

AGENTES MITOGÉNICOS PARA CULTIVOS DE LINFOCITOS EN QUELONIOS

RODRÍGUEZ P. A. Bióloga; ORTIZ M. L. Bióloga; BUENO M. L. Bióloga.
Departamento de Biología Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Colombia
(Recibido: 23 de septiembre de 2003 - Aceptado: 17 de octubre de 2003)

La citogenética es una herramienta básica para el conocimiento genético de especies en peligro de extinción, ya que permite realizar un estudio profundo de los elementos cromosómicos. De igual forma la comparación de las características cariológicas de especies relacionadas sirve como argumento para análisis filogenéticos y el diseño de estrategias de conservación (Bickham, 1981;

Bickham & Carr 1983, Théveonon *et al.*, 2000).

Para la realización de estudios citogenéticos es necesario el desarrollo de un protocolo para la obtención de metafases, a partir de tejidos que permitan la replicación de los procedimientos y que no requieran el sacrificio de los ejemplares, tal es el caso de la sangre periférica (Ortiz & Rodriguez, 2003).

Se emplearon nueve ejemplares de *Podocnemis vogli* y ocho individuos de las especies *P. erythrocephala*, *P. expansa*, *P. unifilis*, *P. lewyana*, *Trachemmys scripta* y *Rhinoclemmys sp.* Los cuales fueron prestados por la Estación de Biología Tropical Roberto Franco, dentro del marco del Programa de Diversidad Genética y Gestión Sostenible de Fauna de la Universidad Nacional de Colombia.

Se realizaron 77 cultivos

seriados bajo condiciones controladas en el laboratorio de Citogenética de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. A partir de los cultivos se extendieron 197 láminas, en las que se contaron 13.970 campos para determinar la cantidad de metafases presentes en cinco recorridos verticales, este valor se calcula como un porcentaje y se denomina índice mitótico.

Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: Me-

INTRODUCCIÓN

La selección del Mitógeno es fundamental para los estudios citogenéticos y aunque la Fitoheماغlutinina P (PHA-P) es el mitógeno más empleado, no todas las especies responden adecuadamente a su estímulo, adicionalmente la concentración óptima en que actúa debe ser establecida para cada caso.

En quelonios han sido pocos los trabajos que repor-

tan el empleo de mitógenos, para la obtención de metafases a partir de linfocitos (Mahecha 1998, Ullsh *et al* 2001), sin embargo los protocolos presentados por estos autores no se han logrado aplicar con éxito a otras especies de quelonios distintas de las estudiadas, de ahí la importancia de aportar elementos para el desarrollo de metodologías de cultivo celular para quelonios en general.

MATERIALES Y MÉTODOS

TC 199 (4 ml para cultivo de 5 ml), Suero Fetal Bovino 20%, 1 ml de plasma rico en linfocitos, la incubación se realizó a 30+/-1°C por 94 horas. Los agentes mitógenos (Fitoheماغlutinina P (Difco), Favina y Lipopolisacárido Sigma L-2630 Serotipo 0111:B4) se aplicaron en diferentes concentraciones y se realizaron mezclas para probar su efecto sinérgico.

Para la obtención de metafases a partir de los linfocitos se realizó el pro-

ceso de cosecha con la adición de colchicina (0,64 mg/ml), en un tiempo de exposición de 40 minutos a 30°C. Posteriormente se realizó un tratamiento hipotónico con KCl 0,05 M por 45 minutos a 30°C, luego se fijó las células con Carnoy 6:1 y después con Carnoy 3:1 en periodos de 30, 15 y 15 minutos. Finalmente se realizó la extensión de las láminas para su análisis en microscopio Olympus CX31 con coloración homogénea Giemsa (4%).



RESULTADOS

Se realizó una representación gráfica de los índices mitóticos para cada uno de los mitógenos analizados

(Fig 1). Identificando que la mayor cantidad de metafases se logró con FitoheMATOGlutinina

P (8.400 $\mu\text{g/ml}$), seguido por la concentración de 5.600 $\mu\text{g/ml}$.

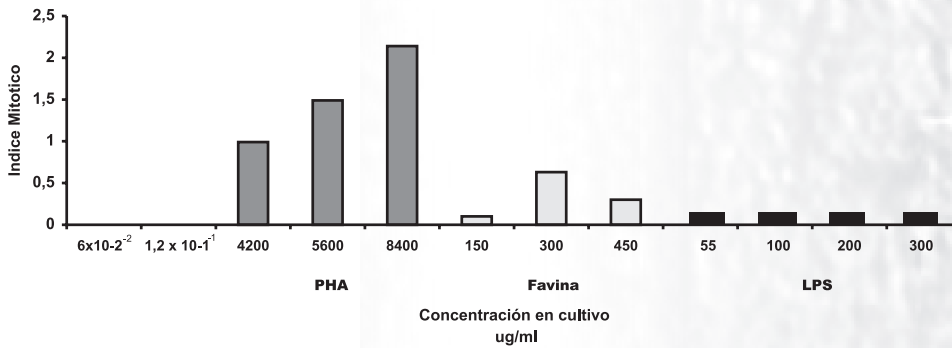


Figura 1. Respuesta a agentes mitogénos en linfocitos de quelonios.

En la figura 1, también se puede apreciar que con el mitógeno Favina no se obtuvo una respuesta en cuanto a índice mitótico comparable a la obtenida con FitoheMATOGlutinina P, el mayor índice registrado con Favina se logró en una

concentración de 300 $\mu\text{g/ml}$. A una concentración superior no se obtuvieron resultados superiores. Lo que indica que aunque la Favina no es el mitógeno óptimo para quelonios, se puede lograr respuesta mitótica a este agente.

Con respecto al LPS no se registró metafases en ninguna de sus concentraciones probablemente ocasionado por un efecto agonista de la división celular (Fig 1 y Tabla 1).

Tabla 1. Respuesta en el índice mitótico a la combinación de mitógenos

MITÓGENOS	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$)	I.M
FITO FAVINA	5.600 300	0,25
FITO FAVINA	8.400 300	0,36
FITO FAVINA	4.200 450	0,07
FITO LPS	5.600 55	0
FITO LPS	8.400 55	0
FAVINA LPS	300 55	0
FAVINA LPS	450 100	0



La realización de mezclas de mitógenos en los cultivos celulares no aumentó los índices mitóticos registrados, al contrario los redujo significativamente (tabla 1), indicando que las

mezclas de mitógenos pueden tener un efecto agonista sobre las células, impidiendo su transformación y división. No se registró efecto sinérgico con ninguna de las mezclas contrario a lo

propuesto por Ullsh *et al* (2001). Por lo tanto se recomienda emplear como agente mitógeno la fitohematoglutina P con una concentración en cultivo de 5.600 a 8.400 mg/ml.

AGRADECIMIENTOS

A la Estación de Biología Tropical Roberto Franco, los profesores Pedro Sánchez, Jaime Ramírez, Myriam Lugo, Luz Adielia Gómez. Al Instituto de genética de la Universidad Nacional de Colombia, a las profesoras Olga María Torres y Miriam Leivovici, a Miriam Calle, a Jorge García.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BICKHAM, J.W. 1981. Two hundred million year old chromosomes: deceleration of the rate of karyotypic evolution in turtles. *Science*. 212: 1.291-1.293.

BICKHAM, J.W., CARR, J.L. 1983. Taxonomy and phylogeny of the higher categories of Cryptodiran turtles based on a cladistic analysis of chromosomal data. *Copeia*. 4: 918 - 932.

MAHECHA S. 1998. Caracterización citogenética de *Rhinoclemmys diade-*

mata (Mertens, 1954) (Testudinata: Emididae). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Trabajo de Grado. Bogotá.

ORTIZ, M.A., RODRÍGUEZ, P.A. 2003. Estudio citogenético de la tortuga "sabanera" (*Podocnemis vogli*, Müller 1935) (Testudinata: Podocnemidae). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Trabajo de Grado. Bogotá.

THÉVEONON, S., CLARO, F., BONNET, A., VOLOBOUEV, V. 2000. Karyotype identity of two subspecies of Elds deer *Cervus eldi* (Cervinae, Artiodactyla) and its consequences for conservation. *J. of Heredity*. 91 (5): 402-403.

ULSH, V.A., CONGDON, J.D., HINTON, T.G., WHICKER, F.W., BEDFORD, J.S., 2001. Culture methods for turtle lymphocytes. *Methods in Cell. SCI* 22: 285 - 297.