

10
2 E.J.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO CITOGENETICO DE LA LINEA
CELULAR WRL-68

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A

CARMEN ARELLANO



DIRECCION DE TESIS:

DRA. MA. EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE



MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

241203



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MEJILLÓN

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis.

ESTUDIO CITOGENETICO DE LA LINEA CELULAR WRL - 68

realizado por CARMEN ARELLANO

con número de cuenta 7927125 - 9 , pasante de la carrera de BIOLOGIA.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

DRA. MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

Propietario

DRA. VIRGINIA PALMA PADILLA

Propietario

DRA. REGINA DORINDA MONTERO MONTOYA

Suplente

BIOL. JULIO ALEJANDRO PRIETO SAGREDO

Suplente

M. en C. ALICIA VILLELA GONZALEZ

Edna María Suárez Díaz

Consejo Departamental de BIOLOGIA
DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ

DEDICATORIA

A mi "Peque", siempre estarás en mi corazón.

A Julio por su apoyo, comprensión y amor.

A mis Padres, gracias por darme la vida.

A Lulú, por su apoyo y cariño.

A Juan Pablo y Mario Alberto por la alegría que dan a mi vida

A mis amigos, por todos esos momentos que hemos compartido y que siempre nos unirán.

A Delfina y Anselmo, por sus consejos que siempre guardaré.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte, por la oportunidad que me brindó de realizar este trabajo de tesis bajo su dirección, por su confianza y sobre todo por su apoyo.

A Paty Guzmán, por su dedicación, sus consejos y paciencia.

A Paty Ramírez, Martha Luna, Sra. Delfina, Lilia y Jorge por su colaboración durante la realización de este trabajo.

A los jurados Dra. Virginia Palma, Dra. Regina Montero, M. en C Alicia Villela y Biol. Julio Prieto, por su orientación y correcciones en la revisión de este trabajo.

A los amigos que me apoyaron y alentaron para la realización de esta tesis

Lo más importante, agradezco a todos su amistad.

INDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	2
A. ANTECEDENTES HISTORICOS	2
B. BANDEO CROMOSOMICO	6
1. Bandas Q	7
2. Bandas G	8
3. Bandas R	10
4. Bandas C	11
C. CULTIVO DE TEJIDOS	12
D. HIGADO	17
E. LINEAS CELULARES HEPATICAS	23
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
III. HIPOTESIS	27
IV. OBJETIVOS	28
A. GENERAL	28
B. PARTICULAR	28
V. MATERIAL Y METODOS	29
A. CULTIVO CELULAR	29

B. COSECHA POR TRIPSINIZACION	30
C. COSECHA DE CULTIVO IN SITU .	31
D. PROCESAMIENTO DE LAMINILLAS	31
E. ANALISIS CROMOSOMICO	33
VI. RESULTADOS	34
VII. DISCUSION	43
VIII. CONCLUSIONES	48
IX. BIBLIOGRAFIA	58

INDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRAFICAS

Tabla N° 1. Acontecimientos relevantes en el desarrollo de tejidos de cultivos

Figura N°1. Esquema tridimensional del parénquima hepático

Figura N°2. Esquema de hepatocito aislado

Figura N°3. Fotografía de núcleo poliploide

Tabla N° 2. Cantidad de ADN y complemento cromosómico

Tabla N° 3 Número de células analizadas por pasaje

Figura N°4 Cariotipo con bandas "G"

Figura N°5 Cariotipo de Línea Celular WRL - 68

Figura N°6 Cariograma de Línea Celular WRL-68

Figura N°7 Cariograma de Línea Celular WRL-68

Figura N°8 Cariograma de Línea Celular WRL-68

Tabla N° 6 Principales genes de los cromosomas 1, 7, 9 y 17(q)

Tabla N° 4 Número modal en relación al número de cromosomas

Tabla N° 5 Número de copias de cromosoma de cada pasaje analizado

Tabla N° 7 Análisis de número cromosómico

Tabla N° 8 Frecuencia de Número Modal

Gráfica N°1 Frecuencia de Número Modal

RESUMEN

Los avances en genética y citología aplicados al hombre han generado grandes aportaciones médicas y biológicas, una de ellas, el estudio de cromosomas humanos ha permitido la identificación de enfermedades hereditarias, de padecimientos congénitos, así como la localización de genes.

En este trabajo se realizó el estudio del cariotipo de la Línea Celular WRL-68, aislada de hígado fetal humano aparentemente normal, la que se utiliza como un modelo hepático *in vitro*. Como no existen estudios previos de caracterización cromosómica, el estudio de esta línea celular permite conocer algunos de los cambios que favorecen su “inmortalización”, lo que contribuye a documentar sus características morfológicas y funcionales. Las células se cultivaron en frascos y mediante cultivos *in situ*, analizándose un total de 638 metafases, las que presentaron en su mayoría un cariotipo poliploide, con un promedio de número modal de 79-107 cromosomas

El análisis citogenético mediante el empleo de técnicas de bandeo, permitió determinar que el cariotipo aneuploide está constituido principalmente por varias copias de ciertos cromosomas observándose al mismo tiempo alteraciones estructurales en algunos casos. Se puede concluir que la Línea Celular WRL-68, es un línea que presenta un alto nivel de aneuploidía, con un incremento en el número de copias de los cromosomas 1, 7, 9 y 17(q). Asimismo fue frecuente observar delección de 1p-, 7p-, inv (9) e i (17q). La amplificación génica, que las múltiples copias cromosómicas generan podrían utilizarse en estudios moleculares de los genes involucrados.

I. INTRODUCCION

A. ANTECEDENTES HISTORICOS

En los últimos años los avances en genética y citología han sido aplicados al hombre, abriendo nuevos campos con importantes aportaciones médicas y biológicas. Estos avances han resultado del uso de técnicas más refinadas para el estudio cromosómico, las cuales han permitido realizar adelantos importantes en el estudio de los cromosomas humanos, desde el punto de vista de su identificación en el cariotipo y la localización de genes.

El término cariotipo se refiere al grupo de características que permiten la identificación de un conjunto cromosómico, como el número de cromosomas, su tamaño relativo, la posición del centrómero, largo de los brazos, constricciones secundarias, satélites, etc. Por ello, el cariotipo es característico de cada grupo, género, especie o individuo y se representa por la serie ordenada de los pares homólogos de tamaño decreciente (cariograma)(De Robertis, y De Robertis, 1981).

Históricamente podemos considerar que el estudio de la estructura celular data de 1665, cuando Robert Hooke vió por primera vez, las células en corcho. Posteriormente la primera descripción de cromosomas de células eucariontes apareció entre 1840 y 1880. Virchow en 1857, en células en división, observó los primeros cromosomas humanos, sin embargo su verdadera naturaleza no fue reconocida entonces. En 1874, el científico húngaro von Torok observó los estadios de la mitosis. Los estudios detallados sobre cromosomas humanos

fueron realizados por Arnold en 1879 y Flemming en 1882 creó el término “cromatina” para las porciones del núcleo que se teñían. (Bartolos, 1972; De Robertis et al 1975). Willhelm Roux y Weissman en 1883, Strasburger en 1884 y von Köllicker en 1885, concluyeron independientemente que los cromosomas ubicados dentro del núcleo celular eran los portadores de los factores hereditarios, pero fue hasta 1888 cuando Waldeyer introdujo el término cromosoma (“cuerpo coloreado”) para estas estructuras (Bartolos, 1972; Gardner, 1979).

En 1912 Winiwarter estudió gónadas y concluyó que el cariotipo femenino era de 48 cromosomas y el masculino de 47 cromosomas. Pointer en 1921 con estudios de testículo hace un reporte preliminar del número modal humano entre 46 y 48 cromosomas En 1923 publica un reporte final en el que estableció erróneamente que el cariotipo humano contenía 48 cromosomas, no contando con las técnicas y el material adecuado. Barr y Bertram en 1949, descubrieron accidentalmente la cromatina “X”, realizando experimentos de neurocitología en gatas, que posteriormente se describió como un cuerpo intranuclear localizado generalmente en la periferia del núcleo interfásico de mujeres y ausente en hombres (Aizpuru et al, 1993). En 1955 Levan y Tjio improvisan una técnica corta con tratamientos de hipotonicidad y agregan colchicina para aumentar el número de metafases. En 1956, Tjio y Levan establecen el número diploide correcto de cromosomas en la especie humana con un número modal de 46 cromosomas, formado por 23 pares de homólogos, 44 autosomas más un cromosoma X y un cromosoma Y en el varón (46, XY) y 44 más dos cromosomas X en la mujer (46, XX). Ese mismo año Ford y Hamerton corroboran el número modal humano. En 1959 Lejuene et al, descubrieron en cultivos de fibroblastos un

número modal de 47 cromosomas, debido a la presencia de un cromosoma pequeño y telocéntrico extra, correspondiendo a una trisomía 21 en el Síndrome de Down. Asimismo Jacobs y Strong describieron el primer análisis citogenético de alteraciones en cromosomas sexuales como son el Síndrome de Turner (XO) y Síndrome de Klinefelter (XXY) (De Robertis, 1975; Gardner, 1979).

En 1960 en la Conferencia de Denver se establece la primera nomenclatura para interpretar y reportar cariotipos. Moorhead et al (1960), publican el método de cultivo de linfocitos a corto tiempo. Describe una trisomía del grupo D, que posteriormente se identifica como trisomía 13 descrita por Patau et al. En 1963 en la Conferencia de Londres se acepta oficialmente reorganizar los cromosomas en 7 grupos (A, B, C, D, E, F, G), propuesto inicialmente por Patau en 1960. También en ese año Lejeune observa el primer síndrome que involucra una delección cromosómica llamado Síndrome de Cri du Chat Schroeder et al en 1964 y German et al en 1965, descubren un incremento en la inestabilidad cromosómica en la anemia de Fanconi y en el Síndrome de Bloom respectivamente, mientras que Jacobs asocia psicopatía criminal a hombres XYY. En 1966 en la Conferencia de Chicago se lleva a cabo una revisión de nomenclatura, incluyendo los avances desde 1963. En 1968 Comings discute la hipótesis de un rearreglo de cromosomas humanos en núcleos interfásicos De los años 1968 a 1971 se establecieron las diferentes técnicas de bandeo (Q, G, R, C, etc.), que permitieron identificar los cromosomas por su patrón de bandas y determinar alteraciones cromosómicas de una manera más precisa. En la Conferencia de París de 1971 se establece la primera representación esquemática de bandas. Unos años después, en 1977, en Estocolmo, se estableció el sistema internacional de nomenclatura: "An International

System for Human Cytogenetic Nomenclature” (ISCN, 1978), un documento importante que incluye las principales decisiones de las Conferencias de Denver, Londres y Chicago, permitiendo estandarizar la nomenclatura de la citogenética humana. Se iniciaron trabajos con cultivos profásicos y prometafásicos, para aumentar la resolución de la secuencia de bandas de los cromosomas. Así para 1980 se emite otra publicación oficial “An International System for Human Cytogenetic Nomenclature - High Resolution Banding” (1981). Esta publicación fue bien aceptada por la comunidad científica por los adelantos en bandeado. Los cromosomas son numerados del 1 al 22, “X” y “Y” y su clasificación está basada en el tamaño y proporción de los brazos. En 1984 se realiza una revisión de este Sistema de Nomenclatura y se publica en 1985, con el propósito de mantener todos los enunciados de nomenclatura juntos en un sólo volumen, y realizando algunas correcciones. En 1986 en Berlín, se realizó el 7º Congreso de Genética Humana, reportándose un incremento en la cantidad y variedad de aberraciones cromosómicas asociadas a neoplasias y se consideró que la terminología apropiada para la descripción de estos eventos no estaba considerada en la nomenclatura, por lo que se realizó una publicación titulada “ISCN (1991): Guidelines for Cancer Cytogenetics”. En 1991 en Washington DC, se realizó el 8º Congreso Internacional de Genética Humana, invitando a la comunidad científica a que aportaran sugerencias y modificaciones de una revisión de los acontecimientos de 1985 a 1991. Para 1994, en la ciudad de Memphis se originó un documento que incluía avances de técnicas de hibridación *in situ*, en el que se incorporó toda la revisión de citogenética en cáncer, así como modificaciones y sugerencias que mejoraron las ediciones anteriores de

1978 a 1991, quedando comprendido en un sólo documento publicado como “An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 1995).

En las últimas décadas los avances a nivel molecular han permitido realizar técnicas como hibridación *in situ* que permite detectar secuencias de ácidos nucleicos, tanto de ADN como de ARN en preparaciones citológicas, lo que permite conocer la ubicación de secuencias específicas de ADN a lo largo de los cromosomas, clasificados por su secuencia de bandas G. La metodología actual de hibridización *in situ*, se basa en los trabajos iniciales de Gall y Pardue de 1969 y de Jones en 1970, lo que ha permitido avanzar en el mapeo cromosómico del genoma humano, así como extender su aplicación al de otras especies (Verma, 1987; Rooney, 1986).

B. BANDEO CROMOSÓMICO

Desde finales de los 60's y en la década de los 70's el desarrollo de los métodos citoquímicos en numerosos laboratorios revolucionó el campo de la citogenética. El descubrimiento de ciertas tinciones y pretratamientos produjo un patrón único y consistente de bandas en cromosomas condensados de eucariontes (Bregman, 1990). Una banda es definida como parte de un cromosoma la cual es notablemente distinguible de su segmento adyacente por aparecer más oscura o más clara con una u otra técnica de bandeo (ISCN, 1995).

Los diferentes procedimientos de bandeo cromosómico han permitido realizar notables avances en citogenética clínica y de vertebrados, genética de células somáticas y mapeo cromosómico (Comings, 1978).

Algunos de estos procedimientos de bandeo por ejemplo las bandas G y las bandas Q, facilitan la identificación de cromosomas individuales, otros métodos de bandeo son específicos para ciertos componentes citológicos y bioquímicos. La metodología empleada para evidenciar las bandas conocidas como C tiñe diferencialmente sitios de heterocromatina constitutiva en cromosomas metafásicos. Esta clase de cromatina es normalmente visible solo en interfase y en profase temprana, está concentrada en la región centromérica (de allí el término de bandas C) y es rica en ADN altamente repetitivo (Bregman, 1990).

1. Bandas "Q"

La metodología para evidenciar las bandas Q fue la primera que se describió. Casperson en 1968 obtuvo un patrón de bandeo específico al tratar cromosomas de *Vicia faba* con quinacrina, y en 1970, experimentó con cromosomas humanos. Los cromosomas teñidos con quinacrina muestran una serie de regiones de fluorescencia brillante y opaca a lo largo de los mismos. Este patrón es característico de cada cromosoma y permite su identificación. Estudios realizados por Comings et al, en 1975 indican que el ADN rico en AT tiende a realzar la fluorescencia de quinacrina, mientras el ADN rico en Guanina y Citosina (GC) tiende a suprimir esta fluorescencia. Sin embargo, si bien la variación en la composición de bases del ADN a lo largo del cromosoma puede ser la base primaria para bandas Q, hay evidencias de que las interacciones ADN-proteína pueden también jugar un papel importante de acuerdo con Ellison y Barr (Comings, 1978).

Las bandas Q no son utilizadas para la identificación de cromosomas rutinariamente, pero es una de las técnicas más elaboradas para estudiar los heteromorfismos asociados con cromosomas 3 y 4, cromosomas acrocéntricos y cromosoma "Y". Algunos de estos heteromorfismos son usados como cromosomas marcadores para determinar el origen parental de cromosomas extras en trisomías y en estudios de paternidad (Verma, 1987).

2. Bandas "G"

El bandeo G es una de las técnicas más populares en bandeo cromosómico, los tratamientos con tripsina-giemsá son los más comúnmente utilizados y tienen la gran ventaja de que permite hacer laminillas con buen contraste casi en forma permanente. Se requieren algunos pretratamientos de la preparación y el manejo de la tripsina es un problema frecuente, sin embargo si se usan láminas con tiempo de envejecimiento adecuado se obtienen resultados óptimos (Jonasson, 1986). Su utilización es tan difundida, que la composición funcional así como la estructura de los cromosomas, se describen actualmente teniendo como referencia la localización de estas bandas. Los mecanismos por los cuales se inducen las bandas G aún no se explican completamente. Un papel directo de la tinción de giemsa en producir las bandas G ha sido sugerida por McKay en 1973 y Schuh et al en 1975. Comings (1978) propone que este bandeo ocurre porque el cromosoma metafásico contiene una estructura básica que es realizada por la metodología empleada. Las bandas G son teñidas con giemsa, la cual es una mezcla de azul de metileno, azures B, A, C y tionina. Estos representan la molécula de tiazina con 4, 3, 2, 1 y 0 grupos metilos respectivamente. En algunas ocasiones hay eosina en el colorante. Las tiazinas son moléculas planas cargadas positivamente, que

se unen selectivamente a los grupos fosfatos del ADN. Bignone en 1983, encontró que se puede obtener bandas G sin ningún pretratamiento, variando sólo la concentración y el pH de la solución amortiguadora en que se prepara el giemsa, lo cual no sólo mostraría que la unión colorante-fosfato está implicada, sino también se propone que puede ocurrir una modificación del enrollamiento de las moléculas de ADN superenrolladas durante la interacción ADN-colorante, que puede dar apariencia de BG. Este postulado se ha apoyado porque el patrón de cromómeros en meiosis corresponde exactamente a las BG. Es durante la meiosis que esta observación se puede llevar a cabo porque los cromosomas están varias veces más extendidos que en metafase, lo cual amplifica la visualización de la organización de la cromatina. Estudios de microscopía electrónica, mostraron que cromosomas sin tratamiento alguno se observan uniformes, pero si se tratan con tripsina se ven bandas densas e interbandas menos densas, que puede deberse a un rearrreglo de las fibras de cromatina o a la extracción de cromatina. La determinación de ADN en cromosomas con bandas G indica que hay una mínima pérdida de ADN, debido a un rearrreglo de la cromatina, el cual puede ser ayudado por extracción de Ca^{++} de la cromatina durante el bandeo. Las histonas se han implicado frecuentemente en el mecanismo de bandeo. La exposición de cromosomas con BG a solución de H1 y H2A, suprime el bandeo y disminuye la tinción, con lo que se concluyó que la remoción selectiva de estas proteínas es necesaria para que las BG se tiñan intensamente, sin embargo aunque no se extraigan las histonas, el cromosoma se puede teñir, pero no se obtienen bandas de calidad. Es posible que el ADN de las regiones de interbandas están asociadas con proteínas no histonas. En estudios in vitro con cromatina tratada para bandas G, se descubrieron grupos fosfatos que

permiten su interacción con el colorante. Probablemente las proteínas no histonas que forman el esqueleto de la estructura terciaria de la cromatina, al tratarse con agentes que las desnaturalizan, modifican su estructura y ocultan fosfatos en las interbandas y se ven las bandas G positivas. Todos los tratamientos para bandas G tienen en común la desnaturalización de proteínas o la ruptura de uniones disulfuro (Comings, 1978).

3. Bandas “R”

Las bandas R o bandas inversas (“reversas”) fueron descritas por Dutrillaux y Lejeune en 1971. Esta técnica produce bandas en los cromosomas que son inversas a las bandas Q y G, es decir, aquellas áreas que no se tiñen con estas técnicas, se tiñen intensamente por el procedimiento de bandas R. Se basa en el tratamiento de las preparaciones a altas temperaturas y con varias soluciones amortiguadoras seguidas de una tinción con naranja de acridina o con giemsa (Verma, 1987). Mediante este proceso se desnaturaliza selectivamente el ADN rico en AT de las bandas G y deja el ADN rico en GC de las bandas R en configuración nativa. Otros métodos incluyen tinción con fluorocromos como, cromomicina A3, olivomicina, incorporación de una timina análoga, bromodesoxiuridina (BrdU) en la replicación del ADN durante el período terminal de la fase S (Comings, 1978). Es útil su aplicación especialmente para la caracterización de rearrreglos que incluyen cromosomas del grupo F y G, también recomendada en translocaciones recíprocas para localización de puntos de rompimiento (Verma, 1987). Los cromosomas homólogos presentan mapas de bandas idénticos o muy similares, los cuales permitieron que se

identificaran a los cromosomas por bandas y se establecieran las primeras alteraciones estructurales (Rooney, 1986; Verma, 1987).

4. Bandas "C"

El tipo de secuencias de ADN encontradas en las bandas C fue descubierto durante la localización de ciertas secuencias de bases en el genoma del ratón. Pardue y Gall en 1970, utilizando la técnica de hibridización *in situ* encontraron que el ADN satélite (ADN altamente repetitivo) está localizado en las regiones centroméricas. Desde entonces, hallazgos similares han sido reportados para varias especies de plantas y animales. La técnica de hibridización *in situ*, incluía incubación de ADN satélite radioactivo (frecuentemente ARN radioactivo, que es complementario al ADN satélite) en cromosomas extendidos pretratados con álcali. El álcali desnatura el ADN cromosomal (separa las hebras de la doble cadena), permitiendo al ADN satélite radioactivo hibridizar con las secuencias complementarias del genoma. Los cromosomas extendidos eran expuestos al ADN radioactivo en presencia de solución salina de citratos caliente, la cual provee de condiciones iónicas que favorecen la renaturalización. Después de la hibridación, se hacían autoradiografías y las laminillas se teñían con giemsa (Bregman, 1990). Un importante aporte del estudio de Pardue y Gall fue la observación de que un pretratamiento con álcali, seguido de una incubación en solución salina de citratos caliente, y tinción ordinaria con giemsa podría utilizarse para identificar heterocromatina constitutiva en cromosomas condensados. La técnica de bandas C fue mejorada por Arrighi y Hsu en 1971. Los mecanismos de las bandas C han sido objeto de varias investigaciones, entre ellas la de

Comings 1978, que propone que la tinción diferencial parece estar relacionada con la cantidad de ADN restante en diferentes regiones del cromosoma después del pretratamiento para bandas C. Se ha demostrado que el tratamiento con álcali no sólo desnaturaliza el ADN, sino que remueve cerca del 60% del ADN cromosomal. La mayoría del ADN es extraído de las regiones de no-bandas C, sugiriendo que la tinción de bandas C tiñe más intensamente solamente porque contiene más ADN después de la extracción. Aún no se ha determinado porqué el ADN en las regiones de bandas C es más resistente a la extracción con álcali (Comings, 1978; Bregman, 1990).

Hay dos aplicaciones principales de esta metodología en citogenética clínica; uno es el estudio de marcadores polimórficos. Los homólogos materno y paterno a veces pueden ser distinguidos especialmente, los cromosomas 1, 3, 4, 9, 13, 14, 15, 16, 21, 22. Otra aplicación es en rearrreglos cromosómicos, para tratar de ver si la región heterocromática está involucrada en el rearrreglo (Rooney, 1986), así como en la identificación del cromosoma y polimorfismo de su porción distal (Palma, 1978).

C. CULTIVO DE TEJIDOS

Los estudios citogenéticos requieren de células en proliferación para la obtención de cromosomas metafásicos. Es por ello que tradicionalmente se requiere del empleo de métodos de cultivo de células, que permitan la obtención de una cantidad adecuada de metafases para analizar la estructura cromosómica

Asimismo, mediante modelos que emplean células creciendo y dividiéndose en el frasco de cultivo ("*in vitro*") se pueden investigar las propiedades celulares básicas, cuyo estudio en

todo el organismo sería más difícil, puesto que no todas las células de un tejido suelen comportarse de una manera homogénea. Uno de los principales objetivos de la Biología Celular es comprender un proceso determinado, para lo cual se emplean sistemas *in vitro*, que permiten tener condiciones controladas, quitando la interferencia de todos los demás factores a que pueda estar sometida la célula normalmente dentro de un organismo multicelular complejo (Karp, 1987).

El cultivo de tejidos engloba todas aquellas metodologías que utilizan células en cultivo, ya sea para estudios cromosómicos, para el diagnóstico de enfermedades genéticas de origen metabólico, para estudios bioquímicos o para la resolución de problemas de investigación (Karp, 1987).

Dentro de los principales métodos se encuentran : el cultivo de tejidos, el cultivo de órganos y el cultivo de células.

Para realizar el cultivo de tejidos y de órganos se toman pequeños fragmentos de tejido y se colocan en medio de cultivo en un frasco de cultivo, donde se adhieren e inician su proliferación las células para formar una capa de una sola célula de espesor o monocapa. Algunas células tienen una alta motilidad y empiezan a migrar del fragmento del tejido lo cual permite su disgregación y que rápidamente se inicie su crecimiento.

Para el cultivo celular, el tejido puede ser intencionalmente desorganizado o disgregado con enzimas proteolíticas (tripsina, colagenasa), para separar en forma individual a las células. Ya separadas hay básicamente 2 formas en que pueden cultivarse: una por masa de cultivo,

en que se agrega una gran cantidad de células a un frasco de cultivo, en donde las células se sedimentan en el fondo y forman una capa distribuida de manera relativamente uniforme, la células pueden proliferar y dividirse. El otro tipo de procedimiento es el cultivo clonal, en que se agrega a un frasco un número relativamente pequeño de células, cada una de las cuales queda a cierta distancia entre sí después de sedimentarse y adherirse, formando colonias individuales, que derivan de la misma célula.

Los cultivos de todos estos tipos son llamados Cultivos Primarios y su tiempo de vida es relativamente corto (semanas o meses) (Paul, 1975).

Establecimiento de líneas celulares.

Si las células se dividen repetidamente por un tiempo prolongado y ocupan todo el espacio disponible, fracciones de ellas pueden ser “pasadas” a otros recipientes de cultivo para que continúen proliferando. Inicialmente, se obtienen células en suspensión, utilizando una enzima para disgregarlas (tripsina) y se colocan en un nuevo frasco de cultivo con medio fresco, reiniciando su proliferación. Como resultado de este proceso haber generado un “pasaje”, el cultivo es designado como línea celular primaria. Estas células tienen un rango de división alto y por un tiempo prolongado, pudiendo ser pasadas o subcultivadas repetidamente. Después de un gran número de pasajes algunas líneas celulares pueden ser cultivadas por mucho tiempo y aparentemente desarrollan un potencial de ser subcultivadas indefinidamente. Estas líneas celulares son llamadas líneas celulares establecidas

Para ser designada línea celular establecida, ésta debe haber sido subcultivada por lo menos unas 70 veces en intervalos de 3 días entre subcultivos (Paul, 1975). En algunos casos la

transición de línea celular primaria a línea celular establecida es uniforme y gradual, siendo muy difícil señalar cuando cesa una línea celular primaria y cuando inicia una línea celular establecida.

Las líneas celulares primarias preservan muchas de las características de las células de las cuales son derivadas, mientras las líneas celulares establecidas frecuentemente varían de su célula de origen. Todas las líneas celulares primarias al inicio tienen un número normal de cromosomas, manteniendo su cariotipo diploide, por el contrario las líneas celulares establecidas invariablemente siempre tienen un número inusual, comúnmente presentan un cariotipo aneuploide. La presencia de aneuploidías es aparentemente debido a una no disyunción durante la división celular, y esto parece proporcionar a las células alguna ventaja selectiva. En estadios tempranos de una línea celular establecida el número de cromosomas puede ser anormal, pero la morfología individual del cromosoma es aparentemente normal, sin embargo, posteriormente como resultado de rompimientos cromosómicos, fusiones, translocaciones, etc., la morfología del cromosoma es irreconocible (Paul, 1975; Karp, 1987)

En la Tabla N° 1 se presentan algunos de los hechos sobresalientes en el desarrollo del cultivo de tejidos, por orden cronológico.

TABLA N° 1

ACONTECIMIENTOS RELEVANTES EN EL DESARROLLO DE TEJIDOS DE CULTIVOS	
1885	Roux : Mantuvo células de embrión de pollo en solución salina, sobreviviendo fuera del cuerpo del animal.
1907	Harrison : Cultivó cordón espinal de anfibio en coágulo de linfa, con lo cual demostró que los axones son producidos como extensiones de una célula nerviosa.
1910	Rous : Induce un tumor usando extracto filtrado de células de tumor de pollo, más tarde mostró que contenía ARN viral (virus del Sarcoma de Rous).
1913	Carrel : Muestra que las células de tumor de pollo crecerían en cultivo por períodos largos, alimentadas regularmente en condiciones asépticas.
1948	Earle y colaboradores : Aislaron células individuales de la línea celular L y mostraron que formaban clones de células en cultivo de tejidos.
1952	Gey y colaboradores : Establecieron una línea celular continua de células derivadas de un carcinoma cervical humano, que es la bien conocida Línea Celular HeLa.
1954	Levi - Montalcini y asociados : Mostraron que el factor de crecimiento del nervio estimuló el crecimiento de axones en cultivo de tejidos.
1955	Eagle : Realizó la primera investigación sistemática de los requerimientos nutricionales esenciales de las células en cultivos de tejidos y encontró que las células animales podrían propagarse en una mezcla definida de moléculas pequeñas.
1956	Puck y asociados : Seleccionaron mutantes con requerimientos de crecimiento alterados de cultivos de células HeLa.
1958	Temin y Rubin : Desarrollaron un ensayo cuantitativo para la infección de células de pollo en cultivo con virus de Sarcoma de Rous purificado. En décadas posteriores, las características de esta y otros tipos de transformación viral fueron establecidas por Stoker, Dulbecco, Green y otros virologistas.
1961	Hayflick y Moorhead : Mostraron que los fibroblastos humanos morían después de un número finito de divisiones en cultivo.
1964	Littlefield : Introdujo medio HAT para el crecimiento selectivo de células somáticas híbridas, junto con la técnica de fusión celular, haciendo factible el estudio de la genética de células somáticas Kato y Takeuchi : Obtuvieron una planta de zanahoria completa de una célula de raíz de zanahoria en cultivo de tejidos.
1965	Ham : Introdujo un medio libre de suero, capaz de mantener el crecimiento clonal de ciertas células de mamíferos.
1968	Augusti - Tocco y Sato : Adaptaron una célula nerviosa de tumor de ratón (neuroblastoma) a cultivo de tejidos y aislaron clones que fueron eléctricamente excitables y que extendieron el proceso nervioso. En este tiempo, también otras líneas celulares fueron diferenciadas y aisladas, incluyendo línea celular esqueleto-muscular y de hígado.
1975	Kohler y Milstein : Produjeron el primer anticuerpo monoclonal secretado por líneas celulares de hibridomas.
1976	Sato y asociados . Publicaron el primero de una serie de artículos que muestran las necesidades de las diversas líneas celulares de diferentes mezclas de hormonas y factores de crecimiento en un medio libre de suero.

(Tomado de Alberts, B. et. al. 1989)

D. HIGADO

En virtud de que este trabajo fue realizado en una línea celular hepática que mantiene algunas de las características del tejido que le dió origen, es apropiado describir de manera breve algunas características importantes del hígado humano.

El hígado es la glándula más grande de todo el organismo, pesa aproximadamente de 1.5 a 2.0 k, tiene una consistencia blanda y se encuentra en el hipocondrio derecho. Se trata de una glándula epitelial que realiza funciones dobles, tanto exocrinas como endocrinas (Lesson, 1981) y también es un órgano que interviene en las conversiones metabólicas. Se clasifica como glándula exocrina, porque uno de sus productos (la bilis) se secreta hacia el duodeno a través de un sistema de conductos excretorios, y es endocrina porque la mayoría de sus productos se secreta directamente hacia el torrente sanguíneo (Ross, 1994).

Está formado por un parénquima y un estroma. El primero es de índole epitelial y deriva del endodermo; el estroma está compuesto de tejido conectivo y deriva del mesodermo (Ham, 1975).

Los hepatocitos o células parenquimatosas, están dispuestos en una serie de láminas que se anastomosan o ramifican, formando una trama esponjosa o laberinto entre la que se encuentran los espacios sinusoidales. Estas láminas se extienden de la periferia del lobulillo clásico a la vena central en forma radial. Excepto en los sitios de anastomosis y ramificación, el espesor de las capas suele ser unicelular, cualquier hepatocito está rodeado por muchos otros en cada lámina. Alrededor de las zonas portales, los hepatocitos están dispuestos a manera de una capa unicelular en sentido adyacente al tejido conectivo periportal, llamada capa limitante. La lámina limitante está integrada por células un poco

menores que los hepatocitos en el centro del lóbulo y está perforada por vasos sanguíneos (ramas de la arteria hepática y la vena porta) y por ramas de los conductillos biliares (Lesson, 1981) (Fig. 1).

Los hepatocitos tienen forma poligonal con seis o más caras, por lo regular de 20 a 35 micras de tamaño y con una membrana celular clara y precisa. Totalizan el 80% de la población celular del hígado. Esta célula posee una gran diversidad funcional que suele ser delatada por sus características citológicas. El núcleo es en general esférico u ovoide y central (Fig. 2).

Muchos hepatocitos (más del 50%) son poliploides, contienen dos (ó más) veces la cantidad normal de ADN y existe una correlación entre el tamaño del núcleo y la ploidía (Ross, 1994), (se esquematiza en la Tabla N° 2, De Robertis, 1981). Al observar al microscopio óptico resulta fácil reconocer algunos núcleos más grandes, que corresponden a células tetraploides u octaploides. Muchos hepatocitos son binucleados, en ellos los núcleos son del mismo tamaño. Estos núcleos presentan uno ó más nucléolos y grumos cromatínicos (Ross, 1994). Pocas veces se encuentran mitosis en hepatocitos adultos pero en el período de regeneración después de una lesión existen numerosas formas mitóticas (Fig. 3).

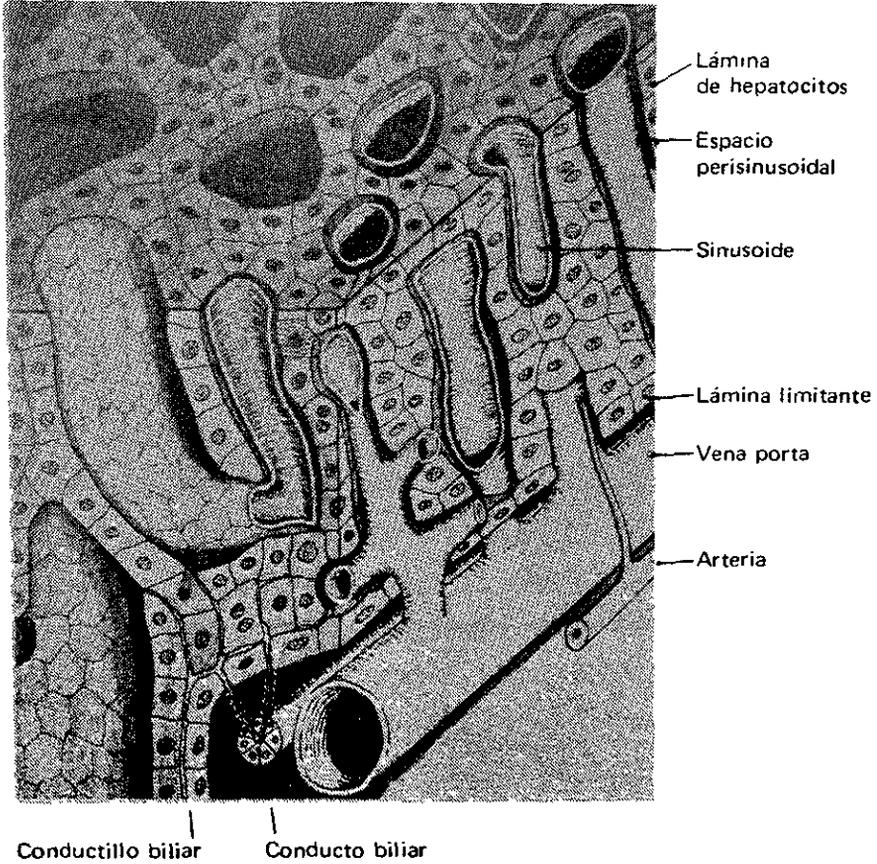


Fig. 1 ESQUEMA TRIDIMENSIONAL DEL PARENQUIMA HEPATICO

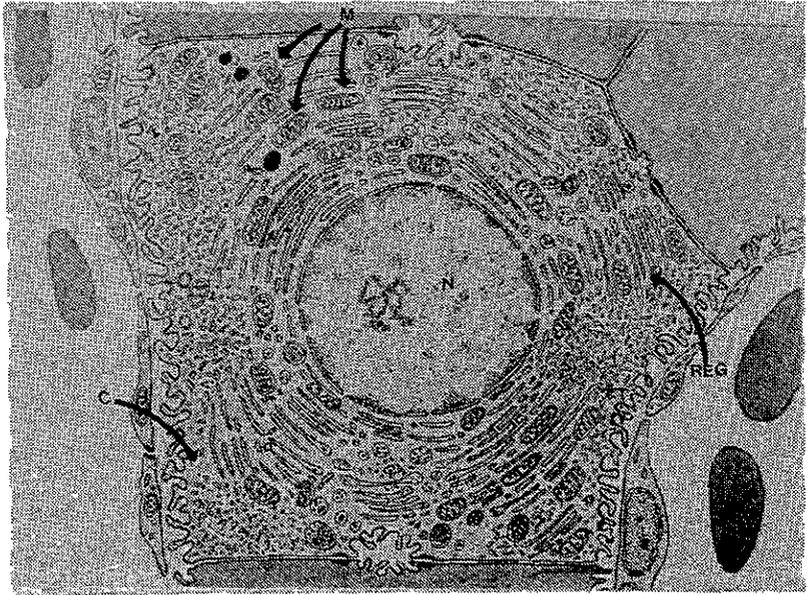


Fig. 2 ESQUEMA DE UN HEPATOCITO AISLADO.

El hepatocito en este corte tiene cinco caras, observándose el núcleo (N) y sus componentes. En el citoplasma (C) se aprecia gran número de cisternas del retículo endoplásmico granular (REG), mitocondrias (M) y otros microcuerpos.

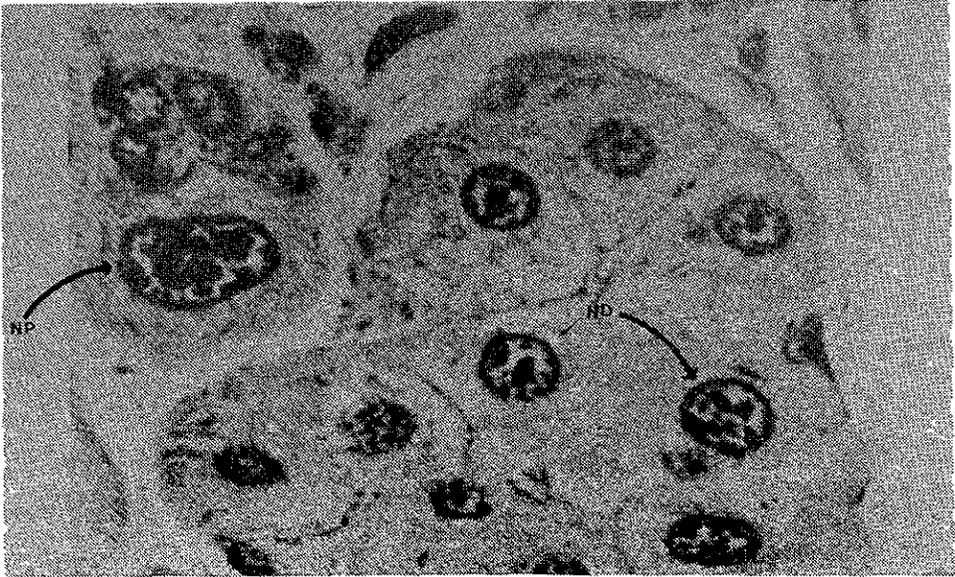


Fig. 3 FOTOGRAFIA DE UN HEPATOCITO DE HIGADO NORMAL.
Se observan núcleos diploides (ND) y un núcleo poliploide (NP).

Tabla N° 2

Contenido de ADN y complemento cromosómico

CONTENIDO DE ADN EN PICOGRAMOS Y COMPLEMENTO CROMOSOMICO (De Pollister, Swift y After)		
CELULAS	TERMINO MEDIO ADN - FEULGEN	CONJUNTO DE CROMOSOMAS ATRIBUIDOS
Espermátida	1,68	Haploide (n)
Hígado	3,16	Diploide (2n)
Hígado	6,30	Tetraploide (4n)
Hígado	12,8	Octaploide (8n)

(Tomado de De Robertis, E.D.P., 1981)

El estroma del hígado está formado por dos partes principales. En primer lugar, el hígado está cubierto de una cápsula de tejido conectivo delgado que contiene fibras colágenas dispuestas regularmente y fibroblastos dispersos, cubierta por una capa de células mesoteliales. En segundo lugar a nivel del hilio del hígado el tejido conectivo de la cápsula se continúa con el que rodea los conductos portales. (Ham, 1975).

El hígado es esencial para la vida y entre la funciones que desempeña las más importantes son:

- Síntesis y secreción de proteínas (albúmina, protrombina, fibrinógeno)
- Formación y secreción de la bilis (reciclado debido a la circulación enterohepática)
- Metabolismo (incluida la destoxicación) de fármacos liposolubles y esteroides
- Síntesis del colesterol
- Síntesis y secreción de lipoproteínas
- Metabolismo de glúcidos
- Formación de urea a partir del ión amonio (ciclo de la urea)
- Conservación de la concentración de glucosa sanguínea
- Almacena vitaminas A, B y heparina
- Hemopoyesis en el feto y el recién nacido

E. LINEAS CELULARES HEPATICAS

A continuación se describen algunas características de las líneas celulares hepáticas humanas más conocidas:

- PLC/PRF/5 (células de Alexander) : Se deriva de un hepatoma humano. El medio común para su propagación es Earle's MEM, con aminoácidos no esenciales y Earle's BSS 90%; suero fetal bovino 10%. Contaminada con micoplasma y secreta antígeno de superficie de hepatitis B. Las células producen Alfa 2-macroglobulina, Alfa1-antitripsina, transferrina, ceruloplasmina, plasminógeno, Complemento C3, Alfa1-ácido glicoproteína (ATCC 1988).
- SK-HEP-1 : Aislada en 1971 por G. Trempe y L. J. Old, de un adenocarcinoma de hígado. No caracterizada (ATCC 1988).
- CLCL : Se obtuvo de hígado de embrión humano. El medio común para su propagación es Eagle's MEM con Earle's BSS 90% y suero fetal bovino 10%. Se depositó en ATCC para su patente. Viable para su distribución, pero no ha sido caracterizada. Reconstituida tiene sólo 7 - 8 pasajes (ATCC 1988).
- Chan liver : Caracterizada por Institute for Medical Research, Camden, New Jersey , así como American Type Culture Collection. Esta línea fue establecida en cultivos de monocapa, con un medio consistente de suero humano 20%, extracto de embrión de pollo 5%, solución salina balanceada 75% y 0.001% de tripsina cristalina. Posteriormente se adaptaron a medio basal Eagle 90%, y suero de carnero 10%. Esta línea ha sido utilizada ampliamente en investigaciones de virología y bioquímica. Fue remitida a ATCC en 1962, en el pasaje aproximado de 250. El análisis del cariotipo

reveló una frecuencia cromosómica en 47 células de $2n=46$. Ocasionalmente se observaron rearrreglos estructurales con nuevos tipos de cromosomas. Presentando un cariotipo inestable dentro del número de la línea original. En estudios de esterilidad fue negativo a mycoplasma, bacterias y hongos. Es susceptible a polivirus tipo 1, 2, 3, adenovirus tipo 3 y virus de estomatitis vesicular (ATCC 1988).

- Hep 3B : Esta línea se estableció de una biopsia de tumor de hígado de un niño de raza negra de 8 años, de Estados Unidos en 1976. Presentando características morfológicas y forma celular epitelial compatible con células parenquimatosas de hígado. Se utilizó como medio común de propagación Eagle's MEM con aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y Earle's BSS 90%, suero fetal bovino 10%. Un estudio ultraestructural de las células con técnicas de microscopía electrónica reveló células con prominentes cisternas del retículo endoplásmico granuloso, una cantidad moderada de mitocondrias, membrana anillada y se observaron agregados de glucógeno en el citoplasma (Aden et al 1979). Se encontró un cariotipo con promedio de 60 cromosomas, con una subpoblación tetraploide $\bar{X}=82$, conteniendo ambas líneas un rearrreglo característico del cromosoma 1. Las células producen Alfa-fetoproteína, Albúmina, Alfa 2-macroglobulina, Alfa 1-antitripsina, Transferrina, Alfa 1-antiquimiotripsina, Heptaglobina, Ceruloplasmina, Plasminógeno, Complemento (C3), Activador C'3, Fibrinógeno, Alfa 1-ácido glicoproteína, Alfa 2-HS glicoproteína, Beta-lipoproteína, Gc-globulina y Proteína de unión al retinol. Contiene integrado el genoma del virus de Hepatitis B, por lo que debe ser manejada como un material biológico de alto riesgo. Es una línea tumorigena (Knowles, 1980).

- Línea Hp G2: Esta línea fue derivada de una biopsia de tumor de hígado (hepatoblastoma), obtenida durante una lobectomía de un hombre caucásico (argentino) de 15 años, en 1975. Se utilizó como medio de propagación Eagle's MEM con aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y Earle's BSS 90%, suero fetal bovino 10%, después de establecida la línea se cultivo por varios meses. Presenta características morfológicas y forma celular epitelial compatibles con parénquima de hígado. Histológicamente la biopsia de hígado reveló un carcinoma hepatocelular bien diferenciado con patrón trabecular (Aden et al, 1979). Presenta una \bar{X} =55 cromosomas (50 a 56). Las células producen Alfa-fetoproteína, Albúmina, Alfa 2-macroglobulina, Alfa 1-antitripsina, Transferrina, Alfa 1-antiquimiotripsina, Heptaglobina, Ceruloplasmina, Plasminógeno, Complemento (C3,C4), Activador C'3, Fibrinógeno, Alfa 1-ácido glicoproteína, Alfa 2-HS glicoproteína, Beta-lipoproteína, y Proteína de unión al retinol. No es una línea tumorigena (Knowles, 1980).
- Línea WRL-68: Esta línea fue registrada por Apostolov en 1976, patentada con el No. 3 935 066 y depositada en ATCC con la clave CL48. Es una línea celular aislada de hígado fetal humano aparentemente normal, preservando las características del hígado. Su patente establece que en crecimiento con medio de cultivo forma colonias individuales o pequeños grupos; su morfología es similar a la de hepatocitos de hígado humano; su tiempo de proliferación no es más de 24 hrs ; incrementa su producción de glucógeno en la presencia de glucosa 1% en el medio; son capaces de soportar virus en preparación de vacunas. En cultivos de esta línea se han reportado características morfológicas de estructura similar a hepatocitos y cultivos primarios hepáticos. Se observa un arreglo

típico poligonal, detectándose algunas células redondas en cultivos de baja densidad, con estudios microscópicos a mayor aumento se observa núcleo prominente redondo y de forma oval, conteniendo uno o más nucléolos, algunas células binucleadas y citoplasma granular y denso. El análisis ultraestructural con microscopio electrónico revela que el tamaño de células en crecimiento en capas delgadas, corresponde a un cultivo de células epiteliales; tamaño y forma del núcleo similar a células en cultivo, así como organelos intracitoplasmáticos, mitocondrias con aspecto estándar, lisosomas en estado primario y secundario (inactivos o activos digiriendo elementos celulares); se observan también numerosos filamentos o proyecciones celulares que forman un patrón extracelular característico. Estudios del citoesqueleto de las células WRL-68, indican que por lo menos presenta cuatro principales proteínas de citoqueratinas de peso molecular de 45 000, 46 000, 48 000 y 50 000 Da y en menor proporción una de 54 000 Da (Gutiérrez-Ruiz et al, 1993).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La WRL-68 es una línea celular aislada de hígado fetal humano aparentemente normal, que se utiliza como un modelo hepático *in vitro*. El establecimiento de una línea celular se asocia con modificaciones en la forma y número cromosómico, que no han sido estudiados en este caso. El estudio del cariotipo de esta línea celular permitirá caracterizar algunos de los cambios que favorecieron su “inmortalización” lo que contribuirá a documentar sus características morfológicas y funcionales.

III. HIPOTESIS

- La células de la línea celular WRL-68 presentarán alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales que permitieron su inmortalización.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La WRL-68 es una línea celular aislada de hígado fetal humano aparentemente normal, que se utiliza como un modelo hepático *in vitro*. El establecimiento de una línea celular se asocia con modificaciones en la forma y número cromosómico, que no han sido estudiados en este caso. El estudio del cariotipo de esta línea celular permitirá caracterizar algunos de los cambios que favorecieron su “inmortalización” lo que contribuirá a documentar sus características morfológicas y funcionales.

III. HIPOTESIS

- La células de la línea celular WRL-68 presentarán alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales que permitieron su inmortalización.

IV. OBJETIVO

A. General:

1. Optimizar la metodología de cultivo que permita un mejor análisis del cariotipo de la Línea Celular Hepática WRL-68 para su estudio cromosómico.
2. Determinar el complemento cromosómico de la Línea Celular Hepática Fetal Humana WRL- 68.

B. Particular:

2. Identificar por medio de diferentes técnicas de bandeo, las alteraciones cromosómicas existentes.

V. MATERIAL Y METODOS

A. Cultivo Celular.

Para este estudio se utilizaron células de la línea celular hepática fetal humana WRL-68, proporcionadas por el Laboratorio de Fisiología Celular del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Se trabajó con los pasajes del 131 al 136.

Para el cultivo de células se utilizaron frascos Falcon, cajas de Petri de 35 mm y placas de 6 pozos, los dos últimos con cubreobjetos estériles. Las células se mantuvieron en medio Dulbecco (DMEM), con 8% de suero fetal de bovino, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de antibióticos (estreptomicina y penicilina) (Gutiérrez-Ruiz, 1994), realizándose cambios de medio cada 2 días. Se utilizó un microscopio invertido de contraste de fases para observar el crecimiento celular y determinar el momento de su cosecha cuando se observaran abundantes figuras mitóticas (las células en división adquieren un aspecto redondeado y refringente). Los cultivos se mantuvieron en incubadora a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 95% de aire.

Para el procesamiento de los pasajes 131 al 133, la línea celular se cultivó en frascos Falcon y para los pasajes 134 al 136 se emplearon las dos metodologías de manera paralela.

B. Cosecha por tripsinización.

Cuando el cultivo se encontraba con abundantes células en división, aproximadamente a los 7 días de sembrado, se procedió a su cosecha con el propósito de obtener células en metafase para su posterior análisis cromosómico.

A los cultivos en frascos Falcon se les retiró el medio de cultivo; la monocapa se lavó con 5 ml de solución STF (solución amortiguadora de fosfatos) estéril, la que se retiró por decantación para agregar 1 ml de tripsina (Sigma 1:250) a una concentración final de 0.005%. Los frascos se incubaron durante 1 min a 37°C. La eficiencia del tratamiento enzimático se determinó en un microscopio invertido de contraste de fases de acuerdo al número de células despegadas. Para detener la acción de la tripsina se agregaron 5ml de solución STF. Se colocó la suspensión celular previamente tripsinizada en un tubo cónico a la que se agregaron 0.5 ml de colchicina (10 µg/ml), con el fin de detener la división celular en metafase. El botón se resuspendió suavemente y se dejó 60 min incubando a 37°C en baño María. Para terminar el tratamiento de colchicina se centrifugó la suspensión durante 10 min a 200 x g, se retiró el sobrenadante y se agregaron 5 ml de solución hipotónica (KCl 0.075 M, previamente calentada a 37°C), se resuspendió y se incubó 40 min a 37°C. Finalmente las células se centrifugaron durante 10 min a 200 x g, se extrajo el sobrenadante y se agregaron 5 ml de fijador Carnoy (metanol-ácido acético 3:1), resuspendiendo muy suavemente la pastilla celular. Después de 15 minutos se hicieron 3 a 4 cambios de fijador hasta que se observó una pastilla celular limpia. En el último lavado se quitó el exceso de fijador y se gotearon 0.5 ml de Carnoy recién preparado para realizar las preparaciones citogenéticas.

C. Cosecha de cultivo *in situ*

Los cultivos en caja de Petri de 35 mm y en placa multipozos se cosecharon después de 24-48 hrs de siembra. De igual manera que el método descrito arriba, se utilizó el microscopio invertido de contraste de fases para observar la presencia de figuras mitóticas y proceder a realizar cosecha *in situ* en el momento más adecuado, de acuerdo a Verma y Babu (1987) con algunas modificaciones. El cultivo se incubó durante 50 min con 0.2 ml de colchicina (10 µg/ml) a 37°C. Se extrajo la solución de incubación y se agregaron 3 ml de solución hipotónica KCl 0.075M en la cual se incubaron a 37°C durante 40 min. Al término de esta incubación se agregaron 2 ml de fijador de Carnoy durante 2 min. El fijador se cambió dos veces más, para finalmente removerlo con una pipeta Pasteur y secar los cubreobjetos con aire comprimido para romper membrana celular y extender las metafases. Se utilizó un microscopio para determinar la calidad de las preparaciones. Las más adecuadas para el análisis citogenético se colocaron en una estufa a 60°C durante 48-72 hrs, para posteriormente realizar las técnicas de bandeo.

D. Proccsamiento de laminillas

Del botón o pastilla celular obtenido de la cosecha por tripsinización, se realizaron las preparaciones por goteco, como se menciona a continuación. Se utilizaron portaobjetos previamente lavados y desengrasados en alcohol al 70%. En portaobjetos secos se depositaron dos gotas del botón celular previamente resuspendido. La calidad de las preparaciones se determinó en un microscopio de contraste de fases. Al igual que en el caso

anterior las preparaciones se mantuvieron a 37°C durante 7 días ó a 60°C durante 48-72 hrs para posteriormente practicar técnicas de bandeo.

1. Técnica de Bandas “Q”

En esta técnica sólo se utilizaron laminillas provenientes de cultivos *in situ*. Cada laminilla se incubó en calor para posteriormente colocarla en quinacrina (0.125 gr + 25 ml H₂O destilada) durante 10 min; se enjuagó brevemente en agua de la llave, para quitar el exceso de tinción. Se colocó en STF pH 5.6 por 1-2 min; se montó en un portaobjetos con algunas gotas de la solución amortiguadora, quitando el exceso y se examinó inmediatamente al microscopio de fluorescencia.

2. Técnica de Bandas “G”

Las preparaciones maduras en incubadora se sometieron a tratamientos con tripsina disuelta en STF (0.03g de tripsina (Sigma 1:250) en 50 ml de STF pH 7.0) durante 30 seg a 1 min; las preparaciones se enjuagaron brevemente en STF pH 7.0 y en agua destilada para ser teñidas en gicmsa al 10% en STF pH 6.8. El exceso de colorante se quitó con lavados de agua de la llave y se dejaron secar al aire. Una vez secas se les protegió mediante la colocación de un cubrecubjetos y se examinaron al microscopio óptico con objetivos de 40 y 100 aumentos.

3. Técnica de Bandas “C”

Se colocaron las preparaciones en una solución de HCl 0.2 N durante 30 min, se dejaron secar al aire y después se colocaron en solución de Ba(OH)₂ al 5% a 37°C durante 30 minutos. Se enjuagaron vigorosamente en agua corriente y se colocaron en solución 2XSSC (solución salina de citratos) a 62°C durante 2 hrs se enjuagaron en agua destilada y se teñieron con giemsa al 10% en STF pH 6.8.

E. Análisis Cromosómico

Del material obtenido, se procedió a su análisis empleando los siguientes criterios: se revisaron un total de 638 metafases (Tabla N° 7), de las cuales se analizaron 22 células del pasaje 131, 96 células del 132, 70 células del 133, 150 células del 134, 150 células del 135 y 150 células del 136 (Tabla N° 3). Estas preparaciones fueron teñidas con giemsa y se registró el número cromosómico en cada una de las metafases identificadas.

La resolución de bandas del análisis fue entre 300 a 450 (ISCN, 1995) (Fig. 4). El número de metafases analizadas con BG fue de 10-15 células en los pasajes 133, 134, 135 y 136; de los pasajes 131 y 132 debido a los procedimientos realizados, no se analizaron bandas G.

VI. RESULTADOS

De las dos metodologías utilizadas: a) El cultivo en frasco tipo Falcon y b) El cultivo *in situ*, el que mejor resultado ofreció fue el cultivo *in situ*, del cual se obtuvieron un número mucho mayor de metafases, observándose una mejor morfología y calidad de los cromosomas lo que favoreció la implementación de las técnicas de bandedo, a diferencia del cultivo en frasco en el cual se realizó cosecha por tripsinización obteniéndose una menor cantidad de metafases y una mayor pérdida de cromosomas, lo cual se debió probablemente a la manera en que se maneja la suspensión celular en este caso. Otra ventaja del cultivo *in situ* fue el menor tiempo de cultivo requerido para la obtención de un número adecuado de metafases, ya que en el cultivo en frasco, el período para obtener un crecimiento satisfactorio de células fue entre 5 y 7 días, mientras que en el cultivo *in situ* esto se lograba en sólo 24 a 48 hrs, dado lo reducido de la superficie en la que se realizó el cultivo.

El análisis de las preparaciones teñidas convencionalmente con giemsa reveló que la mayoría de las células tienen un cariotipo poliploide. El promedio de los números modales de los pasajes (Tabla N° 8), fue de 79-107 cromosomas, este resultado al correlacionarlo con la tabla N° 4 de números modales (ISCN,1995) referente al nivel de número modal de la célula, podemos clasificarlo dentro del grupo N° Próximo-Tetraploide (92+/-) que comprende de 81 cromosomas como mínimo a 103 cromosomas como máximo. La distribución de frecuencias de los números de cromosomas encontrada en este estudio se presenta en la Gráfica N° 1, en donde se observa que la mayor parte de la población celular

se distribuye entre los 79 y 107 cromosomas, lo que corresponde con el grupo modal antes citado.

El análisis citogenético de la Línea Celular WRL-68 mediante Bandas G (GTG), permitió identificar que el cariotipo aneuploide está constituido principalmente por varias copias de ciertos cromosomas y algunas alteraciones estructurales. En la Fig. 5 y la Fig. 6, se ilustran el cariotipo y el cariograma de una metafase de esta línea.

El número de copias de cada cromosoma presente en las metafases analizadas con bandas G, no fue el mismo en todos los pasajes revisados. Los cromosomas estaban representados por una, dos, tres y hasta 9 copias. Los cromosomas con mayor número de copias fueron el N° 1, 7 y 9 con patrón de BG normal, así como una inv(9) presente en todas las células (Fig. 6f, 7f y 8f). Además, el cromosoma 17 presentó copias con patrón normal y de 2 a 5 copias de un isocromosoma de brazos largos i (17q) en todas las células (Fig. 6g, 7g y 8g). También se observaron numerosas copias de los cromosomas N° 10, 12, 16, 20 y 21, los que se repitieron 5 ó más veces. Los cromosomas N° 8, 11, 18, 19 y 22 sólo presentaron de una a tres copias como máximo en las metafases analizadas.

Haciendo una descripción de los hallazgos más relevantes referentes a alteraciones presentes en los cromosomas (Tabla N° 5), se encontró que en el cromosoma N° 1, además de varias copias con patrón normal de BG, se observó una deleción de brazos cortos del(1)(qter→p11:) (Fig. 6a, 7a y 8b), presente en todas las células, variando de una a dos

copias. El cromosoma N° 2 presentó una $\text{del}(2)(\text{qter} \rightarrow \text{p12:})$ (Fig. 7b) en algunas de las copias, también presentó una $\text{del}(2)(\text{pter} \rightarrow \text{q31:})$, con un tamaño menor de lo normal de brazos largos (Fig. 6b, 8c). El cromosoma N° 3, al igual que el anterior presentó una $\text{del}(3)(\text{pter} \rightarrow \text{q11:})$ (Fig. 6c, 7c y 8d), con una o dos copias en la mayoría de las metafases. Los cromosomas 1 y 3 estuvieron involucrados en algunas células en una translocación $\text{t}(1;3)(\text{q10;p10})$ (Fig. 8a). Los cromosomas N° 4 y 5 aparentemente no presentaron alteraciones estructurales, únicamente varió el número de copias presentes en el cariotipo. El cromosoma N° 6, además de presentar de 3 a 6 copias con patrón de BG normales, se observó en algunas células una deleción de brazos largos $\text{del}(6)(\text{pter} \rightarrow \text{q11:})$. El cromosoma N° 7, además de variación en el número de copias, se observó en una de las copias una probable deleción de brazos cortos, $\text{del}(7)(\text{qter} \rightarrow \text{p15:})$ (Fig. 6e, 7d, 8e) presente en todas las células analizadas. El cromosoma N° 8 presentó solamente de una a cuatro copias normales en todos los pasajes. En el cromosoma N° 9 se identificaron cromosomas con patrón de bandas normal y también una inversión de éste, $\text{inv}(9)(\text{p11q12})$ (Fig. 6f, 7f y 8f) en todas las células. El cromosoma N° 10 se observó normal, sólo con diferencia en número de copias. El cromosoma N° 11, presentó monosomía o dos copias como máximo. Cromosoma N° 12 normal, con copias en diferente número. En los cromosomas N° 13, 14 y 15, no varió en más de 3 copias de cada cromosoma, aunque el cromosoma 14 presentó en algunos casos monosomía. El cromosoma N° 16 presentó un número variable de copias (4 a 6 copias) mientras que del N°17 se encontraron varias copias con patrón normal y la presencia de dos a cinco copias de un isocromosoma de brazos largos - $\text{i}(17)(\text{qter} \rightarrow \text{q10::q10} \rightarrow \text{qter})$ (Fig. 6g, 7g y 8g). Los cromosomas N° 18 , 19 y 22 únicamente

presentaron 2 a 3 copias no detectándose alteraciones, 20 y 21 sólo variaron en cuanto a número de copias. Respecto a cromosomas sexuales, sólo se identificó un Cromosoma "X", con una sola célula que presentó 2 copias, (Fig. 6) lo cual no permitió identificar el sexo cromosómico de la Línea Celular WRL-68. Se observaron algunos cromosomas que no se identificaron plenamente, los cuales se agruparon como frag(?) (Fig.6, 7), encontrados en la mayoría de las metafases analizadas, en algunas ausentes y en otras con 1 ó 2 copias. Finalmente se agruparon como no identificados a aquellos cuyo patrón de bandas no se pudo clasificar como perteneciente a alguno de los grupos descritos anteriormente, estos probablemente sean rearrreglos con interacción de varios cromosomas. (Fig. 6, 7 y 8)

Resultados con bandas "C" y bandas "Q" no se pudieron obtener , debido a que las preparaciones no tenían una buena calidad de bandeado. Probablemente el manejo de las técnicas no fue el adecuado.

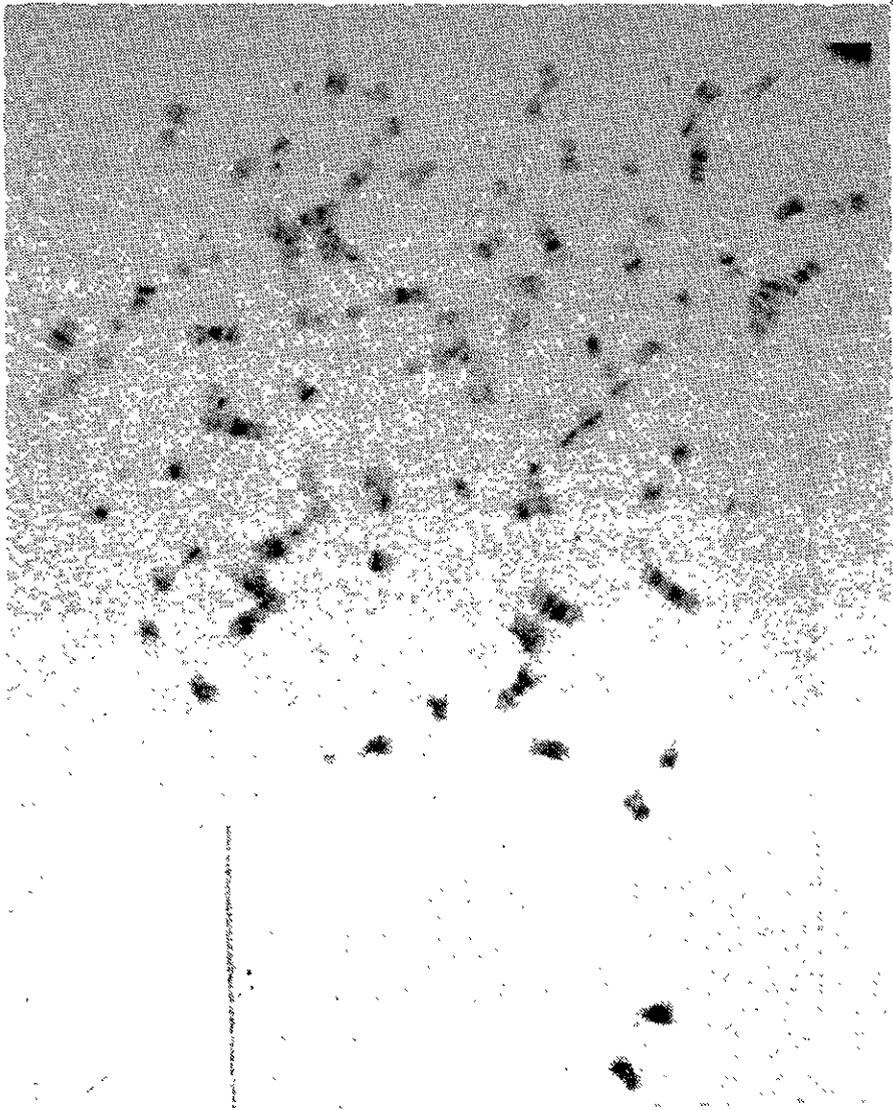


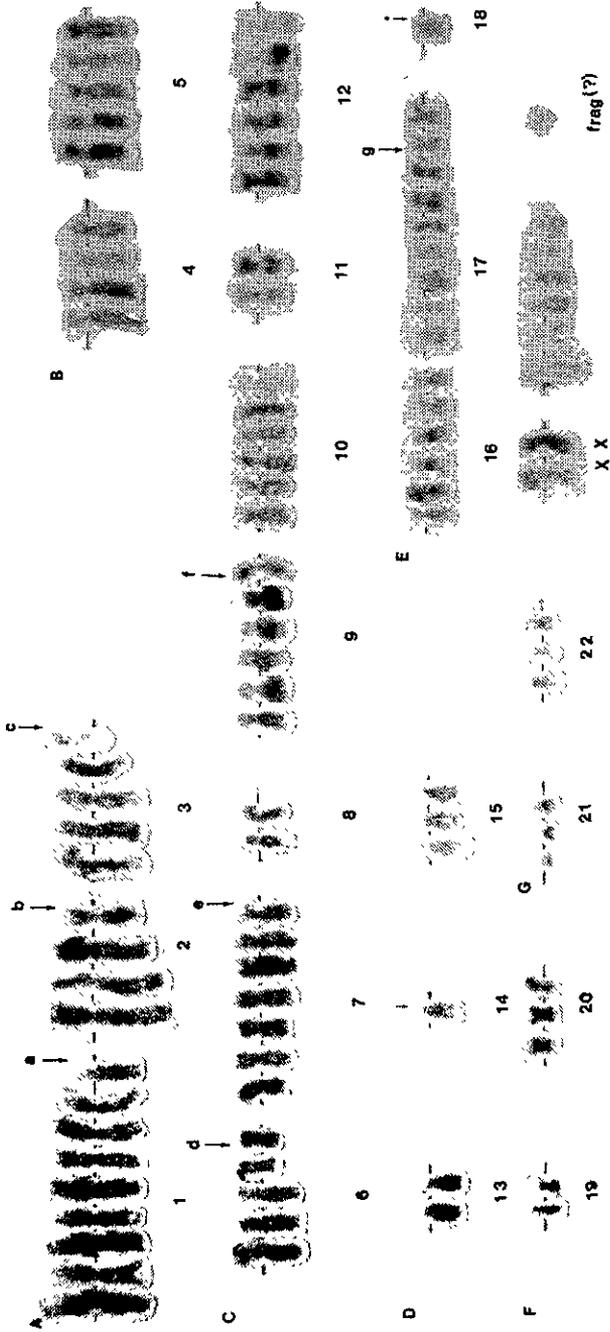
Fig. 4 CROMOSOMAS DE LA LINEA CELULAR WRL-68, CON BANDAS "G"



Fig. 5 CARIOTIPO DE UNA METAFASE DE LA LINEA CELULAR WRL-68

Fig. 6

CARIOTIPO
LINEA CELULAR WRL-68

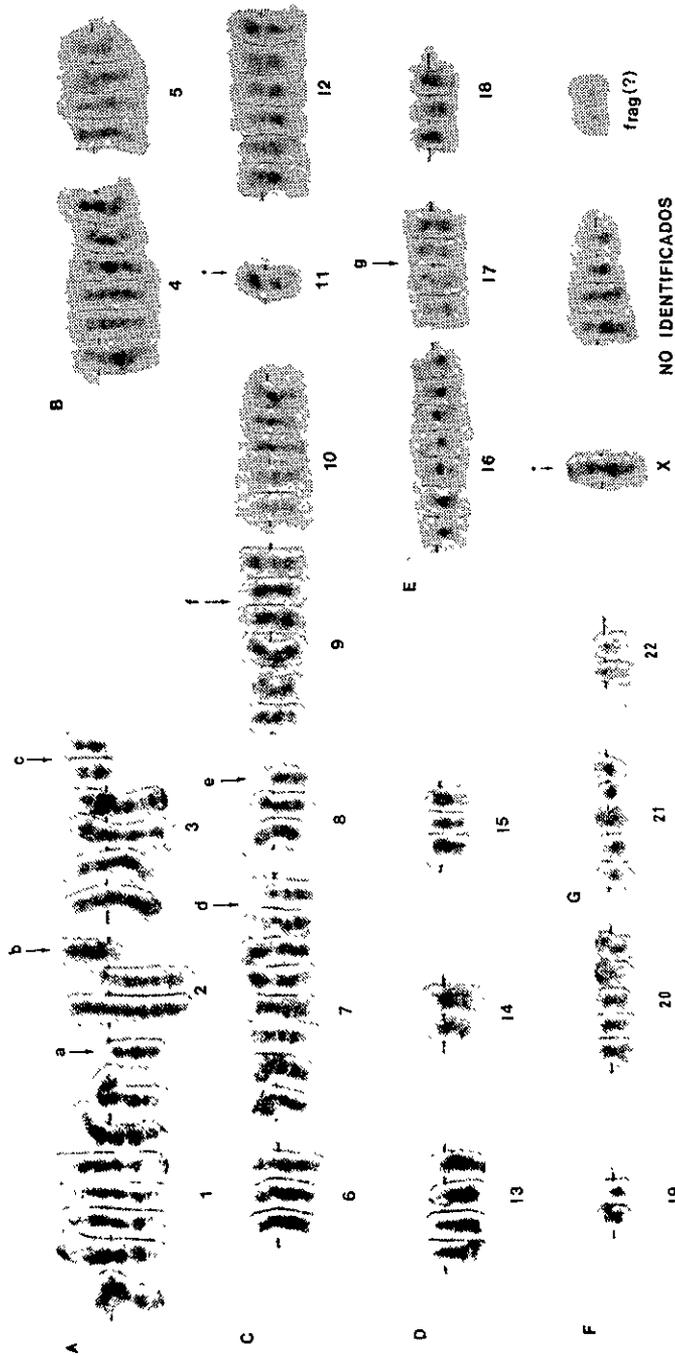


- a del(1)(qter-p15)
- b del(2)(pter-q3t)
- c del(3)(pter-q1t)
- d del(6)(pter-q4t)
- e del(7)(qter-pt5)
- f inv(9)(p1q12)
- g i(17)(qter-q10-q10-qter)
- monosomia

FIG. 7

CARIOTIPO

LINEA CELULAR WRL-68

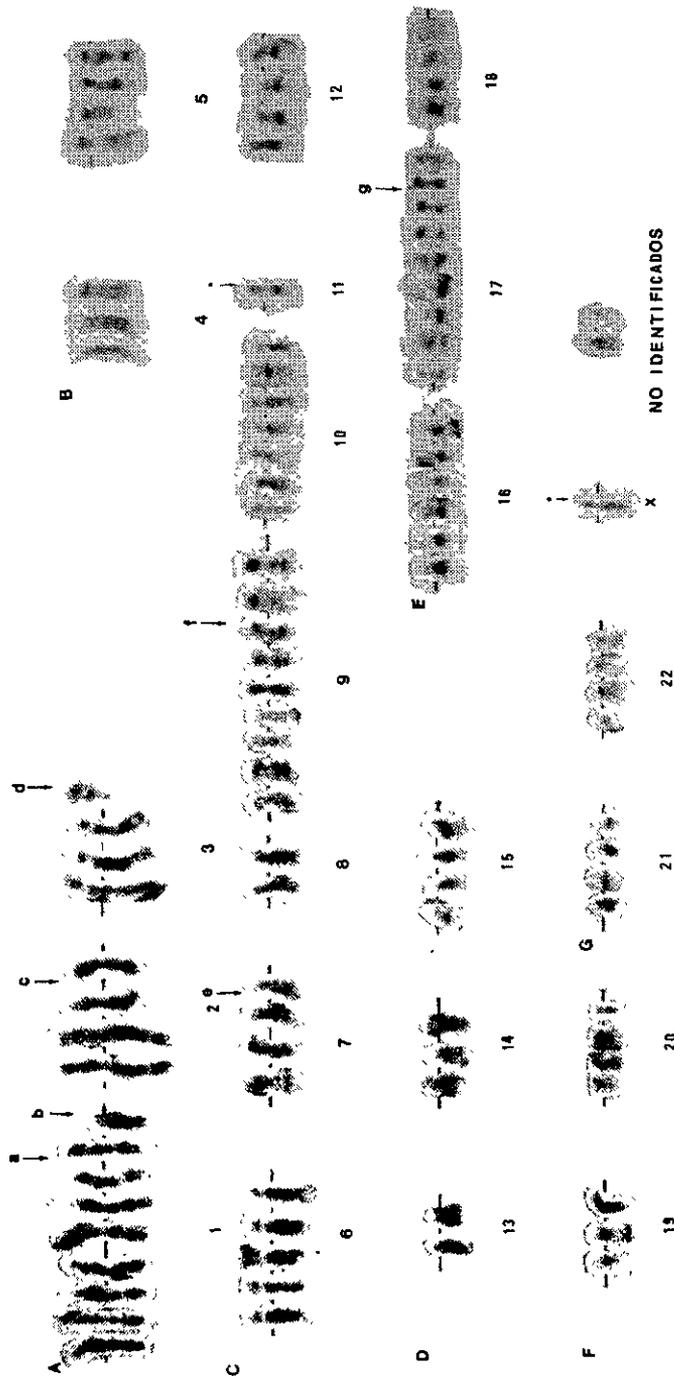


NO IDENTIFICADOS

NO MODAL: 103 cromosomas

CARIOTIPO

LINEA CELULAR WRL-68



- a t(1;3)(q10;p10)
- b del(1)(qter-p11)
- c del(2)(pter-q3f)
- d del(3)(pter-q11)
- e del(7)(qter-p15)
- f inv(9)(p11q12)
- g f(17)(qter-q10::q10--qter)
- * monosomia

VII. DISCUSION

Estas observaciones concuerdan con las reportadas por Paul (1975) el que menciona que en las líneas celulares primarias se mantiene el número de cromosomas normal $2n$ mientras que en las líneas celulares establecidas tienen comúnmente un cariotipo aneuploide, con un extenso número de cromosomas.

En relación con otras líneas celulares hepáticas el número y la morfología cromosómica también presenta variaciones. Mientras que en la Línea Chang Liver se reporta una frecuencia cromosómica de $2n=46$ con rearrreglos ocasionales en la estructura (ATCC, 1988), en la Línea Hep 3B se encontró un cariotipo con promedio de 60 cromosomas, con una subpoblación tetraploide, observándose en ambas líneas un rearrreglo característico del cromosoma No. 1 (Knowles, 1980). Para la Línea Hp G2 se reportó un promedio de 50 a 56 cromosomas en su cariotipo (Knowles, 1980), sin describir rearrreglos.

A pesar de que la Línea Celular WRL-68 tiene un cariotipo anormal la morfología de la célula es aparentemente normal y de acuerdo a reportes de Paul (1975), la aneuploidía (debido a la no disyunción en la división celular) parece proporcionar alguna ventaja selectiva a las células. Otro aspecto importante también es que a pesar del número de cromosomas, la morfología de los cromosomas es aparentemente normal, aunque en algunos casos como resultado de rompimientos cromosómicos, translocaciones, deleciones

y fusiones la morfología de algunos de ellos puede ser irreconocible (Paul, 1975)(Karp, 1987).

Cabe hacer mención que las alteraciones numérica encontradas en esta Línea no se pueden considerar como una indicación de malignidad celular, puesto que no se trata de una línea tumorigénica, sino mas bien como una ventaja selectiva para su inmortalización, tomando en cuenta que se originó de un tejido hepático fetal normal. Resulta importante recordar que las células hepáticas son en un 50 % tetraploides (Ross, 1994), por lo que no sería inesperado encontrar este número cromosómico en líneas celulares hepáticas, sobretodo si ellas fueron las que originaron la línea celular.

En relación a la presencia de los cromosomas sexuales, se ha observado la pérdida de estos cromosomas en el transcurso de los pasajes. En un estudio citogénico realizado en Líneas Celulares de ratón por Sargent et al (1996), encontraron que el cromosoma Y se perdió en forma consistente en el pasaje 7. En la línea WRL-68 no se pudo determinar, porque se inicio el estudio en el pasaje 131, en que se observó un sólo cromosoma sexual.

La presencia de numerosas copias de los cromosomas 1, 7, 9 y 17(q) en todas las células constituiría una evidencia de la presencia de la ampliación de copias de los genes que portan estos cromosomas, como los que se mencionan en la siguiente tabla :

Tabla N° 6

Cromosoma 1	Cromosoma 7	Cromosoma 9	Cromosoma 17(q)
<p>Ciclina p58</p> <p>Receptor del factor de necrosis tumoral 2R(TNF2)</p> <p>Antígeno CD-30 (Ki-1)</p> <p>5-hydroxytryptamina receptor de serotonina 1D</p> <p>Citocromo 4B (CYP4B1)</p> <p>Oncogen MYCL1</p> <p>Oncogen JUN</p> <p>Interleucina 10 (IL-10)</p> <p>Oncogen NRAS</p> <p>Tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2)</p> <p>Proteína quinasa, AMPc, dependiente, catalítico, beta</p> <p>Sitio frágil, tipo atidicolina, común fra(1)(p36)(FRA1A)</p> <p>Descarboxilasa uroporfirinógeno</p>	<p>Citocromo 3A (CYP3A)</p> <p>Interleucina 6 (IL-6)</p> <p>Modulador de la Aril carbon hidroxilasa (AHR)</p> <p>Citocromo oxidoreductasa (POR)</p> <p>Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)</p> <p>Factor de crecimiento alfa polipéptido</p> <p>Receptor Aril-hidrocarbón</p> <p>Sitio frágil, atidicolina, común, fra(7)(p14.2)(FRA7C)</p> <p>Sitio frágil, tipo atidicolina, común, fra(7)(p13)(FRA7D)</p> <p>Factor de crecimiento de hepatocito</p> <p>Sitio frágil, tipo atidicolina, común, fra(7)(q21.2)(FRA7E)</p> <p>Citocromo P450, subfamilia IIIA (nifedipina oxidasa)(CYP3A4)</p> <p>Fritropoyetina</p>	<p>Grupo C de complementación de anemia de Fanconi</p> <p>Tioridexoma (TXM)</p> <p>Grupo A de reparación en Xeroderma Pigmentosa</p> <p>Interferón: alfa 1 IFNA1</p> <p>Interferón alfa 2 IFNA2</p> <p>Interferón alfa 3 IFNA3</p> <p>Interferón alfa 4 IFNA4</p> <p>Interferón alfa 5 IFNA5</p> <p>Interferón: alfa 6 IFNA6</p> <p>Interferón alfa 7 IFNA10</p> <p>Interferón alfa 10 IFNA10</p> <p>Interferón alfa 13 IFNA13</p>	<p>Factor estimulante de colonias granulocitos (G-CSF)</p> <p>Receptor hormona tiroidea</p> <p>Oncogen B 2 de eritroblastosis de ave (ERBB2)</p> <p>Queratina 14, complejo de queratina 1, gen 14</p> <p>Receptor de factor de crecimiento (NGFR)</p> <p>Topoisomerasa II alfa</p> <p>Queratina 15 (tipo básico I)</p> <p>Hormona de crecimiento (GH)</p> <p>Proteína cinasa c alfa</p> <p>Enzima convertidora de Angiotensina I</p> <p>Timidina cinasa I soluble</p> <p>Inhibidor de metaloproteínasa tisular 2</p> <p>Aldehído dehidrogenasa</p>

Tabla N° 6 Continuación

<p>Citocromo P450, subfamilia 4B, polipéptido I (CYP4B1) Sitio frágil, tipo afidicolina, común fra(1)(p32)(FRA1B) Mielocitomatosis viral de ave (v-myc) oncogen homólogo, carcinoma derivado de pulmón.</p>	<p>Acetilcolinesterasa (grupo sanguíneo YF) Citocromo P450, subfamilia 3A (CYP3A4) Sitio frágil, tipo afidicolina, común, fra(7)(q31.2)</p>	<p>Interferón alfa 14 IFNA 14 Interferón alfa 16 IFNA 16 Interferón alfa 17 IFNA 17 Interferón alfa 21 IFNA 21 Sitio frágil, tipo ácido fólico, raro, fra(9)(p21)(FRA 9A) Sitio frágil, tipo BrdU, común, fra(9)(p21)(FRA 9C) Proteína ribosomal S6 Proteína - 2, estrés térmico 27kD Sitio frágil, tipo ácido fólico, raro, fra(9)(q32)(FRA9B) Sitio frágil, tipo afidicolina, común, fra(9)(q32)(FRA9E) Grupo sanguíneo ABO</p>	<p>Ciclo división celular 27 (Cdc27)</p>
<p>Sitio frágil, tipo afidicolina, común fra(1)(p11.2)(FRA1C) Factor 1 estimulación de colonias (macrófago) Glutación S-transferasa M1 Glutación S-transferasa M2 (músculo) Glutación S-transferasa M3 (cerebro) Glutación S-transferasa M4 Glutación S-transferasa M5 Neuroblastoma viral RAS (v-ras) oncogen homólogo</p>			
<p>Proteína 6 estrés térmico 70kD (HSP70'B) Proteína 7 estrés térmico 70kD (HSP70B) Receptor Interleucina 6 Apolipoproteína A-II Sitio frágil, tipo afidicolina, común, fra(1)(q31) Monooxigenasa 3 Monooxigenasa 4 Aldehído deshidrogenasa 4</p>			
<p>Citocromo P450, subfamilia 4A, polipéptido II</p>			

La presencia de estos genes debe de confirmarse por metodologías moleculares, pero la existencia de numerosas copias de estos cromosomas constituyen una evidencia importante en ese sentido. El análisis de aberraciones cromosómicas en patologías humanas está basado en técnicas de bandeo de cromosomas. Sin embargo, no siempre es posible identificar todas las alteraciones en células metafásicas, porque translocaciones imperceptibles, pequeños cromosomas marcadores y cariotipos altamente rearrreglados pueden imposibilitar un análisis correcto. Por lo que se tiene que recurrir a técnicas de citogenética molecular que puedan asistir en el problema del análisis de cariotipos, en particular las pruebas de FISH (hibridización *in situ* florescente), que son de gran valor para complementar el análisis de alteraciones cromosómicas (Spector, 1997). Esta metodología deberá utilizarse para completar los hallazgos de este estudio y poder caracterizar los rearrreglos complejos.

VIII. CONCLUSIONES

Del análisis realizado se puede concluir que la Línea Celular WRL-68, es un línea que presenta un alto nivel de aneuploidía, con un incremento del número de copias de los cromosomas 1, 7, 9 y 17(q).

Las alteraciones numéricas encontradas en la Línea Celular WRL-68 no se pueden considerar como indicación de malignidad celular, sino como una ventaja selectiva para su inmortalización.

La amplificación génica que estas múltiples copias generan podrían utilizarse en estudios moleculares de los genes involucrados.

La línea sería un modelo apropiado para el estudio de los sitios frágiles a nivel de los cromosomas 1 y 7 o los genes de interferones en el cromosoma 9.

TABLAS

Tabla N° 3 CELULAS ANALIZADAS POR PASAJE

N° PASAJE	N° CELULAS ANALIZADAS
131	22
132	96
133	70
134	150
135	150
136	150
TOTAL	638

Tabla N° 4

NUMERO MODAL EN RELACION AL NUMERO DE CROMOSOMAS

NUMERO MODAL			
Próximo - Haploide (23+/-)	≤ 34	Próximo - Pentaploide (115+/-)	104 - 126
Hipohaploide	< 23	Hipopentaploide	104 - 114
Hiperhaploide	24 - 34	Hiperpentaploide	116 - 126
Próximo - Diploide (46+/-)	35 - 57	Próximo - Hexaploide (138+/-)	127 - 149
Hipodiploide	35 - 45	Hipohexaploide	127 - 137
Hiperdiploide	47 - 57	Hiperhexaploide	139 - 149
Próximo - Triploide (69+/-)	58 - 80	Próximo - Heptaploide (161+/-)	150 - 172
Hipotriploide	58 - 68	Hipoheptaploide	150 - 160
Hipertriploide	70 - 80	Hiperheptaploide	162 - 172
Próximo - Tetraploide (92+/-)	81 - 103	Próximo - Octaploide (184+/-)	173 - 195
Hipotetraploide	81 - 91	Hipooctaploide	173 - 183
Hipertetraploide	93 - 103	Hiperoctaploide	185 - 195

Tomado de ISCN (1995)

TABLA N° 5

NUMERO DE COPIAS DE CROMOSOMAS EN CADA PASAJE ANALIZADO

CROMOSOMA N°	NUMERO DE COPIAS DE CROMOSOMAS					
	PASAJE 131	PASAJE 132	PASAJE 133	PASAJE 134	PASAJE 135	PASAJE 136
1	5-6	5	5-6	5-9	5-8	6-7
del(1)(qter→p11:)	1-2	2	1	1-2	1-2	1-2
2	3	3	4	2-4	3-4	3-4
del(2)(qter→q31:)	0-1	0	0	0-1	0-2	0-2
del(3)(pter→q11:)	0-1	0-2	0-1	0-2	0-2	0-2
3	4	4	4	3-4	2-4	3-4
4	4	3	3	2-4	3-6	3-5
5	3	4	4	3-4	4-5	4-5
6	3	3	4	4-5	3-5	3-6
del(6)(pter→q14')	0	0	0	0-2	0	0
7	4	4	4	4-7	3-6	4-7
del(7)(qter→p15:)	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2	1-2
8	2	2	2	1-2	2	1-2
9	3	3	3	4-6	3-7	3-5
inv(9)(p11q12)	3	3-4	3	4	3-4	3-4
10	4	4	4	5-7	4-6	4-6
11	2	1	1	1-2	1-2	1-2
12	4	4	5	5-6	4-5	4-6
13	2	2	2	2-3	2-3	2-3
14	2	3	3	1-4	2-3	2-3
15	2	3	2	2-4	2-3	2-3
16	5	4	5	4-6	4-6	4-6
17	4	4	5	2-5	3-6	3-5
i(17q)	2-4	2-4	2-4	2-5	2-5	2-4
18	2	2	2	2-3	2-3	1-2
19	1	2	2	1-3	2-3	1-2
20	4	4	4-5	4-5	4-5	4-5
21	4	4-5	3-4	4-6	4-5	3-5
22	3	2	3	2-3	2-3	2-3
X	1	1	1	1-2	!	1
frag ?	0-2	0-2	0-2	0-2	0-2	0-2
NO ident.	4	4-5	2	3-4	2-5	3-6

Gráfica N° I

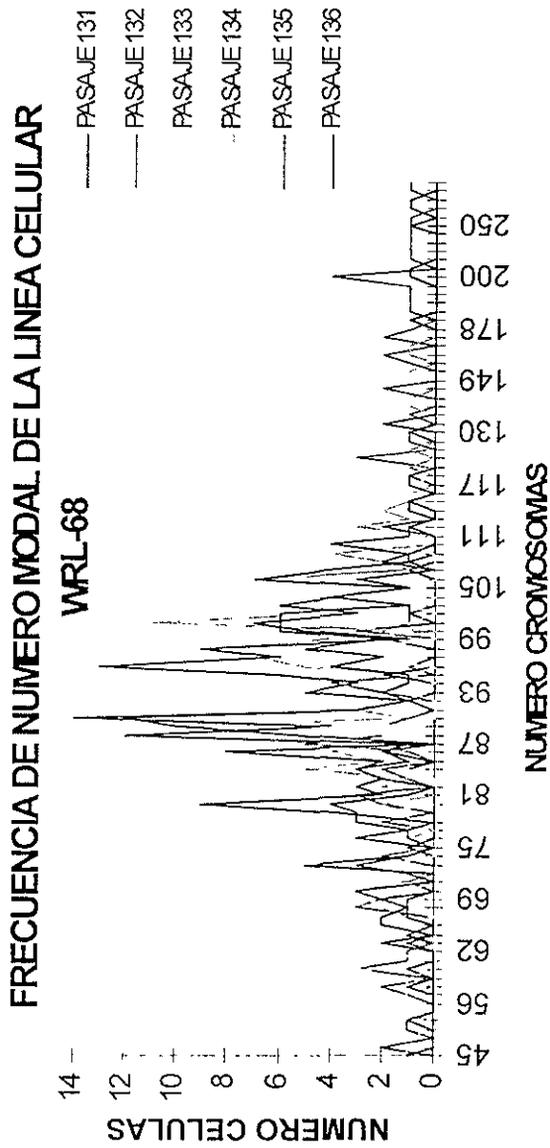


Tabla No. 7

ANALISIS DEL NUMERO CROMOSOMICO EN LA LINEA CELULAR WRL-68

Metafase	Pasaje No.	Pasaje	Pasaje	Pasaje	Pasaje	Pasaje
N°	131	132	133	134	135	136
1	58	46	56	45	45	54
2	60	46	57	46	58	63
3	65	53	58	51	63	63
4	68	54	59	55	67	66
5	69	57	60	55	68	66
6	71	58	60	56	69	67
7	75	58	60	56	69	67
8	84	60	61	56	72	68
9	86	60	61	57	73	69
10	86	60	63	59	73	69
11	92	61	63	67	73	70
12	95	62	66	68	74	70
13	95	66	66	68	76	70
14	100	66	68	69	77	73
15	100	68	69	69	78	73
16	100	68	69	70	78	73
17	102	68	69	72	78	73
18	107	69	70	73	79	73
19	200	69	70	74	79	74
20	250	70	70	76	79	76
21	255	70	70	78	80	76
22	269	70	70	79	80	76
23		71	73	80	80	77
24		74	73	80	80	79
25		74	76	82	81	79
26		76	78	82	83	79
27		78	78	83	83	79
28		78	78	84	84	80
29		80	79	84	84	80
30		80	79	84	84	80
31		81	81	84	85	80
32		81	84	84	85	80
33		81	85	85	86	80
34		83	86	85	86	80
35		84	86	86	86	80
36		84	86	86	86	80
37		86	86	86	86	81
38		87	86	86	86	81
39		87	86	87	86	82
40		87	87	88	86	82
41		87	87	88	88	82
42		87	88	88	88	83
43		88	88	88	88	83
44		88	89	88	88	84
45		89	93	88	88	84
46		89	95	88	89	84
47		90	97	89	89	85
48		93	97	89	89	86

Cont...

Tabla № 7

49		93	97	89	89	86
50		94	98	89	89	87
51		96	98	89	89	88
52		99	98	89	89	88
53		99	100	89	89	88
54		100	100	89	89	88
55		100	100	89	89	88
56		101	100	90	90	88
57		102	100	91	90	88
58		103	100	91	90	88
59		108	100	91	90	88
60		110	100	92	90	88
61		110	101	92	90	88
62		112	103	93	90	88
63		112	105	93	90	89
64		118	110	93	90	89
65		120	110	94	90	89
66		120	117	94	90	89
67		120	120	94	90	90
68		126	120	95	91	90
69		130	135	95	91	90
70		140	137	96	91	90
71		148		96	92	90
72		148		96	93	90
73		158		96	93	90
74		160		96	93	90
75		160		97	93	90
76		167		97	93	90
77		167		97	94	90
78		178		97	94	90
79		181		97	94	90
80		185		97	95	90
81		188		97	95	91
82		196		98	95	91
83		199		98	95	91
84		200		98	95	92
85		200		98	95	93
86		200		98	96	93
87		200		98	96	94
88		210		98	96	95
89		213		98	96	96
90		220		98	96	96
91		246		99	96	96
92		248		99	96	96
93		250		99	96	97
94		253		99	96	97
95		279		101	96	98
96		300		101	96	98
97				101	96	98
98				101	96	98
99				101	97	98
100				101	97	99

Cont....

Tabla Nº 7

101				101	97	99
102				101	97	100
103				101	97	100
104				101	97	100
105				101	101	101
106				102	98	100
107				102	98	100
108				102	98	100
109				102	98	101
110				103	98	101
111				103	98	101
112				103	98	101
113				103	98	101
114				103	98	102
115				104	99	102
116				104	100	102
117				104	100	102
118				104	100	102
119				105	100	102
120				105	100	103
121				106	101	104
122				106	101	104
123				106	101	104
124				106	101	104
125				106	101	105
126				106	101	106
127				106	102	106
128				107	102	106
129				108	102	106
130				108	103	106
131				109	103	106
132				109	103	106
133				109	103	107
134				109	103	107
135				112	103	107
136				112	104	107
137				112	104	108
138				113	104	109
139				114	104	110
140				114	105	110
141				115	106	110
142				116	106	110
143				119	106	111
144				122	108	112
145				144	108	114
146				146	109	115
147				149	112	117
148				155	115	118
149				160	135	130
150				162	135	168
SUMA	2487	11189	5965	14205	13800	13744
PROMEDIO	113 045455	116 552083	85 2142857	94 7	92	91.6266667

Tabla No. 8

FRECUENCIA DE N° MODAL EN LA LINEA CELULAR WRL-68						
N° MODAL	PASAJE 131	PASAJE 132	PASAJE 133	PASAJE 134	PASAJE 135	PASAJE 136
45	0	0	0	1	1	0
46	0	2	0	1	0	0
51	0	0	0	1	0	0
53	0	1	0	0	0	0
54	0	1	0	0	0	1
55	0	0	0	2	0	0
56	0	0	1	3	0	0
57	0	1	1	1	0	0
58	1	2	1	0	1	0
59	0	0	1	1	0	0
60	1	3	3	0	0	0
61	0	1	2	0	0	0
62	0	1	0	0	0	0
63	0	0	2	0	1	2
65	1	0	0	0	0	0
66	0	2	2	0	0	2
67	0	0	0	1	1	2
68	1	3	1	2	1	1
69	1	2	3	2	2	2
70	0	3	5	1	0	3
71	1	1	0	0	0	0
72	0	0	0	1	1	0
73	0	0	2	1	3	5
74	0	2	0	1	1	1
75	1	0	0	0	0	0
76	0	1	1	1	1	3
77	0	0	0	0	1	1
78	0	2	3	1	3	0
79	0	0	2	1	3	4
80	0	2	0	2	4	9
81	0	3	1	0	1	2
82	0	0	0	2	0	3
83	0	1	0	1	2	2
84	1	2	1	5	3	3
85	0	0	1	2	2	1
86	2	1	6	4	8	2
87	0	5	2	1	0	1
88	0	2	2	7	5	12
89	0	2	2	9	10	4
90	0	1	0	1	12	14
91	0	0	0	3	3	3
92	1	0	0	2	1	1
93	0	2	1	3	5	2
94	0	4	0	3	3	1
95	2	0	1	2	6	1
96	0	1	0	5	13	4
97	0	0	3	7	6	2
98	0	0	3	9	9	5
99	0	2	0	4	1	2
100	3	2	8	0	5	6

Cont ...

Tabla № 8

101	0	1	1	11	7	6
102	1	1	0	4	3	6
103	0	1	1	5	6	1
104	0	0	0	4	4	4
105	0	0	1	2	1	1
106	0	0	0	7	3	7
107	1	0	0	1	0	4
108	0	1	0	2	2	1
109	0	0	0	4	1	1
110	0	2	2	0	0	4
111	0	0	0	0	0	1
112	0	2	0	3	1	1
113	0	0	0	1	0	0
114	0	0	0	2	0	1
115	0	0	0	1	1	1
116	0	0	0	1	0	0
117	0	0	1	0	0	1
118	0	1	0	0	0	1
119	0	0	0	1	0	0
120	0	3	2	0	0	0
122	0	0	0	1	0	0
126	0	1	0	0	0	0
130	0	1	0	0	0	1
135	0	0	2	0	2	0
140	0	1		0	0	0
144	0	0		1	0	0
146	0	0		1	0	0
148	0	2		0	0	0
149	0	0		1	0	0
155	0	0		1	0	0
158	0	1		0	0	0
160	0	2		1	0	0
162	0	0		1	0	0
167	0	2		0	0	0
178	0	1		0	0	0
181	1	0		0	0	0
185	0	1		0	0	0
188	0	1		0	0	0
196	0	1		0	0	0
199	0	1		0	0	0
200	1	4		0	0	0
210	1	0		0	0	0
213	0	1		0	0	0
220	0	1		0	0	0
246	0	1		0	0	0
248	0	1		0	0	0
250	1	1		0	0	0
253	0	1		0	0	0
255	1	0		0	0	0
269	1	0		0	0	0
279	0	1		0	0	0
300	0	1		0	0	0

IX. BIBLIOGRAFIA

- Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., Knowles, B. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*: 2; 615 - 616.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., James, D. W. (1989). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc. New York. pp. 159 - 165, 611 - 621
- American Type Culture Collection. (1988). *Catalogue of cell lines and hybridomas*. 6th ed. USA. pp. 11, 30, 61, 175, 179
- Aizpuru, A. E., Kofman-Alfaro, S. (1993). *Cromatina X y compensación de dosis*. *Cromatina Y*. En *Genética Clínica*. Guízar, V. J.J. Ed. El Manual Moderno. México. pp. 88 - 96
- Arrighi, F. E. y Hsu, T. C. (1971). Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics*:10;81 - 86
- Bartolos, M., Baramki, T.A. (1972). *Citogenética Médica* Eudeba S.E.M Argentina. pp 3 - 80
- Bregman, A., (1990). *Laboratory Investigation in Cell and Molecular Biology*. 3th. Ed John Wille and Sons U.S.A. pp. 29 - 35, 225- 261
- Bucio, L., Souza, V., Albores, A , Sierra, A., Chávez, E., Carábez, A , Gutierrez-Ruiz, M C (1995). Cadmium and mercury toxicity in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells) *Toxicology*.102; 185 - 299
- Burger, A. M., Bibby, M. C., Double, J. A. (1997). Telomerase activity in normal and malignant mammalian tissues: feasibility of telomerase as a target for cancer chemotherapy *British Journal of Cancer*. 75(4); 516 - 522
- Butler, M. (1991). *Mammalian Cell Biotechnology. A practical Approach*. IRL Press. U.S.A pp 1 - 26
- Caspersson, T., Zech, L , Modest, E. J., Foley, G E., Wagh, U., Simonsson, E. (1969). Chemical differentiation with fluorescent alkylating agents in *Vicia faba* metaphase chromosome. *Exp. Cell Res.*: 58, 128 - 140
- Caspersson, T., Lomakka, G. L (1971). The 24 fluorescence patterns of the human metaphase chromosome distinguishing characters and variability *Hereditas*: 67; 89 - 10
- Caspersson, T , Zech, L., Johansson, Modest, E.J. (1970) Identification of Human Chromosomes by DNA-Binding Fluorescent Agents. *Chromosoma* 30; 215 - 227

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Comings, D. E., Evangelista, A., Okada, T. A., Wyandt, H. E. (1973). The mechanism of C- and B-banding of chromosomes. *Exp. Cell Res.*: 77; 469 - 493
- Comings, D. E. y Evangelista A. (1974). Mechanisms of chromosome banding. II. Evidence that histones are not involved. *Exp. Cell. Res.*: 86; 202 - 206
- Comings, D.E., Kovacs, B.W., Evangelista, A., Harris, D.C. (1975). Mechanisms of Chromosome Banding. V. Quinacrine Banding. *Chromosoma*: 50;111 - 145
- Comings, D. E. (1978). Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. *Ann. Rev. Genet.*: 12; 25 - 46
- Cuttchia, J. (1994). Human Gene mapping a compendium. The Johns Hopkins University Press. U.S.A. pp. 1 - 147, 149 - 180, 389 - 417, 444 - 459, 967 - 995
- Chuprevich, T. W., Meisner, L. F., Inhorn, S. L. (1973). Mechanism of trypsin chromosome banding. *Lancet*: 1; 484
- Dellarco, V. H. (1985). Aneuploidy. *Basic Life Sciences*. V 36. New York, N.Y. pp. 75, 103, 133, 165 - 183
- De Robertis, E. D. P., Saez, F. A. y De Robertis, E. M. F. (1975). *Cell Biology*. W.B. Saunders Company. USA. Pp. 7 - 12, 266 - 273
- De Robertis, E. D. P. y De Robertis, E. M. F. (1981). *Biología Celular y Molecular*. Ed. Ateneo. Argentina. pp. 12 - 26, 43 - 49, 160 - 168, 313 - 432
- Desai, L. S., Pothier, L., Foley, G. E., Adams, R. A. (1972). Immunofluorescent labeling of chromosomes with antisera to histones and fractions. *Exp. Cell Res.*: 70; 468 - 471
- Dutrillaux, B. (1973). Nouveaus système de marquage chromosomique: Les bandes T. *Chromosoma*: 41, 395 - 402
- Drouin, R., Lemieux, N., Richer, C. L. (1991). Chromosome condensation from prophase to late metaphase: relationship to chromosome bands and their replication time. *Cytogenet. Cell. Genet.*: 57; 91 - 99
- Ellison, J.R., Barr, H.J. (1972). Quinacrine Fluorescence of Specific Chromosome Regions. *Chromosoma*: 36, 375 - 390

- Freshney, R. I. (1986) Introduction: Principles of Steriles Technique and Cell Propagation. IRL Press Limited. pp. 1 - 11

- Ford, D. E. y Hamerton, J. L. (1956). The chromosomes of man Nature:178; 1020 - 1023

- Gardner, E. J., (1979). Principios de Genética. Ed. Limusa. México. pp. 351 - 429

- Goldberg, M A., Glass, A G., Cunningham, J. M , Bunn, F. H. (1987). The regulated expression of erythropoietin by two human hepatoma cell lines Proc. Natl Acad. Sci. USA: 84; 7972 - 7976

- Gómez, O., J. L. (1992). Análisis de los efectos a nivel de membrana plasmática en la línea celular hepática WRL-68 por las exposiciones crónica o aguda al etanol. Tesis de Maestría. UNAM. pp. 1 - 22

- Guizar, V. J. J. (1993). Genética Clínica. Manual Moderno. México. pp. 88 - 96

- Gutierrez-Ruiz, M. C , Bucio, L , Souza, V., Gómez, J J., Campos, C., Cárabez, A. (1994). Expression of some hepatocyte-like functional properties of WRL-68 in culture. In Vitro Cell. Dev Biol..30 A; 366 - 371

- Ham, A. W. (1975). Tratado de Histología. Ed. Interamericana. México. pp. 21 - 71, 637 - 669

- Herskowitz, I. H. (1977). Principles of Genetics. Macmillan Publishing Co , Inc. New York, N Y pp. 19 - 40, 240 - 272

- Jonasson, J. A. (1986) Analysis and interpretation of human chromosome preparations In Human Cytogenetics. Rooney, D. E., Czepulkowski, B. H. IRL Press Washington, D.C. pp. 85 - 134

- Karp, G. (1987) Biología Celular. 2ª. Ed. Prog Educ. S.A. C.V México. pp. 705 - 717

- Knowles, B B., Howe, Ch. C., Aden, D P. (1980). Human hepatocellular carcinoma cell lines secretes the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. Science:209;497 - 499

- Lesson, C R., Lesson, T S. (1981). Histología. Ed Interamericana. México. pp 48 - 70, 353 - 370

- Lisker, R y Armendares, S. (1994). Introducción a la Genética Humana. Manual Moderno. México. pp. 137 - 187

- Mather, J P. (1984). Mammalian cell culture Plenum Press New York. pp 151 - 166

- Mckay, R. D. G. (1973). The Mechanism of G and C Banding in Mammalian Metaphase Chromosomes *Chromosoma*: 44, 1 - 14

- Mckusick, M. D. V. A. (1990). Mendelian inheritance in man. Catalogs of autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked phenotypes. The Johns Hopkins University Press. U.S.A.

- Moorhead, P. S., Nowell, P. C., Mellman, W. J., Battips, D. M., Hungerford, D. A. (1960). Chromosome preparations of leukocytes from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.*: 20; 613 - 616

- Mutchinick, O., Sánchez, F., Lisker, R., Armendares, S., Calójero J., Ruz, L. (1987). Heterochromatin C sizes distribution of chromosomes 1, 9, 16 and Y in a sample of the Mexican population: comparison of two quantitative methods of measurement. *Rev. Invest. Clín. (Méx.)* : 39;123 - 130

- Olivares, I. P., Bucio, L., Souza, V., Cárabez, A., Gutiérrez-Ruiz, M. C (1997). Comparative study of the damage by acute ethanol and acetaldehyde treatment in a human fetal hepatic cell line. *Toxicology*:120;133 - 144

- Pardue, M. P., Gall, J. G. (1970). Chromosomal Localization of Mouse Satellite DNA. *Science*: 168, 1356 - 1358

- Paul, J (1975). *Cell and Tissue Culture*. 5th Ed. Churchill Livingstone. Great Britain. pp.1 - 117

- Palma, P. V. (1978). Heterocromatina constitutiva: Frecuencia de polimorfismos cromosómicos en R/N consecutivos en la Cd. de México y patrones de segregación. Tesis Profesional. Depto. Biología. Fac. de Ciencias. UNAM pp 1 - 51

- Pretlow, T. G., Pretlow, T. P. (1984). *Cell separation*. Academic Press Inc. Florida. USA. pp. 123 - 137

- Retief, A. E. , Ruchel, R. (1977). Histones removed by fixation. *Exp. Cell Res.*:106; 233 - 237

- Rooney, D. E., Czepulkowski, B. H. (1986) *Human Cytogenetics*. IRL Press Washington, D C. pp. 1 - 36, 57- 134

- Ross, M. H., Reith, E J., Romrell, L. J. (1994). *Histología*. Ed. Médica Panamericana S.A. de C.V. México. pp 453 - 461

- Sargent, L., Dragan, Y. P., Babcock, K., Wiley, J., Klaunig, J., Pitot, H C. (1996) Cytogenetic analysis of three rat liver epithelial cell lines (Wbneo, WBHa-ras and WBrasIIa) and correlation of an early chromosomal alteration with insulin-like growth factor II expression *Cancer Research*:56; 2992 - 2997

- Singer, M., Berg, P (1993) *Genes y Genomas* Ed. Omega, S A. Barcelona, España. pp. 812 - 869

- Souza V., Bucio, L., Jay, D., Chávez, E., Gutiérrez - Ruíz, M. C. (1996). Effect of cadmium on calcium transport in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology*:112 ; 97 - 104

- Souza V., Bucio, L., Gutiérrez-Ruiz, M. C. (1997). Cadmium uptake by a human hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology*:120 ; 215 - 220

- Spector, D. L., Goldman, R. D., Leinwand, L. A. (1997). *Cells. A laboratory manual*. Vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press. U.S.A. pp. 1.1 - 3.12, 5.1 - 5.2, 13.1 - 13.2

- Sumner, A. T., Evans, H. J., Buckland, R. A. (1973). Mechanisms involved in the banding of chromosomes with Quinacrine and Giemsa. I. The effects of fixation in methanol-acetic acid. *Exp. Cell Res.*: 81;214 - 222

- Sumner, A. T. , Evans, H. J. (1973). Mechanisms involved in the banding of chromosomes with Quinacrine and Giemsa. II. The interaction of the dyes with the chromosomal components. *Exp. Cell Res.*: 81; 223- 236

- Urano, Y., Watanabe, K., Lin, C. C., Hino, O., Tamaoki, T. (1991). Interstitial chromosomal deletion within 4q11-4q13 in a human hepatoma cell line. *Cancer Research*:51;1460 - 1464

- Verma, R. S., Babu, A. (1987). *Human Chromosomes Manual of basic techniques*. Pergamon Press. New York, N.Y. pp. 1 - 147, 191 - 219

- Wahedi, K., Pawlowitzki, I. H. (1987) C-band polymorphisms of chromosome 9: quantification by C-bands. *Human. Genet.*: 77; 1 - 5

- Yunis, J. J. (1976). High Resolution of Human Chromosomes. *Science*: 191; 1268 - 1270

- Yunis, J. J. (1981). New Chromosome Techniques in the study of Human Neoplasia. *Humam Patology*: 12; 540 -549

- Yunis, J. J., Sánchez, O. (1973). G-Banding and Chromosome Structure. *Chromosome*: 44; 15 - 23