de gemelos monocigóticos. La aparición de este cromosoma en pacientes que desarrollan la LMC después de un tratamiento radiante indica que se trata de una aberración cromosómica adquirida.

En la fase recesiva de la enfermedad, como consecuencia de una terapia positiva, el cromosoma Ph₁ desaparece de la sangre circulante y de la médula ósea. En algunos casos ha

sido observado en los estadios preleucémicos donde los síntomas clínicos no estaban aún presentes. Estos dos hechos, así como su especificidad para la LMC indican que el cromosoma Ph₁ es un marcador de indudable valor diagnóstico y de gran utilidad como criterio para evaluar la respuesta a un tratamiento terapéutico.

Lejeune (1965) propuso el nombre de "variante común" para la o las alteraciones cariotípicas específicas en un determinado tipo de tumor. El único ejemplo de variante común bien establecido en el hombre es el de la leucemia mieloide crónica.

Algunos casos de alteraciones cromosómicas precisas que hablarían en favor de variantes comunes serían determinadas leucemias murinas, el papiloma de Shope del conejo y el sarcoma venéreo de Sticker en el perro.

Una muy vasta bibliografía cita casos de aparentes variantes comunes en diferentes tumores malignos sólidos humanos pero los resultados no son sistemáticamente coincidentes. Estos tumores se caracterizan por la presencia casi constante de alteraciones cromosómicas que son frecuentemente variables dentro de un mismo tumor. Numerosos estudios efectuados sobre tumores benignos señalan en cambio la ausencia de anomalías cromosómicas. El análisis por espectrofotometría del ADN en estos tumores demuestra una cantidad diploide en tanto que las mediciones realizadas en los tumores malignos indican una aneuploidía del material genético.

Las alteraciones cromosómicas presentes en los procesos malignos pueden ser de dos tipos:

a) Cambios de estructura que conducen a la formación de

"marcadores", tales como el cromosoma Ph₁.

b) Modificaciones del número cromosómico, que llevan a una aneuploidía.

La hipótesis propuesta por Ising y Levan (1957) según la cual existiría un número modal óptimo válido para todos los tumores humanos no pudo ser posteriormente confirmada. El análisis cromosómico de un gran número de tumores sólidos mostró que en su mayoría el número modal era hiperdiploide, con variaciones entre 47-57 cromosomas. Sin embargo, valores diferentes resultaron del estudio de otros tumores, con rangos que varían entre la hipodiploidía y la hipertriploidía.

En otro tipo de tumores, tales como los de la serie osteo-cartilaginosa, se observa frecuentemente la presencia de células gigantes multinucleadas. En condiciones normales, la fusión celular y la formación de este tipo de células solo ocurre en algunos casos particulares, tales como la histogénesis del músculo estriado.

En cultivo in vitro, la obtención de células polinucleadas se ha logrado mediante la exposición de cultivos a diferentes virus, tales como los virus Herpes y Sendai que conducen a la formación de policariocitos portadores de docenas de núcleos.

El estudio del mecanismo de la fusión celular inducida por virus permitió un extraordinario avance en el área de la hibridación celular somática. Los trabajos realizados en este campo de investigación durante los últimos doce años, especialmente el análisis del contenido cromosómico y de la expresión fenotípica de los híbridos somáticos, han suministrado una valiosa información sobre la genética

de las células somáticas de los vertebrados incluyendo los humanos, y los mecanismos involucrados en la regulación de su expresión.

El proceso responsable de la evolución del cariotipo en los tejidos cancerosos no ha sido dilucidado. La no disyunción en la duplicación de determinados cromosomas conduciría a la presencia de cromosomas supernumerarios; la pérdida de cromosomas como consecuencia de mitosis anormales llevaría a monosomías o nulisomías; endomitosis sucesivas darían lugar a núcleos altamente poliploides; translocaciones, deleciones y la formación de isocromosomas originarían cromosomas "marcadores". Estos y otros mecanismos combinados en el tiempo producirían las profundas modificaciones y la heterogeneidad cariotípica observadas en los tumores malignos.

En este trabajo hemos proyectado analizar en distintos sistemas biológicos y con diferentes técnicas las modificaciones y la evolución cariotípica que se producen en algunos tumores malignos.

Hemos estudiado tumores humanos, en los cuales se hallaron frecuentes y constantes alteraciones, tales como la presencia de cromosomas marcadores y de mitosis atípicas que dan lugar a la formación de policariocitos. En un tumor canino analizamos la aparición de numerosos cromosomas anormales y la disminución del número cromosómico total.

En un híbrido ratón- humano estudiamos la segregación cromosómica de ambas células parentales en el híbrido y la malignidad del mismo.

Para el estudio de los reordenamientos cromosómicos que ocurren en las células neoplásicas y el análisis de los

5 bis

híbridos somáticos, hemos utilizado una sencilla técnica que pone en evidencia bandas cromosómicas, facilitando el reconocimiento de los cromosomas y las alteraciones que en ellos se presentan.

BREVE GLOSARIO

La utilización de las técnicas de cultivo de tejidos, exitosamente desarrolladas en las últimas décadas, constituye una herramienta de gran valor en los estudios de diferentes ramas de la ciencia. Durante varios años existió una controversia respecto a la terminología utilizada por los "cultivadores de células". Es así que en 1961 la Asociación de Cultivo de Tejidos creó un Comité de Nomenclatura, encargado de unificar los conceptos y definir los términos frecuentemente utilizados, sobre los cuales habían considerables desacuerdos entre los diferentes investigadores.

Este Comité redactó un informe que fue definitivamente adoptado en 1966.

En las páginas siguientes se transcriben los conceptos de términos repetidamente citados en el presente trabajo y acordes con el texto aprobado por la Asociación de Cultivo de tejidos.

Cultivo de tejidos: El Cultivo de Tejidos concierne al estudio de células, tejidos y órganos explantados y mantenidos en crecimiento en cultivo "in vitro" durante más de 24 horas. Según que el cultivo se refiera a células, tejidos u órganos, existen dos metodologías: 1) Cultivo de

células, que se refiere al crecimiento "in vitro" de células- incluyendo el cultivo de una sola célula- que no se organizan en tejidos. 2) Cultivo de órganos, que comprende el mantenimiento o crecimiento "in vitro" de tejidos y de órganos - en su integridad o parte de ellos-, de manera tal que puedan diferenciarse- en el caso de órganos embrionarios- y preservarse la arquitectura y función de los mismos.

- - - - -

Explanto: Este término indica el fragmento cortado de un tejido o de un órgano utilizado para iniciar un cultivo "in vitro".

- - - - -

Monocapa: Una lámina única de células creciendo sobre una superficie.

- - - - -

Cultivo en suspensión: Se refiere a un tipo de cultivo en el cual las células se multiplican suspendidas en el medio nutritivo.

- - - - -

Cultivo primario: Este término implica un cultivo iniciado a partir de células, tejidos u órganos tomados directamente del organismo. Excluye los cultivos comenzados de explantos desarrollados en animales por inyección en los mismos de células cultivadas "in vitro".

- - - - -

Línea celular: Se origina a partir de un cultivo primario, en el momento que este es subcultivado por primera vez.

- - - - -

Línea celular establecida: Se puede definir como tal a una línea celular que presenta el potencial de ser subcultivada in vitro indefinidamente. Con el actual conocimiento sobre el comportamiento de las células "in vitro," no es posible determinar el punto en el cual un cultivo se considera establecido, si el término establecido quiere indicar que el cultivo ha adquirido la capacidad de crecer indefinidamente. Basándose únicamente en la experiencia con células humanas de tipo fibroblástico, un cultivo debe ser subcultivado al menos 70 veces, con intervalos de 3 días, antes de ser considerado establecido.

Clon: Población celular a partir de una célula por sucesivas mitosis. Un clon no es necesariamente homogéneo; en consecuencia, "clon" o "clonado" son términos que no deben ser empleados para indicar homogeneidad en una población celular.

Línea celular diploide: Define una línea celular en la cual al menos el 75% de las células presenta el cariotipo normal de la especie. El número diploide de cromosomas no es necesariamente equivalente al cariotipo diploide, pues existen situaciones en las cuales una célula puede perder un tipo de cromosoma y adquirir un otro. En ese caso el cariotipo de la célula ha cambiado pero el número diploide de los cromosomas persiste. Esas células se denominan "pseudodiploides".

Cariotipo: Disposición sistemática de los cromosomas de una sola célula, preparada mediante el dibujo o fotografía de la misma, que puede representar los cromosomas de un individuo o de una especie.

Idiograma: Es la representación diagramática de un cariotipo, que se basa en el estudio de los cromosomas de varias células.

Línea celular heteroploide: Es aquella que tiene menos del 75% de las células con una constitución cromosómica diploide.

Haploide: 1) El número básico de las series poliploides (símbolo: x). En este caso haploidía equivale a monoploidía.

2) El número cromosómico de la fase haploide, el número de cromosomas de las gametas (símbolo : n).

Diploide, triploide, tetraploide, etc.: El doble, triple, cuádruple etc. del número básico (símbolos: $2x$, $3x$, $4x$, etc.).

Poliploide: Designación general para los múltiplos del número básico, mayores que el número diploide.

Heteroploide: 1) En organismos con predominancia de la fase diploide, todos los números cromosómicos desviados del número cromosómico normal de la fase diploide.

2) En organismos con predominancia de la fase haploide,

todos los números cromosómicos desviados del número cromosómico normal de la haplofase.

Euploide: Múltiplos exactos de x.

Aneuploide: Todos los números desviados de x y de los múltiplos exactos de x.

Subcultivo: Indica la transferencia de células de un recipiente de cultivo a otro. Se utilizan indistintamente los términos "subcultivo" y "pasaje".

Número de subcultivo o número de pasaje: Indica el número de veces que las células han sido subcultivadas o transferidas de un recipiente de cultivo a otro.

Intervalo de subcultivo: Representa el lapso de tiempo transcurrido entre dos subcultivos o pasajes.

Tiempo de generación celular: Indica el intervalo entre dos consecutivas divisiones de una célula.

Células de tipo fibroblástico: En el cultivo "in vitro" varios tipos de células adquieren una morfología similar. Aquellas que adoptan una forma irregular o fusiforme son llamadas "fibroblastos". Sin embargo, el origen de esas células o sus potencialidades, tal como la producción de fibras son generalmente desconocidos. Una denominación más apropiada para estas células es la de "células de tipo fibroblástico".

Células de tipo epitelial: Las células epiteliales "in vitro" pueden adoptar diferentes formas pero tienden a formar una capa de células poligonales muy próximas las unas a las otras. Sin embargo el grado de cohesión de las células es variable. Cuando el único criterio para la identificación de estas células es su tendencia a adherir las unas a las otras es preferible denominarlas "células tipo epiteliales".

Tumorigenicidad: No hay un criterio para determinar la tumorigenicidad o poder tumorigeno de las células "in vitro." Esta capacidad de las células puede ser determinada por el comportamiento de las mismas en los animales, en la medida que puedan o no inducir el crecimiento de tumores en los mismos. Los tests de tumorigenicidad se efectúan mediante el transplante de células en animales singeneicos o bien hamsters sirios cortisonados.

Transformación celular "in vitro": Está generalmente referida a la acción que producen los virus oncogénicos en poblaciones celulares en cultivo.

La transformación se define en estos casos como el proceso por el cual las células adquieren propiedades diferentes a aquellas que se manifestaban antes de la infección viral.

Las células transformadas pueden diferir de las células originales en una serie de características:

- a) Pérdida de la inhibición de contacto, como consecuencia de cambios de su superficie, lo que lleva a un crecimiento donde las células se superponen.
- b) Cambio morfológico, con pasaje del tipo celular fibroblástico al tipo epitelioide.

- c) Alteraciones del metabolismo celular.
- d) Capacidad de formar colonias en cultivo en agar blando.
- En ciertas condiciones las células transformadas pueden ser capaces de producir tumores cuando son inoculadas en animales singeneicos o hamsters cortisonados.

BIBLIOGRAFIA

Fedoroff, S.: J. Nat. Cancer Inst. 38: 607.(1967).

ESTABLECIMIENTO Y ESTUDIO CITOGENETICO DE UNA LINEA CELULAR HUMANA PROVENIENTE DE UN TUMOR MIXTO DE LA GLANDULA PAROTIDA.

Alexis Carrel (1) en 1924 estableció el primer cultivo celular permanente in vitro. Esta primera línea celular provenía de corazón de embrión de pollo y fue mantenida durante 34 años mediante ininterrumpidos pasajes en cultivos de plasma coagulado. Lamentablemente no se tiene gran información sobre el fenotipo y las propiedades genéticas de las células cultivadas por Carrel, especialmente las modificaciones morfológicas, metabólicas y cromosómicas experimentadas por la línea celular durante su extensa vida in vitro.

Más tarde, entre 1940 y los primeros años de la década del 50, nuevas técnicas de cultivo de tejidos, la utilización de medios sintéticos y de antibióticos permitió el desarrollo de líneas celulares permanentes.

Es importante destacar que los tejidos a cultivar, ya sea en fragmentos o en suspensión son casi todos, genéticamente hablando, mezclas de varios tipos de células caracterizadas por diferentes grados de diferenciación histológica más o menos irreversible. Sin embargo, a pesar de esta heterogeneidad histológica la evolución in vitro de las células sigue el mismo esquema. Los estadios usualmente son, primero, una rápida multiplicación celular, luego una disminución de la velocidad de crecimiento y la aparición progresiva o abrupta según los casos, de la situación conocida como "adaptación" o "transformación". Esta evolución conduce a una población celular aparentemente diferente por sus

propiedades morfológicas y frecuentemente cariotípicas a cualquier célula componente del tejido explantado.

Dos fenómenos son reconocidos durante la adaptación de las células somáticas a la vida "in vitro": 1) una tendencia hacia la desdiferenciación celular, con pérdida de ciertas propiedades morfológicas y funcionales; 2) cambios en el cariotipo celular que conducen frecuentemente a la aneuploidía y a la aparición de nuevos cromosomas diferentes de los preexistentes. (2,3,4,5).

Los estudios efectuados en numerosas líneas celulares permiten concluir que las células cultivadas "in vitro," después de atravesar un período crucial de adaptación, logran una relativa estabilidad de sus características esenciales, tales como un cariotipo más o menos constante, la mayor o menor receptividad a determinados virus (6) y el mantenimiento de sus propiedades antigénicas (2,7).

Los tumores mixtos de las glándulas salivales son tumores "benignos", de evolución muy lenta. Al cabo de muchos años algunos pueden presentar un desarrollo francamente maligno y las recidivas son frecuentes como consecuencia de una exéresis incompleta.

Considerados desde el ángulo histológico, los tumores mixtos aparecen constituídos por una doble morfología epitelial y conjuntiva.

Hay varias teorías respecto al origen de los mismos:

1) La hipótesis según la cual serían de origen puramente mesodérmico (8), actualmente descartada pues el tejido conectivo no es capaz de transformación epitelial in vivo.

2) La teoría que sostiene que estos tumores se originarían a partir de tejidos embrionarios ectodérmicos y mesodérmicos, si bien estaría contradecida por el hecho de no haberse observado tejidos embrionarios en las glándulas salivales (9).

3) La hipótesis según la cual estos tumores serían de origen solamente epitelial, que es actualmente aceptada (10, 11, 12).

En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Oncología "Angel H. Roffo" se estableció un cultivo celular permanente a partir de un tumor de la glándula parótida humana y se efectuó el estudio citogenético del mismo durante el primer año de su vida in vitro.

MATERIALES Y METODOS

El material cultivado proviene de una enferma de 19 años quien no había recibido previamente a la intervención quirúrgica ningún tratamiento antitumoral o radiante.

Los cultivos se efectuaron de acuerdo a dos métodos diferentes:

1) Método de cultivo en explantos: utilizando tubos de Leighton, según la técnica de Lejeune y col. (13). Un fragmento del tumor recogido esterilmente de la pieza operatoria en un intervalo no mayor de 2 horas fue lavado varias veces en medio nutritivo y cortado en pequeños fragmentos de 1 a 2 mm³. Estos explantos fueron cultivados sobre coágulo plasmático en tubos de Leighton. La desventaja que presenta esta técnica es la de no permitir una rápida proliferación celular pero resulta útil en el caso que el fragmento tumoral obtenido de la pieza operatoria o de la biopsia es muy pequeño.

2) Cultivo en fase líquida: Como en el método anterior el fragmento operatorio fue finamente cortado y los pequeños fragmentos colocados en un Ehrlenmeyer conteniendo solución de PBS de Dulbecco y tripsina al 0,25%. La disociación de los fragmentos fue facilitada mediante la acción de un agitador magnético. Cada 15 minutos la solución de tripsina fue reemplazada y la suspensión recogida conservada en un tubo de centrifuga mantenido en hielo. Esta operación se repitió hasta lograr una completa disociación de los fragmentos tumorales. Finalmente las suspensiones recogidas fueron centrifugadas durante 10 minutos a 800 r.p.m. El precipitado se lavó dos veces en medio de cultivo y fue por último resuspendido.

Los cultivos se efectuaron en frascos Pyrex y en tubos de Leighton. El medio de cultivo utilizado fue el medio sintético 199, suplementado con 10% de suero humano decomplementado y con antibióticos en una proporción de 100 U/ml de Penicilina y 100 μ g/ml de Estreptomina.

Los cultivos fueron mantenidos en estufa a 37°C y el crecimiento de los mismos controlado diariamente. En general se efectuaron subcultivos una vez por semana, dependiendo la frecuencia de los pasajes del crecimiento celular.

Técnica citogenética

Los estudios citogenéticos se efectuaron en tubos de Leighton, utilizándose los cultivos provenientes de un cultivo primario en explanto. Este método sin la utilización de tripsina permite la conservación de células con las características propias del tumor original. El cultivo en explanto sería preferible al cultivo mediante tripsinización pues la enzima lesiona la mayoría de las

células tipo epiteliales, favoreciendo por lo tanto el crecimiento de las células fibroblásticas.(14).

El procedimiento seguido para el estudio cromosómico fue el siguiente:

- 1) Entre 24-48 horas después de efectuados los repiques se agregó Colcemid (Ciba) a los cultivos en una concentración de 0,5 μ g por mililitro de medio de cultivo. Las células fueron incubadas durante 2 horas a 37°C a fin de permitir una acumulación de metafases detenidas por la colchicina.
- 2) Posteriormente los cultivos fueron sometidos a un tratamiento hipotónico a 37°C a fin de dispersar los cromosomas metafásicos. Se utilizó suero humano y agua neutra en proporción 1:5 durante 30-40 minutos.
- 3) Las células fueron fijadas en una solución de Carnoy (ácido acético glacial, cloroformo y alcohol absoluto en proporción 1:3:6) durante 45 minutos.

Estos pasos se efectuaron en las láminas aún en el interior de los tubos de Leighton. Una vez fijadas, éstas se retiraron de los tubos.

- 4) Una hidrólisis en CLH N a 57°C durante 7-8 minutos, seguida de varios lavados en agua neutra, precedió a la coloración. Las láminas fueron sumergidas durante 10-15 minutos en una solución de colorante de Unna (azul de Unna) en proporción 1:5 en agua neutra. Después de lavadas en agua destilada fueron montadas en bálsamo de Canadá.

Las fotografías se tomaron con una máquina Kodak adaptada a un microscopio Carl Zeiss, utilizándose películas Kodak Panatomic en blanco y negro.

RESULTADOS

Desde el primer pasaje las células presentaron una morfología de tipo epitelióide y un rápido crecimiento con un tiempo de generación de aproximadamente 24 horas. A lo largo de los pasajes estudiados, la mayoría de las células fueron hipotriploides, con fluctuaciones del número cromosómico entre 60-66, si bien el número modal fue de 66 cromosomas. Se observaron también núcleos altamente poliploides con 130-150 cromosomas. (Fig.1).

Las observaciones más frecuentes fueron:

a) Disociación centromérica: en algunos casos parcial, o sea teniendo lugar solo en parte de los cromosomas, y en otros una disociación total afectando todos los cromosomas que presentaron sus cromátidas separadas. (Fig.2).

b) Pulverización cromosómica y presencia de "cromosomas minutos": Estos últimos fueron notados en muchas de las metafases estudiadas, variando el número de los microcromosomas o cromosomas minuto entre 2 y 5 pares por célula. (Fig.3,13 y 14).

Las pulverizaciones cromosómicas han sido observadas en diversos grados, desde pulverizaciones parciales donde solamente parte de los cromosomas estaban alterados y era posible distinguir cromosomas intactos, hasta pulverizaciones totales donde todo el complejo cromosómico se veía intensamente fragmentado. (Fig.4).

En los diferentes pasajes en los cuales se calculó el índice de pulverizaciones se hallaron valores comprendidos entre 19 y 26%, con la sola excepción de un índice 9,5%. Estos valores se calcularon considerando los núcleos parcial y totalmente pulverizados sobre un total de 100 núcleos en

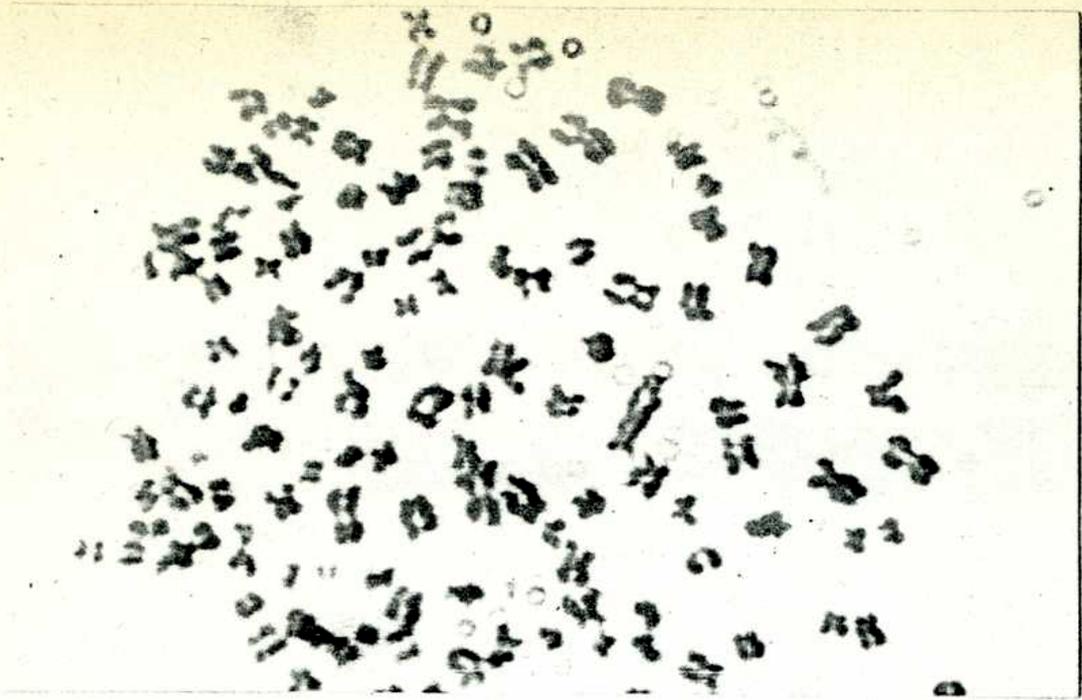


Fig. 1. - Metafase de una célula altamente poliploide.
(1500 x).

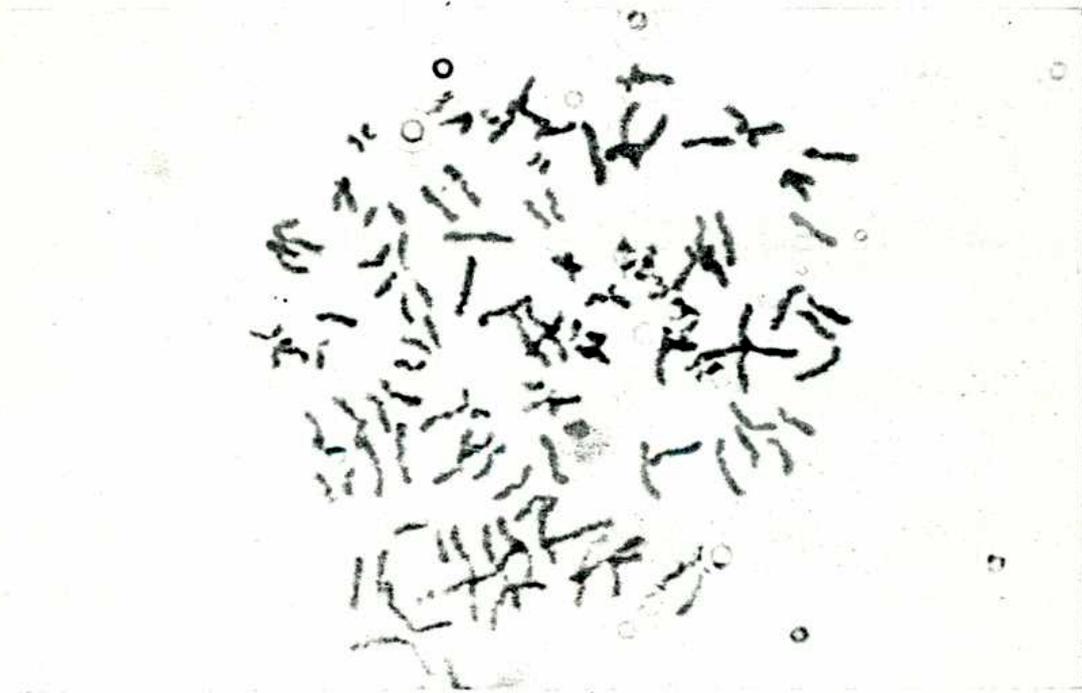


Fig. 2 - Disociación centromérica. La mayor parte de los
cromosomas presentan las cromátidas separadas.
(1500x).



Fig. 3. - Célula en metafase conteniendo 2 pares de cromosomas minutos (flechas). (1500 x).

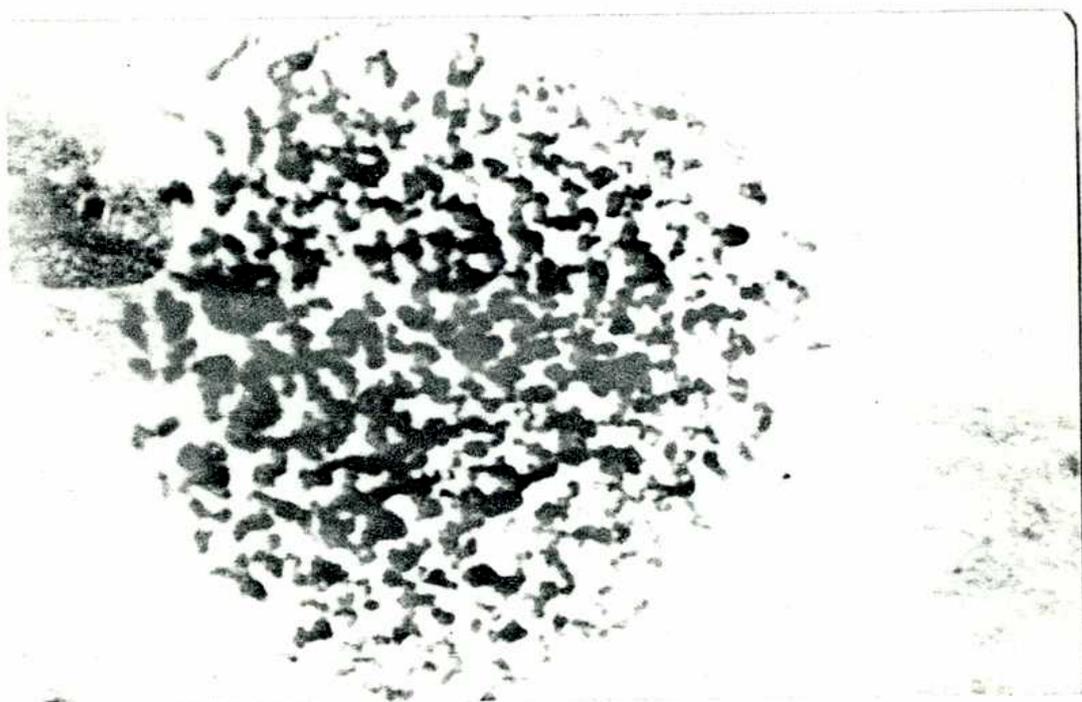


Fig. 4. - Pulverización cromosómica en una célula mononucleada. (1500 x).

metafase, sin considerar las metafases en las cuales se encontraron números bajos de cromosomas minutos.

c) Presencia de cromosomas erosionados: Estos han sido frecuentemente observados, coincidiendo en algunos casos con la presencia en el mismo núcleo de fragmentos cromosómicos. (Fig.5).

d) Células polinucleadas y micronúcleos: Si bien las primeras son un fenómeno común en los cultivos celulares in vitro, ha sido notada la presencia de grandes células de tipo sincisial con varios núcleos, verdaderas "bolsas de núcleos" en los cuales era frecuente la presencia de micronúcleos. (Fig.6 y 7).

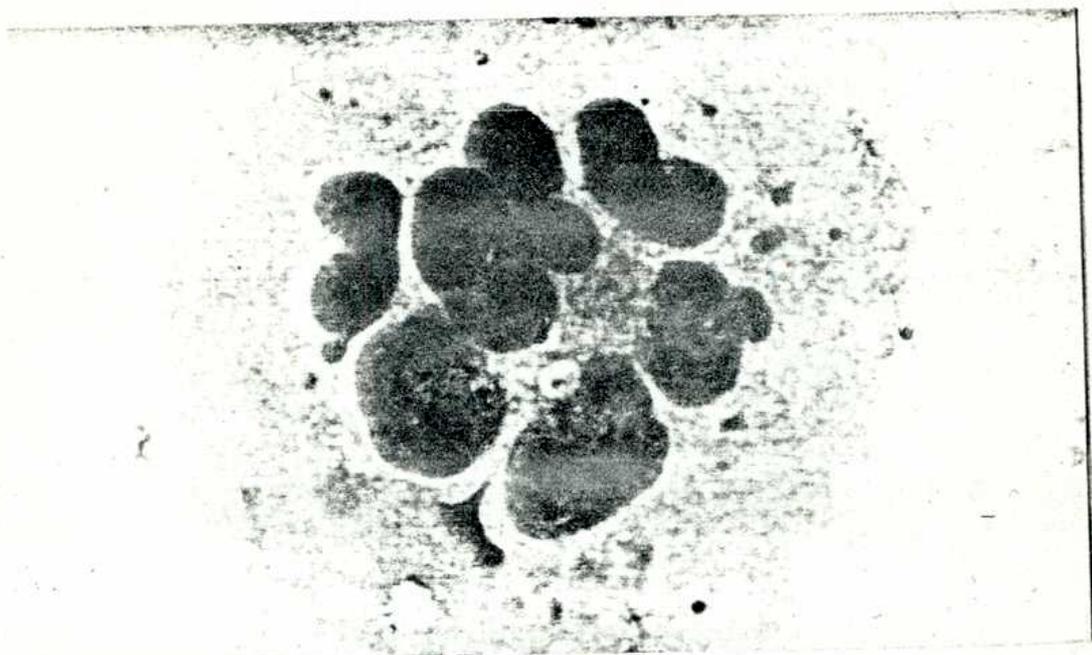
e) Células gigantes; generalmente mononucleadas, cuyos núcleos eran de un tamaño 8 a 20 veces mayor que los de las células circundantes. (Fig. 9).

f) Presencia de cromosomas marcadores. El análisis cariológico reveló un número variable entre 60-66 cromosomas por núcleo, siendo el número modal de 66 cromosomas. En los 25 cariotipos estudiados correspondientes a los pasajes 15, 25, 32 y 34 se observó en un 80% de los mismos la presencia de un cromosoma marcador subtelocéntrico (M_1) de tamaño similar al par 3. (Fig. 9, 10, 11, 12).

La tabla 1 muestra la distribución de los cromosomas en los 25 cariotipos. En casi todos los grupos de la mayoría de las metafases estudiadas hubo cromosomas supernumerarios, siendo los más estables en el número normal los grupos A y B. La única alteración observada en el grupo B fue la presencia en solo 4 cariotipos de una trisomía en el par 5. Los grupos más frecuentemente repetidos son el G y el F en el 100% de los casos, siendo el par 20 el de



Fig. 5. - Célula en metafase presentando los cromosomas ercsionados .(1500 x).



Figs. 6 y 7 - Células polinucleadas. Se observa la presencia de micronúcleos. (1000 x).

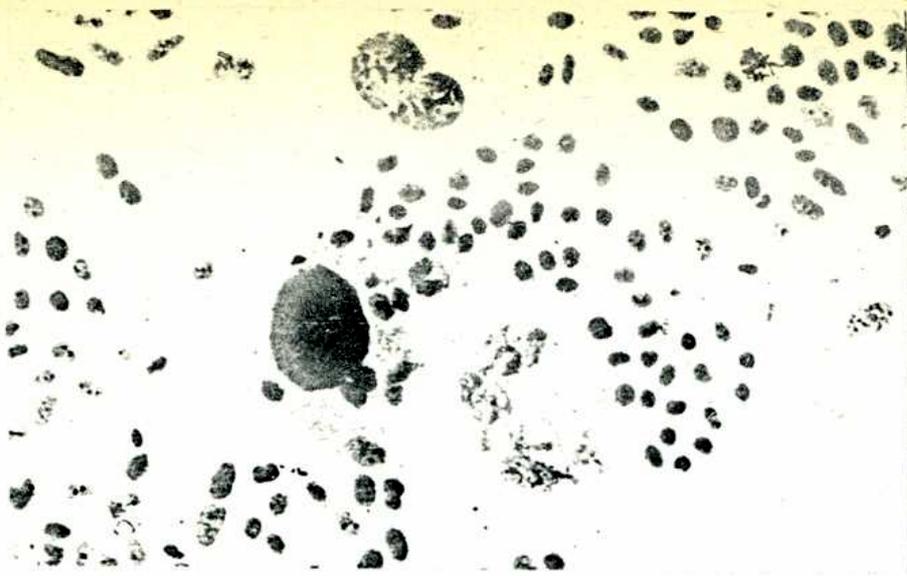


Fig. 8 - Célula gigante cuyo núcleo es varias veces mas grande que los núcleos circundantes. (800 x)

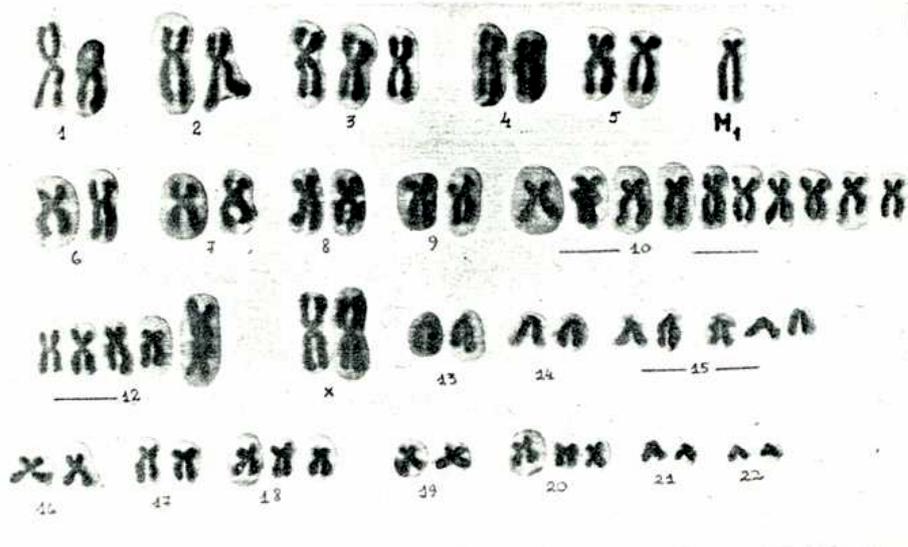


Fig. 9. - Cariotipo de 63 cromosomas. Nótese la presencia de un cromosoma subteloecéntrico M₁ y la repetición de los cromosomas del grupo C (6-12). (1500 x).



Fig. 10. - Cariotipo de 66 cromosomas. Se observa el marcador cromosómico M₁ y cromosomas supernumerarios en los grupos 19 y 20. (1500 x).

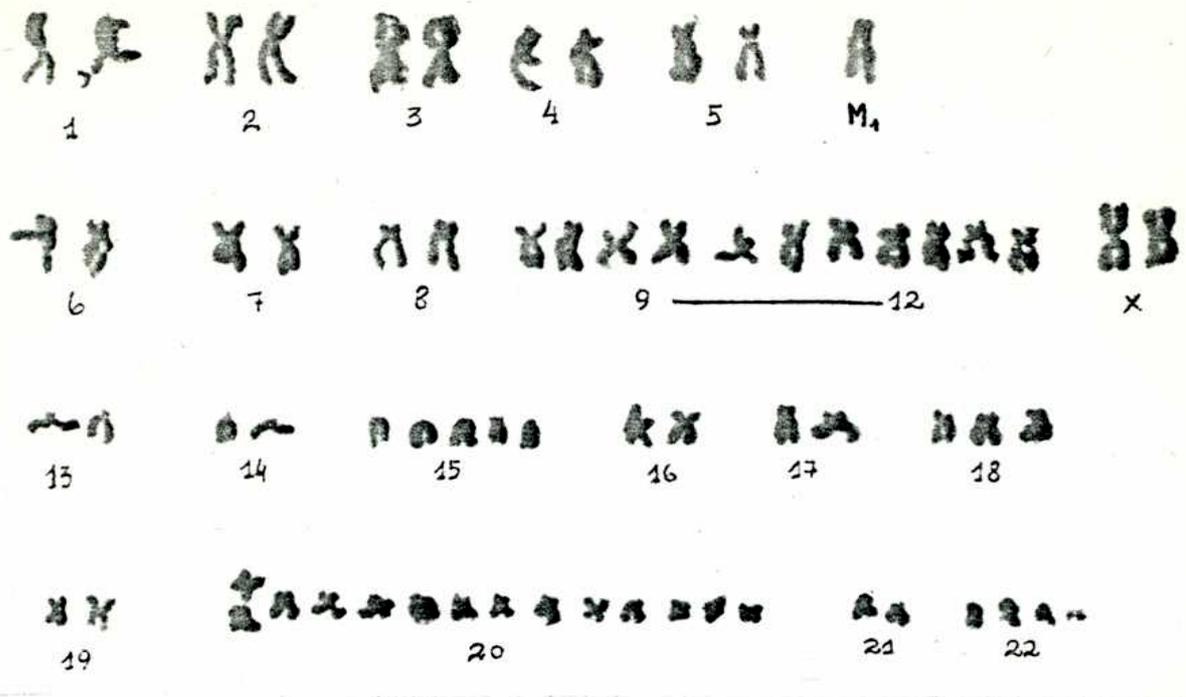


Fig. 11. - Cariotipo de 68 cromosomas. Presencia del marcador subtelocéntrico M₁ y de 14 cromosomas en el grupo 20. (1500 x).

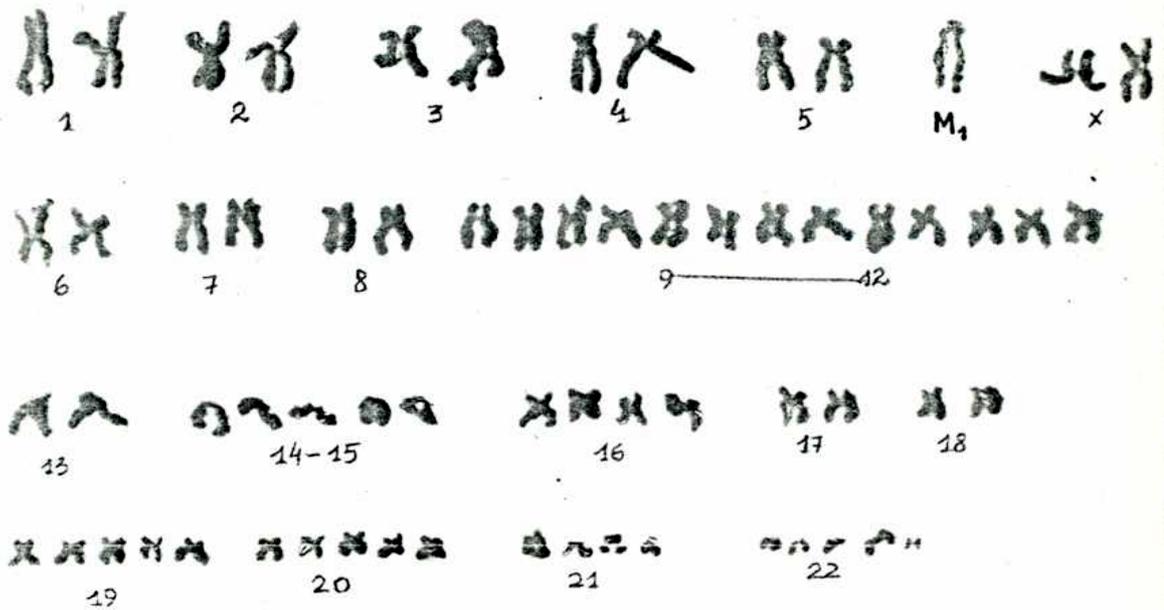


Fig. 12. - Cariotipo de 66 cromosomas. Está presente el cromosoma marcador M₁ y se observan cromosomas supernumerarios en el grupo C (6-12). (1500 x)

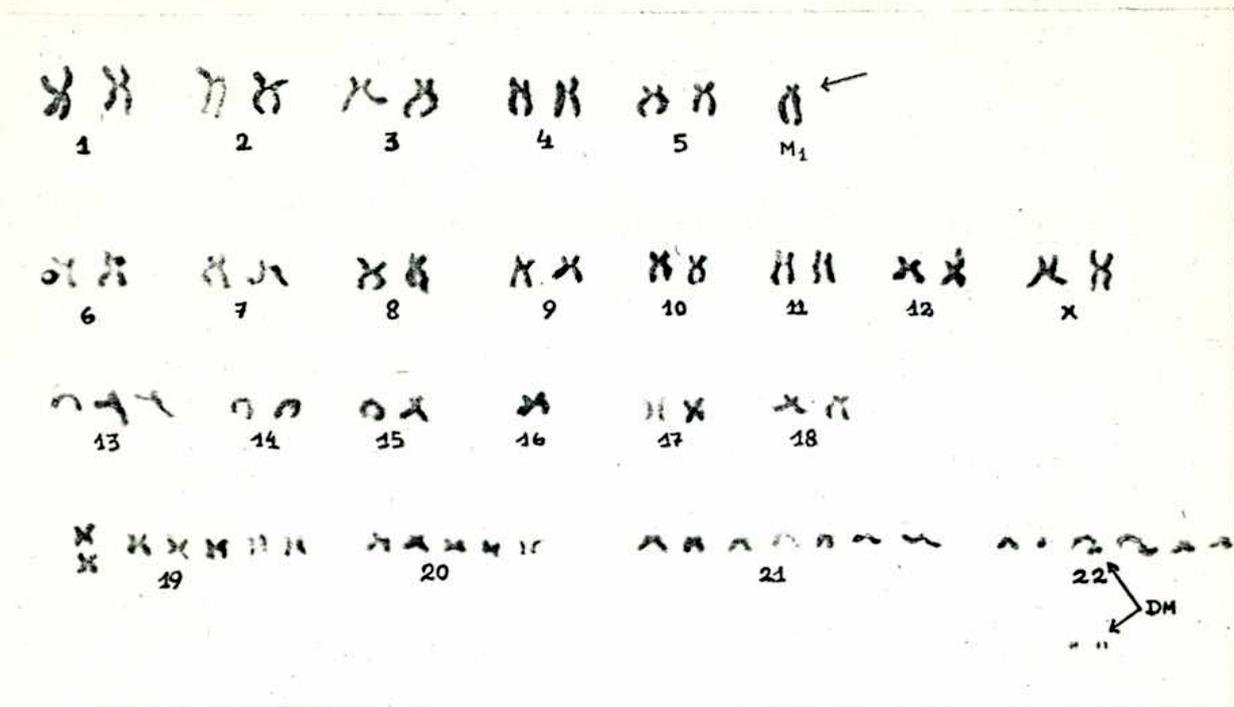


Fig. 13. - Cariotipo de 66 cromosomas. Se observan el cromosoma M_1 , 3 pares de cromosomas minutos (DM) y la pérdida de un cromosoma del par 16 (flecha). (1500 x).



Fig. 14. - Cariotipo de 65 cromosomas. Nótese la presencia de 2 pares de cromosomas minuto (DM) (1500 x).

Distribución de los cromosomas en 25 cari

células n°	2n	por n°																							
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
Tipo	46	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
1	66	-	-	-	-	+1	+1	←	←	←	+8	→	→	→	-	-	+2	-	-	-	+1	+5	+1		
2	66	-	-	-	-	+1	-	+1	-	-	-	-	-	+1	-	-	+1	←	←	←	+2	+6	-		
3	66	-	-	-	-	+1	-	+1	-	-	-	-	-	+1	←	+3	→	+2	→	-	+6	→	+5		
4	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+1	-	-	+1	←	+2	→	-	+4	+1		
5	65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+1	-	-	-1	-	-	-	+5	+3	+5		
6	63	-	-	-	-	+1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+2	+3	-	-	+2	+6	+3		
7	67	-	-	-	-	-	-	-	-	←	+8	→	→	→	-	-	+3	-	-	+1	-	+2	-		
8	63	-	-	+1	-	-	-	-	-	-	←	+10	→	→	→	-	+3	-	-	+1	-	+1	-		
9	65	-	-	-	-	-	-	-	-	←	+5	→	→	→	→	→	+1	→	+2	-	-	+3	+3		
10	61	-1	-	-	-	-	-	-	-	-	←	+2	→	→	→	-	-	-	-	+4	+5	+4	-		
11	66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+1	←	+4	→	-	+5	+10		
12	67	-	-	-	-	-	-	-	-	←	+3	→	→	→	-	-	+3	-	-	+1	+3	+6	+5		
13	65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+1	-	-	-	-	-	+2	+3	-	-	+2	+6	+3		
14	66	-	-	-	-	-	-	-	-	←	+6	→	→	→	-	+1	-	-	-	+4	-	-	+5		
15	67	-	-	-	-	-	-	-	-	←	+5	→	→	→	→	+1	-	-	-	+2	-	-	+3		
16	64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+2	-	+3	-	-	+3	+6		
17	66	-	-	-	-	-	-	-	-	←	+4	→	→	→	-	-	+1	-	-	-	+2	+6	+4		
18	61	-	-	-	-1	-	-	-	-	←	+5	→	→	→	-	-	-	-	-	+3	+5	-	+2		
19	65	-	-	-	-	-	-	-	-	←	+4	→	→	→	-	+1	+1	←	+3	→	-	+4	+2		
20	66	-	-	-	-	-	-	+2	-	←	+8	→	→	→	→	+2	-	-	-	-	-	-	+7		
21	63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+2	←	+5	→	+2	+7	-		
22	60	-	-	-	-	-	-	-	-	←	+5	→	→	→	-	-	-	-	-	-	-	+6	+2		
23	66	-	-	-	-	-	-	-	-	←	+6	→	→	→	-	-	+2	+2	-	+2	-	+5	+2		
24	62	-	-	-	-	-	-	-	-	←	+5	→	→	→	-	-	+2	-	+3	-	-	+3	+3		
25	66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+2	+3	-	+2	-	+2	+5		

Frecuencia del cromosoma M₁-20/25

Cromosomas "doble minuto" 9/25

de los cromosomas en 25 cariotipos

par n°																		Cromosoma Marcador M ₁	Cromosomas "Minuto" (DM)
6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X		
2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
+1	←			+8	→	-	-	+2	-	-	-	+1	+5	+1	-	-	+	-	
-	+1	-	-	-	-	+1	-	-	+1	←	3	→	+2	+6	-	+4	+	-	
-	+1	-	-	-	-	+1	←	+3	→	+2	→	-	←	+6	→	+5	+	-	
-	-	-	-	-	-	+1	-	-	+1	←	+2	→	-	+4	+1	+5	-	-	
-	-	-	-	-	-	+1	-	-	-1	-	-	+5	+3	+5	+5	+	2 pares		
-	-	-	-	-	-	-	-	+2	+3	-	-	+2	+6	+3	-	+	4 pares		
-	-	-	←	+5	→	-	-	+3	-	-	+1	-	+2	-	+1	+	1 par		
-	-	-	←	+10	→	-	-	+3	-	-	+1	-	+1	-	-	+	-		
-	-	-	←	+5	→	-	←	+1	→	+2	-	-	+3	+3	+2	+2	+	2 pares	
-	-	-	←	+2	→	-	-	-	-	-	+4	+5	+4	-	-	+	-		
-	-	-	-	-	-	-	-	+1	←	+4	→	-	+5	←	+10	→	+	-	
-	-	-	←	+3	→	-	-	+3	-	-	+1	+3	+6	←	+5	→	+	-	
-	-	-	-	+1	-	-	-	+2	+3	-	-	+2	+6	+3	+2	+	2 pares		
-	-	-	←	+6	→	-	+1	-	-	+4	-	-	+5	+3	-	+	-		
-	-	-	←	+5	→	+1	-	-	+2	-	-	+3	+3	+2	+4	+	-		
-	-	-	-	-	-	+2	-	+3	-	-	-	+3	+6	+3	-	-	-		
-	-	-	←	+4	→	-	-	+1	-	-	-	+2	+6	+4	+3	+	-		
-	-	-	←	+5	→	-	-	-	-	-	+3	+5	-	+2	-	+	-		
-	-	-	←	+4	→	-	+1	+1	←	+3	→	-	+4	+2	+3	+	4 pares		
-	+2	-	←	+8	→	+2	-	-	-	-	-	-	+7	-	-	+	2 pares		
-	-	-	-	-	-	-	-	+2	←	+5	→	+2	+7	-	-	+	-		
-	-	-	←	+5	→	-	-	-	-	-	-	+6	+2	-	-	+	-		
-	←			+6	→	-	-	+2	+2	-	+2	-	+5	←	+2	→	+	-	
-	-	-	←	+5	→	-	-	+2	-	+3	-	-	+3	←	+3	→	+	-	
-	-	-	-	-	-	+2	+3	-	+2	-	-	+2	+5	+5	-	+	2 pares		

frecuencia del cromosoma M₁-20/25

cromosomas "doble minuto" 9/25

mayor número de cromosomas extranumerarios. El grupo C fue altamente repetido en el 80% de los cariotipos analizados, siendo en algunos de ellos difícil la agrupación de los pares cromosómicos. No hubo, en cambio alteración numérica de los cromosomas X.

El cromosoma M_1 fue el único marcador observado. No hubo faltas cromosómicas repetidas. Sólo en tres casos se vieron monosomías correspondientes a los grupos A_1 , E_{16} y B_4 . Excepcionalmente se hallaron células con cromosomas dicéntricos.

DISCUSION

De los estudios citogenéticos efectuados en numerosas líneas celulares humanas, ya sea de origen normal o tumoral adaptadas a la vida "in vitro", se vió que esa adaptación, que implica un crecimiento autónomo e ilimitado, es acompañada por reordenamientos cromosómicos importantes. Estos reordenamientos parecen ser una condición necesaria pues los cultivos diploides detienen su multiplicación al cabo de 40-50 generaciones. (15).

La evolución del cariotipo de las líneas celulares hacia valores hiperdiploides-hipotetraploides parece un fenómeno general, no solamente en las células humanas sino también en las murinas. (16,7).

Un hecho que nos parece destacable en este trabajo es la presencia, desde la iniciación del estudio del cultivo en el pasaje número 15, de un número cromosómico diferente del normal, aproximadamente hipotriploide, que se ha mantenido a lo largo de posteriores subcultivos a una

elevada frecuencia, y de un cromosoma marcador subtelocéntrico (M_1) también a menudo observado.

La bibliografía referente al estudio cromosómico de tumores mixtos de la glándula parótida humana es escasa. Kondo y col. (17), en una línea de la glándula salivar humana, señalan una constitución cromosómica también hipotriploide con valores frecuentes de 62, 63, 64 y 65 cromosomas. En la totalidad de las metafases analizadas observan la presencia de un marcador subtelocéntrico de tamaño similar al par A_2 y de otros cromosomas marcadores meta-céntricos más pequeños.

El cromosoma marcador M_1 , de talla semejante al par A_3 podría originarse de un reordenamiento de uno de los cromosomas de este grupo, por translocación de un par de fragmentos de la región supracentromérica a la parte infracentromérica intacta.

La presencia de "cromosomas minuto" ha sido descrita previamente en tumores humanos de muy diverso origen, en niños (18,19,20) y en adultos (21,22). Los microcromosomas son muy frecuentes en tumores neurogénicos malignos, de acuerdo a los trabajos recientes de Mark (23,24). Este mismo autor cita la presencia de "cromosomas minuto" o "doble minuto" en el sarcoma de Rous en ratón (25) y Hauschka y Levan (26) los describen en los tumores ascíticos Krebs-2 y Ehrlich también en ratón. Freed y Schatz (27) señalan la presencia de los cromosomas "dobles minuto" en cultivos de células normales de hamster sometidos a la falta de aminoácidos esenciales.

Las características cariotípicas de los tumores descritos hasta la fecha que presentan cromosomas doble minuto o DMS

son muy variables. El número total de cromosomas oscila entre la forma pseudodiploide con 46 cromosomas y células con más de 85 cromosomas. Más aún, en algunos de los tumores estudiados hay una considerable variabilidad del número cromosómico, sin existir una moda predominante. La mayoría de estos tumores presentan cromosomas anormales o marcadores y éstos varían de tumor en tumor. O sea, no hay una caracterización cariotípica determinada o un particular cromosoma marcador que pueda relacionarse con los tumores que presentan DMS.

La mayor incidencia de DMS la presentan los tumores neurogénicos y los rhabdomiosarcomas. Hasta el momento no se sabe si es el tejido de origen quien es susceptible a la formación de los DMS o si un agente interno de estos tumores conduce a la génesis de los mismos. Puede ser que ambos mecanismos actúen conjuntamente.

Una teoría postulada por Sandberg acerca del origen de estos microcromosomas parece tener gran solidez. Según este autor ellos resultarían de la rotura de cromosomas preexistentes (42).

Recientemente se demostró que los cromosomas humanos están constituidos por un gran número de cromómeros de diferentes tamaños (43), estando esos cromómeros probablemente conectados por delgadas cadenas de ADN.

La visualización de la estructura cromomérica es posible en el estadio paquiténico de la meiosis, dificultándose a medida que los cromosomas se contraen. Según Sandberg, los DMS son cromómeros o grupos de cromómeros que se han liberado de un cromosoma preexistente y representarían pequeños cromosomas en anillo, probablemente del tipo acéntrico.

El proceso de formación de los DMS ocurriría en un período definido de tiempo y ésto quedaría indicado por la ausencia u ocasional presencia de cromosomas en anillo y de cromosomas dicéntricos en las células que presentan DMS.

La ausencia de aberraciones cromatídicas indicaría que los DMS se originan durante el período G_1 del ciclo celular (42).

Una interesante aunque especulativa teoría de Sandberg relaciona los DMS con la regresión espontánea de ciertos tumores. Este fenómeno, aunque muy raro, ha sido algunas veces citado (44) y la más alta incidencia fue descrita para casos de neuroblastomas y tumores neurogénicos. Aún cuando el mecanismo de la regresión espontánea no ha sido establecido, Sandberg sostiene que los DMS, cuando se encuentran en las células en elevado número, interferirían con el metabolismo normal celular y en la supervivencia de las células inhibiendo el proceso neoplásico.

La presencia de pulverizaciones cromosómicas, parciales o completas también ha sido citada con anterioridad. Este fenómeno fue observado en células infectadas con diversos virus. (28-35).

Cuando las pulverizaciones son observadas después de infectar los cultivos celulares con el virus de Sendai (34,35) los autores sostienen que la fusión celular es un prerequisite para la inducción del fenómeno, es decir, la pulverización tiene lugar solamente en células bi o poli-nucleadas, en las cuales un núcleo mitótico al menos permanece intacto en tanto el otro núcleo puede estar total o parcialmente fragmentado.

Nichols y col. (31), describen la existencia de

pulverizaciones en células humanas de diferente procedencia infectadas con virus de sarapión. Las lesiones ocurren en células fusionadas en sincisios. Sin embargo estos autores hallan núcleos aislados pulverizados lo que demostraría que el fenómeno puede también tener lugar en células mononucleadas.

Sandberg y col. (36) en una extensa publicación reciente sostienen que el fenómeno de pulverización solo ocurre en células bi o multinucleadas, donde uno de los núcleos está siempre en mitosis. La invariable presencia de un núcleo en metafase intacto-ocasionalmente en anafase o en telofase- en células multinucleadas con pulverizaciones señalaría que estos núcleos tienen una función crucial en la génesis de este fenómeno. Los núcleos más susceptibles de sufrir pulverizaciones serían, según los autores, aquellos que se encuentran en la fase S o de síntesis del material genético. Los núcleos en anafase, telofase e interfase serían progresivamente más sensibles a la pulverización cromosómica.

De la experiencia de estos autores se desprende que las células fusionadas con otras en metafase son más rápidamente pulverizadas que aquellas fusionadas con otras en anafase o telofase.

En el mismo trabajo Sandberg y col. (36) proponen una hipótesis para explicar la pulverización celular. Según ella, en el núcleo en división de una célula mononucleada la membrana nuclear de la célula parental se desintegra antes de la separación en anafase de los cromosomas metafásicos destinados a las células hijas. Durante la metafase, o al final de la misma, una maquinaria enzimática podría ser desreprimida.

Esta maquinaria podría destruir la membrana nuclear y, tal vez, otros componentes ajenos al huso, tales como el aparato de Golgi, provocando la anafase. Si esta enzima, o conjunto de enzimas actuara sobre un núcleo interfásico, su membrana, cromatina y tal vez otras estructuras serían rotas y pulverizadas. El rol de la fusión celular, y de los virus fusionantes, tal el caso del virus de Sendai, sería el de poner en contacto al núcleo interfásico con el citoplasma de la célula en mitosis conteniendo la o las enzimas activas. Puesto que la o las enzimas solo aparecen poco antes de iniciarse la anafase, la fusión de 2 núcleos interfásicos no puede resultar en una pulverización cromosómica.

Esta hipótesis está sometida actualmente a pruebas experimentales. Extractos de células metafásicas puestos en contacto con núcleos interfásicos de la misma línea celular deberían conducir a pulverizaciones en células mononucleadas. Extractos provenientes de núcleos interfásicos no deberían tener efecto pulverizante sobre núcleos de células mononucleadas en interfase. El resultado de estas experiencias no ha sido aún publicado.

Un hecho sugestivo en nuestro trabajo, es el de encontrar células mononucleadas pulverizadas, lo que contradice la hipótesis anteriormente expuesta.

Johnson y Rao (37) demostraron que la pulverización cromosómica es una condensación precoz e incompleta de la cromatina aún funcionalmente inmadura para este proceso, desencadenada por la influencia de un núcleo en mitosis fusionado en el mismo citoplasma con un núcleo interfásico. Propusieron el término "condensación

cromosómica prematura" en lugar de "pulverización" para referirse a este fenómeno.

Kato y Sandberg (38), en un trabajo realizado sobre cultivos derivados de un linfoma de Burkitt- la línea P-J-3 (Jijoye)- señalan la presencia de pulverizaciones cromosómicas y de micronúcleos. Los autores citan un porcentaje muy elevado de micronúcleos en células poliploides (20,6%) en relación con el hallado en células diploides (1,7%).

Varios trabajos (39,40) indican que los micronúcleos son una consecuencia de mitosis anormales en las cuales algunos cromosomas quedarían rezagados dando origen de esta manera a los micronúcleos. Frecuentemente las células poliploides sufren divisiones tri o tetrapolares en las cuales la presencia de cromosomas rezagados es más común que en las divisiones normales. Es decir, habría una íntima relación entre cromosomas rezagados y la formación de micronúcleos, ambos vinculados a células poliploides. Los autores citados suponen la existencia de una estrecha correlación entre la pulverización cromosómica y los micronúcleos, ambos fenómenos coexistentes en sus cultivos celulares. Una explicación sería que los micronúcleos, conservando su poder de síntesis de ADN, aunque siendo esta tardía con respecto a la del núcleo principal, resultarían pulverizados una vez que este último libera la o las enzimas de las cuales se habló en un párrafo anterior, de acuerdo a la hipótesis propuesta por Sandberg.

Henry y col.(41) en leucocitos humanos infectados con virus de sarampión observan que el fenómeno de la pulverización cromosómica ocurre en células sintetizando

activamente el ADN, en tanto las células en las fases G₁, G₂ y en mitosis son más sensibles al fenómeno de "erosión" o despiralamiento.

De nuestra experiencia personal, en ninguno de los pasajes estudiados se observaron células bi o multinucleadas en mitosis, ya que todos los policariocitos detectados estaban en interfase. Todas las células parcial o totalmente pulverizadas fueron mononucleadas.

En esta línea celular cultivada en nuestro laboratorio coincidieron fenómenos vinculados normalmente con infecciones virales u observados en células portadoras de partículas virales tales como el virus Epstein-Barr asociado al linfoma de Burkitt.

- - - - -

BIBLIOGRAFIA

- 1) Carrel, A. Compt. Rend. 90:410 (1924).
- 2) Barski, G.; Cornéfert, F. y Biedler, J. Ann. Inst. Pasteur 100:324 (1961).
- 3) Brand, K. G. y Syverton, J.T. J. Nat. Cancer Inst. 28:147 (1962).
- 4) Defendi, V. y col. J. Nat. Cancer Inst. 25: 359 (1960).
- 5) Hsu, T. C. y Klatt, O. J. Nat. Cancer Inst. 22:313 (1959).
- 6) Barski, G. y Cornéfert, F. J. Nat. Cancer Inst. 28:823 (1962).
- 7) Barski, G. y Cassigena, R. J. Nat. Cancer Inst. 30:865 (1964).
- 8) Billroth, Th. Virchows Arch. Path. Anat. 17:357 (1859).
- 9) Wilms, M. "Die Mischgeschwülste" (Georgi, Leipzig 1902).
- 10) Cohnheim, J. Vorlesungen über Allgemeine Pathologie, 2. Aufl. vol 1 (Hirschwald, Berlin 1882).
- 11) Bauer, W. H. y Bauer, J. D. Arch. Path. 55:328 (1953).
- 12) Azzopardi, J. G. y Smith, O. D. J. Path. Bact. 77:131 (1959).
- 13) Turpin, R.; Lejcunc, J. "Les chromosomes humains". Gauthier-Villars (París) 1965.
- 14) Jensen, F. C.; Gwatkin, R. B. L. y Biggers, J. D. Exptl. Cell Res. 34:440 (1964).
- 15) Hayflick, L. y Moorhead, P. S. Exptl. Cell Res. 25:585 (1961).
- 16) Sandford, K. K. y col. J. Nat. Cancer Inst. 23:1035 (1959).
- 17) Kondo, T. y col. Cancer, 27:403 (1971).
- 18) Cox, D.; Yuncken, C. y Spriggs, A. J. Lancet, 2:55 (1965).
- 19) Levan, A.; Manolov, G. y Clifford, P. J. Nat. Cancer Inst. 41:1377 (1968).
- 20) Lubs, H. A.; Salmon, J. H. y Flanigan, S. Cancer, 19:591 (1966).

- 21) Huang, C.C.; Imanura, R. y Moore, G. E. J. Nat. Cancer Inst. 43:1129 (1969).
- 22) Suárez, M. G. y col. Int. J. Cancer, 4:880 (1969).
- 23) Mark, J. y Granberg, I. Acta Neuropathol. 16:194 (1970).
- 24) Mark, J. Hereditas 68:61 (1971).
- 25) Mark, J. Hereditas, 57:1 (1967).
- 26) Hauschka, T. S. y Levan, A. J. Nat. Cancer Inst. 21:77 (1958).
- 27) Freed, J.J. y Schatz, S.A. Exptl. Cell Res. 55:393 (1969).
- 28) Harnden, D. G. Amer. J. Hum. Genet. 16:204 (1964).
- 29) Kato, H. y Sandberg, A. A. J. Nat. Cancer Inst. 41:1117 (1968).
- 30) Kurita, Y.; Osato, T. y Yohei, I. J. Nat. Cancer Inst. 41:1355 (1968).
- 31) Nichols, W.W. y col. Hereditas, 54:101 (1965).
- 32) Stich, H. F.; Hsu, T. C. y Rapp, F. Virology, 22:439 (1964).
- 33) Stich, H. F.; Van Hoosier, G. L. y Trentin, J. J. Exptl. Cell Res. 34:400 (1964).
- 34) Takagi, N. y col. J. Nat. Cancer Inst. 43:335 (1969).
- 35) Saksela, E.; Aula, P. y Cantell, K. Ann. Med. Exp. Fenn. 43:132 (1965).
- 36) Sandberg, A. A. y col. J. Nat. Cancer Inst. 45:615 (1970).
- 37) Johnson, R. T. y Rao, P. N. Nature 226:717 (1970).
- 38) Kato, H. y Sandberg, A. A. J. Nat. Cancer Inst. 40:165 (1968).
- 39) Das, N. K. J. Cell Biol. 15:121 (1962).
- 40) La Cour, L. F. Heredity, 6:163 (1953).
- 41) Henry, H. L.; Cohen, S. y Karzon, M. I. Cytogenetics 10:377 (1971).

42) Sandberg, A. A.; Masaharu, S. y Holdsworth, R. Cancer
29:1671 (1972).

43) Hungerford, D. A.; La Badie, G. U. y Balaban, G. Cytoge-
netics, 10:33 (1971).

44) Helson, L. Lancet, 1:1075 (1971).

OTRAS OBSERVACIONES REFERENTES A LA PULVERIZACION
CROMOSOMICA

En el capítulo precedente señalamos la presencia, en la línea de tumor de parótida estudiada, de solamente células mononucleadas total o parcialmente pulverizadas.

En otra línea tumoral humana, la línea KB proveniente de un carcinoma epidermoide de la boca que se mantiene en cultivo desde hace aproximadamente 15 años, observamos también células pulverizadas. En los cultivos de esta línea notamos células mononucleadas en las cuales el núcleo se halla completamente pulverizado (Fig. 1), otras también mononucleadas donde parte de los cromosomas están intactos (Fig. 2) y células binucleadas en las cuales uno de los componentes cromosómicos se halla en metafase y el otro totalmente dañado (Fig. 3 y 4).

La presencia de este último tipo de células coincide con las observaciones realizadas por los autores previamente citados, según las cuales sería una condición necesaria para la pulverización cromosómica que las células fueran binucleadas, hallándose uno de los núcleos en metafase y el otro- aquel que va a sufrir la alteración cromosómica- en interfase.

Sin embargo, el hecho de encontrar también células mononucleadas altamente pulverizadas es acorde con las observaciones realizadas en la línea de tumor de parótida. Ello nos induce a pensar que en las células mononucleadas pueda tal vez operar el mismo mecanismo que ocurriría en las células binucleadas. Es decir, de acuerdo a lo propuesto por Sandberg y col. (36), la maquinaria enzimática que

normalmente comenzaría a actuar al final de la metafase, disolviendo la membrana nuclear y otros componentes celulares, podría ser prematuramente desreprimida en las células interfásicas mononucleadas, atacando la membrana celular y provocando una condensación precoz y fragmentada de la cromatina. Este fenómeno podría resultar de alteraciones metabólicas espontáneas debidas a la vida celular "in vitro" o a la presencia de agentes tales como radiaciones o virus que pudieran actuar a nivel de los ácidos nucleicos, provocando la desrepresión de genes que controlen la producción de las enzimas que normalmente actúan durante la mitosis.



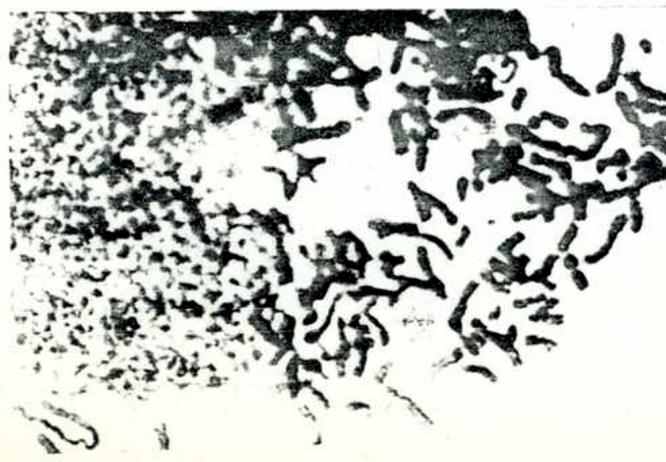
Fig. 1.- Célula mononucleada cuyos cromosomas están totalmente pulverizados. (1200 x)



Fig. 2.- Célula mononucleada donde parte de los cromosomas están pulverizados y otros intactos. (1200 x).



Figs. 3 y 4.- Células binucleadas. Uno de los núcleos está pulverizado y el otro en metafase. (1200 x).



MITOSIS Y CELULAS MULTINUCLEADAS EN CULTIVOS DE TUMORESOSEOS GIGANTO-CELULARES HUMANOS

El mecanismo de formación de las células multinucleadas ha sido investigado por diferentes autores pero con especial referencia a los denominados "policariocitos" y no a las células multinucleadas de origen tumoral.

Si bien estos estudios han descripto los hallazgos en cultivos de diferentes tipos celulares de células multinucleadas inducidas principalmente por virus fusionantes, o bien por sustancias químicas o radiaciones, así como las características de su formación, no se ha podido establecer aún un concepto definido a este respecto.

Por otra parte, en nuestra revisión, no hemos hallado mayores referencias sobre estudios de este mecanismo "in vitro", en células originadas en cultivos de tumores humanos.

Siendo el tumor de Células Gigantes (Osteoclastoma) y el Condrioblastoma benigno, tumores que se caracterizan por estar constituidos por células histiocitarias y células gigantes multinucleadas, nos pareció de interés efectuar un análisis del mecanismo de división observado "in vitro", en cultivos de este tipo de tumores de origen óseo, con especial referencia a este último tipo de células.

MATERIALES Y METODOS

El material fué obtenido en condiciones de esterilidad, de piezas quirúrgicas recién extirpadas, efectuándose los

cultivos inmediatamente después de haberlas recibido.

Se estudiaron 12 casos de tumores humanos de Células Gigantes y 2 Condrioblastomas benignos. Cada caso fué estudiado histopatológicamente con técnicas de rutina y especiales.

Método de cultivo de células. El material recibido fué cortado en múltiples fragmentos de $\frac{1}{2}$ a 1 mm, lavándolos varias veces en solución fisiológica. Estos fragmentos fueron en parte cultivados en coágulo plasmático, sobre cubreobjetos y colocados luego en tubos de Leighton a 37°C con medio sintético 199, 10% de suero humano y antibióticos en la proporción previamente citada para los anteriores cultivos.

Otra parte del material fué tripsinado, utilizando tripsina al 0,25% en solución salina de tampón fosfato, y cultivado en frascos Pyrex a 37°C. Los cultivos así obtenidos fueron repicados semanalmente a lo largo de un año.

Simultáneamente se efectuaron cultivos de órgano, utilizándose agar nutritivo - agar al 1,5% en partes iguales con medio 199 mas 10% de suero humano - o Hanks con 20% de suero humano en cápsulas de porcelana, rodeadas de algodón embebido en agua estéril a fin de mantener la humedad ambiente en el interior de cápsulas de Petri.

Técnicas histológicas y citológicas empleadas. Cada caso cultivado fué estudiado histológicamente. El material recibido fué fijado en formol al 10%, incluido en parafina y

los cortes obtenidos coloreados con Hematoxilina-Eosina. No se efectuó agregado de colchicina a ninguno de los cultivos ni tratamiento hipotónico. Se coloró con Hematoxilina-Eosina.

RESULTADOS

De los 14 casos cultivados - 12 osteoclastomas y 2 condroblastomas - se obtuvo crecimiento en todos ellos. Se efectuaron en el primer grupo 12 tubos de Leighton por caso con 3 explantos en cada tubo. Es decir, un total de 432 explantos de los cuales crecieron mas del 85%.

En el segundo grupo se efectuó también un total de 12 tubos por caso con 3 explantos cada uno, con un crecimiento del 80% sobre 72 explantos cultivados.

Los cultivos en coágulo plasmático evolucionaron favorablemente durante aproximadamente 25 días, mientras que los tripsinados perduraron durante mas de 6 meses. El tipo de crecimiento observado se componía de células mononucleadas, entre las que se hallaban numerosas binucleadas de aspecto histiocitario. (Fig. 1). También se observaron numerosas células gigantes multinucleadas que migraban del explanto, persistiendo 48 a 72 horas. A medida que desaparecían las células multinucleadas primarias, se observó una nueva generación de células gigantes neoformadas "in vitro", a la semana de iniciado el cultivo.

Las células mono y binucleadas presentaban núcleos de cro-

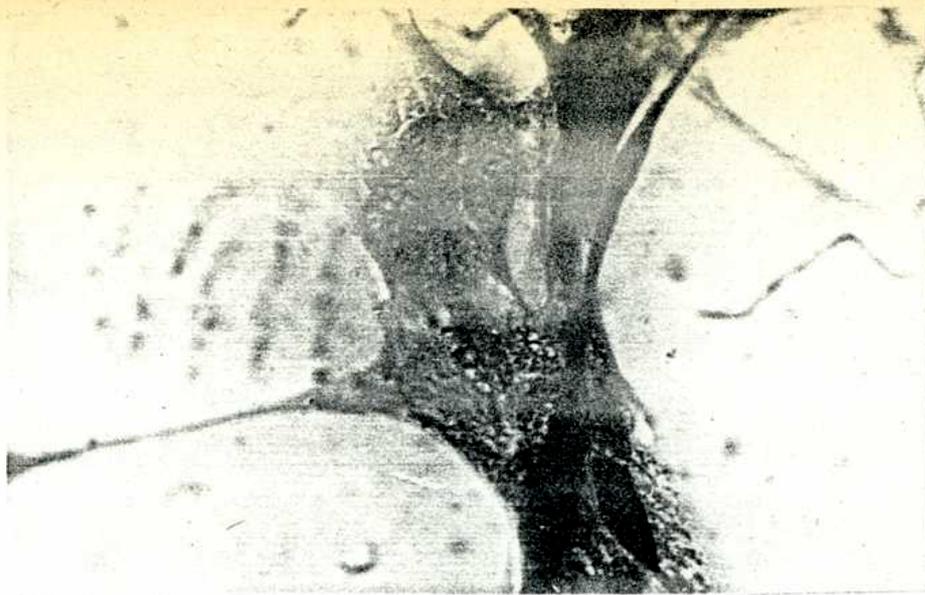
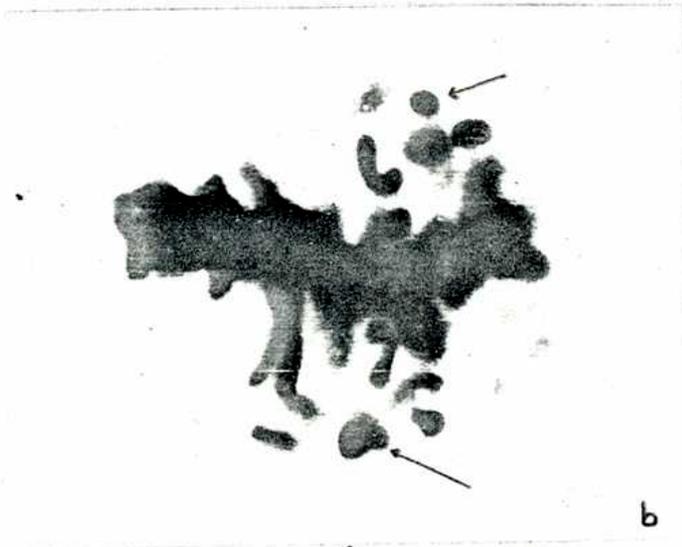
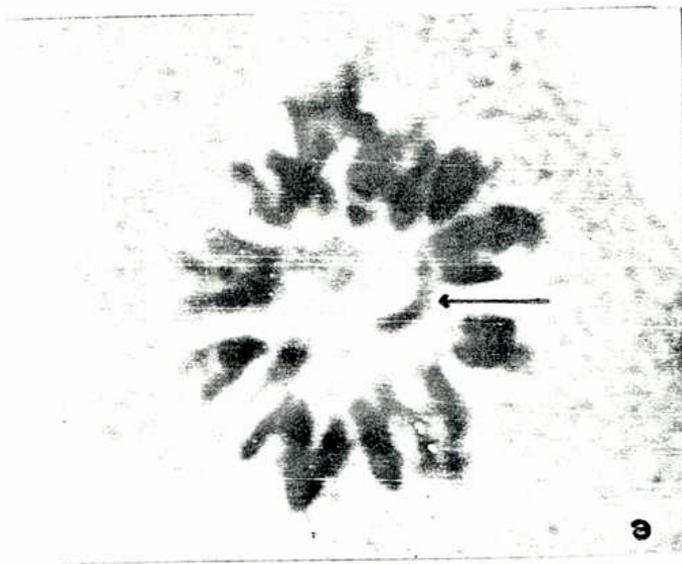


Fig. 1.- Tumor de células gigantes, 5to pasaje. Célula binucleada. (400 x).



Figs. 2a y 2b.- Metafases mitóticas. Presencia de cromosomas rezagados (flecha) (400 x).

matina finamente distribuída, dos o mas nucleolos y citoplasma amplio, finamente granular. Entre ellas se observaron numerosas mitosis de caracteres típicos en diferentes etapas de su evolución. También se hallaron anomalías mitóticas, tales como la presencia de cromosomas rezagados (Figs. 2a y 2b) de migración tardía en metafase.

Las células multinucleadas alcanzaban, en algunos casos, un diámetro aproximado de 300 μ , con 30 o mas núcleos (Fig.3). Se observó en algunos de los cultivos que estas células presentaban un activo movimiento de su membrana ondulante. En ocasiones, entre las células descritas, estaban presentes otras mononucleadas de gran tamaño, citoplasma y núcleo voluminoso, hasta nueve veces mas grande que los núcleos normales.

Analizando el tipo de mitosis halladas, además de las descritas en un párrafo anterior, se observaron numerosas configuraciones tripolares, tetrapolares y multipolares. Entre las mitosis tripolares, la mayoría presentaban un ordenamiento en Y. Los grupos de cromosomas en estas configuraciones eran generalmente de tamaño marcadamente desigual (Figs. 4a y 4b).

Las Figuras 5a y 5b muestran las anafases que siguen a este tipo de ordenamiento metafásico tripolar.

En algunas anafases tripolares se vieron dificultades en la separación de los cromosomas, lo que dió lugar a imágenes como la de la Figura 6a, donde se observa un retardo

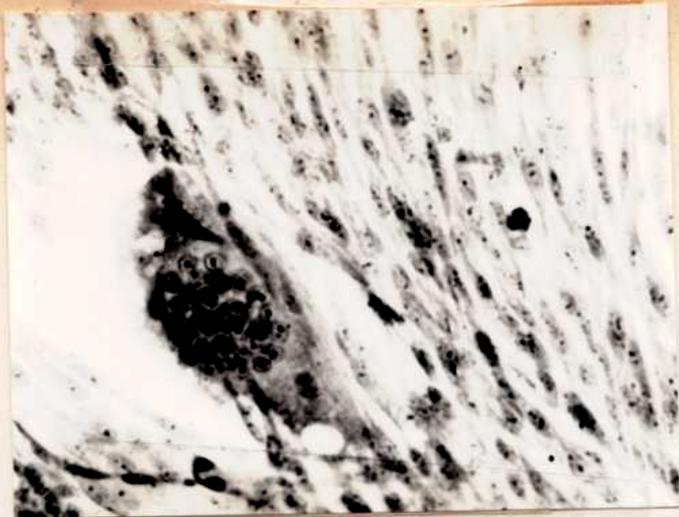
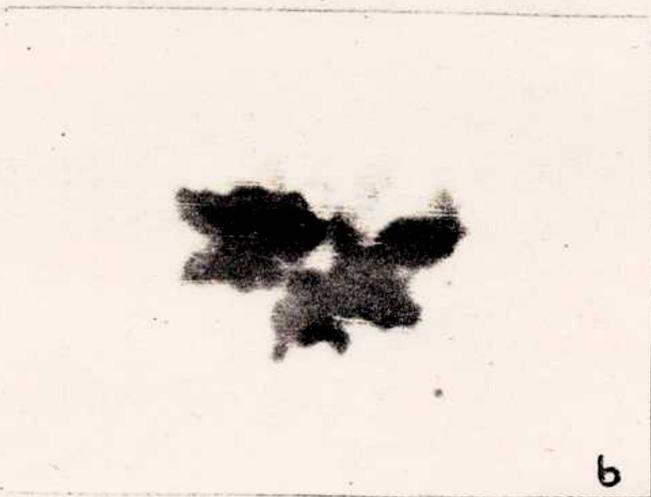


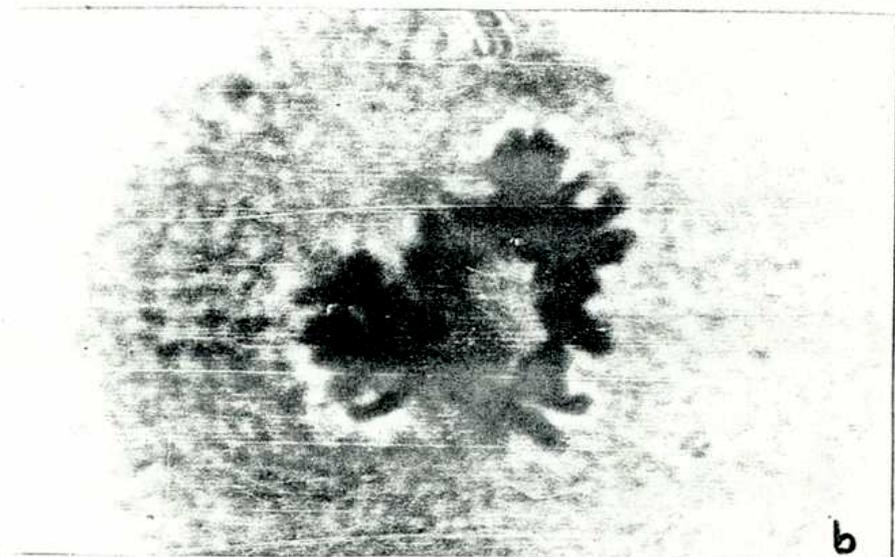
Fig. 3. - Células gigantes multinucleadas
, (400 x).



Figs. 4a y 4b. - Metafases tripolares. (400 x).



a



b

Figs. 5a y 5b. - Anafases tardías tripolares
(1200 x).

en la migración de los mismos hacia los tres polos. Fenómenos semejantes se observaron en anafases tetrapolares (Fig. 6b).

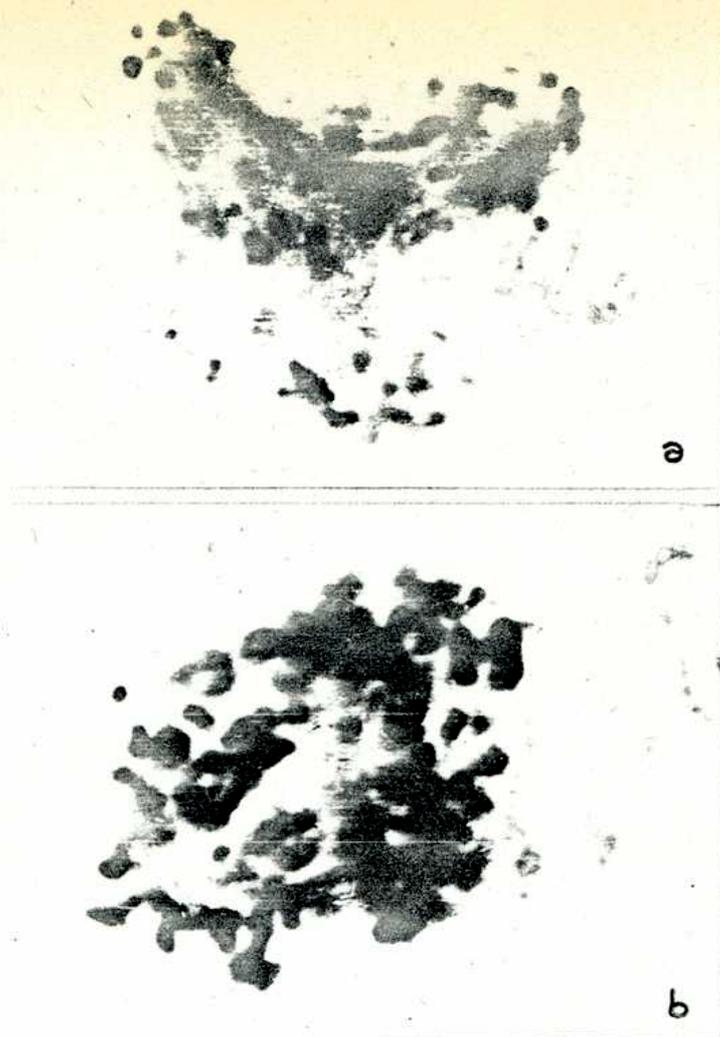
En las células normales en metafase, los cromosomas se orientan en el plano ecuatorial y aparecen como un único grupo cromosómico entre los dos polos. En algunos casos anormales, los cromosomas pueden orientarse a su vez entre los polos y alrededor de ellos, dando configuraciones como la de la Fig. 7. Esta orientación de los cromosomas se la denomina "metafase de tres grupos". (5).

Además de las configuraciones tripolares, se observaron otros ordenamientos cromosómicos más complejos, de tipo cuadripolar y multipolar. La Figura 8 muestra una mitosis cuadripolar, en una anafase temprana.

Las Figuras 9 y 10 representan metafases multipolares de aparentemente 5 grupos cromosómicos en forma de estrella. En algunas células binucleadas se vieron imágenes de mitosis sincronizadas, donde se observaban los dos núcleos en metafase. Otras células binucleadas, como la de la Fig. 11, presentaban, en cambio, un núcleo en interfase y el otro en mitosis.

DISCUSION

Las observaciones realizadas permiten afirmar que en los cultivos "in vitro" de osteoclastomas y de condroblastomas, las células mononucleadas son potencialmente capaces de formar una nueva generación de células gigantes. Es-



Figs. 6a y 6b - a) Anafase tripolar b) Anafase tetrapolar (1200 x).

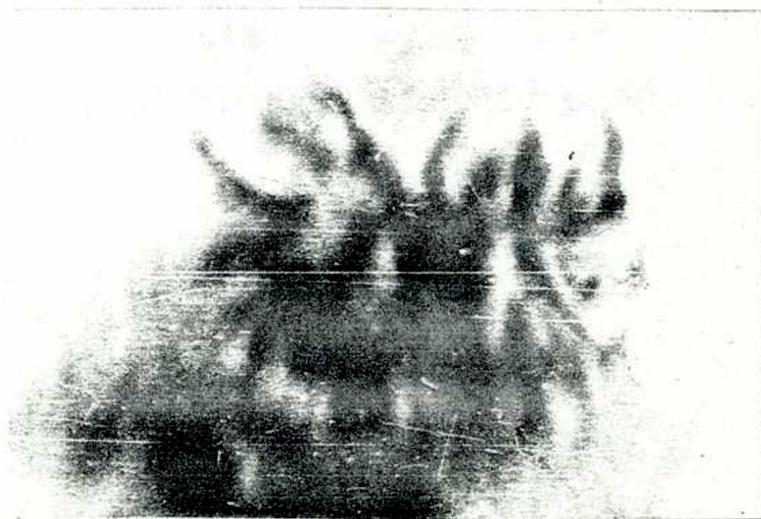


Fig. 7. -"Metafase de tres grupos", donde los cromosomas se disponen entre los polos y alrededor de ellos. (1200 x).

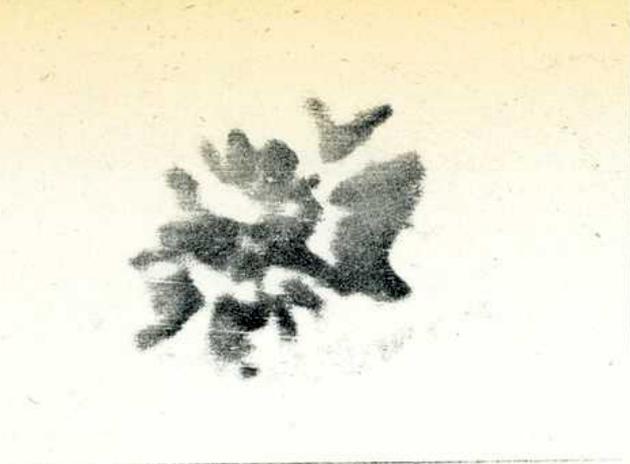


Fig. 8 - Anafase tetrapolar temprana (1200 x).

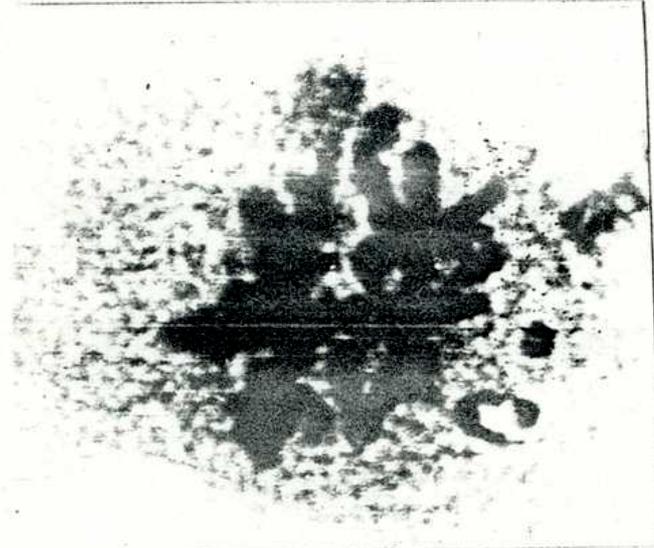


Fig. 9 y 10 - Metafases multipolares con disposición de los cromosomas en forma de estrella (1200 x).

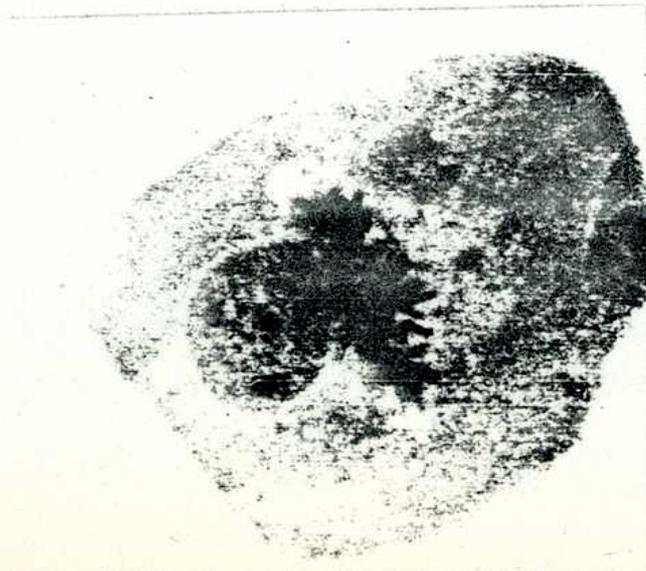


Fig. 11 - Célula binucleada. Un núcleo en división y el otro en interfase. (600 x).

te hecho coincide con previas experiencias de Gallardo y col (1).

Las imágenes de mitosis tri, tetra y multipolares descritas hablarían en favor de que uno de los mecanismos de formación de las células gigantes multinucleadas "in vitro" estaría basado en divisiones anormales.

Las mitosis multipolares son frecuentes en los tejidos malignos y son responsables de una distribución irregular de los cromosomas en varios núcleos. A menudo estas divisiones son incompletas y se forman puentes cromosómicos que mantienen unidos varios núcleos hijos en un citoplasma común.

De acuerdo a las experiencias de Oftebro (2), una célula binucleada en cultivo puede presentar imágenes multipolares, cuyo destino puede ser dar origen a varias células mononucleadas, parte de las cuales pueden fusionarse y constituir una multinucleada. Este mismo autor observó también configuraciones multipolares que se originaban en células pentanucleadas.

Toona (3), en estudios con técnica autorradiográfica de osteoclastos normales, concluye que las células multinucleadas se forman por fusión de células mononucleadas de la médula osea.

Thomison (4) ha observado el crecimiento de dos tipos de células multinucleadas. Uno de ellos, de menor tamaño y número de núcleos mas reducido, constituido por fusión de va-

rias células adyacentes. El otro tipo de células multinucleadas es de mayor tamaño, con numerosos núcleos y se originaría por la incorporación paulatina de las células mononucleadas vecinas hasta constituir un sincisio.

Gallardo y col (1) no descartan la posibilidad de que el proceso de incorporación de células adyacentes sea precedido por mitosis multipolares, constituyendo así un mecanismo combinado en la formación de las células gigantes de estos tumores.

las células binucleadas frecuentemente observadas en nuestros cultivos serían el resultado de mitosis incompletas, sin la formación de una membrana celular entre las células hijas. A partir de esas células binucleadas dos procesos podrían ocurrir:

- 1) En la siguiente mitosis los dos núcleos se dividen simultáneamente, compartiendo un plano ecuatorial común donde los dos complementos cromosómicos se mezclan. Las dos nuevas células resultantes contienen cada una dos veces el número diploide de cromosomas. La repetición de este proceso originaría las células gigantes mononucleadas donde el único núcleo de gran tamaño es altamente poliploide.
- 2) Los dos núcleos entrarían en división sincrónicamente, formándose configuraciones tri, tetra y multipolares y dando origen a células tri, tetra y multinucleadas. Estas células polinucleadas con un número bajo de núcleos podrían aumentarlo simultáneamente por división de los mis-

mos y por la fusión de células vecinas.

En una segunda etapa se formarían los sincisios con gran número de núcleos por una progresiva incorporación de células mononucleadas adyacentes. Este proceso concordaría con el activo movimiento de la membrana ondulante de las células gigantes.

El hecho de no observar en ninguno de los cultivos células multinucleadas donde los núcleos se hallen en mitosis apoyaría la idea de que en este segundo paso el crecimiento de las mismas se debería principalmente a la incorporación de células al sincisio mas que a la multiplicación de los núcleos existentes en el gran citoplasma común.

Es decir, de nuestra experiencia, podemos concluir que las células multinucleadas de estos tumores óseos se originarían por un doble mecanismo, mitótico y de incorporación de células mononucleadas a un sincisio.

Heneen y col (5)^{han} descrito imágenes comparables a las observadas en este trabajo en cultivos infectados por virus, especialmente del tipo del sarampión y de otros que inducen la fusión celular.

Esta similitud nos induce a pensar en la posibilidad de que un agente viral intervenga en el mecanismo de la formación de las células multinucleadas de origen tumoral, ya sea provocando la fusión celular o induciendo divisiones multipolares. La presencia de pulverizaciones cromo-

sómicas en algunos de los explantos, si bien relativamente poco frecuentes, también vincula estos cultivos a otros donde la infección viral produce este tipo de alteración cromosómica.

Resultados experimentales recientes hablarían en favor de la presencia de un agente viral oncogénico. Finkel y col (6), inoculando extractos de osteosarcomas humanos a hámsters recién nacidos, obtuvieron tumores en el 2% de los animales tratados. Estos autores señalan la presencia de partículas virales en osteosarcomas humanos y de hámster, si bien no excluyen la posibilidad de que esos virus fueran incidentales y no los agentes responsables de la aparición de tumores. El porcentaje de éstos es, además, demasiado bajo para ser realmente significativo. Sin embargo, los tumores óseos espontáneos en el hámster son raros y los resultados de los autores podrían indicar la presencia de un agente oncogénico en los osteosarcomas humanos capaz de producir osteosarcomas en el hámster.

Morton y col (7) probaron que un extracto acelular de un osteosarcoma humano en cultivo de tejidos - SA₂ - es capaz de producir la transformación morfológica y antigénica de fibroblastos embrionarios humanos "in vitro". Los mismos autores detectaron partículas virales del tipo A en tejidos provenientes de un osteosarcoma humano.

Otros hechos adicionales en favor de una etiología viral de los osteosarcomas es el simultáneo desarrollo de tu-

morens en tres miembros de una misma familia (8) y la simultánea ocurrencia de osteosarcomas en sitios múltiples de un mismo paciente. En 1966, Finkel y col (9) aislaron un virus que induce osteosarcomas en el ratón - virus FBJ - de características similares a los osteosarcomas humanos. Maunoury y col (10) y Mc Allister y col (11), quienes establecieron líneas celulares provenientes de osteosarcomas humanos no detectaron, sin embargo, ninguna partícula viral, tanto en el tejido tomado "in vivo" como en el cultivado "in vitro".

....

BIBLIOGRAFIA

- 1) Gallardo, H.; Lustig, E. S. de y Schajowicz, F. Oncology 24:146 (1970).
- 2) Oftcbro, R. Scand. L. Clin. Lab. Invest. 22 (Suppl. 106): 79 (1968).
- 3) Toona, F. Exptl. Cell Res. 52:34 (1968).
- 4) Thomison, J. B. Lab. Invest. 11:211 (1962).
- 5) Heneen, W. K. y col. Hereditas, 64:53 (1970).
- 6) Finkel, M. P.; Birute, O. y Farrcl, C. Radiology, 92:1546 (1969).
- 7) Morton, D. L.; Malmgren, R. A. y Hall, W. T. Surgery, 66: 152 (1969).
- 8) Roberts, C. W. y Roberts, C. P. J. Amer. Med. Ass. 105: 181 (1935).
- 9) Finkel, M. P.; Biskis, B. O.; y Jenkins, P. B. Science, 151:698 (1966).
- 10) Manoury, R.; Arnoult, J. y Vedrenne Cl. Path. BioE. 20: 369 (1972).
- 11) Mc Allister, R. M. y col. Cancer, 27:397 (1971).

ESTUDIO CIPOGENETICO DE UN NEUROBLASTOMA CANINO

Los trabajos de diversos autores (Makino, 1949; Matthey (1954; Awa y col., 1959; Moore y Lambert, 1963; Gustavsson 1964; Ford, 1965 y Gustavsson y Sundt, 1965) (1 - 7) confirmaron que el cariotipo del perro normal es de 78 cromosomas. (Fig. 1). Los cromosomas somáticos son acrocéntricos o telocéntricos y los sexuales submetacéntricos. Los cromosomas X son de gran tamaño, de longitud aproximadamente igual al par somático más largo. El Y es el más pequeño y generalmente de fácil identificación. Los estudios realizados en diferentes razas demostraron que no existen variaciones cualitativas dentro de la especie Canis familiaris.

Hasta el presente ha sido poco estudiada la citogenética de tumores en los perros. En los últimos años los estudios en este dominio se refirieron principalmente al sarcoma venéreo de Sticker y a la relación entre la presencia de un cariotipo alterado y las enfermedades cardiovasculares congénitas.

El estudio del tumor de Sticker llevado a cabo por diferentes autores muestra un resultado llamativamente constante en todos los casos: un número modal cercano a 59 conteniendo de 12 a 20 cromosomas metacéntricos (Weber y col., 1965; Barski y Cornefert-Jensen, 1966; Kakpakova y col., 1967 y Thorburn y col., 1968) (8-11). Este cariotipo anormal podría explicarse por la acción de un mecanismo de fusión céntrica de dos autosomas telocéntricos.

Shive y col., 1965 (12) en perros con defectos cardíacos congénitos y Hare y col., 1967 (13), en un perro con



Fig . Metafase de perro normal (φ). Las flechas indican los cromosomas x . Cultivo de riñon. Dibujo en cámara clara (1200x).

condroplasia ósea hallaron un cariotipo anormal de 77 cromosomas con un submetacéntrico supernumerario. Recientemente el mismo cariotipo fue citado por Ma y Gilmore, 1971 (14) en un perro fenotípica y clínicamente normal.

Como en el caso del tumor de Sticker, se sugiere que la formación de cromosomas anormales meta y submetacéntricos implicaría un mecanismo de fusión céntrica.

MATERIALES Y METODOS

El tejido cultivado proviene de una perra Cocker Spaniel de 8 años de edad. El diagnóstico indicó Neuroblastoma orbitario, tumor canino relativamente frecuente.

Los cultivos se efectuaron de las dos maneras previamente indicadas en el estudio de tumor de parótida, en explanto de pequeños fragmentos y por tripsinización del tejido. Las preparaciones cromosómicas se hicieron también de acuerdo a la técnica citada anteriormente.

RESULTADOS

Se observó una notable proporción de mitosis, aún en los cultivos primarios, muy superior a la observada en muchos tumores humanos en estudio en nuestro laboratorio. (Fig. 2). Los cultivos presentaron un aspecto homogéneo, de células fusiformes, predominantemente mononucleadas. (Fig. 3 y 4).

El estudio cromosómico se llevó a cabo en los cultivos primarios y los cuatro primeros pasajes in vitro. Fueron utilizadas 80 metafases en las cuales el recuento cromosómico reveló que la mayoría de ellas era hipodiploide.



Fig. 2. - Neuroblastoma canino. Mitosis en el cultivo primario. (600 x).



3)



4)

Fig. 3 y 4. - Aspecto del cultivo en el 2do pasaje. (600 x).

La variación más frecuente osciló entre 44-57 cromosomas por núcleo. Células aparentemente diploides normales y algunas altamente poliploides también fueron observadas, aunque en una proporción mucho menor que las hipodiploides.

La disminución del número total de cromosomas fue acompañada por un aumento del número de cromosomas meta y submetacéntricos de diferentes tamaños, variando estos entre 5 y 16. (Fig. 5a, 5b y 6). Se observó también una pérdida de cromosomas, de acuerdo al número de brazos de las células estudiadas, en general inferior a 80, que es el número de brazos cromosómicos o número fundamental en el perro normal. (76 cromosomas acrocéntricos + 2 cromosomas submetacéntricos = 80 brazos cromosómicos).

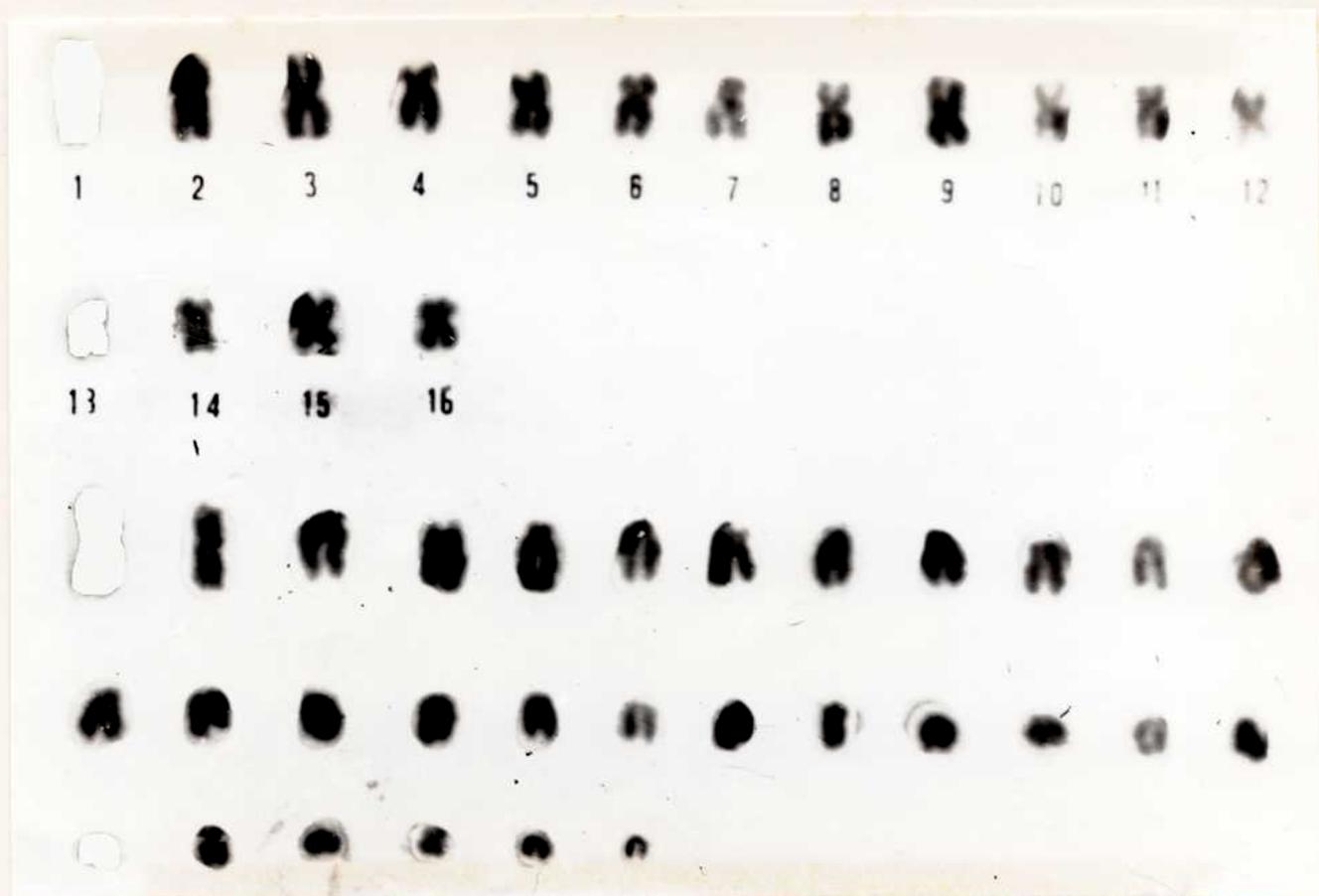
No se ha observado un cariotipo anormal que parezca predominar siendo amplias las fluctuaciones del número cromosómico total, del número de cromosomas de dos brazos presentes y del número fundamental. Estos valores están indicados en la tabla 1, correspondiendo a las 80 metafases estudiadas.

En la mayor parte de las mitosis en base a las cuales se confeccionaron cariotipos resultó fácil la identificación de uno solo de los cromosomas X. El segundo miembro de este par parece estar ausente o confundirse con los cromosomas submetacéntricos supernumerarios.

En el presente neuroblastoma no han sido observadas otras alteraciones cromosómicas frecuentemente citadas en tumores neurogénicos humanos y de otros animales, tales como los cromosomas "doble minuto" y las pulverizaciones. Estos fenómenos fueron observados por Levan y col. (15) en un neuroblastoma humano y por Mark (16-17) en gliomas de adultos.



a)



b)

Fig. 5. - a) Metafase y b) Idiograma de una célula de 46 cromosomas de los cuales 16 son de 2 brazos. (1500 x).

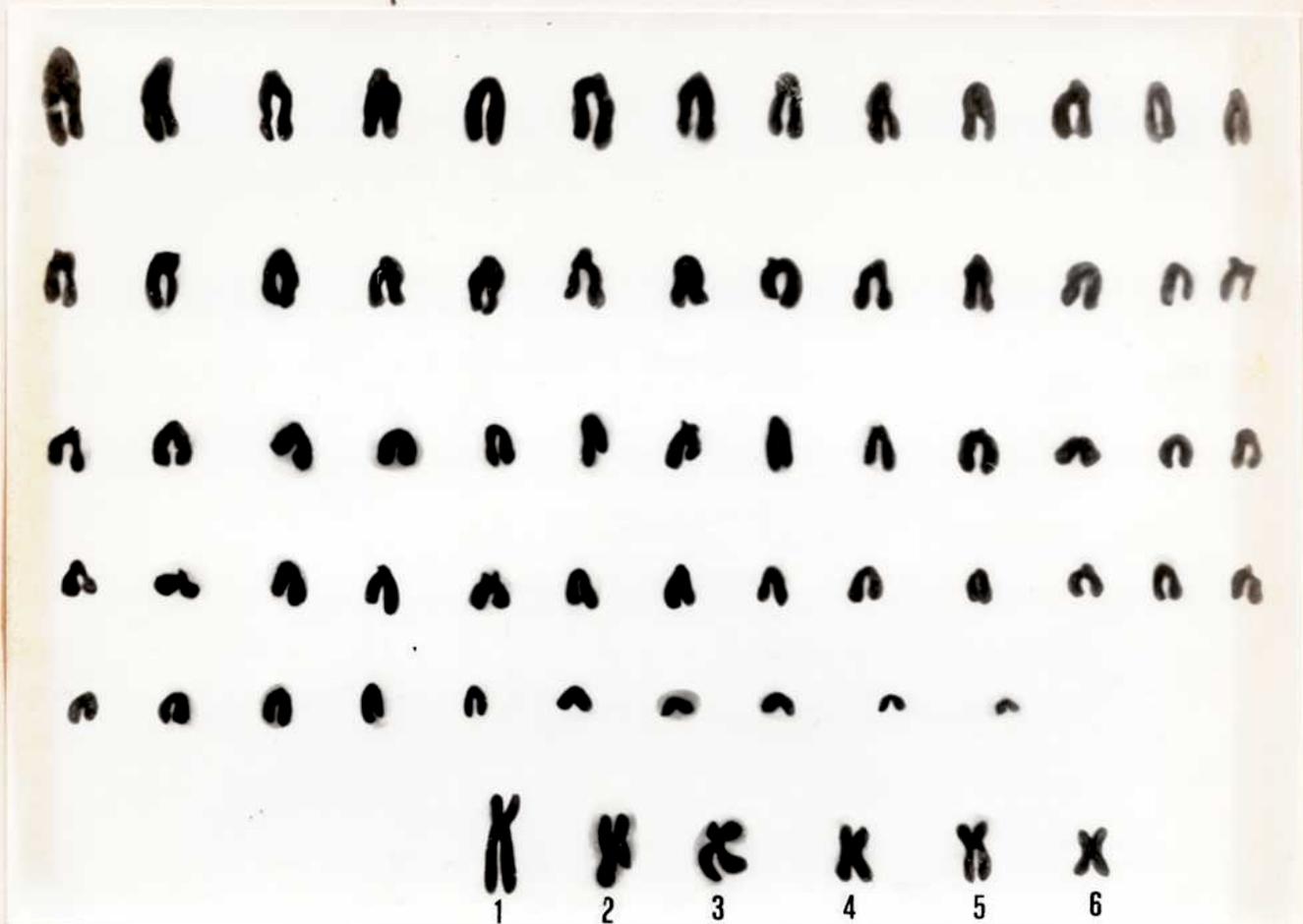


Fig. 6. - Idiograma de una célula de 68 cromosomas donde 6 son de 2 brazos (1500 x).

<u>Número de cromosomas</u>	<u>Número de cromosomas meta y submetacéntricos</u>	<u>Número Fundamental</u>	<u>Número de células</u>
78	2	80	9
75	2	77	4
74	2	76	3
72	2	74	2
70	2	72	5
70	3	73	2
68	6	74	6
61	12	73	3
57	11	68	1
56	8	64	2
56	9	65	3
55	9	64	6
53	6	59	3
50	9	59	4
48	9	57	2
48	10	58	3
47	6	53	2
47	7	54	5
47	10	57	4
46	14	60	6
46	16	62	3
44	11	55	1
44	13	57	1

TABLA 1: Número de cromosomas, de cromosomas meta y submetacéntricos y número fundamental en 80 metafases.

DISCUSION

Las observaciones realizadas en los cultivos primarios, 72 horas después de iniciado su crecimiento "in vitro" y en los 4 pasajes subsiguientes revelaron la presencia constante de cromosomas marcadores de dos brazos, cuyo número fue variable en las 80 metafases estudiadas.

La presencia de cromosomas submetacéntricos de diferentes tamaños sugiere que no serían el resultado de la endoreduplicación selectiva o de la no disyunción somática de los cromosomas X. Tampoco la existencia de cromosomas metacéntricos, ausentes en el cariotipo del perro normal, puede deberse a la acción de estos mecanismos.

El origen de estos cromosomas marcadores puede explicarse admitiendo un amplio reordenamiento cromosómico resultante de múltiples fusiones céntricas de tipo Roberstoniano. (18). La fusión de dos cromosomas telocéntricos daría origen a un cromosoma meta o submetacéntrico y la repetición de estas translocaciones a partir de un cariotipo normal conduciría a la aparición de los múltiples cromosomas marcadores observados.

La acción de un mecanismo de fusión céntrica explicaría también la reducción del número total de cromosomas en las células anormales y la disminución de cromosomas telocéntricos. Sin embargo, en este caso, la disminución del número total de cromosomas no parece guardar una relación estricta con el incremento de cromosomas meta y submetacéntricos, y ocurriría una pérdida real de cromosomas, eliminados durante mitosis anormales.

Pakes y col. (19) describieron la presencia de

cariotipos alterados en dos líneas de tumores caninos, donde se observaron cromosomas de dos brazos supernumerarios. En una línea celular proveniente de un perro con un linfosarcoma, Miles (20) halló un cariotipo estable de 43 44 cromosomas de los cuales aproximadamente 26 eran meta y submetacéntricos.

La fusión céntrica de dos cromosomas telocéntricos dando origen a un cromosoma a dos brazos, es uno de los mecanismos básicos en la alteración del cariotipo de los eucariotes. Este fenómeno es, en conjunción con otros procesos tales como el aislamiento geográfico, un paso frecuente en la formación de nuevas especies. Además de los trabajos citados, en los cuales la presencia de cromosomas anormales podría deberse a este mecanismo, en otros individuos normales de la familia Canidae se cita la existencia de un polimorfismo intraspecífico debido a fusiones céntricas. Tal el caso del Zorro azul-*Alopex lagopus* Lin (7).

Estos hechos sugieren que el fenómeno de fusión céntrica además de desempeñar un rol importante en la evolución del cariotipo de la familia Canidae, representaría una tendencia general en los reordenamientos cromosómicos de algunos tumores caninos.

- - - - -

BIBLIOGRAFIA

- 1) Makino, S. Jap. J. Zootch. Sci. 19:5 (1949).
- 2) Matthey, R. Mammalia, 18:225 (1954).
- 3) Awa, A.; Sasaki, M. y Takayama, S. Jap. J. Zool. 12:257 (1959).
- 4) Moore, W. y Lambert, P. D. J. Hered. 54:273 (1963).
- 5) Gustavsson, I. Hereditas, 51:187 (1964).
- 6) Ford, L. Stain Technol. 40:317 (1965).
- 7) Gustavsson, I. y Sundt, C. O. Hereditas, 54:248 (1965).
- 8) Weber, W. T.; Nowell, P. C. y Hare, W. C. D. J. Nat Cancer Inst. 35:537 (1965).
- 9) Barski, G. y Cornefert-Jensen, F. J. Nat. Cancer Inst. 37:787 (1966).
- 10) Kakpakova, E. S.; Pogosyanz, E. E. y Ponomarkov, V. I. Vop. Onkol. 14:43 (1968).
- 11) Thorburn, M. J.; y col. Brit. J. Cancer, 22:720 (1968).
- 12) Shive, R. J. y col. Cytogenetics, 4:340 (1965).
- 13) Hare, W. C. D. y col. Amer. J. Vet. Res. 28:583 (1967).
- 14) Ma, N. S. F. y Gilmore, C. E. Cytogenetics, 10:254 (1971).
- 15) Levan, A.; Manolov, G. y Clifford, P. J. Nat Cancer Inst. 41:1377 (1968).
- 16) Mark, J. y Granberg, I. Acta Neuropathol. 16:194 (1970).
- 17) Mark, J. Hereditas, 68:61 (1971).
- 18) Roberston, W. R. B. J. Morphol. 27:179 (1916).
- 19) Pakcs, S. P.; Griesemer, R. A. y Kasza, L. Amer. J. Vet. Res 26:837 (1965).
- 20) Miles, C. P. Comunicación personal al Dr. G. Barski.

HIBRIDACIÓN CELULAR SOMÁTICA ENTRE UNA LÍNEA TUMORAL
HUMANA Y UNA LÍNEA NORMAL DE RATÓN

INTRODUCCION

Actualmente se sabe que las células somáticas de los organismos superiores cultivadas "in vitro" son susceptibles, en determinados casos, de fusionarse. Esta fusión da lugar a la formación de nuevas células denominadas "híbridas". La hibridación celular somática fué descubierta por Barski y col en 1960 (1,2). Las células empleadas en la primera experiencia de hibridación celular somática pertenecían a las líneas NCTC 2472 y NCTC 2555, obtenidas en el laboratorio de Sandford a partir de un mismo clon de células normales de ratón C57 (3). Mantenidas en cultivo mediante pasajes seriados durante largo tiempo, las dos líneas divergieron, adquiriendo propiedades diferentes. Marcadamente distintos fueron su capacidad tumorigena, su morfología y el número y tipo de sus cromosomas. La línea NCTC 2472, denominada N₁, presentó un número modal de 55 cromosomas telocéntricos, siendo uno de ellos de gran tamaño, y un elevado poder tumorigeno. La línea NCTC 2555, también conocida como N₂, acusó un número modal de 62 cromosomas de los cuales 9 a 19 eran metacéntricos y los restantes telocéntricos. Su capacidad de producir tumores era muy inferior a la de la línea N₁.

Se efectuó un cultivo mixto de ambos tipos celulares y se

mantuvo durante varios meses a través de pasajes sucesivos. Al cabo del tercer mes en cocultivo se observó la aparición de un tercer tipo celular. Estas nuevas células, denominadas M, presentaban un número modal de 115 a 116 cromosomas, lo que correspondía aproximadamente a la suma de los cromosomas de N_1 y de N_2 . El análisis cariotípico de esas células reveló que los 11 cromosomas metacéntricos presentes correspondían a la línea N_2 y el largo telocéntrico a la línea N_1 . Las células M presentaron una ventaja selectiva respecto de ambas líneas parentales, lo que permitió aumentar progresivamente su número y aislarlas por clonación a partir del cultivo mixto.

Todos los clones M estudiados mostraban una serie de características comunes: 1) morfología similar, intermedia entre la de las células N_1 y la de la línea N_2 . 2) un cariotipo acumulativo de N_1 y N_2 con una tendencia sin embargo a un número cromosómico por debajo del valor aditivo. 3) un elevado poder tumorigeno del mismo orden que el de la línea N_1 .

La posibilidad de obtener células híbridas despertó inmediatamente el interés de varios investigadores que quisieron verificar en que medida este era un fenómeno general. Sorieul y Ephrussi (4) repitieron la experiencia de Barski y col y llegaron a los mismos resultados. Posteriormente los trabajos de Ephrussi y col (5,6) demostraron, en células de ratón, que era posible obtener

híbridos entre células tumorales y células normales, los cuales conservaban el carácter neoplásico del parental maligno. Mas tarde se logró la obtención de híbridos interespecíficos, resultado de la fusión de células de ratón y de rata (7,8), de ratón y de hámster (9,10), de células humanas y murinas (11).

Estos híbridos interespecíficos fueron posibles mediante la utilización de métodos selectivos que se discutirán en el curso de este trabajo.

El fenómeno de la hibridación celular somática - así denominado pues concierne a las células de la línea somática, por oposición a las células de la línea germinal - ha permitido el estudio de problemas fundamentales en la genética de las células de los vertebrados superiores.

Para estudiar la expresión simultánea de genes de los dos tipos de células parentales, es necesario utilizar líneas que posean al menos un marcador genético, es decir que un mismo carácter presente en ambas células parentales formas diferentes, lo que permitirá su identificación en el híbrido. Spencer y col utilizaron como marcadores los antígenos de histocompatibilidad del sistema H2 del ratón y demostraron que en los híbridos murinos los antígenos de transplatación eran codominantes, es decir que en el híbrido se expresan las características antigénicas de ambos parentales.

La utilización de marcadores enzimáticos en el ratón y

en la rata, tales como la lactodehidrogenasa y la β -glucuronidasa, evidenciaron que en los híbridos interespecíficos ratón-rata las dos isoenzimas estaban presentes en el híbrido. Esto indica que en este último se expresa una parte al menos de los genes de cada una de las líneas parentales (8).

El problema de la regulación de la transcripción de los genes y la relación entre la transcripción del ADN y la traducción de los ARN mensajeros en proteínas también fueron abordados mediante experiencias de hibridación. Se sabe que la mayor parte de las células altamente diferenciadas no se dividen. Harris y col (13,14) demostraron que el proceso de diferenciación no produce un paro irreversible de las funciones nucleares. Fusionando eritrocitos de pollo con células no diferenciadas se logró la reactivación de los núcleos de los primeros. Es decir, los eritrocitos de pollo conservan un núcleo "latente" que no sintetiza ningún material genético. Pero cuando esos núcleos se introducen en el citoplasma de una célula no diferenciada humana o murina, se reactivan y recomienzan las síntesis de ADN y ARN.

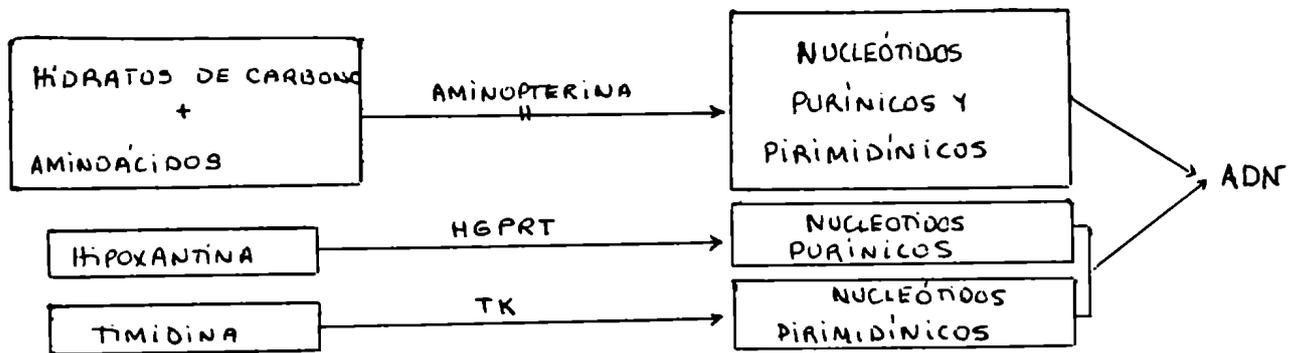
Otros aspectos estudiados mediante la hibridación celular somática han sido los factores que determinan la receptividad celular a las infecciones virales (15) y la activación de virus oncogénicos presentes en forma enmascarada en las células (16,17).

SISTEMAS SELECTIVOS Y SEMISELECTIVOS

En el curso de las primeras experiencias de hibridación celular somática la obtención de los híbridos resultó en algunos casos muy difícil, pues solo podían ser aislados aquellos que poseían una ventaja selectiva sobre las células parentales. Además el fenómeno de la fusión celular ocurre a una baja frecuencia y la proporción de híbridos formados en la población mixta es muy escasa.

En 1964, Littlefield perfeccionó un método que permitió salvar la dificultad del aislamiento de las células híbridas. Esto consistió en utilizar como líneas parentales células deficientes en ciertas enzimas que intervienen en la síntesis del ADN y como medio de cultivo un medio selectivo, llamado medio de Littlefield o medio HAT.

Se sabe que existen dos vías de síntesis del ADN celular. Por un lado las células efectúan la síntesis "de novo" de los nucleótidos purínicos y pirimidínicos a partir de los hidratos de carbono y de los aminoácidos. También pueden utilizar para la síntesis del ADN precursores tales como la timidina y la hipoxantina, debido a la presencia en las células de las enzimas timidina quinasa (TK) e hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa (HGPRT). El esquema que sigue muestra estos mecanismos.



Las células normales sintetizan a la vez la TK y la HGPRT. A partir de células normales se pueden aislar otras deficientes en una u otra de estas enzimas. Las células deficientes en timidina-quinasa - llamadas TK^- sintetizan normalmente la HGPRT, y las carentes de ésta última - llamadas $HGPRT^-$ sintetizan la timidina-quinasa. Una célula híbrida resultante de la fusión de una célula $HGPRT^-$ y de otra TK^- sintetiza las dos enzimas.

En un medio de cultivo que contenga un inhibidor de la síntesis "de novo" del ADN, tal como la aminopterina, ninguna célula puede multiplicarse. Pero si además de la aminopterina se añaden timidina e hipoxantina las células normales que poseen las enzimas TK y HGPRT necesarias para la utilización de estos precursores pueden multiplicarse, así como los híbridos $TK^- \times HGPRT^-$. En cambio, las células parentales TK^- y $HGPRT^-$ no pueden dividirse.. Ese medio adicionado con hipoxantina, aminopterina y timidina es el medio de Littlefield o HAT. El sistema semiselectivo perfeccionado por Davidson y Ephrussi (20). en 1965 consiste en una modificación

del sistema de Littlefield. Se utiliza cuando uno de los tipos de células parentales es normal, o sea que no presenta ninguna deficiencia enzimática y el otro es TK⁻ o HGPRT⁻. En el medio HAT las células parentales TK⁻ y HGPRT⁻ son contraseleccionadas y el híbrido se multiplica. En el medio semiselectivo solo es eliminado el parental deficiente. Partiendo de un cultivo mixto donde las células normales se hallen en número reducido, las colonias híbridas pueden generalmente reconocerse por su morfología y ser aisladas.

La ventaja de este método sobre el anterior reside en que permite la utilización de células normales, lo que constituye una facilitación de orden técnico y aumenta considerablemente el número de combinaciones que pueden efectuarse.

MATERIALES Y METODOS

Líneas parentales: Las células de ratón pertenecen a la línea 3T3-4E (TK⁻) deficiente en timidina-quinasa y resistente a 30 g de BUDR/ml (5-Bromodeoxiuridina) (21, 22). Estas células presentan un número modal de 66 cromosomas - 62 a 70- todos telocéntricos. (Fig.1).

Antes de iniciar la hibridación esta línea fué inoculada en el hámster Sirio dorado no dando lugar a la producción de tumores.

La línea celular humana es la SA₄ (HGPRT⁻) deficiente

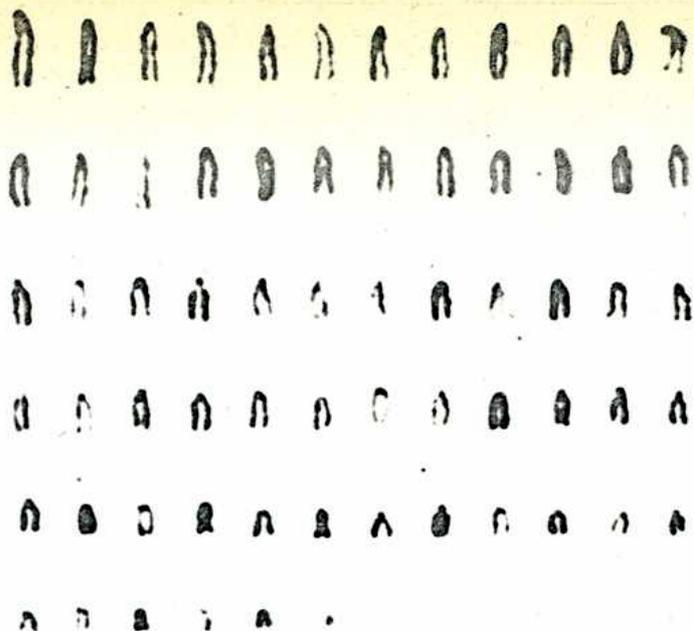


Fig. 1. - Idiograma correspondiente a una célula de la línea 3T3-4E de 66 cromosomas. (1200 x).

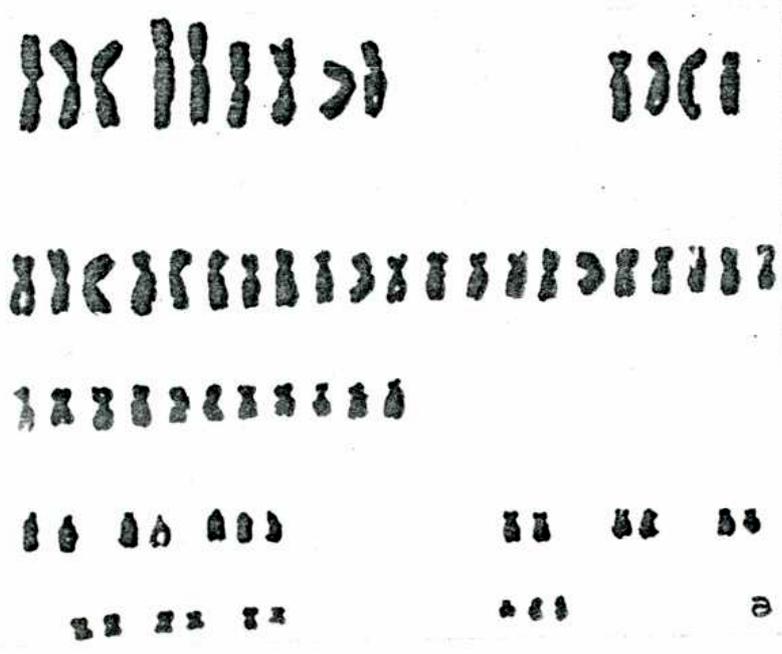


Fig. 2. - Idiogramas de 2 células de la línea SA₄. a) 67 cromosomas. b) 61 cromosomas. (1200 x)

en hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa y resistencia a 3 μ g/ml de 8-Azaguanina. Proviene de un liposarcoma y fué establecida por el Dr D. L. Morton (23). Presenta un número modal de 61 - 60 a 67 - cromosomas, con la siguiente distribución de acuerdo a la clasificación de Denver:

Grupo A: 9 (8-10) cromosomas
 Grupo B: 4 (4-7) cromosomas
 Grupo C: 20 (15-32) cromosomas
 Grupo D: 9 (7-11) cromosomas
 Grupo E: 11 (6-11) cromosomas
 Grupo F: 4 (4-9) cromosomas
 Grupo G: 4 (2-5) cromosomas (Figs. 2a y 2b)

Durante los primeros pasajes después de iniciado el cultivo el estudio de estas células mediante el microscopio electrónico reveló la presencia de partículas virales del tipo C, morfológicamente similares a los virus de los sarcomas murinos y aviarios (23). Asimismo, los test de inmunofluorescencia evidenciaron un antígeno tumoral capaz de reaccionar con los anticuerpos del suero del paciente del cual provenía el material cultivado.

En posteriores pasajes el cultivo no reveló más partículas virales, si bien continuó presente el antígeno tumoral característico previamente detectado. No se sabe si las células perdieron completamente las partículas virales o si el genoma viral persiste en ellas pero habiendo perdido su capacidad de producir virus completos.

Las células parentales fueron cultivadas en medio sintético 199 suplementado con 10% de suero fetal bovino. Para el mantenimiento de la línea 3T3-4E (TK⁻) se agrega-

ron 30 μ g de BUdR/ml de medio y en el caso de las células SA₄ (HGPRT⁻), 3 μ g de 8-Azaguanina/ml. Las dosis de antibióticos en ambos cultivos fué de 100 μ g/ml de estreptomocina y 100 U/ml de penicilina.

Previamente a la experiencia de hibridación las células fueron examinadas con microscopía electrónica. El resultado de este estudio demostró la ausencia de partículas virales del tipo C en ambas líneas.

Las figuras 3a y 3b muestran el aspecto morfológico de los cultivos parentales al iniciarse la hibridación. Nótese las células alargadas, típicamente del tipo "fibroblástico" de la línea 3T3-4E y el aspecto "epitelióide" y el crecimiento agrupado de las células SA₄.

Inducción a la fusión celular: El virus actualmente mas utilizado en las experiencias de hibridación celular es el virus de Sendai, un mixovirus del grupo de los parainfluenza. La técnica original de su utilización, descrita por Okada (24) consiste en la inducción de la fusión mediante el virus inactivado por la radiación ultravioleta, pues el virus induce la fusión de las células aún cuando sus ácidos nucleicos han sido destruidos. La envoltura viral es el componente de capacidad fusionante.

En la experiencia de hibridación de las células 3T3-4E y SA₄, cultivos mixtos de 1×10^6 células de ambas líneas fueron incubados a 37°C con 800 unidades hemaglutinantes (HAU) de virus de Sendai inactivado con radiación ultravioleta.

Fig. 3.- Morfología de lo
cultivos parentales y de
los híbridos. (450 x).

a) Línea humana SA₄.



b) Línea de ratón 3T3-4E



c) Hy-1 en el 6to pasaje.



d) Cultivo de un tumor ob-
tenido por heterotrans-
plante de células del hí-
brido Hy-1.

Las suspensiones mixtas, efectuadas en medio de cultivo sin suero, fueron mantenidas a 4°C durante 10 minutos para permitir la acción viral. Luego fueron lavadas tres veces con medio mínimo 199. La fusión se realizó en cápsulas de Petri plásticas de 10 cm de diámetro, conteniendo 7 ml de medio. Una vez lavadas las células, se agregó medio mínimo, que fué reemplazado por medio HAT al cabo de 24 hs. Este último fué renovado dos veces por semana.

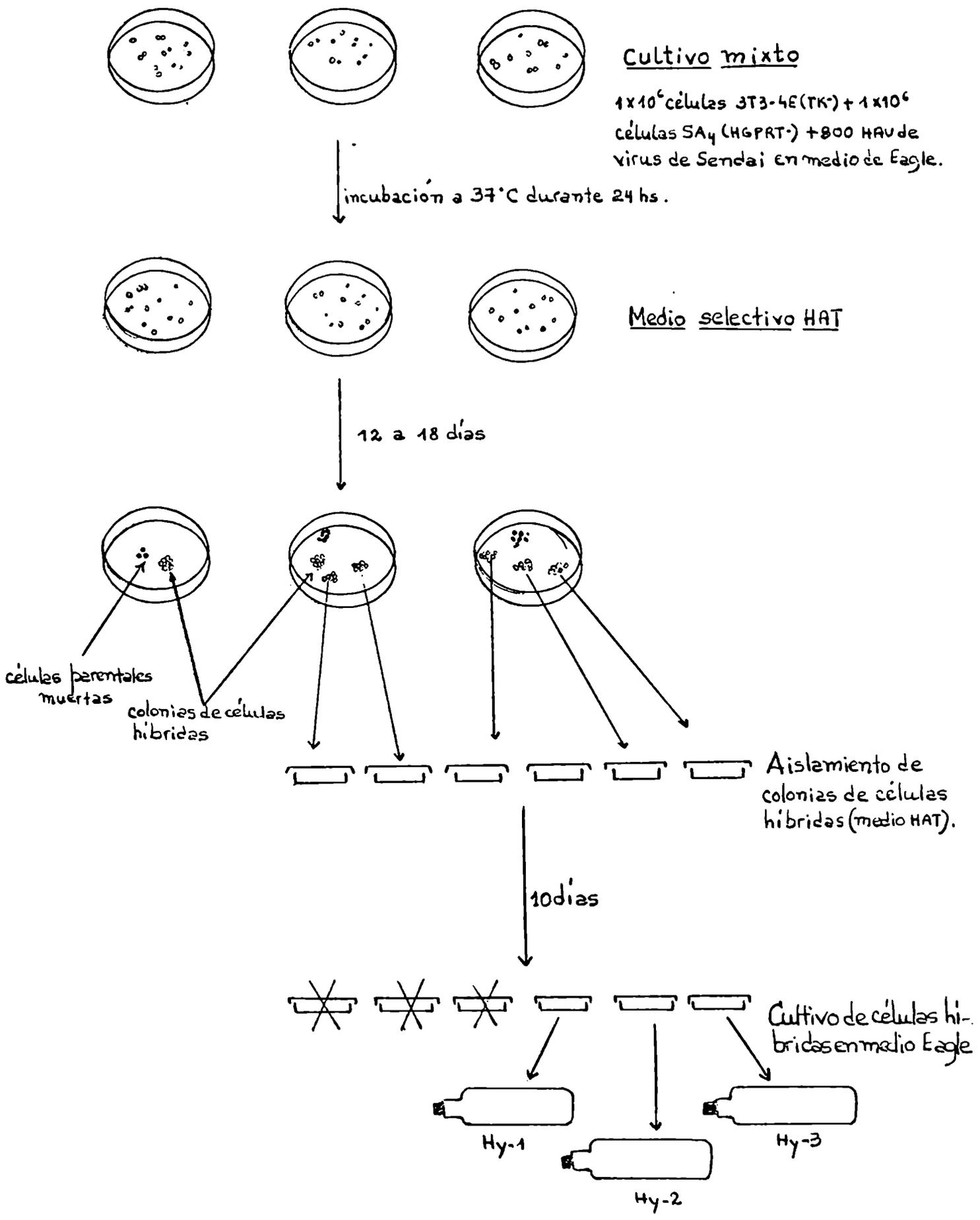
Al cabo de 15-18 días de mantenimiento en medio selectivo, se observó el crecimiento de colonias híbridas en dos de las cápsulas. La frecuencia de obtención de colonias fué de una por 1×10^3 células parentales aproximadamente.

Se aislaron 6 colonias, a razón de 3 por cápsula, mediante una pipeta capilar Fasteur y fueron transferidas a 6 cápsulas plásticas de 3 cm de diámetro con 1,5 ml de medio HAT. Al cabo de 10 días el cultivo fué confluyente en 3 de las cápsulas y las células fueron transferidas a botellas de cultivo de vidrio Pyrex de 200 ml. A partir de este momento los cultivos se continuaron en medio mínimo 199 suplementado con 15% de suero fetal bovino y antibióticos. Este procedimiento se esquematiza en la Fig. 4.

Los tres clones híbridos así aislados fueron denominados Hy-1, Hy-2 y Hy-3.

La Fig. 3c muestra la morfología del clon Hy-1 en el 6to pasaje en medio mínimo, intermedia a la de las células parentales.

Fig.-4.



Test de la malignidad por heterotransplante. El carácter maligno o no maligno de las células parentales y de los híbridos fué probado por heterotransplante de las células en cultivo en las bolsas yugales del hámster Sirio dorado. Los animales fueron tratados una vez por semana con 0,13 ml/hámster de acetato de cortisona (Cortisona Roussel).

Se efectuaron lotes de 8 animales:

Lote 1: 1×10^6 células de la línea SA₄.

Lote 2: 1×10^6 células de la línea 3T3-4E.

Lote 3: Se inocularon 1×10^6 células del híbrido Hy-1 en el 27avo pasaje.

Lote 4: 1×10^6 del híbrido Hy-2 en el 29avo pasaje.

Lote 5: 1×10^6 células del híbrido Hy-3 en el pasaje 27.

Test XC para la detección de partículas virales del tipo C.

La línea celular XC proviene de un tumor de rata inducido por un virus de sarcoma aviario (26). Fué obtenida del laboratorio del Dr W. P. Rowe (National Institute of Health Bethesda, Md, USA). y mantenida mediante pasajes seriados en medio esencial mínimo. Se caracteriza por desarrollar policariocitos cuando es cocultivada con células portadoras de partículas virales del tipo C. Es actualmente un test de gran valor para la detección de estos virus.

Las células XC fueron cultivadas en tubos de Leighton, a razón de 1×10^5 células por tubo. Entre 24 y 48 horas después, según el crecimiento de las monocapas, se añadieron

las células a testar, a razón de 1×10^5 células por tubo. Los cocultivos se mantuvieron a 37°C y fueron controlados 24, 48 y 72 horas después de efectuados. Según los casos la fijación y coloración (Giemsa) se llevó a cabo a las 48 y 72 horas de cocultivo.

Las células cultivadas conjuntamente con la línea XC fueron las parentales 3T3-4E y SA₄ y los híbridos Hy-1, Hy-2 y Hy-3 en el 6to pasaje en medio mínimo y en los subcultivos 26, 28 y 26 respectivamente. Como línea de control se utilizó la N₁, citada en la introducción, la que da sistemáticamente respuesta positiva a este test por estar crónicamente infectada con partículas C.

RESULTADOS

Análisis cariológico de los híbridos. El estudio de las células parentales 3T3-4E y SA₄ indicó la siguiente composición cromosómica:

<u>3T3-4E</u>	<u>SA₄</u>	}	48 cromosomas a 2 brazos.
66 cromosomas telocéntricos	61 cromosomas		13 acrocéntricos.

De donde un híbrido ideal con la participación de los complementos cromosómicos completos de ambos parentales sería:

SA ₄	3T3-4E	127 crom.	}	79 acrocéntricos y telocéntricos
				48 (SA ₄) cromosomas de 2 brazos

Al cabo de 4 pasajes en medio mínimo 199, 56 días después de iniciada la hibridación, se efectuó el primer examen cariológico de los híbridos Hy-1, Hy-2 y Hy-3, analizándose un total de 52 metafases.

En los tres grupos de células estudiadas se hallaron números cromosómicos totales entre 102-116, con un número de cromosomas de dos brazos variable entre 25-33 (Tabla 1 y Fig. 5).

Los valores medios comprendidos entre 107,66 y 109,35 para el número total de cromosomas indican que la composición de los híbridos difiere en aproximadamente 20 cromosomas de un híbrido ideal de 127 donde todos los cromosomas de las dos células parentales estuvieran presentes.

La presencia de en general 78-81 cromosomas acrocéntricos y telocéntricos - 79 en un híbrido ideal - y de aproximadamente 28 cromosomas de dos brazos - 48 en el híbrido ideal - indica una pérdida de cromosomas de éste último tipo.

Las Figs. 6, 7 y 8 muestran los idiogramas correspondientes a 3 metafases de los híbridos Hy-1, Hy-2 y Hy-3 en el 4to pasaje.

La ausencia de cromosomas de dos brazos en las células parentales de ratón nos permite ubicar a los mismos hallados en los híbridos como de origen humano. No es posible, en cambio, diferenciar los cromosomas humanos acrocéntricos de los grupos D y G de los cromosomas murinos.

Tabla 1

células examinadas	Hy-1		Hy-2		Hy-3	
	NTC	C2B	NTC	C2B	NTC	C2B
1	103	31	105	25	110	28
2	105	30	109	30	105	25
3	110	28	115	32	111	27
4	105	32	110	28	103	24
5	106	25	115	29	116	32
6	105	25	103	25	105	26
7	115	29	106	26	110	28
8	103	26	110	25	104	25
9	108	28	112	26	102	25
10	105	26	110	29	115	28
11	110	31	106	28	106	25
12	105	28	105	25	111	27
13	114	33	108	26	105	25
14	106	29	114	31	115	31
15	115	31	116	33	110	32
16			109	30	114	32
17			105	28	108	28
18					115	32
19					106	25
20					116	28
valores extremos	103-115	25-33	103-116	25-33	102-116	24-32
Medias	107,66	28,80	109,00	28,00	109,35	27,65

Composición cromosómica de los híbridos Hy-1, Hy-2 y Hy-3 en el 4^{to} pasaje en medio mínimo de Eagle a los 56 días de cultivo.

n° de células examinadas

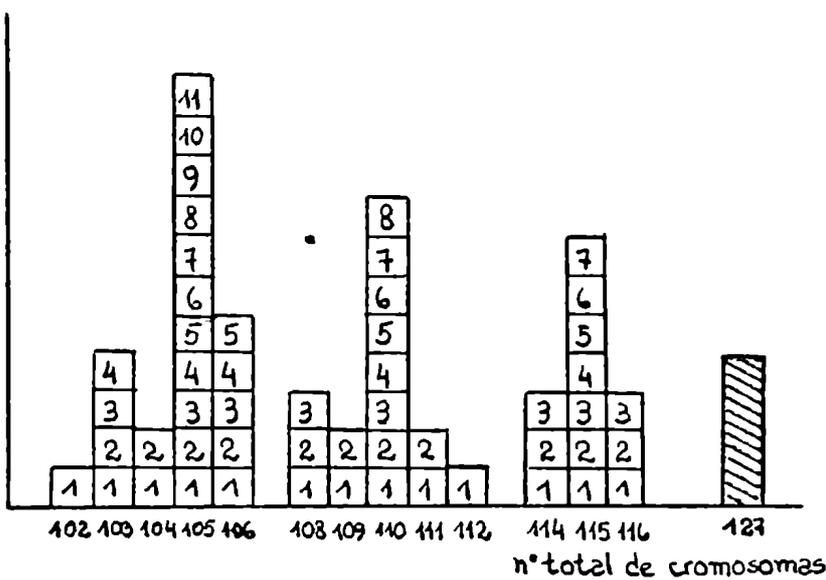
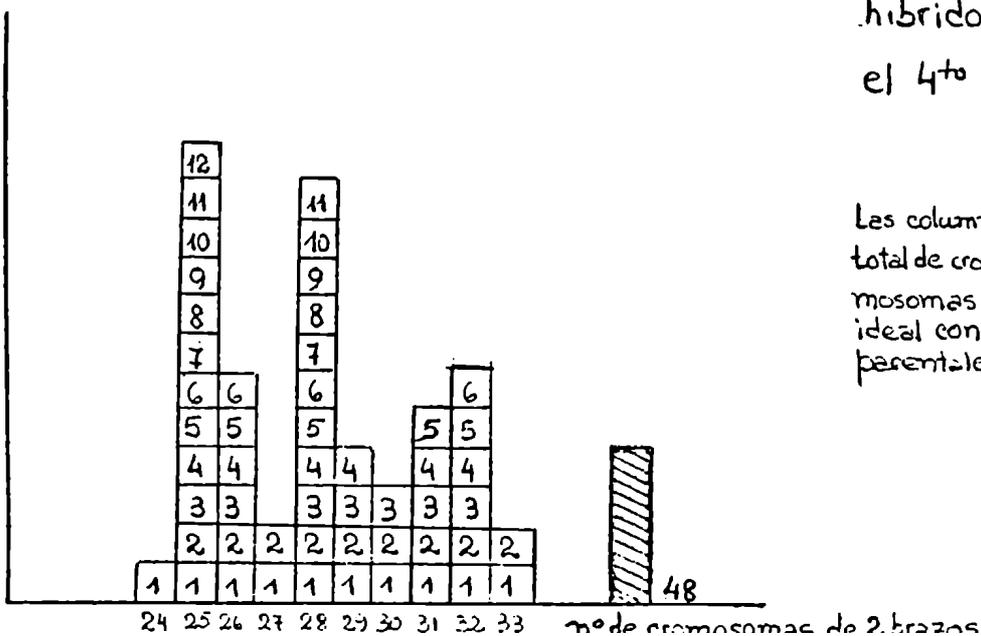


Fig. 5-

Histogramas del número total de cromosomas y número de cromosomas de 2 brazos de los híbridos Hy-1, Hy-2 y Hy-3 en el 4^{to} pasaje.

n° de células examinadas



Las columnas indican el número total de cromosomas y el número de cromosomas de 2 brazos en un híbrido ideal con 2 dotaciones cromosómicas parentales completos.

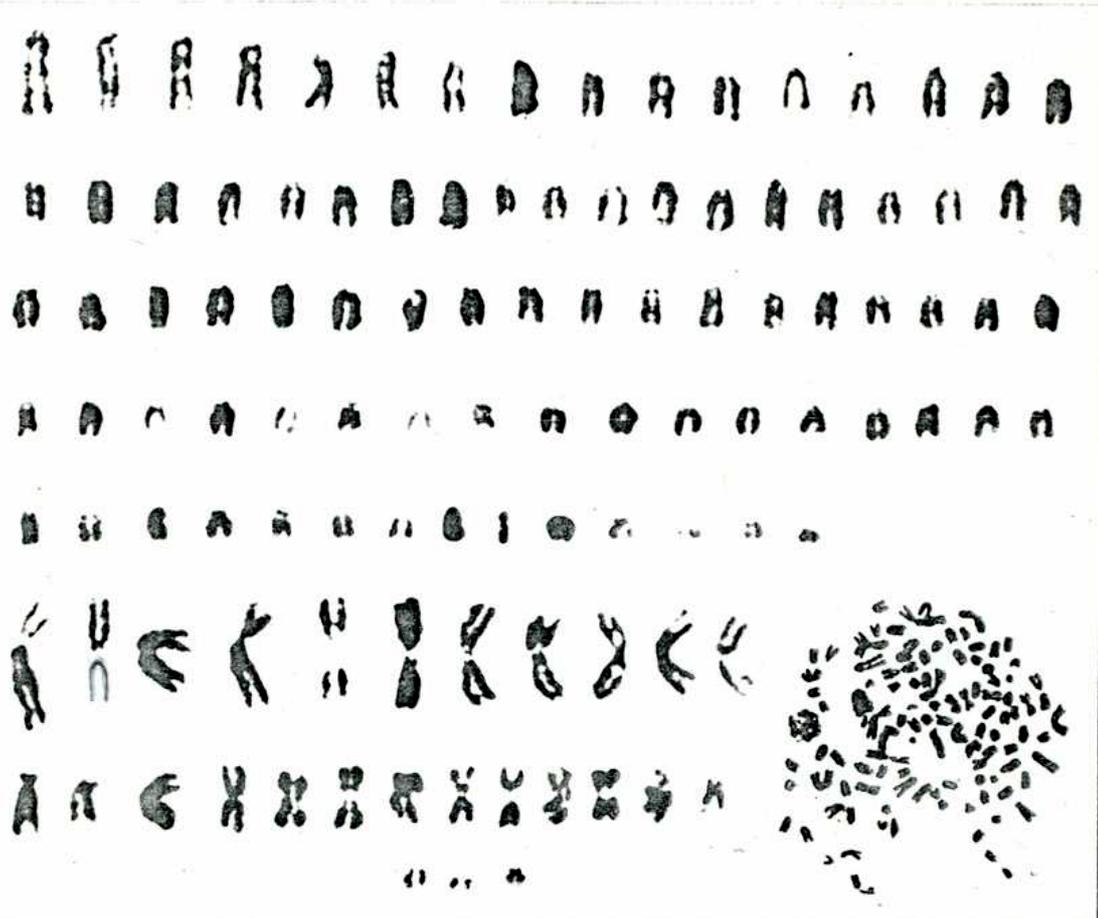


Fig. 8. - Célula híbrida Hy-3 de 111 cromosomas, donde 27 son humanos. 4to pasaje. (1200 x).

Es decir, en este primer estudio de los híbridos se observa la permanencia de aproximadamente un 100% de los cromosomas de ratón y humanos acrocéntricos y la pérdida de un 41,67% de los cromosomas humanos meta y submetacéntricos. Posteriores estudios cromosómicos se efectuaron en los 3 grupos de híbridos en los siguientes pasajes:

- 1) Hy-1, en los subcultivos 25, 30, y 35, a los 182, 207 y 232 días de iniciada la hibridación.
- 2) Hy-2, en los pasajes 25, 31 y 35, a los 182, 212 y 232 días de cultivo.
- 3) Hy-3, en los subcultivos 27, 32 y 36, a los 188, 216 y 237 de cultivo.

En los 3 grupos de híbridos se observaron números cromosómicos totales de entre 51-62 cromosomas que se mantuvieron sin variaciones remarcables entre un pasaje y otro.

Híbrido Hy-1: (Figs. 9a y 9b.) El número total de cromosomas presentó, en los pasajes 25, 30 y 35, valores medios de 55,13, 57,30 y 56,14 respectivamente. Los valores medios de los cromosomas de dos brazos fueron de 9,27 8,13 y 7,14 (Tabla 2a).

Es decir, a lo largo de 10 pasajes - entre el número 25 y el número 35 - y de 50 días de intervalo entre los subcultivos 25 y 35, no se produjeron pérdidas considerables del número total de cromosomas ni una eliminación tampoco importante de cromosomas de dos brazos.

La ^{Tabla 3}~~Fig. 10~~ muestra los histogramas de los valores repre-

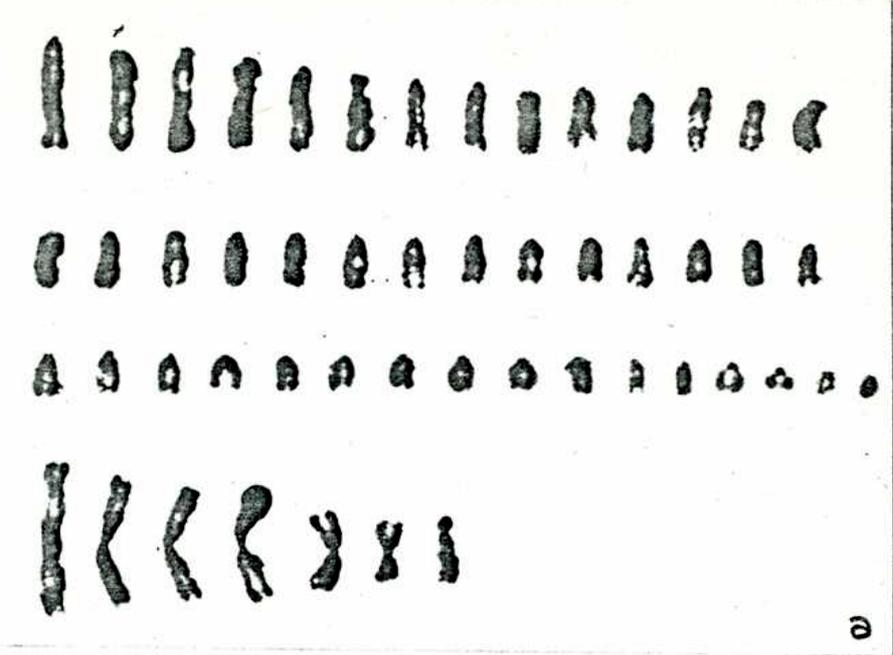


Fig. 9. - Idiogramas de células híbridas Hy-1. a) en el pasaje n° 25, 51 cromosomas donde 7 son humanos. b) en el pasaje n° 35, 57 cromosomas donde 7 son humanos. (1200 x).

Células enumeradas	Pasaje n: 25		Pasaje n: 30		Pasaje n: 35	
	NTC	C2B	NTC	C2B	NTC	C2B
1	56	10	56	7	58	8
2	54	9	58	8	57	7
3	57	10	60	9	58	7
4	51	7	58	9	60	10
5	60	12	60	10	51	6
6	55	9	59	10	50	6
7	60	10	60	10	58	7
8	57	10	51	7	60	10
9	60	12	55	6	57	8
10	54	8	57	7	60	9
11	55	8	55	7	58	8
12	51	7	60	9	54	9
13	53	8	56	7	58	8
14	57	9	55	7	55	7
15	58	10	58	9	60	9
Valores extremos	51-60	7-12	51-60	6-10	50-60	6-10
Medias	55,13	9,27	57,30	8,13	56,14	7,14

a)

Hibrido Hy-1 en los pasajes número 25, 30 y 35 a los 182, 207 y 232 días después de la fusión.

NTC: n: total de cromosomas.

C2B: n: de cromosomas de 2 brazos.

Células enumeradas	Pasaje n: 25		Pasaje n: 31		Pasaje n: 35	
	NTC	C2B	NTC	C2B	NTC	C2B
1	61	12	59	10	60	14
2	60	12	53	8	55	12
3	51	14	54	12	58	12
4	55	14	52	14	62	14
5	59	13	56	15	52	10
6	51	15	55	14	51	10
7	60	17	51	12	55	12
8	55	10	51	14	51	10
9	58	15	58	15	58	15
10	52	10	60	16	52	12
11	55	14	55	14	56	15
12	56	15	62	15	58	15
13			58	13	51	10
14			55	10	56	12
15			56	14	58	12
Valores extremos	51-61	10-17	51-62	8-16	51-62	10-15
Medias	56,08	13,41	55,10	13,06	55,53	12,33

b)

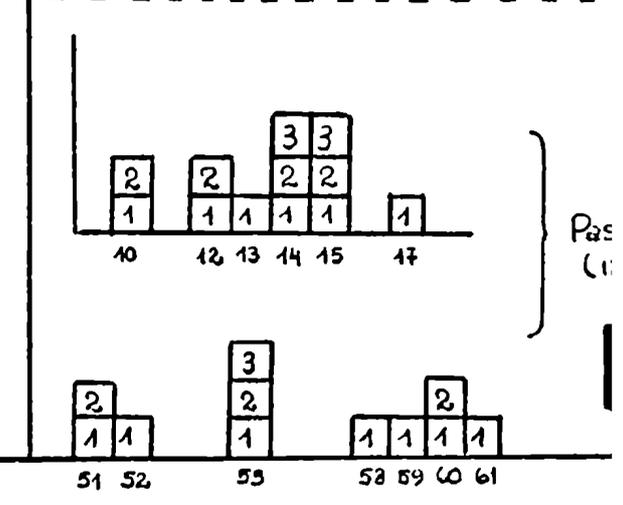
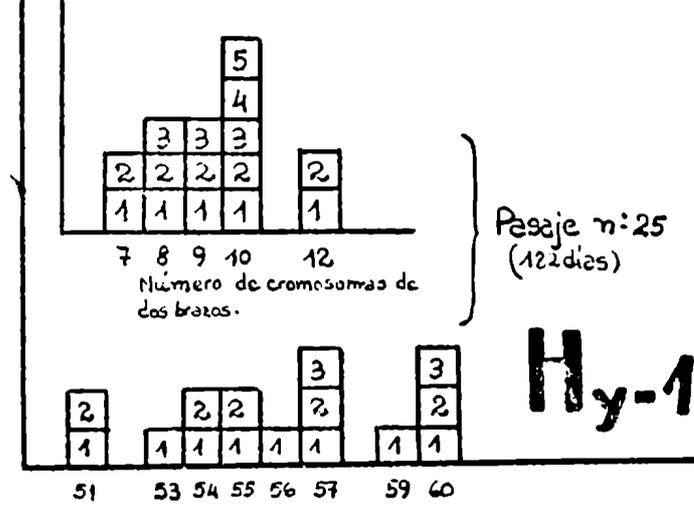
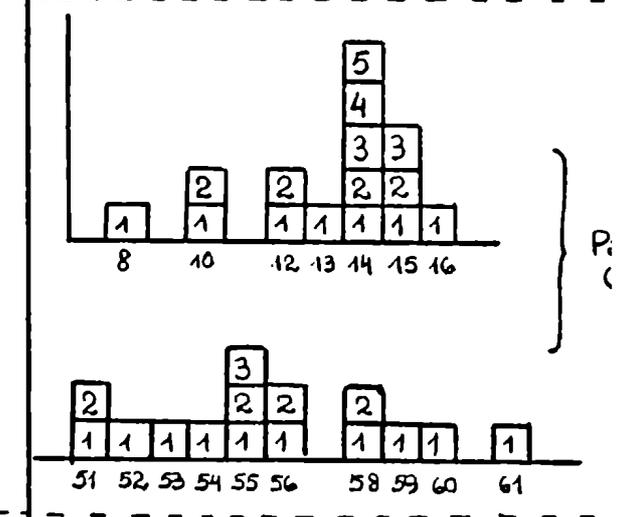
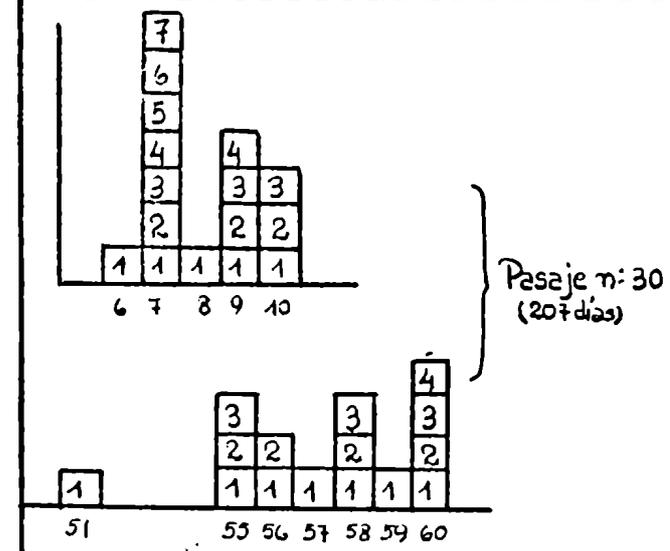
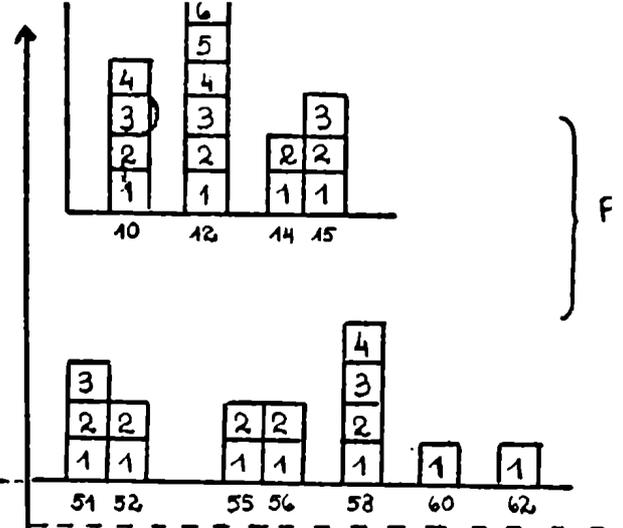
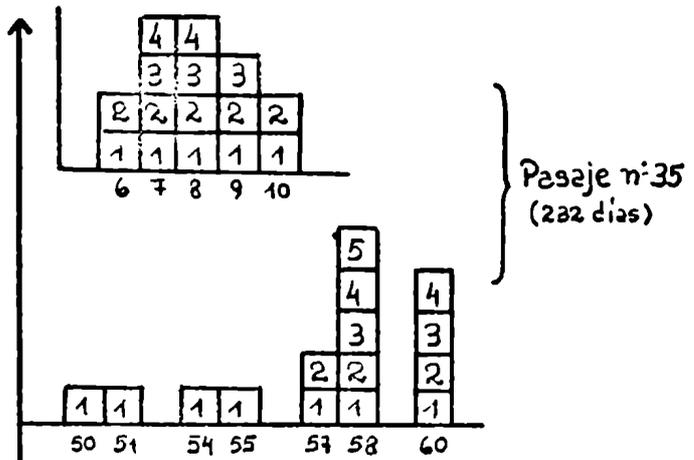
Hibrido Hy-2 en los pasajes número 25, 31 y 35 a los 182, 212 y 232 días después de la fusión.

Células enumeradas	Pasaje n: 27		Pasaje n: 32		Pasaje n: 36	
	NTC	C2B	NTC	C2B	NTC	C2B
1	58	9	60	10	54	7
2	60	9	51	6	58	9
3	56	8	57	7	60	12
4	55	7	54	7	51	6
5	58	7	60	11	56	7
6	50	7	56	7	58	8
7	57	9	53	7	51	6
8	61	12	61	12	60	10
9	58	8	55	7	57	9
10	61	10	58	8	59	10
11	56	7	58	9	51	7
12	58	8	60	10	56	6
13	61	9	51	6	60	12
14	51	6	55	7	54	8
15	57	9	54	7	51	6
Valores extremos	50-61	6-12	51-61	6-12	51-60	6-12
Medias	56,66	8,33	56,20	8,06	55,73	8,20

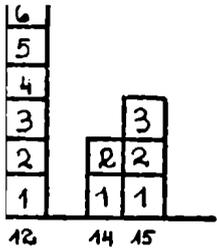
c)

Hibrido Hy-3 en los pasaje número 27, 32 y 36 a los 188, 216 y 237 días después de la fusión.

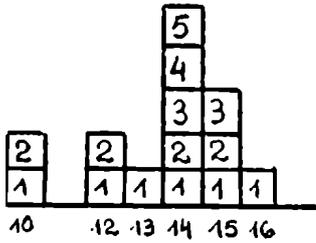
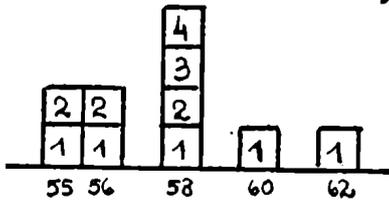
Número de células examinadas



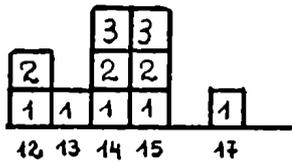
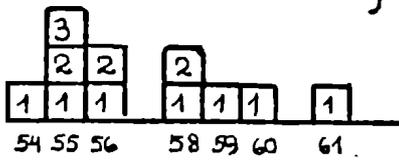
H_y-1



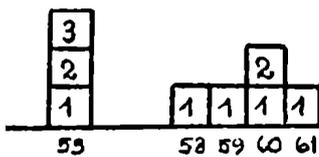
Pasaje n: 35
(232 días)



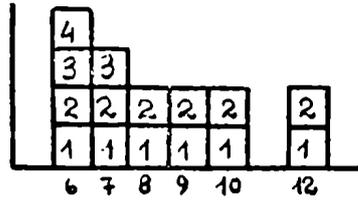
Pasaje n: 31
(212 días)



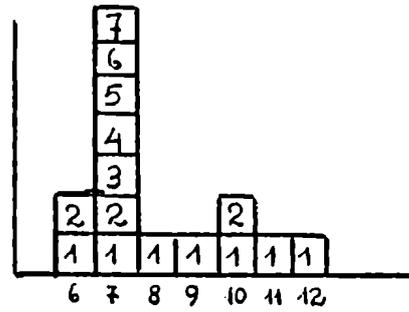
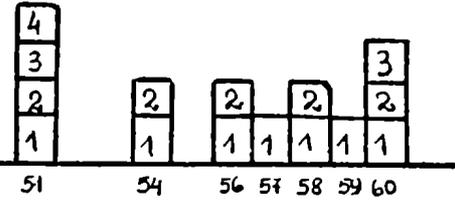
Pasaje n: 25
(182 días)



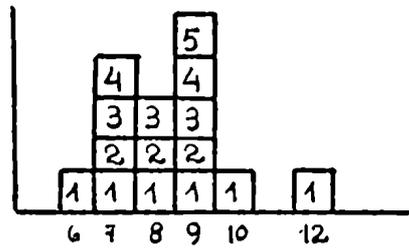
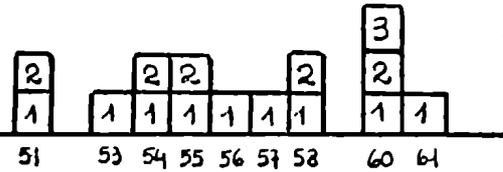
Hy-2



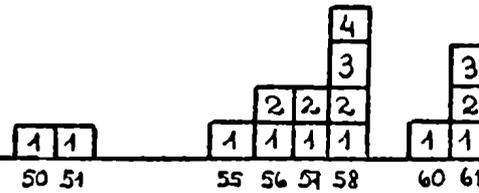
Pasaje n: 3
(237 días)



Pasaje n: 32
(216 días)



Pasaje n: 27
(188 días)



Hy-3

Número total de cromosomas

sentados en la Tabla 2.

Híbrido Hy-2: El número total de cromosomas fluctúa también entre 51-62 en los 3 pasajes, con valores medios de 56,08 , 55,10 y 55,53 en los cultivos 25, 31 y 35 respectivamente.

Los cromosomas de dos brazos presentan valores medios de 13,41 , 13,06 y 12,33 (Tabla 2b, figs. 10 y 11).

Es decir, como en el Hy-1, en el Hy-2 no se manifiesta una pérdida considerable del número total de cromosomas de dos brazos a lo largo de los tres pasajes. Sin embargo, este grupo presenta un número de cromosomas meta y submetacéntricos ligeramente superior - entre 13,41 y 12,33 al de los híbridos Hy-1 (9,27-7,14) y Hy-2 (8,33-8,20).

Híbrido Hy-3: (Fig. 12). Los valores medios de 56,66 , 56,20 y 55,73 en los pasajes 27, 32 y 36 señalan igualmente una estabilidad en el número total de cromosomas. Los valores medios de 8,33 , 8,06 y 8,20 para los cromosomas de dos brazos indican también que no hay variación del número de éstos en el período comprendido entre los pasajes 27 y 36. (Tabla 2c).

Test de la malignidad por heterotransplante (Fig. 13)

Las observaciones en los 5 lotes de animales anteriormente descritos fueron las siguientes:

Lote 1: Entre 30 y 40 días después de inoculados con las células SA₄, 7 de los 8 hámsters presentaron tumores, lo que confirma el carácter altamente maligno de esta línea.

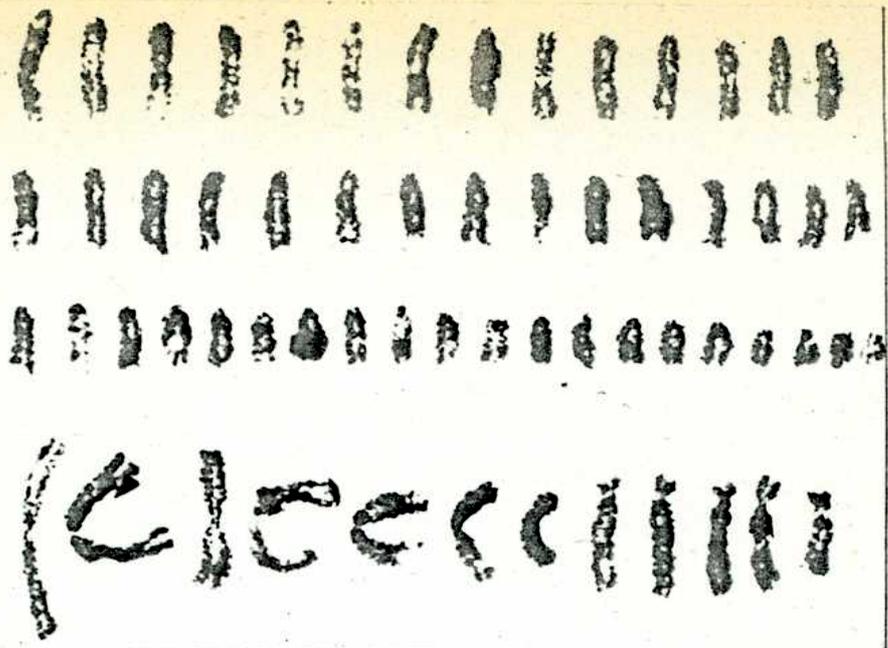


Fig. 10. - Idiograma de una célula Hy-2, con 62 cromosomas donde 12 son humanos. Pasaje 25. (1200 x).

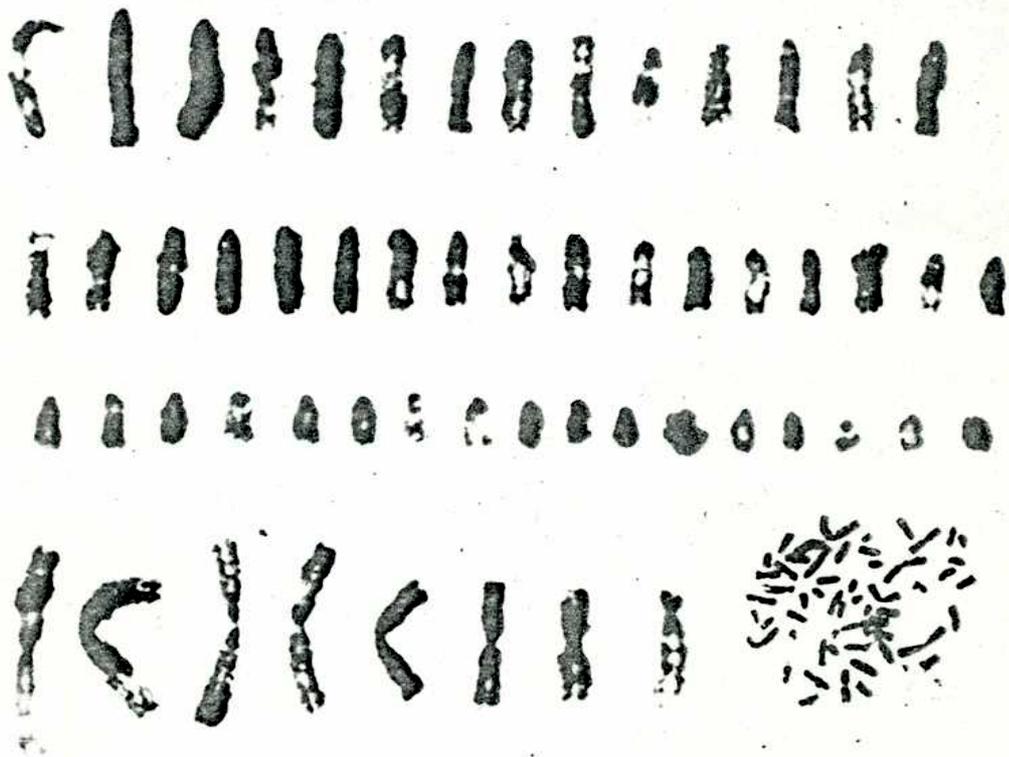


Fig. 11. - Idiograma de una célula Hy-2, con 56 cromosomas de los cuales 8 son humanos. Pasaje 27. (1200 x).



Fig. 12. - Hy-3 en el pasaje n° 31. 55 cromosomas de los cuales 14 son humanos. (1200 x).

Lote n°	1	2	3	4	5
	SA ₄	3T3-4E	Hy-1, pasaje 27	Hy-2, pasaje 27	Hy-3, pasaje 29
Presencia de tumores	$\frac{7}{8}$	-	$\frac{3}{8}$	$\frac{2}{8}$	$\frac{3}{8}$
Lapso de aparición	30-40 días		40-60 días	45-60 días	40-60 días

Fig. 13. - Test de la malignidad por heterotransplante de células parentales e híbridas en el hámster Sirio.

cocultivo XC →	SA ₄	3T3-4E	Hy-1 ^a	Hy-2 ^{cc}	Hy-3 ^{ccc}	N ₁
Test XC	-	-	-	-	-	+

- ^a En los pasajes número 6 y 26.
- ^{cc} En los pasajes número 6 y 28.
- ^{ccc} En los pasajes número 6 y 26.

Fig. 14. - Resultado del test XC obtenido por cocultivo de las células parentales e híbridas con células de la línea XC.

Lote 2: Los animales fueron mantenidos en observación durante 2 meses sin que ninguno de ellos presentara tumores en ese lapso. Algunos meses antes de iniciada esta experiencia las células 3T3-4E habían sido testadas en el hámster sin dar tampoco en esa oportunidad lugar a la aparición de tumores.

Lote 3: Entre los 40-60 días siguientes a la inoculación de las células, 3 de los 8 hámsters presentaron tumores en las bolsas yugales.

Lote 4: 2 de los 8 animales desarrollaron tumores entre los 45-60 días.

Lote 5: Entre los 40-60 a la inoculación 3 de los 8 hámsters presentaron tumores.

Dos explantos de tumores de los grupos 3 y 5 fueron cultivados *in vitro*, realizándose su estudio cromosómico y morfológico en el primer pasaje. La Fig. 3d muestra el aspecto del cultivo proveniente de un tumor originado por heterotransplante de células del híbrido Hy-1. La morfología celular es similar a la del Hy-1 (Fig. 3c) antes del transplante en el hámster.

El estudio de 10 metafases indicó un número cromosómico total de entre 53-60 cromosomas y un número de 6 a 12 cromosomas de dos brazos. Esto permite identificar los tumores originados en el hámster como provenientes de las células híbridas inoculadas. Estas células híbridas conservan después del pasaje en el animal, o de crecimiento "in

vivo" una composición cromosómica similar a la mantenida en cultivo "in vitro".

Resultado de los test XC: (Fig. 14) En las líneas parentales y en los tres híbridos cocultivados con las células XC, éste test fué negativo. En ningún caso se observaron células gigantes multinucleadas en las células XC. Por el contrario, la línea N₁, utilizada como control, presentó numerosos policariocitos. El resultado obtenido para las líneas parentales 3T3-4E y SA₄ concuerda con las observaciones efectuadas con microscopía electrónica, previamente a la hibridación, que demostraron la ausencia de partículas virales del tipo C en ambas.

DISCUSION

La bibliografía conocida hasta el momento referida a los híbridos somáticos entre células murinas y humanas (6, 11, 17, 22-27, 31 y 38) muestra que en todos los casos hay una pérdida masiva de cromosomas humanos.

Dicha bibliografía sugiere que estos híbridos pueden agruparse en dos clases generales:

a) La primera se caracteriza por la presencia de una sola y completa dotación cromosómica de ratón - 1s - y por la pérdida temprana de cromosomas humanos (11, 17, 27-30). Solamente de 0 a 15 de estos últimos son retenidos en la generación híbrida número 20 y la mayoría de ellos se pierden entre las generaciones 20 y 100.

b) La segunda se caracteriza, salvo raras excepciones, por la presencia de dos dotaciones cromosómicas completas de ratón y por una eliminación menos rápida de los cromosomas humanos. De estos últimos persisten 10 o más en la generación número 150 (17, 22 y 34).

Los híbridos comprendidos en la primera clase tienen en común las células parentales murinas, que pertenecen a la línea L. Las células humanas son células diploides WI-38 o bien células aneuploides transformadas por el virus SV40.

La segunda clase comprende híbridos donde las células murinas son diploides o células de la línea 3T3-4E. El parental humano está representado por líneas permanentes.

El análisis de los híbridos entre células humanas y de ratón estudiados hasta hoy evidencia que aquellos que contienen una sola dotación cromosómica - la - murina, ésta es completa. Este hecho permite suponer que en esos híbridos la pérdida de cromosomas humanos no es el resultado de mitosis desiguales. Por el contrario, las células híbridas con más de un genoma parental murino presentan un número irregular y variable de cromosomas de ratón y la participación de los cromosomas humanos es mayor y menos constante.

Estas observaciones sugerirían que los cromosomas humanos fueran mejor "tolerados" cuando el balance génico se vuelca hacia un exceso de cromosomas de ratón.

Clones híbridos con dos dotaciones cromosómicas murinas son muy frecuentes en las fusiones de la línea D98, pre-

sumtivamente derivada de la HcLa, con la línea 3T3-4E (22) y de la línea humana VA₂ con la 3T3-4E (31). Esas células con un doble contenido de cromosomas de ratón pueden resultar de : a) Fusiones múltiples o sea la fusión de dos células diploides de ratón con una sola célula humana. b) Fusión preferencial del parental humano con células tetraploides de ratón. c) Que las células parentales se hallaran en diferentes fases del ciclo celular en el momento de la fusión y no hubiera una sincronización de los dos genomas, de ratón y humano, en la célula híbrida.

Un trabajo reciente de Jami y Grandchamp (38) incorpora una tercera categoría de híbridos a las citadas anteriormente. Es aquella que comprende células híbridas que retienen esencialmente el genoma humano completo y muestran una pérdida preferencial de cromosomas de ratón. Estos híbridos provienen de la fusión de células de la línea de ratón CL₂LD y de células de la línea humana VA₂.

Los resultados obtenidos en nuestra experiencia indican que a los 56 días de realizada la fusión y en el 4to pasaje en medio mínimo las células híbridas de los tres clones estudiados presentan la totalidad de los cromosomas de ratón y de los acrocéntricos humanos. Hay, en cambio, una pérdida de cromosomas humanos de dos brazos de aproximadamente un 40%.

Dificultades técnicas, y principalmente el lento crecimiento de las colonias híbridas inmediatamente después de su

aparición, impidió el análisis cariológico temprano de las células. No conocemos, por lo tanto, la composición de los híbridos en los primeros momentos de su formación, ni la cinética de la eliminación de cromosomas humanos meta y submetacéntricos.

En los pasajes posteriormente estudiados, entre los 182 y 188 días de efectuada la fusión se produce simultáneamente una considerable pérdida de cromosomas de ratón y acrocéntricos humanos y de cromosomas humanos de dos brazos. Esto se evidencia, por ejemplo, en el clon Hy-1 por los valores medios de 107,66 para el número total de cromosomas y de 28,80 para los cromosomas de dos brazos en el 4to pasaje y de 55,13 y 9,27 respectivamente en el pasaje número 25.

Es decir, el número de cromosomas de ratón y humanos acrocéntricos disminuye en un 50% y el de cromosomas de dos brazos en un 66%, entre el 4to y 25-27avos pasajes.

Estos valores son válidos para los clones Hy-1 y Hy-3. El clon Hy-2 coincide con los anteriores en la pérdida de la mitad de los cromosomas acro y telocéntricos, pero experimenta una eliminación algo menor de cromosomas humanos de dos brazos - aproximadamente un 50% -.

A partir de los pasajes 25-27 el análisis de los 3 clones híbridos muestra una estabilidad cromosómica, conservándose entre 6-15 cromosomas humanos meta y submetacéntricos en los pasajes 35-36.

Estos resultados coinciden con los obtenidos en otras ex-

periencias de hibridación entre células de ratón y humanas en la pérdida preferencial de cromosomas de origen humano. Los hechos no concordantes con otros citados en la bibliografía son: a) Las células híbridas muestran en los primeros análisis la presencia de una sola y completa dotación cromosómica de ratón, en tanto en las otras hibridaciones realizadas con la misma línea parental murina 3T3-4E existe un doble genoma de ratón. b) A lo largo de sucesivas generaciones las células híbridas evidencian una pérdida de cromosomas acrocéntricos y telocéntricos más pronunciada que la observada en otras hibridaciones y paralela a la eliminación de cromosomas humanos de dos brazos. No es posible diferenciar los cromosomas acrocéntricos humanos de los de ratón, pero siendo la eliminación de los cromosomas telocéntricos y acrocéntricos de un 50% respecto de los valores observados en el 4to pasaje, se supone la pérdida de cromosomas humanos y de ratón.

Habría, por lo tanto, una eliminación paralela de cromosomas de ambos parentales, donde la pérdida de los cromosomas humanos sería más pronunciada que la de los murinos. Finalmente se llegaría a un cariotipo más o menos estable de aproximadamente 50-62 cromosomas, de los cuales 6-15 son meta y submetacéntricos.

Es decir, las células híbridas al cabo de un largo cultivo "in vitro" se estabilizan en un cariotipo caracterizado por un número cromosómico total inferior al de las líneas pa-

rentales y compuesto por parte de ambas genomas.

Un problema de interés que intentan resolver algunos de los biólogos que estudian la hibridación celular somática es si los híbridos resultantes de la fusión de células cancerosas con células normales tienen las propiedades de las células tumorales, de las células normales o bien propiedades intermedias.

Diferentes autores han llegado a la conclusión que el carácter maligno persiste en los híbridos resultantes de tales cruzamientos. Por ejemplo los híbridos obtenidos por Scalotta y Ephrussi (6) entre células neoplásicas y fibroblastos normales de ratón presentaban la capacidad de inducir tumores cuando se los inoculaba en animales que poseían los antígenos de transplatación compatibles.

Resultados análogos fueron obtenidos por Silagi (32) en experiencias de hibridación entre células normales y células malignas provenientes de un melanoma de ratón. El carácter maligno de las células M obtenidas por Barski y Cornfert (33) a partir de las células N₁ y N₂ concuerda con los resultados de los autores recién citados.

Sin embargo, los trabajos recientes de Harris y Klein (34 y 35) tienden a demostrar que el carácter maligno de las células puede ser suprimido mediante la fusión con células normales, si bien los híbridos resultantes pueden recuperar el carácter tumoral cuando se produce una pérdida importante de cromosomas de la línea normal. Es decir,

en este caso, la no malignidad estaría regida por un balance entre los cromosomas de ambos parentales tumoral y normal, y la eliminación masiva del parental no maligno volcaría el equilibrio hacia la manifestación de la tumorigenicidad.

A diferencia de las observaciones de Harris y Klein, los resultados de Sobel y col (36) en híbridos de células de hámster Chino de diferente poder tumorigénico, mostraron que no existía ninguna relación entre la pérdida de cromosomas y la expresión de la malignidad. Estos autores hallaron entre los clones mas altamente tumorigénicos cariotipos muy próximos al valor híbrido ideal de 44 cromosomas.

El resultado de los test de heterotransplante realizados en nuestra experiencia indican: a) La línea parental humana SA₄ conserva su carácter maligno, provocando la aparición de tumores en los hámsters inoculados.

b) La línea parental de ratón 3T3-4E no es tumorigénica.

c) Los híbridos resultantes presentan un poder tumorigénico menor que el de las células parentales malignas, obteniéndose tumores en el 33% de los animales inoculados.

Las células híbridas utilizadas en los heterotransplantes pertenecían a pasajes en los cuales la composición cromosómica comprendía entre 50-62 cromosomas de los cuales 8-16 eran meta y submetacéntricos, es decir cuando se había producido ya una importante eliminación de cromosomas de ambos parentales.

Cabe plantearse la pregunta de que si la eliminación de gran parte de los cromosomas humanos, en este caso del parental maligno SA₄, podría ser la causa del menor poder tumorigénico de los híbridos.

En nuestra experiencia desconocemos la tumorigenicidad de los híbridos en su primera etapa, cuando su composición cromosómica comprendía la totalidad de los cromosomas del parental no maligno 3T3-4E y gran parte de los cromosomas del parental maligno SA₄.

De acuerdo a los resultados de Harris y Klein, éstos híbridos deberían ser no tumorigénicos, quedando reprimida la malignidad por la presencia de los cromosomas de ratón. La pérdida posterior de cromosomas murinos haría recuperar el carácter maligno de las células. Sin embargo, nos parece difícil la restitución de la tumorigenicidad cuando simultáneamente a la pérdida de cromosomas del parental normal se produce la eliminación en mayor grado del parental maligno. Nos parece mas probable que ocurriese el proceso inverso. Es decir, que en su origen los híbridos fueran malignos, cuando presentaban la mayor parte de los cromosomas humanos "tumoraes". Probablemente el poder tumorigénico de los híbridos en ese momento fuera mas elevado que el evidenciado en los pasajes 27-29 y mas próximo del poder tumorigénico de las células SA₄. La menor tumorigenicidad de los híbridos testados sería debida a la pérdida de gran parte de los cromosomas humanos mas bien que a la presencia de los cromosomas

del parental no maligno murino.

No es numerosa la bibliografía referente a la producción de partículas C en células híbridas. La mayor parte de las referencias provienen de la fusión de células de rata crónicamente infectadas con el virus del sarcoma murino de Rous, RSV, con células de pollo (37). En este caso las células de rata han sido transformadas por el virus de Rous, pero no producen partículas virales. La fusión de estas células con fibroblastos de pollo permite la liberación del virus de Rous de los heterocariones y es probable que las células de pollo suministren algún factor o factores necesarios para la producción de virus en las células híbridas.

En nuestra experiencia el carácter negativo del test XC practicado en los 3 clones híbridos indica que estos no producen partículas C, tanto en el 6to pasaje como en los pasajes número 26 y 28.

La bibliografía sobre la línea tumoral humana SA₄ indica la presencia de partículas virales C en un primer período de su cultivo, y la pérdida de dichas partículas en posteriores subcultivos.

En este trabajo, la fusión de las células SA₄ con las células 3T3-4E - virus negativas - no induce la liberación de partículas virales en los híbridos. Dos razones podrían ser las responsables de este hecho:

a) La definitiva pérdida de las partículas virales C en la línea SA₄.

b) La existencia del genoma viral en las células humanas, aunque incapaz de replicar nuevos virus.

Las células 3T3-4E a lo largo de su vida "in vitro" nunca han manifestado la presencia de partículas virales C. Al ser fusionadas con las células SA₄ podría ser que no fueran capaces de bloquear algún represor que actuara inhibiendo la producción viral, o de suministrar el factor o factores necesarios para la replicación de los virus, como ocurriría en el caso de los heterocariones de rata y pollo.

Es una evidencia incuestionable que la hibridación celular somática ha suministrado a la Biología Celular un nuevo medio para penetrar en el dominio hasta el momento mal conocido de los mecanismos que rigen la herencia en las células somáticas, y en especial la herencia de la transformación maligna. Utilizando en las experiencias de hibridación numerosas combinaciones celulares se pueden actualmente acumular conocimientos no solamente sobre el contenido genético de las células somáticas, o sea la localización cromosómica de los sitios génicos, sino sobre los mecanismos de su expresión.

Los resultados acumulados hasta el momento parecen indicar, dada la falta de uniformidad, que los factores que determinan las propiedades invasivas de las células son complejos, que la cancerización no sería comparable a un carácter mendeliano único, recesivo o dominante.

....

BIBLIOGRAFIA

- 1) Barski, G. y col. C. R. Acad. Sci. (Paris), 251:1825 (1960).
- 2) Barski, G. y col. J. Nat. Cancer Inst. 26:1269 (1961).
- 3) Sandford, K. K. y col. J. Nat. Cancer Inst. 15:215 (1954).
- 4) Soricul, S. y Ephrussi, B. Nature, 190:653 (1961).
- 5) Ephrussi, B. y col. Symp. Int. Soc. Cell Biol. 3:12 (1964).
- 6) Scalcta, L. J. y Ephrussi, B. Nature, 205:1169 (1965).
- 8) Weiss, M. C. y Ephrussi, B. Genetics, 54:1096 (1966).
- 7) Ephrussi, B. y Weiss, M. C. Proc. Nat. Acad. Sci. 53:1040 (1965).
- 9) Scalcta, L. J. y col. Genetics, 57:107 (1967).
- 10) Migcon, B. R. Biochem. Genet. 1:305 (1968).
- 11) Weiss, M. C. y Green, H. Proc Nat. Acad. Sci. 58:1104 (1967).
- 12) Spencer, R. A. y col. J. Nat. Cancer Inst. 33:893 (1964).
- 13) Harris, H. J. Cell Sci. 2:23 (1967).
- 14) Harris, H. y col. J. Cell Sci. 4:499 (1969).
- 15) Wang, F. y col. J. Virol. 5:682 (1970).
- 16) Watkins, J. F. y Dulbecco, R. Proc. Nat. Acad. Sci. 58:1396 (1967).
- 17) Weiss, M. C. y col. Proc. Nat. Acad. Sci. 59:1132 (1968).
- 18) Littlefield, J. W. Science, 145:709 (1964).
- 19) Littlefield, J. W. Exptl. Cell Res. 41:190 (1966).
- 20) Davidson, R. L. y Ephrussi, B. Nature, 205:1170 (1965).
- 21) Todaro, G. J. y Green, H. J. Cell Biol. 17:299 (1963).
- 22) Matsuya, Y. y Green, H. Science, 163:697 (1969).
- 23) Morton, D. L.; Hall, W. T. y Melmgren, R. A. Science, 165:813 (1969).

- 24) Okada, Y. Exptl. Cell Res. 26:108 (1962).
- 25) Neff, J. M. y Enders, J. F. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y), 127:260 (1968).
- 26) Svoboda, J. Nature, 186:980 (1960).
- 27) Matsuya, Y., Green, H. y Basilico, C. Nature, 220:1199 (1968).
- 28) Migcon, B. R. y Miller, C. S. Science, 162:1005 (1968).
- 29) Nabholz, M. V.; Miggiano, V. y Bodmer, W. Nature, 223:358 (1969).
- 30) Wang, R. y col. J. Virol. 5:677 (1970).
- 31) Weiss, M. C. Proc. Nat. Acad. Sci. 66:79 (1970).
- 32) Silagi, S. Cancer Res. 27:1953 (1967).
- 33) Barski, G. y Cornefert, F. J. Nat. Cancer Inst. 28:801 (1962).
- 34) Harris, H. y col Nature, 223:363 (1969).
- 35) Harris, H. y Klein, G. Nature, 224:1315 (1969).
- 36) Sobel, J. S. y col. Comunicación personal al Dr. Barski.
- 37) Coffin, J. M. J. Virol. 10:153 (1972).
- 38) Jami, J. y Grandchamps, S. Proc. Nat. Acad. Sci. 68:3097 (1971).

....
....

NUEVA TÉCNICA DE ANÁLISIS CITOGÉNÉTICO

Durante los últimos tres años ha sido publicado un gran número de técnicas de bandeado cromosómico. El denominador común de todas ellas es el de permitir la identificación de los cromosomas en metafase mediante la presencia de bandas claras y oscuras de localización precisa y característica en cada par cromosómico de una determinada especie.

La extensa bibliografía se inició en 1969 con un trabajo de Caspersson y col (1) donde citaban una técnica de fluorescencia basada en la utilización de la mostaza de quinacrina para el análisis cromosómico. En 1970 el grupo de trabajo de este mismo investigador (2) publicó la identificación de los cromosomas humanos en metafase mediante la mencionada técnica. Los cromosomas tratados con la mostaza de quinacrina presentan al ser observados con el microscopio de fluorescencia bandas de mayor o menor intensidad de fluorescencia a lo largo de sus brazos.

Posteriormente Summer y col (3) introdujeron el método denominado ASG (ácido acético-solución salina-Giemsa) que puso en evidencia, en preparaciones de linfocitos humanos, las mismas bandas exhibidas con la técnica de Caspersson.

Más recientemente otras sustancias fueron utilizadas para demostrar el bandeado cromosómico (4-7). Entre estas figuran las enzimas proteolíticas tales como la tripsina (8) y la quimiotripsina (9) que dan bandas comparables a las obtenidas con la mostaza de quinacrina y el método ASG. En todas estas téc-

nicas el colorante cromosómico utilizado es el Giemsa. La utilización de éstos métodos permitió, además del estudio de las bandas del cariotipo humano, el de los cariotipos del ratón (10-12), del hámster Chino (5), del cerdo (13) y de otros mamíferos tales como el gorila y el camello (14). Pardue y Gall (15), en un estudio sobre la hibridación "in situ" del ARN complementario al ADN satélite en el ratón, observaron que la región centromérica de los cromosomas murinos, donde el ARN complementario se localizaba mediante autoradiografía, se coloreaba mucho más intensamente con Giemsa que el resto del cromosoma. Arrighi y Hsu (16) modificaron esta técnica omitiendo el ARN complementario y obtuvieron regiones centroméricas intensamente coloreadas en cromosomas humanos (16) y de otros mamíferos (17-18). A esa región intensamente coloreada se la denominó heterocromatina centromérica. Esta técnica fué vastamente utilizada en la identificación de cromosomas (19) y en el estudio de reordenamientos cromosómicos en células anormales (20). Summer (21) practica una modificación de la técnica ASG para el bandeado cromosómico que permite poner en evidencia la heterocromatina centromérica de una manera menos tediosa que con el procedimiento anterior. En este trabajo presentamos una técnica simple y rápida, basada en la digestión enzimática mediante la tripsina, que permite la obtención de bandas cromosómicas y la coloración de la heterocromatina centromérica.

MATERIALES Y METODOS

Las células utilizadas fueron las de la línea permanente N₁ (NCTC 2472) obtenida a partir de tejido subcutáneo de ratón C3H/He y mantenida en cultivo desde 1954 (22)

El mantenimiento de estas células se efectuó como en los casos anteriores, mediante pasajes semanales en medio mínimo de cultivo 199 enriquecido con 10% de suero fetal bovino y antibióticos.

El medio de los cultivos a estudiar fué renovado 24 hs antes de añadir la colchicina. Esta se utilizó a razón de 0,4 μ g/ml incubándose a 37°C durante 90 minutos. Un tiempo mayor de incubación no es aconsejable pues los cromosomas se contraen en exceso y no son aptos para el bandedo. De nuestra experiencia deducimos que las células que se bandean mas eficientemente son aquellas que se encuentran en metafase temprana. Las que presentan un mayor grado de contracción - metafase tardía - son mas susceptibles de poner en evidencia la heterocromatina centromérica.

El tratamiento hipotónico se efectuó en células en suspensión, desprendidas de los frascos de cultivo con tripsina al 0,25 en PBS. La solución hipotónica empleada fué ClK 0,057 M durante 8 minutos a 37°C. Las células fueron luego centrifugadas durante 5 minutos a 800 rpm. La solución fijadora utilizada fué metanol - ácido acético glacial en proporción 3:1, efectuándose 3 cambios de fijador. En el último fijador las células pueden ser conservadas durante largo tiempo a 4°C.

La suspensión celular fué extendida en láminas mantenidas en agua destilada fría a razón de 2 o 3 gotas por lámina. Estas no fueron pasadas por la llema, siendo secadas durante 2-4 horas a 37°C.

Digestión enzimática: La solución de tripsina empleada en el bandeó de los cromosomas consistió en 0,25 g de la enzima (Trypsin, Biochemicals Nutritional Corporation, USA) en 100 ml de cloruro de sodio isotónico a pH 5-5,2.

Previamente a la digestión enzimática la solución de tripsina fué calentada a 37°C durante 20 minutos en cajas de Petri de 10 mm de diámetro. Las láminas a digerir fueron también mantenidas a la misma temperatura igual lapso. Luego fueron introducidas en las cápsulas conteniendo la solución enzimática, cuidando que ésta cubriera íntegramente la superficie de las láminas y mantenidas a 37°C durante el tiempo de digestión. Este varió entre 2' 30'' y 3' 30''.

Las láminas fueron entonces pasadas a cápsulas conteniendo una solución de ClNa isotónico donde la acción de la enzima fué detenida. En una segunda cápsula las láminas fueron lavadas pipeteando suavemente sobre la superficie de las mismas. En este paso se efectuó el control bajo microscopio de fase. Cuando la digestión fué suficiente los cromosomas presentaron un aspecto turgente, pareciendo de mayor tamaño que aquellos en los cuales no actuó la enzima y ambos brazos permanecían unidos. Un exceso de digestión enzimática se evidencia por una extrema hinchazón de los cromosomas. Cuando las

láminas no fueron suficientemente digeridas se las sometió a un tiempo suplementario de acción enzimática.

Es recomendable tratar las láminas individualmente, sobre todo cuando no se conocen los tiempos de digestión ideales de las células con las que se trabaja.

El colorante utilizado fué el Gicmsa (Merck) diluido de la siguiente manera:

100 ml de agua neutra o bidestilada

30 ml de tampón fosfato

5 ml de Gicmsa Merck

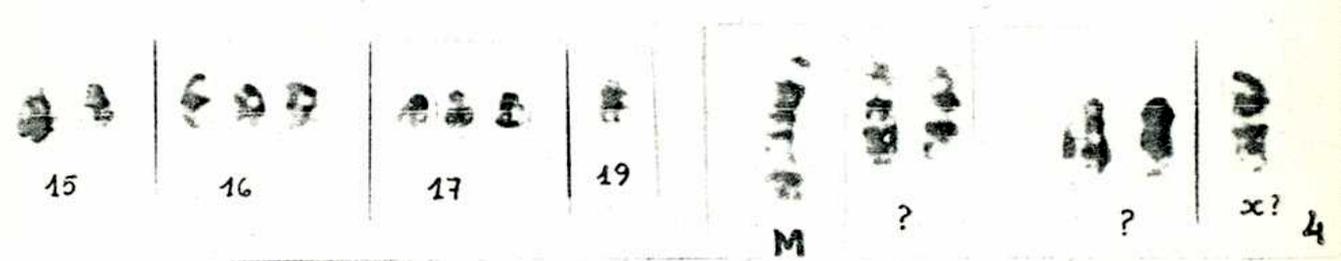
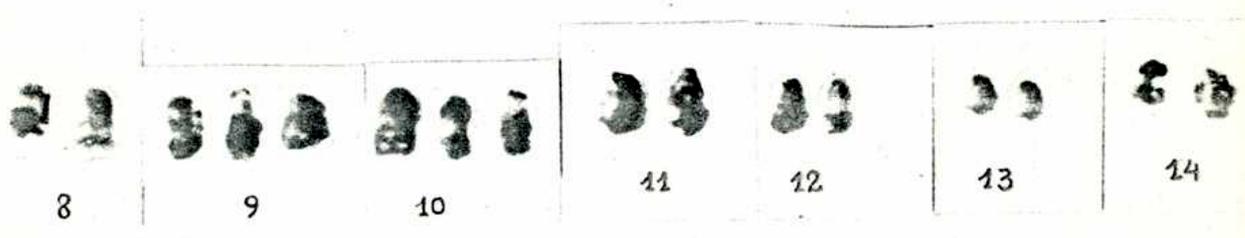
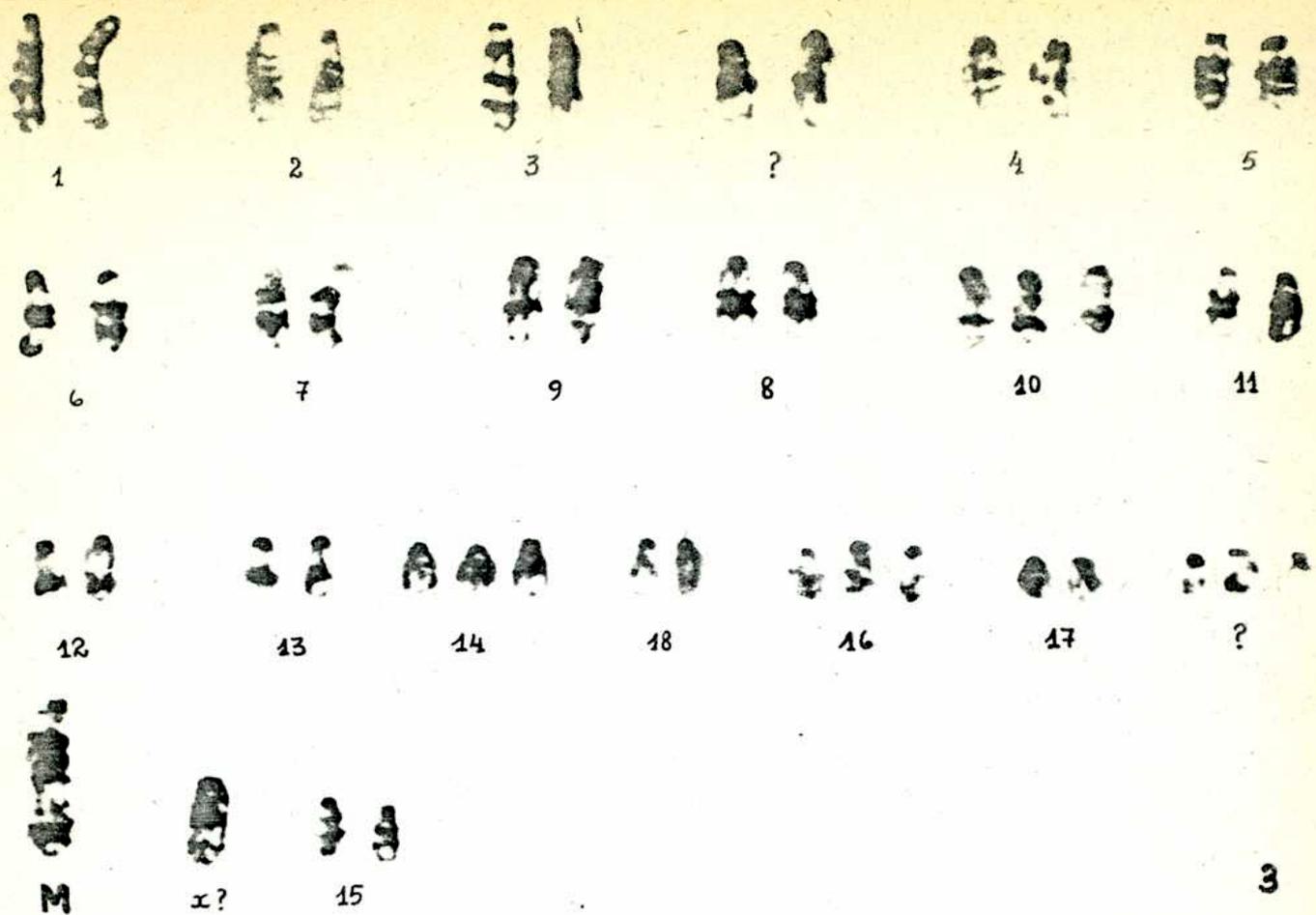
El tampón fosfato empleado comprende: 9,18 g/l de PO_4KH_2 y 11,8 g/l de PO_4HNa_2 , ajustándose a pH 6,8.

El tiempo de coloración osciló entre 10-15 minutos. Inmediatamente después de coloreadas las láminas fueron lavadas con agua corriente y secadas en estufa a 37°C.

La observación microscópica se efectuó con la óptica de inmersión, colocándose la gota de aceite sobre la lámina sin cubreobjetos. Para su limpieza éstas últimas fueron guardadas en recipientes con xilol, donde pudieron permanecer largo tiempo sin que la coloración ni la nitidez de las bandas fuera alterada.

RESULTADOS Y DISCUSION

Fueron analizadas 10 metafases de un mismo paseje. Las figuras 1-4 muestran los idiogramas realizados a partir de cuatro de esas metafases. La agrupación de los pares cromos-



Figs. 3 y 4. - Idiogramas de 2 células de la línea N_7 de 46 cromosomas. En ambos el cromosoma marcador extra largo M. (1200 x)

sómicos se efectuó según el ordenamiento de Buckland y col (10) para el cariotipo del ratón normal.

En las 10 células estudiadas se halló el cromosoma marcador telocéntrico M de gran tamaño, descrito por Woods (23) en el primer estudio cariológico de esta línea. Se hallaron algunos cromosomas que no están presentes en el cariotipo del ratón normal, probablemente resultantes de reordenamientos ocurridos durante la transformación de esta línea in vitro.

La figura 5 muestra el idiograma confeccionado a partir de una metafase en la cual se produjo la coloración de la heterocromatina centromérica. Al igual que en las células normales de ratón (10) ésta se observa intensamente coloreada en la línea N_1 .

El apareamiento de los cromosomas basado en el largo de los brazos es impreciso en muchos casos. Resulta particularmente difícil en el cariotipo del ratón, donde las diferencias de longitud de brazos en algunos pares prácticamente no existen. Las bandas características de cada par cromosómico superan esa dificultad.

La utilización de la tripsina permite una buena resolución de las bandas y se revela como un método sencillo y rápido. La técnica aquí descrita es una modificación de la propuesta por Scabright (8), pues se utiliza la misma concentración de la enzima disuelta en solución fisiológica. Varían el pH, en este caso de 5 a 5,2 y en el de Scabright neutro, y la temperatura a la cual se efectúa la digestión, 37°C en este

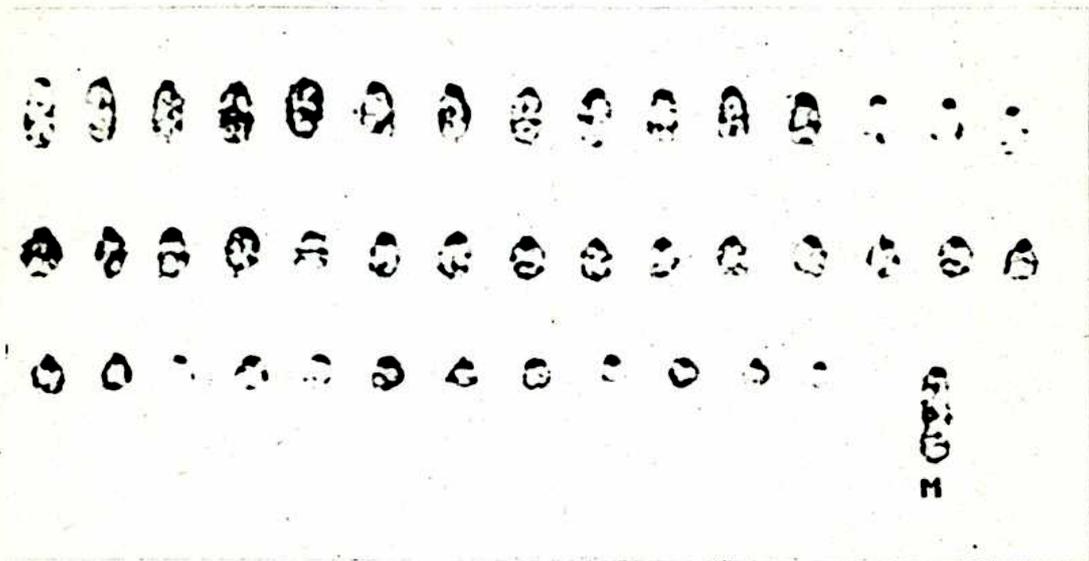


Fig. 5. - Heterocromatina centromérica en una célula de la línea N_1 de 43 cromosomas. Se halla presente el marcador M. (1200 x).

procedimiento, a temperatura ambiente en el de Scabright.

El efectuar la digestión enzimática a menor pH alarga el tiempo de la misma y el efecto de la enzima es menos drástico. Los tiempos de digestión no son nunca inferiores a 2 minutos. A pH 7-7,2 en cambio, la enzima actúa más eficazmente y los tiempos de digestión son muy breves - 10 a 20 segundos -, con lo cual resulta más difícil arribar al punto justo de acción enzimática. Frecuentemente las metafases presentan el aspecto típico de los cromosomas demasiado digeridos.

En nuestro caso hallamos generalmente una elevada proporción de metafase eficazmente bandeada por lámina observada.

Scabright propone el colorante de Leishman, si bien el Giemsa diluido en agua neutra y adicionando tampón fosfato resulta eficaz en la coloración de las bandas.

El mecanismo molecular exacto que pone en evidencia el bandeo cromosómico es aún desconocido. Una de las posibles explicaciones respecto de las bandas en las cuales interviene el colorante de Giemsa es que las diferentes sustancias que actúan según las distintas técnicas podrían disociar ciertos componentes, posiblemente de naturaleza proteica, que forman parte de la estructura cromosómica, exponiendo numerosos sitios en los cuales el Giemsa se intercalaría específicamente.

La presencia de electrolitos en la solución del colorante, como en el caso del tampón fosfato, podría desempeñar un rol importante en la fijación del colorante en los cromosomas, puesto que el Giemsa diluido en agua sin tampón colorea los

cromosomas de manera uniforme. Tampoco son visibles las bandas cuando las láminas pretratadas son coloradas con acetoorceína.

El hecho de que tratamientos con enzimas - pronasa, tripsina, quimiotripsina - induzcan bandas en los cromosomas parece favorecer esta hipótesis sobre la digestión de componentes proteicos.

Parduc y Gall (15) afirman que la heterocromatina centromérica densamente colorada en los cromosomas de ratón contiene una alta proporción de ADN repetitivo, denominado ADN satélite, que constituye un 10% del ADN de los cromosomas murinos. Las bandas oscuras a lo largo de los brazos serían mas bien secuencias de nucleótidos repetidas un número menor de veces.

El que existan diversos agentes de diferente naturaleza - enzimas proteolíticas, urea, permanganato de potasio (24) -, capaces de inducir bandas en los cromosomas de mamíferos, sugiere que otros factores, además del grado de repetición del ADN, estuvieran involucrados en este fenómeno.

La aplicación de estas nuevas técnicas de preparación de cromosomas al análisis del cariotipo permite el estudio de las anomalías cromosómicas constitucionales y de aquellas adquiridas, en particular aberraciones asociadas a cáncer y leucemia. Hace posible también el estudio de homologías entre los cromosomas de diferentes especies emparentadas, como el hombre y los primates y resulta de gran valor en el análisis

1870

1871

1872

1873

1874

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

BIBLIOGRAFIA

- 1) Caspersson, T. y col. Exptl Cell Res. 58:141 (1969).
- 2) Caspersson, T.; Johanson, C. y Modest, P. Chromosoma, Berl. 30:215 (1970).
- 3) Summer, A.; Evans, H. y Buckland, R. Nature Lond New Biol. 232:31 (1971).
- 4) Dutrillaux, B. y col. Cytogenetics 11:113 (1972).
- 5) Kato, H y Yosida, T. Chromosoma Berl. 36:272 (1972).
- 6) Utakoji, T. Nature Lond. New Biol. 239:168 (1972).
- 7) Berger, R. Rev.Europ.Etudes Clin. et Biol. 17:812 (1972).
- 8) Seabright, M. Chromosoma Berl. 36:204 (1972).
- 9) Finaz, C. y de Grouchy, J. Ann.Génét. 14:309 (1971).
- 10) Buckland, R.; Evans, H. y Summer, A. Exptl.Cell Res. 69:231 (1971).
- 11) Francke, V. y Nesbitt, M. Cytogenetics. 10:356 (1971)
- 12) Miller , O.J. y col. Proc.Nat.Acad.Sci. 68:1530 (1971).
- 13) Gustavsson, I. y col. Exptl.Cell Res 70:471 (1972).
- 14) Sperling, K. y Wiesner, R. Humangenetik 15:349 (1972).
- 15) Pardue, M.L. y Gall, J.G. Science 168:1356 (1970).
- 16) Arrighi, F. E. y Hsu, T.C. Cytogenetics 10:81 (1971).
- 17) Arrighi, F. E. y col. Chromosoma Berl. 32:224 (1970).
- 18) Hsu, T. C. y Arrighi, F. E. Chromosoma Berl. 34:243 (1971).
- 19) Chernay, P.R. y col. Cytogenetics 10:219 (1970).
- 20) Chen, T. R. y Ruddle, F. H. Chromosoma Berl. 34:51 (1971).
- 21) Summer, A. T. Exptl. Cell Res 75:304 (1972).
- 22) Likely, G. D.; Sandford, K.K.; y Earle, W. R. J.Nat Cancer Inst. 13:177 (1954).
- 23) Wodds, M. M. y col. J. Nat Cancer Inst. 23:1035 (1959).
- 24) Utakoji, T. Nature Lond. New Biol. 239:168 (1972).

IDENTIFICACION DE LOS CROMOSOMAS DE UN HIBRIDO
HAMSTER-RATON MEDIANTE EL METODO DE DIGESTION
ENZIMATICA.

Hasta el presente es escasa la bibliografía referente al reconocimiento de cromosomas en células híbridas mediante las técnicas de bandeo cromosómico. Las citas conocidas corresponden a híbridos ratón-humanos, donde los cromosomas fueron identificados con el método de fluorescencia (1) (2).

En este trabajo aplicamos la técnica de la digestión enzimática descrita en el capítulo anterior para identificar los cromosomas de un híbrido hámster-ratón.

MATERIALES Y METODOS

Células utilizadas: Fueron las líneas parentales R₄-Budr y DC-3F/ADX/AZA y el híbrido HY-CS.

R₄-Budr: Es una línea de ratón derivada de la línea 3T3 (3) y resistente a la 5-Bromodeoxiuridina. Presenta entre 46 y 49 cromosomas, todos acrocéntricos excepto un marcador metacéntrico. Menos frecuentemente se observa un segundo cromosoma metacéntrico. (Fig. 1).

DC-3F/ADX/AZA: Es una línea de hámster Chino derivada de la línea DC-3F (4) resistente a la 8-Azaguanina y a la Actinomicina D. Se caracteriza por tener 22-23 cromosomas, entre los cuales se hallan dos grandes marcadores subtelo-céntricos M₁. (Fig. 1).

HY-CS: Se obtuvo de la hibridación de las líneas anteriores (Barski y col, en prensa). Tiene entre 60 y 115 cromosomas.



Fig. 1. - Idiogramas correspondientes a células de las líneas R₄-Budr (49 cromosomas), DC-3F/ADX/AZA (22 cromosomas) y del híbrido HY-CS (101 cromosomas). (1200 x).

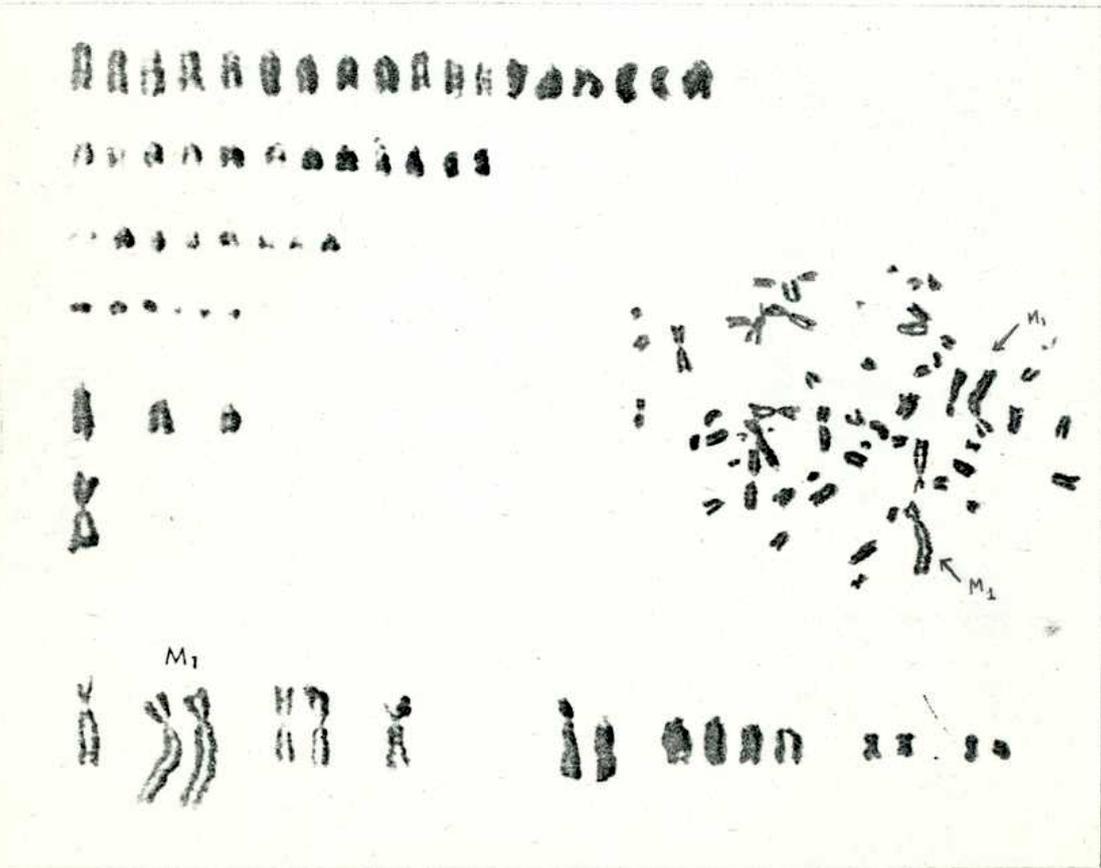


Fig. 2. - Idiograma de una célula del híbrido HY-CS de 64 cromosomas, donde solo figura un complemento cromosómico de ratón. (1200 x).

En las células de menor número cromosómico está presente un solo complemento de ratón (Fig. 2) y en las de más de 100 cromosomas se hallan aproximadamente dos complementos murinos (Fig. 1). El número de cromosomas de hámster varía entre 8 y 15.

Técnica citogenética: El método utilizado para poner en evidencia las bandas cromosómicas es el citado en el capítulo anterior, procediéndose a una digestión enzimática que duró entre 2'30'' y 3', con ligeras variaciones según las células tratadas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Células parentales R₄: Las figuras 3a y 3b muestran los idiogramas de dos células de esta línea. En los tres casos se observa la presencia de un cromosoma metacéntrico R que presenta dos bandas subterminales en un brazo superior y una banda terminal en el brazo inferior.

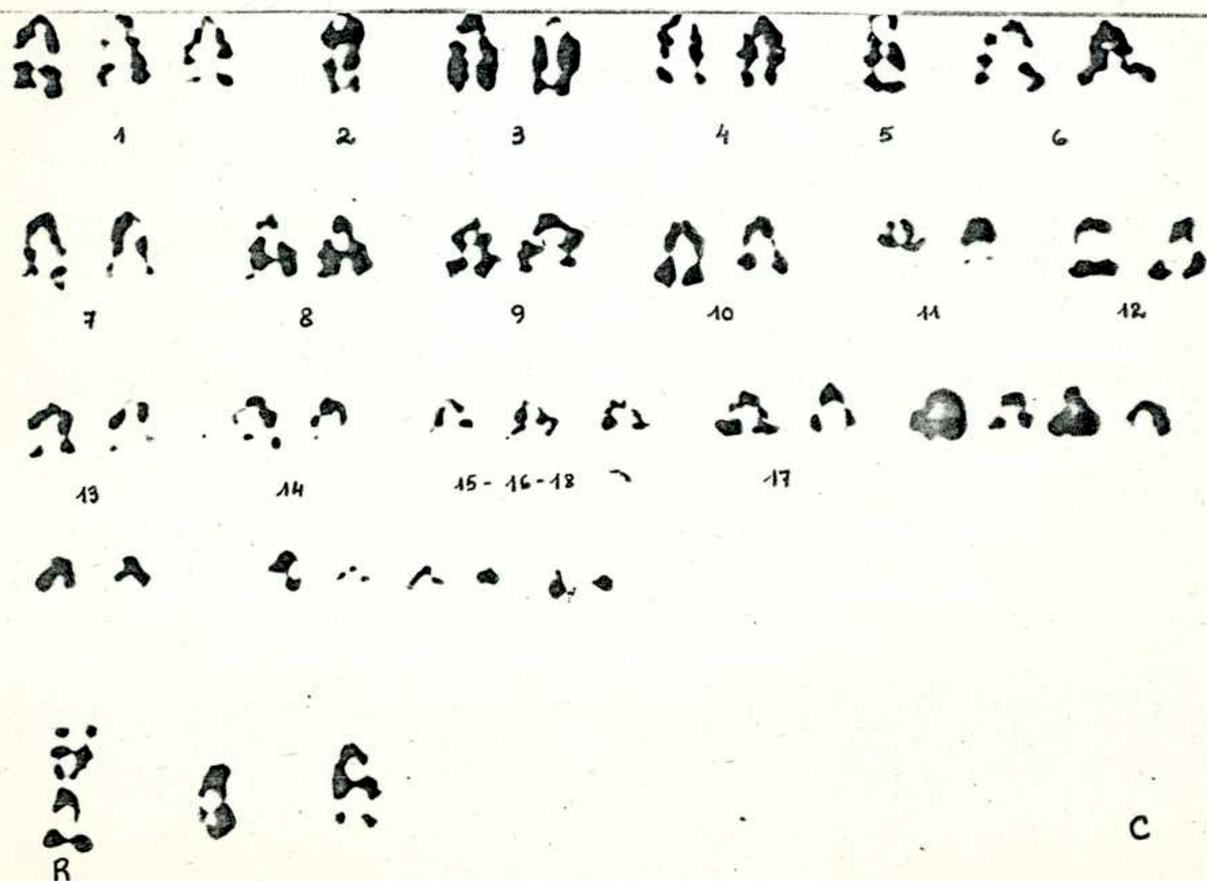
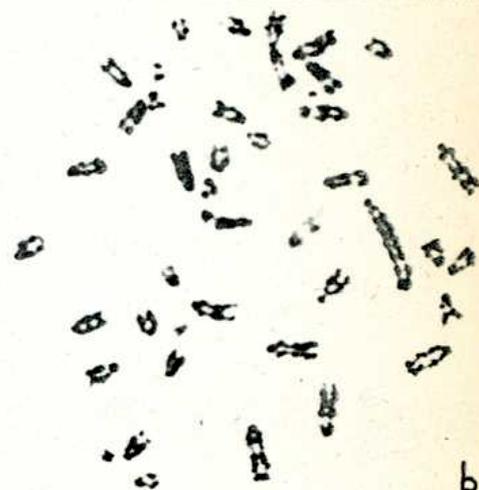
Células parentales DC-3F/ADX/AZA: La figura 4 presenta los idiogramas de dos células de esta línea. Los cromosomas, se hallaran en pares o no, fueron arbitrariamente designados de A a J. El primer par, M₁, corresponde a los marcadores subtlocéntricos. En la parte inferior de la foto se ubicaron los cromosomas cuya presencia no es constante. La fig. 5 esquematiza las bandas de los 11 tipos de cromosomas observados en esta línea de hámster.

Células híbridas HY-CS: Analizamos el contenido cromosómico de siete metafases.

Figura 6: Muestra el idiograma de una célula en la cual se puso en evidencia la heterocromatina centromérica de los cromosomas de ratón. Se observan dos marcadores metacentricos de ratón- en el interior del recuadro oscuro-



Fig. 3.- Idiograma de 2 células de la línea R₄-Budr después del tratamiento enzimático.
 a) idiograma y b) metafase de 46 cromosomas.
 c) 47 cromosomas. Nótese en ambos el marcador metacéntrico R.



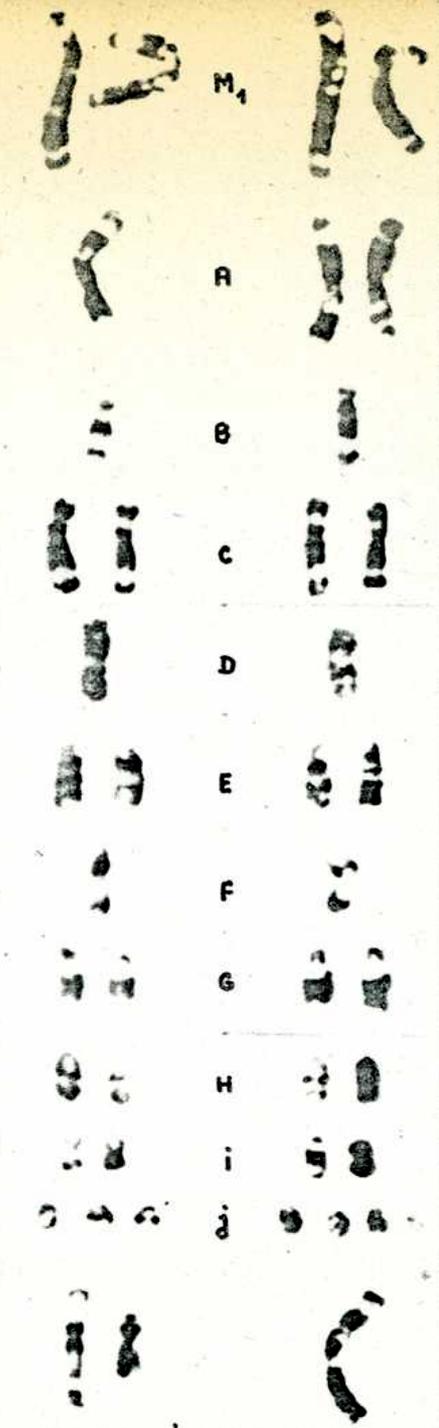


Fig. 4. - Idiogramas de 2 células de la línea DC-3F/ADX/AZA después de la digestión enzimática. a) 21 cromosomas b) 22 cromosomas. (1200 x).

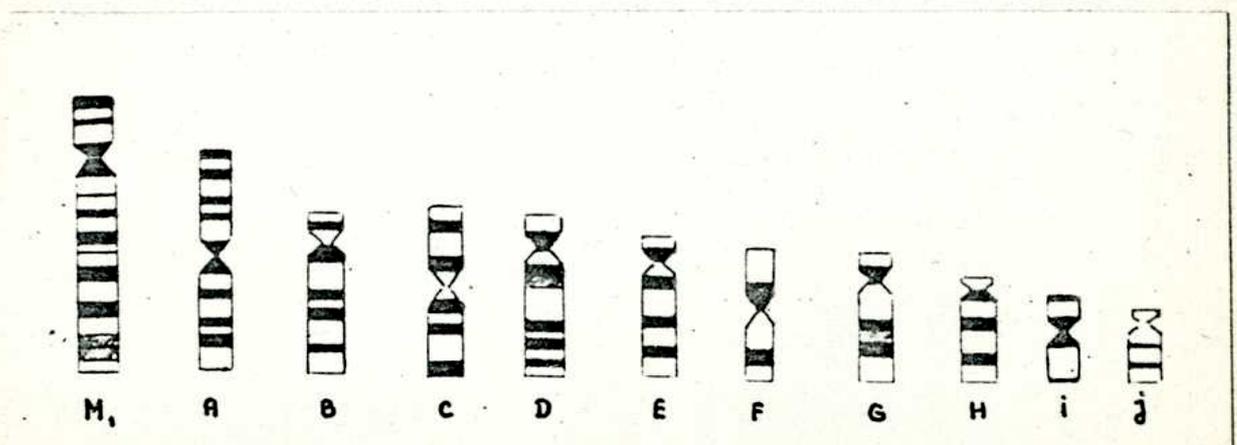


Fig. 5. - Esquemática de las bandas de los 11 tipos de cromosomas presentes en la línea DC-3F/ADX/AZA.

resultantes de la fusión céntrica de dos cromosomas acrocéntricos. Estos pueden distinguirse de los metacéntricos de hámster ubicados en la línea inferior por la densa coloración centromérica. Uno de los metacéntricos de ratón presenta una doble región centromérica heterocromática.

Figura 7: Representa el idiograma de una célula híbrida de 112 cromosomas. Los cromosomas numerados fueron identificados como de origen R_4 .

Entre ellos, varios grupos cromosómicos están representados por 3 y 4 cromosomas- grupos 1,2,3,4,6,11,12,15,14y 19-. Otros se componen de más de 5 cromosomas-grupos 9 y 10-. La cuarta línea agrupa los cromosomas de ratón que, de acuerdo a sus bandas, serían producto de reordenamientos ocurridos después de la hibridación, pues éstas no coinciden con las bandas observadas en los cromosomas de la línea parental R_4 . La 5ta. línea agrupa los pequeños cromosomas de ratón.

Los dos grandes cromosomas en el interior del recuadro son de origen murino. Uno de ellos coincide con el marcador R de la línea R_4 y el otro -(X-X)- también se habría originado como aquel por fusión céntrica de dos acrocéntricos de ratón. La presencia de 3 bandas en ambos brazos muy semejantes a las del cromosoma identificado como X y de una región monocentromérica heterocromática hace suponer que este cromosoma -(X-X)- se habría originado por fusión céntrica de dos cromosomas X, con pérdida de uno de los centrómeros. En el cromosoma R, en cambio, la fusión céntrica habría conservado ambos centrómeros.

La 6ta. y última línea agrupa 10 cromosomas, de los cuales 9 corresponderían a los cromosomas M_1 , C, D, I y J del hámster.

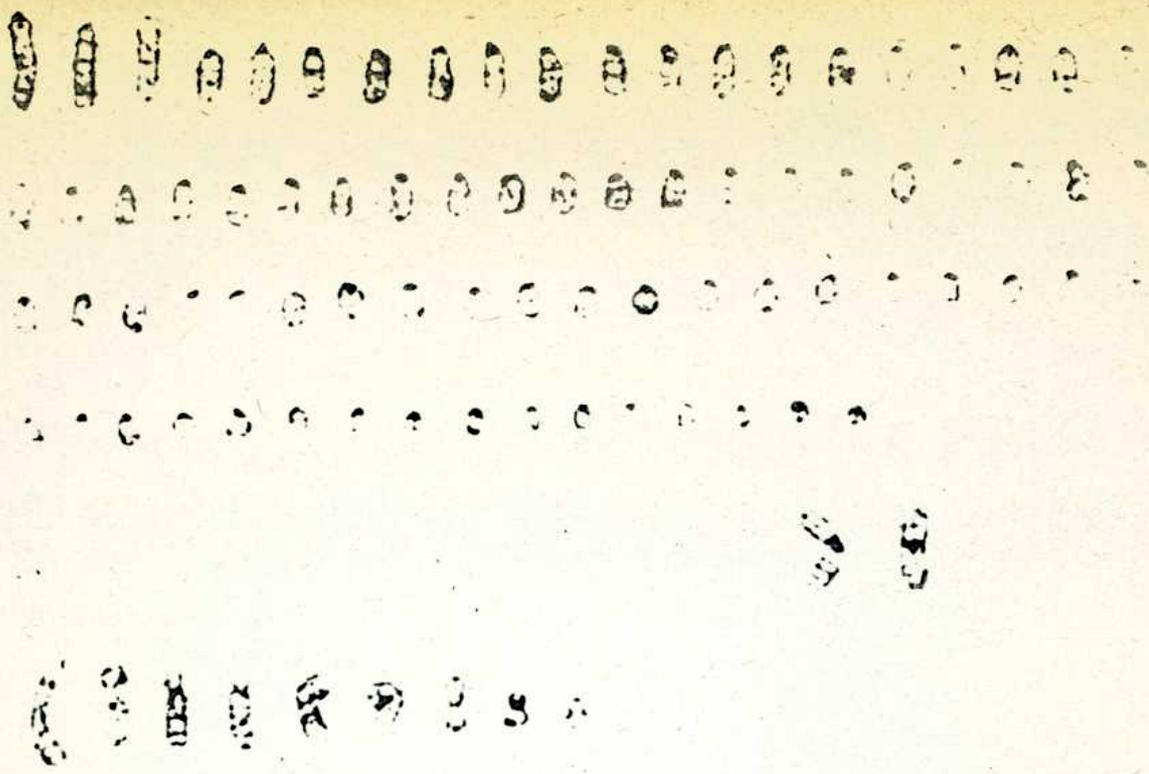


Fig. 6. - Heterocromatina centromérica en una célula HY-CS de 88 cromosomas. Los cromosomas acrocéntricos y meta-céntricos de ratón presentan una densa heterocromatina centromérica, en relación con los 9 cromosomas de hámster situados al pie de la figura. (1200 x).

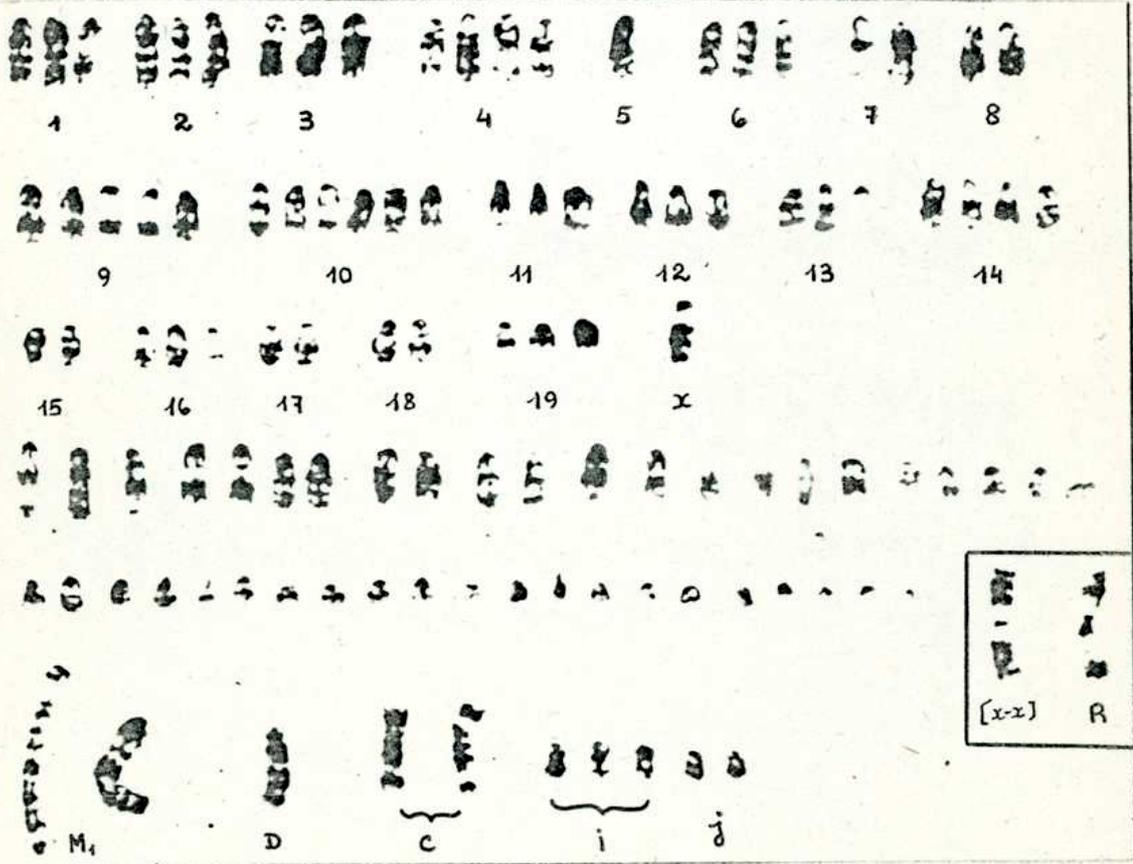


Fig. 7. - Célula HY-CS de 112 cromosomas. 9 de los 10 cromosomas al pie de la foto corresponden al parental hámster DC-3F/ADX/AZA. En el recuadro el cromosoma marcador R de ratón y un otro metacéntrico de ratón neoformado, (x-x). (1200 x).

Figura 8: Representa el idiograma de una célula híbrida de 96 cromosomas. Las tres primeras líneas corresponden a los cromosomas provenientes del parental murino R_4 que han podido ser identificados.

Las 4ta. y 5ta. líneas también agrupan cromosomas de ratón puesto que todos ellos son acrocéntricos. Sin embargo, el número y posición de las bandas, comparadas con los de las 3 primeras líneas y con los cromosomas de R_4 , sugieren que son producto de reordenamientos estructurales.

En el interior del recuadro se indican el cromosoma marcador R y un segundo cromosoma metacéntrico (X-X) que sería resultante de la fusión de dos cromosomas X. La 6ta línea corresponde a los pequeños cromosomas de ratón.

En la última línea se ubican 8 cromosomas de hámster chino, correspondientes a los grupos M_1 , B, C, D, F e I.

Figura 9: Representa el idiograma de una célula de 78 cromosomas. Como en las figuras 9 y 10; las tres primeras líneas representan los cromosomas de ratón identificados. La 4ta línea corresponde a los cromosomas murinos- todos acrocéntricos- en los cuales la posición y número de sus bandas sugieren reordenamientos respecto de la línea R_4 . Los cromosomas pequeños de la 5ta línea serían de ratón. Los metacéntricos R y (X-X) corresponden a los ya citados marcadores. Como en los idiogramas de las figuras anteriores, el cromosoma R presenta una densa región centromérica heterocromática, sugiriendo la persistencia de dos centrómeros. En el cromosoma (X-X) la heterocromatina centromérica más fina indicaría la pérdida de un centrómero.

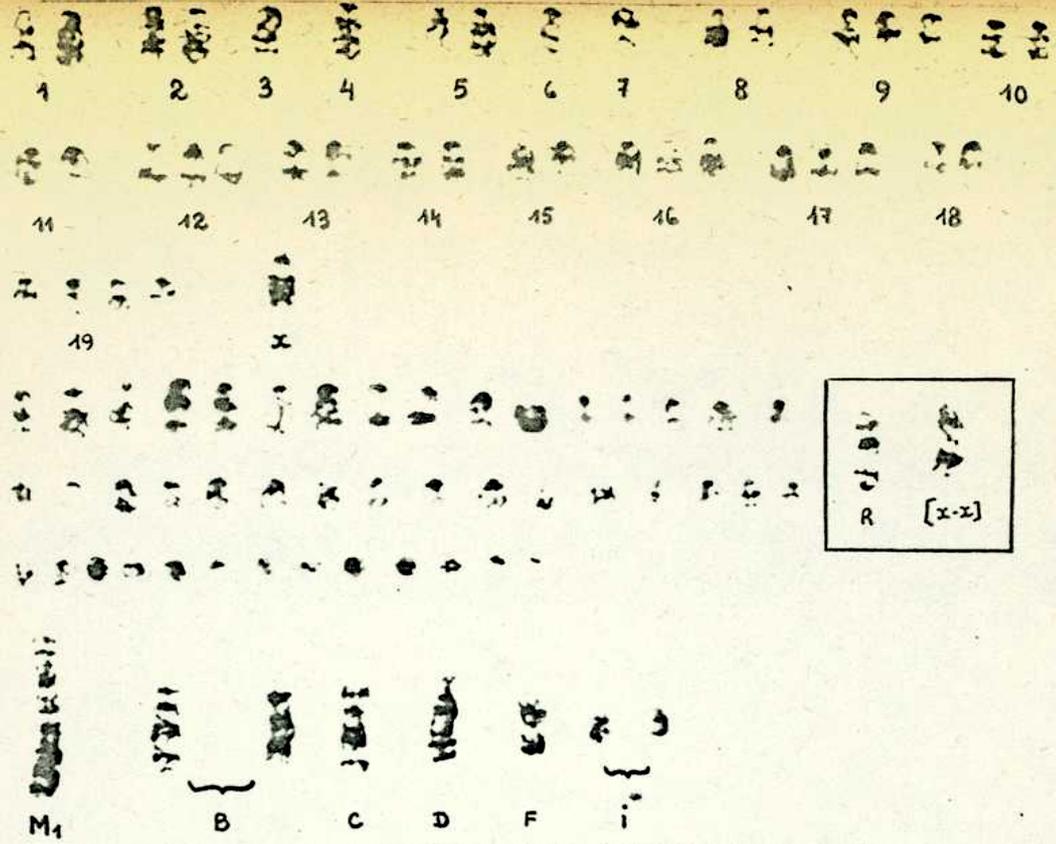


Fig. 8. - Célula HY-CS de 96 cromosomas. Dentro del recuadro el marcador R y el cromosoma (x-x) de la línea R₄-Budr. En la parte inferior de la figura 8 cromosomas de hámster. (1200 x).

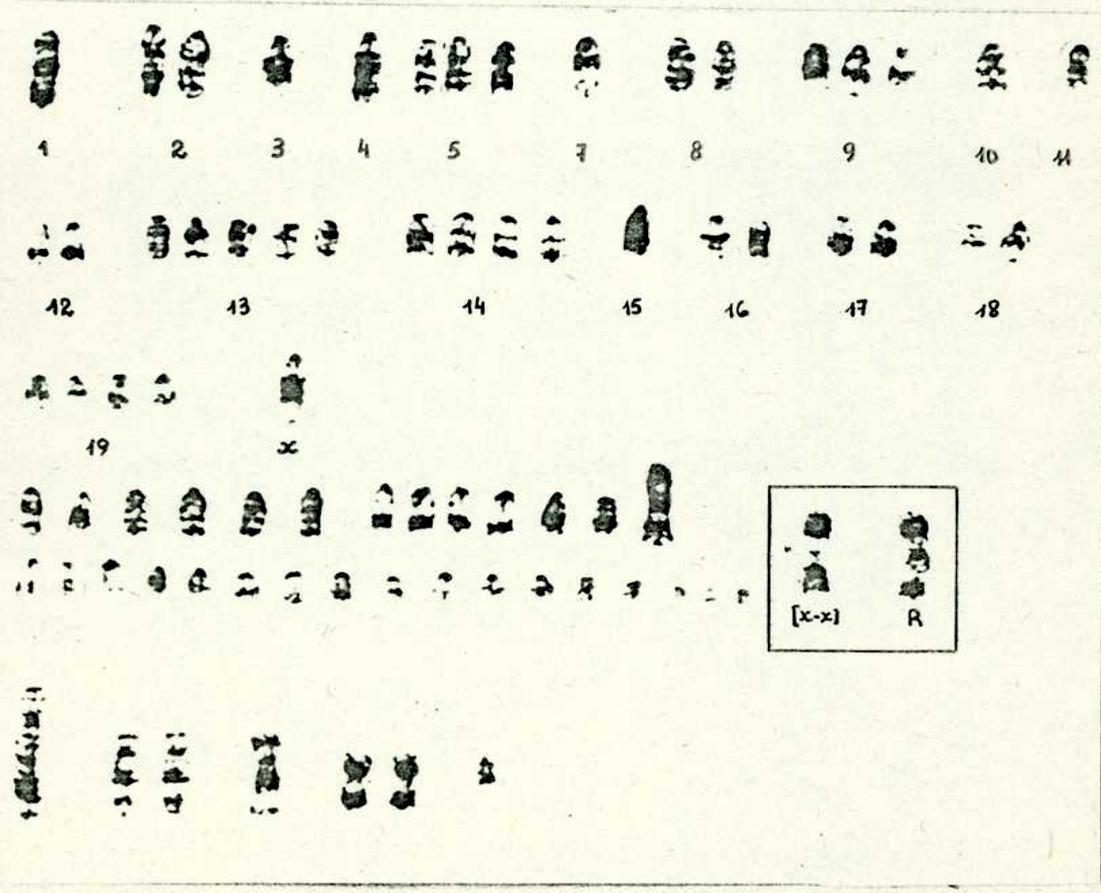


Fig. 9. - Célula Hy-Cs de 78 cromosomas. Se observan los 2 cromosomas metacéntricos de ratón, R y (x-x) y en la parte inferior de la figura, 7 cromosomas de hámster.

Al pie de la figura se hallan 7 cromosomas correspondientes al hamster: M_1 , B, C, F e I.

Figura 10: Corresponde al idiograma de una célula híbrida de 98 cromosomas. Como en las figuras anteriores, los cromosomas numerados son de ratón. Las 4ta y 5ta líneas agrupan los cromosomas de ratón no identificados.

Dentro del recuadro hallamos el marcador metacéntrico murino R, el cromosoma (X-X) y tres nuevos cromosomas de dos brazos resultantes de la fusión céntrica de cromosomas acrocéntricos de ratón. El origen de estos tres cromosomas, de acuerdo a sus bandas, podría ser:

- a) Fusión céntrica del cromosoma 10 y de un pequeño cromosoma indicado con un asterisco.
- b) Fusión céntrica de los cromosomas 9 y 13.
- c) Fusión céntrica de los cromosomas 4.

En la última línea figuran los 6 cromosomas de hamster: M_1 , C, D e I.

Figura 11: Representa el idiograma de una célula de 81 cromosomas. De ellos 41 han sido identificados como pertenecientes al parental R_4 y 31 serían también de ratón pero con cambios estructurales.

Se observan cuatro cromosomas de dos brazos de origen R_4 que serían el resultado de:

- a') Fusión céntrica de un cromosoma 4 y de un pequeño cromosoma indicado con un asterisco.
- b') Fusión céntrica de los cromosomas 12 y 18.
- c') Fusión céntrica de los cromosomas 5 y X.
- d') Fusión céntrica de un cromosoma 12 y de otro de los pequeños cromosomas.

Es decir, entre los cromosomas de dos brazos de origen

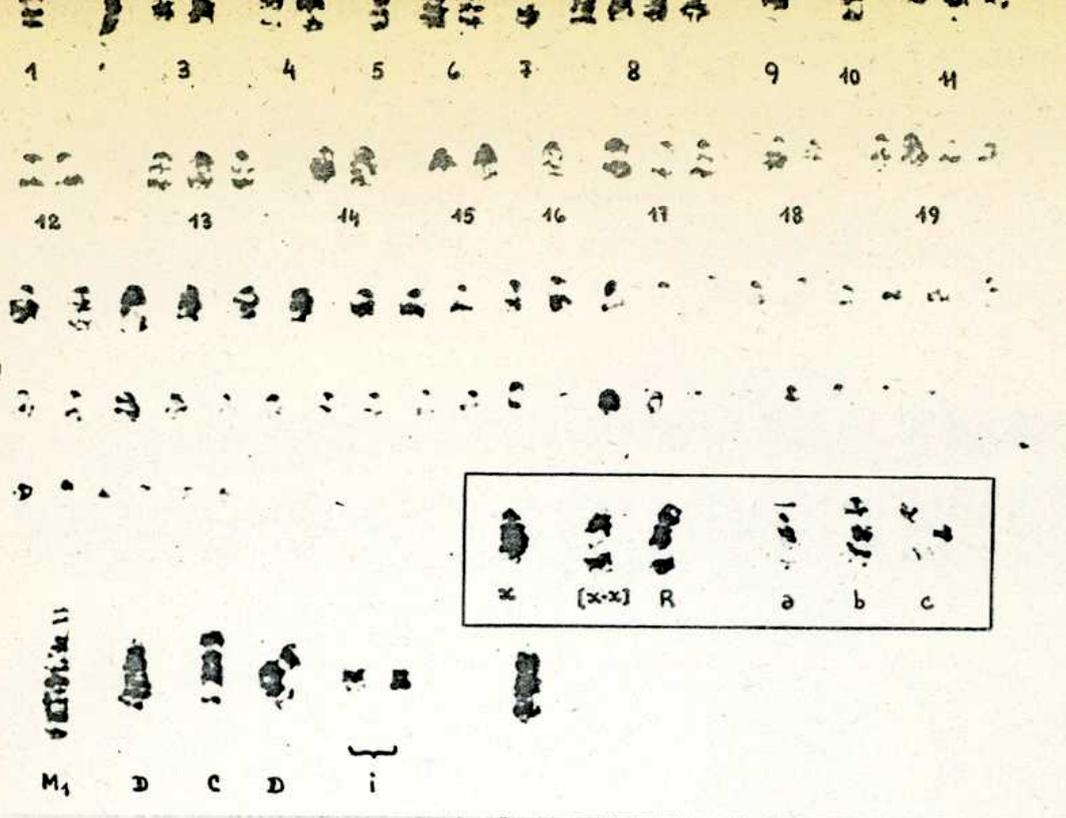


Fig. 10.- Célula HY-CS de 98 cromosomas. Dentro del recuadro, los cromosomas metacéntricos de ratón R y (x-x) y otros 3 cromosomas de 2 brazos también murinos, neoformados por fusión céntrica. Al pie, 6 cromosomas de hámster. (1200 x).

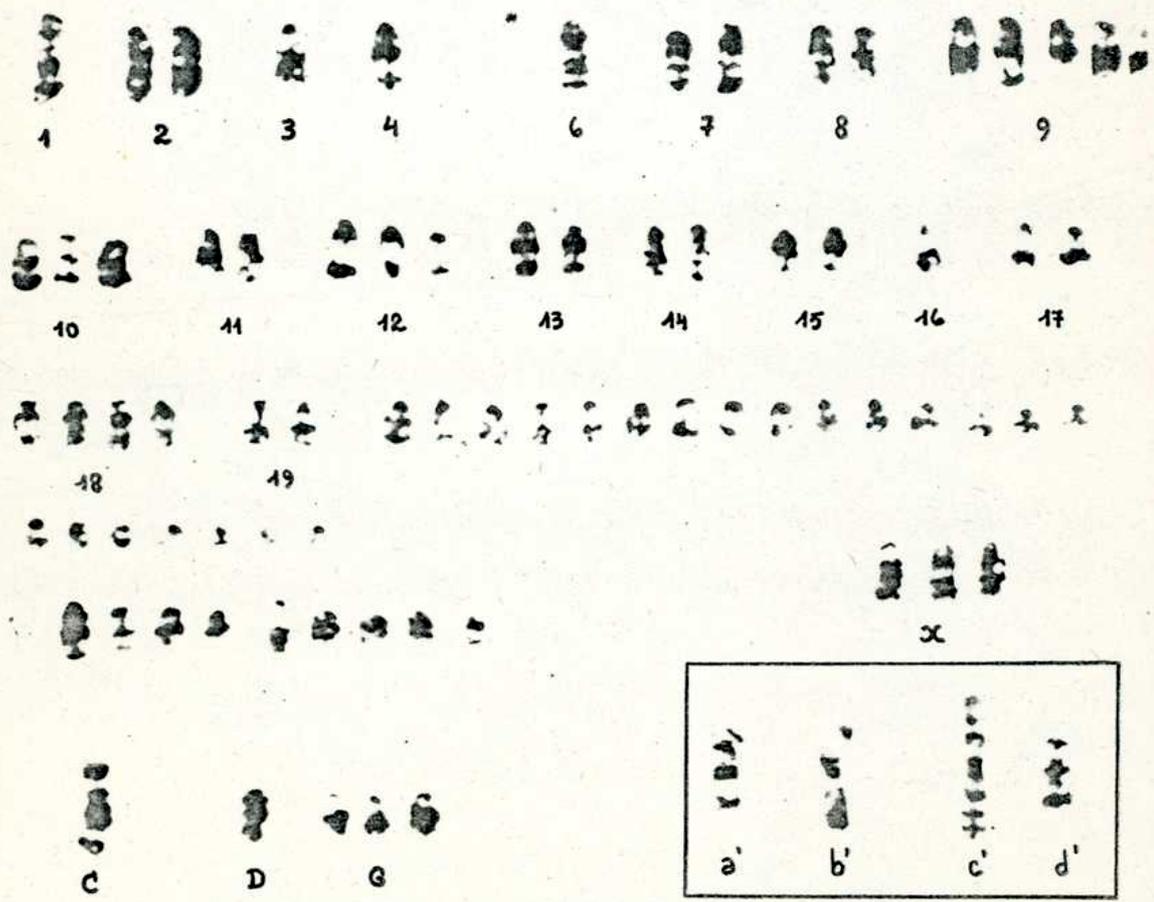


Fig. 11. - Célula HY-CS de 81 cromosomas. Faltan los metacéntricos de ratón R y (x-x), pero se observan otros 4 cromosomas de 2 brazos de origen murino, en el interior del recuadro. C, D y G corresponden al parental hámster.

murino no se encuentran los marcadores R y (X-X), hallados en las figuras anteriores.

Los cinco cromosomas de hámster identificados corresponden a los tipos: C, D y G. El cromosoma D experimentó la pérdida de sus brazos cortos.

Figura 12: Corresponde al idiograma de una célula híbrida de 106 cromosomas. En el interior del recuadro se observan el cromosoma marcador R, el cromosoma (X-X) y un tercer metacéntrico neoformado, resultante de la fusión de 2 acrocéntricos de ratón. Al pie de la foto se hallan 9 cromosomas de hámster.

En este trabajo no pretendemos efectuar el estudio cromosómico completo de este híbrido hamster-ratón, ni el análisis de la segregación de cromosomas de uno u otro tipo. Solamente quisimos identificar los cromosomas de ratón y de hámster presentes en algunas células híbridas mediante la utilización de la técnica del bandeo cromosómico, empleando un criterio crítico que nos permitiera decidir en qué medida esta técnica puede ser de utilidad al estudio de células híbridas.

De las observaciones realizadas con el híbrido HY-CS y las líneas parentales R₄ y DC-3F/ADX/AZA podemos concluir que el análisis citogenético de híbridos mediante esta técnica es efectivo porque:

- 1) Permite el reconocimiento de los cromosomas parentales en las células híbridas, sobre todo aquellos de forma y tamaño parecidos pero de diferente origen cuya identificación no es posible mediante las coloraciones clásicas. Tal el caso de los cromosomas de dos brazos de origen murino que pueden ser diferenciados de los cromosomas de

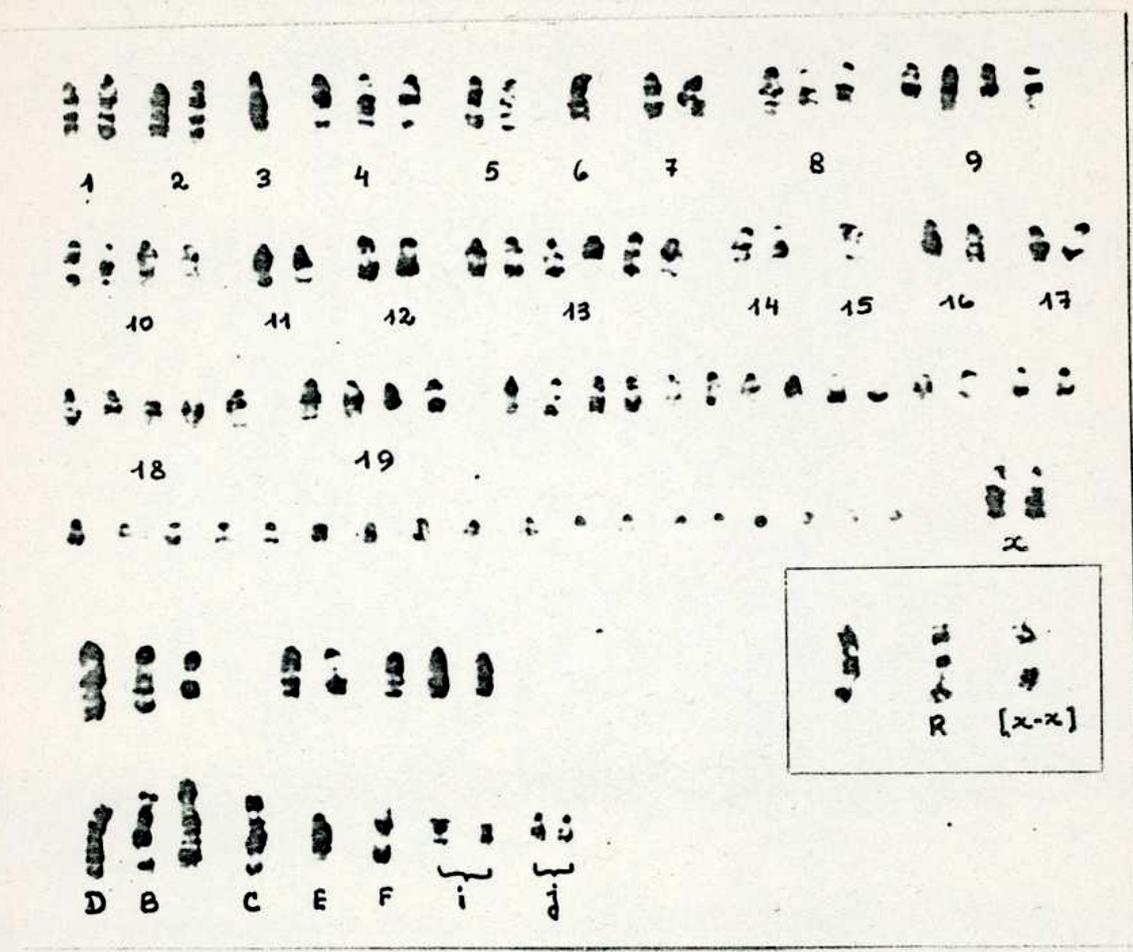


Fig. 12. - Célula HY-CS de 106 cromosomas, donde 9 provienen de la línea parental de hámster. Entre los cromosomas de ratón se observan, en el interior del recuadro, los cromosomas R, (x-x) y un tercer meta-céntrico. (1200 x).

hamster por la densa heterocromatina centromérica.

La identificación de cada uno de los cromosomas parentales en las células híbridas resulta de gran valor, principalmente en los casos en que se trata de relacionar algunas de sus propiedades, tales como la malignidad o ciertas actividades enzimáticas, con la presencia de determinados cromosomas de uno u otro origen.

2) Hace posible conocer cuales son los reordenamientos cromosómicos que ocurren en las células híbridas. En nuestro caso, nos permite saber que en las células HY-CS se produjeron modificaciones cromosómicas estructurales, tales como deleciones de los cromosomas de ratón que llevaron a la aparición de cromosomas acrocéntricos cuyas bandas no coinciden con las de los cromosomas típicos de la línea R₄. También nos indica que en el híbrido se produjeron fusiones céntricas de los cromosomas de ratón que condujeron a la formación de nuevos cromosomas de dos brazos.

En el caso de los cromosomas pequeños de ratón y de hamster esta técnica no se revela tan efectiva, pues la ausencia de bandas o la coincidencia de las mismas en cromosomas de ambos parentales no permite la identificación de los mismos.

Manó

-
Eugenia S. de R. L. de R.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Caspersson, T. y col. Exptl. Cell Res. 65:475 (1971).
- 2) Yoshida, M. Japan. J. Genetics. 45:211 (1972).
- 3) Todaro, G. J. y Green, H. J. Cell Biol. 17:299 (1963).
- 4) Biedler, J. L. y Riehm, H. Cancer Res. 30:1174 (1970).