

Desarrollo de cultivos de tejidos celulares en reptiles y/o anfibios para su uso en estudios citogenéticos



Iván Gómez Seoane
Trabajo Fin de Grado
Grado en Biología



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
Área de Genética

DESARROLLO DE CULTIVOS DE TEJIDOS CELULARES EN
REPTILES Y/O ANFIBIOS PARA SU USO EN ESTUDIOS
CITOGENÉTICOS

Iván Gómez Seoane

2014

Contenidos

Introducción.....	3
Objetivos.....	5
Materiales y Métodos.....	6
1.-Especie de estudio.....	6
2.-Procesamiento.....	7
3.-Cultivos celulares.....	7
4.-Método directo.....	11
5.-Citogenética.....	11
Resultados.....	14
1.-Cultivos celulares.....	14
2.-Método directo.....	16
3.-Datos citogenéticos.....	17
Discusión.....	21
1.-Cultivos celulares.....	21
2.- Metafases.....	21
3.-Citogenética.....	22
4.-Epílogo.....	23
Conclusiones.....	24
Agradecimientos.....	25
Bibliografía.....	26

Introducción

El establecimiento y mantenimiento de cultivos celulares en anfibios constituye una herramienta muy útil para la realización de estudios citogenéticos, ya que permiten la obtención de gran número de células y, consecuentemente, un índice metafásico muy elevado. Por lo tanto, la optimización de los cultivos tisulares permite disponer de una fuente casi inagotable de nuevas células (Ezaz *et al.*, 2009). Es por ello, y a pesar de que autores como Olmo *et al.* (1986), Wei *et al.* (1992) y Campos *et al.* (2012) se decantan por el uso de un método directo, que decidimos proceder al establecimiento de diferentes cultivos y a su optimización de cara a estudios citogénéticos posteriores.

Si bien el establecimiento de dichos cultivos podría haberse realizado con alguna otra especie, en este caso nos decidimos por adentrarnos en el grupo de los anfibios y más concretamente en el género *Pelophylax*, eligiendo como objeto de estudio a una rana típica de Galicia como es la rana verde o *Pelophylax perezi* (López Seoane, 1885). Esta especie de anuro presenta un tamaño mediano, con una cabeza más larga que ancha y el hocico redondeado. Tiene ojos prominentes y próximos entre sí con una pupila horizontal. Presenta además un tímpano muy patente y un pliegue dorsolateral moderadamente desarrollado. En cuanto a la coloración dorsal, existe una gran variabilidad. Comúnmente de color verde (como su nombre común indica) con manchas negras, presenta una línea vertebral clara, la cual es uno de los rasgos más destacables de su coloración cuando esta es visible (Figura 1). Su hábitat de distribución es tremendamente variable, apareciendo por toda la Península Ibérica y el sur de Francia (Egea-Serrano, 2006).



Figura 1: Imagen de *P. perezi* con detalles sobre su anatomía. (http://www.fonsaweb.com/fonsaweb_et/modules.php?name=News&file=article&sid=7#rana_perezi)

Desarrollo de cultivos de tejidos celulares en reptiles y/o anfibios para su uso en citogenética

Este grupo animal presenta una gran variabilidad en cuanto a los patrones de determinación sexual lo cual es de gran interés a la hora de estudios evolutivos sobre la diferenciación gonadal en vertebrados (Eggert, 2004). En este grupo se han descrito mecanismos de determinación genética del sexo tanto con sistema XX/XY (macho heterogamético) como con sistema ZZ/ZW (hembra heterogamética). Es, además, un grupo en el cual el heteromorfismo dentro de los cromosomas sexual se observó en unas 20 especies de las 1500 estudiadas.

Toda esta plasticidad hace de estos animales un grupo de interés a la hora de su estudio ya que nos permiten una mayor comprensión evolutiva de los mismos, pudiendo incluso afinar más a la hora de establecer relaciones y filogenias entre las diferentes especies. Como ejemplo tenemos las múltiples revisiones filogenéticas, las cuales han llevado a considerar a *Pelophylax* como un género dentro de la familia Raninae y no como subespecie asociada al género *Rana* (Che *et al.*, 2006). Todos estos análisis se deben a que las diferencias morfológicas son en ocasiones complicadas de ver y no permiten hacer una diferenciación clara de forma que los datos citológicos obtenidos permiten un acercamiento y una mayor comprensión del parentesco entre especies.

Todos estos datos hacen que esta sea una especie de gran interés en estudios de evolución cromosómica. Este trabajo constituye la puesta en marcha y establecimiento de líneas celulares en *P. perezii* y la obtención de cromosomas metafásicos para la elaboración de su cariotipo y la localización cromosómica de regiones de interés. Para ello hemos aplicado diferentes técnicas esperando llegar a un nivel de cultivos óptimo así como a resultados citogenéticos de calidad que ayuden a comprender la evolución cromosómica y de determinación sexual no solo de este grupo, sino incluso de otras especies dentro de los vertebrados.

Objetivos

El objetivo del trabajo es el establecimiento y mantenimiento *in vitro* de líneas celulares de anfibios tomando como base la especie *Pelophylax perezi*. Se realizarán diferentes pruebas para intentar optimizar estos cultivos mediante el empleo de diferentes medios y temperaturas así como diferentes órganos del animal. Además se procederá a un análisis citogenético preliminar de la especie a partir de cromosomas metafásicos obtenidos a partir de *Pelophylax perezi*.

Materiales y Métodos

1.- Especie de estudio

Se procedió a la captura de 3 individuos, dos machos y una hembra, de *Pelophylax perezii* procedentes de la localidad de Cerceda (43°10' N, 08°28' O). Los individuos fueron capturados y procesados de acuerdo a la legislación española actual (Real Decreto 1201/2005 y Ley 32/2007, sobre la protección de los animales de uso en experimentación y otros propósitos científicos) y con la autorización de la Xunta de Galicia (Nº Clave 571/2013).

La determinación sexual de los individuos fue realizada basándose en el fenotipo externo así como por inspección visual de las gónadas durante la disección utilizando los criterios que aparecen en Egea-Serrano, (2006). Se confirmó la presencia de sacos bucales aéreos en los machos (Figura 2A) así como de la presencia de callosidad nupcial de color negruzco en el primer dedo de las patas delanteras (Figura 2B) y mediante la observación del antebrazo, pronunciadamente mayor en tamaño en los machos que en las hembras (Figura 2C).

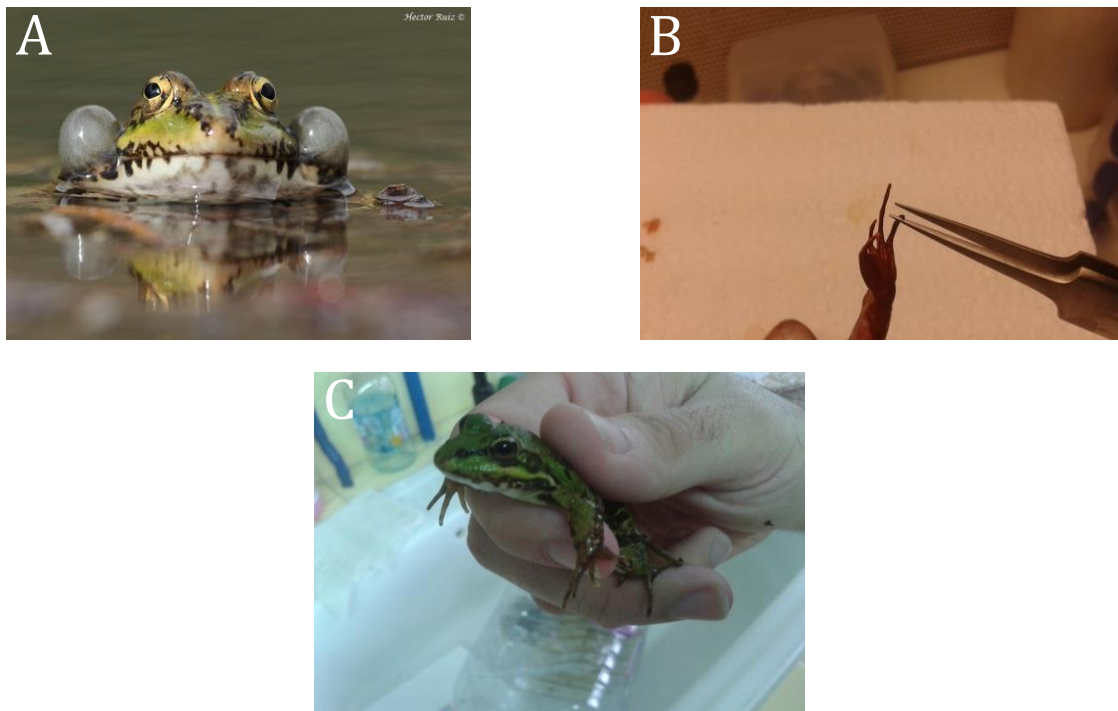


Figura 2. Detalles de: A) Sacos aéreos bucales en *P. perezii* (http://zonaosera.blogspot.com.es/2011_08_01_archive.html). B) Callosidad nupcial en *P. perezii*. C) Antebrazo de macho de *P. perezii*.

2.- Procesamiento

Dos de los individuos, un macho y una hembra, fueron anestesiados y sacrificados conforme a la normativa ética vigente y se dispuso al procesamiento en condiciones de esterilidad en una cámara de flujo laminar previo lavado del animal con alcohol. Se procedió a la disección del animal y a la extracción de los tejidos que iban a ser utilizados para cultivo. Se extrajo sangre por punción directa en el corazón y se extrajeron los pulmones, el corazón y tejido muscular de las ancas para realizar los diferentes cultivos.

Con el tercer individuo, un macho, se realizó la preparación de metafases por método directo, la cual se explicará en el apartado 4.

3.- Cultivos celulares

3.1-. Sangre

3.1.1-. Extracción y cultivo

La sangre se extrajo mediante punción directa del corazón utilizando jeringuillas estériles con heparina para evitar la coagulación. Se extrajeron una media de entre 500-1000 μ L que se dejaron reposar en un tubo Corning estéril junto con la heparina para permitir la división en dos fases, intentando obtener así una separación de los diferentes componentes celulares, presuponiendo obtener en la fase superior linfocitos y en la inferior eritrocitos y otros componentes celulares (Kasahara *et al.*, 1998).

Una vez separadas las fases estas se recogieron por separado y se cultivaron en diferentes tipos de medio en tubos Corning estériles (Tabla 1).

Tabla 1: Composición del medio para cultivo de linfocitos

Componentes	Substancias utilizadas	Proporción
Medio Base	Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma)	
Suplementos generales	Suero bovino fetal (Sigma)	20%
	L-glutamina (GIBCO)	2%
	Solución Antibiótica Antimicótica 100X (Gibco)	2%

Como se muestra en la Tabla 2, la variación más destacada es la del agente mitogénico añadido a cada uno de los tubos.

Tabla 2: Suplementos específicos utilizados en los diferentes medios para cultivo de linfocitos

	Medio 1	Medio 2	Medio 3
Mitógeno añadido	Fitohemaglutinina M (GIBCO)	Pokeweed (Sigma)	Fitohemaglutinina M + Pokeweed
Proporción	5%	0.1mg/mL	5%+0.1mg/mL

Los medios con los tres diferentes agentes mitogénicos así como un medio extra (medio general para humanos) se cultivaron en una estufa a 26°C (Kasahara *et al.*, 1998).

3.1.2-. Obtención de metafases

La obtención de metafases a partir de diferentes volúmenes de sangre se llevó a cabo a los 3, 4, 5, 6 y 7 días posteriores al cultivo ya que se suponía que el pico de mitosis estaría en este rango (Kasahara *et al.*, 1998). A los medios se les añadió 30ng/μL de colcemida la cual se dejó actuando toda la noche. La colcemida detiene la división celular en metafase al inhibir la formación del huso acromático. Al día siguiente el volumen de sangre, generalmente unos 1.5mL de volumen total, fue centrifugado a 180g durante 5 minutos. El sobrenadante se retiró con cuidado y se sometieron las células a un choque hipotónico con 5mL de KCl 0.075M. Se realizó una incubación durante 30 minutos a temperatura de cultivo, se centrifugó y se realizó una serie de dos lavados con *carney* (3metanol:1ac. acético) frío con centrifugaciones de 7 minutos a 180g en el medio de cada lavado. Para finalizar se hizo una nueva centrifugación y se resuspendió en un volumen de *carney* adecuado al tamaño de nuestro sedimento. Por último, se extendieron a temperatura ambiente en el portaobjetos y se observó las preparaciones a microscopio.

3.2.- Fibroblastos (tejido)

3.2.1.- Procesamiento y cultivo

Una vez sacrificados los individuos se procedió a la disección de los mismos. Los tejidos elegidos para los cultivos fueron los de corazón, pulmones y músculo, este último procedente de las ancas (Uno *et al.*, 2008).

Para la disección se utilizaron pinzas y cuchillas estériles, la piel se separó y se realizó un corte en la zona abdominal en dirección posterior-anterior así como otros dos cortes, uno en la base del cráneo y otro en la zona caudal, para permitir la apertura de la cavidad abdominal.

Se separaron las dos mitades y se sujetaron con agujas estériles para permitir un fácil acceso a los diferentes órganos y un mejor manejo del animal. A continuación se identificaron los diferentes tejidos y se fueron extrayendo con la ayuda de unas nuevas pinzas estériles así como una cuchilla estéril para evitar posibles contaminaciones que pudieran ser ocasionadas por los instrumentos en contacto con la piel. Situamos los tejidos de interés en placas de Petri con medio de cultivo (Figura 3A), cuya composición es la mostrada en la Tabla 3. Para evitar la posible muerte del tejido se utilizó un nuevo par de cuchillas estériles y se troceó el material para facilitar el cultivo. Los explantes obtenidos fueron depositados en frascos Roux (Figura 3B) y cultivados a dos temperaturas diferentes, 26°C y 30°C (Kasahara *et al.*, 1998).

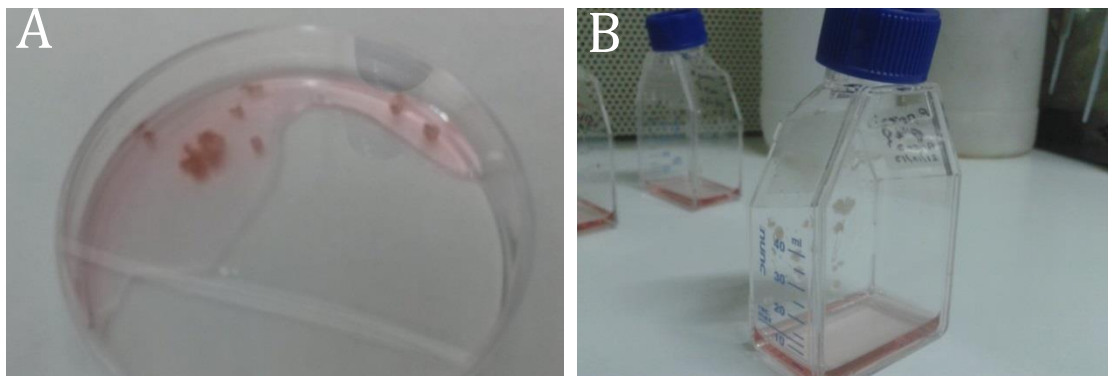


Figura 3: A) Fragmentos de tejido en placa Petri con medio de cultivo. B) Frasco Roux con explantes adheridos.

Corazón y pulmón fueron cultivados juntos en un frasco, tanto para hembra como para macho, el primero a 26°C y el segundo a 30°C. En cuanto a los cultivos de tejido muscular, se cultivaron réplicas de ambos cultivos a las dos temperaturas para intentar observar posibles diferencias en la temperatura de cultivo.

Tabla 3: Composición de medios para cultivo de fibroblastos

Componentes	Substancias utilizadas	Proporción
Medio base	Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, SIGMA)	
Suplementos	Suero bovino fetal (Sigma)	10%
	L-glutamina (GIBCO)	2%
	Solución Antibiótica Antimimicótica 100X (Gibco)	2%

3.2.2-. Subcultivo

Una vez los cultivos mostraron un crecimiento suficiente y se observó que las células empezaban a ser confluentes se subcultivaron a una proporción 1:2 para evitar que su confluencia limitase la división celular y, por lo tanto, el crecimiento del cultivo. Para ello retiramos el medio y lavamos las células con tampón fosfato salino (PBS) 1X estéril para eliminar todo el suero bovino fetal (FBS), el cual inhibe la acción del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)-tripsina. La solución EDTA-tripsina se utiliza en el siguiente paso del subcultivo, previamente precalentada a 37°C, para despegar las células de la base del frasco. Se añadieron 2 mL de EDTA-tripsina (0.05%-0.02%) y se dejó incubar en la estufa durante 2 minutos. Una vez se observó que las células están desadheridas se añadió nuevo medio de cultivo el cual detiene la acción de la tripsina (tóxica para las células si no se controla muy bien el tiempo de exposición) y estas células pueden ser pasadas a un nuevo frasco para continuar su crecimiento.

3.2.3-. Obtención de metafases

La obtención de metafases se realizó siguiendo los mismos pasos descritos en el apartado 3.2.2, una vez obtenidas las células sueltas se centrifugaron 7 minutos a 180g y añadimos entre 5-10 mL de KCl 0.075M, en función del sedimento celular, para realizar el choque hipotónico. A partir de aquí el proceso a seguir es el mismo que para 3.1.2. Se realizaron dos lavados con *carney*, seguido cada uno de una centrifugación, retiramos el sobrenadante y resuspendemos en un volumen final de *carney* adecuado al sedimento celular del que disponemos.

4.- Método directo

Se inyectó al macho 0.01ml colchicina/gr de peso para detener las mitosis del animal en metafase y procurar obtener así un alto número de las mismas para observar a microscopio (Olmo *et al.*, 1986).

Transcurridas 3 horas desde el tratamiento, el macho fue anestesiado, sacrificado y diseccionado utilizando de nuevo el proceso ya descrito anteriormente (apartado 3.2.1). Al igual que para el resto de individuos, se extrajo sangre directamente del corazón por punción directa con jeringuilla cargada con heparina y se utilizó en cultivo para proceder a probar más medios de cultivo.

Posteriormente se procedió a la extracción de los siguientes órganos: corazón, pulmones, intestino, hígado, testículos y medula ósea (Wei *et al.*, 1992 y Campos *et al.*, 2012). Estos órganos fueron sometidos a un choque hipotónico con citrato de sodio sobre placas Petri y a una posterior fijación con *carnoy* (Amor *et al.*, 2010). Las muestras fueron congeladas y diferentes preparaciones de metafases fueron observadas a microscopio. El método directo se realizó según el método de *air-drying* descrito por Schmid (1978).

5.- Citogenética

5.1.- Cariotipo

La elaboración del cariotipo fue realizada en base a la longitud relativa y a la posición centromérica siguiendo los criterios expuestos por Levan *et al.*, (1964), donde se establece la nomenclatura cromosómica a partir de la fórmula $IC=q/L(p+q)$ y que divide a los cromosomas según la Tabla 4.

Tabla 4: Nomenclatura cromosómica según la posición centromérica

Clasificación	Índice centromérico
Metacéntrico	50
metacéntrico	50-37.5
submetacéntrico	37.5-25
subtelocéntrico	25-12.5
telocéntrico	12.5-0
Telocéntrico	0

5.2.- Tinción con Giemsa

Se realizó una tinción estándar con Giemsa añadiendo a una cápsula Coplin 50mL de una mezcla de 4mL de Giemsa, 4mL de tampón fosfato enrasado a 100mL con agua destilada y dejando los portas a teñir durante 20 minutos, lavándolos con agua posteriormente.

5.3.- Tinción con nitrato de plata (AgNO_3)

Para la tinción con nitrato de plata se siguió el procedimiento de Howell & Black (1980). Para ello se preparó una disolución de gelatina (2% gelatina: 1% ac. fórmico) y una solución de dicho nitrato (0.5gr/mL). Sobre la preparación cromosómica previamente situada en una placa a 43°C se extendieron dos gotas de la gelatina y de cuatro de solución de nitrato. Se procedió a una ligero agitado de la mezcla teniendo cuidado de no tocar la superficie del porta para evitar dañar las metafases y se dejó teñir durante 5 minutos. La extensión se lavó con abundante agua. Esta tinción permite visualizar en los núcleos o en los cromosomas las regiones organizadoras nucleolares (Ag-NORs).

5.4.- Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

Para visualizar la localización cromosómica de los genes ribosomales 18S-5'8S-28S (18S) se llevó a cabo la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) utilizando la sonda de DNA pDm 238 de *Drosophila melanogaster* (Rohia *et al.*, 1981) marcada con fluoresceína con el Kit Platinum Bright™: Nucleic Acid Labeling Kit (Kreatch biotechnology) para los genes 18S. Para la visualización de los genes 5S, se usó la sonda para los genes 5S de *Iberolacerta monticola* marcada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con Cy3 usando el kit Cy3 PCR Labeling Master (Jena Bioscience). Ambas preparaciones fueron contrateñidas con DAPI.

El proceso que se siguió es el descrito por Rojo *et al.* (2014). El primer paso en dicho proceso es realizar dos lavados de 5 minutos en 2xSSC a temperatura ambiente seguido de una serie de deshidrataciones en etanol al 70%, 90% y 100% de 5 min cada uno y, posteriormente, se procedió a su envejecimiento a 65°C durante 30 minutos. Cien nanogramos de la sonda marcada (2.5µL) se añadieron y se completaron hasta los 30 µL junto con *buffer* de hibridación (50% formamida, 10% dextrano de sulfato, 20xSSC y agua miliQ), se desnaturalizó la mezcla de hibridación a 70°C durante 15 minutos, se incubó en hielo durante 5 minutos y se añadió a cada preparación la mezcla de hibridación. Se colocó un cubreobjetos y se pegó con pegamento para evitar la deshidratación. La siguiente desnaturalización se realizó en una PCR con el siguiente procedimiento: 75°C durante 7 minutos, 55°C durante 2 minutos, 50°C durante 30 segundos, 45°C durante 1 minutos, 42°C durante 2 minutos, 40°C durante 5 minutos, 38°C durante 5 minutos y 37°C durante 5 minutos. La hibridación tuvo lugar en una cámara húmeda en oscuridad

Desarrollo de cultivos de tejidos celulares en reptiles y/o anfibios para su uso en citogenética

durante toda la noche a 37°C. Los lavados posthibridación consistieron en dos lavados durante 5 minutos en 2xSSC a 37°C y a temperatura ambiente respectivamente seguidos de un lavado de 5 minutos en una solución de lavado TNT (0.1M Tris, 0.15M NaCl y 0.05% Tween-20) a temperatura ambiente.

5.5.- Fotografiado

Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio de epifluorescencia *Nikon Microphot-FXA* equipado con una cámara digital *Nikon DS-Qi1 Mc digital camera* y procesados con el software *NIS-Elements D 3.10*.

Resultados

1.- Cultivos celulares

1.1-. Sangre:

Una vez realizada la extracción y el cultivo de la sangre se hicieron preparaciones de metafases a partir de linfocitos a los 3, 4, 5, 6 y 7 días posteriores siguiendo los criterios aportados por Kasahara *et al.*, (1998). En nuestro caso, y al contrario de dicho estudio, así como de otros muchos (Nishioka *et al.*, 1993, Ananias *et al.*, 2007, Amor *et al.*, 2010), las preparaciones realizadas mostraron un crecimiento bajo motivo por el cual no se encontraron metafases aunque aparecieron gran cantidad de núcleos (Figura 4A).

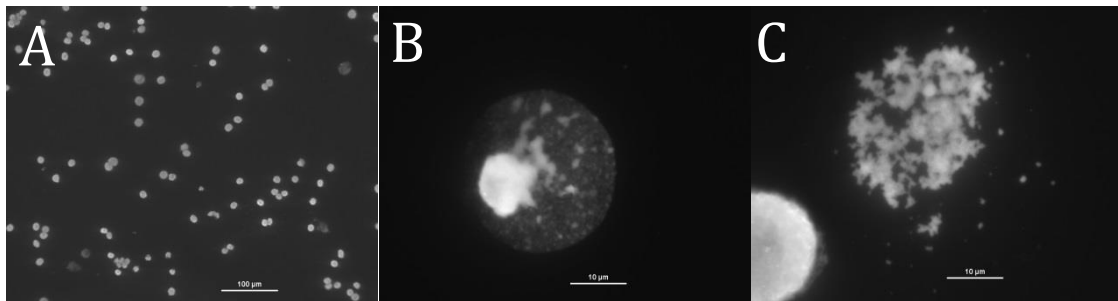


Figura 4: A) Vista general de preparación de sangre de macho. B) Detalle de núcleo de célula sanguínea en cultivo de hembra. C) Detalle de núcleo artefactado en sangre de macho.

Los resultados para todos los diferentes cultivos con sus diferentes agentes mitogénicos así como para los diferentes días de procesamiento y duración del cultivo se muestran en las imágenes. Se observaban núcleos con una morfología atípica (Figura 4B) o artefactados (Figura 4C).

1.2-. Fibroblastos

1.2.1 Cultivos

Con respecto a los fibroblastos, los cultivos que mejor crecieron fueron los obtenidos de corazón y pulmones. Se observó crecimiento en alguno de los cultivos transcurrida una semana desde su establecimiento. Por otra parte, los cultivos de músculo mostraron un crecimiento incipiente a las 3-4 semanas de media (Figura 5).

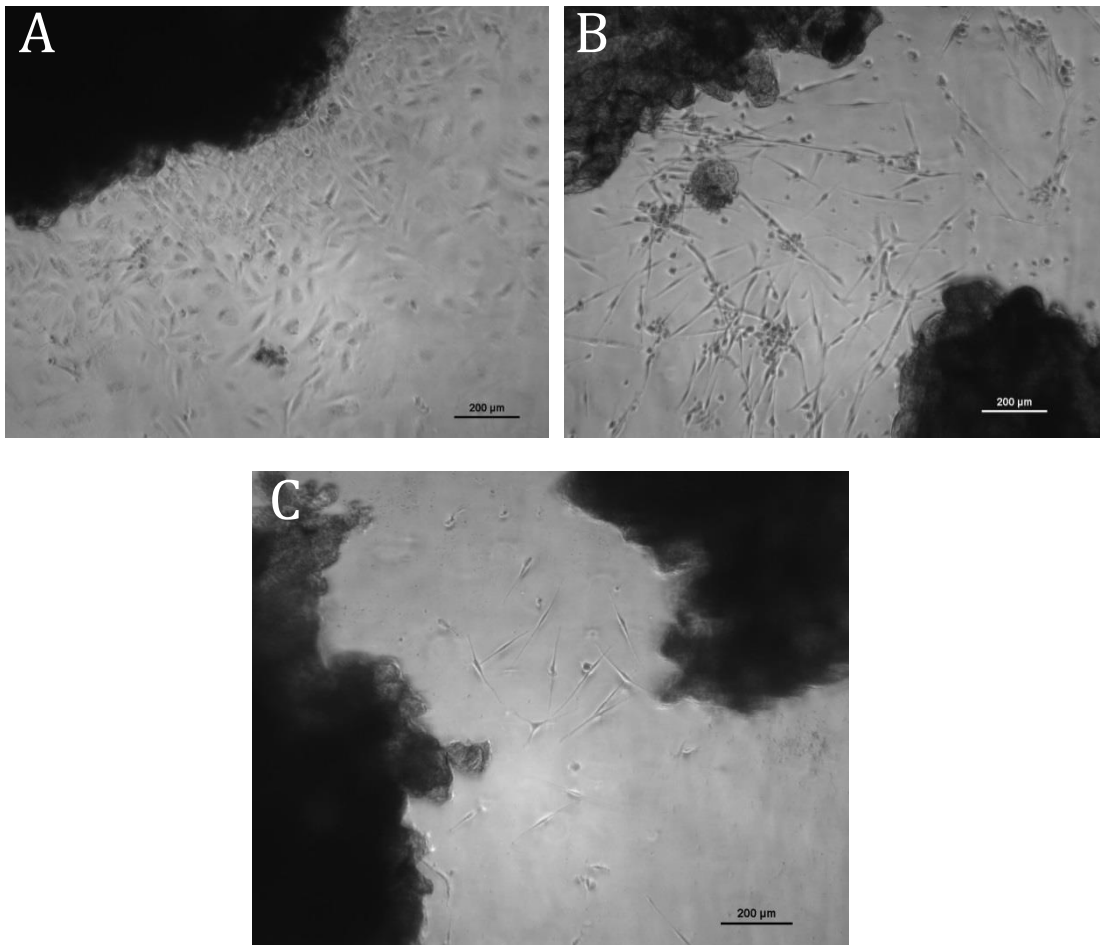


Figura 5: A) Fibroblastos en cultivo de sangre de hembra pasadas 2 semanas de crecimiento. B) Fibroblastos en cultivo de musculatura tras 5 semanas de crecimiento. C) Fibroblastos en cultivo de musculatura tras 4 semanas de crecimiento (crecimiento incipiente).

En cuanto a las dos temperaturas que se testaron (26°C y 30°C), los resultados no son lo suficientemente concluyentes para determinar cuál es la más adecuada.

La temperatura no parece ser un factor determinante para el cultivo. De los tejidos cultivados el que mostró un mejor crecimiento fue el de corazón y pulmón. De todas formas hay que tener en cuenta que parece haber diferentes factores externos (edad del individuo o estado fisiológico) que pueden afectar al crecimiento de los fibroblastos tanto entre los diferentes individuos como en cultivos pertenecientes al mismo individuo.

Tampoco se observó contaminación de ningún tipo que haga necesarias medidas de esterilidad adicionales.

1.2.2 Metafases

No se han obtenido metafases a partir de los cultivos celulares.

2.- Método directo

El método directo resultó ser óptimo para obtener metafases de una forma relativamente rápida y sencilla. El problema de este método es que la cantidad de metafases obtenidas, así como su calidad, son bajas.

De todos los tejidos procesados por este método, solo las preparaciones pertenecientes a testículo fueron las que dieron mejores resultado apareciendo metafases en diferentes grados de condensación (Figura 6A y 6B).

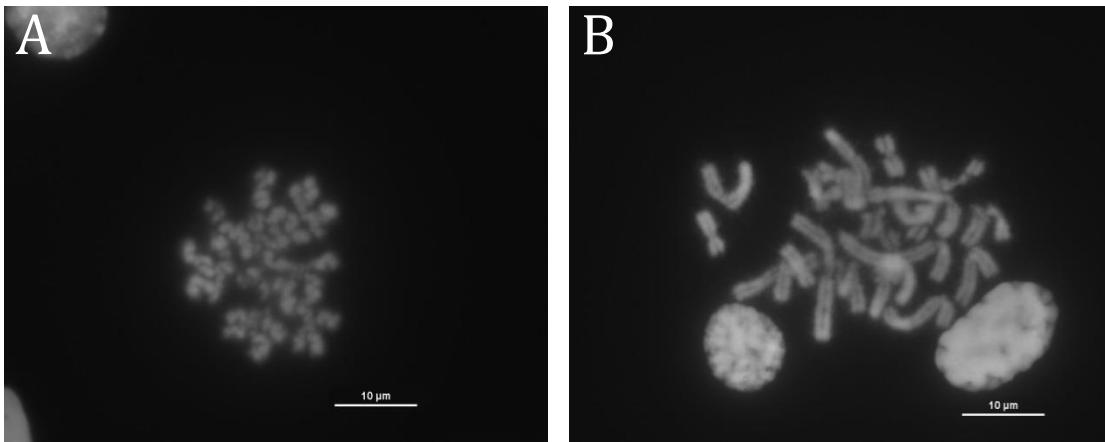


Figura 6: A) Metafase con cromosomas poco definidos. B) Metafase con cromosomas bien definidos. (Ambas obtenidas a partir de preparación de testículo).

La mayoría de metafases encontradas en estas preparaciones presentaron un aspecto similar a los que se muestra en la Figura 6A, con una estructura cromosómica pre-metafásica y condensada.

3.- Datos citogenéticos

3.1.- Cariotipo

El análisis de las metafases obtenidas permite determinar que el número cromosómico en esta especie es de $2n=26$ (Figura 7). Este número es coincidente con el descrito para otras especies de rana pertenecientes al mismo género (Martirosyan *et al.*, 2009, Amor *et al.*, 2010 y Dedukh *et al.*, 2013).

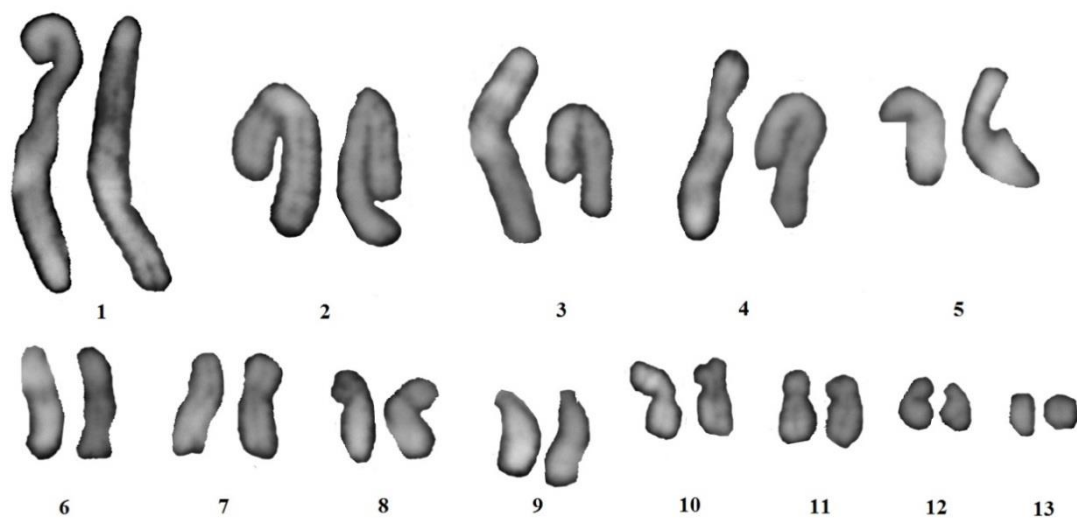


Figura 7: Cariotipo de la especie *Pelophylax perezii* ordenado y dividido en pares cromosómicos.

En base a la longitud y posición centromérica el cariotipo muestra 4 cromosomas largos, 7 medianos y 2 pequeños. Los pares 1, 3, 4, 6, 7, 12 son metacéntricos, los pares 2, 5 y 11 son submetacéntricos, el par 8 es subtelocéntrico, el par 9 telocéntrico, el par 13 Telocéntrico. En el caso del par 10 se observa un notable heteromorfismo (Tabla 5).

Tabla 5: Cromosomas *P. perezii* (Levan et al., 1964)

PC	p	q	L	Índice centromérico	Tamaño relativo	Clasificación
1	2.8	4.2	7	40	17.37	metacéntrico
2	2	3.5	5.5	36.6	13.65	submetacéntrico
3	2	3	5	40	12.41	metacéntrico
4	1.8	2.5	4.3	41.8	10.67	metacéntrico
5	1	2.3	3.3	30.3	8.19	submetacéntrico
6	1.2	1.3	2.5	48	6.2	metacéntrico
7	1	1.5	2.5	40	6.2	metacéntrico
8	0.5	1.7	2.2	22.7	5.46	subtelocéntrico
9	0.1	1.9	2	5	4.96	telocéntrico
10	-	-	2	-	4.96	Muy heteromórfico
11	0.5	1.2	1.7	29.4	4.22	submetacéntrico
12	0.5	0.8	1.3	38.4	3.23	metacéntrico
13	0	1	1	0	2.48	Telocéntrico

PC, par cromosómico; P, longitud del brazo pequeño; q, longitud del brazo largo; L: longitud total del cromosoma

3.2.- Ag-NOR y Giemsa

Una de las pruebas citogenéticas realizadas en este trabajo ha sido la tinción con nitrato de plata. Esta tinción nos permite localizar, tanto en los núcleos como en los cromosomas, los Ag-NORs transcripcionalmente activos en la interfase precedente. En la especie de estudio los resultados obtenidos revelan que existen dos señales de Ag-NOR tal y como se observa en el núcleo (Figura 8A), que parece localizarse en un cromosoma pequeño (Figura 8B).

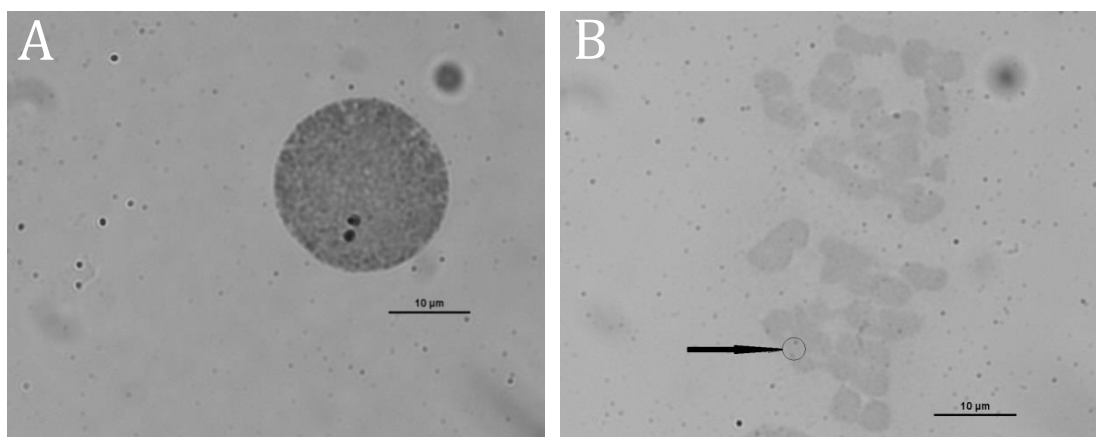


Figura 8: A) Detalle de núcleo con tinción Ag-NOR, la imagen muestra dos señales claras. B) Metafase de *P. perezii* donde se señalan las dos posibles señales de Ag-NOR.

También se realizó tinción con Giemsa con la cual se pueden observar de una forma más clara los cromosomas (Figura 9).

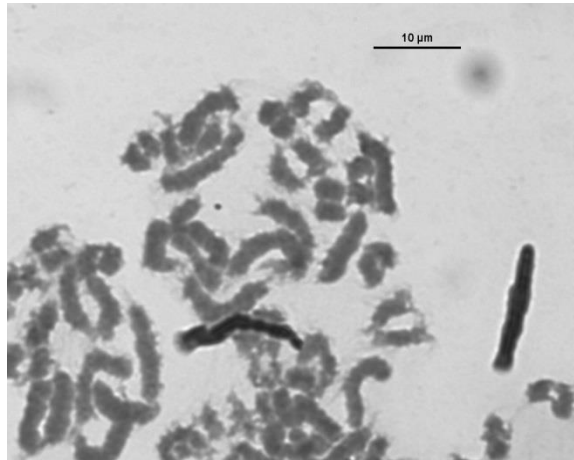


Figura 9: Metafase de *P. perezii* teñida con Giemsa.

3.3.- Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)

La hibridación con la sonda 18S, que puede ser utilizada para realizar análisis filogenéticos y evolutivos de la especie (Hedges *et al.*, 1990), pone de manifiesto la presencia de dos señales claras en los núcleos celulares (Figura 10).

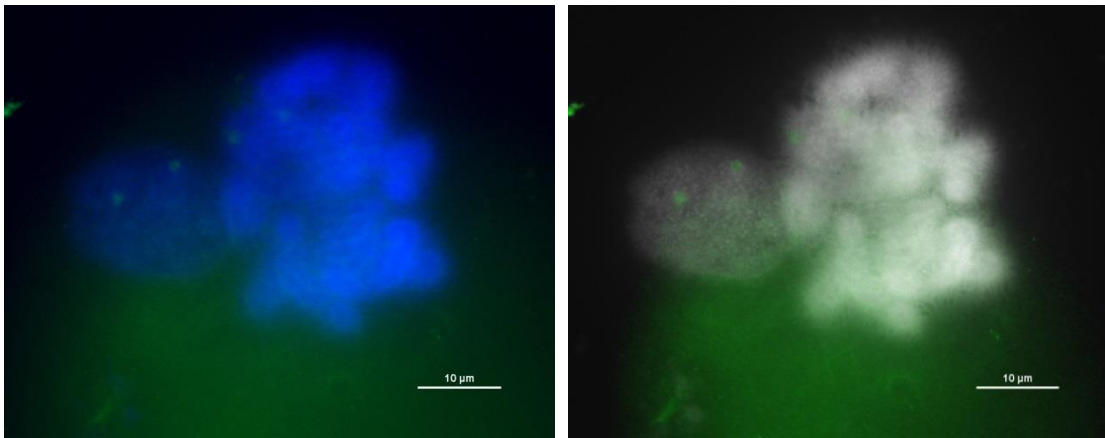


Figura 10: A) Metafase y núcleo con fondo azul marcados con sonda 18S. B) Metafase y núcleo con fondo blanco marcados con sonda 5S. (En ambos se puede observar dos señales claras).

Desarrollo de cultivos de tejidos celulares en reptiles y/o anfibios para su uso en citogenética

La hibridación realizada para los genes ribosomales menores (5S), es de gran interés por su amplificación masiva en especies modelo como *Xenopus laevis* (Pardue *et al.*, 1973). Una vez marcados se observó que había una señal dentro del núcleo, lo cual permite decir que hay un cromosoma en el que la señal es clara pero debido a calidad de las metafases no podemos determinar con claridad de que cromosoma se trata (Figura 11).

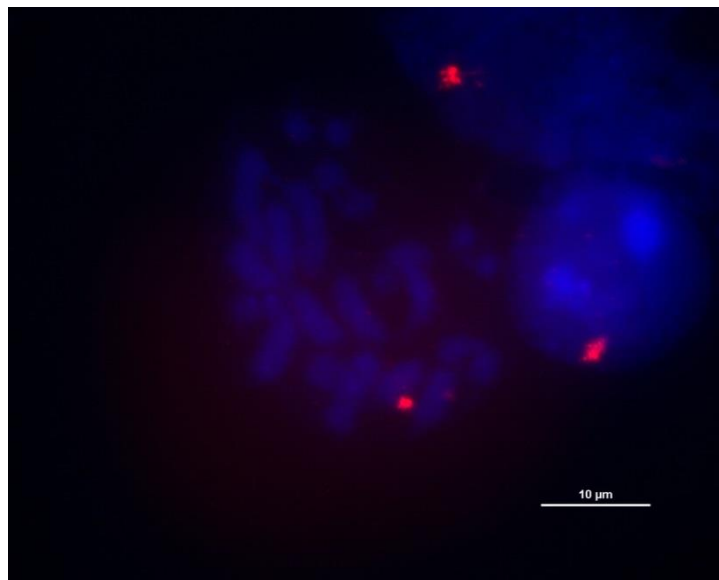


Figura 11: Metafase con dos núcleos cercanos marcada con sonda 5S en la cual se observa señal en un único punto.

Discusión

1.- Cultivos celulares

Los cultivos de sangre en *Pelophylax perezii* no dan resultados del todo satisfactorios debido a que requieren largo tiempo de realización.

En cuanto a los fibroblastos, el más eficaz y adecuado son los de corazón y pulmón. El crecimiento en ambos tejidos comienza rápidamente una vez establecido el cultivo y se va desarrollando con una buena velocidad llegando a observarse los propios fibroblastos a la semana de cultivo. En nuestro caso y con los resultados obtenidos los órganos prioritarios a la hora de realizar el cultivo serían corazón y pulmones debido a la facilidad y rapidez observada en su crecimiento además del músculo, el cual también se ha llegado a desarrollar de una forma óptima en las primeras fases de crecimiento.

En el caso de las temperaturas de cultivo ambas son igual de efectivas. Por lo tanto son válidas a la hora de establecer y mantener los cultivos.

Los cultivos se desarrollaron bien hasta que alcanzaron un punto en el que parecía que la división celular se veía detenida sin motivo aparente. Esto, unido a los resultados obtenidos en el cultivo de sangre, nos hace pensar que uno de los problemas más importantes es que los cultivos se vean limitados por la escasez de CO₂ y que de alguna forma este factor influya notablemente en la obtención de resultados óptimos.

De los resultados obtenidos se puede asegurar que la optimización de los cultivos podría seguir realizándose mediante el ajuste de la temperatura o la utilización de estufas que permitan el intercambio de CO₂, siendo esta última la causa más probable de todos los problemas que han aparecido con los cultivos.

2.- Metafases

Se obtienen metafases por método directo en testículo al igual que obtienen otros autores (Olmo *et al.*, 1986, Wei *et al.*, 1992, Amor *et al.*, 2010 y Campos *et al.*, 2012).

En cuanto a la calidad de dichas metafases, la poca definición observada en los cromosomas puede ser debido al tratamiento con colchicina. Esta baja definición puede deberse tanto a la dosis como al tiempo de exposición a este agente y sería necesario realizar un ajuste para intentar obtener metafases con la mejor calidad posible para ser utilizadas en los diferentes análisis citogenéticos. Además de la exposición a la colchicina, otro factor que se debería ajustar es la exposición a KCl en el choque hipotónico.

3.- Citogenética

En cuanto al cariotipo de *P. perezii*, hemos comprobado que el número cromosómico es el mismo que para otras especies congénicas como *P. ridibundus* (Martirosyan *et al.*, 2009), *P. esculentus*, *P. lessonae* (Dedukh *et al.*, 2013) y *P. saharicus* (Amor *et al.*, 2010).

La comparación del cariotipo de *P. perezii* con los de las especies congénicas analizadas hasta el momento permite observar grandes diferencias entre ellos. *P. perezii* muestra 4 cromosomas largos, 7 medianos y 2 pequeños y el resto de especies 5 cromosomas largos y 8 pequeños.

Observamos también que la posición del centrómero difiere en diferentes cromosomas de forma que comparándolo, por ejemplo con los de la especie *P. saharicus* (Amor *et al.*, 2010), esta presenta solo cromosomas metacéntricos (5 pares) y cromosomas submetacéntricos (8 pares) resultado que difiere del nuestro en el que encontramos cromosomas con el centrómero en diferentes posiciones lo que nos lleva a tener cromosomas correspondientes a todas las diferentes divisiones según el índice centromérico, es decir, tenemos cromosomas que corresponden a la clasificación de metacéntricos, submetacéntricos, subteloacéntricos, telocéntricos y Telocéntricos.

En cuanto a la morfología de los cromosomas, cabe destacar el par 10, donde los cromosomas presentan un marcado heteromorfismo.

Echando un vistazo a los Ag-NOR, podemos observar que aparecen dos señales claras. Esto mismo sucede en el caso de *P. ridibundus* (Martirosyan *et al.*, 2009), donde los Ag-NOR se encuentran en el cromosoma 10, y en *P. saharicus*, que se encuentran en el cromosoma 11 (Amor *et al.*, 2010). En el caso de *P. lessonae*, a diferencia de nuestros resultados, no parece haber ningún NOR activo (Dedukh *et al.*, 2013).

Los genes 18S están agrupados formando parte de una unidad única de transcripción. Esta unidad de transcripción se encuentra en copias múltiples organizadas en tándem de repeticiones directas, separadas entre sí por un espaciador intergénico. Los genes 5S constituyen, al igual que los 18S, una unidad que se repite muchas veces, formando una agrupación de unidades dispuestas en tándem. Estas agrupaciones en tándem hacen que la señal que emiten sea fácilmente localizable y por ello se utilizan en estudios de citogenética.

4- Epílogo:

Podemos afirmar que los cultivos en anfibios, y más específicamente en *P. perezi* necesitan aún diversos ajustes. Como ya hemos comentado, algunas de las pautas a seguir son el ajuste de la temperatura y la necesidad de cultivar en estufa de CO₂. Así mismo creemos que sería conveniente completar este estudio para perfeccionar el proceso de cultivo y lograr un análisis citogenético más amplio.

Sería posible probar un método menos agresivo como puede ser la extirpación de una falange para su cultivo, evitando así el sacrificio del animal.

A partir de este trabajo podría seguirse una línea de investigación sobre anfibios de interés y continuar con la optimización y la mejora sobre los cultivos de estos organismos así como la ampliación de los estudios citogenéticos para conocer como estas especies han ido evolucionando y diversificándose.

Conclusiones

1.- Los tejidos más adecuados para la obtención de metafases resultaron ser los de corazón y pulmón además del de músculo los cuales muestran un buen crecimiento con un buen desarrollo. Por otra parte los más complicados han sido los de sangre.

2.- El medio RPMI es adecuado para el crecimiento y ambas temperaturas (26°C y 30°C) son óptimas para el cultivo. El factor más limitante para el crecimiento de los cultivos ha sido el CO₂.

3.- El número cromosómico de la especie es $2n=26$ y su cariotipo presenta 4 cromosomas largos, 7 medianos y 2 pequeños. Presenta dos señales Ag-NOR, dos señales para los genes 18S y una para los genes 5S.

Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento a Verónica Rojo Oróns por sus enseñanzas y ayuda en la realización de los cultivos celulares y en los análisis citogenéticos, y a Zeltia Torrecilla Pérez por habernos proporcionado los ejemplares analizados en este trabajo.

Bibliografía

- Amor, N., Farjallah, S., Ben-Yacoub, S., & Said, K. (2010). Karyological and morphometric variation of the North African green frog *Pelophylax saharicus* (anura) in north-eastern Africa. *Zoology*, **56**:678-686.
- Ananias, F., Dhimas S. Modesto, A., Celi Mendes, S. & Felgueiras Napoli, M. (2007). Unusual primitive heteromorphic ZZ/ZW sex chromosomes in *Proceratophrys boiei* (Anura, Cycloramphidae, Alsodinae), with description of C-Band interpopulational polymorphysm. *Hereditas*, **144**:206-212.
- Campos, J., Martins, I., Haddad, C., & Kasahara, S. (2012). The karyotype of *Holoaden luederwaldti* (anura, strabomantidae), with report of natural triploidy. *Folia Biologica*, **58**:144-150.
- Che, J., Pang, J., Zhao, H., Wu, G., Zhao, E. & Zhang, Y. (2006). Phylogeny of Raninae (Anura: Ranidae) inferred from mitochondrial and nuclear secuencias. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **43**:1-13.
- Dedukh, D., Mazepa, G., Shabanov, D., Rosanov, J., Litvinchuk, S., Borkin, L., Saifitdinova, A. & Krasikova, A. (2013). Cytological maps of lampbrush chromosomes of European water frogs (*Pelophylax esculentus* complex) from the Eastern Ukraine. *BMC Genetics*, **14**:26.
- Egea-Serrano, A. (2006). Rana común – *Pelophylax perezi*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Carrascal, L. M., Salvador, A. (Eds.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid.
- Eggert, C. (2004). Sex determination: the amphibian models. *Reproduction Nutrition Development*, **44**:539-549.
- Ezaz, T., O'Meally, D., Quinn, A.E., Sarre, S.D., Georges, A. & Marshall Graves, J.A. (2008). A simple non-invasive protocol to establish primary cell lines from tail and toe explants for cytogenetic studies in Australian dragon lizards (Squamata: Agamidae). *Cytotechnology*, **58**:135-139.
- Hedges, S.B., Moberg, K.D. & Maxson L.R. (1990). Tetrapod phylogeny inferred from 18S and 28S ribosomal RNA sequences and a review of the evidence for amniote relationships. *Molecular Biology and Evolution*, **7**:607-633.
- Howell, W.M. & Black, D.A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, **36**:1014-1015.

Desarrollo de cultivos de tejidos celulares en reptiles y/o anfibios para su uso en citogenética

- Kasahara, S., Silva, A.P.Z., & Gruber, S.L. (1998). Use of lymphocyte cultures for BrdU replication banding patterns in anuran species (amphibia). *Genetics and Molecular Biology*, **21**.
- Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Institute of genetics, Lund, Sweden, and Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, N.Y., U.S.A.* 202-220.
- Martirosyan, A. & Stepanyan, I. (2009). Features of the karyotypes of *Pelophylax ridibundus* Pallas, 1771 and *Rana macrocnemis* Boulenger, 1885 (Amphibia: Ranidae) from Armenia. *Comparative Cytogenetics*, **3**:11-24.
- Nishioka, M., Miura, I. & Saitoh, K. (1993). Sex Chromosomes of *Rana rugosa* with Special Reference to Local Differences in Sex-determining Mechanism. *Sci. Rep. Lab. Amphibian Biol.* **12**:55-81.
- Olmo, E., Odierna, G., & Capriglione, T. (1987). Evolution of sex-chromosomes in lacertid lizards. *Chromosoma*, **96**:33-38.
- Pardue, M.L., Brown, D.D. & Birnstiel, M.L. (1973) Location of the genes for 5S ribosomal RNA in *Xenopus laevis*. *Chromosoma*, **42**:191-203.
- Rohia, H., Miller, J.R., Woods, L.C. & Glover, D.M. (1981). Arrangements and rearrangements of sequences flanking the two types of rDNA insertion in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, **290**:749-753.
- Rojo, V. Giovannotti, M., Naveira, H., Nisi Cerioni, P., González-Tizón, A.M., Caputo Barucchi, V., Galán, P., Olmo, E. & Martínez-Lage, A. (2014). Karyological characterization of the endemic Iberian rock lizard, *Iberolacerta monticola* (Squamata, Lacertidae): insights into sex chromosome evolution. *Cytogenetic and Genome Research*, **142**:28-39.
- Schmid, M. (1978). Chromosome banding in amphibia. *Chromosoma*, **66**:361-388.
- Seoane, V.L. (1885). On two forms of *Rana* from N.W. Spain. *The zoologist*, **9**:169- 172.
- Uno, Y., Nishida, C., Oshima, Y., Yokoyama, S., Miura, I., Matsuda, Y. & Nakamura, M. (2008). Comparative chromosome mapping of sex-linked genes and identification of sex chromosomal rearrangements in the japanese wrinkled frog (*Rana rugosa*, ranidae) with ZW and XY sex chromosome systems. *Chromosome Research*, **16**:637-647.
- Wei, G., Ning, X. , Dejun, L. & Min, W. (1992). Karyotypes of two *Rana* from Xinjiang, China. *Asiatic Herpetological Research*, **4**:141-145.