

ANORMALIDADES CITOGENÉTICAS DE LÍNEAS ESTABLES DE FIBROBLASTOS BOVINOS

Cytogenetic Abnormalities in stable, Bovine Fibroblast Lines

Marcos De Donato y Isabel Mimbela de Loroño

Laboratorio de Genética Molecular, Dpto. Biomedicina, IBCA, Universidad de Oriente, Cerro del Medio, Cumaná.
E-mail: marcosdedonato@yahoo.com Teléfono: 0293-430 2140, Fax: 0293-452 1297

RESUMEN

El cultivo de tejidos celulares en animales ha servido para el estudio de los fenómenos citológicos así como para el mapeo de genes a través de citogenética molecular, híbridos somáticos y radiación de híbridos. Sin embargo, es poco lo que se ha estudiado del comportamiento de líneas celulares establecidas. El objetivo de este estudio fue caracterizar las anomalías que pueden ocurrir en líneas estables de fibroblastos bovinos. Las células se replicaron y trataron con BrdU por 24 horas y luego se trataron con colcemida y se cosecharon con KCl, para luego fijarse con metanol-ácido acético (3:1). Las preparaciones cromosómicas fueron coloreadas con Hoechst 33258 y en algunos casos se marcaron cromosomas específicos (BTA5, BTA6, BTA8, BTA9 y BTA23) con sondas de clones BAC conteniendo segmentos genómicos a través de la hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH). Los resultados revelaron varias anomalías citogenéticas que se hicieron evidentes cuando el número de repiques aumentaba. Se encontró un 5% de poliploidía, principalmente tetraploidía, y algunas células octaploides. Asimismo, se observó en un 2% de las células en prometáfase, que las cromátidas hermanas perdían prematuramente su asociación entre ellas. Por último, el 1% de las células sufrió el fenómeno de endorreducción. Es posible que la ocurrencia de estas anomalías pueda ser debido al uso de BrdU u otras condiciones de cultivo. De lo contrario, estas anomalías en líneas celulares establecidas, que han demostrado ser estables luego de muchas divisiones, pudieran indicar la ocurrencia natural de estos fenómenos en tejidos animales *in vivo*.

Palabras clave: Citogenética, FISH, poliploidía, endorreducción.

ABSTRACT

The cultivation of animal cell tissue has aided in the study of cytological phenomena such as the mapping of genes through molecular cytogenetics, somatic hybrids and radiation hybrid. However, little has been studied as to the behavior of established cell lines. The objective of this study was to characterize abnormalities that could occur in stable fibroblast lines of bovines. Cells were reproduced and treated with BrdU for 24 hours and then treated with colcemide. They were collected with KCl and then fixed with methanol-acetic acid (3:1). The chromosome preparations were colored with Hoechst 33258 and in some cases specific chromosomes were labeled (BTA5, BTA6, BTA8, BTA9, and BTA23) with BAC hybridization clone probes containing genomic segments through fluorescence (FISH) *in situ* hybridization with. The results indicated several cytogenetic abnormalities that became evident when the number of replications increased. 5% polyploidy was found, principally tetraploidy, and a few octaploidy cells. In addition, 2% of the cells observed in prometaphase showed the sister chromatids with their association prematurely lost. Finally 1% of the cells suffered the endo-reduplication phenomenon. It is possible that the occurrence of these abnormalities could be due to the use of BrdU or other culture conditions. If this is not the case, these abnormalities in established cell lines which have proven to be stable after multiple divisions, could indicate the natural occurrence of these phenomenon in live animal tissue.

Key words: Cytogenetics, FISH, polyploidy, endo-reduplication.

INTRODUCCIÓN

Cada vez se conoce más que el ciclo celular está cuidadosamente controlado genéticamente por diferentes mecanismos que implican la señalización celular a través de una serie de cascadas de transformaciones que ocurren en el interior de la célula previo a la división celular. Fallas o cambios en la ac-

ción de dichos mecanismos pueden producir alteraciones en el ciclo y anomalías citogenéticas.

El cultivo de tejidos celulares en animales, especialmente en mamíferos, ha sido usado para estudiar los aspectos citológicos como control del ciclo celular, estructura intracelular, mecanismos moleculares de acción de distintos procesos bioquímicos y estudio del cáncer, entre otros [6]. Además, las líneas celulares han sido extensivamente usadas para el mapeo de genes a través de citogenética molecular, híbridos somáticos y radiación de híbridos [5, 8, 24]. Éstas se han utilizado debido a sus características de inmortalidad, muy poca diferenciación, inhibición del crecimiento por contacto celular y estabilidad genética por muchas generaciones [23]. Sin embargo, es poco lo que se ha estudiado del comportamiento citogénico de líneas celulares estables, lo que se evidencia por el escaso número de referencias sobre el tema.

La endorreducción es una alteración del ciclo celular donde ocurre la replicación del ADN sin ocurrir la mitosis y donde los cromosomas pueden estar asociados a varios niveles [9, 13]. Ésta se ha observado en diferentes organismos, principalmente en insectos, donde es normal encontrar cientos a miles de copias del ADN unidas entre sí formando los cromosomas politénicos de células de glándulas salivares como parte de una estrategia para la amplificación genética y sobreproducción de diferentes compuestos ha ser secretados [1]. En mamíferos también ha sido reportada previamente para células *in situ* tanto normales, inducidas y de origen canceroso [13, 14, 15, 16, 17, 19, 20].

La poliploidía, por su parte, representa la amplificación del contenido genético celular por medio de varios mecanismos, incluyendo la endorreducción, pero más comúnmente la progresión de una mitosis anormal donde las cromátidas se dividen en la anafase sin ocurrir migración hacia los polos ni división citológica. Es un fenómeno muy común en las plantas donde juega un papel importante en los patrones evolutivos de muchos grupos filogenéticos, pero también es encontrado en distintos grupos de animales [1]. En mamíferos parece ser un fenómeno común en algunas células de diferentes tejidos celulares, también implicado con la amplificación genética [2, 4, 18, 22].

Los fibroblastos, son células poco diferenciadas del tejido conjuntivo que se consiguen adyacentes al tejido epitelial y su función es secretar las proteínas que componen la matriz extracelular, especialmente colágeno tipo I y III [6]. Estas células crecen muy bien en cultivo *in vitro* en forma de monocapas que van formando primero una red suelta y luego una capa compacta con células dispuestas en forma paralela. Ellas normalmente inhiben su crecimiento con el contacto intercelular estrecho y se ha reportado que pueden llegar a diferenciarse en otros tipos celulares [12] aunque esto ha sido muy poco estudiado.

El objetivo de este estudio fue caracterizar las anomalías que pueden ocurrir en líneas estables de fibroblastos bovinos con el fin de ahondar en el conocimiento sobre los posibles mecanismos que pueden darles origen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de líneas celulares

Células de fibroblastos de las líneas celulares bovinas establecidas JEW38 y COW56 fueron usadas para este estudio. Estas son líneas celulares diploides, con un complemento cromosómico normal que fueron desarrolladas en el Laboratorio de Genética del Departamento de Patobiología de la Universidad Texas A&M (generosamente donadas por el Dr. James E. Womack), a partir de biopsias de piel de un toro raza Angus (JEW38) y una vaca raza Brahman (COW56). Estas células son mantenidas congeladas a -86°C y se descongelan para ser usadas por unas 50 repeticiones. Para su establecimiento, las biopsias fueron cortadas en secciones muy pequeñas y se colocaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco BRL), suplementado con aminoácidos, vitaminas y 10 % de suero fetal bovino y agregándoles una solución de antibióticos y antimicóticos (Sigma) que contienen una concentración final de 100 U de penicilina, 0,1 mg de estreptomina y 0,25 μg de anfotericina B por cada mL de medio [24]. El tejido fue incubado a 37°C en una incubadora con 5% de CO_2 . Cada tres días, el medio se renueva hasta que los fibroblastos se diseminan por todo el alrededor de las secciones, para luego separar las células por tratamiento con tripsina y establecer el cultivo eliminando la solución de antibióticos y antimicóticos.

Para el cultivo celular se utilizó la metodología de Gallagher *et al.* [7] con modificaciones. En breve, las células fueron cultivadas en frascos desechables específicos para cultivo celular a 37°C en una incubadora con 5% de CO_2 , utilizando el medio DMEM (Gibco BRL), suplementado con aminoácidos, vitaminas y 10 % de suero fetal bovino. Para la preparación de láminas con células mitóticas, las células de un frasco confluyente (cuando las células cubren de manera compacta todo el fondo) son lavadas con Solución Balanceada de Sales de Hank (HBSS, Gibco BRL) sin cloruro de calcio, sulfato de magnesio ni bicarbonato de sodio, y tratadas con una solución de Tripsina-EDTA (0,05% de Tripsina de páncreas bovino y 5 mM de EDTA- Na_4) por 10 minutos para despegar las células y obtener células individuales. Luego se añade medio fresco y se replica el frasco en una proporción desde 1:4 hasta 1:8, dependiendo de la densidad celular.

Bromodeoxiuridina (BrdU) es añadido al medio (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para promover su incorporación diferencial en las regiones ricas en AT de los cromosomas que se replican tempranamente en la fase S, con el fin de aumentar la resolución del contraste de bandas, así como para servir como sincronizador del ciclo celular. Después de unas 20 a 24 horas de incubación el medio es eliminado y las células son lavadas dos veces con HBSS. Medio fresco es luego añadido con timidina (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para reactivar el ciclo celular y evitar nueva incorporación del BrdU residual en las bandas de replicación tardías.

Adicionalmente, con el propósito de descartar al BrdU como posible causante de anomalías citogenéticas, se

cultivaron células no tratadas con este compuesto, utilizando las mismas condiciones y tratamientos. A partir de este cultivo, se analizó un pequeño grupo de células (N = 100) para establecer los porcentajes de células anormales observadas.

Después de 5 a 6 horas, cuando el índice mitótico está al máximo, las células son tratadas con colcemida (40 ng/mL) añadida al medio por treinta minutos para detener las células en metafase a través de la inhibición de la polimerización de la tubulina de las fibras del huso mitótico, con el fin de obtener preparaciones con cromosomas no aglomerados o sobrepuestos. Luego de este tratamiento por 30 minutos, las células son lavadas brevemente y cosechadas usando una solución hipotónica (75 mM de KCl) por un tiempo máximo de 15 minutos. Las células en solución fueron centrifugadas por 5 minutos a 1.000 rpm y fijadas con metanol-ácido acético (3:1) recién preparado añadiendo el fijador de manera gradual. Finalmente las células fueron lavadas dos veces con fijador fresco y guardadas a -20°C hasta su uso.

Para preparar láminas con células mitóticas, la suspensión celular fue lavada tres veces con fijador fresco y unas dos o tres gotas de suspensión fueron añadidas a láminas limpias y húmedas. Los cromosomas fueron teñidos con una solución de Hoechst 33258 (1,4 $\mu\text{g/mL}$) para producir las bandas fluorescentes QHF. La visualización fue hecha con un fotomicroscopio epifluorescente Olympus AX-70, usando filtro para luz ultravioleta de banda ancha. Los cromosomas bovinos fueron identificados de acuerdo con su tamaño relativo y la disposición de las bandas Q, siguiendo las designaciones de las bandas de la nomenclatura estándar bovina [3]. El colorante Hoechst y la incorporación diferencial de la BrdU produce un patrón de bandas QHF con muy buena resolución [8].

Se analizaron en detalle las bandas QHF de los cromosomas de 100 células por réplica, por línea, para determinar la presencia de rearrreglos cromosómicos tales como inversiones, duplicaciones, deleciones o translocaciones.

Hibridación *In situ* por Fluorescencia

La técnica de hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) se llevó a cabo según la metodología de Gallagher *et al.* [8] con algunas modificaciones. Las preparaciones cromosómicas fueron hidratados en buffer 2X SSC (300 mM NaCl, 30 mM citrato de sodio, HCl hasta pH 7,0) a 37°C por 1 hora. Los cromosomas fueron luego deshidratados en una serie de etanol desde 70, 85, 95 y 100 % a temperatura ambiente por dos minutos cada uno y luego desnaturalizados al meter las láminas en formamida desionizada al 70% en buffer 2X SSC a 76°C por 2 minutos.

Las sondas utilizadas para marcar los distintos cromosomas fueron vectores de cromosomas artificiales bacterianos (BAC por sus siglas en inglés) que contienen segmentos genómicos bovinos identificados previamente [5 y datos no publicados] escogidos por su disponibilidad al momento de llevar a cabo el estudio. El ADN de las sondas usadas fue marcado con biotina por "Nick Translation" a través de un kit comercial (Bio-

Nick kit, Gibco-BRL), donde 1 μg de ADN fue puesto en un tubo con 5 μL de la mezcla de 10 X de dNTP, agua purificada hasta un volumen de 45 μL y 5 μL de mezcla de 10 X de la enzima. El marcaje se incubó a 16°C por 2 horas. La eficacia del marcaje fue medido corriendo una muestra en un gel de agarosa al 2%, junto con ADN de C_0t I bovino (Applied Genetics Laboratories) como estándar para determinar cantidad y tamaño.

Entre 100 a 200 ng de ADN de la sonda marcada con biotina fue precipitado junto con 10 mg de ADN C_0t I bovino con etanol 100% y centrifugado en 13.000 rpm por 25 min. a 4°C . El precipitado fue secado al aire libre y resuspendido en 10 μL de mezcla de hibridación (50% formamida desionizada, buffer de 2X SSC, 10% dextran sulfato, a pH 7,0). El ADN luego fue desnaturalizado a 76°C por 6 min. e incubado por 30 min. a 37°C para permitir que las secuencias repetitivas se apareen y bloquear las señales no específicas. El ADN luego se añadió a las láminas precalentadas y se dejó incubar hasta el siguiente día a 37°C en una cámara húmeda. El siguiente día, las láminas fueron lavadas tres veces en formamida al 50 % con buffer 2X SSC y tres veces más con sólo buffer, ambos a 40°C por 5 min. cada uno. Luego fueron lavadas en buffer 4X SSC y se añadió 100 μL de solución de bloqueo (buffer 4X SSC, 13% de albúmina sérica bovina (BSA), 0,05% de Tween-20 y 0,08% de azida de sodio) para disminuir la unión no específica del anticuerpo, incubándolo por 15 min. a 37°C . Para la detección, se añadió 100 μL de solución de detección (buffer 4X SSC, 1% de BSA, 0,05% de Tween-20) conteniendo 1 $\mu\text{g/mL}$ del anticuerpo marcado Cy3-avidina (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y se incubó a 37°C por 30 min. Luego fueron lavadas tres veces en buffer 4X SSC con 0,05% de Tween-20 a 37°C por 5 min. cada uno.

En todas las preparaciones, los cromosomas fueron contrañidos con Hoechst 33258 (1,4 $\mu\text{g/mL}$) añadidos a una solución de buffer 4X SSC con para-fenilenediamina dihidroclorada (1 mg/mL, pH 9,0) como protector de la señal fluorescente. La visualización de la señal de las sondas fue hecho con un fotomicroscopio epifluorescente Olympus AX-70, usando filtro de paso doble específico para las emisiones de Cy3 y Hoechst.

RESULTADOS

Se analizaron un mínimo de 500 células por cada réplica y 4 réplicas por cada una de las líneas celulares para un total de 4.125 células de fibroblastos analizadas. El número de células observadas para cada tipo de anomalía fue analizado estadísticamente a través de un ANOVA simple para determinar si existían diferencias. No se encontraron diferencias significativas entre las réplicas o las líneas ($F = 0,43$; $P < 0,05$). La poliploidía fue el fenómeno más común encontrado en los fibroblastos con un 4,97% de aparición (TABLA I). El nivel de ploidía más frecuente en las células poliploides fue la tetraploidía, con el 4,58%, pero también se observaron células octaploides.

En la FIG. 1 se muestran ejemplos de células de fibroblastos de la línea JEW38 con diferentes niveles de ploidía. Las células poliploides fueron marcadas por FISH usando sondas específicas para el cromosoma 5 y 8. En las FIGS. 1b y c se utilizaron sondas BAC que contienen los microsatélites BM1819 y BM8126 localizados en el cromosoma 5 [5] mientras que en la FIG. 1d se utilizó una sonda BAC que contiene un segmento anónimo del genoma localizado en el cromosoma 8 (resultados no publicados).

Otra anomalía presente en el 1,02% de las células fue la endorreducción (FIGS. 2a y b). Las células que mostraron esta característica eran tetraploides cuyos cromosomas duplicados permanecían asociados, formando diplocromosomas, de modo que los cromosomas duplicados permanecían uno al lado del otro incluso después del reordenamiento que sufren los cromosomas con el aplastamiento de la célula durante la preparación de las láminas. Esto se pudo evidenciar por el uso de sondas que marcaban a los cromosomas homólogos, demostrando la clara asociación entre ellos.

En la FIG. 2a el cromosoma 6 está marcado con una sonda BAC que contiene el microsatélite BM4528, localizado a la mitad de este cromosoma [5], mientras que en la FIG. 2b el cromosoma 9 está marcado con una sonda BAC que contiene un microsatélite anónimo (resultados no publicados).

Además, otro grupo de células anormales (1,99%) mostró una disociación temprana de las cromátidas hermanas en prometáfase (FIGS. 2c y d). Esta separación es típica de las cromátidas al final de la metafase justo antes de comenzar la anafase, cuando las cromátidas se separan y comienzan a migrar a polos opuestos. Sin embargo, la forma alargada y fina de las cromátidas es típica de los cromosomas al final de la profase, donde los cromosomas aparecen bien definidos pero no se han compactado lo suficiente todavía y sus cromátidas hermanas permanecen asociadas y casi indistinguibles.

En la FIG. 2c y d se marcaron cromosomas específicos por FISH, donde el cromosoma 23 (FIG. 2c) aparece marcado con una sonda BAC que contiene el gen PRL y un microsatélite asociado a éste [5] y el cromosoma 9 (FIG. 2d) aparece marcado con una sonda BAC que contiene un microsatélite anónimo (resultados no publicados).

Por último, un 0,92 % de las células analizadas mostró otros tipos de anomalías, entre los que podemos nombrar la presencia de cromosomas conglomerados, células aneuploides y micronúcleos.

En el análisis de células del grupo control (N = 100) no tratadas con BrdU, se observó un porcentaje similar de células con endorreducción (2), tetraploidía (4) y cromátidas separadas (1).

El análisis de las bandas QHF de los cromosomas estuvo de acuerdo a las bandas de la nomenclatura estándar bovina [3] y no mostró ninguna alteración que pudiera indicar la

TABLA I
FRECUENCIA DE ANORMALIDADES CITOGÉNÉTICAS ENCONTRADAS EN LAS CÉLULAS DE DOS LÍNEAS ESTABLES DE FIBROBLASTOS BOVINOS. LOS NÚMEROS EN CADA LÍNEA REPRESENTAN LA SUMA DE LAS CÉLULAS ANALIZADAS EN LAS 4 RÉPLICAS. EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO NO MOSTRÓ DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ENTRE LAS LÍNEAS CELULARES NI LAS RÉPLICAS

Tipo de Célula	Línea JAW38	Línea COW56	Porcentaje
Diploide Normal	1,872	2,215	91,10
Tetraploide	93	96	4,58
Octaploide	9	7	0,39
Con Endorreducción	23	19	1,02
Con cromátidas separadas	38	44	1,99
Otros	17	21	0,92
Total	2,050	2,075	100,00

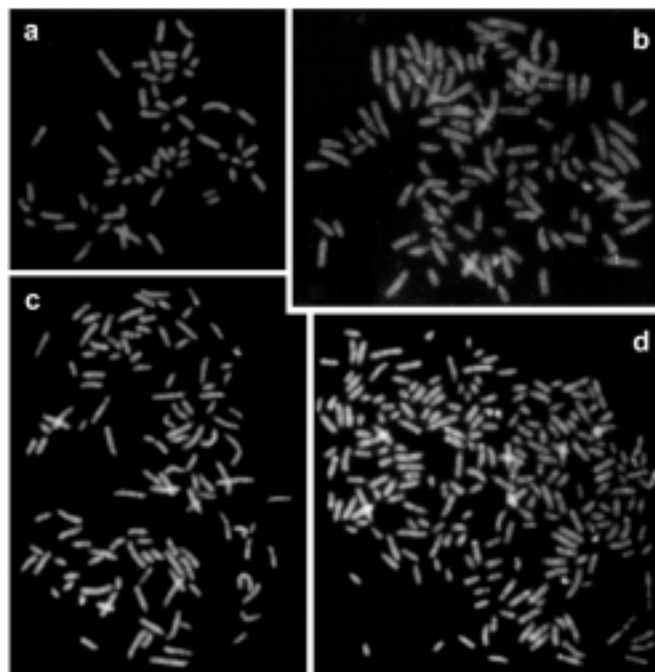


FIGURA 1. CROMOSOMAS METAFÁSICOS DE FIBROBLASTOS BOVINOS CON DIFERENTES NIVELES DE PLOIDÍA EN LA LÍNEA CELULAR JAW38. A) CÉLULA DIPLOIDE NORMAL, B) Y C) CÉLULAS TETRAPLOIDES DONDE SE OBSERVAN 4 CROMOSOMAS 5 MARCADOS CON DOS SONDA DIFERENTES QUE SON ESPECÍFICAS PARA ESE CROMOSOMA, Y D) CÉLULA OCTAPLOIDE DONDE SE OBSERVAN 8 CROMOSOMAS 8 MARCADOS CON UNA SONDA ESPECÍFICA PARA ESE CROMOSOMA.

presencia de rearrreglos cromosómicos tales como inversiones, duplicaciones, deleciones o translocaciones.

DISCUSIÓN

La poliploidía es un fenómeno que ha sido extensamente estudiado en plantas y algunos grupos de animales. En mamíferos, este fenómeno sólo ha sido estudiado en detalle en embriones y en células de origen cancerígeno [14, 16, 17, 20, 22], aunque ha sido reportado en tejidos humanos del miocardio, hígado, páncreas, células gliales, megacariocitos y trofoblastos [4]. La presencia de poliploidía en tejidos humanos ha sido asociada a la amplificación genética necesaria en células altamente especializadas de naturaleza secretora [4, 18].

La endorreduPLICACIÓN es una forma de poliploidización nuclear que resulta en múltiples copias de los cromosomas. Este proceso es común en plantas y animales, especialmente en tejidos con una alta actividad metabólica, y ocurre generalmente en células altamente diferenciadas [13]. La endorreduPLICACIÓN es el resultado de la ocurrencia de dos o más eventos de replicación en un ciclo celular y puede ser producido por la presencia de iniciaciones múltiples de la replicación dentro de una fase S, recurrencia de varias fases S o repeticiones de las fases S y G [9]. Aunque se ha observado este fenómeno desde hace tiempo como producto de cambio en genes que controlan varios aspectos de la regulación del ciclo celular, sólo recientemente se han llevado a cabo algunos estudios dirigidos a estudiar los mecanismos moleculares responsables de este ciclo celular especializado [13, 14]. Además, ésta ha sido implicada como el proceso que origina el mayor número de casos de poliploidía en células diferenciadas [21].

La endorreduPLICACIÓN ha sido reportada previamente para células de mamíferos *in situ* tanto normales, inducidas o de origen canceroso [2, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20]. Por ejemplo, en los tejidos embrionarios del disco (DE) y del trofotodermo (TE) de embriones bovinos producidos *in vitro* se han reportado entre un 25 a 96% de poliploidía, porcentaje que disminuye con la edad del embrión [22]. La diferenciación de las células del trofotodermo embrionario en bovinos y murinos está marcada por la aparición de células binucleadas producidas por endorreduPLICACIÓN [14, 16]. Estas células secretan hormonas, como el lactógeno placentario, y exhiben comportamiento migratorio para transferir sus hormonas a la circulación materna. Además, los megacariocitos humanos, precursores de las plaquetas sanguíneas, pueden alcanzar altos niveles de ploidía a través de endomitosis (endorreduPLICACIÓN) [18]. Esta poliploidización está asociada a un cambio orquestado de la expresión de distintos genes que inducen los altos niveles de ploidía y cambian la fisiología de la célula.

En fibroblastos humanos en cultivo también se ha encontrado que ocurre endorreduPLICACIÓN en una frecuencia entre 3 y 5% [21]. Este resultado es un poco mayor al encontrado en el presente estudio y puede ser debido a las diferencias de especies y líneas celulares usadas.

En las células endorreduPLICADAS analizadas en este estudio, los cromosomas duplicados aparecieron siempre juntos

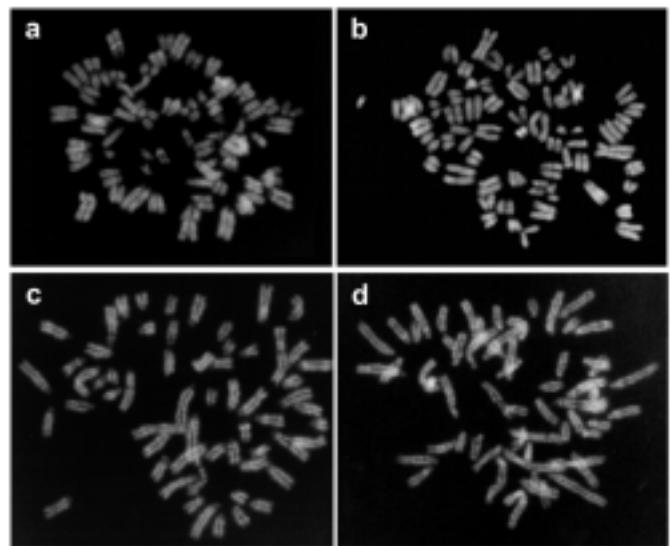


FIGURA 2. ANORMALIDADES CITOGÉNÉTICAS OBSERVADAS EN CÉLULAS DE FIBROBLASTOS BOVINOS DE LA LÍNEA CELULAR JAW38. A) Y B) CÉLULAS TETRAPLOIDES QUE PRESENTAN EL FENÓMENO DE ENDORREDUPLICACIÓN DONDE LOS CROMOSOMAS DUPLICADOS PERMANECEN EN ESTRECHA RELACIÓN. AQUÍ LOS CROMOSOMAS 6 (A) Y 9 (B) ESTÁN MARCADOS. C) Y D) CROMOSOMAS EN PROMETAFASE CON SEPARACIÓN PREMATURA DE LAS CROMÁTIDAS HERMANAS, CON SONDAS QUE MARCAN A LOS CROMOSOMAS 23 Y 9 RESPECTIVAMENTE.

en las profases y metafases, a pesar del procesamiento que sufren las células durante la fijación y preparación de las láminas. Estas observaciones demuestran que debe existir alguna asociación física entre dichos cromosomas a nivel de las regiones centroméricas.

Es posible que la ocurrencia de estas anomalías pueda ser debido al uso de BrdU u otras condiciones de cultivo, aunque se descarta a la colcemida ya que su acción no duró más de 30 minutos, aplicadas cuando las células ya se encontraban en metafase. Sin embargo, debido a que las células control mostraron porcentajes de anomalías similares a los obtenidos con las células tratadas con BrdU, hace parecer poco probable que éste pueda ser responsable de las anomalías encontradas. Además, la presencia de células octaploides demuestran que el primer evento de poliploidización ocurrió algún tiempo antes del tratamiento con este compuesto. Por último, aunque se ha señalado al BrdU como un compuesto mutagénico por ser un análogo de la timina, que puede inducir sustituciones de bases, pero no se conoce que pueda inducir poliploidización [6].

Es posible entonces que las anomalías observadas en estas líneas celulares, las cuales han demostrado ser genéticamente estables luego de muchas generaciones de división, sean fenómenos que ocurran de manera natural en el tejido conjuntivo animal *in vivo*. Así, el alto porcentaje de poliploidía

encontrado en este estudio podría indicar que ésta juega un papel importante en la diferenciación y especialización celular, lo cual sería una estrategia para aumentar su dosaje genético y la producción de diversos compuestos extracelulares, especialmente de las fibras que componen la matriz extracelular. Sin embargo no es conocido hasta ahora cuál podría ser la función de los fibroblastos especializados o de que ellos den lugar a células especializadas específicas con una función diferente.

Por su parte, la endorreduplicación podría ser el mecanismo de poliploidización de los fibroblastos de las líneas celulares estudiadas. El reporte de este fenómeno en otros tipos celulares en mamíferos es una indicación de que puede ser utilizado como estrategia para la poliploidización y consecuente aumento en el dosaje genético.

Entre los otros tipos de anomalías encontradas, los micronúcleos pueden ser producto de un proceso de apoptosis desencadenado por el envejecimiento de las células del cultivo, ya que es conocido que este tipo de proceso de muerte celular induce a la formación de micronúcleos [10, 11, 24].

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio, así como los reportes previos de células poliploides y del fenómeno de endorreduplicación, pueden demostrar que este mecanismo ocurre *in vivo*, como parte de un proceso programado de diferenciación terminal para inducir altos niveles de dosaje genético. Sin embargo, es necesario estudiar con más detalle los procesos que desencadenan a las alteraciones del ciclo celular y de diferenciación, especialmente en fibroblastos cuya función y patrón de desarrollo podría no estar totalmente esclarecido.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] APPELS, R.; MORRIS, R.; GILL, B.S.; MAY, C.E. **Chromosome Biology**. Kluwer Academic Publishers, Boston, USA. 401 pp. 1998.
- [2] CARTSBURG, O.; KALLEN, C.; HILLENKAMP, J.; SUNDMACHER, R.; POMJANSKI, N.; BOCKING, A. Topical mitomycin C and radiation induce conjunctival DNA-polyploidy. **Anal. Cell. Pathol.** 23: 65-74. 2001.
- [3] CRIBIU, E.P.; DI BERARDINO, D.; DI MEO, G.P.; EGGEN, A.; GALLAGHER, D.S. GUSTAVSSON, I.; HAYES, H.; IANNUZZI, L.; POPESCU, C.P.; RUBES, J.; SCHMUTZ, S.; STRANZINGER, G.; VAIMAN, A.; WOMACK, J. International system for chromosome nomenclature of domestic Bovids (ISCNDB 2000). **Cytogenet. Cell Genet.** 92(3-4): 283-99. 2001.
- [4] D'AMATO, F. Polyploidy in cell differentiation. **Caryologia** 42:183-211. 1989.
- [5] DE DONATO, M.; GALLAGHER, D.S.; DAVIS, S.K.; JI, Y.; BURZLAFF, J.D.; STELLY, D.M.; WOMACK, J.E.; TAYLOR, J.F. Physical assignment of microsatellite-containing BACs to bovine chromosomes. **Cytogenet. Cell Genet.** 87:59-61. 1999.
- [6] FRESHNEY R.I. **Culture of Animal Cells: A manual of basic technique**. 4^{ta} ed. John Wiley & Sons, New York. pp 557. 2000.
- [7] GALLAGHER, D.S.; DAVIS, S.K.; DE DONATO, M.; BURZLAFF, J.D.; WOMACK, J.E.; TAYLOR, J.F.; KUMAMOTO, A.T. A karyotypic analysis of Nilgai, *Boselaphus tragocamelus* (Artiodactyla: Bovidae). **Chrom. Res.** 6:505-513. 1998.
- [8] GALLAGHER, D.S.; DAVIS, S.K.; DE DONATO, M.; BURZLAFF, J.D.; WOMACK, J.E.; TAYLOR, J.F.; KUMAMOTO, A.T. A molecular cytogenetic analysis of the tribe Bovini (Artiodactyla: Bovidae: Bovinae) with an emphasis on sex chromosome morphology and NOR distribution. **Chrom. Res.** 7:481-492. 1999.
- [9] GRAFI, G. Cell cycle regulation of DNA replication: the endoreduplication perspective. **Exp. Cell Res.** 244:372-378. 1998.
- [10] KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutat. Res.** 504: 137-148. 2002.
- [11] KIRSCH-VOLDERS, M.; FENECH, M. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. **Mutagenesis** 16: 51-58. 2001.
- [12] KURIHARUCH, W.; GREEN, H. Adipose conversion of 3T3 cells depends on a serum factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 75: 6107-6110. 1978.
- [13] LARKINS, B.A.; DILKES, B.P.; DANTE, R.A.; COELHO, C.M.; WOO, Y.M.; LIU, Y. Investigating the hows and whys of DNA endoreduplication. **J. Exp. Bot.** 52: 193-192. 2001.
- [14] NAKANO, H.; SHIMADA, A.; IMAI, K.; TAKEZAWA, T.; TAKAHASHI, T.; HASHIZUME, K. Bovine trophoblastic cell differentiation on collagen substrata: formation of binucleate cells expressing placental lactogen. **Cell Tissue Res.** 307: 225-235, 2002.
- [15] MACAULEY, A.; CROSS, J.C.; WERB, Z. Reprogramming the cell cycle for endoreduplication in rodent trophoblast cells. **Mol. Biol. Cell** 9: 795-807. 1998.
- [16] MATSUOKA, A.; TADA, A.; TERAOKA, Y.; NUKAYA, H.; ONFELT, A.; WAKABAYASHI, K. Chromosomal effects of newly identified water pollutants PBTA-1 and PBTA-2 and their possible mother compounds (azo dyes) and intermediates (non-CIPBTAs) in two chinese hamster cell lines. **Mutat. Res.** 493: 75-85, 2001.

- [17] OKSALA, T.; THERMAN, E. Mitotic Abnormalities and Cancer. In: German, J. (Ed.), **Chromosomes and Cancer**. Wiley & Sons, New York. 239-263 pp. 1974.
- [18] RAVID, K.; LU, L.; ZIMMET, J.M.; JONES, M.R. Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. **J. Cell Physiol.** 190: 7-20. 2002.
- [19] TATEWAKI, R.; KAGOHASHI, Y.; FURUSE, K.; OTANI, H. Chromosome analysis of blastocysts cultured under diabetic condition. **Congenit. Anom. Kyoto** 42: 21-26. 2002.
- [20] THERMAN, E.; KUHN, E.M. Mitotic modifications and aberrations in cancer. **CRC Crit. Rev. Oncogen.** 1: 293-305. 1989.
- [21] THERMAN, E.; SUSMAN, M. **Human Chromosomes, Structure, Behavior and Effects**. 3rd ed. Springer-Verlag, New York. 376 pp. 1993.
- [22] VIUFF, D.; PALSGAARD, A.; RICKORDS, L.; LAWSON, L.C.; GREVE, T.; SCHMIDT, M.; AVERY, B.; HYTTEL, P.; THOMSEN, P.D. Bovine embryos contain a higher proportion of polyploid cells in the trophectoderm than in the embryonic disc. **Mol. Reprod. Dev.** 62: 483-488. 2002.
- [23] WALEN, K.H. The origin of transformed cells. Studies of spontaneous and induced cell transformation in cell cultures from marsupials, a snail, and human amniocytes. **Cancer Genet. Cytogenet.** 133:45-54, 2002.
- [24] WOMACK, J.E.; MOLL, Y.D. A gene map of the cow: Conservation of linkage with mouse and man. **J. Hered.** 77: 2-7.1986.