

Adaptación de la Técnica de Cultivo de Linfocitos de Alpacas y Llamas para el Análisis de Intercambio de Cromátides Hermanas

ADAPTATION OF THE LYMPHOCYTE CULTURE TECHNIQUE OF ALPACAS AND LAMAS FOR THE ANALYSIS OF SISTER CHROMATID EXCHANGE (SCE)

Mariella Ramos G.^{1,4}, Jaime Descailleaux L.¹, Margarita Velásquez R.¹, Wilfredo Huanca L.², Leopoldo Iannuzzi³, Angela Perucatti³

RESUMEN

El estudio describe las variaciones introducidas para adaptar la técnica de cultivo de linfocitos y el análisis del Intercambio de Cromátides Hermanas (SCE) en camélidos sudamericanos en el Laboratorio de Genética Humana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú, a partir de la técnica de cultivo de linfocitos de animales domésticos utilizada en la Universidad de Nápoles y el Centro Nacional de Investigación (CNR-ISPAAM), Italia. Se trabajó con 8 alpacas y 19 llamas oriundas de Puno y Huancavelica, de ambos sexos, y de aproximadamente 5 años de edad. Los resultados permiten visualizar células linfocíticas en división y un índice mitótico promedio de cinco metafases por campo observado a 100X. La adaptación de la técnica es considerada de aplicación simple, permitiendo estimar la frecuencia del SCE de manera segura e inequívoca y está sustentada en la coloración diferencial de las cromátides hermanas con Giemsa o un fluorocromo al haber incorporado 5-BrdU durante dos ciclos celulares consecutivos.

Palabras clave: alpacas, llamas, cultivo de linfocitos, cromosomas, SCE

ABSTRACT

The study describes the changes made to adapt the lymphocyte culture technique and the analysis of sister chromatid exchange (SCE) for South American camelids in the Laboratory of Human Genetics, San Marcos University, Lima, Peru used in the University of Naples and the National Research Centre (CNR- ISPAAM), Italy. Blood samples were collected from 8 alpacas and 19 llamas from Puno and Huancavelica, both sexes, and

¹ Laboratorio de Genética Humana, Facultad de Ciencias Biológicas, ² Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

³ Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Istituto per il Sistema produzione Animale in Ambiente Mediterraneo (ISPAAM), Napoli, Italia

⁴ E-mail: mariella.rg@gmail.com

Recibido: 4 de diciembre de 2013

Aceptado para publicación: 20 de julio de 2014

approximately 5 years old. The results allowed visualizing lymphocyte cells dividing and a mitotic index average of five metaphases per field observed at 100X. The adapted technique is considered of simple application, allowing to estimate the frequency of SCE securely and unambiguously, and it is supported by differential staining of sister chromatids with Giemsa or fluorochrome when incorporated 5-BrdU for two consecutive cell cycles.

Key words: alpaca, llama, culture of lymphocytes, chromosome, SCE

INTRODUCCIÓN

El cultivo de linfocitos humanos para el análisis citogenético es una técnica relativamente simple que fue reportada inicialmente por Moorhead *et al.* (1960), habiendo sido estandarizada e implementada en clínicas y universidades de múltiples países; no obstante, a pesar de aplicar cuidadosamente las metodologías de análisis citogenético según lo descrito por el autor, resultados obtenidos en los laboratorios no son siempre los esperados, obteniéndose cultivos inadecuados con metafases difíciles de analizar cuantitativamente y cualitativamente, que impiden interpretar algunas características de los cromosomas referente a los aspectos organizativos y fisiológicos del material genético.

La variabilidad de los resultados puede ser atribuida a factores propios del laboratorio (Gersen y Keagle, 2005), tanto externos como humedad, temperatura y altitud, así como factores internos como origen y calidad de reactivos, aparatos y equipos. Asimismo, el *modus operandi* del citogenetista, el cual se encarga de preparar las soluciones a determinadas concentraciones, temperaturas y la estimativa de tiempos de tratamiento durante el proceso de cultivo, cosecha, preparación de láminas, y la aplicación de las técnicas de coloración diferencial de cromátides hermanas.

En el presente trabajo se describen los cambios realizados a la técnica de cultivo de linfocitos de animales domésticos (Iannuzzi y

Di Berardino, 2008) y a la técnica de coloración para el análisis de Intercambio de Cromátides Hermanas - SCE (Perucatti *et al.*, 2006), con el fin de adaptar ambas técnicas al cultivo de linfocitos de camélidos en el Laboratorio de Genética Humana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. Asimismo, se han considerado ligeras modificaciones en la técnica inicial de referencia para analizar características estructurales y fisiológicas de los cromosomas de los camélidos sudamericanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra Poblacional y Material Biológico

Se trabajó con 27 camélidos sudamericanos (CSA) de 2 a 5 años de edad. De estos, 8 alpacas (*Vicugna pacos*) (3 hembras y 5 machos) eran originarias de Puno y fueron trasladadas a Lima dos años antes del estudio. Los 19 restantes eran llamas (*Lama glama*), siendo 6 hembras y 4 machos de Puno y 9 machos de Huancavelica.

Para los efectos del estudio, se colectó asépticamente sangre periférica de la vena yugular de los 27 animales en tubos Vacutainer® con heparina sódica.

La sangre se mantuvo en refrigeración hasta el inicio del proceso, no siendo mayor de 72 h el tiempo entre la toma de muestra y el cultivo de linfocitos. La sangre fue cultivada según la técnica reportada por Iannuzzi y Di Berardino (2008), adaptada para el análisis

sis de SCE reportado por Di Meo *et al.* (2010) y a la técnica de coloración diferencial descrita por Perucatti *et al.* (2006).

Reactivos

Las soluciones fueron preparadas en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), siguiendo las indicaciones de Iannuzzi y Di Bernardino (2008).

Reactivos y soluciones

- RPMI 1640 Medium (1X), liquid. Life Technology, GIBCO (21875-034).
- Fetal bovine serum. Gibco (10099-133)
- Colcemid solution 10 µg/mL. Irvine Scientific (9311)
- Amfotericina B 250 µg/ml. Euroclone (ECM0009D)
- Penicilina/Estreptomicina. Euroclone (ECB3001D)
- Concanavalina A. SIGMA (C-2010)
Solución stock (SS): diluir 50 mg de Concanavalina A en 50 ml de solución Puck. Filtrar con filtros 0.2 micrones y alicuotar.
Solución de trabajo: utilizar 200 µl de SS para 10 ml de medio (20 µg/ml)
- 5-Brd U intercalante. Sigma (B-5002)
Solución stock (SS): diluir 20 mg de 5-BrdU en 20 ml de solución Puck. Filtrar con filtros 0.2 micrones y alicuotar.
Solución de trabajo: utilizar 100 µl de SS para 10 ml de medio (10 µg/ml)
- Hoechst 33258 (Bisbenzimidide). Sigma (B-2883).
Solución stock (SS): diluir 0.02 g Hoescht en 20 ml de agua destilada. Alicuotar y congelar. Solución de trabajo: utilizar 1 ml de SS con 49 ml de agua destilada (25 µg/ml)
- Coloración Giemsa. Gurr BDH (Reino Unido)
Solución stock 200 ml de 1.52 g de Giemsa en polvo + 100 ml de Glicerol a 60 °C. Mezclar y disolver el Giemsa manteniendo la temperatura de 60 °C. Una vez disuelto agregar 100 ml de metanol y homogenizar. Filtrar la solución con pa-

pel filtro y almacenarlo en frasco oscuro por 5 días antes de su uso.

Solución de trabajo: 3 ml de SS en 97 ml de buffer fosfato pH 6.8

- Solución de Carnoy: Fijador compuesto por Etanol absoluto 3 : Ácido acético 1 Etanol absoluto. Merck (1.00983.2500); Ácido acético glacial. Merck (1.00063.2500)
- Solución Puck g/l: NaCl 8 g, KCl 0.4 g, NaHCO 0.35 g. Autoclavar y llevar a pH 7.0 con 1N HCl.
- Solución salina citratada 2XSSC g/l: NaCl (0.3 M) 17.53 g + Citrato trisódico (0.03 M) 8.82 g. Completar a un litro con agua destilada estéril hasta el litro y ajustar el pH a 7.0 con HCl 1N
- Solución hipotónica: KCl (0.075M). Diluir 0.56 g en 100 ml de agua destilada
- Buffer fosfato: 10.5 de Solución A + 9 ml de Solución B
Solución A: KH_2PO_4 , 0.06 M (8.1654 g/l); Solución B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.06 M (16.0848 g/l). Ajustar el pH 6.8 con HCl 0.1 N o NaOH 0.1 N

Variaciones en el Protocolo de Cultivo de Linfocitos

- El cultivo de linfocitos se realizó a 38 °C, por ser la temperatura corporal promedio de los CSA (Raggi y Ferrando, 1998), a diferencia de 37.5 °C utilizado en el CNR –ISPAAM, Italia. (Iannuzzi y Di Bernardino, 2008).
- La preparación de los reactivos y soluciones utilizados durante la siembra, cultivo y cosecha (Concanavalina A, 5-BrdU, Hoescht 33258, solución 2XSSC, solución hipotónica y buffer fosfato) se hizo con en agua destilada estéril, en lugar de agua ultra pura Milli-Q utilizada en el laboratorio CNR-ISPPAM, Italia.
- Se adicionó 1.5 ml de SBF como nutriente y 7.0 ml de medio RPMI 1640, a diferencia de 1.0 ml de SFB y 8.0 ml de medio RPMI 1640 indicado en la técnica original (Iannuzzi y Di Bernardino, 2008) o los 2 ml de SFB y 7.0 ml de RPMI 1640 empleado actualmente en el

CNR-ISPAAAM. La adición de 1.5 ml de SBF permite aumentar el enriquecimiento del medio de cultivo; sin embargo; la reducción de SBF permitió disminuir los costos de este reactivo sin disminuir la calidad de las metafases que mostraron a los cromosomas elongados, carentes de restos citoplasmáticos y sin sobre posición entre ellos.

- Para facilitar la visualización de SCE, se incorporó el 5-BrdU (100 µl) a las 46 h de iniciado el cultivo de la sangre de CSA, procurando abarcar dos ciclos celulares a las 72 h de finalizado el cultivo. Por el contrario, Perucatti *et al.* (2006) describe la incorporación de 5-BrdU a las 42 h de iniciado el cultivo en ovejas, no siendo de utilidad para el cultivo de camélidos.
- Para detener la acción de la solución hipotónica KCl 0.075M (0.56% a 38 °C) se adicionó 1 ml de Solución de Carnoy (3 etanol:1 ácido acético) recién preparada y se homogenizó con la pipeta Pasteur. Asimismo, los lavados siguientes de la suspensión celular se realizaron con esta solución. Por el contrario, la Solución de Carnoy en la técnica original utiliza metanol en lugar de etanol.
- Las láminas portaobjetos fueron lavadas individualmente con detergente biodegradable en polvo marca Alconox y enjuagadas sucesivamente con agua potable y luego por tres veces con agua destilada. Finalmente, fueron sumergidas en agua destilada y refrigeradas hasta su uso. Por su lado, la técnica original solo describe el lavado de las láminas con etanol y refrigeradas hasta el momento de su uso.

Variaciones en la Técnica de Coloración con Giemsa para el Análisis de SCE

- Se colocaron 8 gotas de Hoescht 33258 (solución de trabajo) sobre la lámina portaobjeto que contenía la preparación citológica, y se cubrió con una laminilla cubreobjeto por 20 min, según el procedimiento del CNR-ISPAAAM; en vez de

los 10 min indicados por Perucatti *et al.* (2006).

- Exposición UV: Se retiró el cubreobjeto, se lavó con agua destilada por ambos lados y se dejó secar. Se adicionó 8 gotas de 2XSSC (pH 7.0), se cubrió con un cubreobjeto y se expuso a la lámpara UV (254 nm) durante 30 min a 8 cm de distancia. En esta parte de la metodología se sigue la referencia de Perucatti *et al.* (2006).
- Tinción con Giemsa 3%: Se lavó la lámina con agua destilada, se dejó secar y se coloreó con Giemsa al 3% en buffer fosfato a pH 6.8 durante 6 min. Se enjuagó con agua destilada estéril y se dejó secar para visualizar la coloración diferencial (SCE) con Giemsa (Fig. 1). Perucatti *et al.* (2006) describen la coloración con naranja de acridina, proceso que permite observar la coloración diferencial de las SCE en microscopio de fluorescencia por un tiempo limitado.

Captura de Imágenes

Las metafases que exhiben la coloración diferencial de SCE, cromosomas elongados y sin sobreposiciones fueron seleccionadas y capturadas en una cámara digital, transferidas a un computador para su análisis realizando el conteo de intercambios entre cromátides hermanas con la ayuda del programa Photoshop CS5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El empleo de 38.0 °C en el cultivo de linfocitos, considerando la temperatura rectal de los CSA (Raggi y Ferrando, 1998), permitió obtener un mejor índice mitótico, comparado con los 37.5 °C utilizado en el CNR-ISPAAAM, Italia.

Los cambios de volumen del medio de cultivo RPMI 1640 (7 en vez de 8.0 ml) y del SFB (1.5 en vez de 1.0 ml), en relación con la técnica original de Iannuzzi y Di Bernardino (2008), permitió enriquecer el medio de culti-

vo, dado que el SFB aporta factores de crecimiento, hormonas, minerales y lípidos (Escobar *et al.*, 2011). Por el contrario, a diferencia de lo utilizado actualmente en el CNR-ISPAAAM, es decir 7 mL de RPMI 1640 y 2.0 mL de SFB, permitió economizar 0.5 ml de SFB siendo un importante ahorro económico y del mismo modo, garantizar la proliferación celular de linfocitos, ya que se logró

obtener un promedio de cinco metafases por campo a 100X.

La incorporación de 5-BrdU en combinación con la tinción Hoescht 33258, permite observar la coloración diferencial entre las cromátides hermanas con Giemsa (Latt, 1973). La coloración diferencial de SCE se observa cuando el 5-BrdU está presente en

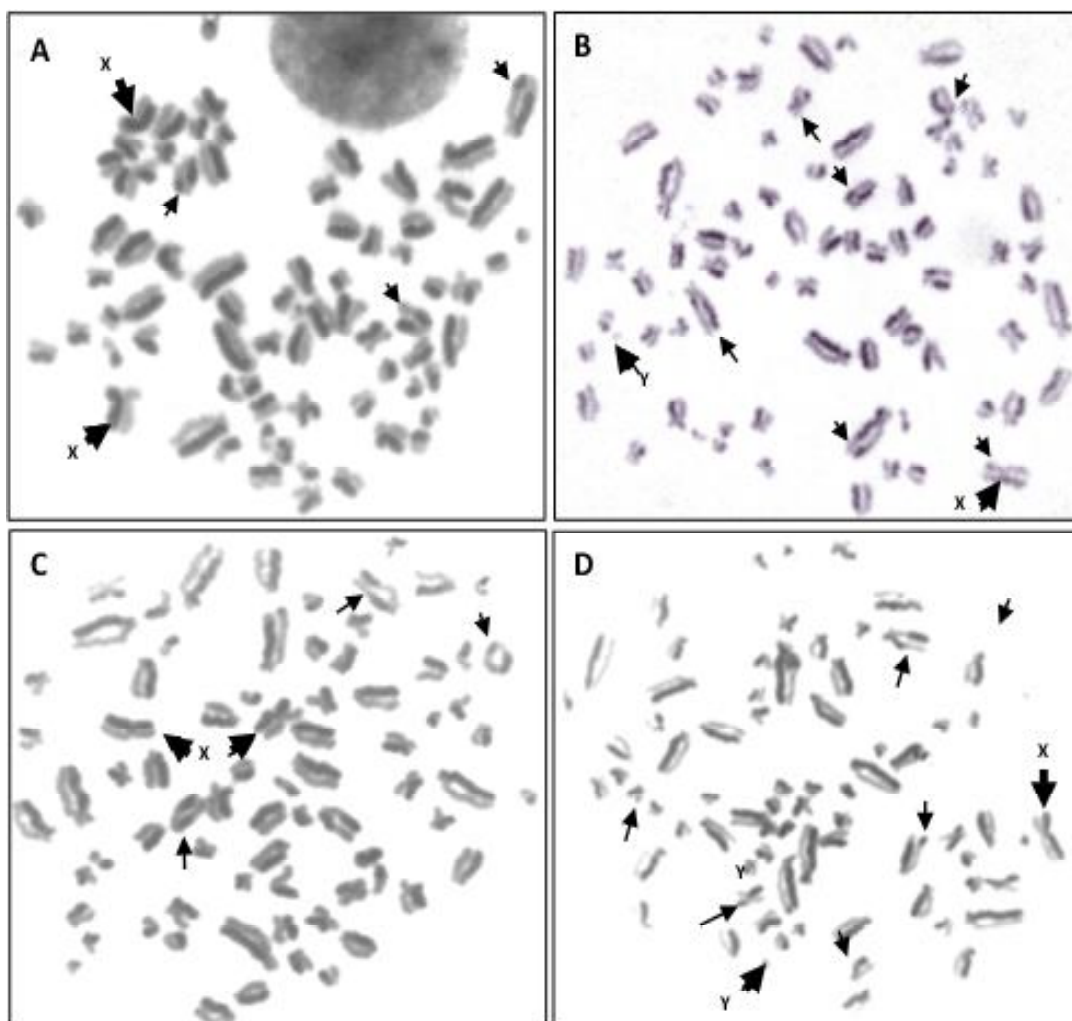


Figura 1. Coloración diferencial con Giemsa en cromátides de camélidos sudamericanos ($2n=74$). Alpacas (*Vicugna pacos*): (A) hembra y (B) macho. Las flechas pequeñas señalan tres y seis intercambios entre las cromátides hermanas respectivamente y las flechas grandes indican los cromosomas sexuales. Llamas (*Lama glama*): (C) hembra y (D) macho. Las flechas pequeñas señalan tres y seis intercambios entre las cromátides hermanas respectivamente y las flechas grandes indican los cromosomas sexuales.

dos ciclos celulares. En el primer ciclo celular ocurre la replicación conservadora del ADN, duplicándose y originando dos cromosomas que tienen la cadena hija naciente con 5-BrdU. Durante el segundo ciclo celular en presencia de 5-BrdU hay una segunda replicación, donde la cromátide hermana con la hebra original de ADN tiene una cadena de ADN nativa y la otra con 5-BrdU (coloración con Giemsa), en tanto que la otra cromátide hermana tiene la incorporación de 5-BrdU en ambas cadenas de ADN (sin coloración con Giemsa) (Verma y Babu, 1989; Wilson y Thompson, 2007).

Con base a lo anterior, se tomó de referencia la incorporación de 5-BrdU (10 µg/mL) en el cultivo de la sangre de CSA a las 42 h de iniciado el cultivo de linfocitos en ovejas (Perucatti *et al.*, 2006) hasta completar las 72 h de cultivo, observando un 20% de cromátides hermanas sin coloración diferencial de SCE. Esto es consecuencia de la presencia de 5-BrdU en más de dos ciclos celulares durante la replicación del ADN, es decir más de 30 h. Como referencia a la anterior experiencia, se incorporó 5-BrdU (10 µg/ml) a las 46 h de iniciado el cultivo de linfocitos de los camélidos hasta finalizar las 72 h de cultivo, resultando la visualización de SCE en un 95%; es decir, la presencia de 5-BrdU estuvo presente durante dos ciclos celulares con un total de 26 h del cultivo de linfocitos, sugiriendo que cada ciclo celular es aproximadamente de 13 h en los CSA.

En la solución de Carnoy se reemplazó el metanol por etanol debido a que el primero tiene propiedades tóxicas y se oxida metabólicamente en ácido fórmico o formaldehído, los cuales tienen efectos nocivos en el sistema nervioso (Mager *et al.*, 2001), ojos y tracto gastrointestinal, con una lenta metabolización en el hígado (Mencías y Mayero, 2000), siendo de uso restringido. Por el contrario, el etanol es menos tóxico, oxidándose rápidamente en el organismo a

dióxido de carbono y agua, produciendo escasos efectos acumulativos (Mager *et al.*, 2001).

Las láminas portaobjetos utilizadas en el presente estudio, procedentes de China, no son del tipo pre-lavadas, por lo que era necesario hacerles un lavado individual para eliminar los restos que pueden perjudicar la visualización adecuada de SCE al microscopio; en cambio Ianuzzi y Di Berardino (2008) utilizan láminas pre-lavadas procedentes de Alemania, de mejor calidad y sin presentar una capa de grasa, por lo cual solo requieren ser lavadas con etanol.

Se utilizó el Giemsa (solución stock) al 3% diluido en buffer fosfato a pH 6.8, el cual permitió observar los intercambios entre las cromátides hermanas en microscopio con luz incorporada, sin necesidad de requerir un microscopio de fluorescencia para observar el SCE, tal como reporta Perucatti *et al.* (2006) en su técnica de coloración con naranja de acridina. Una ventaja adicional de la coloración Giemsa es que se puede observar la lámina por un largo periodo, en comparación con las láminas coloreadas con naranja de acridina que tienen un tiempo de vida útil corto para observarlas, fotografiarlas y analizarlas en el microscopio de fluorescencia (Dutrillaux, 1981).

CONCLUSIONES

- El índice mitótico obtenido fue de cinco metafases por campo de 100X; es decir, los cambios realizados en la técnica no afectaron la calidad ni el número de metafases.
- La técnica de cultivo de linfocitos de camélidos sudamericanos y la técnica de coloración con Giemsa para el análisis de SCE, son de fácil replicación, y de simple lectura e interpretación de resultados.

- Las modificaciones descritas permiten replicar las técnicas en laboratorios con acceso a microscopios con luz incorporada, sin afectar la calidad ni el número de las metafases obtenidas con la coloración diferencial con Giemsa.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Prof. Leopoldo Iannuzzi, Director del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Istituto per il Sistema Produzione Animale in Ambiente Mediterraneo (ISPAAM), Napoli, Italia, quién permitió realizar una pasantía en su laboratorio a uno de los autores (M. Ramos), para capacitarse en técnicas de citogenética convencional y molecular utilizadas en este estudio. Asimismo, un agradecimiento especial a cada uno de los investigadores que trabajan en el CNR-ISPAAAM.

El estudio recibió el apoyo del CNR-ISPAAAM a través de la donación de los reactivos utilizados en las técnicas descritas.

LITERATURA CITADA

1. **Di Meo GP, Perucatti A, Genuardo V, Caputi-Jambrenghi A, Rasero R, Nebbia C, Iannuzzi L. 2010.** Chromosome fragility in dairy cows exposed to dioxins and dioxin like PCBs. *Mutagenesis* 26: 269-272. doi: 10.1093/mutage/geq082
2. **Dutrillaux J. 1981.** La pratique de L'analyse chromosomique. Techniques de laboratoire 12^a ed. París: Masson. 87 p.
3. **Escobar L, Morantes S, Cordero C, Aristizábal F. 2011.** Implementación de estrategias *in vitro* para evaluar la funcionalidad de un suero fetal bovino colombiano. *Rev Colomb Cienc Quim Farm* 40: 201-221.
4. **Gersen S, Keagle M. 2005.** The principles of clinical cytogenetics. 2nd ed. Totowa, New Jersey; Humana Press. 568 p.
5. **Iannuzzi L, Di Berardino D. 2008.** Tools of the trade: diagnostics and research in domestic animal cytogenetics. *J Appl Genet* 49: 357-366. doi: 10.1007/BF03195634
6. **Latt SA. 1973.** Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 3395-3399.
7. **Mager J, Osinsky D, Markkanen P. 2001.** Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el trabajo. Portal Gobierno de España. Ministerio de Empleo y Seguridad Social. [Internet]. Disponible en: http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo4/104_03.pdf
8. **Mencías E, Mayero LM. 2000.** Manual de toxicología básica. Madrid: Ed Días de Santos. 904 p.
9. **Moorhead P, Nowell P, Mellman W, Battips D, Hungerford D. 1960.** Chromosome preparations of leukocytes cultures from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 20: 613-616.
10. **Perucatti A, Di Meo GP, Albarella S, Ciotola F, Incarnato D, Jambrenghi AC, Peretti V, et al. 2006.** Increased frequencies of both chromosome abnormalities and SCEs in two sheep flocks exposed to high dioxin levels during pasturage. *Mutagenesis* 21: 67-75. doi: 10.1093/mutage/gei076
11. **Raggi LA, Ferrando G. 1998.** Avances en fisiología y adaptación de camélidos sudamericanos. *Avances Cienc Vet* 13(1): 3-15.
12. **Verma R, Babu A. 1989.** Human chromosomes. Manual of basic techniques. USA: Pergamon Press. 240 p.
13. **Wilson D, Thompson L. 2007.** Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutat Res* 616: 11-23. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2006.11.017