

**ESTANDARIZACION DE TECNICAS EN CITOGENÉTICA ANIMAL
REPORTE DE CASOS EXPERIMENTALES EN AVES Y PECES**

**DARWIN FABIAN RIVERA
COD: 2002201829**

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE EDUCACIÓN
LICENCIATURA EN EDUCACIÓN BÁSICA CON ENFASIS EN CIENCIAS
NATURALES Y EDUCACIÓN AMBIENTAL
NEIVA
2008**

**ESTANDARIZACION DE TECNICAS EN CITOGENÉTICA ANIMAL
REPORTE DE CASOS EXPERIMENTALES EN AVES Y PECES**

**TRABAJO DE GRADO (TESIS)
PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO
EN EDUCACIÓN BÁSICA CON ENFASIS EN CIENCIAS NATURALES Y
EDUCACIÓN AMBIENTAL**

**DIRECTOR:
SANDRA MILENA BERMEO SERRATO, Bac, MSc.**

**DARWIN FABIAN RIVERA
COD: 2002201829**

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE EDUCACIÓN
LICENCIATURA EN EDUCACIÓN BÁSICA CON ENFASIS EN CIENCIAS
NATURALES Y EDUCACIÓN AMBIENTAL
NEIVA
2008**

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por sus bendiciones y hacer de mi cada día una mejor persona.

A la Universidad Surcolombiana por haberme admitido como un hijo más de su alma mater.

Agradecimiento especial,

Al Dr. Henry Ostos Alfonso, Medico Genetista, coordinador del laboratorio de Medicina Genómica, por permitir el desarrollo y la financiación del presente trabajo.

A Sandra Milena Bermeo Serrato Bac. MSc. por asumir la orientación del presente trabajo, por su compañía, consejos y asesorías como directora.

A James Betancur López, Zootecnista y Carlos Mario Rivera, Ing. Pesquero, por sus asesorías y recomendaciones durante el desarrollo del presente trabajo.

A Frank Barreiro, Tec. en Acuicultura y Adriana Bermudez, Zootecnista, por su colaboración en la toma de muestra de sangre en peces y el transporte de las mismas.

A Andrea Garrido, Aux. de Laboratorio, por su colaboración y disponibilidad con los materiales del laboratorio.

A todos, mil gracias.....

NOTA DE ACEPTACION

Presidente del jurado

RESUMEN

La filogenética y los estudios sobre evolución se pueden llevar a cabo visualizando el complemento cromosómico completo de un ser vivo. La citogenética es una ciencia, rama de la genética, cuya función básica es la construcción y análisis de cariotipos, el cual es un método eficiente para el estudio de los cromosomas de las especies. La comparación del cariotipo de especies muy relacionadas ha reforzado el entendimiento de los mecanismos de evolución cromosómica y el esclarecimiento del parentesco filogenético. En animales tales mecanismos son rearrreglos estructurales que parecen haber tenido un papel importante durante el proceso de especiación.

En el Huila no hay registros que indiquen estudios citogenéticos en animales, por eso el presente trabajo fue realizado por primera vez en nuestra región y de igual forma en la Universidad Surcolombiana, donde su objetivo fue estandarizar técnicas en citogenética animal que permitan el estudio y análisis de cariotipos.

Para la obtención de los cromosomas se emplearon los protocolos citados por Giannoni 1986, para aves y Camacho 1999, para peces; los cuales fueron modificados en el transcurso del proyecto.

Se logró estandarizar una técnica para la obtención de cromosomas en estado metafásico, a partir de cultivo de corta duración usando pulpa de plumas en aves y una técnica para la obtención de cromosomas en estado metafásico, a partir de cultivo de larga duración usando sangre periférica en peces.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	8
2. JUSTIFICACIÓN.....	9
3. FORMULACION DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	11
4. OBJETIVOS.....	12
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	12
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
5. MARCO TEÓRICO.....	13
5.1 CULTIVOS CELULARES.....	13
5.2 BIOLOGÍA DE LA CÉLULA EN CULTIVO.....	16
5.3 CLASES DE CULTIVOS CELULARES.....	17
5.3.1 Cultivo de órganos.....	17
5.3.2 Explantes primarios.....	17
5.3.3 Cultivo celular.....	17
5.4 APLICACIONES DEL CULTIVO CELULAR.....	18
5.4.1 Actividad intracelular.....	18
5.4.2 Ecología celular.....	18
5.4.3 Interacciones celulares.....	18
5.5 VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LAS TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR.....	19
5.5.1 Ventajas.....	19
5.5.2 Inconvenientes.....	19
5.6 LABORATORIO DE CULTIVOS CELULARES.....	19
5.7 COMPONENTES DEL CULTIVO CELULAR.....	20
5.7.1 Suero Fetal Bovino SFB.....	20
5.7.2 Fitohemaglutinina PHA.....	20
5.7.3 Medio Para Cultivo.....	21
5.7.4 Antibióticos.....	22
5.8 MUESTRAS.....	32
5.9 CICLO CELULAR.....	23
5.9.1 Interfase.....	24
5.9.1.1 G1.....	24
5.9.1.2 S: Fase de síntesis o replicación del ADN.....	24
5.9.1.3 G2.....	25
5.9.2 Fase M o mitosis.....	25
6. PRINCIPIOS ETICOS EN EL MANEJO DE ANIMALES DE LABORATORIO.....	27
7. HIPÓTESIS.....	29
8. METODOLOGÍA.....	30
8.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	30
8.2 ÁREA DE ESTUDIO.....	30
8.3 ANIMALES.....	30
8.4 MATERIALES Y REACTIVOS.....	30
8.5 TOMA DE MUESTRA DE SANGRE (AVES).....	31

8.6 CULTIVO DE LINFOCITOS DE LARGA DURACIÓN.....	32
8.7 TOMA DE MUESTRA (PLUMAS).....	33
8.8 CULTIVO DE CORTA DURACIÓN USANDO PULPA DE PLUMA...	33
8.9 TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE (PECES).....	34
8.10 CULTIVO DE LINFOCITOS DE LARGA DURACIÓN.....	34
9. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	36
9.1 AVES.....	36
9.2 PECES.....	37
10. RECURSOS HUMANOS Y FINANCIEROS.....	46
10.1 PRESUPUESTO GLOBAL DE LA PROPUESTA POR FUENTES DE FINANCIACIÓN.....	46
10.2 MATERIALES Y SUMINISTROS.....	46
10.3 DESCRIPCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS EQUIPOS DE USO PROPIO.....	47
11. CONCLUSIONES.....	48
12. RECOMENDACIONES.....	50
12. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	51
BIBLIOGRAFÍA.....	52

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo celular es una técnica efectiva para el estudio del comportamiento de las células animales y vegetales, libres de las variaciones sistémicas ocurridas dentro del organismo durante su normal homeostasis pero sometidas al estrés de un experimento. Se realiza *in vitro* y se simulan las condiciones normales de las células existentes *in vivo* (Barriga, 2007, pág. 10)

La filogenética y los estudios sobre evolución se pueden llevar a cabo visualizando el complemento cromosómico completo de un ser vivo (Shoffner, 1985); (Martins y Galetti, 1998). La citogenética es una ciencia, rama de la genética, cuya función básica es la construcción y análisis de cariotipos, el cual es un método eficiente para el estudio de los cromosomas de las especies. La comparación del cariotipo de especies muy relacionadas ha reforzado el entendimiento de los mecanismos de evolución cromosómica y el esclarecimiento del parentesco filogenético (Takagi y Makino, 1966). En animales tales mecanismos son rearrreglos estructurales que parecen haber tenido un papel importante durante el proceso de especiación (Teglstrom *et al.*, 1983). En el Huila no hay registros que indiquen estudios citogenéticos en animales, por eso el presente trabajo fue realizado por primera vez en nuestra región y de igual forma en la Universidad Surcolombiana.

El presente trabajo fue ejecutado con el fin de llevar a cabo la estandarización de técnicas de cultivos celulares en animales para la obtención de cromosomas metafásicos, en él se describen con detalle los procesos implicados en cada una de las etapas de cultivo como son: Toma de muestra, transporte, almacenaje, siembra, cosecha de células, tinción regular con Giemsa, Bandas G y análisis de metafases, los cuales son necesarios para llevar a cabo el desarrollo de dicho procedimiento. Se explican las características de infraestructura de los laboratorios para realizar cultivos celulares (aislamiento de salas de cultivo, cabinas de flujo laminar, incubadores estériles, entre otros) y la importancia de los medios de cultivo y los demás componentes necesarios para que éstos se lleven a cabo con éxito. Además, se describen las variables que fueron determinantes para que el objetivo propuesto fuese llevado a cabalidad.

2. JUSTIFICACION

Los cultivos celulares son una herramienta básica para la obtención y análisis del comportamiento de células específicas en diferentes líneas de investigación (Lilan y Sebastián, 2005). Sus aplicaciones son diversas y abarcan un gran número de disciplinas y aproximaciones al estudio del fenómeno celular. Sus usos incluyen publicaciones en virología, investigación en cáncer, inmunología, ingeniería de proteínas, estudios de interacción y señalización celular, en la diferenciación y en el desarrollo celular, aplicaciones médicas, aplicaciones industriales y agronómicas, estudios citogenéticos y diferenciación celular (Reina, 2003).

El Huila es un departamento rico en fauna silvestre, de la cual se tiene poca información e incluso nula sobre sus características genéticas y poblacionales. Además, se ve afectada por serios problemas de tráfico ilegal de fauna, caza indiscriminada y la comercialización de sus carnes (Guevara *et al.*, 2003). A esto se suman los problemas del ecosistema, consecuencia del calentamiento global como lo son: Erosión del suelo, tala de árboles, destrucción de los bosques, las sequías y el deshielo del Nevado del Ruiz. Todo lo anterior conlleva a que haya un desequilibrio en los ecosistemas, lo cual desencadena en problemas en los procesos reproductivos de las especies dejando algunas de éstas en inminente riesgo de extinción.

Es importante realizar estudios que brinden información sobre las características genéticas, fisiológicas, ecológicas y de los comportamientos ambientales de los organismos que habitan nuestra región, para así poder contribuir a los programas de conservación de las especies en riesgo de extinción. Una herramienta importante para lograrlo desde el área de la genética es estandarizar y apropiar técnicas en citogenética para la obtención de cromosomas metafásicos que ayuden a realizar estudios en ésta área del conocimiento, cuya labor fundamental es la construcción y análisis de cariotipos (Arias *et al.*, 2006), los cuales nos permiten inferir acerca de posibles fenómenos de evolución, especiación, problemas reproductivos, enfermedades cromosómicas, relación con síndromes, rearrreglos cromosómicos (Inversiones, translocaciones, fusiones) (Jose y Lopes, 1976), sexaje, caracterización descriptiva (Lunardi *et al.*, 2003), confirmación taxonómica, fortalecimiento de los programas de conservación y repoblamiento (ocasionados generalmente por pérdida del hábitat, explotación humana, híbridos en cautiverio) y definición de la conexión filogenética entre las especies (Mercival y Galetti, 2000).

En Colombia y el Huila son pocos los estudios realizados sobre cultivos celulares en animales; se han hecho estudios citogenéticos elementales, presentando

principalmente el número cromosómico y la fórmula cariológica, pero debido precisamente al tipo de técnica de obtención de los cromosomas (directa), son pobres en su información (Burbano, 2001).

Por lo anterior, en el presente trabajo se describen técnicas en citogenética animal que permitan la obtención de metafases óptimas para la realización de los procedimientos de bandeado cromosómico, coloración convencional con Giemsa y análisis de las mismas, el cual fue un trabajo realizado por primera vez en el laboratorio de Medicina Genómica de la Universidad Surcolombiana.

3. FORMULACION DEL PROBLEMA DE INVESTIGACION

El Departamento del Huila, por su ubicación geográfica, comprende climas desde cálido hasta templado; es rico en biodiversidad faunística –incluyendo especies endémicas- con diversidad de organismos que no referencian estudio alguno sobre sus características evolutivas y ambientales (Guevara *et al.*, 2003).

Desde la citogenética y con la construcción de cariotipos podemos hacer estudios como los mencionados anteriormente, ya que éstos son una herramienta importante que ayuda a inferir acerca de los posibles fenómenos de evolución (Vidotto *et al.*, 2004), especiación (Brassesco *et al.*, 2004), problemas reproductivos, enfermedades cromosómicas, sexaje, caracterización descriptiva (Mizoguchi *et al.*, 2007); (Crossetti *et al.*, 1987), confirmar taxonomía, programas de conservación y repoblamiento, relación con síndromes, rearrreglos cromosómicos, y conexión filogenética de las especies (Burbano 2001); (Stock y Mengden, 1957); (Federico *et al.*, 2005).

La revisión bibliográfica demuestra que las universidades y las organizaciones ambientales de la región no han adoptado una posición determinante ante esta problemática, siendo de vital importancia el conocimiento multidisciplinario que estos organismos pueden generar para el desarrollo científico de la región. Además es de vital valor estandarizar una técnica ajustada a las condiciones del laboratorio de nuestra zona que nos permita el estudio cromosómico de las especies que habitan nuestro Departamento. Concibiendo por estandarizar, el realizar una técnica que nos permita obtener un resultado, y, que siempre que se repita dicho procedimiento el resultado obtenido sea igual al inicial, en otras palabras que la técnica sea reproducible.

Es importante apropiarnos de la riqueza natural y empezar a generar nuevos conocimientos sobre las especies que habitan nuestro departamento, de esta forma estaremos contribuyendo a la acreditación de alta calidad de nuestras Universidades y al reconocimiento de éstas ante la sociedad y la comunidad científica.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estandarizar técnicas citogenéticas para la obtención y análisis de cariotipos en peces y aves.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar una técnica para la obtención de cromosomas metafásicos a partir de pulpa de plumas jóvenes o de sangre periférica en aves.
- Estandarizar una técnica para la obtención de cromosomas metafásicos a partir de sangre periférica en peces.
- Analizar las variables involucradas para la obtención de cromosomas metafásicos en las diferentes especies estudiadas.
- Elaborar una guía de laboratorio donde se enuncien las técnicas mencionadas.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 CULTIVOS CELULARES

El cultivo celular permite el mantenimiento o crecimiento *in vitro* de células, tejidos u órganos de origen animal o vegetal, conservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas, con el fin de asegurar su supervivencia y multiplicación (Oliveira *et al.*, 2005), manteniendo todas sus funciones metabólicas de una manera semejante a las que tenían en el hospedero.

Historia de los cultivos celulares

El cultivo de tejidos se desarrolló a partir de los últimos años del siglo XIX como una continuación de las técnicas de la embriología. Wilhem Roux mantuvo en el año 1885 células de embrión de pollo en solución salina durante unos días. El zoólogo americano R.G. Harrison es considerado el iniciador de los cultivos de tejidos animales (Reina, 2003).

Harrison fue el primer investigador que empleó técnicas *in vitro* para el estudio de fenómenos *in vivo*. Realizando cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios, pudo observar el crecimiento de los axones de los neuroblastos y estableció que el axón se formaba por expansión del cuerpo neuronal y no por fusión de una cadena de células. El cultivo se realizaba en una gota de linfa del anfibio que colgaba de un cubreobjetos sobre una cámara sellada. (Reina, 2003).

La primera limitación para el establecimiento de cultivos era lograr un medio nutritivo adecuado.

En 1910 Burrows empleó plasma de pollo para nutrir los explantes de tejidos embrionarios de pollo. Este medio se reveló mucho mejor que los anteriormente probados, lo que le permitió observar el crecimiento del tejido nervioso, corazón y piel.

Burrows y Carrel realizaron los primeros intentos de establecer cultivos de células de mamífero y consiguieron mantener explantes obtenidos a partir de perros, gatos y conejos de Indias, así como en el crecimiento de tumores sólidos. Demostraron que la vida del cultivo se puede prolongar mediante subcultivo o cultivo secundario. Los medios empleados fueron plasma suplementado con extractos de embrión.

1913 Carrel demostró la posibilidad de mantener en cultivo células extraídas de un embrión de pollo, durante un periodo de tiempo superior al de la vida de éste. Mantuvo en cultivo células de pollo durante 34 años. Gran parte del éxito en el mantenimiento de los cultivos se debió al desarrollo del denominado frasco de Carrel.

1916 Roux y Jones emplearon por vez primera extractos enriquecidos en tripsina para disociar las células de embriones de pollo, estableciendo el primer cultivo celular. Uno de los mayores problemas que describieron para el establecimiento de los cultivos celulares es la aparición de múltiples contaminaciones, por lo que desarrollaron numerosos métodos de manipulación en condiciones de asepsia que aún hoy en día se utilizan.

Entre los años 1920 y 1940 se desarrollaron diferentes estrategias de obtención de cultivos y de mantenimiento de las condiciones estériles, pero sin grandes avances. A partir de los años 40, con el aislamiento de los primeros antibióticos, se desarrollaron numerosas aplicaciones, entre las que podemos destacar:

1948 Earle y Cols, aislaron células de la línea celular L, línea cultivada de fibroblastos de ratón C3H que no se adhieren entre sí y que no expresan las cadherinas (grupo de moléculas de adhesión caracterizadas por un mecanismo de acción dependiente de calcio), y mostraron que eran capaces de formar clones en el cultivo de tejidos. Demostraron que para que una célula llegue a dividirse necesita ser alimentada con los nutrientes correctos.

1952 Gry y Cols, establecen la primera línea celular continua, las actualmente bien conocidas células HeLa. El medio empleado era extremadamente complejo y poco definido: Plasma de pollo, extracto de embrión bovino y suero de cordón umbilical humano.

1954 Rita Levi-montalcini y Cols, establecen que el factor de crecimiento nervioso estimula el crecimiento de los axones en tejidos en cultivo; este trabajo supuso el Premio Nobel para Levi-Montalcini en 1986.

1955 Eagle realiza la primera investigación sistemática de los requerimientos nutritivos de las células en cultivo. Describe que las necesidades del cultivo de soluciones corporales complejas (sueros) pueden ser satisfechas por tan poco, como el 1% de suero de caballo dializado en un medio definido de pequeñas moléculas (aminoácidos, azúcares).

1961 Hayflick y Moorhead usaron por primera vez antibióticos para prevenir la contaminación de los cultivos de fibroblastos. Pudieron mantener estos cultivos durante unos 12 pases, pero no consiguieron establecer líneas estables.

1965 Ham introduce el primer medio definido libre de suero capaz de mantener algunas células de mamífero en cultivo indefinidamente.

1969 Augusti-Tocco y Sato establecen la primera línea celular estable de neuroblastoma aislando clones que establecían procesos nerviosos y que eran eléctricamente excitables. Se empieza a establecer las primeras líneas celulares diferenciadas.

1975 Kohler y Milstein establecen la primera línea celular productora de anticuerpos monoclonales. El establecimiento de la tecnología de obtención de anticuerpos monoclonales les valió el Premio Nobel.

1976 Sato y Cols, publicaron sus trabajos, en los que demuestran que las diferentes líneas celulares requieren mezclas distintas de hormonas y factores de crecimiento para crecer en medios libres de suero.

A pesar de que el primer animal del que se establecieron cultivos celulares era un anfibio, poiquiloterma (organismos de sangre fría), rápidamente el interés se centró en el cultivo de células de animales homeotermos (organismos que pueden mantener la temperatura corporal de cuerpo dentro de unos límites sin importar la temperatura ambiente), especialmente humanas, por su gran interés médico. Sin embargo en los últimos años, y especialmente debido a la problemática del control de plagas e infecciones en agricultura y piscicultura, se ha desarrollado notablemente el establecimiento de líneas celulares de poiquilotermos e invertebrados (Reina, 2003).

La historia de la citogenética humana es relativamente nueva. Hasta 1956, en que Tjio y Levan informaran que el número de cromosomas de la especie humana era 46, se sostenía que éste era de 48, basados principalmente en los estudios de Painter publicados en 1923. Estos estudios se habían realizado en tejido testicular humano, producto de la castración de individuos, en consideración a su conducta, hospitalizados en un sanatorio psiquiátrico en Texas. La razón de este error era que la observación y recuento se realizaba en células mitóticas y principalmente meióticas, en las que los cromosomas se veían muy condensados y sobrepuestos (Be *et al.*, 1999).

Dos hechos permitieron el nacimiento de la citogenética médica. Uno fue la comprobación que los linfocitos, que no se multiplican en el medio de cultivo, lo hacen al ser estimulados con fitohemaglutinina, un derivado del poroto rojo. El otro fue el descubrimiento accidental de Tjio y Levan que estos linfocitos en mitosis, suspendidos en una solución hipotónica generaban cromosomas metafásicos dispersos y bien separados, aptos para su observación y recuento (Be *et al.*, 1999).

La primera publicación en que se demostró una anomalía cromosómica como causa de una enfermedad humana fue la de Lejeune en 1959: la trisomía del cromosoma 21 provocaba el síndrome de Down. Esta fue seguida rápidamente por otras en que se comunicaba anomalías en el número de cromosomas sexuales y las trisomías de los cromosomas 13 y 18 causantes de los síndromes de Patau y Edwards respectivamente. (Be *et al.*, 1999).

Un año más tarde las anomalías congénitas perderían su exclusividad de estar asociadas con anomalías cromosómicas. Nowell describió que pacientes con leucemia mieloide crónica tenían uno de los cromosomas 22 de menor tamaño, al que denominó cromosoma Philadelphia. De esta forma la citogenética se incorporó al diagnóstico en oncología (Be *et al.*, 1999).

La década del 60 se caracterizó por la búsqueda de nuevas anomalías cromosómicas, pero el éxito fue reducido. Los cromosomas eran coloreados uniformemente, de manera que pequeñas pérdidas o adiciones de material cromatínico o intercambio entre segmentos de cromosomas no homólogos (translocaciones) eran prácticamente imposibles de detectar. La descripción de técnicas que permitían teñir los cromosomas en bandas claras y oscuras específicas para cada par de homólogos (bandas fluorescentes y no fluorescentes de acuerdo al trabajo pionero de Caspersson) significó una revolución que hizo posible el estudio de anomalías cromosómicas estructurales con grandes aplicaciones, principalmente en los campos de la medicina reproductiva, neuropsiquiátrica, en oncología y en dismorfología (Be *et al.*, 1999)

Los estudios citogenéticos se emplean en taxonomía y filogenética, de tal manera que permiten identificar elementos comunes entre las especies, poblaciones y sus posible origen y evolución. Así mismo, permite identificar elementos propios que constituyen los llamados marcadores citogénéticos, es decir, características típicas que permiten identificar un grupo de otro. Por todo el aporte que brindan los estudios citogenéticos se considera un aspecto primordial y de gran valor para dar respuestas necesarias en el manejo de la zootecnia, piscicultura y de otros animales en condiciones controladas (Burbano, 2001).

5.2 BIOLOGÍA DE LA CÉLULA EN CULTIVO

En el proceso de establecimiento de un cultivo celular se seleccionan las células que crecerán según numerosos criterios. Así solo formarán el cultivo aquellas células que sean, por una parte, capaces de superar el proceso de disgregación y por otra, capaces de adherirse al sustrato y proliferar en forma de monocapa o en suspensión.

El crecimiento en monocapa significa que las células se adherirán al sustrato y en esa forma inician la proliferación. Muchas líneas celulares son anclaje dependiente, es decir no inician la proliferación hasta que se han adherido al

sustrato. Este es el modo normal de proliferación de la mayor parte de las células, con excepción de las hematopoyéticas maduras. El crecimiento en suspensión es propio de aquellas células capaces de proliferar sin necesidad de adherirse al sustrato, independientes de anclaje y es propio de las células hematopoyéticas, algunas líneas celulares transformadas y de células procedentes de tumores. Es de destacar que en todo tejido existe una fracción o tipo celular que es capaz de crecer en suspensión; a pesar de que su origen no está claro se cree que se trata de células madre ("*stem cells*") indiferenciadas.

Cuando se mantiene el cultivo se establece una nueva selección: Aumentan en número aquellas células que tienen una mayor tasa de crecimiento. En el momento en que se alcanza la confluencia, las células en general detienen su crecimiento, aunque pueden existir tipos celulares, neoplásicos, que sigan duplicándose y que desplacen a los otros del cultivo.

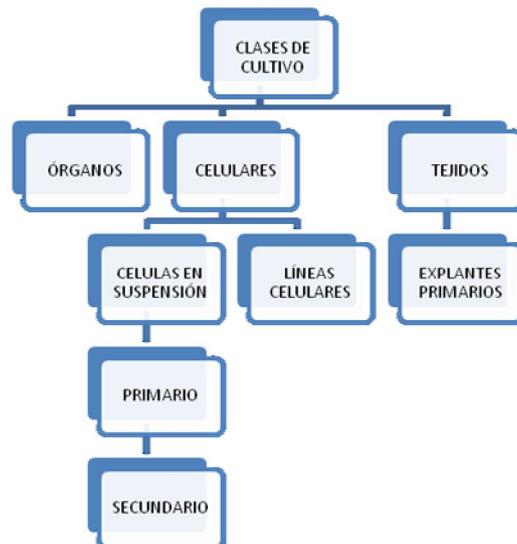
5.3 CLASES DE CULTIVOS CELULARES

5.3.1 Cultivo de órganos. Implica que la arquitectura característica del tejido '*in vivo*' se mantiene al menos en parte. Para ello el órgano se mantiene en un medio del que obtiene los nutrientes y al que puede liberar los desechos y en el que mantiene su estructura tridimensional, en general esférica. Este tipo de cultivo permite mantener los tipos celulares diferenciados y es por ello una buena réplica del tejido de origen, pero por el contrario no permite su propagación pues el crecimiento, de producirse, se limita a la periferia y es debido fundamentalmente a los tipos celulares embrionarios. La imposibilidad de propagar obliga a partir, en cada nuevo experimento, de nuevo material animal lo que conlleva una elevada heterogeneidad.

5.3.2 Explantes primarios. Fragmentos de tejidos o de órganos que se adhieren a una superficie y en la que proliferan las células de la periferia del explante.

5.3.3 Cultivo celular. Supone una disgregación celular ya sea por medios enzimáticos o mecánicos. La suspensión celular se puede cultivar como una monocapa adherente o en suspensión en el medio de cultivo. Este tipo de cultivo permite su propagación, aumentando notablemente la masa celular del cultivo a lo largo de las generaciones. Como característica negativa se pierde la heterogeneidad celular de partida, la población se hace uniforme y homogénea al predominar en el cultivo aquellos tipos celulares que tienen superior tasa de crecimiento.

En la actualidad los cultivos celulares son los más empleados, fundamentalmente por la posibilidad de propagación, así como por las ventajas en la cuantificación, caracterización y reducibilidad de los ensayos. A fin de compensar la ausencia de interacciones heterotípicas se realizan desde hace unos años cultivos mixtos con importantes éxitos (Reina, 2003).



Grafica 1. CLASES DE CULTIVOS CELULARES

Fuente: Reina 2003.

5.4 APLICACIONES DEL CULTIVO CELULAR.

Los estudios que emplean cultivos celulares abarcan gran número de disciplinas y aproximaciones al estudio del fenómeno celular.

5.4.1 Actividad intracelular. Mecanismos implicados en los diferentes procesos intracelulares, como por ejemplo. Transcripción de ADN (ácido desoxirribonucleico), síntesis de proteínas, metabolismo energético. Flujo intracelular. Movimientos intracelulares de sustancias y señales asociadas a los diferentes procesos fisiológicos, como por ejemplo. Ensamblaje y desensamblaje de los diferentes componentes intracelulares, movimientos del ARN (ácido ribonucleico): entre núcleo-citoplasma, movimiento de proteínas.

5.4.2 Ecología celular. Estudio de las condiciones ambientales responsables del mantenimiento de la funcionalidad celular, de su diferenciación, como por ejemplo: estudio de las necesidades nutricionales, infecciones, estudio de la transformación celular (inducidas por virus o agentes químicos), cinética de la población celular.

5.4.3 Interacciones celulares. Procesos de inducción embrionaria, cooperación metabólica, inhibición por contacto o por adhesión, interacciones célula-célula.

5.5 VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LAS TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR

5.5.1 Ventajas

Entre las ventajas se pueden enumerar:

- a. Permiten un control preciso y fino del medio ambiente.
- b. Caracterización y homogeneidad de la muestra.
- c. Economía.
- d. Motivaciones éticas.

5.5.2 Inconvenientes

Como desventajas se señalan:

- a. Técnica sensible.
- b. Cantidad y costo.
- c. Inestabilidad.
- d. Validez del modelo '*in vitro*'.

5.6 LABORATORIO DE CULTIVOS CELULARES

Un laboratorio de cultivo celular debe contar con una infraestructura básica en la cual se disponga de áreas independientes para llevar a cabo la preparación y esterilización de medios y reactivos, un espacio independiente para el proceso de lavado y preparación de material y un área propiamente destinada al trabajo con cultivos celulares.

Dentro de la infraestructura física básica se debe contar con sistemas de refrigeración y congelación, incubadoras, centrifugas, balanzas, microscopios y cabinas de flujo laminar.

Adicionalmente, se debe disponer de un buen suplemento de material plástico y de vidrio y con sistemas de esterilización apropiados para los diferentes tipos de reactivos y materiales utilizados (Pérez *et al.*, 2001).

Equipamiento necesario

- Cabina de flujo laminar.
- Incubadora.
- Tanques de Nitrogeno Líquido.
- Pipeteador.
- Baño serológico.
- Centrifuga.

- Microscopio invertido con contraste de fase.
- Microscopio óptico.
- Autoclave.
- Recipientes para cultivo (tubos Falcón, frascos de Roux).

5.7 COMPONENTES DEL CULTIVO CELULAR

5.7.1 Suero Fetal Bovino SFB. El suero fetal bovino contiene muchas sustancias que necesitan las células cultivadas para crecer y vivir adecuadamente. La ventaja del SFB como producto es que puede ser usado factiblemente para cualquier tipo de célula.

5.7.2 Fitohemaglutinina PHA. La fitohemaglutinina (PHA) extracto de *Phaseolus vulgaris*, aglutina hematíes y leucocitos; es capaz de unirse a oligosacáridos y estimula la mitosis en diferentes estirpes celulares, incluidos los linfocitos. Esta comprende 5 glicoproteínas tetraméricas (PM= 115.000 ± 4.130 D), isolectinas formadas por 2 polipéptidos (L=leucocito y E=eritrocito) en combinaciones L₄, L₃E₁, L₂E₂, L₁E₃, E₄. Las subunidades tipo E (PM=31.700 ± 600 D), mayores que las L, son responsables de la eritroaglutinación, pero muestran poca actividad mitogénica o ninguna. Las subunidades L (PM= 29.900 ± 200 D) confieren propiedades leucoaglutinantes a la proteína nativa y tienen la máxima actividad estimulante de la mitosis.

La PHA fue utilizada inicialmente para separar células sanguíneas, después como marcador histológico y en la producción y mejoramiento de medios diagnósticos y analíticos. Resultados *in vitro* avalan el posible uso terapéutico de la isoforma mitogénica L₄ como modificador de respuestas biológicas, de versátil administración, no sensibilizante, poco tóxica, con máxima efectividad a baja dosis, no inductora de estrés, no oncogénica, no infecciosa, compatible con diversas modalidades terapéuticas; probablemente compatibles con el embarazo y con una adecuada relación costo-efectividad en los análisis económicos.

Las potencialidades de la PHA como inmunomodulador se fundamentan en la inducción de la actividad y proliferación linfocitaria *in vitro*; efecto observado *in vivo* solo con dosis excesivas de PHA eritroaglutinante y nocivas para el sistema circulatorio de pequeños animales de laboratorio. La restringida disponibilidad del mitógeno en forma no aglutinante ha limitado un estudio más exhaustivo en el ser humano. La subestimación de su eficacia ha limitado también su producción industrial en cantidades requeridas para ensayos clínicos. Su posible efecto de modulación mitogénica podría ser de utilidad en la terapéutica del cáncer, infecciones graves y anemia aplásica (Ruiz *et al*, 2005).

5.7.3 Medio para cultivo. El cultivo celular se realiza en medios artificiales preparados mediante la mezcla de componentes purificados o de soluciones orgánicas complejas, en el interior de instrumentos que mantienen las condiciones físico-químicas adecuadas y sobre soportes o recipientes que los contienen y aíslan del medio exterior. (Reina, 2003). Por ello se considera que el medio de cultivo estará formado por cuatro elementos:

1. La naturaleza del sustrato o fase en que crecen las células.
2. Las condiciones físico-químicas y fisiológicas del medio.
3. La naturaleza y composición de la fase gaseosa.
4. Las condiciones de incubación, especialmente la humedad y la temperatura.

Los medios para cultivo son una mezcla de sales enriquecidas con aminoácidos y otros componentes esenciales para el crecimiento celular. Actúan como una solución nutritiva en el cultivo celular. El medio tiene que tener sustratos para cumplir los requerimientos de los elementos esenciales como Carbono, Nitrógeno, Fósforo, metales, etc.

Todo medio de cultivo está formado por los siguientes elementos:

1. Soluciones salinas equilibradas (BSS).
2. Aminoácidos.
3. Vitaminas.
4. Suplementos orgánicos de bajo peso molecular.
5. Hormonas y factores de crecimiento (suero).
6. Inhibidores del crecimiento de los contaminantes (antibióticos y antifúngicos).

Los principales medios para cultivo y sus aplicaciones los encontramos en la siguiente tabla.

TABLA 1. Principales medios para cultivo

MEDIO PARA CULTIVO	APLICACIONES
Medio Basal de Eagle (BME).	Medio elemental con sólo los aminoácidos esenciales. Se necesita siempre la suplementación con suero bovino fetal al 10 %. Crecimiento de fibroblastos de ratón y células HeLa.
Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM).	Es el medio de uso más corriente, contiene más aminoácidos y en mayor concentración que el BME. Se usa para casi todo tipo de cultivos y requiere la adición de suero (10 %).
R.P.M.I. 1640.	Medio diseñado para el crecimiento de linfoblastos y líneas celulares leucémicas en suspensión. Tiene un amplio rango de aplicaciones con suplementos adecuados.

Medio MEM modificado por Dulbecco (DMEM).	Contiene cuatro veces la concentración de aminoácidos y vitaminas que el B.M.E. Se usa para la selección de hibridomas suplementado con HAT o HT.
Modificación de Iscove del medio DMEM (IMDM).	Es un medio muy completo que incluye en su formulación albúmina bovina, transferrina, selenito, etc. Es muy útil para el cultivo de linfocitos en medio libre de suero. También sirve para otros tipos celulares, pero en ese caso requiere suero a bajas concentraciones.
McCoy 5A.	Medio diseñado para el crecimiento de líneas celulares diploides tanto de rata como humanas.
Medio L-15 de Leibovitz.	Utilizado para el cultivo de virus.
Medio F-10 de Ham.	Para el crecimiento de líneas celulares humanas, debe ser suplementado con proteínas y hormonas. Contiene metales como Fe, C y Zn. Es útil para el cultivo de células amnióticas.
Medio F-12 de Ham.	Útil para el crecimiento de líneas celulares con suplementos proteínicos. Combinado con IMDM es un medio que se usa como libre de suero.
Medio 199.	Muy usado para el cultivo de células no diferenciadas y estudio de cromosomopatías.

5.7.4 Antibióticos. A fin de evitar el crecimiento de contaminantes en el cultivo se suele suplementar éste con sustancias antibióticas de diferente espectro de acción. La adición de antibióticos ha de ser estrictamente controlada para evitar efectos nocivos sobre el cultivo.

Las mezclas de uso más común son:

1. Penicilina (100 U/ml) / Estreptomina (100 ugr/ml). Combinación anti-microbiana.
2. Penicilina (100 U/ml) / Estreptomina (100 ugr/ml) / Fungizona (Wittaker). Combinación anti-microbiana y anti-fúngica.
3. Gentamicina (50 ugr/ml). Anti-microbiana, conviene ir alternándola con la penicilina-estreptomina.
4. Amphotericina-B (2.5 ugr/ml). Antifúngico y antilevaduras. Se han observado algunos efectos secundarios sobre el crecimiento de células de médula ósea humana en cultivo.

5.8 MUESTRAS

Se pueden usar distintos tejidos para obtener preparaciones de cromosomas, por ejemplo, sangre periférica, médula ósea, fluido amniótico y productos de la concepción (Molina *et al.*, 2005). Aunque las técnicas específicas difieren según el

tejido usado, el método básico para obtener preparaciones de cromosomas es así:

- Recolección de la muestra y preparación inicial.
- Cultivo celular.
- Adición de un inhibidor de la mitosis para detener las células en metafase.
- Recogida de las células. Este paso es muy importante para obtener preparaciones de alta calidad. Implica exponer las células a una disolución hipotónica, seguida de una serie de disoluciones fijadoras. Esto hace que las células se expandan, de modo que los cromosomas se extiendan y puedan examinarse individualmente.
- Tinción de las preparaciones cromosómicas para detectar los posibles cambios numéricos y estructurales.

5.9 CICLO CELULAR

El ciclo celular es la secuencia cíclica de procesos en la vida de una célula eucariota que conserva la capacidad de dividirse. Consiste de interfase y mitosis.

Tal como lo expresa la teoría celular, *todas las células se forman a partir de células preexistentes*. El crecimiento y desarrollo de los organismos vivos depende del crecimiento y multiplicación de sus células; cuando una célula se divide la información genética contenida en su ADN debe duplicarse de manera precisa y luego las copias se transmiten a cada célula hija (Castorena *et al.*, 1983). En los procariontes este proceso de división es sencillo y recibe el nombre de fisión binaria. En los eucariotes el ADN está organizado en más de un cromosoma, siendo el proceso de división celular más complejo.

A pesar de las diferencias entre procariontes y eucariotes, existen numerosos puntos en común entre la división celular de ambos tipos de células, las que deben pasar por cuatro etapas:

1. Crecimiento celular.
2. Duplicación del ADN.
3. Separación del ADN original de su réplica (para ello se empaqueta en forma de cromosomas).
4. Separación de las dos células hijas, con lo que finaliza la división celular.

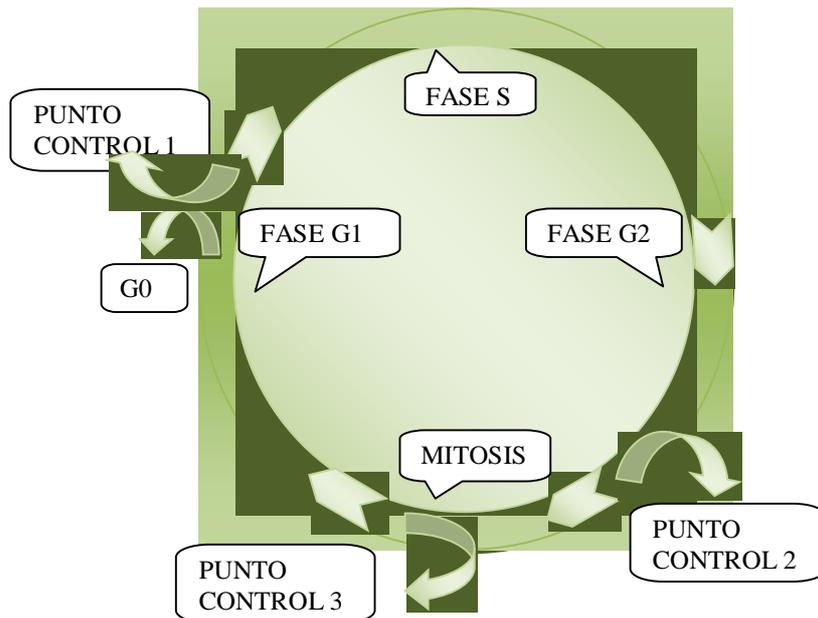


Figura 1. CICLO CELULAR
Registro propio

5.9.1 Interfase. La vida de las células transita por dos etapas que se alternan cíclicamente: interfase y división, la interfase se subdivide en tres períodos G1, S y G2. Durante la interfase el ADN asociado a las histonas constituye la cromatina, que se encuentra desenrollada en largas y delicadas hebras.

5.9.1.1 G1: (G por gap: intervalo), en esta fase tiene lugar las actividades de la célula (secreción, conducción, endocitosis, etc). Comenzando a partir de la citocinesis de la división anterior, la célula hija resulta pequeña y posee un bajo contenido de ATP consecuencia del gasto experimentado en el ciclo anterior, por lo que en este período se produce la acumulación del ATP necesario y el incremento de tamaño celular.

Es el período que más variación de tiempo presenta, pudiendo durar días, meses o años. Las células que no se dividen nuevamente (como las del músculo esquelético) pasan toda su vida en este período, que en estos casos se denomina **G0**, ya que las células se retiran del ciclo celular.

5.9.1.2 S: Fase de síntesis o replicación del ADN. Comienza cuando la célula adquiere el tamaño suficiente y el ATP necesario. Dado que el ADN lleva la información genética de la célula, antes de la mitosis deben generarse dos

moléculas idénticas para ser repartidas entre las dos células hijas. El ADN es una doble hélice que se abre y cada cadena es usada como molde para la producción de una nueva cadena, que queda unida a la original usada como molde. Por esta razón la replicación del ADN se denomina semiconservativa. Estos ADN's nuevos quedan unidos por el centrómero hasta la mitosis, recibiendo el nombre de cromátidas hermanas.

5.9.1.3 G2: es el tiempo que transcurre entre la duplicación del ADN y el inicio de la mitosis. Dado que el proceso de síntesis consume una gran cantidad de energía la célula entra nuevamente en un proceso de crecimiento y adquisición de ATP. La energía adquirida durante la fase G2 se utiliza para el proceso de mitosis. Durante esta fase también ocurre la duplicación de los centriolos.

Factores ambientales como cambios en la temperatura y el pH, y la disminución de los niveles de nutrientes, llevan a la depreciación de la velocidad de división celular. Cuando las células detienen su división generalmente lo hacen en una fase tardía de la G1 denominado G0.

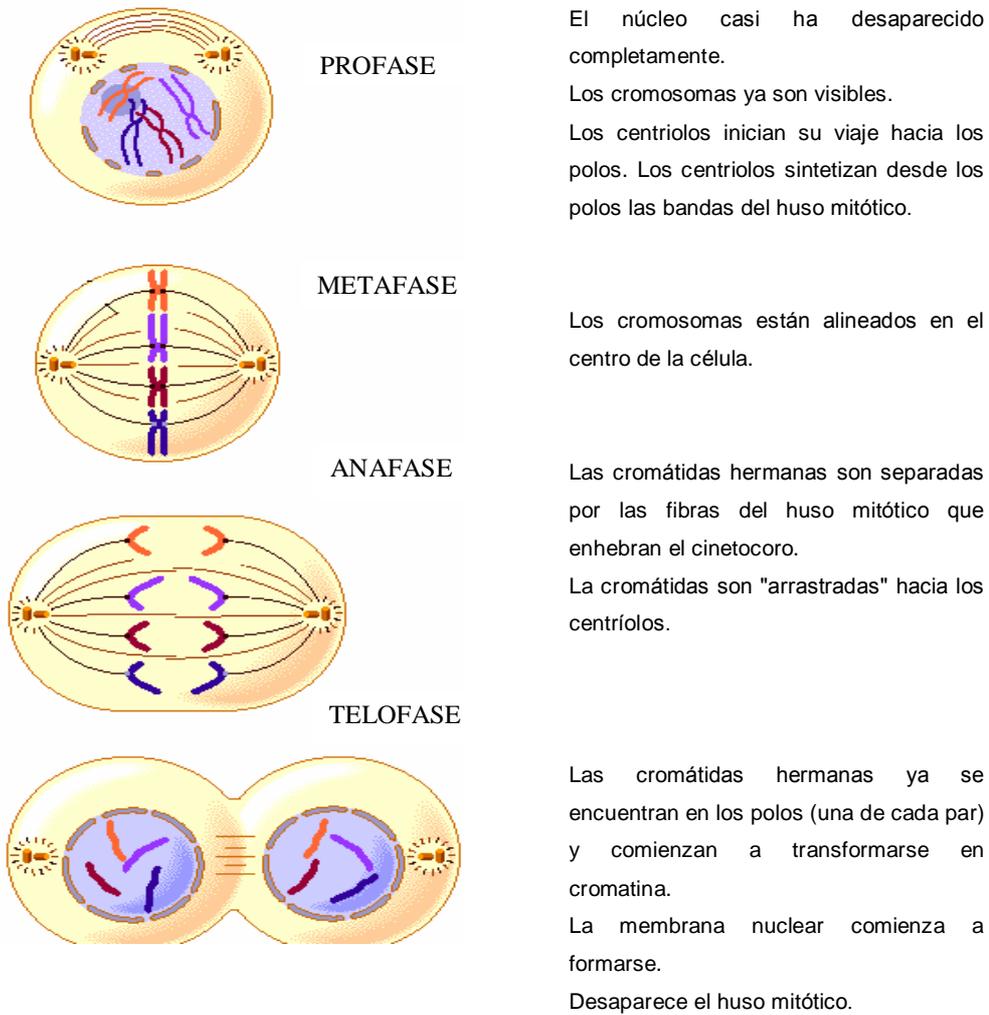
5.9.2 Fase M o mitosis. La mitosis es un proceso de división celular en el que dos células resultantes obtienen exactamente la misma información genética de la célula progenitora.

Comprende las siguientes fases: Profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis (véase fig.2).

En Colombia se han realizado estudios en especies silvestres donde se ha hecho la caracterización genética para algunas especies de peces de nuestro país, tal es el caso del Yamú que presenta un número cromosómico $2n=50$ (Guevara *et al.*, 2003). Además en otras regiones del continente americano se han realizado también esta clase de estudios, como lo fue la caracterización genética del Pirarucú *Arapaima gigas* (Marqués, 2003).

No se encontró registros bibliográficos para Colombia donde se manifiesten estudios algunos sobre estudios citogenéticos en aves, pero se encontró estudios realizados para especies que no habitan en nuestro país, como es el caso del *Spheniscus magellanicus* (Ledesma *et al.*, 2033).

Figura 2. MITOSIS
 Fuente: www.maph49.galeon.com



El núcleo casi ha desaparecido completamente.

Los cromosomas ya son visibles.
 Los centriolos inician su viaje hacia los polos. Los centriolos sintetizan desde los polos las bandas del huso mitótico.

Los cromosomas están alineados en el centro de la célula.

Las cromátidas hermanas son separadas por las fibras del huso mitótico que enhebran el cinetocoro.
 La cromátidas son "arrastradas" hacia los centriolos.

Las cromátidas hermanas ya se encuentran en los polos (una de cada par) y comienzan a transformarse en cromatina.
 La membrana nuclear comienza a formarse.
 Desaparece el huso mitótico.

5. PRINCIPIOS ETICOS EN EL MANEJO DE ANIMALES DE LABORATORIO

Este tema compete a todos los individuos pero, con mayor razón, a los involucrados en la investigación biológica; desde el técnico auxiliar que está a cargo del cuidado de los animales, hasta el más alto directivo de la institución productora o usuaria de los mismos. La primera condición del investigador que trabaja con animales de laboratorio es el respeto por la vida, por el dolor o sufrimiento a que éstos pueden ser sometidos en los trabajos bajo su responsabilidad.

Siempre que se utilizan animales en investigación habremos de considerar que un objetivo, tan importante como el de obtener resultados experimentales, será el de minimizar cualquier dolor o angustia que éstos puedan sufrir. El refinamiento de los procedimientos para conseguir que sean más humanos debe ser parte integrante de toda investigación científica.

Esto es importante tanto desde el punto de vista de la preocupación humanitaria como para cumplir con los requisitos de la legislación sobre animales en investigación los cuales fueron tenidos en cuenta para el desarrollo de la presente investigación.

Principio Éticos Internacionales para Investigación Biomédica con Animales –CIOM (Consejo Internacional de Organizaciones Médicas)

- El avance del conocimiento, la protección de la salud y/o el bienestar de los hombres y los animales requiere la experimentación con animales vivos.
- Realizar experimentación en animales después de estudiar su importancia para la salud humana y animal, y para el avance del conocimiento biológico.
- Seleccionar animales de especie y calidad apropiadas y usar el mínimo número requerido para obtener resultados científicamente válidos.
- Tratar a los animales como seres sensibles y considerar imperativo ético el cuidado y uso adecuado, evitando o minimizando las molestias, las angustias y el dolor.
- Presumir siempre que los procedimientos dolorosos para el hombre también causarán dolor en otras especies.
- Procedimientos que puedan causar dolor o angustia momentánea o mínima deben ser realizados con sedación, analgesia o anestesia. No realizar

procedimientos quirúrgicos o dolorosos en animales no anestesiados o paralizados con agentes químicos.

- Cuando se requiera apartarse del principio anterior, la decisión debe ser tomada por un Comité Revisor convenientemente constituido. Estas excepciones no deben ser hechas solo para demostración o enseñanza.
- Al final de la experiencia o en el momento apropiado, los animales que puedan sufrir dolor crónico o severo, angustia, disconfort o invalidez, que no puedan ser aliviados, deben ser sacrificados sin dolor.
- Los animales mantenidos con fines biomédicos deben tener las mejores condiciones de vida posibles, de preferencia con supervisión de veterinarios con experiencia en ciencia de animales de laboratorio.
- El director del establecimiento es responsable por la calificación de los investigadores y demás personal para realizar los trabajos requeridos, debiendo otorgar adecuadas oportunidades de entrenamiento.

7. HIPÓTESIS

- El tiempo de incubación de 72 horas, en la técnica de cultivo de larga duración, es el apropiado para la obtención de cromosomas en estado metafásico en el proceso de estandarización de técnicas en citogenética animal.
- La temperatura de 28°C, es la apropiada para la obtención de cromosomas en estado metafásico en peces.
- La disgregación mecánica efectiva de los bulbos de pluma, es determinante para la obtención de cromosomas en estado metafásico en aves.
- El medio para cultivo RPMI 1640, es el apropiado para la obtención de cromosomas en estado metafásico, en el proceso de estandarización de técnicas en citogenética animal.

8. METODOLOGIA

8.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

Investigación de metodología (Polit y Hungler, 1985) fue un estudio hecho para crear o refinar métodos para obtener, organizar o analizar datos.

8.2 ÁREA DEL CONOCIMIENTO

Los experimentos fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Medicina Genómica, ubicado en la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana.

8.3 ANIMALES

Para los trabajos realizados en aves se dispusieron de tres pollos (*Gallus gallus*) que fueron comprados en una tienda veterinaria. Con peces se trabajaron con dos carpas (*Cyprinus carpio*), dos cachamas (*Piaractus brachipomus*) y 10 tilapias roja (*Oreochromis spp*), las cuales se encontraban en la Granja Agroindustrial CRECER, ubicada en el Municipio de Aipe-Huila.

8.4 MATERIALES Y REACTIVOS

- Jaula
- Jeringas de 1 ml
- Heparina
- Muestras de sangre
- Bulbo de plumas
- Cámara de flujo
- Decol (hipoclorito de sodio)
- Puntas amarillas
- Algodón
- Alcohol
- Mechero
- Encendedor
- Guantes
- Pipetas de vidrio de 5 y 10 ml.
- Micropipeta de 10-100 ul
- Tubo Falcon de 15 ml.

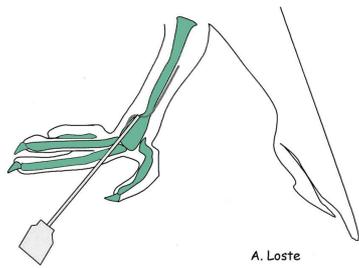
- Medio RPMI 1640
- Medo 199
- SFB
- PHA
- Incubadora 37° C, 5% CO₂
- Colchicina
- Centrifuga
- Pipeta Pasteur
- Fijador Carnoy
- Microscopio óptico
- Papel aluminio
- Solución hipotónica de KCl 0.075 M
- Nevera a 4°C
- Laminas portaobjetos
- Laminillas cubreobjetos
- Cámara fotográfica
- Aceite de inmersión
- Metanol
- Acido acético
- Buffer 2X SSC
- Tripsina 0.25%
- Colorante Giemsa
- Tampon sorse
- Agua

8.5 TOMA DE MUESTRA DE SANGRE (AVES)

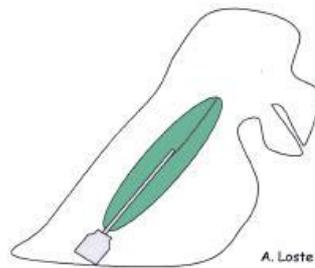
A los individuos se les hizo la toma de muestra de sangre de la vena yugular y de la vena cutánea cubital, de la cual se tomó el mayor volumen posible con jeringas de 5 ml previamente heparinizadas, este material fue almacenado a 4°C antes de su procesamiento en el laboratorio de Medicina Genómica de la Universidad Surcolombiana (Facultad de salud). (Véase fig. 3)

Figura 3. TOMA DE MUESTRA DE SANGRE AVES

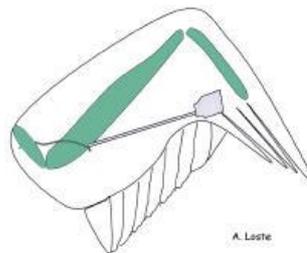
Fuente: www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/tecnicas_de_cultivo_celular.htm



Punción de la vena medial metatarsal



Punción de la vena yugular



Punción de la vena cutánea cubital

OBTENCION DE CROMOSOMAS METAFASICOS A PARTIR DE SANGRE PERIFERICA EN AVES

8.6 CULTIVO DE LINFOCITOS DE LARGA DURACIÓN. (Giannoni *et al*, 1986); (Giannoni y Giannoni, 2000).

Técnica de cultivo según Belterman y De Boer (1984)

Se utiliza:

- Medio para cultivo RPMI 1640 (5 ml)
- Suero Fetal Bovino SFB (1 ml)
- Fitohemaglutinina PHA (0.3ml)
- Penicilina/estreptomicina (0.1ml)

Cultivo celular (37 a 41 °C preferiblemente)

1. Se deja el cultivo en crecimiento celular durante 72 horas.
2. Una hora antes de las 72 horas adicionar 0.1 ml de Colchicina 0.016 %.
3. Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos.
4. Botar el sobrenadante, dejar 1 ml aproximadamente.
5. Resuspender con pipeta Pasteur.
6. Adicionar 5 ml de KCl 0.075 M
7. Dejar en baño maría a 41 °C durante 10 minutos. Durante este tiempo resuspender varias veces con pipeta Pasteur.
8. Centrifugar a 1000 rpm por 5 minutos.
9. Descartar el sobrenadante, dejar 1 ml aproximadamente.
10. Agitar continuamente el material con pipeta Pasteur.
11. Agregar una gota de fijador carnoy (3:1 metanol-ácido acético) durante 10 segundos. (este paso hacerlo muy lentamente)
12. Completar a 5 ml muy lentamente.
13. Repetir dos veces más el paso N°5.
14. Dejar 0.5 ml a 1 ml aproximadamente de material en suspensión en el tubo.
15. Adicionar 2 ml de fijador.
16. Sobre láminas que hayan estado inmersas en agua fría dejar caer dos gotas.
17. Secar al aire.
18. Colorear con Giemsa fosfatada al 5%
19. Observar al microscopio.

OBTENCION DE CROMOSOMAS METAFASICOS A PARTIR DE PULPA DE PLUMA EN AVES.

8.7 TOMA DE MUESTRA (PLUMAS)

Se retiran del ave de 5 a 10 plumas en crecimiento, los mejores bulbos se obtienen de la parte inferior del ala o de la cola.

8.8 CULTIVO DE CORTA DURACIÓN USANDO PULPA DE PLUMA. (Giannoni *et al*, 1986); (Goldschmidt *et al.*,1983); (Mercival y Galetti, 2000). Modificado por Rivera, 2008.

Se prepara una solución utilizando:

96 ml de KCl 0.075 M + 4 ml de solución acuosa de Colchicina al 0.0016 %.

1. Colocar las plumas retiradas del ave directamente en la solución preparada anteriormente.
2. Dejar por una hora.
3. Con ayuda de láminas portaobjetos separar y esparcir los bulbos.
4. Centrifugar por 5 minutos a 800 rpm.

5. Descartar el sobrenadante.
6. Resuspender y fijar con carnoy (3:1 metanol-ácido acético)
7. Repetir dos veces más el proceso de fijación con carnoy.
8. Sobre láminas que hayan estado inmersas en agua fría dejar gotear el material fijado.
9. Remover el exceso de agua de la parte inferior y secar en llama.
10. Colorear con Giemsa fosfatada al 5%.
11. Observar al microscopio.

8.9 TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE (PECES)

A los individuos se les hizo la toma de muestra de sangre de la vena caudal ubicada en la línea media del pez (véase fig. 4), de la cual se tomó el mayor volumen posible con jeringas de 5 ml, este material fue almacenado a 4°C antes de su procesamiento en el laboratorio de Medicina Genómica de la Universidad Surcolombiana (Facultad de salud).

Figura 4. TOMA DE MUESTRA DE SANGRE EN PECES. REPORTE FOTOGRÁFICO



8.10 CULTIVO DE LINFOCITOS DE LARGA DURACIÓN. (Camacho, 1999)
Citado por Guevara *et al.*, 2003. Modificado por Rivera, 2008.

Toma de muestra

- Tomar 2 ml de sangre.
- Adicionar 0.1 ml de heparina.

Técnica de cultivo según Camacho (1999)

Se utiliza:

- Medio para cultivo TC-199 (5 ml)
- Suero Fetal Bovino SFB (1 ml)

- Fitohemaglutinina PHA (0.3ml)
- Penicilina/estreptomicina (0.1ml) solo si hay sospecha de contaminación.

Cultivo celular (28 °C preferiblemente)

1. Se deja el cultivo en crecimiento celular durante 72 horas.
2. Una hora antes de las 672 horas adicionar 0.1 ml de Colchicina 0.016 %.
3. Centrifugar a 2500 rpm durante 10 minutos.
4. Al precipitado adicionar 10 ml de KCl 0.075 M por 30 min.
5. Centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos.
6. Fijar con 5 ml de carnoy (3:1 metanol/ácido acético).
7. Centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos.
8. Repetir dos veces más el Paso N°7.
9. Gotear láminas frías.
10. Colorear con Giemsa fosfatada al 2%
11. Observar al microscopio.

9. RESULTADOS Y ANÁLISIS

9.1 AVES (CULTIVO DE LINFOCITOS)

Se realizaron 10 cultivos de linfocitos de larga duración de los cuales en ninguno se obtuvo cromosomas en estado metafásico, debido a que hubo una variación en la temperatura para las replicas realizadas. Se registró una temperatura promedio de 40.2°C, la cual mostró una desviación estándar de 2.7, lo que indica que hay una variación de 3 grados centígrados aproximadamente por debajo o por encima de la temperatura ideal para realizar los cultivos, que es de 41°C. Los resultados obtenidos fueron células con la cromatina condensada pero nunca en estado metafásico (véase foto 1). Además una de las replicas realizadas se hizo sin la presencia de antibiótico, para comprobar la efectividad y la importancia de uso de éste al momento de realizar los cultivos, y como resultado se evidenció presencia de cocos y bacilos en los extendidos en la láminas (véase foto 2). Para comprobar la presencia de éstos se realizó coloración con Gram. Las fotos fueron tomadas con cámara fotográfica a un aumento de 100X.

Foto 1. 100X

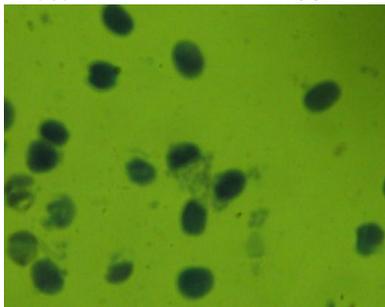
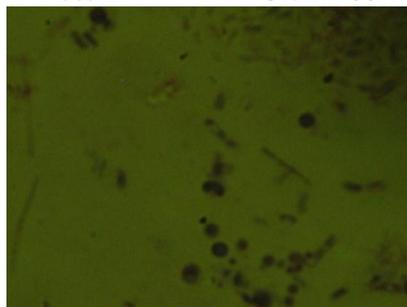


Foto 2. Gram 100X



Cultivo de pulpa de pluma

Se realizaron 12 réplicas de corta duración usando pulpa de plumas, se obtuvieron cromosomas en estado metafásico en aquellas replicas donde se llevó a cabo una excelente disgregación mecánica y esparcimiento de los bulbos, donde se encontró que el número de cromosomas del *Gallus gallus* es $2n=78$, que coincide con los reportados para esta especie (Ansari *et al.*, 1986). En la foto se puede

evidenciar que una característica de las aves es que presenta un número determinado de macrocromosomas, de 6 a 10 en pollos (Masabanda *et al.*, 2004) y una cantidad significativa de microcromosomas (véase foto 3). Se elaboró el cariotipo para esta especie solo mostrando los macrocromosomas (véase fig. 5). Además se reportó los casos donde no se llevo a cabo una disgregación mecánica de los bulbos, mostrando las células (fibroblastos) unidos por tejido conectivo (véase foto 4).

Foto 3. 100X

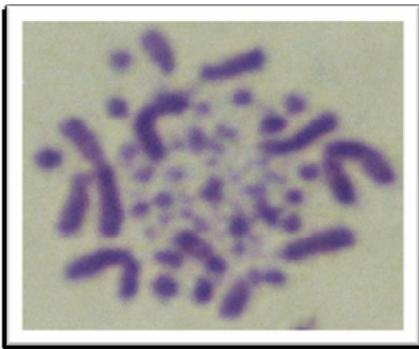


Figura 5. CARIOTIPO *Gallus gallus* 2n=78

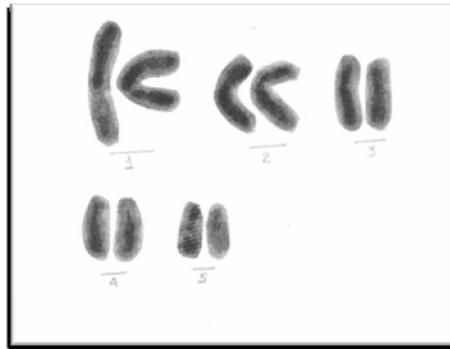
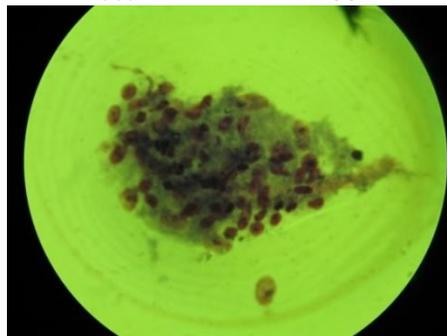


Foto 4. 100X



9.2 PECES (CULTIVO DE LINFOCITOS)

Para los experimentos realizados en peces se partió del protocolo base propuesto por Camacho en 1999, primera columna de resultados tabla N°2 que se fue modificando con el transcurso del proyecto como se muestra en las tabla N° 2 y 3.

Tabla 2. Resultado de cultivo de linfocitos en peces

ESPECIE →	TILAPIA ROJA				
n° DE REPLICAS →	(4)	(2)	(5)	(2)	(4)
SANGRE HEPARINIZADA	10 gotas	10 gotas	10 gotas	10 gotas	10 gotas
MEDIO TC-199	5 ml		5 ml	5 ml	
MEDIO RPMI		5 ml			5 ml
SFB	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
PHA	0.3 ml	0.3 ml	0.3 ml	0.3 ml	0.3 ml
ANTIBITICO	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
TEMPERATURA INCUBACION	28 °C	28 °C	28 °C	28 °C	28 °C
TIEMPO INCUBACION	60 h	60 h	72 h	84 h	72
CENTRIFUGACION	1200 rpm	1200 rpm	1200 rpm	1200 rpm	2500 rpm
KCI	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
CARNOY 3:1 METANOL:ACIDO ACETICO	3 veces	3 veces	3 veces	3 veces	3 veces

Tabla 3. Resultados cultivo de linfocitos en peces

ESPECIE →	CARPA			CACHAMA		
n° DE REPLICAS →	(5)	(2)	(5)	(2)	(2)	(3)
SANGRE HEPARINIZADA	10 gotas					
MEDIO TC-199	5 ml	5 ml		5 ml	5 ml	
MEDIO RPMI			5 ml			5 ml
SFB	1 ml					
PHA	0.3 ml					
ANTIBITICO	0.1 ml					
TEMPERATURA INCUBACION	28 °C					
TIEMPO INCUBACION	72 h	84 h	72	72 h	84 h	72
CENTRIFUGACION	1200 rpm	1200 rpm	2500 rpm	1200 rpm	1200 rpm	2500 rpm
KCI	10 ml					
CARNOY 3:1 METANOL:ACIDO ACETICO	3 veces					

NOTA: Para garantizar la estabilidad de la temperatura en los experimentos realizados se elaboró una incubadora artesanal con un balde y un calentador de agua para peceras (véase foto 5).

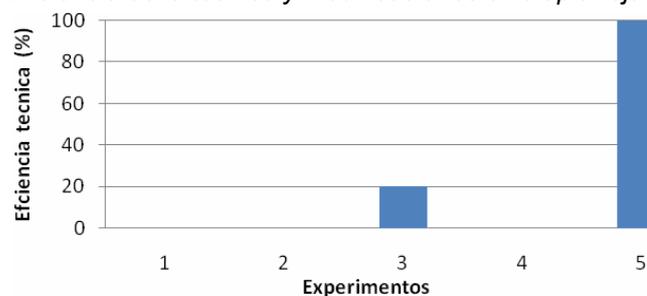
Foto 5. INCUBADORA ARTESANAL



En los resultados obtenidos se evaluaron la eficiencia del protocolo base Vs la eficiencia del protocolo modificado en el laboratorio, entiendo por eficiencia lo siguiente:

$$\% \text{ EFICIENCIA} = \text{N}^\circ \text{ de replicas realizadas} / \text{N}^\circ \text{ de replicas exitosas} * 100$$

Eficiencia de la técnica y modificaciones en tilapia roja.



Experimento 1. Protocolo sin modificaciones

Experimento 2. Cambio del medio TC-199 por MEDIO RPMI en igual volumen.

Experimento 3. Modifico tiempo de incubación de 60 hr a 72 hr.

Experimento 4. Modifico tiempo de incubación de 60 hr a 84 hr.

Experimento 5. Cambio del medio TC-199 por MEDIO RPMI en igual volumen. Modifico tiempo de incubación de 60 hr a 72 hr.

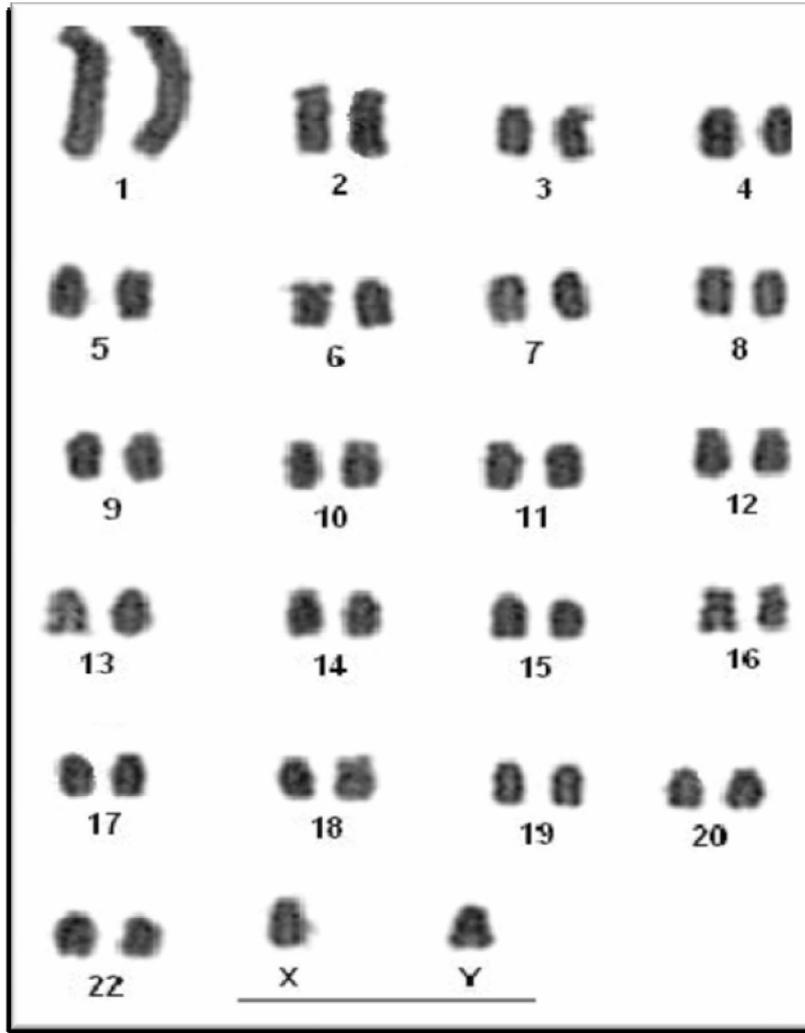
La grafica muestra que las replicas realizadas con el protocolo base (Experimento 1), y las realizadas con la modificación del medio y el tiempo de incubación a 84hr (Experimento 2 y 4) no mostraron eficiencia de éxito en su procedimiento. Mientras que los experimentos realizados donde se modificó el tiempo de incubación a 72h y se cambió el medio TC 199 por medio RPMI 1640 (Experimento 3 y 5), mostraron eficiencia de éxito del 20 y 100% respectivamente.

Se obtuvieron campos mitóticos para Tilapia roja (véase foto 6), y a partir de estos se elaboró el cariotipo, (véase fig. 6) organizándolos por su tamaño, alineándolos por el centromero y emparejándolos por lo homología de sus bandas. Se encontró que el número de cromosomas es el mismo al que se encontraba reportada para esta especie $2n=44$.

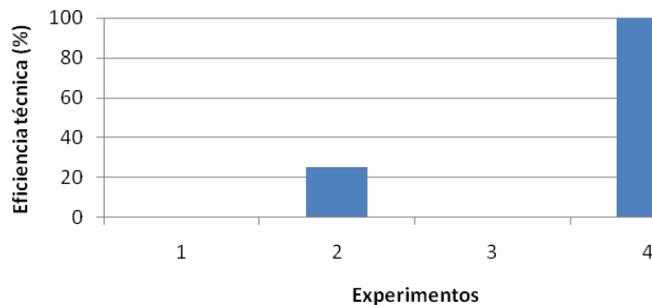
Foto 6. CAMPO MITÓTICO DE TILAPIA ROJA



Figura 6. CARIOTIPO *Oreochromis spp* 2n=44



Eficiencia de técnica y modificaciones en carpa común.



Experimento 1. Protocolo sin modificaciones.

Experimento 2. Modificación de tiempo de incubación de 60 hr a 72 hr.

Experimento 3. Modificación de tiempo de incubación de 60 hr a 84 hr.

Experimento 4. Cambio del medio TC-199 por MEDIO RPMI en igual volumen. Modifico tiempo de incubación de 60 hr a 72 hr.

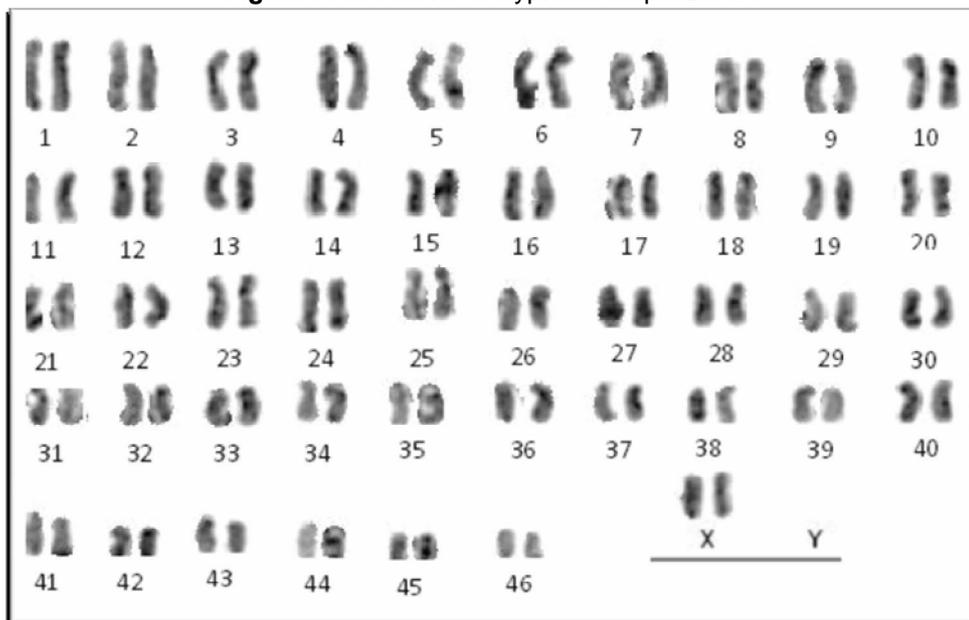
La grafica muestra que las replicas realizadas con el protocolo base (Experimento 1), y las realizadas con la modificación del tiempo de incubación a 84hr (Experimento 3) no mostraron eficiencia de éxito en su procedimiento. Mientras que los experimentos realizados donde se modificó el tiempo de incubación a 72h y se cambió el medio TC 199 por medio RPMI 1640 (Experimento 2 y 4), mostraron eficiencia de éxito del 22 y 100% respectivamente.

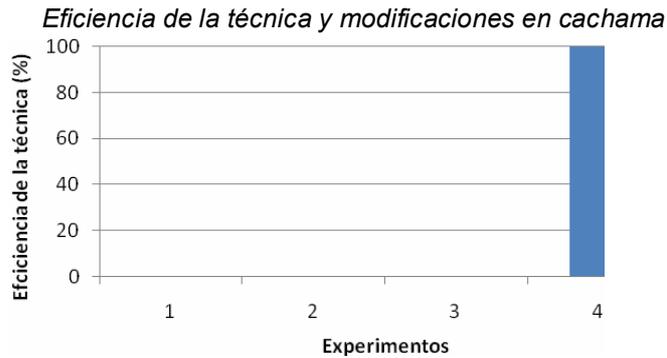
Se obtuvieron campos mitóticos para Carpa común (véase foto 7), y a partir de estos se elaboró el cariotipo, (véase fig. 7) organizados por su tamaño. Se encontró que el número de cromosomas es el mismo al que se encontraba reportada para esta especie $2n=94$.

Foto 7. CAMPO MITÓTICO CARPA COMÚN



Figura 7. CARIOTIPO *Cyprinus carpio* 2n=94





Experimento 1. Protocolo sin modificaciones.

Experimento 2. Modificación de tiempo de incubación de 60 hr a 72 hr.

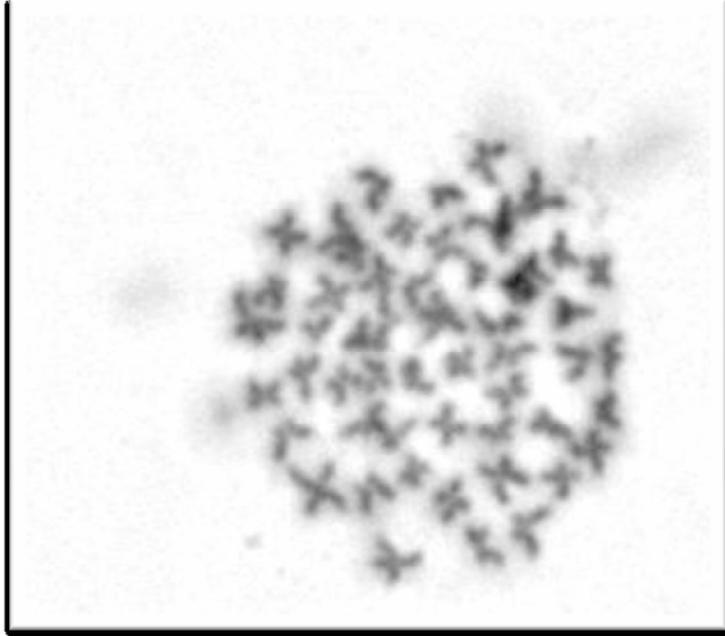
Experimento 3. Modificación de tiempo de incubación de 60 hr a 84 hr.

Experimento 4 Cambio del medio TC-199 por MEDIO RPMI en igual volumen. Modifico tiempo de incubación de 60 hr a 72 hr.

La grafica muestra que las replicas realizadas con el protocolo base (Experimento 1), y las realizadas con la modificación del tiempo de incubación a 72 y 84hr (Experimento 1, 2 y 3) no mostraron eficiencia de éxito en su procedimiento. Mientras que los experimentos realizados donde se modificó el tiempo de incubación a 72h y se cambió el medio TC 199 por medio RPMI 1640 (Experimento 4), mostraron eficiencia de éxito del 100%.

Se obtuvieron campos mitóticos para Carpa común (véase foto 8).

Foto 8. CAMPO MITÓTICO DE CACHAMA



10. RECURSOS HUMANOS Y FINANCIEROS

10.1 Presupuesto global de la propuesta por fuentes de financiación (en miles de \$).

RUBROS	FUENTES		TOTAL
	AUXILIO PROPIO	CONTRAPARTIDA.	
Equipos	-----	69.500	69.500
Materiales	76	4.695	4.771
Salidas de Campo	100	-----	100
TOTAL	176	74.195	74.371

10.2 Materiales y suministros (en miles de \$)

Materiales*	Justificación	Auxilio propio	Contrapartida	Total
Vacutainer ® 3 ml	Obtención de muestras de sangre.		100	100
Porta – cubre objetos	Evaluación de cromosomas en metafase		50	50
Micropipetas (10, 100, 100 µl)	Manejo de muestras de sangre, tinciones y preparación de reactivos.		1.700	1.700
NaH ₂ PO ₄ .	Preparación de reactivos.		300	300
KH ₂ PO ₄ .	Preparación de reactivos.		300	300
KCl	Preparación de reactivos.		100	100
HCl	Preparación de reactivos.		100	100
NaOH	Preparación de reactivos.		100	100
Heparina	Anticoagulante		10	10
Decol-hipoclorito de sodio	Lavado de materiales		5	5
Algodón	Limpieza toma de muestra	3		3
Alcohol comercial	Desinfección toma de muestra	3		3
Guantes	Trabajo de laboratorio	10		10
Medio RPMI	Medio para cultivo		400	400
Medio TC-199	Medio para cultivo		400	400
Suero Fetal Bovino SFB	Factores de crecimiento		1.000	1.000
Fitoheماغlutinina PHA	Estimulante de la Mitosis		20	20
Colchicina	Inhibidor de la Mitosis		20	20
Metanol	Preparación de reactivos		40	40
Acido acético	Preparación de reactivos		40	40
Giemsa	Tinción cromosomas		10	10
Pollos	Animales para experimentación	10		10
Impresión y empastado	Divulgación de resultados	50		50
TOTAL		76	4.695	4.771

Eliminado: i

10.3 Descripción y cuantificación de los equipos de uso propio (en miles de \$)

EQUIPO	VALOR (CONTRAPARTIDA)
Microscopio óptico con contraste de fase(1)	30.000
Centrifuga (1)	2.000
Incubadora	1.000
Cabina de Flujo laminar	35.000
Balanza Digital (1)	1.000
Neveras (4°C)	300
Plancha de calentamiento	200
TOTAL	69.500

NOTA: el presente trabajo fue financiado en su totalidad por el laboratorio de Medicina Genómica de la Universidad Surcolombiana.

11. CONCLUSIONES

- Se estandarizó una técnica para la obtención de cromosomas en estado metafásico a partir de sangre periférica en peces, donde se determinó que el éxito de la técnica está determinado por tiempos de incubación de 72hr, asociado con medio RPMI 1640 y un control adecuado de la temperatura a 28°C.
- Se estandarizó una técnica para la obtención de cromosomas en estado metafásico a partir de bulbo de plumas en aves, donde se determinó que el éxito de la técnica se llevo a cabalidad cuando se hizo una disgregación mecánica excelente de los bulbos.
- Se comprobó que el uso de antibióticos es de vital importancia al momento realizar los cultivos celulares, además es necesario tener el área de trabajo en condiciones estrictas de asepsia, esto evita que los mismos se contaminen.
- La temperatura es un factor determinante al momento de realizar cultivos de larga duración, el control adecuado de esta variable nos permitió llevar a cabalidad los objetivos propuestos en el presente trabajo.
- En los campos mitóticos de las aves se visualizan diferencia cromosómicas en cuanto a su tamaño, hay evidencia de macrocromosomas y microcromosomas, como fue el caso del *Gallus gallus* que presenta un $2n=78$ (Masabanda *et al.*, 2004), de los cuales en el presente trabajo se lograron identificar los macrocromosomas que corresponden a diez del total de cromosomas de la especie en mención.
- El numero cromosómico reportados en el presente trabajo coinciden con los reportados para Tilapia roja (*Oreochromis spp*) $2n=44$ (Castorena *et al.*, 1983), (Crossetti *et al.*, 1987) y de Carpa común *Cyprinus carpio* $2n=94$.
- Se estableció que el tiempo de incubación determinante para la presencia de cromosomas metafásicos en peces es de 72 horas. Tiempos inferiores o superiores a este mostraron resultados erróneos en la investigación. Esto relacionado con el tiempo del ciclo celular que no lo encontramos reportado, pero al igual que en todo las células eucariotas debe ser cercano a las 16-18 horas.

- Para realizar experimentos *in vitro* el tiempo del ciclo celular se retrasa un poco más, se realizan cultivos con tiempos de incubación que caractericen múltiplos de 24 horas donde se obtuvieron excelentes resultados.

12. RECOMENDACIONES

- La presencia de una incubadora que garantice la temperatura adecuada de los cultivos celulares es de vital importancia para llevar a cabo investigaciones en citogenética animal. Y es la principal razón o factor determinante que no permitió la obtención de metafases en el cultivo de larga duración a partir de linfocitos en aves.
- Siempre que se trabajen con muestras de animales es de vital importancia el uso de antibióticos que eviten el crecimiento de bacterias en los cultivos.

12.CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Meses	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Actividades												
Revisión bibliográfica de los estudios realizados en citogenética												
Captura de las especies sometidas a experimentación												
Desarrollo de los cultivos celulares												
Revisión de las láminas al microscopio												
Divulgación de resultados												

BIBLIOGRAFÍA

- Ansari H, Takagi N, Sasaki M. Interordinal conservatism of chromosome banding patterns in *gallus domesticus* (galliformes) and *melopsittacus undulates* (psittaciformes). *Cytogenet cell genet*; 1986. 43: 6-9.
- Arias-Rodriguez L, Páramo-Delgadillo S, Durán-González A. Caracterización citogenética del pez tropical de agua dulce *Parachromis managuensis* (Pisces: Cichlidae). *Rev. Biol. Trop*; 2006 54 (1): 35-42p
- Barriga Sosa Irene de los Angeles. Manual de prácticas de laboratorio de genética general BF-05. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa; 2007. 15p.
- Brassescos M, Pastori M, Roncati H y Cols. Comparative cytogenetic studies of Curimatidae (Pisces, Characiformes) from the middle Paraná River (Argentina). *Genetics and Molecular Research*; 2004. 3(2): 293-301p.
- Burbano C, Fundamentos de Acuicultura Continental. Capítulo VIII: Citogenética Aplicada a peces; 2001. 219-231.
- Castorena I, Uribe M, Arreguín J. Estudio cromosómico de poblaciones del género *Tilapia* Smith (Pisces, Cichlidae), provenientes de tres regiones de México. *Veterinaria Méx.* 1983. 14:137-143p.
- Cecilia Be T, Velásquez P, Youlton R. Laboratorio de Citogenética, Clínica Las Condes: experiencia de 15 años; 1999. 10(1)
- Crossetti D, Sola, L, Brunner P, y Cols. Cytogenetical Characterization of *Oreochromis niloticus*, *O. mossambicus* and their hybrid. The second International Symposium on Tilapia in Aquaculture. 1987. 143-151p
- Federico C, Cantarella CD, Scavo C y Cols. Avian genomes: different karyotypes but a similar distribution of the GC-richest chromosome regions at interphase. *Chromosome*; 2005. 13(8): 785-93
- Giannoni M, Giannoni MA, Ferrari I. Citogenética aplicada ás aves: técnicas. Manual Técnico; 1986. 119p.
- Giannoni ML y Giannoni MA. Cytogenetic analysis of the species *Porzana albicollis* ("saracura-saná", or sora). *Rev. Brasil. Genet*; 2000. 1(4): 649-665.

Goldschmidt B, Nogueira D, Araujo K y Cols. Study of the caryotype of *orizoborus maximiliani* (Passeriformes - aves) using young feather pulp cultures. *Genetics and molecular biology*; 1983. 23(2): 371-373.

Guevara P. Arias J. Cruz-Casallas P. Caracterización cariotípica del Yamú (*Brycon siebenthalae*). *Rev. Orinoquia*; 2003. 42-46p.

Jose de Lucca E, Lopes M. Chromosomal evolution in columbiformes (aves). *Caryologia*; 1976. 29(1): 59-68.

Ledesma M, Freitas T, Da Silva J y Cols. Descripción cariotípica de *spheniscus Magellanicus* (spheniscidae). *Hornero*; 2003. 18(1): 61-64

Lilian J y Sebastián S. Estudio citogenético preliminar en *Rhamdia quelen* (Pisces, Rhamdiidae) del río Paraná, provincia de Corrientes – Argentina. Resumen: V-056. 2005.

Lunardi V, Mercival F, Rocha G y Cols. Karyotype description of two neotropical psittacidae species: the endangered Hyacinth Macaw, *Anodorhynchus hyacinthius*, and the Hawk-headed parrot, *Derophtus accipitrinus* (Psittaciformes: Aves), and its significance for conservation plans. *Genetics and molecular biology*; 2003. 26(3): 283-287.

Marqués Débora Karla Silvestre. Caracterización genética de pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier) (Teleostei, Osteoglossidae) da bacia Tocantins-Araguaia, estado do Mato Grosso. Tese (Doctorado). UFSCar. 2003; 66p.

Martins C y Galetti Jr PM. Karyotype similarity between two sympatric Schizodon fish species (Anostomidae, Characiformes) from the Paraguay River basin. *Genet. Mol. Biol*; 1998. 21(3): 15p.

Masabanda J, Burt D, O'Brien P y Cols. Molecular cytogenetic definition of the chicken genome: the first complete avian caryotype. *Genetics*; 2004. 166: 1367-1373

Mercival F y Galetti M. First karyotypical description of two american ciconiiform birds, *Mycteria Americana* (Ciconiidae) and *Platalea ajaja* (Threskiornithidae) and its significance for the chromosome evolutionary and biological conservation approaches. *Genetic and molecular biology*; 2000. 23(4): 799-801.

Mizoguchi S, Portela-castro A, Martins-santos I. Cytogenetic Characterization of *Crenicichla* (Pisces, Perciformes, Cichlidae) of the Iguacú River. *Genetics and Molecular Research*; 2007. 6(3): 650-656p.

Molina J, Molero T, Hernández L y cols. Cariotipo del bagre guatero *Hexanematichthys herbergii* (Ariidae: Siluriformes) del estrecho del Lago de Maracaibo, Venezuela. *Biológico*; 2005. 38(3) 1-9.

Oliveira E, Habermann F, Lacerda O y Cols. Chromosome reshuffling in birds of prey: the karyotype of the world's largest eagle (Harpy eagle, *Harpia harpyja*) compared to that of the chicken (*Gallus gallus*). *Chromosoma*; 2005. 114(5): 338-343

Pérez A, Rodríguez N, Gil J y Cols. Tamaño de la muestra. Programa sistemático para el cálculo del tamaño de la muestra y el poder en diseños de investigación. Ver. 1.1. Bogotá Unidad de epidemiología clínica y bioestadística. Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Javeriana. 2001. 1 cd-rom.

Polit D y Hungler B. Investigación Científica en Ciencias de la Salud. 2da Edi. Nueva Edición Iberoamericana. México D.F. 1985. 595p.

Reina M. Técnicas de estudio de líneas celulares. Capítulo 1: Introducción al cultivo celular. 2003; 9p.

Reina M. Técnicas de estudio de líneas celulares. Capítulo 3: El medio de cultivo. 2003; 12p.

Ruiz V, Cárdenas B, González M y Cols. Efecto inmunomodulador de la fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*. *Rev Cubana Invest Bioméd*; 2005. 24(1) 5-13

Shoffner RN. Chromosome of birds. In: *The cells nucleus*, ed. Bush H. New York; 1974. 2: 223-261p

Shoffner RN. Curso de citogenética de aves. Jaboticabal, UNESP; 1985. 21-26p

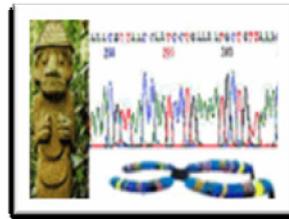
Stock A y Mengden G. Chromosome banding conservatism in birds and nonhomology of chromosome banding patterns between birds, turtles, snakes and amphibians. *Chromosoma (Berl)*; 1975. 50: 69-77.

Takagi N, Makino S. A revised study on the chromosomes of three species of birds. *Caryologia*; 1966. 19(4): 443-455.

Tegelstrom H, Ebenhard T, Rytman H. Rate Of Karyotype Evolution And Speciation In Birds. *Hereditas*; 1983. 98(2): 235-240

Vidotto A, Swarc A, Fenocchio A, y Cols. Cytogenetic Studies in Three *Pimelodella meeki* Populations (Pisces, Pimelodidae) from Tibagi River Basin (Brazil). *Journal of Heredity*; 2004. 95(6): 517–520p.

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
LICENCIATURA EN EDUCACION BASICA CON ENFASIS EN
CIENCIAS NATURALES Y EDUCACION AMBIENTAL
LABORATORIO DE MEDICINA GENOMICA



GUIA DE LABORAROTARIO PARA LA OBTENCION DE CROMOSOMAS
METAFAASICOS EN AVES Y PECES.

REALIZADA POR: DARWIN FABIAN RIVERA.

INTRODUCCION

La filogenética y los estudios sobre evolución se pueden llevar a cabo visualizando el complemento cromosómico completo de un ser vivo. La citogenética es la rama de la genética que se encarga de estudio de los cromosomas, cuya función básica es la construcción y análisis de cariotipos, que es la organización de los cromosomas por su tamaño, forma, alienados por el centromero y por la homología de sus bandas. Que es un método eficiente para el estudio cromosómico de las especies, los cuales nos permiten inferir acerca de posibles fenómenos de evolución, especiación, problemas reproductivos, enfermedades cromosómicas, relación con síndromes, rearrreglos cromosómicos (Inversiones, translocaciones, fusiones), sexaje, caracterización descriptiva, confirmación taxonómica, fortalecimiento de los programas de conservación y repoblamiento (ocasionados generalmente por pérdida del hábitat, explotación humana, híbridos en cautiverio) y definición de la conexión filogenética entre las especies.

El cultivo celular es una técnica efectiva para el estudio del comportamiento de las células animales y vegetales, libres de las variaciones sistémicas ocurridas dentro del organismo durante su normal homeostasis y sometidas bajo el estrés de un experimento. Se realiza *in vitro* y se pretende que las células tengan las mismas condiciones y componentes existentes *in vivo*.

Sus aplicaciones son diversas y abarcan un gran número de disciplinas y aproximaciones al estudio del fenómeno celular. Sus usos incluyen publicaciones en virología, investigación en cáncer, inmunología, ingeniería de proteínas, estudios de interacción y señalización celular, en la diferenciación y en el desarrollo celular, aplicaciones médicas, aplicaciones industriales y agronómicas, estudios citogenéticos y diferenciación celular.

OBJETIVOS:

- Obtener cromosomas en estado metafásico a partir de un cultivo de corta duración usando pulpa de plumas jóvenes.
- Obtener cromosomas en estado metafásico a partir de cultivo de larga duración usando sangre periférica en peces.
- Aplicar las técnicas de coloración regular con Giemsa y bandeo G.
- Elaborar el cariotipo a partir de los cromosomas metafásicos obtenidos en los cultivos celulares.

MATERIALES



Cámara de flujo laminar



Incubadora



Centrifuga.



Autoclave



Pipeteador



Baño maria



Microscopio óptico



Nevera 4°C

- Láminas portaobjetos y cubreobjetos.
- Bálsamo de Canadá.
- Tubos falcon de 15 ml.
- Pipetas de vidrio de 5 y 10 ml.
- Pipeta automática y puntas amarillas.
- Pipeta pasteur de vidrio.

REACTIVOS

- Medio para cultivo RPMI 1640.
- Suero Fetal Bovino SFB.
- Fitohemaglutinina PHA.
- Antibiótico: Penicilina/estreptomina.
- Solución de KCl 0.075 M.
- Solución acuosa de colchicina al 0.016%
- Giemsa.
- Buffer 2XSSC.
- Tampón fosfato.

PROCEDIMIENTO
OBTENCIÓN DE METAFASES USANDO PULPA DE PLUMA.
(Técnica de corta duración)

TOMA DE MUESTRA (PLUMAS): se retiran del ave de 5 a 10 plumas en crecimiento, los mejores bulbos se obtienen de la parte inferior del ala o de la cola.

Se prepara una solución utilizando:

96 ml de KCl 0.075 M. + 4 ml de solución acuosa de Colchicina al 0.0016 %.

1. Con ayuda de láminas portaobjetos separar y esparcir bien los bulbos.
2. Colocar los bulbos esparcidos en la solución preparada anteriormente.
3. Dejar por una hora.
4. Centrifugar por 5 minutos a 800 rpm.
5. Descartar el sobrenadante.
6. Resuspender y fijar con carnoy (3:1 metanol-ácido acético)
7. Repetir dos veces más el paso N° 6.
8. Sobre láminas que hayan estado inmersas en agua fría dejar gotear el material fijado.
9. Remover el exceso de agua de la parte inferior y secar en flama.
10. Colorear con Giemsa fosfatada al 5%.
11. Observar al microscopio.

OBTENCIÓN DE MEAFASES A PARTIR DE CULTIVO DE LINFOCITOS EN PECES
(Técnica de larga duración)

TOMA DE MUESTRA: la muestra de sangre debe tomarse con jeringa heparinizada, por 4 ml de sangre tomar 0.1 ml de heparina.

SIEMBRA: previo a la siembra, limpiar la cámara de flujo laminar con alcohol, luego introducir un frasco con decol, dos copos de algodón empapados en alcohol para limpiar la boca de los frascos, guantes, mecheros, bricket, pipetas de vidrio de 5 y 10 ml, pipeta automática de 10-100µl con puntas amarillas, tubo falcon nuevo y marcado. Dejar descongelar el medio RPMI 1640, el Suero Fetal Bovino (SFB) y la Fitohemaglutinina (PHA) sin sacudir para evitar la formación de burbujas. Prender la luz UV por 20 min sin la sangre.

Tomar un tubo falcon nuevo de 15 ml y en la cámara de flujo laminar adicionar:

- 5 ml de medio RPMI 1640
- 1 ml de SFB
- 100 µl de PHA

- 10 gotas de sangre

Flamear la boca del frasco, taponarlo, mezclar el tubo por inmersión, marcarlo y dejarlo en incubadora a 28 °C durante 72 hr.

PROCESAMIENTO: 1 hr antes que se cumplan las 72 hr de incubación agregar 100 µl de colchicina al 0.016% y al término de las 72 hr iniciar el proceso de la siguiente manera:

1. Centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos.
2. Botar el sobrenadante, dejar 1 ml aproximadamente.
3. Resuspender con pipeta Pasteur.
4. Adicionar 10 ml de KCl 0.075 M
5. Dejar en baño maría a 28°C durante 30 minutos. Durante este tiempo resuspender varias veces con pipeta Pasteur.
6. Centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos.
7. Descartar el sobrenadante, dejar 1 ml aproximadamente.
8. Agitar continuamente el material con pipeta Pasteur.
9. Agregar una gota de fijador carnoy (3:1 metanol-ácido acético) durante 10 segundos. (este paso hacerlo muy lentamente)
10. Después completar a 10 ml con carnoy muy lentamente resuspender 60 veces con pipeta Pasteur y dejar en reposo durante 20 min.
11. Centrifugar a 2000 rpm por 10 min.
12. Agregar 5 ml de carnoy, resuspender 60 veces y dejar en reposo durante 10 min.
13. Centrifugar a 2000 rpm por 10 min.
14. Agregar 5 ml de carnoy, resuspender 60 veces y dejar en reposo durante 5 min.
15. Centrifugar a 2000 rpm por 10 min.
16. Dejar 0.5 ml a 1 ml aproximadamente de material en suspensión en el tubo.
17. Adicionar 1 ml de fijador resuspender y
18. Sobre láminas que hayan estado inmersas en agua fría dejar caer dos gotas.
19. Secar al aire.
20. Colorear con Giemsa fosfatada al 5%
21. Observar al microscopio.

PREPARACION PREVIA DE LAS LÁMINAS: para cada cultivo deben prepararse cuatro láminas portaobjetos, las cuales deben ser de óptima calidad desde el punto de vista óptico y estar libres de grasa. Deben ser nuevas, además deben ser sumergidas con anterioridad en un recipiente con etanol por 24 hr, luego de este tiempo limpiarlas energéticamente una por una con una toalla que no deje motas.

BANDAS G

Una vez se han extendidos las láminas se dejan secar al aire. Se prepara la solución colorante, de acuerdo con la cantidad de láminas a colorear, aproximadamente por lámina se prepara 5 ml. Observar al microscopio y evaluar la calidad de la lámina.

PROCEDIMIENTO

- Envejecer las láminas 2 horas a 82 °C, con el fin de eliminar los iones que puedan intervenir en el tratamiento.
- Incubar las láminas a 60 °C por 30 min en buffer 2XSSC (esta solución se puede guardar en la nevera a 4 °C y usar por cuatro ocasiones).
- Lavar las láminas con abundante agua de chorro y dejar secar.
- Colocar las laminas en solución de tripsina 1:1 con agua destilada fría (esta solución debe botarse porque la tripsina se inactiva).
- Tripsinizar las láminas durante 5 segundos, lavar inmediatamente y dejar secar.
- Colorear con Giemsa fosfatada al 5% por 10 min. Lavar con agua de chorro y dejar secar al aire libre.
- Cubrir las láminas con laminillas y pegante estellan o bálsamo de Canadá.

REACTIVOS NECESARIOS

- Buffer 2XSSC (partes iguales de cloruro de sodio 0.3M y citrato de sodio 0.03M).
 - Cloruro de sodio 0.3M: 8.77g en 500ml de agua destilada.
 - Citrato de sodio 0.3M : 4.41g en 500ml de agua destilada.
- Tripsina al 0.025%: 0.25g en 100ml de agua destilada.
- Tampón fosfato: 0.21g Na_2HPO_4 + 0.358g $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ para un litro de agua destilada. Ajustar pH a 7.2 con NaHCO_3 .
- Colchicina solución madre 0.016% (0.16g/100ml H_2O), solución de trabajo 0.016% (1ml de solución madre + 9 ml de H_2O).
- KCl 0.075M: 1.298g KCl + 500ml de H_2O -

BIBLIOGRAFIA

1. Barriga Sosa Irene de los Angeles. Manual de prácticas de laboratorio de genética general BF-05. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa; 2007. 15p.
2. Burbano C, Fundamentos de Acuicultura Continental. Capitulo VIII: Citogenética Aplicada a peces; 2001. 219-231.
3. Giannoni M, Giannoni MA, Ferrari I. Citogenetica aplicada ás aves: técnicas. Manual Técnico; 1986. 119p.
4. Reina M. Técnicas de estudio de líneas celulares. Capítulo 1: Introducción al cultivo celular. 2003; 9p.
Reina M. Técnicas de estudio de líneas celulares. Capítulo 3: El medio de cultivo. 2003; 12p.