



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO**

**Trabajo para optar por el título de**

**Doctor en Ciencias Naturales**

**“MECANISMOS RELACIONADOS CON LA**  
**MANIFESTACIÓN *IN VITRO* DE LA HETEROPLOIDÍA**  
**EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS”**

**Doctorando: Lic. Juan Pablo Pilili**

**Director de Tesis: Dr. Marcelo Larramendy**

**Co-Director de Tesis: Dr. Miguel Reigosa**

**2012**

**A Pao,  
por su  
paciencia y  
comprensión**

*“El éxito es aprender a ir de  
fracaso en fracaso sin desesperarse”*

**Winston Churchill**

## AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a quienes han formado parte de este proyecto personal:

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Beca de Postgrado Tipo I (2006-09) y Tipo II (2009-11).
- Facultad de Ciencias Naturales por el recurso físico brindado.
- Al Dr. Marcelo Larramendy, quien generosamente me dio la oportunidad de integrar su grupo de investigación como estudiante del doctorado, permitiéndome llevar a cabo el presente trabajo de Tesis Doctoral bajo su dirección, transmitiéndome sus conocimientos, experiencia y su interés por la investigación experimental.
- Al Dr. Miguel Reigosa, guía constante y desinteresada, por haber formado parte de este proyecto personal, por su tiempo dedicado, por sus aportes teóricos y, fundamentalmente, por sus palabras de reflexión y aliento incondicional.
- A la Dra. Sonia Soloneski, quien profesionalmente me acompañó con su participación y ayuda por los caminos de la citogenética.
- A mis compañeros del laboratorio con quienes he compartido el esfuerzo diario, recibiendo su desinteresada colaboración y apoyo.
- A la Dra. Cecilia Catanesi quien me brindó su tiempo, conocimiento y me permitió desarrollar las tareas moleculares en el IMBICE.
- A la Dra. Mercedes Lojo, quien me dirigió y ayudo incondicionalmente en el aprendizaje e interpretación del estudio de los microsatélites en electroforesis capilar.
- Al Dr. Fernando Archuby, quien con su siempre buena disposición me orientó en el desarrollo y análisis de la estadística.
- A mi familia y pareja, pilares anímicos fundamentales, por su cariño, por su fuerza...
- Y a todos aquellos que me brindaron su apoyo, colaboración y comprensión a lo largo del camino...

<b>RESUMEN</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>11</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>14</b>
<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>15</b>
1.1. Inicio de un cultivo celular	17
1.2. Evolución de las líneas celulares	19
1.2.1. Senescencia celular	20
1.2.1.1. Características de las células senescentes	22
1.2.1.2. Teorías de senescencia celular	24
1.2.2. Transformación celular	29
1.2.2.1. Mecanismos de transformación celular	30
1.2.2.2. Características de las células transformadas	35
1.2.2.2.1. Inestabilidad genética	36
1.2.2.2.2. Control del crecimiento aberrante	46
1.2.2.2.3. Tumorigenicidad	48
1.2.3. Cultivos de conejo neozelandés	54
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>56</b>
2.1. Hipótesis	56
2.2. Objetivo	56
2.2.1. Objetivos específicos	56
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>58</b>
3.1. Materiales	58
3.1.1. Compuestos empleados	58
3.1.1. Cultivos primarios	59
3.1.2. Línea celular CHO-K1	59
3.2. Métodos	59

3.2.1. Establecimiento y mantenimiento de cultivos primarios	59
3.2.1.1. Inicio de los cultivos primarios	59
3.2.1.2. Mantenimiento de la línea celular JPCS <sub>1</sub>	62
3.2.2. Cultivo de la línea celular CHO-K1	63
3.2.3. Estudios citogenéticos	63
3.2.3.1. Obtención de preparados para los estudios citogenéticos	63
3.2.3.2. Bandas cromosómicas de duplicación tardía	64
3.2.3.3. Análisis de la frecuencia del número cromosómico	64
3.2.3.4. Análisis del cariotipo	65
3.2.4. Estudios de microsatélites	68
3.2.4.1. Extracción de ADN	68
3.2.4.2. Análisis de microsatélites	69
3.2.5. Estudio de la curva de crecimiento celular	71
3.2.5.1. Realización de la curva de crecimiento celular	71
3.2.5.2. Análisis de la curva de crecimiento celular	71
3.2.6. Ensayo de crecimiento con independencia de suero	72
3.2.6.1. Realización de las curvas de crecimiento con independencia de suero	72
3.2.6.2. Análisis de las curvas de crecimiento con independencia de suero	73
3.2.7. Ensayo de crecimiento independiente de anclaje	74
3.2.8. Ensayo de migración celular	75
3.2.9. Análisis estadístico	76
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>78</b>
4.1. Estudios citogenéticos	78
4.1.1. Evaluación de la frecuencia del número cromosómico	78
4.1.2. Evaluación de la evolución del cariotipo	81
4.2. Análisis de microsatélites	89
4.3. Análisis de la curva de crecimiento	92
4.3.1. Análisis del tiempo de duplicación poblacional	92
4.3.2. Análisis de la densidad limitante de la proliferación	94
4.4. Análisis de las curvas de crecimiento con independencia de suero	96
4.4.1. Análisis de la pendiente de la curva de crecimiento con independencia de suero	98
4.4.2. Análisis de la capacidad de proliferación celular en ausencia de Suero	100
4.5. Análisis del crecimiento independiente de anclaje	102

---

4.6.Análisis del ensayo de la migración celular	102
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>105</b>
5.1.Evolución del cariotipo del al línea celular JPCS <sub>1</sub>	105
5.2.Secuencias de ADN de microsatélites de la línea celular JPCS <sub>1</sub>	110
5.3.Curvas de crecimiento	113
5.4. Independencia de suero	114
5.5.Crecimiento independiente de anclaje	115
5.6.Migración celular	116
5.7.Estado de la línea celular JPCS <sub>1</sub>	116
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>121</b>
<b>GLOSARIO</b>	<b>124</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>127</b>

## RESUMEN

Desde el inicio de un cultivo celular, las células que lo conforman atraviesan una serie de presiones de selección donde sobrevivirán aquellas que logren adaptarse a las condiciones desde el sistema *in vivo* al sistema *in vitro*. La mayoría de los cultivos celulares de vertebrados no progresan más allá de un número finito de divisiones y entran en senescencia replicativa. En muchas ocasiones, ya sea por inducción o espontáneamente, algunos cultivos celulares pueden adquirir una serie de características proliferativas anormales (independencia de anclaje, pérdida de inhibición de contacto, disminución de la limitación de la densidad de crecimiento, entre otras) proceso denominado transformación celular el cual a menudo se puede correlacionar con la tumorigenicidad.

El objetivo general del presente plan de investigación es enunciar nuevos conocimientos en el campo de la Biología Celular y Molecular vinculados con la transformación celular *in vitro* acontecida en cultivos celulares provenientes de células fetales de conejo (*Oryctolagus cuniculus*). El cultivo inicial se originó a partir de células obtenidas de piel de la especie en cuestión mediante disgregación enzimática. La línea celular originada a partir de este cultivo se denominó JPCS<sub>1</sub>. Todos los estudios presentados en esta Tesis se realizaron cada cinco SCs (subcultivos), entre el SC 5 al SC 25 y cada diez SCs desde el SC 30 al SC 50. Para evidenciar la inestabilidad genética los estudios se realizaron tanto a nivel citogenético como molecular. A nivel citogenético se analizaron los cambios en la frecuencia del número cromosómico como así también la

evolución del cariotipo de la línea celular durante su mantenimiento entre el SC 5 al 50. A nivel molecular, se utilizó como marcador de inestabilidad genética un conjunto de *loci* de microsatélites. Las características del control de crecimiento de la línea JPCS<sub>1</sub> fueron evaluadas mediante el análisis de las curvas de crecimiento. En las mismas se obtuvo tanto el tiempo de duplicación poblacional media como la densidad limitante de proliferación celular. Asimismo, se realizó el estudio de curvas de crecimiento con independencia de suero donde se obtuvo la pendiente de la curva de crecimiento y la capacidad de proliferación celular en ausencia de suero. Asimismo, también fue analizado el crecimiento independiente de anclaje. Por último, la capacidad de migración celular fue investigada mediante la técnica de la herida.

Los resultados de nuestras investigaciones llevados a cabo para dar cumplimiento con los objetivos de la presente Tesis Doctoral demuestran que la misma presenta inestabilidad cromosómica a partir del SC 10, previo a los cambios en los parámetros de crecimiento y migración celular, evidenciando una tendencia al aumento del número cromosómico (hiperdiploidización) cambiando el número modal desde 44 a 46 cromosomas. A partir de ganancias cromosómicas, en primera instancia por una trisomía en el cromosoma 18 a partir del SC 10 y en segunda instancia por trisomía en el cromosoma 6 a partir del SC 20 y posteriormente por tetrasomía del mismo cromosoma en el SC 40. Asimismo, la línea celular muestra un incremento en la frecuencia de la delección de 10p -del(10)(p13)- a partir del SC 30. A nivel molecular, los resultados obtenidos demuestran que la línea JPCS<sub>1</sub> exhibe estabilidad genética

del panel de microsatélites utilizados, sin encontrarse nuevos alelos para estos marcadores ni desbalance de las variantes alélicas en los *loci* heterocigotas. En cuanto a los parámetros de crecimiento celular evaluados, la línea celular en cuestión presenta un acortamiento del ciclo celular demostrando un cambio abrupto entre los SCs 30 y 40, determinado por la disminución del tiempo de duplicación poblacional. Asimismo, se pudo evidenciar la existencia de una tendencia al aumento progresivo de la densidad limitante de la proliferación celular a medida que se incrementa el tiempo de cultivo, exhibiendo una disminución de la inhibición por contacto. Por otra parte, en las etapas más avanzadas del mantenimiento esta línea JPCS1 se caracteriza por exhibir crecimiento con independencia de las necesidades de factores de crecimiento, ya sea por producción autócrina o por presentar algún mecanismo de señalización intracelular alterado. La línea celular JPCS<sub>1</sub> no demostró crecimiento con independencia de anclaje en ninguno de los SCs analizados. Por último la misma exhibió un aumento de la capacidad migratoria de las células a partir del SC 25, tendencia que se acentúa en el SC 40 demostrando una disminución de la inhibición por contacto en concordancia con los ensayos de proliferación celular. A partir de los resultados obtenidos en las investigaciones llevadas a cabo durante el desarrollo del presente trabajo de Tesis Doctoral se ha puesto en evidencia, mediante los diferentes estudios realizados que la línea celular JPCS<sub>1</sub> originada a partir de células de embriones de *Oryctolagus cuniculus* luego de su mantenimiento en el sistema *in vitro* que el cultivo celular se encuentra transformado en el SC 40 proceso que no ha

terminado, y que la inestabilidad genética a nivel cromosómico es un evento inicial del proceso de transformación.

## ABSTRACT

From the beginning of a cell culture, cells go through a series of pressures due to selection, and only those ones who can be adapted to the environmental conditions of the new *in vitro* system will survive. The majority of vertebrate cell cultures do not progress beyond a finite number of cell divisions and they enter, then, into replicative senescence. On several occasions, whether it is due to induction or it occurs spontaneously, some cell cultures can acquire a series of abnormal proliferative characteristics (anchorage independence, loss of contact inhibition, drop in the limitation of the growth density, among others), a process known as cellular transformation to which a correlation with tumorigenicity can be drawn.

The major aim of the present research plan is to set out new knowledge in the field of Molecular and Cell Biology associated with cell transformation *in vitro* in cell cultures derived from fetal rabbit cells (*Oryctolagus cuniculus*). acquire knowledge connected to the *in vitro* cellular transformation process in cell cultures derived from fetal rabbit cells. The initial culture was originated from skin cells of *Oryctolagus cuniculus* through enzymatic digestion. The cell line originated from this culture was designed as JPCS<sub>1</sub>. All the analysis presented in this Ph.D. Thesis were performed every five subcultures (SCs), between SC 5 and SC 25, and every ten SCs from SC 30 to SC 50. To analyze genetic instability, studies were performed on both at cytogenetic as well as at molecular levels. At the cytogenetic level, changes in the chromosomal number frequency as well as the evolution of the karyotype features during its

maintenance between SC 5 and SC 50 were analyzed. At the molecular level, several *loci* of microsatellites were used as markers of genetic instability. The characteristics of the growth control of JPSC<sub>1</sub> cell line were evaluated through the analysis of growth curves. Results of the growth patterns showed both the average population doubling time and the limiting density of cellular proliferation. In addition, an analysis was performed on growth curves with serum independence, which showed the slope of the growth curve and the capacity of cellular proliferation in the absence of serum. Furthermore, the anchorage independent growth was also analyzed. Finally, the capacity of cellular migration was further tested by the scratch assay.

The current results presented in this Doctoral Thesis revealed that chromosomal instability from SC10 is present, previous to those changes in the parameters of growth and cellular migration, demonstrating then a tendency towards an enhancement in the chromosomal number (hyperdiploidization), changing the modal number from 44 to 46 chromosomes. Chromosomal gains are present, first depicted by a trisomy of chromosome 18 from SC 10, then by a trisomy of chromosome 6 from SC 20, and finally by a tetrasomy affecting the latter in SC 40. In addition, the cell line shows a tendency towards deletion of 10p -del10(p13)- from SC 30 onwards. At the molecular cytogenetic level, the results show that the JPSC<sub>1</sub> line presents genetic stability of the panel of microsatellites assayed, without revealing new alleles for these markers or imbalance in the allelic variants in the heterozygous *loci*. Regarding the evaluated cellular growth parameters, the cell line presents a shortening of the

cell-cycle proving an abrupt change between SCs 30 and 40, determined by the drop of the population doubling time. Furthermore, the existence of a tendency towards a progressive enhancement of the limiting density of the cell proliferation as the culture time is increased was evident, showing a decrease in contact inhibition. On the other hand, in the advance maintenance stages, the JPSC<sub>1</sub> line is characterized by presenting growth independence of the growth factors requirements, whether related to an autocrine production or to other disregulated intracellular signaling mechanism is still unknown. The cell line JPSC<sub>1</sub> did not present independent anchorage growth pattern at any of the SCs analyzed. Finally, this line showed an increased cellular migratory capacity starting from SC 25, tendency accentuated in the SC 40 wherein a drop in contact inhibition in accordance with the test of cellular proliferation was achieved. Taking into account the results of the analyses performed during the development of this Doctoral Thesis it has become evident that the cell line JPSC<sub>1</sub> originated from *Oryctolagus cuniculus* embryo cells after its maintenance in *in vitro* system, at least during its first 50 SCs, was able to begin the transformation process being the genetic instability at the chromosomal level the first events required for such capacity, at least through the different bioassays employed.

## ABREVIATURAS

A lo largo del texto del presente trabajo de Tesis Doctoral, aquellas abreviaturas correspondientes a Instituciones internacionales han sido adoptadas en su idioma original y no por su traducción al español.

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

ATCC: American Type Culture Collection

BrdU: Bromodeoxiuridina

CAM: Moléculas de adhesión celular

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

dNTP: Dinucleotido trifosfato

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMEM: Modificación de Dulbecco del Medio Eagle

e.g.: *Exempli gratia* (por ejemplo)

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EBV: virus Epstein-Barr

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de Hidrógeno

IGF-1: Factor de crecimiento similar insulina 1

KCl: Cloruro de Potasio

MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de magnesio

N<sub>2</sub>: Nitrógeno molecular

Na<sub>2</sub>EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético disódico

NCI: National Cancer Institute (Instituto Nacional del Cancer)

O<sub>2</sub>: Oxígeno molecular

O<sub>2</sub>•-: Radical superóxido

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

SBF: Suero bovino fetal

SC: Subcultivo

## 1. INTRODUCCIÓN

Fue el biólogo francés Claude Bernard, a fines del siglo XIX, quien proporcionó las bases teóricas para crear un sistema artificial donde las células o tejidos pudieran sobrevivir independientemente del organismo del cual fueron extraídas.

El cultivo de células (o “cultivo de tejidos” como también se denomina) no es una tarea sencilla y es considerado un acontecimiento poco frecuente e impredecible, el cual pretende simular lo más cercano posible las condiciones *in vivo* (Paul, 1975).

El microambiente físico-químico necesario para mantener una célula en cultivo resulta sobradamente complejo. Dentro de los factores intervinientes podemos mencionar los medios de cultivos celulares ricos en nutrientes, los factores de crecimiento, el tipo de sustrato disponible, la temperatura, la atmósfera y la presencia de sueros homólogos o heterólogos a la especie (Paul, 1975). El advenimiento de técnicas más sofisticadas permitió la incorporación de modificaciones que dieron lugar a medios más apropiados lo cual hizo posible la propagación de células de tejidos normales o tumorales (Morgan y Darling, 1993).

El cultivo celular ha alcanzado en el presente una posición en la que su objetivo es, con frecuencia, otorgar las condiciones existentes *in vivo* permitiendo el crecimiento de las células eucariotas (Freshney, 2005). Las

diferencias sustanciales intervinientes como limitantes de este fenómeno están centradas en las interacciones célula-célula y/o célula-matriz las cuales se ven alteradas *in vitro* por existir una menor heterogeneidad de poblaciones celulares y por una pérdida de la arquitectura tridimensional presentes en un tejido *in vivo*, como así también muchos de los factores tróficos u hormonales (Freshney, 2005). Dentro de esta problemática, podemos mencionar a modo de ejemplo lo acontecido en los cultivos de células de tejido conjuntivo, como son fibroblastos, donde en el estado *in vivo* se encuentran inmersos en una red estructural compleja representada por una gran variedad de proteínas (glicoproteínas multiadhesivas, fibras colágenas, reticulares y elásticas), proteoglicanos y glicosaminoglicanos, denominada matriz extracelular, además, de estar en contacto con otras poblaciones celulares con las que interactúa a través de señales químicas (Ross y Pawlina, 2007). Por otra parte, en las condiciones de cultivo *in vitro* son sobradamente distintas donde las superficies disponibles se hallan constituidas por diferentes materiales (vidrio, plásticos, etc.), a veces tratadas con fibronectina, laminina (Niewiarowski *y col.*, 1972) o matrices colágenas (Yang *y col.*, 1979), para hacerlas más apropiadas al crecimiento y mantenimiento celular. A pesar de todos los empeños posibles, los sistemas artificiales no pueden reemplazar la complejidad existente *in vivo*, marcando una notable diferencia con las células bacterianas que pueden ser cultivadas con mayor facilidad.

Freshney (2005) afirma que la influencia del entorno sobre el cultivo celular se manifiesta a través de 5 rutas: 1) la naturaleza del sustrato en el que

crecen las células, 2) el grado de contacto con otras células, 3) las propiedades físico-químicas del medio de cultivo, 4) la constitución de la fase gaseosa y 5) la temperatura de incubación. Una vez alcanzadas estas condiciones se puede modelizar el estado *in vivo* permitiendo el crecimiento en cultivo de células normales o tumorales. En la actualidad, pueden cultivarse en el laboratorio células de una amplia gama de tejidos y organismos con propósitos diferentes. En un principio los modelos de estudio se orientaron a las propias células en las condiciones mencionadas: cómo crecen, qué necesitan para lograr un crecimiento exitoso, cómo y cuándo dejan de hacerlo, etc. Este tipo de análisis todavía tiene hoy un amplio interés científico que involucra el estudio de la bioquímica celular como también la alteración de la misma.

### **1.1. Inicio de un cultivo celular**

Por lo general, un cultivo celular puede derivar como consecuencia de la migración de células desde una biopsia o por la dispersión mecánica o enzimática del mismo, estableciéndose así un cultivo primario de células (Parker, 1961).

Dependiendo de la técnica empleada para la obtención del cultivo primario, la selección de células es diferente. Si el cultivo es iniciado a partir de una biopsia, sólo aquellas células con capacidad de migrar desde la misma constituirán la población celular del cultivo primario. Por otra parte, si el cultivo es iniciado mediante alguna técnica de disgregación, sólo aquellas células que sobrevivan a la dispersión enzimática o física y logren adherirse al

nuevo sustrato otorgado constituirán el cultivo primario (Freshney, 2005). Si el cultivo se mantiene por más de unas horas o días se producirá un siguiente paso de selección, donde sólo permanecerán aquellas células capaces de proliferar. Asimismo otros tipos celulares podrán permanecer quiescentes sin capacidad de multiplicación durante algún tiempo para luego iniciar un camino de muerte celular. Otros en cambio no serán capaces de sobrevivir en las condiciones particulares ofrecidas en el cultivo y su desaparición será casi inmediata (Paul, 1975). De esta forma, la proporción relativa de cada tipo celular fluctuará hasta lograr cubrir toda la superficie otorgada para el crecimiento del cultivo celular. Tanto los cambios en las poblaciones celulares, como así también la adaptación al nuevo sistema ocurren continuamente a lo largo de la vida del cultivo celular, haciendo difícil seleccionar un período durante el cual pueda ser considerado como homogéneo o estable (Freshney, 2005).

Algunos aspectos de la función especializada de diferentes linajes celulares se expresan preferentemente con mayor frecuencia en el cultivo primario. En esta etapa, el cultivo mostrará una morfología y bioquímica semejante al tejido de origen (Freshney, 2005).

Alcanzada la confluencia del cultivo primario (es decir, la superficie de crecimiento disponible es cubierta en su totalidad por la población celular) el mismo debe ser subcultivado, lo cual involucra la dispersión química o mecánica de las células del recipiente original y su posterior propagación en nuevos dispositivos de cultivo, manteniendo una tasa de subcultivación

apropiada (Morgan y Darling, 1993). A partir de aquí el cultivo pasa a constituir una línea celular, la cual puede ser subcultivada reiteradas veces (Morgan y Darling, 1993). Con cada SC se irá seleccionando el componente celular de la población con una tasa de proliferación mayor, y aquellas células con una menor tasa se irán perdiendo durante los sucesivos SCs. La selección de las poblaciones celulares no sólo está dada por las diferencias intrínsecas de las células sino además por las presiones de selección que operan sobre el cultivo dentro de las cuales se pueden citar los traumas físico-químicos ejercidos durante el SC-mantenimiento (Freshney, 2005).

Usualmente la morfología que una célula adopta en cultivo en confluencia *in vitro* sigue principalmente dos patrones, fibroblástica o epitelióide. No obstante, la morfología adoptada es independiente del tipo celular que le dio origen. Cuando se hace referencia a la denominación fibroblástica o fibroblastoide, ésta indica que las células presentan una morfología cuya longitud es al menos dos veces mayor a su ancho. Mientras que la denominación epitelióide indica una morfología adoptada en cultivo donde las dimensiones son regulares, presentando una morfología poligonal. Cabe mencionar que existen varias excepciones, como por ejemplo los cultivos de neuronas que exhiben una morfología estrellada, entre otras.

## **1.2. Evolución de las líneas celulares**

Durante el mantenimiento del cultivo celular y el concomitante aumento del número de SCs, éste se vuelve más estable y se caracteriza por estar

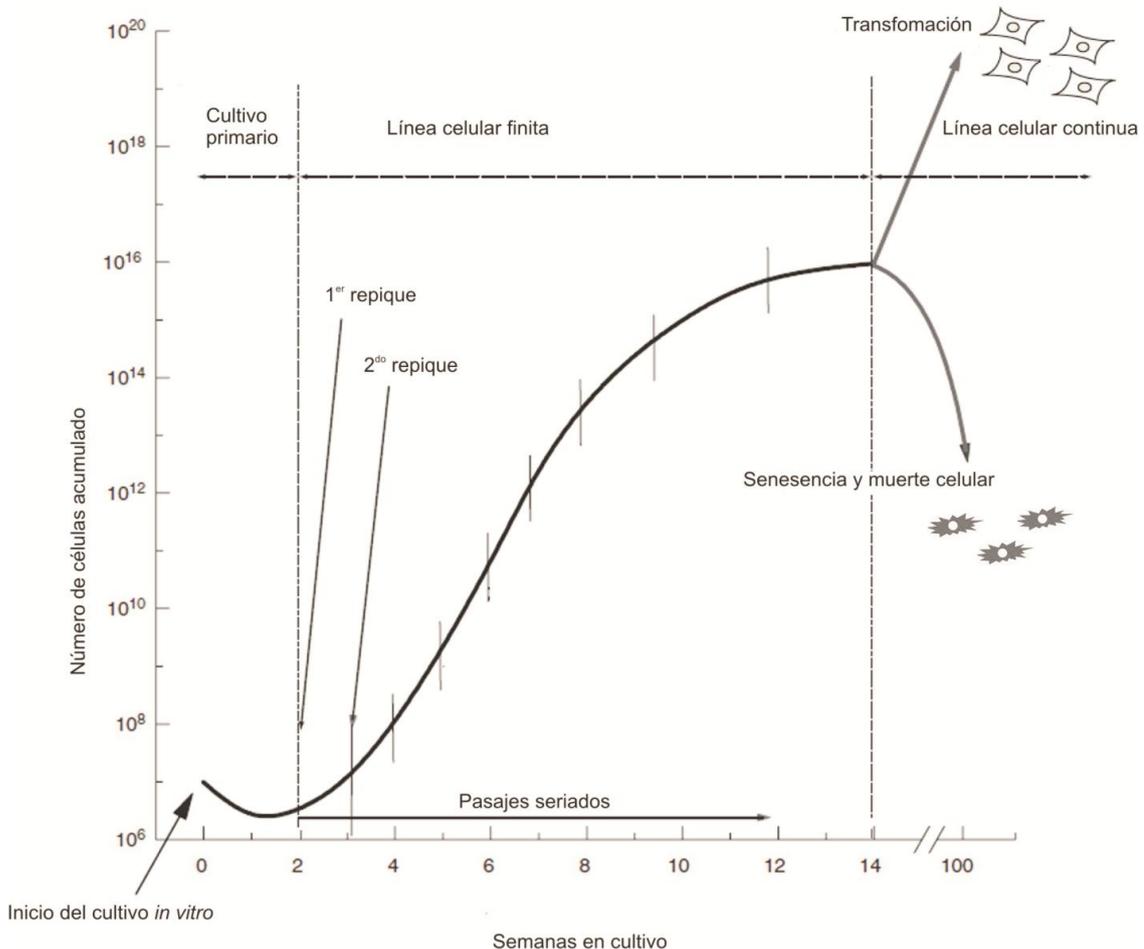
compuesto por una población celular con una mayor capacidad proliferativa, como así también presentar una mayor resistencia a las metodologías de cultivo que involucren un estrés físico y químico (Paul, 1975).

No todas las líneas celulares pueden dar lugar a líneas celulares continuas, algunas fracasan durante el mantenimiento, e inician un período de senescencia celular (ver inciso 1.2.1) durante períodos variables hasta alcanzar la muerte celular (Fig. 1). La capacidad de una línea celular para crecer continuamente refleja probablemente su inestabilidad genética, permitiendo la selección posterior de subpoblaciones celulares, la que menudo implica la eliminación o la mutación en genes relacionados con el ciclo y división celular (Freshney, 2005).

### **1.2.1. Senescencia celular**

El concepto de senescencia celular se originó a partir de estudios realizados a principios de la década del 60, llevados a cabo por Hayflick y Moorhead (1961), en el Instituto Wistar de Filadelfia en los EE.UU. En las experiencias realizadas por estos investigadores utilizaron fibroblastos obtenidos a partir de fetos humanos abortados, cultivados *in vitro*. Dichas células, después de alcanzar un número concreto de divisiones, comenzaban a sufrir una serie de cambios morfológicos, aumentaban su tamaño y se aplanaban. Asimismo, su capacidad para dividirse declinaba progresivamente hasta cesar completamente su proliferación alcanzadas las 50 divisiones poblacionales. Este evento demostró ser irreversible, es decir los factores de

crecimiento no pudieron continuar estimulando a las células para entrar en división.



**Fig. 1.** El eje de las ordenadas (y) representa el crecimiento celular total en escala logarítmica (suponiendo que no hay reducción en cada SC) para un cultivo celular hipotético. El eje de las abscisas (x) representa el tiempo en cultivo en escala lineal. Tanto la transformación como la senescencia pueden ocurrir en cualquier momento del cultivo celular (modificado de Hayflick y Moorhead (1961)).

Dicho fenómeno se repitió en todas sus experiencias y lo denominaron “senescencia replicativa”, la cual implica una capacidad limitada de las células para poder continuar dividiéndose. Algunos autores también han denominado este fenómeno como “el límite de Hayflick” en honor a uno de sus descubridores.

### 1.2.1.1. Características de las células senescentes

En la actualidad hay un exhaustivo cuerpo teórico para explicar el fenómeno de la senescencia celular y sus implicancias. Muchas de las investigaciones están orientadas en demostrar marcadores de senescencia, de los cuales el más obvio es la detención del crecimiento de manera irreversible (Cristofalo y Sharf, 1973). Otros marcadores ampliamente utilizados son los cambios morfológicos acontecidos en las células senescentes. Entre los más característicos podemos mencionar: aumento del tamaño celular, aumento del tamaño nuclear y nucleolar, un aparato de Golgi prominente, aumento del número de vacuolas en el retículo endoplasmático, aumento del número de vesículas lisosomales, aumento del número de microfilamentos citoplasmáticos, como también un aumento en el número de células multinucleadas (Cristofalo y Pignolo, 1993).

Las células senescentes parecen exhibir una mayor sensibilidad al contacto célula-célula (Cristofalo y Pignolo, 1993), lo que reduce los niveles de densidad celular en la confluencia del cultivo (Cristofalo, 1988). Aunque la síntesis de macromoléculas disminuye con el aumento del tiempo en cultivo, aumenta el contenido intracelular de ARN y proteínas. El aumento de estas macromoléculas se debe a niveles reducidos de degradación proteica por el sistema de proteosomas, a una disminución en el recambio de ARN, como también a un desacople del crecimiento y de la división celular (Phipps *y col.*, 2007).

Otros marcadores bioquímicos que podrían ayudar a identificar las células senescentes en cultivo son los cambios generados en la producción de IGF-1, EGF, *c-fos* y la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa. El IGF-1 es producido por muchos tipos celulares y desempeña un papel importante en la regulación de la proliferación. Ferber y col. (1993) demostraron que la producción del ARNm de IGF-1 resulta indetectable en células senescentes. Otro marcador biológico regulado de manera diferencial en las células senescentes es el EGF. La señalización de este factor se reduce en fibroblastos humanos diploides senescentes “corriente abajo” del enlace de receptor. Carlin y col. (1994) compararon la actividad proteolítica contra los receptores de EGF de lisados de células pre-senescentes y senescentes de la línea celular WI-38, donde demostraron la escisión del receptor de EGF por una proteasa presente exclusivamente en las células senescentes. La ausencia de la expresión del protooncogen *c-fos* inducía la senescencia en la línea celular establecida WI-38, este fenómeno fue demostrado por Seshadri y Campisi (1990).

La tinción de la  $\beta$ -galactosidasa es una técnica para distinguir células senescentes *in situ* y ha sido utilizada en muchos estudios para determinar la cantidad de células senescentes en cultivo celular (Dimri y col., 1995; Stenderup y col., 2003; Alexander y col., 2004). Esta enzima es una hidrolasa lisosomal la cual normalmente actúa a pH 4, pero en células senescentes a menudo se encuentra activa a un pH 6. Durante el mantenimiento de un cultivo de fibroblastos humanos el porcentaje de células positivas para la tinción de la enzima aumenta con el número de duplicaciones poblacionales hasta hacerse

máxima en la senescencia (Dimri *y col.*, 1995). Este aumento en la tinción se debe a un incremento en el número de lisosomas y al aumento de la actividad de los mismos (Kurz *y col.*, 2000).

#### **1.2.1.2. Teorías de senescencia celular**

Un gran número de teorías han sido generadas a través de los años para poder explicar el fenómeno de la senescencia celular. De manera sintética se expondrán brevemente algunas de las mismas:

##### **Teoría de la catástrofe:**

Una teoría actualmente controvertida enunciada por Orgel (1963) propone que en aquellas células senescentes durante la síntesis de proteínas se va produciendo una acumulación exponencial de errores traduccionales a lo largo del tiempo y estos conducen a una “catástrofe” de la homeostasis celular, como consecuencia inevitable de dos fenómenos: a) la transferencia de información del ADN al ARN no ocurre siempre con absoluta fidelidad, y en adición b) las proteínas producidas a partir de ARN con baja fidelidad están involucradas en este proceso de transferencia de información; de tal manera, una mínima proporción de síntesis de proteínas aberrantes involucradas en la transcripción y en la traducción (ARN polimerasas, aminoacilARNt sintetisas, proteínas ribosómicas), inducen de forma progresiva y continua un aumento cada vez mayor de proteínas aberrantes. La acumulación de errores conduce a una inestabilidad homeostática al superar la capacidad de reparación y de

eliminación de proteínas anormales. Sin embargo, resultados actuales señalan como responsables de las alteraciones proteicas a algunas modificaciones postraduccionales como son la glicosilación no enzimática (Monnier, 1990), la acción de radicales libres (Sohal *y col.*, 1993), entre otros fenómenos manifiestos y no así a los errores adjudicados por Orgel (1963) durante la traducción proteica. Por otra parte, la fidelidad de la síntesis de proteínas en las células senescentes no es significativamente distinta a la encontrada en células normales.

#### **Teoría del acortamiento de las secuencias teloméricas:**

En experiencias posteriores a las de Hayflick y Moorhead (1961), Harley *y col.* (1990) vincularon la limitada capacidad de proliferación con el acortamiento progresivo de las secuencias teloméricas de las células durante su mantenimiento *in vitro*. Estas secuencias de los extremos de los cromosomas no se replican del mismo modo que el resto del genoma, son añadidas posteriormente por un complejo enzimático denominado telomerasa (Holt *y col.*, 1997). La mayoría de las células humanas, salvo algunas excepciones como por ejemplo las células madre, no presentan actividad de la telomerasa. Harley *y col.* (1990) demostraron que el tamaño de los telómeros disminuía de 2 Kb a 4 Kb con la aparición de la senescencia durante el mantenimiento de los fibroblastos humanos.

Otros datos experimentales también soportan esta teoría; la mayoría de las líneas celulares inmortales como las células cancerosas expresan actividad

de la telomerasa (Kim *y col.*, 1994); la inhibición experimental de la actividad de ésta puede inducir un fenotipo senescente en células cancerosas (Herbert *y col.*, 1999), dicho fenómeno se ha visto también en células eucariotas de ascomicetes como son las levaduras (Lundblad y Szostak, 1989).

Se han comunicado varias excepciones a la relación entre el acortamiento telomérico y la inducción de la senescencia celular. Entre las mismas podemos citar: a los queratinocitos orales humanos cultivados *in vitro* donde la disminución del potencial de proliferación está asociado a la pérdida de actividad de la telomerasa pero sin acortamiento de los telómeros (Kang *y col.*, 1998; Kang *y col.*, 2004); en los leiomiomas acontece un fenómeno similar donde el tamaño telomérico no limita el potencial de crecimiento (Rogalla *y col.*, 1995; Bonatz *y col.*, 1998; Patton *y col.*, 2006), otra excepción la constituye el Orden Rodentia (Clase Mammalia, Superorden Euarchontoglires) donde se conoce la existencia de una coevolución inversa entre la masa corporal y la expresión de la telomerasa en algunos tejidos. Se ha demostrado que las especies de pequeño tamaño corporal presentan actividad de la telomerasa en ciertos órganos incluyendo piel y pulmón (Seluanov *y col.*, 2007; Seluanov *y col.*, 2008; Gorbunova y Seluanov, 2009). Para algunos autores, los resultados obtenidos sobre la relación entre los telómeros y senescencia celular no es el final de la historia (Herbig y Sedivy, 2006).

### **Teoría de la senescencia inducida por estrés:**

Las células *in vivo* están expuestas a condiciones bioquímicas las cuales resultan imposibles de reproducir en su totalidad en un sistema *in vitro*. Uno de

los parámetros críticos lo constituye el nivel de concentración de oxígeno en los cultivos celulares. Normalmente se encuentran expuestos a concentraciones del 20%, estos valores son mucho más altos respecto a condiciones fisiológicas donde alcanzan solamente un 3% (Rubin, 1997). El mantenimiento de los fibroblastos humanos en una concentración de O<sub>2</sub> entre un 1,5 a un 3% retrasa la aparición de la senescencia replicativa en comparación con las células cultivadas en una atmósfera del 20% (Poulios *y col.*, 2007). Cuando las células son cultivadas en concentraciones de O<sub>2</sub> más cercanas a las fisiológicas se observa un mayor número de duplicaciones poblacionales (Chen *y col.*, 1995 ). En contraste a lo expuesto, cuando las células son cultivadas a concentraciones de un 20 a un 50% se observa más tempranamente el fenómeno de la senescencia celular, alcanzando menores duplicaciones poblacionales (von Zglinicki *y col.*, 1995 ). Este efecto, ya sea por las concentraciones de O<sub>2</sub>, como por otros factores estresantes para las células en cultivo parece inducir la senescencia celular (von Zglinicki *y col.*, 1995 ; Toussaint *y col.*, 2002). En el taller de Gerontología Molecular y Celular llevado a cabo en Suiza en 1999 luego de profundas deliberaciones, se acuñó el concepto de senescencia prematura inducida por estrés (Brack *y col.*, 2000).

Además del O<sub>2</sub>, otras fuentes pueden generar daño oxidativo como es el radical superóxido (O<sub>2</sub>•-) producto del metabolismo celular o el tert-butilhidroperóxido (Dumont *y col.*, 2000). Asimismo, existen otros factores estresantes como el etanol, las radiaciones ionizantes y drogas como la

mitomicina C las cuales se hallan entre los inductores de la senescencia prematura inducida por estrés (Toussaint *y col.*, 2002).

### **Teoría de la diferenciación celular:**

En las etapas avanzadas de diferenciación celular muchos tipos de células *in vivo* pierden la capacidad de multiplicarse, como acontece en la diferenciación terminal de queratinocitos, enterocitos, neuronas y células musculares cardíacas (Ross y Pawlina, 2007). En 1974 Martin y col. (1974) propusieron que el límite en el número de divisiones celulares alcanzado por los fibroblastos humanos en cultivo representaba una diferenciación terminal y no la senescencia de las mismas. Los autores arribaron a estas conclusiones apoyados sobre cambios morfológicos y funcionales acontecidos en las células, como fueron el tamaño de las mismas; la morfología “epitelioide” adoptada en las etapas finales del cultivo, la adquisición de capacidad fagocítica, así como la pérdida de la capacidad replicativa. Dichos investigadores sugirieron que los fibroblastos iniciales se diferenciaron a macrófagos, resultando de un proceso epigenético de atenuación clonal del crecimiento (Martin *y col.*, 1974).

Muchos investigadores adhieren a esta teoría, uno de los más importantes es Bayreuther (1992), quien propone a los fibroblastos como un sistema de células madre donde define una secuencia de 11 estados de diferenciación, divididas en 5 compartimientos dentro de este sistema. Los 11 estados fueron individualizados en base a características morfológicas y bioquímicas. La secuencia establecida por este autor es: a) el primer

compartimento es el de las células madre donde establece 3 estados de diferenciación, denominados S1, S2 y S3; b) el segundo compartimento es el de fibroblastos progenitores, en este compartimento las células tienen capacidad replicativa, y establece una secuencia de 3 estados de diferenciación, denominados MF I, MF II Y MF III; c) el tercer compartimento es el de fibroblastos en maduración donde las células pierden la capacidad replicativa y establece 5 estados secuenciales de diferenciación, denominados PMF IV, PMF V, PMF VI; d) en el cuarto compartimento denominado etapa de degeneración de los fibroblastos, los PMF VI degeneran a PMF VIIa en este compartimento o se transforman a PMF VIIb e) en el último compartimento denominado transformación fibroblástica, donde evaden la degeneración y adquieren nuevamente la capacidad replicativa.

### **1.2.2. Transformación celular**

La palabra transformación ha sido utilizada con cierta liviandad y poco rigor científico dando lugar a diferentes acepciones para distintos autores. Por lo general ha existido una tendencia a confundir el concepto de transformación y el de immortalización celular. En la presente Tesis Doctoral se adopta el concepto acuñado por Freshney (2005) donde immortalización significa la adquisición de una duración de vida media infinita y transformación celular implica una alteración adicional de características de crecimiento (independencia de anclaje, pérdida de inhibición de contacto, disminución de la limitación de la densidad de crecimiento, entre otras) donde a menudo, pero no

necesariamente, se puede correlacionar con tumorigenicidad (capacidad de generar tumores *in vivo*) (Freshney, 2005).

El término transformación se ha aplicado para explicar o comprender el proceso de establecimiento de una línea celular continua *in vitro*. En dicho proceso acontecen una serie de alteraciones morfológicas y bioquímicas semejantes a las ocurridas en los procesos carcinogénicos *in vivo* (Freshney, 2005). Dentro de las mismas podemos mencionar: los bajos requerimientos de suero en los medios de cultivo, la reducción en la limitación del crecimiento demostrada por la pérdida de inhibición por contacto, crecimiento independiente de anclaje y alteraciones cromosómicas, entre otras (Morgan y Darling, 1993).

#### **1.2.2.1. Mecanismos de transformación celular**

La transformación puede ocurrir de forma espontánea o ser inducida por factores físicos, químicos o biológicos (McCormick y Maher, 1989):

##### **Transformación espontánea:**

Uno de los primeros aportes sobre transformación espontánea de células en cultivos fueron realizados por Gey (1941). Dicho investigador trabajando con fibroblastos de rata descubrió la capacidad de los mismos en transformarse espontáneamente en células capaces de formar sarcomas cuando eran inoculadas en organismos de la misma especie. Conclusiones similares fueron alcanzadas por Earle (1943) en el NCI, trabajando con fibroblastos de ratón.

Cuando se compara la probabilidad de transformación espontánea de los fibroblastos normales de diferentes especies se observa una gran variedad de patrones y se demostró que este proceso no ocurre con la misma frecuencia en las misma. Algunas especies originan cultivos que se transforman espontáneamente con una frecuencia alta mientras que otras nunca lo hacen (Macieira-Coelho, 2000). Dentro del Orden Rodentia se encuentran varias especies con las probabilidades más altas de originar cultivos transformados espontáneamente como son la rata (*Rattus norvegicus*) y el ratón (*Mus musculus*). En la ATCC (<http://www.atcc.org>) existen una gran variedad cultivos transformados de las especies en cuestión originados tanto de tejidos normales como la línea L6 (CRL-1478) y la línea 3T3 (CL-173) respectivamente, como neoplásicos A9 (CCL-102) y C6 (CCL-107). Otra especie dentro de este Orden ampliamente utilizada y que presenta una potencialidad menor es la del hámster (*Mesocricetus auratus*), existiendo una gran diferencia entre las cepas existentes (Macieira-Coelho, 2000). La cepa de hámster sirio presenta tendencias bajas a la transformación espontánea, entre un 5 al 10% (Barrett, 1980; Bruce *y col.*, 1986), no obstante la línea celular BHK-21 [C13] (CCL-10) es ampliamente utilizada para diversas líneas de investigación como también para la propagación de virus como son el de la fiebre aftosa (Vagnozzi *y col.*, 2007), rabia (Lalosević *y col.*, 2008), New Castle (Reddy y Srinivasan, 1992), dentro de los más conocidos. Mientras que la cepa de hámster chino presenta una alta tasa de transformación espontánea, una de las líneas más ampliamente utilizada en estudios citogenéticos es la CHO-K1 (CCL-61). El caso de *Oryctolagus cuniculus*

es un ejemplo intermedio en cuanto a la probabilidad de inmortalización o transformación espontánea a partir de células normales (Macieira-Coelho, 2000). Un panorama totalmente distinto encontramos con otras especies ampliamente utilizadas en cultivos celulares como son los bovinos (*Bos taurus*), la especie humana (*Homo sapiens*) y la gallina (*Gallus gallus*) donde la probabilidad de obtener líneas celulares inmortales o transformadas a partir de tejidos normales es muy baja en las primeras dos especies y prácticamente nula en la última. En el caso de los bovinos una de las líneas más ampliamente conocidas es la línea celular MDBK (CCL-22) utilizada para la propagación de virus como el virus de la diarrea bovina (BVDV). En los humanos es muy baja la probabilidad de obtener líneas celulares inmortales o transformadas espontáneamente entrando en su mayoría en senescencia replicativa. Existen algunas líneas celulares de uso frecuente que tienen una vida media finita como las MRC5 (CCL-171) o la WI-38 (CCL-75) en ambos casos las células mantienen el cariotipo diploide original de la especie ( $2n=46$ ) y pueden cultivarse entre 50 a 55 generaciones poblaciones punto en el cual entran en senescencia replicativa. La gran mayoría de los cultivos iniciados a partir de tejidos normales deben ser transformados mediante el uso de virus o algún otro agente transformante con el objetivo de lograr una línea celular continua (Nitta *y col.*, 2001; Dorner *y col.*, 2008; Katsch *y col.*, 2012). Asimismo la gran mayoría de las líneas celulares humanas que se comercializan han sido obtenidas como cultivos primarios de tejidos neoplásicos, siendo tejidos alterados previamente a su exposición a las condiciones *in vitro*. Una de las primeras líneas obtenidas a

partir de tejidos neoplásicos es la línea celular HeLa (CCL-2) la cual porta una gran variedad de aberraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales. Por último, en el caso de la gallina la probabilidad de obtener una línea celular inmortal o transformada de forma espontánea es nula. En resumen, parece existir algún tipo de relación entre el comportamiento de las células *in vitro* y algunas características de los organismos a partir de las cuales se originan, de hecho la tasa de cáncer es más alta en aquellas especies en las que la probabilidad de la transformación espontánea también lo es (Pontén, 1971). Otra relación puede ser establecida entre la longevidad de la especie de origen y la probabilidad de transformación espontánea: a una menor longevidad media en la especie de origen se contrasta con una mayor probabilidad de transformación espontánea (Macieira-Coelho, 2000).

### **Transformación inducida por agentes biológicos:**

En el mismo año que Gey (1941) describía la transformación espontánea, Halberstaedter y col. (1941) observaron que el virus del sarcoma de Rous (virus ARN), podía inducir transformación en fibroblastos de pollo cultivados *in vitro*. Posteriormente otros dos virus ARN aislados a mediados de la década del 60 como son el virus de sarcoma de Harvey (1964) y el virus de sarcoma de Kirsten (Kirsten y Mayer, 1967) inducen la formación de sarcomas en rata. Posteriormente se concluyó que los mismos poseían un gen similar productor de la transformación, el cual fue denominado gen *ras* derivado del inglés *rat sarcoma* o sarcoma de rata.

Aproximadamente en la misma época fueron descubiertos dos virus de ADN con capacidades transformantes, el SV40 (siglas derivadas del inglés *simian virus* o virus del simio) y el virus del Polioma. El primero fue descubierto por su potencial efecto citopático (productor de lisis celular) en el hígado de “mono verde africano” (Sweet y Hilleman, 1960). Posteriormente Todaro y col. (1964) demostraron que este virus producía la transformación de la línea celular 3T3 derivada de fibroblastos de ratón induciendo la pérdida de inhibición de crecimiento por contacto. Asimismo, Vogt y Dulbecco (1960) demostraron la capacidad transformante del virus del Polioma utilizando fibroblastos de embrión de ratón.

La transformación celular inducida por virus se encuentra asociada con la capacidad de los mismos de insertarse en el genoma celular, pudiendo activar protooncogenes. Los virus con capacidad de inserción en el genoma celular pueden ser ARN (Retrovirus) o ADN (Adenovirus, Poliomavirus, Herpevirus, Hepadnavirus, Poxivirus, entre otros). Algunos de estos virus se utilizan en protocolos específicos para transformar algunos cultivos celulares como es el caso del virus Epstein-Barr, ampliamente utilizado para inducir la transformación de linfocitos B (Karpas *y col.*, 2001).

#### **Transformación inducida por agentes químicos:**

Berwald y Sachs (1963) comunicaron una serie de trabajos realizados con pasajes tempranos de una línea celular proveniente de embriones de hámster sirio en los cuales las mismas fueron tratadas con benzo[a]pireno (hidrocarburo

policíclico aromático con alto poder carcinogénico). Estos autores observaron que algunas células comenzaban a demostrar un patrón de crecimiento anómalo. Las células tratadas con el agente carcinogénico luego de ser cultivadas *in vitro* por sucesivos pasajes, demostraron la formación de tumores cuando eran inoculadas en la especie de origen (Berwald y Sachs, 1965). Un estudio similar fue realizado por Borek y Sachs (1966b) utilizando radiaciones ionizantes sobre la misma línea celular reemplazando el uso de los agentes químicos. Después de una extensa subcultivación las células resultantes lograron formar tumores similares a los sarcomas, en hámster de 2 a 6 semanas de vida. Estas experiencias llevaron a estandarizar una serie de protocolos por medio de los cuales se puede evaluar el potencial carcinogénico de diferentes agentes en un sistema *in vitro* (DiPaolo y col., 1969).

#### **1.2.2.2. Características de las células transformadas**

La transformación celular involucra una serie de eventos como son la inestabilidad genética y tres clases principales de cambios fenotípicos: (1) la inmortalización, (adquisición de una vida media infinita) (2) control de crecimiento aberrante (la pérdida de motilidad celular por inhibición de contacto, limitación en la densidad de proliferación celular y la independencia de anclaje) y (3) la malignidad (marcada por la capacidad de producir tumores *in vivo*) (Freshney, 2005).

### 1.2.2.2.1. Inestabilidad genética

La inestabilidad genética se manifiesta como una tendencia creciente a adquirir mutaciones (todo cambio hereditario en el material genético) cuando los procesos responsables del mantenimiento y replicación del genoma se tornan disfuncionales (Martín *y col.*, 2010).

La inestabilidad genética se clasifica en macrolesiones y microlesiones, dependiendo del nivel de la organización biológica involucrado (Martín *y col.*, 2010).

#### **Macrolesiones**

Las macrolesiones son alteraciones a nivel cromosómico y originan aberraciones cromosómicas. Estas se clasifican en numéricas (afectan el número cromosómico) y estructurales (afectan la estructura de los cromosomas).

- Aberraciones numéricas:
  - Euploidias: involucran a la dotación entera de cromosomas. Estas se clasifican según la cantidad de veces que está presente el número haploide original.
    - Triploidía: presenta tres juegos completos de cromosomas.
    - Tetraploides: presentan cuatro juegos completos de cromosomas.
  - Aneuploidías: involucran cambios en uno o más cromosomas aislados del complemento. Entre algunas de ellas podemos mencionar:
    - Nulisomías: pérdida del par de cromosomas homólogos

- Monosomías: pérdida de uno de los cromosomas homólogos del par.
- Trisomías: ganancia de un cromosoma homólogo.
- Aberraciones estructurales:

Según Savage (2001), las aberraciones estructurales pueden ser de tipo cromátida o cromosómico dependiendo si la lesión afecta a una o ambas cromátidas hermanas del cromosoma, respectivamente. Luego de finalizada la mitosis el cromosoma no se encuentra replicado, por lo que cualquier cambio estructural durante esta etapa será duplicado durante la siguiente fase de síntesis (fase S) del ciclo celular, y por consiguiente las aberraciones durante la subsiguiente mitosis afectarán al mismo *locus* en ambas cromátidas hermanas, por lo que se designan como aberraciones tipo cromosómicas. Asimismo, si el cambio estructural ocurre luego de la fase S del ciclo celular pero afectando a una de las dos cromátidas hermanas del cromosoma, se designa como aberración tipo cromátida dado que sólo será observable en un único brazo cromosómico.

La mayoría de las aberraciones son el resultado de la interacción o falta de la misma entre dos o más lesiones en los brazos de los cromosomas:

- Intercambios (del inglés *interchange*): se forman cuando las lesiones que interaccionan afectan dos cromosomas distintos ya sean homólogos o no homólogos.
- Intracambios (del inglés *intrachange*): se forman cuando las lesiones que interactúan se ubican en el mismo cromosoma.

- Interbrazos: las lesiones que interactúan se ubican en brazos opuestos.
- Intrabrazos: las lesiones que interactúan se ubican en el mismo brazo.
- Discontinuidades (rotura o deleción, del inglés *break*): ruptura del brazo de un cromosoma o cromátida sin asociación con algún evento de intercambio o intracambio.

Las primeras dos categorías generalmente se designan en común como intercambios (del inglés *exchange*), y pueden ocurrir de dos formas:

- Asimétrica: la reunión de los elementos siempre resulta en la producción de “fragmentos acéntricos” (segmento de un cromosoma sin centrómero), los cuales se tienden a perder ya que no pueden migrar durante la mitosis.
- Simétrica: la reunión, a menos que sea incompleta, no produce “fragmentos acéntricos”, por lo que en la mayoría de los casos los cambios estructurales son transmitidos en las generaciones futuras de células.

Por último, las aberraciones pueden ser clasificadas como completas, cuando no quedan fragmentos con extremos rotos, o incompletas cuando quedan fragmentos sin reunirse.

Casi todos los tipos de aberraciones estructurales pueden ser clasificados con los parámetros expuestos anteriormente, ya sea de forma simple como por

combinación de alguna de estas categorías. En la [Fig-figura- 2](#) se exponen los cuatro tipos básicos de aberraciones observados más frecuentemente.

Brevemente, cabe mencionarse que existen tres teorías ampliamente difundidas que explican el origen de las aberraciones cromosómicas estructurales.

### **Teoría de la rotura y reunión**

Esta teoría fue desarrollada por Sax (1941) a partir de su trabajo realizado en *Drosophila* sp. y por Lea (1946) a partir de su trabajo con radiaciones ionizantes en células de *Tradescantia* sp. Según esta teoría, la radiación actúa generando roturas en el cromonema o esqueleto de la cromátida produciendo un corte completo. Esto implica que cada rotura posea dos extremos abiertos denominados roturas primarias, éstas pueden seguir tres caminos diferentes:

- La restitución, cuando los dos extremos de la rotura vuelven a unirse permitiendo la restitución de la estructura cromosómica original. Se considera que en el 90% de los casos acontece este evento.
- Se producen uniones ilegítimas entre extremos procedentes de roturas primarias diferentes dando como resultado los intercambios.
- Error de reunión de las roturas primarias, ya sea la restitución como la reunión ilegítima, permaneciendo los dos extremos de las roturas sin unirse, produciéndose por tanto las deleciones.

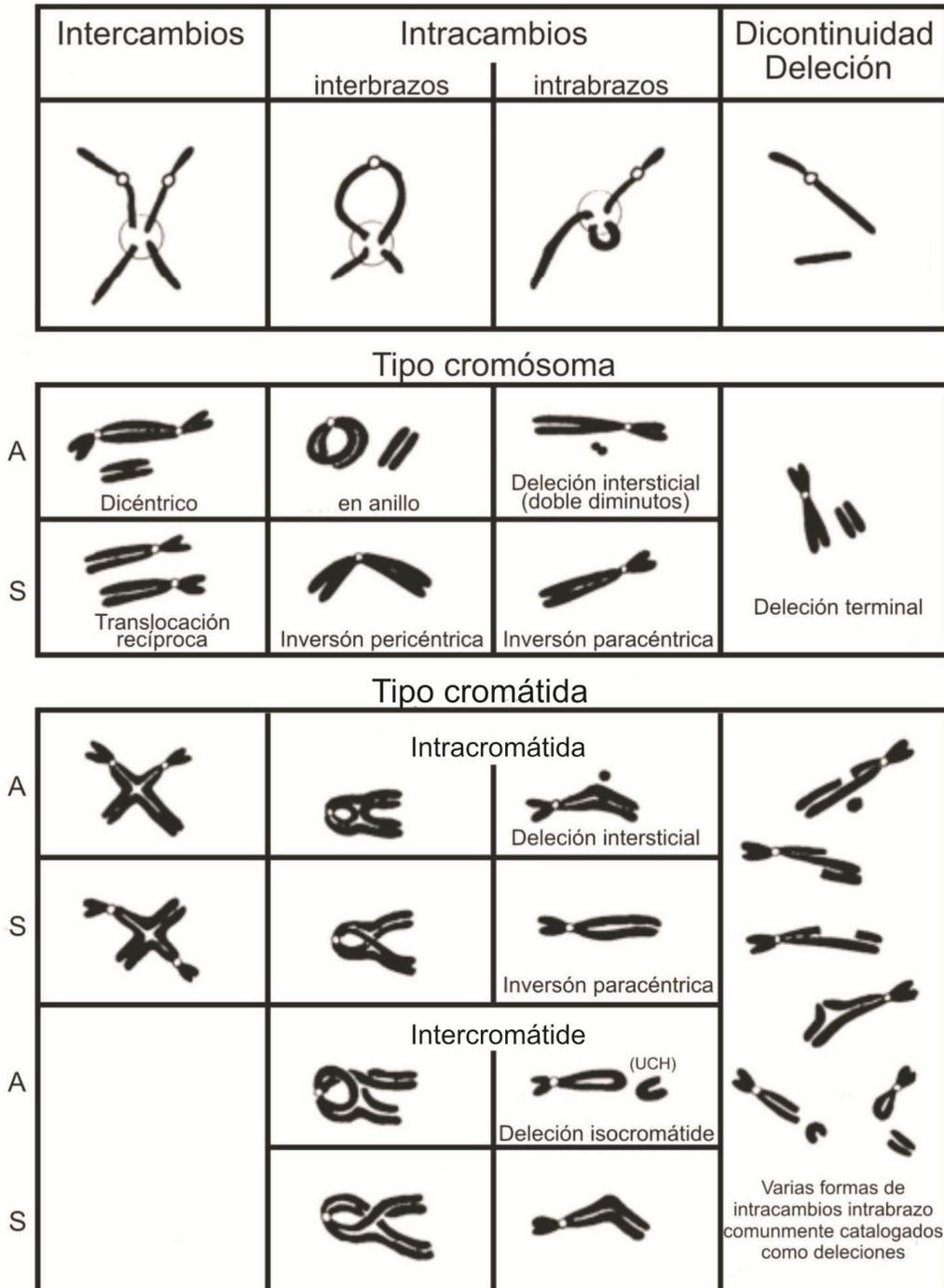


Fig. 2. Los cuatro tipos de aberraciones básicas. A, reuniones asimétricas; S, reuniones simétricas; UCH, unión de cromátidas hermanas con ambos extremos fusionados lateralmente (mModificada a partir de Savage (2001)).

### Teoría del intercambio

Esta teoría fue desarrollada por Revell (1959), a partir de sus estudios con agentes alquilantes. Básicamente, propone que el evento primario no es una

rotura sino una lesión inestable en la cromatina con un tiempo limitado de vida media. Estas lesiones tienden a volver a un estado estable. Si antes de volver a esta situación, dos lesiones se aproximan e interaccionan entre sí forman un estado semiestable, denominado “inicio del intercambio”, siendo este punto aún reversible. En este contexto puede dar lugar al proceso de intercambio, estableciéndose una entidad estructural irreversible. En una gran proporción de casos el proceso falla y el intercambio se realiza de forma incompleta dejando extremos sin reunión.

### **Teoría molecular**

Desarrollada en la década de los 80's por Chadwick y Leenhouts (1981), con un cuerpo teórico más abundante en lo referido a la complejidad de los cromosomas, la arquitectura intranuclear y los mecanismos moleculares implicados en su mantenimiento y reparación. Estos autores sintetizaron una gran cantidad de ensayos en radiobiología sobre la base de un único tipo de lesión, la rotura de doble cadena y su posterior reparación. Con respecto a las aberraciones estructurales, estos autores concluyen que los intercambios simples (los que no implican más de dos elementos) comienzan en una rotura doble cadena que interacciona localmente con cromatina sin dañar. Los mismos, asimismo, proponen que la reparación de la mayoría de las lesiones se produce por un mecanismo de recombinación mediante la formación de heteroduplex de ADN acompañado por la producción adicional de roturas de doble cadena inducidas enzimáticamente.

Las aberraciones cromosómicas originan una gran variabilidad en los cariotipos de las poblaciones celulares presentes en un cultivo. Existen dos etapas bien marcadas en la evolución de una línea celular desde el punto de vista de la heterogeneidad cariotípica (Mamaeva, 1998), la etapa de establecimiento y la etapa de estabilización. Una de las principales características observadas durante la primera es la existencia de una gran heterogeneidad en los cariotipos presentes en las distintas poblaciones celulares. La duración de la misma estará determinada tanto por la heterogeneidad de cariotipos presentes en las poblaciones celulares como también por la selección clonal acontecida en el cultivo. La etapa de estabilización está caracterizada por una disminución en la heterogeneidad de los cariotipos en el cultivo, observándose una disminución de la variabilidad en el número cromosómico de las poblaciones presentes (Mamaeva, 1998).

Las evidencias de las aberraciones cromosómicas pueden ser observadas evaluando el número cromosómico y también a través del análisis del cariotipo de los cultivos celulares establecidos. Un ejemplo evidente los constituye los cultivos obtenidos de células de ratón. El cariotipo de éste se compone exclusivamente de cromosomas acrocéntricos, pero la gran mayoría de las líneas celulares derivadas de estos poseen varios cromosomas metacéntricos originados por translocación robertsoniana de los cromosomas acrocéntricos originales de la especie en cuestión, un ejemplo lo constituyen la línea celular 3T3 y sus derivadas (Morgan y Darling, 1993).

Algunas aberraciones específicas se asocian con determinados tipos de malignidad (Heim y Mitelman, 1986; Croce, 1991; Knuutila *y col.*, 1994; Larramendy *y col.*, 1998). La mayoría de las aberraciones presentes corresponden a translocaciones recíprocas y no recíprocas, inversiones y trisomías (Heim y Mitelman, 1986; Mitelman, 1994, 2000). Por ejemplo, en pacientes con linfoma de Burkitt se encuentran translocaciones específicas, siendo algunas de las más frecuentes la  $t(8;14)(q24;q32)$ ,  $t(2;8)(p12;p24)$  y  $t(8;22)(q24;q11)$  (Shade *y col.*, 1980; Bernheim *y col.*, 1981; Abe *y col.*, 1982; Look *y col.*, 1995). En la leucemia mieloide crónica humana se encuentra recurrentemente el cromosoma Filadelfia, una translocación recíproca entre cromosomas 9 y 22,  $t(9;22)(q34;q11)$  (Raskind *y col.*, 1987; Ohyashiki *y col.*, 1988). En los neuroblastomas aparece recurrentemente una delección del brazo corto del cromosoma 1 (1p-) (Gilbert *y col.*, 1982), mientras que en el cáncer de “células pequeñas” de pulmón ocurre frecuentemente la delección en el brazo corto del cromosoma 3 (Whang-Peng, 1989; Testa y Graziano, 1993).

### **Microlesiones**

Las microlesiones son alteraciones a nivel molecular, esto es los cambios producidos en la secuencia de nucleótidos de la molécula de ADN no observables con microscopía óptica (Watson *y col.*, 2007). Como consecuencia de estos cambios se puede alterar la secuencia de bases y esto puede afectar la secuencia de aminoácidos específica de las proteínas que codifican esos segmentos alterados.

Las mutaciones genéticas se clasifican en:

- Mutaciones por sustitución: las mismas ocurren cuando se cambia un par de bases por otro:
  - Transicionales: son sustituciones de una pirimidina por otra pirimidina ( $C \leftrightarrow T$ ) o una purina por otra purina ( $A \leftrightarrow G$ ).
  - Transversionales: son sustituciones de una pirimidina por una purina o una purina por una pirimidina.
- Mutación de corrimiento: ocurre cuando se añade o eliminan pares de nucleótidos alterando la longitud de la cadena de ADN.
  - Deleciones: se elimina una o más pares de bases en la cadena de ADN.
  - Inserciones: se añade uno o más pares de bases en la cadena de ADN.

La detección de inestabilidad genómica es un paso importante en el análisis molecular de la transformación maligna. Un marcador ampliamente utilizado para la evaluación de la inestabilidad genética son las secuencias de ADN microsatélite. Estas son segmentos de ADN constituidos por una secuencia de dos a siete nucleótidos de longitud repetidas en tándem por un número variable de veces (Sprecher *y col.*, 1996). Comúnmente se ubican en regiones no codificantes del genoma y presentan una tasa de mutación relativamente alta (Sprecher *y col.*, 1996). Como consecuencia, tienen un elevado número de variantes alélicas, que se diferencian entre sí por la cantidad de veces que se repite el motivo (Da Silva *y col.*, 1999). Las zonas de la hebra de

ADN que presentan secuencias altamente repetidas, como aquéllas encontradas en los microsatélites son especialmente propensas al deslizamiento de la polimerasa de ADN y, en consecuencia, se establecen zonas con forma de "bucle" en la cadena, quedando ambas desalineadas entre sí (Schlötterer y Tautz, 1992). Si estos errores no son corregidos por los sistemas de reparación, la mutación es fijada durante la replicación posterior como adición o delección de una o más unidades de repetición que conforman el "bucle", añadiendo o delecionando repeticiones (Schlötterer y Tautz, 1992). Las alteraciones de estas secuencias se denominan como "inestabilidad de microsatélites". Esta puede ser expresada como la aparición de nuevos alelos o el desbalance de la heterocigosis por pérdida de alguno de estos (Peltomäki *y col.*, 1993; Lynch *y col.*, 1997). Esta última sólo puede ser evaluada en aquellos *loci* que sean heterocigotas.

La inestabilidad en los microsatélites ha sido detectada en una gran variedad de tumores neoplásicos humanos, tanto hereditarios como esporádicos, en éstos se ha encontrado que portan mutaciones en alguna proteína del sistema de reparación por emparejamiento erróneo (Leach *y col.*, 1993; Bronner *y col.*, 1994; Wooster *y col.*, 1994) y por consiguiente, la inestabilidad en los microsatélites es considerada el reflejo de la deficiencia de este mecanismo y es utilizada como criterio de diagnóstico para evaluar tal deficiencia (Aaltonen *y col.*, 1993; Papadopoulos *y col.*, 1994; Wooster *y col.*, 1994; Mead *y col.*, 2007; Berginc *y col.*, 2009).

#### **1.2.2.2.2. Control del crecimiento aberrante**

Las células cultivadas a partir de tumores, como las transformadas en cultivos *in vitro*, muestran un control de crecimiento aberrante, que se manifiesta por alcanzar una mayor densidad celular de saturación en el cultivo (Dulbecco y Elkington, 1973), demostrar una capacidad de crecimiento con independencia de anclaje al sustrato (Freedman y Shin, 1974), formación de multicapas celulares (Aronson *y col.*, 1970), presentar una menor dependencia de suero o factores de crecimientos aportados por este último, debido en parte a la producción autócrina de sus propios factores de crecimiento (Todaro y De Larco, 1978).

### **Crecimiento con independencia de anclaje**

Muchas de las propiedades asociadas con la transformación neoplásica *in vitro* son el resultado de modificaciones en la superficie celular (Hynes y Humphryes, 1974; Nicolson, 1976; Bruyneel *y col.*, 1990), por ejemplo, presentar una mayor afinidad a las lectinas de origen vegetal (Laferté y Loh, 1992), cambios en las glicoproteínas de membrana (Bruyneel *y col.*, 1990; Carraway y Hull, 1991) como así también presentar modificaciones en las CAM (Yang *y col.*, 2004), muchos de estos cambios pueden relacionarse con la capacidad de invasividad y formación de metástasis *in vivo*.

Las células transformadas por lo general carecen de CAM específicas (por ejemplo, L-CAM), cuando estas células son transfectadas con los genes específicos de CAM, pueden restablecer el fenotipo normal no invasivo (Mege *y col.*, 1988). La expresión y grado de fosforilación de las integrinas, también

puede verse afectada (Hertle *y col.*, 1991), alterando las interacciones con los filamentos de actina, la adherencia de las células al sustrato, como también la regulación de la proliferación celular (Fata *y col.*, 2004).

La pérdida de las uniones intercelulares manifiestas en los tejidos normales es una de las características distintivas del crecimiento aberrante, conduciendo a un patrón de crecimiento desordenado y a una pérdida de inhibición de crecimiento por contacto (Pawlak y Helfman, 2001). Las células transformadas pueden crecer separadas del sustrato, ya sea en cultivos en suspensión o en medios semisólidos, realizados con agar o Methocel (Paul, 1975). Shin y sus colaboradores demostraron una estrecha correlación entre la tumorigenicidad y la capacidad de crecimiento en medio semisólido con Methocel (Freedman y Shin, 1974; Kahn y Shin, 1979), varios autores en la actualidad utilizan esta metodología como rutina para estudiar la transformación de células formadoras de tumores (Costea *y col.*, 2008; Tirino *y col.*, 2009).

### **Inhibición de contacto**

La pérdida de inhibición por contacto puede detectarse morfológicamente por la formación de una monocapa celular desorganizada o por formación de focos de crecimiento de células en multicapa, sin respetar las restricciones de densidad impuesta por el contacto con células vecinas, por ejemplo los cultivos de glioma humano muestran un patrón de crecimiento desordenado y una reducida limitación de crecimiento alcanzando mayores

densidades celulares por unidad de superficie, comparados con las células gliales (Freshney *y col.*, 1980; Walton *y col.*, 2009).

### **Dependencia de suero**

Las células transformadas tienen una menor dependencia de factores de crecimiento con respecto a células normales (Eagle *y col.*, 1970; Paul *y col.*, 1974) debido en parte, a la producción de factores de crecimiento autócrinos como acontece en la mayoría de los tumores malignos. Como ejemplo podemos citar al factor de crecimiento fibroblástico (Szuster y Kosz-Vnenchak, 2005) y varios de los factores de crecimiento hematopoyéticos, tales como las interleuquinas (Fontana *y col.*, 1984; Sato *y col.*, 2011; Escudero-Lourdes *y col.*, 2012); factor estimulante de la colonia (Metcalf, 1990; Toy *y col.*, 2009) y el factor derivado de las plaquetas (Shimozato *y col.*, 1996; Majumdar *y col.*, 2009).

#### **1.2.2.2.3. Tumorigenicidad**

La tumorigenicidad implica la capacidad de las células para generar tumores invasivos cuando son implantadas *in vivo* en un hospedador de la especie de origen o si son trasplantadas como un injerto foráneo en un animal inmunodeprimido. Los ratones “desnudos” (genéticamente atímicos) o ratones timectizados han sido utilizados frecuentemente como bioensayos de tumorigenicidad hasta la actualidad (Giovanella *y col.*, 1974; Selby *y col.*, 1980; Zalatnai *y col.*, 1999; Jenkins *y col.*, 2005; Tokar *y col.*, 2010).

## **Angiogénesis**

Esta característica está asociada directamente a la tumorigenicidad y es la capacidad de estimular el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos en el contorno del tumor (Zhu *y col.*, 2002). Las células tumorales liberan señales químicas que estimulan el crecimiento de las células endoteliales cercanas; esta estrategia les permite recibir un mayor caudal de nutrientes necesarios para la alta actividad biosintética presente en ellas (Zhu *y col.*, 2002). Algunos factores angiogénicos capaces de inducir vascularización son: el VEGF (Joukov *y col.*, 1997; Tong *y col.*, 2008), el FGF-2 (Graeven *y col.*, 2001) y la angiogenina (Hu *y col.*, 1997; Tello-Montoliu *y col.*, 2006). Existen una gran variedad de bioensayos para poder evaluar la capacidad angiogénica de las células tumorales, entre los más utilizados se encuentran el ensayo de membrana corioalantoidea, el de angiogénesis en córnea, o el de cámara donde quirúrgicamente se produce un espacio subcutáneo en la piel de ratones donde se introducen las células a estudiar, entre otros (Staton *y col.*, 2004).

## **Oncogenes y genes supresores de tumor**

La tumorigenicidad está asociada a la alteración de protooncogenes. La mayoría de éstos codifican proteínas involucradas en el crecimiento y la división celular (Watson *y col.*, 2007). La transformación de estos protooncogenes a oncogenes induce a la célula a entrar en división sin presencia de señales externas (Watson *y col.*, 2007).

Algunos oncogenes codifican factores de crecimiento, como por ejemplo el oncogen *sis*. Este fue identificado a partir de un retrovirus de mono, y codifica una proteína similar al PDGF, un potente factor mitogénico (Deuel *y col.*, 1987). Las células infectadas con este oncogen exhiben un fenotipo de célula transformada (Deuel *y col.*, 1987).

Otros protooncogenes codifican para receptores de factores de crecimiento (Watson *y col.*, 2007). Estos son altamente específicos y poseen propiedades tirosina-quinasa. Las versiones oncogénicas de ellos son receptores “excitados” permanentemente, es decir, estos transmiten señales aún sin ser estimulados por un factor de crecimiento. Un ejemplo lo constituye el gen *erbB* que codifica una forma alterada del receptor para EGF, donde todo el dominio extracelular está ausente (Elliott *y col.*, 2008). Este receptor truncado actúa como si estuviera unido a su ligando, produciendo una estimulación constante.

Por último algunos protooncogenes actúan como factores de la transcripción (Watson *y col.*, 2007). Genes como *c-fos*, *c-myc* y *c-rel* se expresan en niveles basales en células quiescentes, pero son activamente transcritos en respuesta a señales mitogénicas. La activación de estos oncogenes desregula la expresión de los genes que están bajo sus controles. El *c-myc* es un gen ubicado en el brazo largo del cromosoma 8 en los humanos (8q24) (Hoffman *y col.*, 2002), posee un sitio de integración de varios provirus y también es un sitio con una alta tasa de translocación donde están involucradas algunos tipos de aberraciones cromosómicas como las descritas anteriormente en el linfoma de

Burkitt (ver sección 1.2.2.2.1), ambos procesos incrementan la expresión de este gen o permiten su expresión en momentos inadecuados.

El papel que cumplen los oncogenes en la génesis tumoral es aumentar o alterar la actividad del producto del gen que conduce a una desregulación positiva de la división celular, éste posee un fenotipo dominante sobre sus protooncogenes alélicos (Watson *y col.*, 2007). La génesis tumoral, en este caso se debe a una ganancia de función. Asimismo, otra forma de llegar a la misma es a través de la pérdida de ambos alelos en un *locus*, provocando la disrupción de los mecanismos normales de control negativo de la proliferación celular por la pérdida de función (Watson *y col.*, 2007). Estos identifican a los genes supresores de tumores, genes cuyos productos se necesitan para el funcionamiento normal de la célula y que imponen algún tipo de restricción en el ciclo celular. Uno de los ejemplos mejor descritos es *TP53* (Lewin, 2001).

Más de la mitad de los cánceres humanos han perdido o presentan mutaciones en el gen *TP53* (Watson *y col.*, 2007). El producto de este gen es una fosfoproteína tetramérica nuclear, más específicamente un factor de transcripción que desarrolla diversas actividades moleculares. La proteína *TP53* activa varios procesos, los que pueden dividirse en tres grupos principales (Lewin, 2001). La primera vía determina la activación de *p21*, el cual es un inhibidor del ciclo celular que evita que las células continúen a través de  $G_1$ . En la segunda vía, la activación de *GADD45* identifica el proceso relacionado con el mantenimiento de la estabilidad del genoma, siendo el producto de su expresión una proteína de reparación del ADN. La tercer vía es aquella que

conduce a una célula a iniciar la apoptosis (Lewin, 2001). La pérdida de actividad de la TP53 implica la desregulación de las tres vías mencionadas, otorgando ventajas adaptativas para el crecimiento celular desregulado (Levine, 1997).

### **Invasividad, migración celular y enzimas proteolíticas**

El proceso de metástasis celular consiste en una serie de pasos secuenciales interrelacionados que implican la angiogénesis, invasión local, intravasación, tránsito en la sangre o linfa, extravasación y formación de metástasis en órganos distantes (Lester y McCarthy, 1992; Woodhouse *y col.*, 1997). Muchos de estos pasos requieren de la migración celular, lo cual permite a las células cambiar de ubicación dentro de los tejidos. Los mecanismos de migración que las células transformadas utilizan para colonizar otros tejidos son similares a los utilizados por células normales durante procesos fisiológicos como la morfogénesis embrionaria, respuestas inflamatorias, cicatrización y angiogénesis (Friedl *y col.*, 1998). La reorganización del citoesqueleto de actina es el mecanismo principal de motilidad celular y es esencial para la mayoría de los tipos de migración (Schmidt y Hall, 1998). Durante la misma, los microfilamentos de actina son dinámicamente remodelados, lo que produce la fuerza necesaria para el movimiento de las células (Pollard y Borisy, 2003).

En un cultivo celular las células que proliferan van ocupando el sustrato vacío, migran y establecen contactos con sus vecinas, cumpliendo con el proceso antes mencionado como así también interactuando con las cargas que

les ofrece el sustrato, el cual resulta más oportuno cuando prevalecen las cargas positivas (Freshney, 2005). Cuando una célula queda rodeada por otras, deja de dividirse y pierde su motilidad, este fenómeno se denomina inhibición por contacto (Freshney, 2005). El mismo ocurre en todas las células en cultivo, por lo que terminan formando una monocapa celular. Las células transformadas no experimentan esta clase de inhibición por contacto, debido a las alteraciones de membrana que suelen demostrar, y continúan dividiéndose y migrando, apilándose unas sobre otras hasta formar multicapas celulares (Freshney, 2005).

Otra característica importante para la invasión es el aumento en la producción de enzimas proteolíticas (metaloproteasas, serinoproteasas, cisteínoproteasas y aspartilproteasas) que les permiten *in vivo* atravesar las barreras biológicas como la membrana basal producida por los epitelios (Liotta, 1987). Dichas enzimas han adquirido un gran interés en fisiopatología tumoral debido a su papel potencial en la degradación de los principales componentes de las matrices extracelulares permitiendo de esta forma la invasión tumoral y la metástasis (Liotta, 1987). Uno de los ejemplos de enzimas fuertemente ligado a la migración e invasividad son las metaloproteinasas como por ejemplo las MMP-2 y MMP-9 (Wilson *y col.*, 2002). El principal sustrato de ambas es el colágeno tipo IV propio de las láminas basales de los epitelios, por lo que la expresión tumoral de estas enzimas ha sido relacionado con el potencial metastásico de las células cancerosas (Cupić *y col.*, 2011). Otro ejemplo de enzima ampliamente estudiado es el activador del plasminógeno denominada uroquinasa (uPA) (Duffy, 2004). Constituye un complejo sistema de cascada

proteolítica, asociado a otros sistemas enzimáticos, participando en la degradación de la matriz extracelular durante los procesos de remodelación tisular durante la embriogénesis normal y en condiciones patológicas, incluyendo la invasión tumoral (Danø *y col.*, 1985; Saksela y Rifkin, 1988). La principal función de la uPA es convertir el plasminógeno en plasmina. Esta última, actúa como proteinasa neutra de amplia especificidad, tiene la capacidad de unirse a diferentes receptores de la superficie de las células tumorales y desarrolla una amplia actividad fibrinolítica capaz de catalizar la degradación de diferentes componentes de la matriz extracelular favoreciendo así la metástasis (Miles y Plow, 1988; Annecke *y col.*, 2008; Ulisse *y col.*, 2009).

### **1.2.3. Cultivos de conejo neozelandés**

El conejo neozelandés es una especie de gran interés tanto para la producción pecuaria, como en la investigación científica. El conejo como modelo biológico está presente en la investigación de varias patologías del orden humano entre las que podemos mencionar la aterosclerosis e hipercolesterolemia (Van Zutphen y Fox, 1977), cáncer ocasionado por infección por el virus del papiloma humano, entre otros (Campo, 2002). Además es un modelo de elección de un sin número de protocolos utilizados en las normas internacionales validadas para el control del material biomédico (<http://www.iso.org/iso/home.htm>). Asimismo, las líneas celulares derivadas de conejo y cultivos de células de embriones totales son utilizadas en la producción de vacunas (lapinizadas) de uso veterinario y médico, como la peste

porcina y la fiebre aftosa (<http://www.rr-americas.oie.int/in/proyectos/Camevet/fichas/biologicos/5PPORCINACLASICA.htm>).

A pesar de constituirse en una especie de elección en el laboratorio no se halla demasiada información respecto a las modificaciones bioquímicas acontecidas durante el mantenimiento o el cultivo de células provenientes de conejo neozelandés. La información científica existente en la actualidad es escasa respecto a dicha temática. Autores como Puck y col. (1966), Bianchi y col. (1975) y Yang y Rosanoff (1977) intentaron dar respuesta a algunos de los interrogantes ocurridos en la transformación de células de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) durante su mantenimiento *in vitro*. Los trabajos realizados por estos autores presentan coincidencias respecto al aumento en el número cromosómico dado principalmente por la existencia de una trisomía en uno de los cromosomas telocéntricos de la especie. Esta fue adjudicada a distintos pares del complemento, posiblemente debido a que Puck y Bianchi no utilizaron técnicas de bandas cromosómicas, una herramienta fundamental para discernir el origen de estos cromosomas.

Estas investigaciones preliminares motivaron la realización del presente plan de Tesis Doctoral. El propósito de la misma es incorporar nuevas formas de abordaje científico que permitan alcanzar una mayor profundización en el conocimiento sustantivo respecto de las modificaciones que acontecen durante la transformación celular en el presente modelo de estudio.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1. Hipótesis

En los cultivos celulares provenientes de células fetales de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) el evento inicial en la transformación celular *in vitro* es la heteroploidía.

### 2.2. Objetivo

El objetivo general de la siguiente Tesis Doctoral es enunciar nuevos conocimientos en el campo de la Biología Celular y Molecular vinculados con la transformación celular *in vitro* acontecida en cultivos celulares provenientes de células fetales de conejo (*Oryctolagus cuniculus*).

#### 2.2.1. Objetivos específicos

1. Establecer líneas celulares a partir de cultivos primarios de diferentes tejidos de fetos de conejos neozelandeses.
2. Analizar mediante el empleo de técnicas citogenéticas convencionales y de bandas cromosómicas diferentes subcultivos celulares de la línea celular JPCS<sub>1</sub>.
3. Determinar el tiempo de duplicación poblacional en diferentes subcultivos de la línea JPCS<sub>1</sub>.

4. Analizar la dependencia de factores séricos fetales como inductores del crecimiento celular en diferentes subcultivos de la línea JPCS<sub>1</sub>.
5. Estudiar la inestabilidad genética con marcadores de ADN microsatélite en diferentes subcultivos de la línea JPCS<sub>1</sub>.
6. Analizar la migración celular en diferentes subcultivos de la línea JPCS<sub>1</sub>.
7. Analizar el crecimiento independiente de anclaje en medio de cultivo semisólido en diferentes subcultivos de línea JPCS<sub>1</sub>.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIALES

##### 3.1.1. Compuestos empleados

Los compuestos empleados para el desarrollo de estas investigaciones se presentan en la Tabla 1.

Compuesto	CASRN / Número de catálogo	Origen
Ácido acético glacial	64-19-7	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.)
Acrilamida	M7279	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.)
Agar Noble	214220	BD Difco™ (Franklin Lakes, NJ, EE.UU.)
Azul de tripán	72-57-1	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.)
BrdUrd	59-14-3	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.)
Chelex® 100	142-1253	BioRad (Hercules, CA, EE.UU.)
Cloruro de potasio	7447-40-7	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.)
Colchicina	64-86-8	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.)
DMEM	12800-082	Gibco (Grand Island, NY, EE.UU.)
DMSO	67-68-5	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.)
dNTP Mix	18427-013	Invitrogen (Carlsbad, CA, EE.UU.)
Estreptomycin	3810-74-0	Gibco (Grand Island, NY, EE.UU.)
Fluoresceína-12-dCTP	NEL424001EA	Perkin Elmer Life Science (Boston, MA, EE.UU.)
Giemsa	HX933732	Merck KgaA (Darmstadt, Alemania)
Ham F10	N6635	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.)
Hoescht 33258	23491-45-4	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.)
Na <sub>2</sub> EDTA	E4884	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.)
Metanol	K39504909	Merck KgaA (Darmstadt, Alemania)
Penicilina	69-57-8	Gibco (Grand Island, NY, EE.UU.)
Suero fetal bovino		Internegocios S.A. (Mercedes, Bs.As., Argentina)
Taq Polimersa	10342020	Invitrogen (Carlsbad, CA, EE.UU.)
Tripsina	T4799	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.)

**Tabla 1. Compuestos empleados.**

### **3.1.2. Cultivos primarios**

Para desarrollar el presente plan de Tesis Doctoral se utilizaron cultivos primarios obtenidos a partir de células de fetos de conejos neozelandeses (ver sección 3.2.1) en el laboratorio de la Cátedra de Citología de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo (UNLP).

### **3.1.3. Línea celular CHO-K1**

Se empleó la línea celular transformada CHO-K1 (ATCC® CCL-61), derivada de ovario de hámster chino adulto, proveniente de la American Type Culture Collection (Rockville, MD, EE.UU.).

## **3.2. MÉTODOS**

### **3.2.1. Establecimiento y mantenimiento de cultivos primarios**

#### **3.2.1.1. Inicio de los cultivos primarios**

Para las tareas de investigación se realizaron cultivos primarios a partir de células de embriones de conejos neozelandeses (*Oryctolagus cuniculus*), con un tiempo de gestación de 22-25 días. Con este propósito se adquirió una coneja preñada a la Cátedra de Introducción a la Producción Animal de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (UNLP). Esta Cátedra mantiene una producción de conejos con fines didácticos, experimentales y productivos (venta de carne). Consta de un plantel de 40 hembras alojadas en jaulas individuales para

madres, equipadas con nidos y la posibilidad de realizar lactancia controlada. Asimismo, cuenta con una zona de engorde de los animales destinados a faena. Los individuos reproductores son mantenidos con alimento balanceado y suplemento de heno de alfalfa. La edad de inicio reproductivo de los individuos destinados a ser reproductores depende del sexo. En el caso de las hembras es alcanzada a los 90 días de edad y deben presentar un peso mínimo de 2,7 Kg. En el caso de los machos es alcanzada entre los 4 a 5 meses de vida. Las condiciones de apareamiento constan de la monta natural frente a la presencia de celo realizándose con un manejo intensivo, esto implica que las hembras sean servidas nuevamente a los 4 días después del parto. La renovación de sangre se realiza mediante la compra de nuevos individuos machos según necesidad, con el fin de evitar la consanguinidad en la población. El tiempo de gestación de esta especie es de 31 días y al nacer presentan un peso entre 45 a 50 gr. Sobre el plantel de individuos reproductores se mantiene un calendario sanitario el cual consta de:

- Vacunación contra el virus de la mixomatosis (LaDiPreVet, La Plata, Buenos Aires, Argentina). Se realiza en primavera y puede realizarse una segunda vacunación si se extiende el período cálido.
- Vacunación contra el complejo respiratorio (LaDiPreVet, La Plata, Buenos Aires, Argentina). Se aplica únicamente a hembras con palpación positiva a los 15 días de gestación.
- Aplicación de coccidicida (Ruminal, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina) a los gazapos de destete con un promedio de 28 días de edad.

- Aplicación a los reproductores de albendazoles (Ruminal, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina) cada seis meses.
- Suplemento de diclazuril como coccidiostato (GEPISA, Pilar, Buenos Aires, Argentina) presente en el alimento balanceado.

Las células se obtuvieron mediante disgregación enzimática siguiendo la metodología descrita por Freshney con modificaciones menores (Freshney, 2005). Los embriones fueron procesados en condiciones de asepsia para obtener disecciones de distintos tejidos (piel, pulmón y riñón), las cuales se sometieron a digestión enzimática con tripsina 0,25% p/v durante 3 h a temperatura ambiente. Las células resultantes de este proceso se centrifugaron para retirar la enzima proteolítica y obtener un botón celular, el cual fue resuspendido en medio de cultivo completo según lo detallado en 4.1.3 y sembrado en frascos de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> de polipropileno (Falcon BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) e incubado en una estufa a 37 °C, con intercambio de CO<sub>2</sub> a una atmosfera del 5%. Las condiciones de mantenimiento de los cultivos celulares se detallan en la sección 3.1.3.

Se iniciaron cultivos primarios de piel de 4 fetos diferentes denominándose como: JPCS<sub>1</sub>, JPCS<sub>2</sub>, JPCS<sub>3</sub> y JPCS<sub>4</sub>, respectivamente. Paralelamente, se desarrollaron dos cultivos primarios adicionales, uno de riñón (denominado JPCR) y otro de pulmón (denominado JPCP), ambos provenientes de un conjunto de biopsias de órganos de 9 embriones.

En el presente Trabajo de Tesis Doctoral se utilizó el cultivo primario denominado JPCS<sub>1</sub> sobre el cual se realizaron todos los estudios incluidos en la misma.

### **3.2.1.2. Mantenimiento de la línea celular JPCS<sub>1</sub>**

La línea celular JPCS<sub>1</sub> se mantuvo desde su comienzo con medio de cultivo DMEM alto en glucosa, suplementado con el 10% v/v de suero bovino fetal, 10 µg/ml de estreptomicina, 100 unidades/ml de penicilina y cultivados a 37 °C con una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos fueron repicados una vez alcanzada la confluencia mediante la utilización de una solución de tripsina al 0,25% p/v y Na<sub>2</sub>EDTA a una concentración de 0,02 mM. Es dable aclarar que el rango de subcultivación utilizado durante toda la investigación fue de 1:2. Asimismo, todos los estudios presentados en este trabajo de Tesis se realizaron cada 5 subcultivos, entre el 5 al 25 y cada 10 subcultivos desde el 30 al 50.

Los experimentos fueron realizados usando las células en su fase de crecimiento exponencial. Se emplearon los mismos lotes de medio de cultivo y suero bovino fetal en todos los experimentos incluidos en el presente Trabajo de Tesis Doctoral.

Las células fueron congeladas desde el subcultivo 3 hasta el 50, cada 5 pasajes entre los subcultivos 3 al 30 y cada 10 pasajes entre los subcultivos 30 al 50. En todos los casos, DMSO al 10% v/v fue utilizado como criopreservante. El mantenimiento de las células congeladas se realizó en N<sub>2</sub> líquido.

### **3.2.2. Cultivo de la línea celular CHO-K1**

Las células CHO-K1 se cultivaron en medio Ham F10 suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino, 100 unidades/ml de penicilina y 10 µg/ml de estreptomicina, a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>.

Los experimentos fueron realizados usando las células en su fase de crecimiento exponencial y se emplearon los mismos lotes de medio de cultivo y suero.

### **3.2.3. Estudios citogenéticos**

#### **3.2.3.1. Obtención de preparados para los estudios citogenéticos**

La técnica utilizada para la realización de los estudios citogenético básicos fue la descrita por Rønne y col. con modificaciones menores (Rønne y Thust, 1983; Rønne, 1984, 1985). Los cultivos celulares en su fase de crecimiento exponencial fueron tratados con 30 µg/ml de BrdU y 60 µg/ml de Hoechst 33258 durante 6,5 h en las condiciones de cultivo descritas previamente. Durante las últimas 3 h del cultivo, las células fueron tratadas con 0,1 µg/ml de colchicina. Las células fueron separadas del sustrato mediante la utilización de una solución de tripsina (sección 3.1.3) y cosechadas por centrifugación. Posteriormente, fueron sometidas a un tratamiento hipotónico (0,075 M KCl, 37 °C, 15 min) y, por último, fijadas con metanol-ácido acético 3:1.

Los extendidos cromosómicos se realizaron de acuerdo a la técnica citogenética convencional de secado al aire.

### **3.2.3.2. Bandas cromosómicas de duplicación tardía**

Para poner en evidencia las bandas de los cromosomas metafásicos, los preparados obtenidos en la sección 3.2.3.1 se procesaron de acuerdo a un método combinado de fluorocromo-Giemsa (Korenberg y Freedlender, 1974; Perry y Wolff, 1974). Los extendidos celulares se trataron con 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Hoechst 33258 en solución tampón de fosfatos a temperatura ambiente (0,1 M; pH 6,8; 20 min). Posteriormente, los preparados fueron montados en la misma solución tampón y fueron expuestos a luz fluorescente emitida por una lámpara fluorescente de 15 W de potencia durante 1 h. Finalizada la etapa de exposición lumínica, las preparaciones fueron lavadas con agua destilada y secadas a temperatura ambiente. Seguidamente, las preparaciones fueron incubadas en una solución 1 M de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 8,2; 88 °C; 8 min), lavadas con agua destilada y, por último, coloreadas con solución acuosa de Giemsa al 3% durante 12 min.

### **3.2.3.3. Análisis de la frecuencia del número cromosómico**

A partir de los preparados obtenidos en la sección 3.2.3.1 y procesados en la sección 3.2.3.2, se realizó el recuento del número cromosómico en un total de 200 metafases por punto experimental. El conteo se llevó a cabo con un microscopio BX50 (Olympus Corporation, Tokyo, Japón), con una magnificación total de 1000X.

Para la selección de las metafases que fueron contadas, se adoptaron los siguientes criterios de selección:

- 1) Se eligieron metafases convenientemente aisladas, para evitar mezclar los cromosomas de dos células contiguas.
- 2) Se descartaron metafases que no presentaron los cromosomas dispersos de forma circular, con el fin de evitar obtener un menor número cromosómico debido a pérdida durante la obtención de los preparados.
- 3) Se obviaron las metafases con un gran número de cromosomas sobrepuestos, para lograr una fácil individualización de los mismos.

Se estableció el número modal y la distribución de la frecuencia del número cromosómico.

#### **3.2.3.4. Análisis del cariotipo**

La especie *Oryctolagus cuniculus* motivo de la presente Tesis Doctoral posee un número diploide de cromosomas  $2n=44$  (Painter, 1926). El criterio de clasificación que se siguió para el análisis de los cariotipos fue el descrito por Ford y col. (1980). Según el mismo, la especie en cuestión presenta 21 pares de cromosomas autosómicos y un par sexual XX/XY. Los cromosomas autosómicos se clasifican en 4 grupos: metacéntricos (cromosomas 1 a 6), submetacéntricos (cromosomas 7 a 11), acrocéntricos (cromosomas 12 al 17) y por último

telocéntricos (cromosomas 18 al 21). En la figura 3 se presenta un cariotipo de conejo macho normal.

A partir de los preparados obtenidos en la sección 3.2.3.1 y procesados en la sección 3.2.3.2, se realizó el análisis del cariotipo en los subcultivos previamente mencionados. Por cada punto experimental se obtuvieron fotografías de metafases elegidas de forma aleatoria, respetando el criterio adoptado en la sección 3.2.3.3, mediante una cámara DP71 (Olympus Corporation, Tokyo, Japón) anexada a un microscopio BX50 (Olympus Corporation, Tokyo, Japón). Se realizó el análisis del cariotipo en un total de 20 metafases por cada punto experimental con el empleo del programa de computación caryoTIPE-PLUS 2.2 (Bioanalítica S.A., Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina).

Fueron analizadas las variaciones de la frecuencia de aparición de cada tipo cromosómico en la línea celular JPCS<sub>1</sub>, con el objeto de determinar si las mismas siguen un patrón al azar o específico. Fue utilizado el modelo propuesto anteriormente por Bianchi y col. (1977). En el conejo ( $2n=44$ ) cada par de cromosomas homólogos representa  $1/22$  (4,54 %) del total de cromosomas del conjunto haploide. Este porcentaje se mantiene sin modificaciones en los casos de aumento del número cromosómico por ploidía. Por otra parte, en una aneuploidía el porcentaje se modifica, pudiendo el mismo aumentar por ganancia (trisomía, tetrasomía) o disminuir por pérdida (monosomía, nulisomía) de cromosomas. Si las modificaciones en el porcentaje son al azar e involucran a

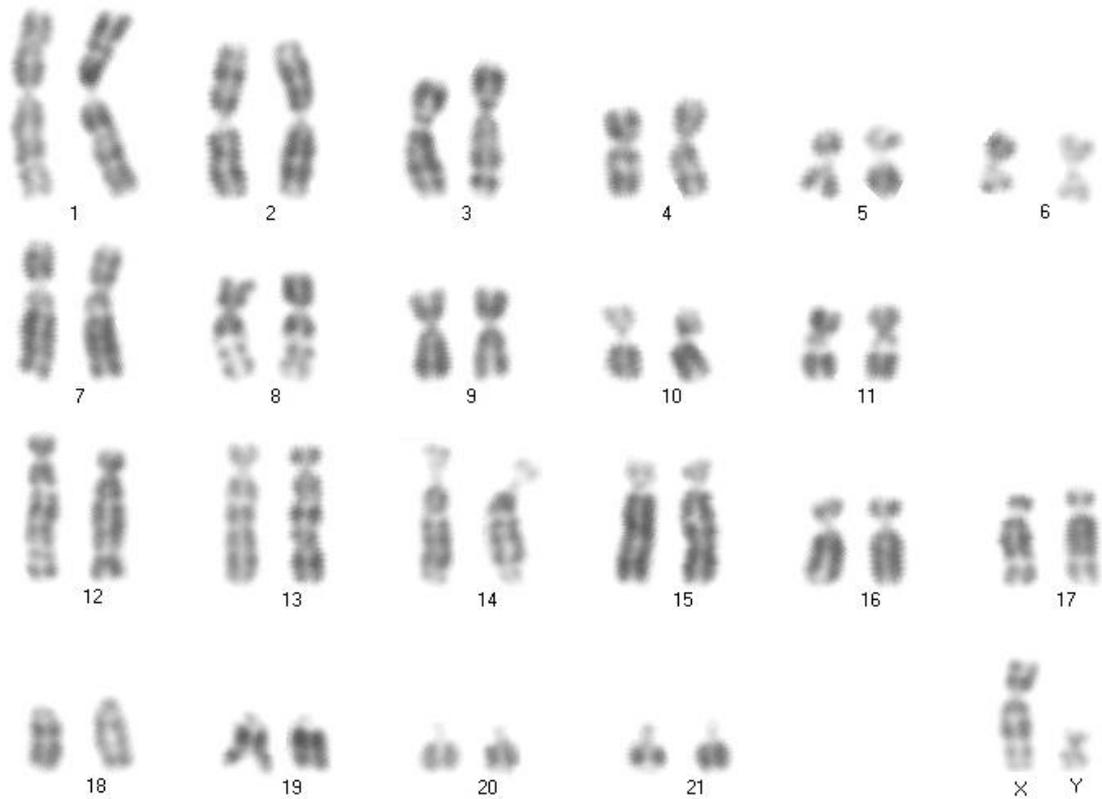


Fig. 3. Cariotipo de conejo macho normal (44,XY).

par de homólogos con la misma frecuencia, el promedio del mismo en un número elevado de células aneuploides será cercano a 4,54% a medida que se incrementa la muestra. En cambio, si las modificaciones son específicas se observará que algunos tipos cromosómicos aparecen con una frecuencia francamente superior o inferior al 4,54 %, dependiendo de la aneuploidía involucrada. En este caso, dichas alteraciones se mantienen independientes del número de células analizadas. Para esta tarea, se restaron los cromosomas marcadores de la suma total de cromosomas estudiados en cada uno de los subcultivos. Luego, se obtuvo el promedio y el intervalo de confianza del 95% individualmente para cada tipo cromosómico identificado en 20 metafases de cada subcultivo estudiado. La comparación entre los valores de las frecuencias

obtenidas y esperadas para cada tipo cromosómico individual se realizó mediante un gráfico de coordenadas cartesianas. En el mismo se representó el número del tipo cromosómico (abscisa) y la frecuencia de aparición de los cromosomas (ordenada).

### **3.2.4. Estudios de microsatélites**

#### **3.2.4.1. Extracción de ADN**

Se extrajo ADN a partir de células de los subcultivos citados previamente utilizando Chelex® 100, siguiendo la técnica descrita por Walsh y col. (1991). Se diluyeron 50 µl de una suspensión celular de cada subcultivo estudiado con 1 ml de agua destilada en tubos de 1,5 ml, y se agitó durante 30 min. Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm (SANYO, San Diego, CA, EE.UU.) durante 5 min. Se descartó el sobrenadante, y los productos obtenidos fueron resuspendidos con 200 µl de una solución de Chelex® 5% p/v en agua destilada. Posteriormente, fueron incubadas a 56 °C durante un período de 30 min. Luego, las mismas fueron sometidas a 98 °C durante 8 min. Por último, se realizó una centrifugación a 1000 rpm (SANYO, San Diego, CA, EE.UU.) durante 5 min con el fin de separar las resinas de Chelex® de los sobrenadantes. Finalmente, estos últimos fueron trasegados a nuevos tubos de 0,5 ml y almacenados a 4 °C.

#### **3.2.4.2. Análisis de microsatélites**

Se analizaron 16 microsatélites elegidos a partir de datos publicados en la literatura por Chantry-Darmon y col. (2006). Los microsatélites empleados en el presente Trabajo de Tesis Doctoral se encuentran detallados en la Tabla 2. Los criterios considerados para la elección de los mismos fueron los siguientes: a) poseer secuencias dinucleotídicas y b) estar distribuidos en distintos cromosomas del complemento del conejo neozelandés.

Las reacciones de PCR se realizaron a un volumen final de 15  $\mu$ l en tubos de PCR de 0,2 ml, conteniendo 10 ng de ADN genómico, 1 X del medio de reacción, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 0,025 U/ $\mu$ l de polimerasa Taq, 1  $\mu$ M de cebador (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Luego del primer paso de desnaturalización a 94 °C durante 2 min se realizaron 32 ciclos de amplificación (94 °C por 30 seg, 30 seg a la temperatura de templado y 72 °C durante 30 seg). Asimismo, se llevó a cabo un paso de extensión final de 1 h a 60 °C. Todas las reacciones de PCR se amplificaron en un termociclador Evo-02 (MPI, La Plata, Bs.As., Argentina). Los productos fueron analizados en geles de poliacrilamida al 6% en condiciones desnaturalizantes.

Finalmente, 5 de los microsatélites (INRACCDDV0203, INRACCDDV0317, INRACCDDV0061, INRACCDDV0007 e INRACCDDV0014) fueron amplificados agregando a las reacciones de PCR Fluoresceína-12-dCTP a una concentración de 2  $\mu$ M. Luego, los amplificados se examinaron mediante electroforesis capilar en un analizador genético ABI 3130 (Applied Biosystems, Forest City, CA, EE.UU.).

Tabla 2. Características de los microsátélites empleados en las experiencias.

Nombre	Localización	Repetición	Cebador directo	Cebador inverso	Tamaño (pb)
INRACDDV0327	1q21.1	(AG)21	GCCCGTCAAGAGAAACACAT	CTGGGAGTAAACCAGTGA	260
INRACDDV0192	2p21.3	(TG)11	TGCAATAGGTGGAGGCTTAGA	TCCACAGAGGAGATATAGTGGTCTT	96
INRACDDV0203	3q22-q23	(GT)16	GATCCAGTCATGGTGTGTGTG	TAGGGCTGGGTTTTTATCTGG	184
INRACDDV0065	4q14-q15	(CT)13	GACCCAGCAGATGGGAGA	TGCAAAAGAAACCCTTATTGAACATC	99
INRACDDV0317	8p12.3	(AG)10	GGCCTTATCCCTATGCCAGT	GTCCAGCTCCCATCATTTGTG	240
INRACDDV0061	10p12	(CA)12	CCCTGGTGTGAACCTTTGT	CGACACAGCTACAGTCCA	152
INRACDDV0318	12q15	(AC)18	TGCACCAATATGTGGTTGTCC	AGATGGAGTTCCTGGCTCCT	251
INRACDDV0335	14q13	(GA)17	CAGGGGAGAGAGAAACAGA	CTCTGCTATGGCCTGGAAG	241
INRACDDV0044	15q23	(AG)11	TTTTCAITGAACAAGCTTTGG	CTGCCCTCCCTATTCTTTCC	252
INRACDDV0003	16q21	(CT)14	GATCAGCGAGCGCCTCTC	TCCATCTG AATGAGGCACAA	225
INRACDDV0063	18q31	(GT)14	GCAGTGTGCCTATGCTTGAA	CCACTCCACCCTATTACCCTG	95
INRACDDV0007	5q12	(CA)15	CTGCTAGCTCTGGGTGGAAG	TGTGTGACCTTTGTGGCCTTA	203
INRACDDV0219	6p12-p13	(CT)13	GGGGAGTGAAACCAGCAGAT	ATGCAGCCATCCTGACACTT	147
INRACDDV0163	7p21-p12	(AC)14	AGGTGCTCCCAGACAGCTTTA	CCTCCCCAAGTCTTTTCCCTAGA	119
INRACDDV0086	11q13	(TC)10	AGCTCCTGGCTTCTTTGCTTT	ATGGGATGCCAGTGCCTTTAG	159
INRACDDV0014	13q31-q32	(GT)9	ATAAGCCITCCC AAAATTGCAG	TGAGCAGCTCTGGTAGAGGTT	193
INRACDDV0208	16q13.1	(CT)9	GTGAAACCAGCAGATGGAAGG	CATCACAGGTGGTCTTTTTT	119
INRACDDV0172	17q21	(AC)14	ATTGTCCAAAACATGCTCGTG	TTCCACTGAGAAAAGCGTGAGT	86
INRACDDV0234	19q12.3	(AG)8	TGGTCTTG AATGGAAACTCC	AGTGAAACCAGTGGATGGAAGA	119
INRACDDV0232	Xp15	(TC)12	ATCATGGGTATTGGGGAGTG	AGCCAGAAAGACAGACACAGG	131

### 3.2.5. Estudio de la curva de crecimiento celular

### **3.2.5.1. Realización de la curva de crecimiento celular**

La técnica utilizada para realizar las curvas de crecimiento fue la descrita por Fan y col. con modificaciones menores (2009). Al llegar a la fase final del crecimiento exponencial, las células fueron separadas del sustrato mediante la utilización de una solución de tripsina (sección 3.2.1.2) y resuspendidas en medio de cultivo completo. Luego, se sembraron  $2,7 \times 10^4$  células /cm<sup>2</sup> en placas de cultivo de 35 mm de diámetro (Falcon BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) con un volumen final de 3 ml. El medio fue reemplazado cada 2 días para garantizar que la detención del crecimiento fuera producida por la confluencia celular y no por la carencia de nutrientes. Posteriormente, se contó el número de células por placa cada 24 h durante 9 días mediante la técnica de coloración supravital de azul de tripán (Freshney, 2005).

Al menos tres experimentos independientes fueron realizados por cada subcultivo estudiado. Los resultados se expresaron como el promedio del número de células por día de conteo y por subcultivo analizado, graficados en un sistema de coordenadas cartesianas registrando el promedio del número de células (ordenada) en función del tiempo de cultivo (abscisas).

### **3.2.5.2. Análisis de la curva de crecimiento celular**

De los datos obtenidos en la sección 3.2.5.1 se calculó el tiempo de duplicación poblacional, y la densidad limitante de la proliferación celular para cada subcultivo estudiado.

A partir de la fase exponencial de la curva de crecimiento se calculó tanto el tiempo de duplicación poblacional, utilizándose los valores del número de células para los días 1 al 4 de las 3 réplicas realizadas. El cálculo de los estimadores se realizó mediante el ajuste de mínimos cuadrados para una curva exponencial, con la ayuda del programa de computación desarrollado por Roth (2006). Los resultados se expresaron como el promedio del tiempo de duplicación poblacional expresado en horas para cada subcultivo analizado.

El cálculo de la densidad limitante de la proliferación celular se realizó a partir de la concentración máxima de células que alcanzan los cultivos celulares de la línea celular JPCS<sub>1</sub> en la fase estacionaria de la curva de crecimiento. Para tal fin se utilizaron los valores del día 9 de la experiencia explicitada en la sección 3.2.3.1. Los resultados se expresaron como los promedios del número de células para cada uno de los subcultivos analizados.

### **3.2.6. Ensayo de crecimiento con independencia de suero**

#### **3.2.6.1. Realización de las curvas de crecimiento con independencia de suero**

La técnica utilizada para realizar las curvas de crecimiento con independencia de suero fue la descrita por Takenaka y col. (2003) con modificaciones menores. En la etapa final del crecimiento exponencial, las células fueron separadas del sustrato mediante la utilización de una solución de tripsina (sección 3.2.1.2) y resuspendidas en medio de cultivo completo. Se

sembraron alícuotas de células a concentraciones de  $2,7 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en placas de cultivo de 24 pozos (Falcon BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.), en un volumen final de 1 ml por pozo, con medio completo para permitir la adherencia al sustrato. Luego de 24 h de cultivo, se reemplazó el medio por otro con concentraciones crecientes de suero bovino fetal siendo las mismas 0; 1,25; 2,5; 5 y 10% v/v, el medio fue reemplazado cada 48 h. Se realizó el recuento de células por pozo mediante la técnica de coloración supravital de azul de tripán. Luego de 7 días de mantenimiento en las condiciones previamente descriptas. Al menos tres experimentos independientes fueron realizados por cada subcultivo estudiado. Los resultados se expresaron como el promedio del número de células por concentración de suero y por subcultivo analizado, graficados en un sistema de coordenadas cartesianas registrando el promedio del número de células (ordenada) en función de la concentración de suero (abscisas).

### **3.2.6.2. Análisis de las curvas de crecimiento con independencia de suero**

Para el análisis de la curva de crecimiento con independencia de suero los datos fueron transformados mediante la raíz cuadrada, y se calculó la pendiente de la recta y los límites de confianza inferior y superior a partir de un método de remuestreo (*bootstrap*) con 2000 replicados, mediante la ayuda de el programa de computación PAST desarrollado por Hammer y col. (2001).

### 3.2.7. Ensayo de crecimiento independiente de anclaje

Para realizar el ensayo de crecimiento independiente de anclaje, se utilizó la técnica convencional de clonado en medio semisólido descrita por Franken y col. (2006) con modificaciones menores. En la etapa final del crecimiento exponencial, las células fueron separadas del sustrato mediante la utilización de una solución de tripsina (sección 3.2.1.2) y resuspendidas en medio de cultivo completo. Se realizó una suspensión celular con una concentración de 1000 células/ml en medio de cultivo 2X suplementado con 20% v/v de suero bovino fetal. Luego, se mezclaron partes iguales de dicha suspensión y una solución precalentada a 40 °C de agar Noble 1% p/v en agua destilada, quedando así una concentración final de 500 células/ml en medio de cultivo 1X suplementado con 10% v/v de suero bovino fetal y una concentración 0,5% p/v de agar Noble. De esta última dilución se sembraron 2 ml en una placa de cultivo de 35 mm de diámetro (Falcon BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.), previamente cubierta con 1 ml de una solución de agar Noble al 1% p/v. Luego, las placas se introdujeron en una heladera a 4 °C durante 30 min para permitir la solidificación de la capa superior de agar Noble. Posteriormente, se incubaron a 37 °C durante 14 días en cámara húmeda con una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Por último, se realizó el recuento bajo microscopio de las colonias obtenidas mediante el uso de un microscopio CKX41 (Olympus Corporation, Tokyo, Japón), con una magnificación total de 40X. Para la identificación de las colonias formadas se estableció un criterio donde las

mismas debían tener un mínimo de 50 células, mostrando un diámetro promedio de colonia de 60  $\mu\text{m}$ .

Como control de la eficacia metodológica empleada se utilizó la línea celular CHO-K1. Se realizaron tres experimentos independientes por cada subcultivo estudiado. Los resultados se expresaron como el promedio del porcentaje de colonias formadas durante la experiencia. El mismo se calculó dividiendo el número de colonias formadas por placa por el número de células inoculadas inicialmente.

### **3.2.8. Ensayo de migración celular**

El ensayo de migración celular fue evaluado mediante la “técnica de la herida” descrita por Liang y col. (2007) con modificaciones menores. En la etapa final del crecimiento exponencial las células fueron separadas del sustrato mediante la utilización de una solución de tripsina (ver sección 3.2.1.2) y resuspendidas en medio de cultivo completo. Posteriormente, se sembraron  $2,7 \times 10^4$  células / $\text{cm}^2$  en placas de cultivo de 35 mm de diámetro (Falcon BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) con un volumen final de 3 ml y fueron incubadas a 37 °C, permitiendo a los cultivos alcanzar la confluencia. Una vez obtenida, se cambió el medio suplementado por medio carente de suero, permaneciendo en estas condiciones durante 24 h. Posteriormente, se procedió a realizar la herida con una punta plástica de una micropipeta mecánica de 200  $\mu\text{l}$ . Una vez realizada, se agregó un volumen de 3 ml de medio sin suero, considerándose este momento como el tiempo 0. Se realizaron capturas fotográficas a las 0 y a

las 12 h del ensayo en los mismos puntos experimentales mediante el uso de una cámara DC 100 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) anexada a un microscopio CKX41 (Olympus Corporation, Tokyo, Japón), la magnificación total para la obtención de las fotografías fue de 40X. La medición del área de la herida se realizó a partir de las fotografías mediante la ayuda del programa Designer 9 (Micrografx Inc., Richardson, TX, EE.UU.).

Se realizaron tres experimentos independientes por cada subcultivo estudiado. Los resultados se expresaron como el promedio de la resta del área entre las mediciones obtenidas de las fotos a las 0 (inicial) y 12 h (final) en cada punto experimental.

### **3.2.9. Análisis estadístico**

Se utilizó el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) para realizar las comparaciones estadísticas de los siguientes ensayos: tiempo de duplicación poblacional, pendiente de la curva de crecimiento, análisis de la densidad limitante de la proliferación celular y migración celular. Para probar la homogeneidad de las varianzas se utilizó la prueba de Levene y para corroborar la normalidad de los datos se utilizó la comparación gráfica de la distribución de los residuos. En caso de encontrar valores del ANOVA estadísticamente significativos se utilizó la prueba de Tukey como prueba *a posteriori*. En el caso del análisis del cariotipo se utilizó el ensayo de *Student* para una muestra, comparando independientemente cada población de cromosomas

con el número esperado de cromosomas para la especie para cada par de cromosomas homólogos de la especie.

El nivel de significación estadística utilizado fue siempre 0,05. El programa de computación usado para las comparaciones fue STATISTICA 6.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EE.UU.).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Estudios citogenéticos

#### 4.1.1. Evaluación de la frecuencia del número cromosómico

El número cromosómico fue evaluado en la línea celular JPCS<sub>1</sub> en los subcultivos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 y 50 (Fig. 4).

El número original de la especie de *Oryctolagus cuniculus* es de 44 cromosomas, el mismo se mantiene como número modal en los SCs 5, 10 y 15 con una frecuencia decreciente a lo largo de estos 3 SC de 96,3%, 84% y 45,33%, respectivamente. Asimismo se observa en estos mismos SC un aumento progresivo en la frecuencia de metafases hiperdiploides siendo la misma 0,93%, 9,33% y 49,33% en los SC 5, 10 y 15, respectivamente (Fig. 4).

A partir del SC 20 el número cromosómico modal cambia a la categoría de 45 cromosomas (55,19%), tendencia que refleja lo mencionado anteriormente entre los SC 5 a 15. El SC 25 mantiene este número modal con una frecuencia de 60,47%. En ambos SC la siguiente categoría en frecuencia es la de 46 cromosomas con valores del 20,78 y 24,19%, respectivamente (Fig. 4).

En el SC 30 el número cromosómico modal cambia nuevamente a la categoría de 46 cromosomas, manteniéndose hasta los últimos dos SC estudiados 40 y 50 con un aumento progresivo en las frecuencias desde un 50% para el SC 30 hasta un máximo 68,33% en el SC 50 (Fig. 4).

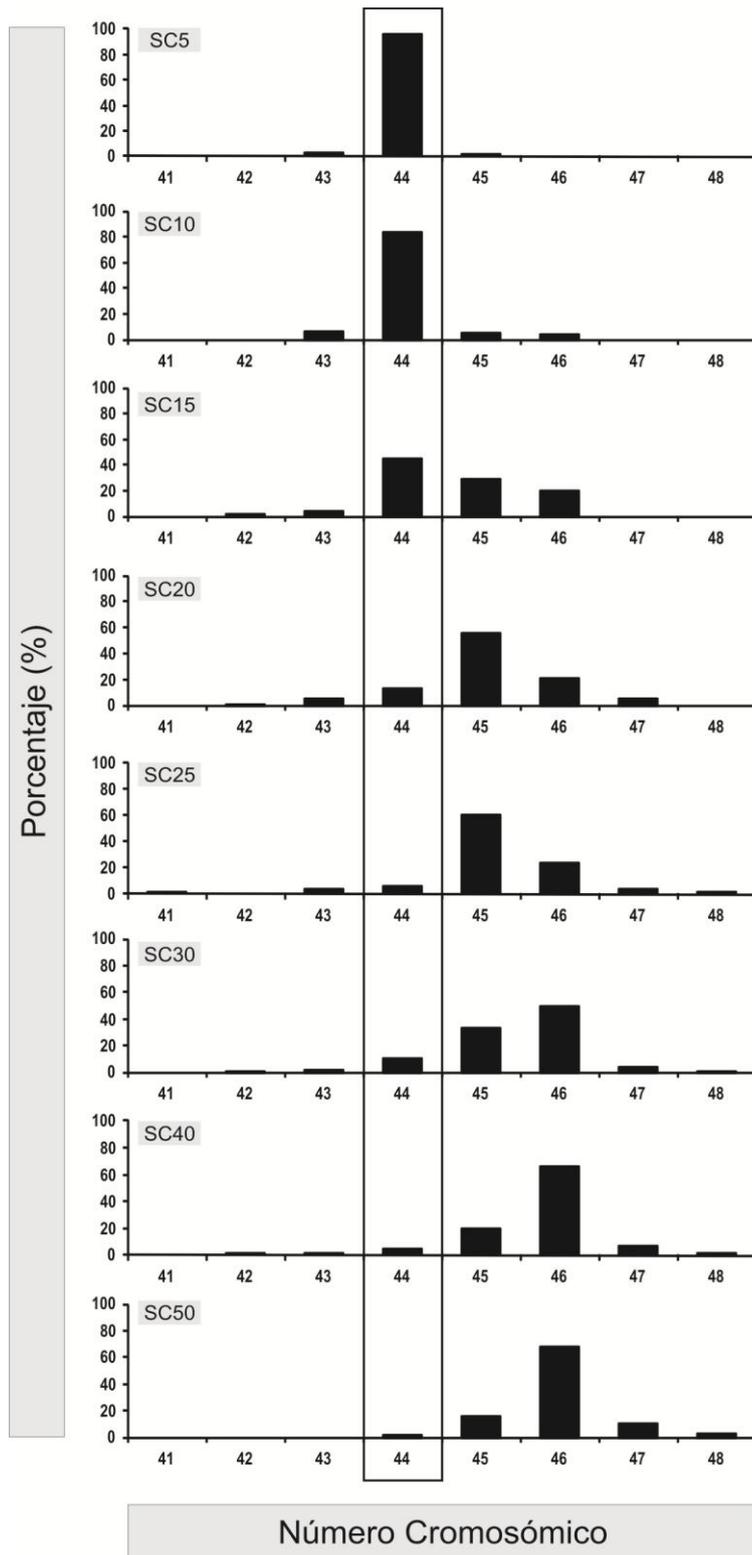


Fig. 4. Frecuencia del número cromosómico en la línea celular JPCS<sub>1</sub>. En el eje de las ordenadas se grafica el porcentaje del número cromosómico y en el eje de las abscisas se grafica el número cromosómico diploide. El recuadro enmarca el numero original de la especie ( $2n=44$ ) a partir de la que se origino el cultivo celular de *Oryctolagus cuniculus*.

Cabe destacar que los SC 15 y 30 son los que presentan los valores modales más bajos siendo 45,33 y 50% respectivamente y valores relativamente altos de las otras categorías del número cromosómico las cuales en sumatoria llegan al valor de la moda, indicando una etapa de transición muy marcada particularmente en estos dos SC mencionados. Por otra parte, los SC iniciales 5 y 10, y los finales 40 y 50 parecen tener cierta estabilidad dado que los valores que presentan sus modas son significativamente más altos que los de las otras categorías.

El porcentaje de células poliploides en todos los SC estudiados se mantuvo entre valores del 5 al 12% de las poblaciones celulares analizadas a lo largo de los SC estudiados (Fig. 5).

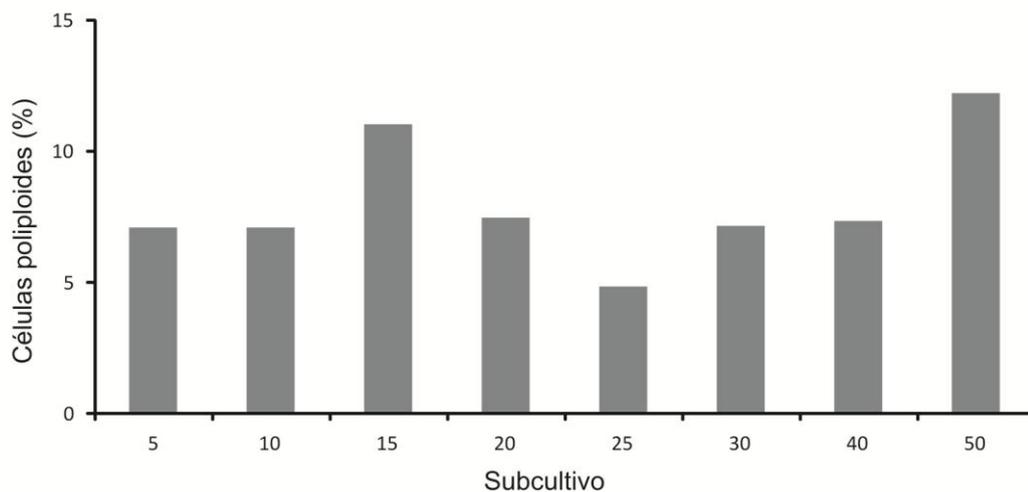
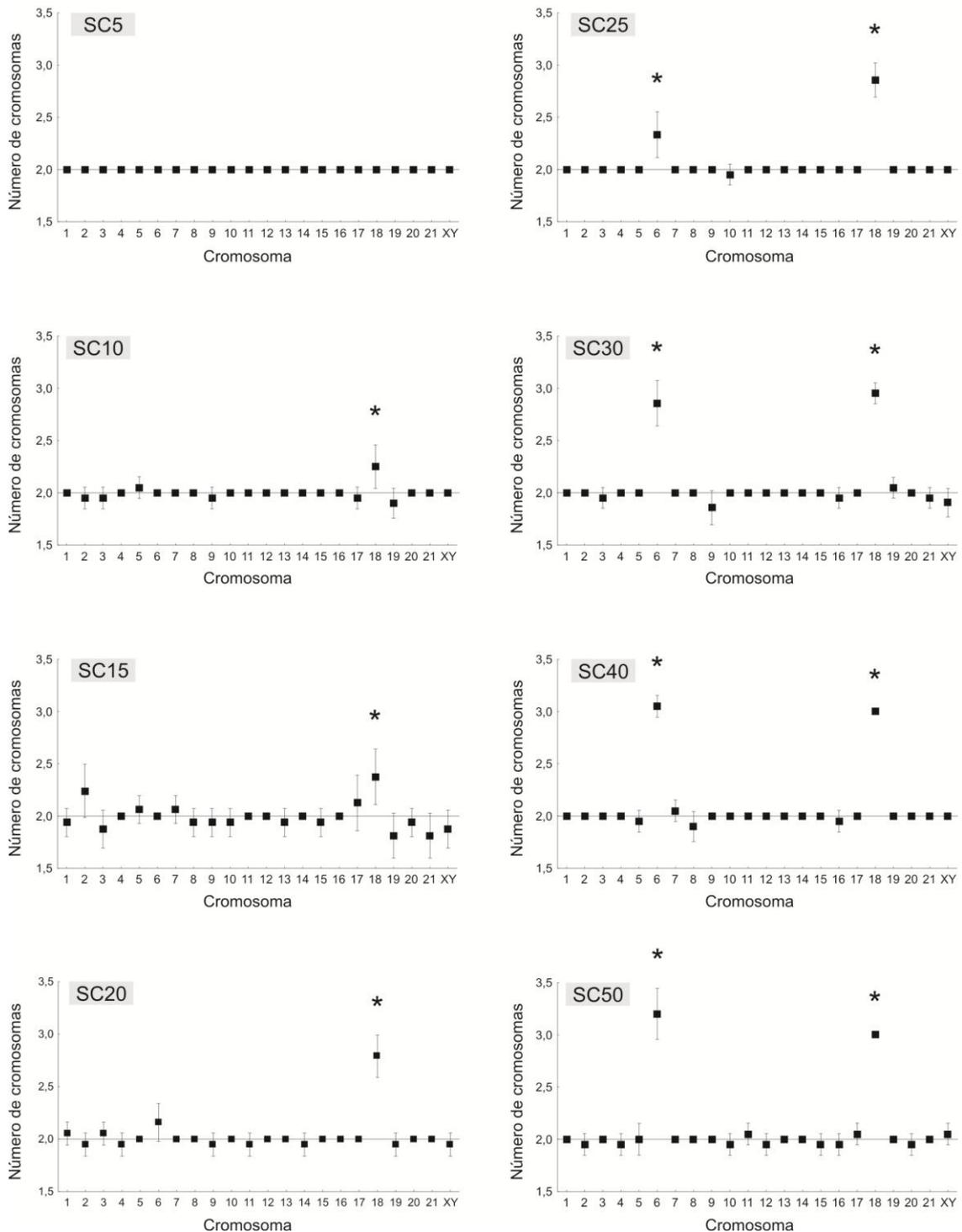


Fig. 5. Frecuencia de células poliploides en la línea celular JPCS<sub>1</sub>. En el eje de las ordenadas se grafica el porcentaje de células poliploides y en el de las abscisas se observan los subcultivos estudiados.

#### 4.1.2. Evaluación de la evolución del cariotipo

El cariotipo macho de la especie de *Oryctolagus cuniculus* es  $2n=44$ , XY conteniendo 21 pares de cromosomas autosómicos y un par sexual. Los cromosomas autosómicos se clasifican en 4 grupos: metacéntricos (cromosomas 1 a 6), submetacéntricos (cromosomas 7 a 11), acrocéntricos (cromosomas 12 al 17) y, por último, telocéntricos (cromosomas 18 al 21). En la figura 3 se presenta un cariotipo de conejo macho normal. De todos los SC analizados el único que presenta todas sus metafases sin modificaciones con respecto a las características mencionadas para el cariotipo de la especie es el SC 5 (Fig. 6). A partir del SC 10 comienzan a evidenciarse aneuploidías en distintos cromosomas. De estas, la trisomía en el cromosoma 18 es la que se da con una frecuencia relativamente alta (20% en el total de las metafases estudiadas) y la media del número de cromosomas para este SC difiere significativamente del valor de referencia ( $P<0,05$ ; Fig. 6). Este patrón específico de aneuploidía se mantiene hasta el SC 50. Asimismo, se observan algunas aneuploidías con un comportamiento estocástico como las monosomías en los cromosomas 2, 3, 9, 17 y 19; y una trisomía en el cromosoma 5 únicamente.

El SC 15 está caracterizado por presentar un mayor índice de aneuploidías (Fig. 6) dado por la gran dispersión que existe en la mayoría de los cromosomas. Los únicos cromosomas que no se ven afectados por aneuploidías son los cromosomas 11 y 12. Al igual que en el SC10, las aneuploidías que tienen un patrón específico están presentes involucrando únicamente al cromosoma 18 ( $P<0,05$ ) con una frecuencia del 40% en las metafa-



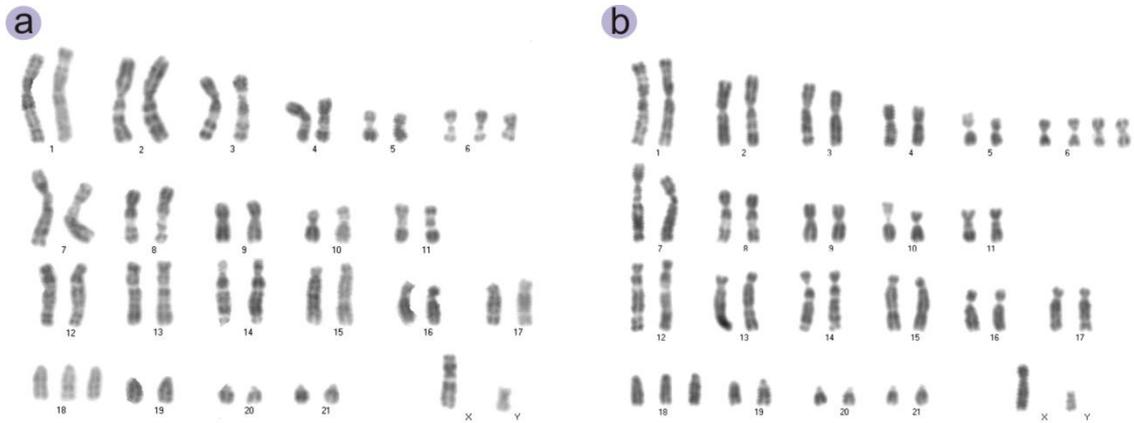
**Fig. 6. Análisis del cariotipo de distintos SC de la línea celular JPCS<sub>1</sub>.** En el eje de las ordenadas se grafica la frecuencia de aparición de cada cromosoma y en el de las abscisas se representa cada para cromosómico presente en la especie de *Oryctolagus cuniculus*. Las líneas que se extienden por encima y por debajo de cada caja demarcan el intervalo de confianza del 95%.

ses estudiadas.

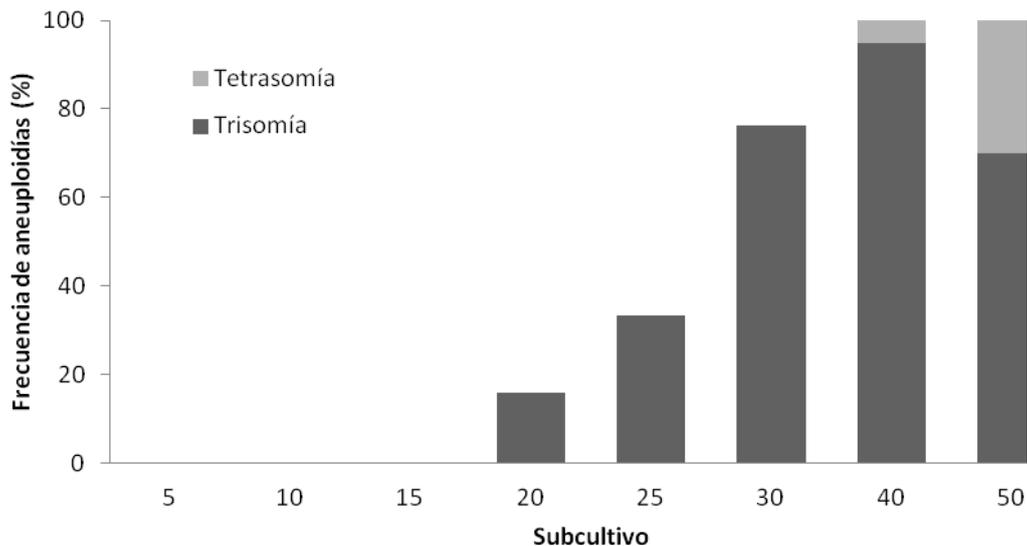
El SC 20 mantiene la tendencia de la alta frecuencia de trisomías en el cromosoma 18. Asimismo, las aneuploidías estocásticas disminuyen con respecto al SC anterior observándose en número menor de cromosomas del complemento, siendo estos los cromosomas 1, 2, 3, 4, 6, 9, 11, 14, 19 y el par sexual. Cabe destacar, que a partir de este pasaje se establece una nueva tendencia en el cromosoma 6 similar a lo que acontece con el cromosoma 18. Si bien en el SC 20 la media del número de cromosomas para el cromosoma 6 no tiene una diferencia significativa con respecto al valor de referencia ( $P < 0,05$ ), la frecuencia de trisomía en el cromosoma 6 alcanza valores del 15,78%, la frecuencia de trisomías para este cromosoma continuará ascendiendo en los sucesivos SCs.

Desde el SC 25 al 50 se mantienen las tendencias que se establecieron en los pasajes previos, donde las aneuploidías que presentan una desviación específica del número de referencia son las presentes en los cromosomas 6 y 18 ( $P < 0,05$ ; Fig. 7). Se observa un aumento progresivo de trisomías en ambos cromosomas (Fig. 8 y Fig. 9). Para el cromosoma 6 específicamente, la tendencia comienza en el SC 20 con una frecuencia de 15,78% aumentando hasta encontrar el máximo en el SC 40 con 95% y disminuyendo hacia el SC 50 a un valor del 70%. Asimismo se observa en los SC 40 y 50 tetrasomías en el mismo cromosoma con frecuencias de 5 y 30%, ésta es la razón por la cual el índice de trisomías disminuye en el SC 50 debido al aumento concomitante de las

tetrasomías. Tanto en el SC 40 como en el 50 la suma de la frecuencia de los dos tipos de aneuploidías presentes para este cromosoma alcanza valores del 100%.



**Fig. 7.** Cariotipos de dos metafases provenientes de momentos diferentes del establecimiento de la línea celular JPCS<sub>1</sub> (1000X). En a) se muestra un cariotipo típico del SC 30 y en b) se muestra un cariotipo del SC 50.



**Fig. 8.** Frecuencia de aneuploidías del cromosoma 6 en distintos SC de la línea celular JPCS<sub>1</sub>.

En cuanto a la frecuencia de trisomías del cromosoma 18 (Fig. 8), se observa una tendencia de aumento constante desde un 20% en el SC 10 hasta un

100% en los SC 40 y 50. En este caso la tendencia comienza en el SC 10, bastante más temprano que lo observado para el cromosoma 6.

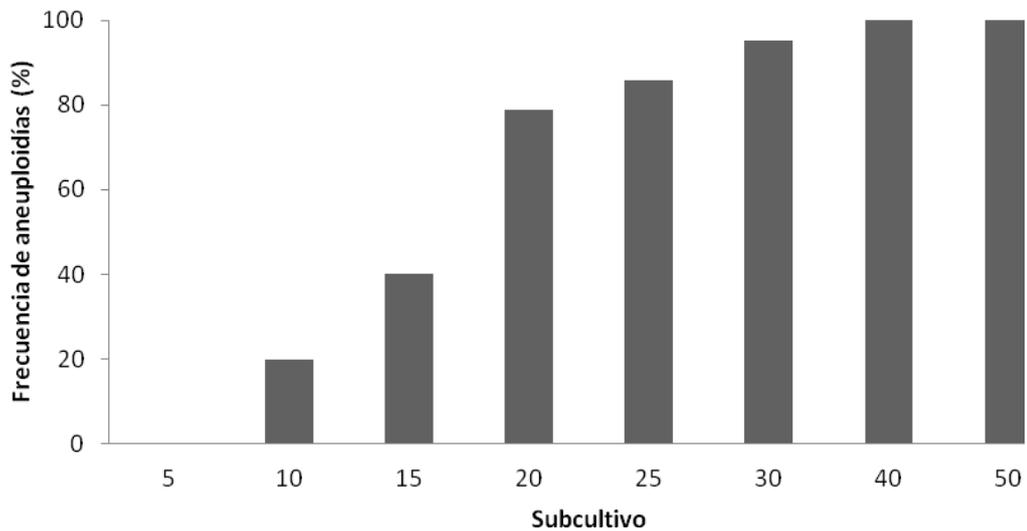


Fig. 9. Frecuencia de aneuploidías del cromosoma 18 en distintos SC de la línea celular JPCS<sub>1</sub>.

Las aberraciones cromosómicas estructurales identificadas que se observaron fueron deleciones cromosómicas que afectaron únicamente a 3 cromosomas, siendo los mismos los cromosomas 10, 12 y 14 (Tabla 3). Las deleciones que afectan a los cromosomas 12 y 14 ocurren únicamente en los SC 25 y 40 respectivamente, sin progresar en otros SC. En cambio, la deleción que afecta al cromosoma 10 aparece en el SC 30 y continúa presente hasta el SC 50. La frecuencia de esta aberración se incrementa a medida que aumentan los SCs, variando desde el 9,52% en el SC 30 hasta un 40% en el último SC estudiado.

Por último, se han logrado identificar 5 tipos de cromosomas marcadores en los SC analizados. Los mismos fueron denominados con la letra "M" seguida de un número que señala el orden cronológico de aparición en los SC.

Subcultivos	Deleciones		
	del(10)(p13)	del(12)(q22)	del(14)(q27)
5	0,00	0,00	0,00
10	0,00	0,00	0,00
15	0,00	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,00
25	0,00	4,76	0,00
30	9,52	0,00	0,00
40	26,32	0,00	15,79
50	40,00	0,00	0,00

**Tabla 3. Frecuencia de aparición de las deleciones encontradas en distintos SC de la línea celular JPCS<sub>1</sub>. La frecuencia observada (%) esta expresada como la razón entre número de metafases donde aparecen los cromosomas portadores de la deleción/número total de metafases analizadas x 100.**

El cromosoma marcador M1 es un elemento acrocéntrico, con un tamaño intermedio entre los cromosomas 19 y 20 (Fig. 10). El M2 presenta una morfología acrocéntrica con un tamaño intermedio entre los cromosomas 15 y 16 (Fig. 11). El M3 presenta una morfología submetacéntrica similar al cromosoma 3, pero a diferencia de este último posee un menor tamaño y un brazo corto relativamente más grande (Fig. 12). El M4 presenta una morfología submetacéntrica similar a un cromosoma 10, presentando un brazo corto de menor tamaño que el ~~presente en este de este~~ último (Fig. 13). El M5 es un cromosoma metacéntrico de pequeño tamaño, similar a un cromosoma 21 (Fig. 14).

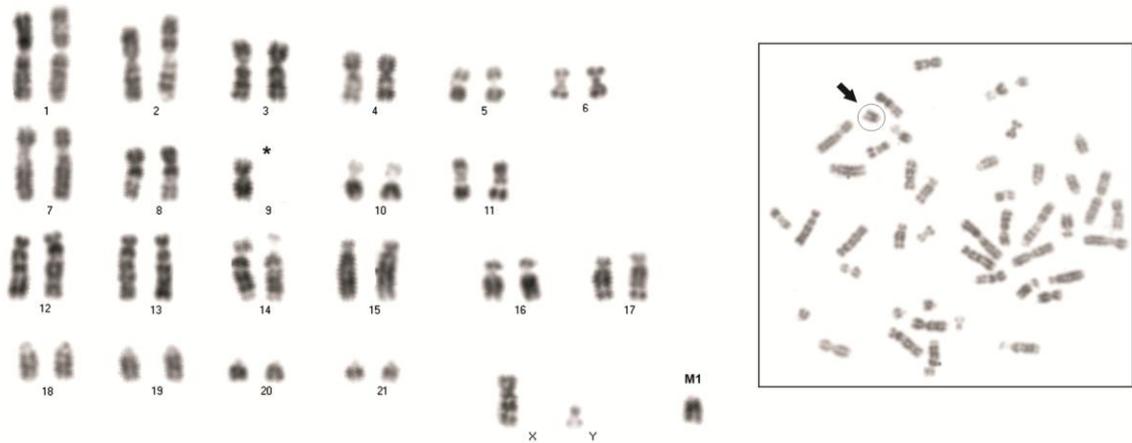


Fig. 10. A la izquierda se observa el cariotipo de metafase en la cual está presente el cromosoma marcador M1, el asterisco indica una monosomía presente en el cromosoma 9. A la **derecha** se observa la fotomicrografía a partir de la cual se realizó el cariotipo, la flecha indica el cromosoma marcador.

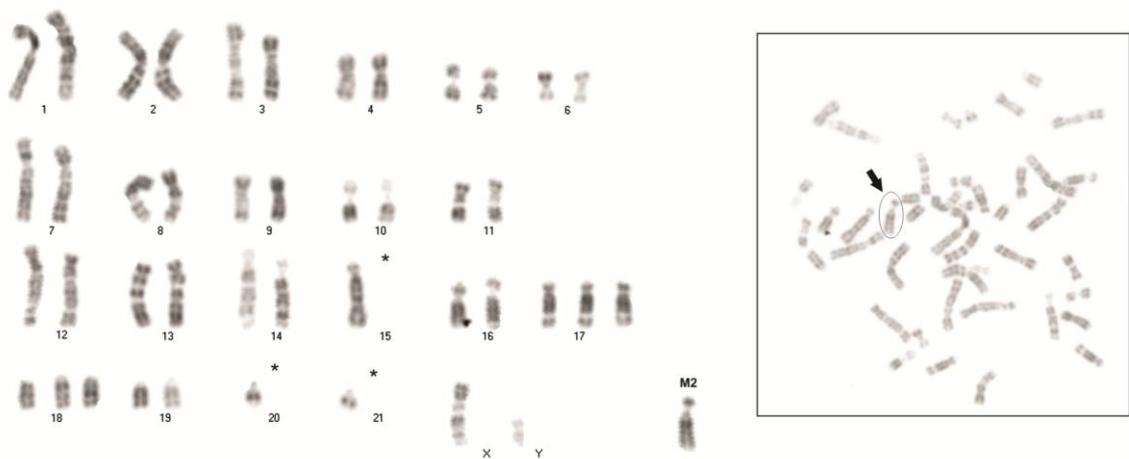


Fig. 11. A la izquierda se observa el cariotipo de metafase en la cual está presente el cromosoma marcador M2, los asteriscos indican las monosomías presentes en la misma en este caso para el cromosoma 15, 20 y 21. A la **izquierda-derecha** se observa la fotomicrografía a partir de la cual se realizó el cariotipo, la flecha indica el cromosoma marcador.

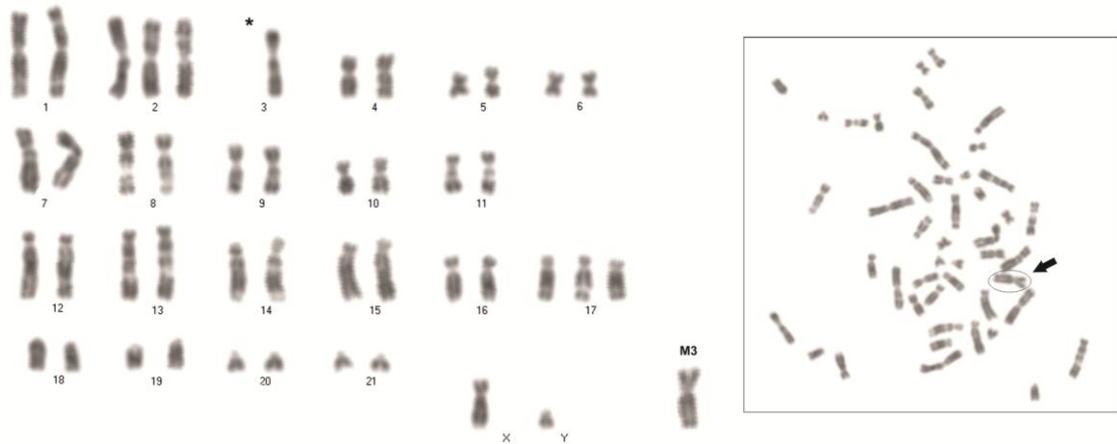


Fig. 12. A la izquierda se observa el cariotipo de metafase en la cual está presente el cromosoma marcador M3, el asterisco indica una monosomía presente en el cromosoma 3. A la **izquierda-derecha** se observa la fotomicrografía a partir de la cual se realizó el cariotipo, la flecha indica el cromosoma marcador.

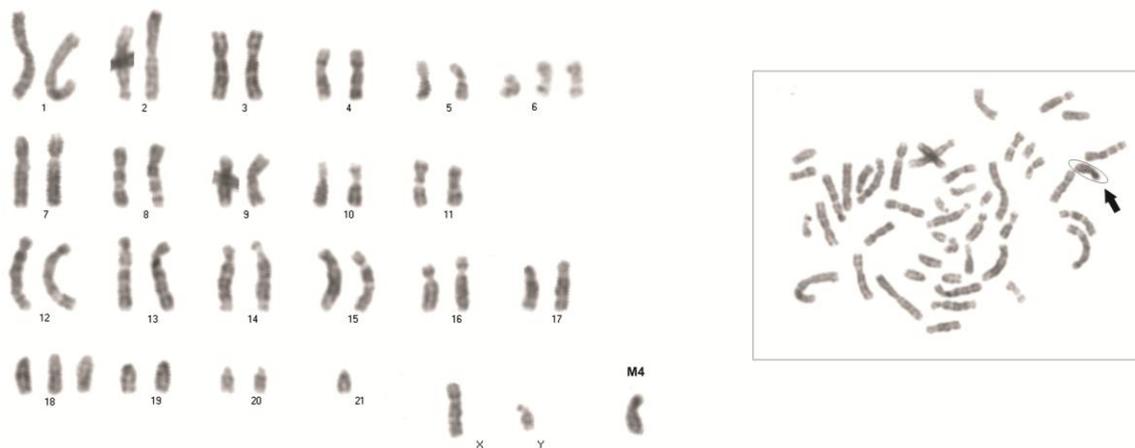


Fig. 13. A la izquierda se observa el cariotipo de metafase en la cual está presente el cromosoma marcador M4. A la **izquierda-derecha** se observa la fotomicrografía a partir de la cual se realizó el cariotipo, la flecha indica el cromosoma marcador.

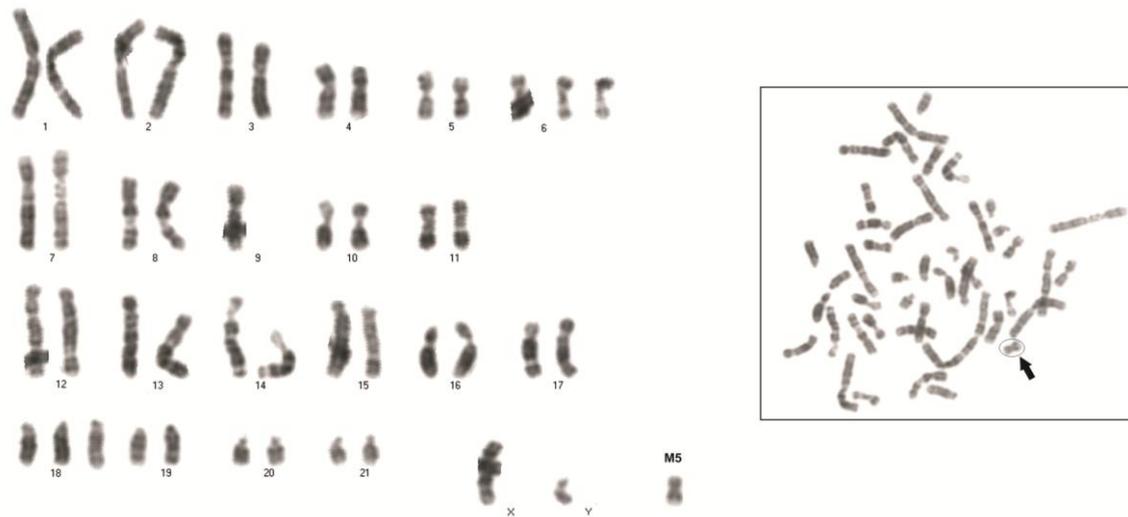


Fig. 14. A la izquierda se observa el cariotipo de metafase en la cual está presente el cromosoma marcador M5. A la ~~izquierda-derecha~~ se observa la fotomicrografía a partir de la cual se realizó el cariotipo, la flecha indica el cromosoma marcador.

La frecuencia de aparición por SC de los cromosomas marcadores fue relativamente baja en todos los casos, llegando a alcanzar valores máximos sin superar el 15% (Tabla 4). El M1 posee una mayor presencia durante el mantenimiento del cultivo celular, hallándose en 4 SC consecutivos, desde el SC 10 al 25. Este cromosoma, tiene su punto álgido de frecuencia en el SC 20 con un 15%, para luego disminuir a un 5% en el siguiente SC analizado, y por último desaparecer en los SC subsiguientes. El resto de los cromosomas marcadores se hacen evidentes en 1 o 2 SC únicamente (Tabla 4).

#### 4.2. Análisis de microsatélites

Se analizaron 16 microsatélites dinucleotídicos distribuidos en distintos cromosomas del complemento de *Oryctolagus cuniculus*, en los SC de 5 a 50 de la línea celular JPCS<sub>1</sub>. Los resultados obtenidos a partir del análisis en geles teñidos con sales de plata de los fragmentos amplificados, demuestran la

inexistencia de aparición de nuevos alelos para todos los marcadores utilizados en los SC estudiados. Asimismo, en aquellos marcadores que presentaron 2 alelos no se evidenció desbalance en heterocigosis.

Subcultivos	Marcadores				
	M1	M2	M3	M4	M5
5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
10	5,00	5,00	0,00	0,00	0,00
15	5,00	15,00	15,00	0,00	0,00
20	15,00	0,00	5,00	0,00	0,00
25	5,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30	0,00	0,00	0,00	4,76	9,52
40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
50	0,00	0,00	0,00	0,00	5,00

**Tabla 4.** Frecuencia de aparición de metafases presentando cromosomas marcadores en distintos SC de la línea celular JPCS<sub>1</sub>. La frecuencia observada (%) de cada cromosoma marcador esta expresada como la razón entre número de metafases donde aparecen los cromosomas marcadores/número total de metafases analizadas x 100.

Con el objeto de corroborar los datos obtenidos en los geles teñidos con sales de plata se eligieron 5 microsatélites y se amplificaron agregando a las reacciones de PCR Fluoresceína-12-dCTP, para marcar con fluorescencia los amplicones obtenidos y luego ser analizados en el analizador genético ABI3130. El análisis de los datos obtenidos con esta técnica arrojaron los mismos resultados a los obtenidos con los geles de plata. En la [figura- 15](#) se observan los electroferogramas, con los alelos respectivos para cada microsatélite amplificado.

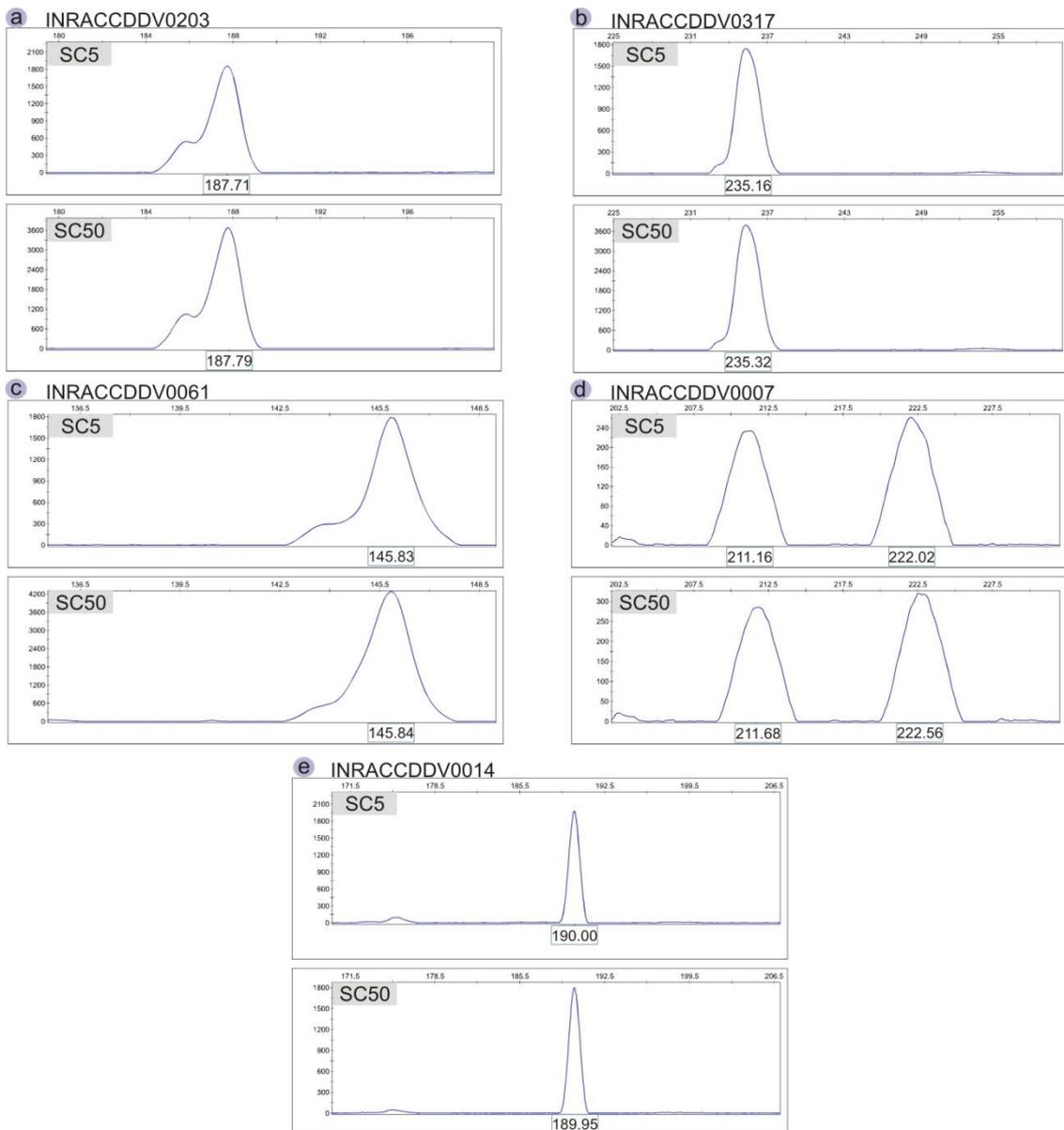


Fig. 15. Electroferogramas de los microsatélites: a) INRACCDDV0203, b) INRACCDDV0317, c) INRACCDDV0061, d) INRACCDDV0007, e) INRACCDDV0014. En cada gráfico el eje de las ordenadas representa unidades de fluorescencia relativa, el de las abscisas representa el tamaño en pares de bases.

En todos los casos existe una coincidencia entre los alelos presentes en el SC 5 y los alelos presente en el SC 50, sin aparición de nuevos alelos. Asimismo, en el marcador INRACCDDV0007 que posee 2 alelos no se observa desbalance en la heterocigosis, ya que ambos presentan la misma intensidad de

fluorescencia relativa. Por último, cabe mencionar que tan sólo 3 de los 16 microsatélites utilizados resultaron ser heterocigotas para la línea celular estudiada: INRACCDDV0327, INRACCDDV0007 y INRACCDDV0044 ubicados en los cromosomas 1, 5 y 15 respectivamente.

#### 4.3. Análisis de la curva de crecimiento

Se obtuvieron las curvas de crecimiento para los SC 5 a 50 (Fig. 16). Las mismas fueron evaluadas en función del tiempo de duplicación poblacional y la densidad limitante de proliferación para cada SC estudiado.

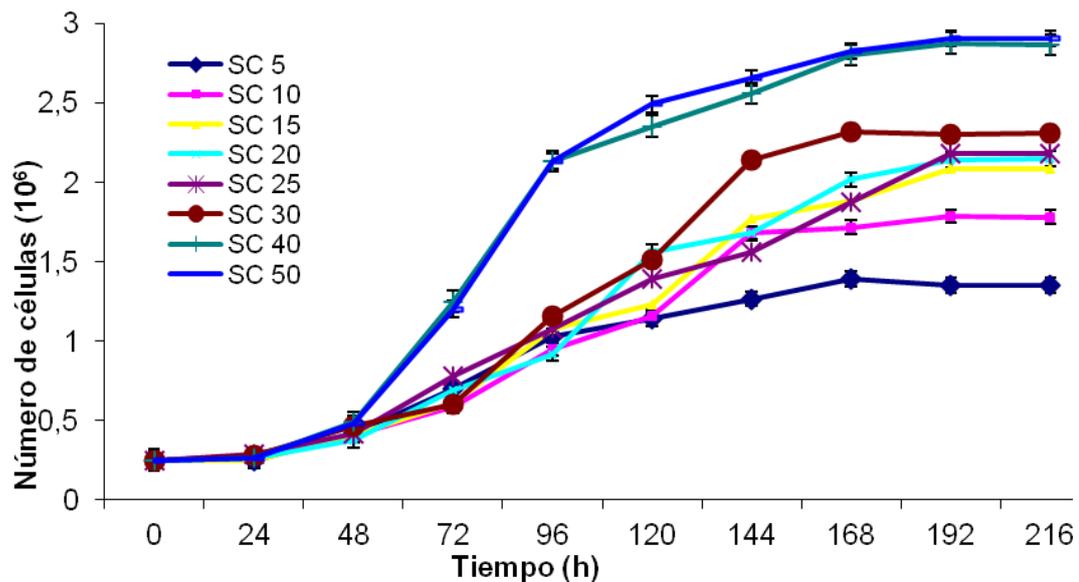


Fig. 16. Curvas de crecimiento de la línea celular JPCS<sub>1</sub>. En la ordenada se representa el número de células y en las abscisas se representa el tiempo en horas (h). Cada punto en la curva representa el valor promedio del número de células y las líneas proyectadas el error estándar.

##### 4.3.1. Análisis del tiempo de duplicación poblacional

A partir de los datos de la curva de crecimiento se obtuvo el tiempo de duplicación poblacional para los SC 5 a 50 (Fig. 17). Se observa que hay 2

agrupaciones de SCs, la primer agrupación comprende los SCs 5 al 30 ( $P>0,05$ ), cuyos los valores promedio del tiempo de duplicación poblacional oscilan entre 34,22 a 37,71 h. La segunda agrupación involucra únicamente los SCs 40 y 50, cuyos valores del tiempo de duplicación poblacional son 24,3 y 23,65 h respectivamente. Entre ambas agrupaciones hay una marcada diferencia cuya amplitud corresponde al orden de 10 h ( $P<0,05$ ), sin observarse cambios graduales a medida que aumentan los SCs durante el mantenimiento de la línea celular.

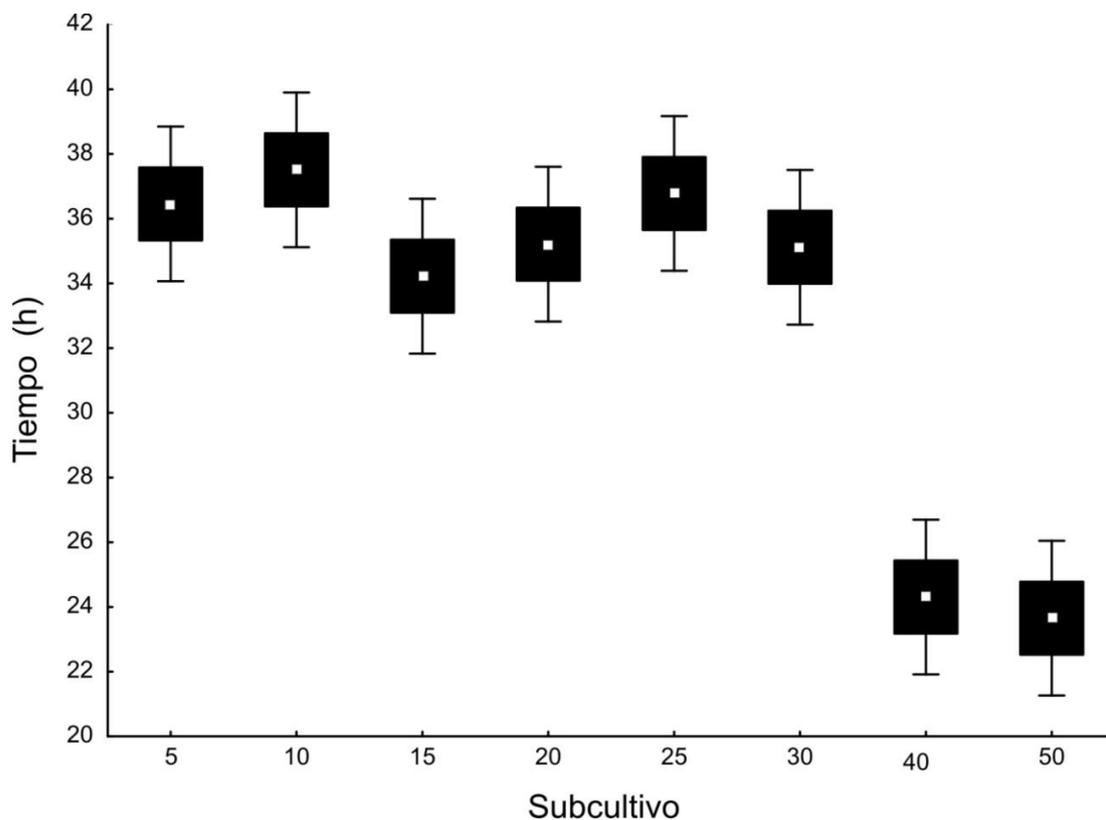


Fig. 17. Tiempo de duplicación poblacional en distintos SC de la línea celular JPCS<sub>1</sub>. En el eje de las ordenadas se grafica tiempo en horas y en el de las abscisas representa los SC analizados. Cada caja incluye el promedio (cuadrado blanco)  $\pm$  el error estándar. Las líneas que se extienden por encima y por debajo de cada caja demarcan el intervalo de confianza del 95%.

#### 4.3.2. Análisis de la densidad limitante de la proliferación

En la fase estacionaria de la curva de crecimiento (Fig. 16) se observó la densidad limitante de la proliferación. Los datos se encuentran detallados en la Tabla 5 y representados en la figura 18.

Subcultivo	Promedio del número de células	Intervalo de Confianza del 95%	Grupos homogéneos
5	1.368.333,33	±468925,54	
10	1.716.666,67	±224031,94	X
15	1.946.666,67	±500128,75	X X
20	2.073.333,33	±254952,09	X
25	2.046.666,67	±279212,36	X X
30	2.297.666,67	±794401,19	X
40	2.843.666,67	±292003,31	X
50	2.903.666,67	±824708,77	X

**Tabla 5. Promedio, intervalo de confianza del 95% y grupos homogéneos del análisis de la densidad limitante de la proliferación celular en distintos SC de la línea celular JPCS<sub>1</sub>. Las X alineadas en la misma columna de los grupos homogéneos indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los SCs que las poseen (P>0,05).**

Los resultados del análisis de la densidad limitante de la proliferación muestran el aumento de la misma a medida que se incrementan los SCs (Fig. 18; Tabla 5). A lo largo de los SC estudiados se establecen varias agrupaciones homogéneas (ver GLOSARIO) dentro de las cuales no hay diferencias significativas (P>0,05; Tabla 5), algunas de estas agrupaciones se solapan entre sí, principalmente en los SCs intermedios comprendidos entre los SCs 10 al 30,

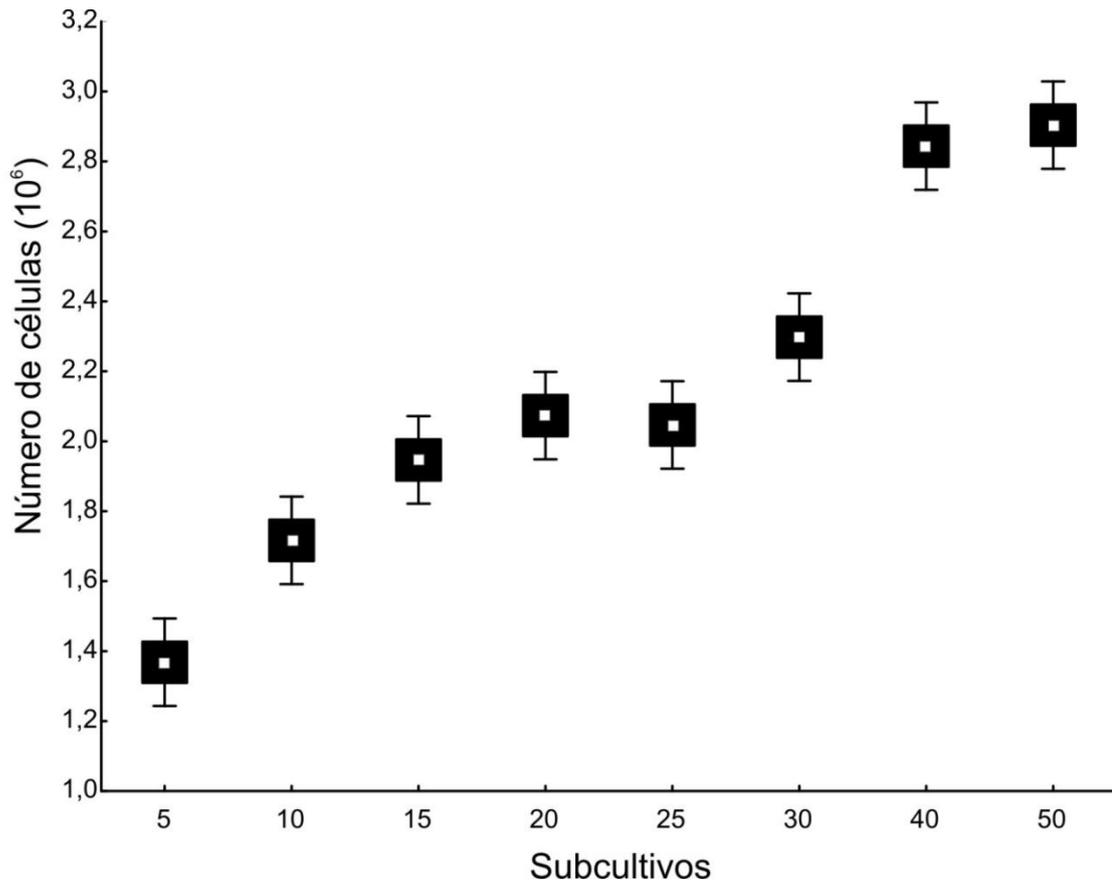


Fig. 18. Densidad limitante de la proliferación en distintos SC de la línea celular JPCS<sub>1</sub>. El eje de las ordenadas representa número de células en millones y el de las abscisas representa los subcultivos. Cada caja incluye el promedio (cuadrado blanco)  $\pm$  el error estándar. Las líneas que se extienden por encima y por debajo de cada caja demarcan el intervalo de confianza del 95%.

indicando la existencia de cambios graduales en la densidad limitante de la proliferación celular en esos puntos. Asimismo, los SC más tempranos como es el caso del SC 5 y tardíos como los SCs 40 y 50 presentan diferencias significativas ( $P < 0,05$ , Tabla 5), sin solaparse con las de otras agrupaciones anteriormente mencionadas.

El aumento de la densidad limitante de la proliferación celular, se da en dos fases de incremento, separadas por una meseta. La primera fase de crecimiento ~~va desde~~ comprende desde el SC 5 al 15 donde hay un aumento

aritmético de la densidad limitante de la proliferación. Luego de esta primera fase, encontramos una meseta representada por los SCs 20 y 25. Entre los SCs 30 y 40 se observa la segunda fase de incremento más pronunciada que la anterior.

En la fase estacionaria de la curva de crecimiento, la línea celular JPCS<sub>1</sub> presenta una morfología fibroblástica a lo largo de su mantenimiento *in vitro*. En los primeros SCs se observa que forman monocapas y tienen una orientación paralela en confluencia, determinando una morfología macroscópica denominada “impresión digital” (“*fingerprint*”, Fig. 19). A medida que los SCs se incrementan la línea celular exhibe una tendencia a la formación de focos de crecimiento (“*foci*”) en donde la densidad celular es mayor que en otras zonas del cultivo, formando multicapas y perdiendo la orientación paralela (Fig. 19). Esta tendencia se hace más evidente a partir del SC 30 y se observa con mayor incrementándose hacia el SC 50.

#### **4.4. Análisis de las curvas de crecimiento con independencia de suero**

Se obtuvieron las curvas de crecimiento con independencia de suero para los SC 5 a 50 en la línea celular JPCS<sub>1</sub> (Fig. 20). Las mismas fueron evaluadas en función de la pendiente resultante y por la capacidad de crecimiento de las células con ausencia de suero en el medio de cultivo.

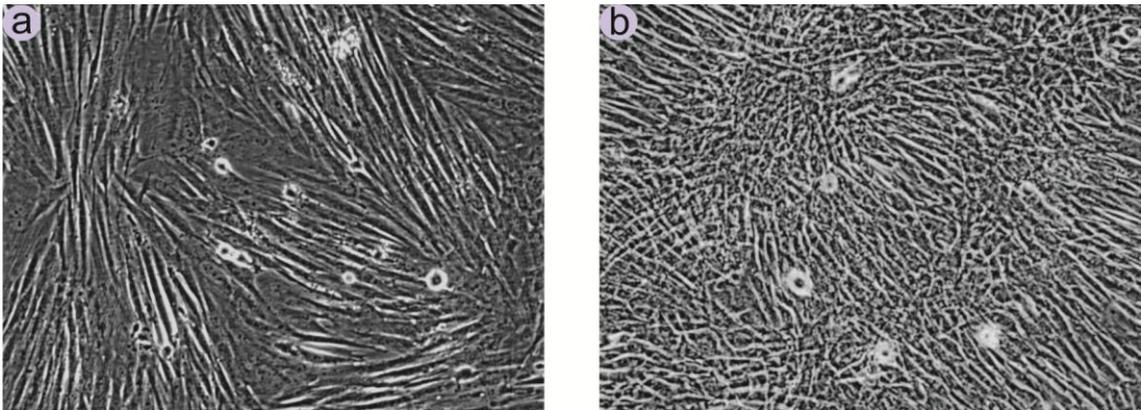


Fig. 19. Fotomicrografías de la línea celular JPCS<sub>1</sub> en confluencia. En a) se muestra la captura fotográfica del SC 5, se observa que en confluencia las células se disponen paralelamente sin formar multicapas y en b) se muestra una fotografía del SC 50, las células no se disponen paralelamente y forman multicapas.

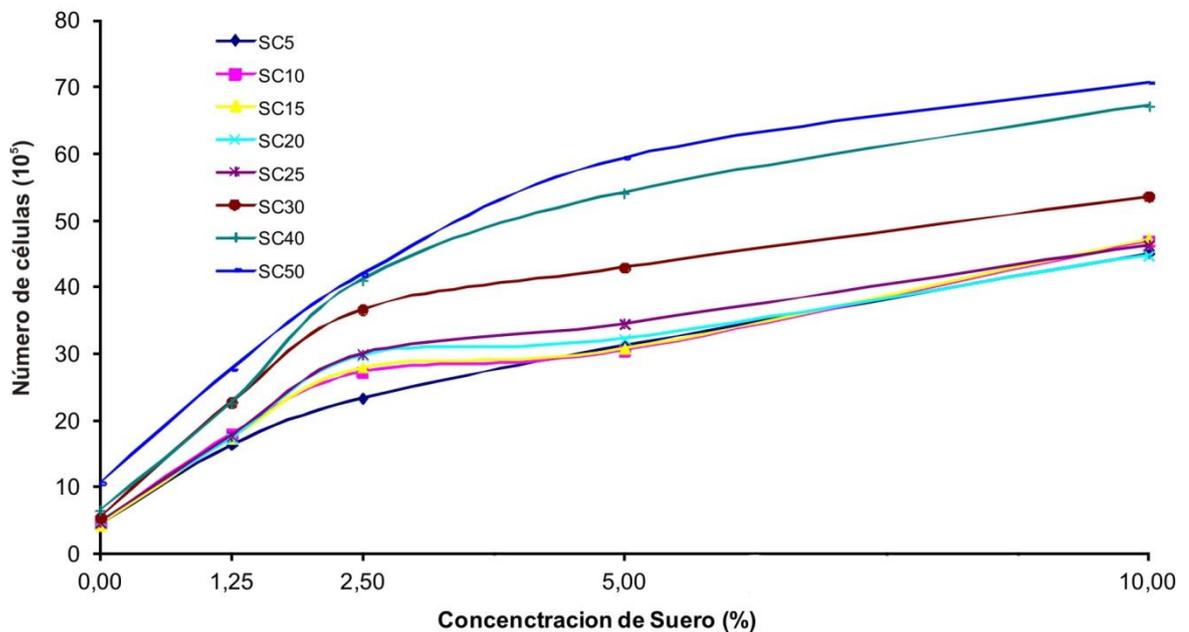


Fig. 20. Curvas de crecimiento con independencia de suero de distintos SC de la línea celular JPCS<sub>1</sub>. En el eje de la ordenada se representa el número de células ( $10^5$ ) y en de las abscisas se representa la concentración de suero (%). Cada punto en la curva representa el valor promedio del número de células.

#### 4.4.1. Análisis de la pendiente de la curva de crecimiento con independencia de suero

A partir de los datos obtenidos para la confección de las curvas de crecimiento con independencia de suero se calcularon las pendientes para cada SC estudiado, mediante la transformación por la raíz cuadrada de la variable de concentración de suero, con el objeto de representar las rectas y obtener las pendientes respectivas (Fig. 21, Tabla 6). Para encontrar la función matemática de transformación que mejor se ajuste a los datos se utilizó un programa de análisis de ajuste de datos producido por Systat Software Inc. (<http://www.sigmaplot.com/products/tablecurve2d/tablecurve2d.php>).

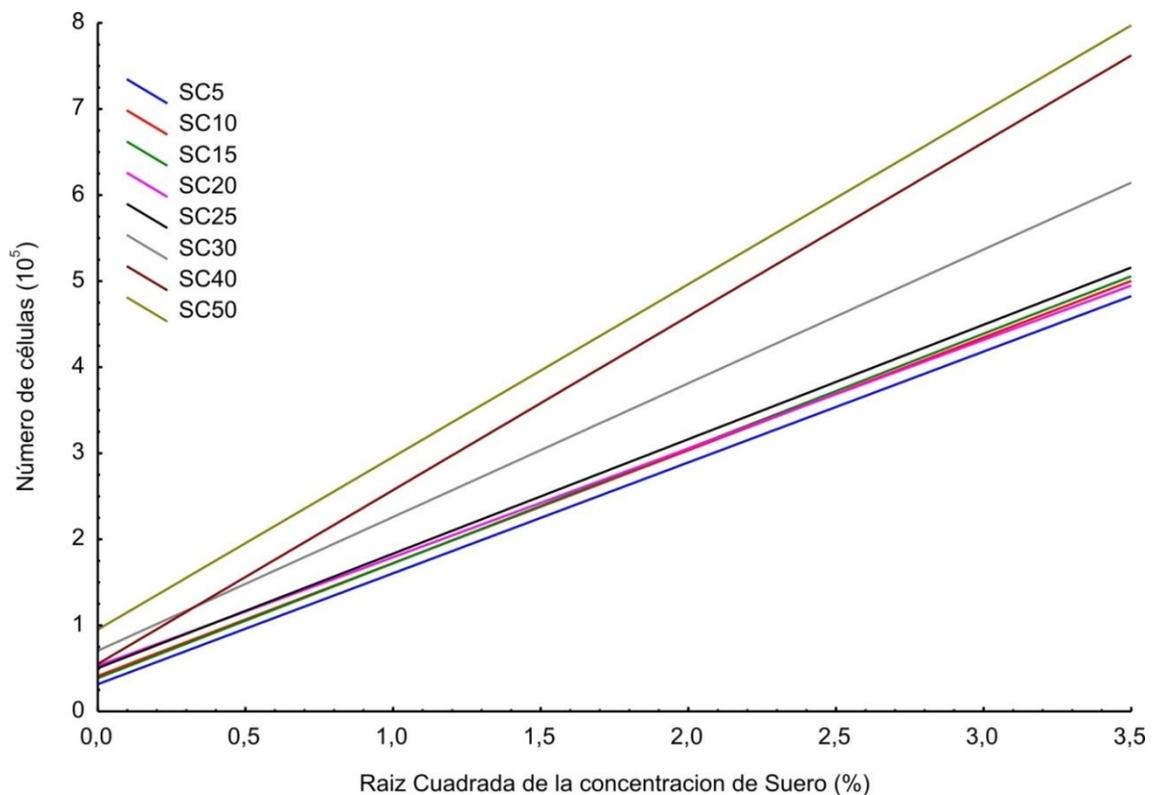


Fig. 21. Rectas obtenidas a partir de la transformación de la variable concentración de suero para los distintos SC de la línea celular JPCS<sub>1</sub> analizados.

Subcultivo	Pendiente	Límite de confianza inferior	Límite de confianza superior	r <sup>2</sup>
5	128,86	117,4	139,1	0,9814
10	131,15	123,7	141,5	0,97573
15	133,43	124,8	146,1	0,96835
20	126,27	118,5	133,7	0,96557
25	133,01	122,8	144,5	0,97048
30	155,42	138,6	171,6	0,96755
40	202,05	182,5	212,9	0,97169
50	200,62	178,7	210,6	0,97645

**Tabla 6. Pendiente, límite inferior, límite superior y r<sup>2</sup> de las rectas obtenidas a partir de la transformación de la variable concentración de suero, para los distintos SC de la línea celular JPCS<sub>1</sub>.**

A partir de los datos obtenidos se pone en evidencia un marcado ajuste de las curvas, manifestado por el coeficiente r<sup>2</sup>, superior en todos los casos a 0,96 (Tabla 6). En la [Figfigura- 21](#) se observa en primera instancia que entre los SC 5 a 25 no existen grandes diferencias debido al solapamiento presente entre los límites de confianza para cada pendiente dada (Tabla 6), oscilando los valores de las mismas entre 126,27 y 133,43. Por fuera de este grupo, encontramos las rectas de los SC 30 con un valor de pendiente equivalente a 155,42 y agrupadas con los valores más altos encontramos las rectas de los SCs, 40 y 50, entre las cuales no hay diferencias observables. Los valores de las pendientes de este último grupo se hallan en el orden de 200 (Tabla 6).

Paralelamente, se observa un aumento progresivo de las pendientes a medida que avanzan los SCs, el mismo se manifiesta en 3 etapas. La primera

comprende los SC 5 a 25, la segunda solo el SC 30, y por último muy alejada de las anteriores se encuentra la tercera etapa representada por los SC 40 y 50.

#### 4.4.2. Análisis de la capacidad de proliferación celular en ausencia de suero

Utilizando los valores del número de células para la concentración de suero del 0%, se realizó el análisis de la capacidad de proliferación celular en ausencia del mismo (Fig. 22, Tabla 7). Los resultados obtenidos evidencian 3 agrupaciones homogéneas dentro de las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ; Tabla 7). Las primeras dos agrupaciones se superponen ampliamente. Por fuera de esta superposición quedan los SC 5 y 30 entre los cuales hay diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ; Tabla 7), siendo los valores obtenidos del número de células similares a los de la siembra inicial indicando la ausencia de proliferación celular.

Subcultivos	Promedio	Intervalo de confianza del 95%	Grupos homogéneos	
5	43370,0	$\pm 18476,63$	X	
10	44555,4	$\pm 10746,59$	X	X
15	42592,6	$\pm 3877,33$	X	X
20	50259,3	$\pm 22923,12$	X	X
25	46777,7	$\pm 2406,68$	X	X
30	53777,8	$\pm 21064,14$		X X
40	63703,7	$\pm 14702,40$		X
50	108814,7	$\pm 29918,52$		

**Tabla 7. Promedio, intervalo de confianza del 95% y grupos homogéneos de la capacidad de crecimiento celular en ausencia de suero en distintos SC de la línea celular JPCS<sub>1</sub>. Las X alineadas en la misma columna de los grupos homogéneos indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los SCs que las poseen ( $P > 0,05$ ).**

La tercera agrupación está compuesta únicamente por los SC 30 y 40. A partir de este último se observa un valor levemente aumentado respecto al inóculo inicial sembrado.

Por último, el SC 50 presenta los valores más extremos alcanzados en el número de células obtenidas al final del período de cultivo y muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto a los restantes SC estudiados ( $P < 0,05$ ; Tabla 7). El SC 50 presenta un valor sobradamente aumentado, duplicando el valor del inóculo celular inicialmente sembrado indicando la existencia de proliferación celular en este SC.

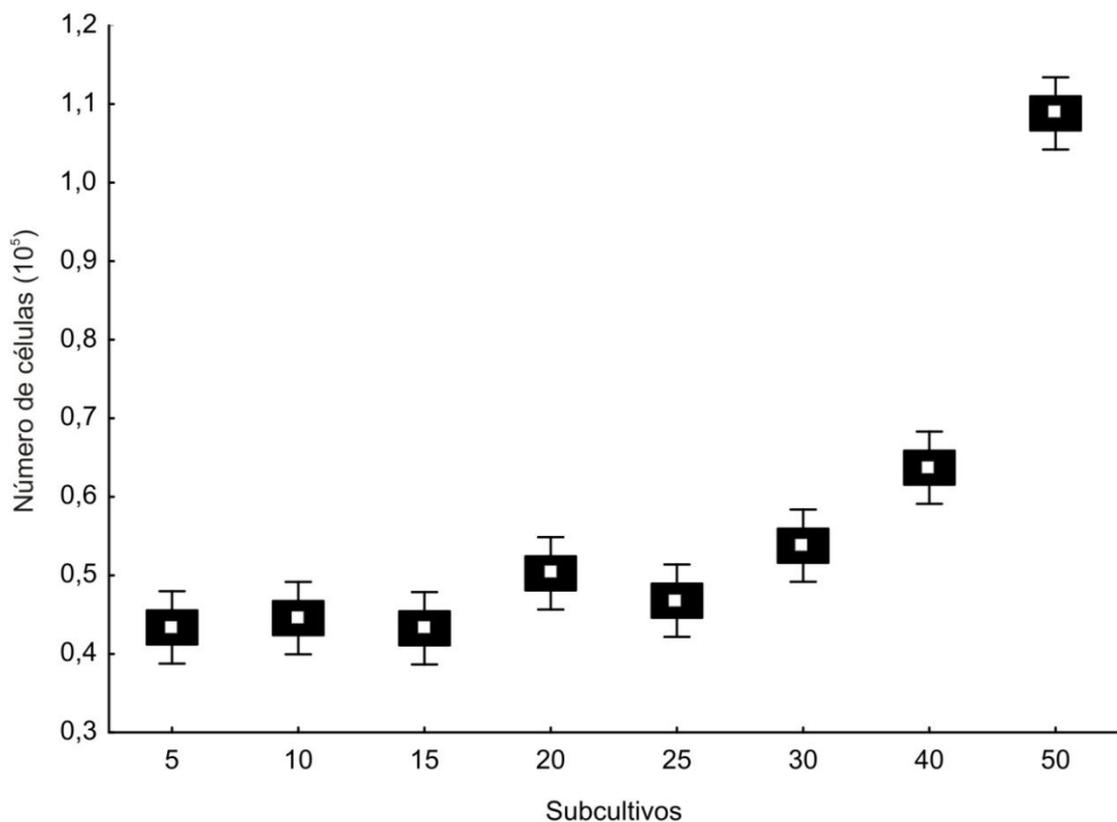


Fig. 22. Capacidad de crecimiento celular en ausencia de suero analizada en distintos SC de la línea celular JPCS<sub>1</sub>. El eje de las ordenadas representa número de células ( $10^5$ ) y el de las abscisas representa los subcultivos. Cada caja incluye el promedio (cuadrado blanco)  $\pm$  el error estándar. Las líneas que se extienden por encima y por debajo de cada caja demarcan el intervalo de confianza del 95%.

#### 4.5. Análisis del crecimiento independiente de anclaje

El ensayo de crecimiento independiente de anclaje se realizó en los SC 5 a 50 de la línea celular JPCS<sub>1</sub>. Los resultados obtenidos a partir del mismo evidencian la ausencia de crecimiento en las condiciones establecidas en todos los SC analizados. Asimismo, la línea celular establecida CHO-K1 presentó un 68,5%±3 de capacidad de formar colonias en cultivo con independencia de anclaje (Fig. 23).

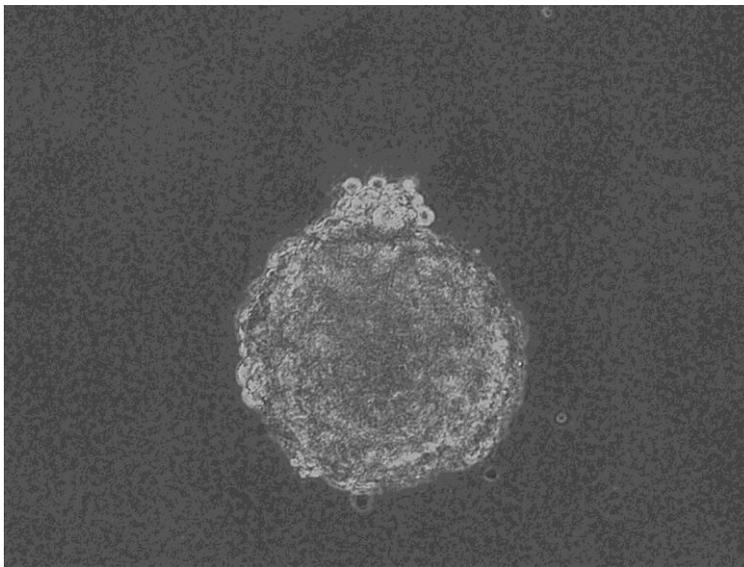


Fig. 23. Fotomicrografía del ensayo de crecimiento independiente de anclaje. Se observa una colonia celular formada por la línea celular CHO-K1 (100X).

#### 4.6. Análisis del ensayo de la migración celular

Los resultados del análisis de la “técnica de la herida” en distintos SC de la línea celular estudiada muestran un incremento de la migración celular a partir del SC 25, con una tendencia sostenida hasta el SC 50 (Fig. 24; Tabla 8).

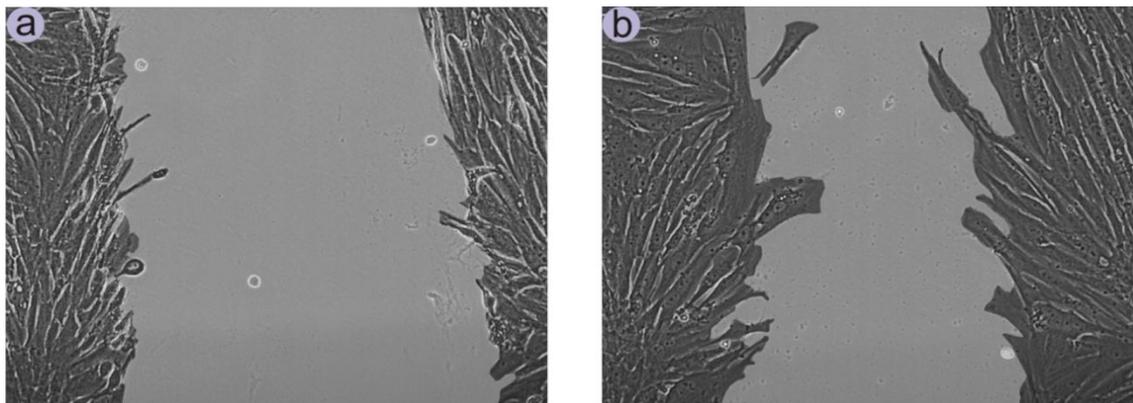


Fig. 24. Fotomicrografías del ensayo de migración celular, en la línea celular JPCS<sub>1</sub> (100 X). En a) se muestra la captura fotográfica de un área de cultivo a las 0 h y en b) la captura fotográfica de la misma a las 12 h.

Subcultivo	Promedio del área cubierta	Intervalo de confianza del 95%	Grupos homogéneos
5	63.069,92	±13.582,6	X
10	62.073,92	±10.604,21	X
15	61.685,40	±13.225,84	X
20	62.377,66	±13.529,53	X
25	70.388,21	±12.091,59	X X
30	78.398,75	±13.002,58	X
40	98.825,52	±15.025,06	X
50	109.466,68	±18.251,85	X

Tabla 8. Promedio, intervalo de confianza del 95% y grupos homogéneos del ensayo de migración celular en distintos SC de la línea celular JPCS<sub>1</sub>. Las X alineadas en la misma columna de los grupos homogéneos indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los SCs que las poseen (P>0,05).

Del análisis realizado se desprenden 3 agrupaciones homogéneas (P>0,05; Tabla 8). Las primeras 2 agrupaciones solo se superponen a través del SC 25, indicando diferencias graduales en este punto. El SC 30 presenta

diferencias estadísticamente significativas entre los SC 5 a 20 ( $P < 0,05$ ). La tercera agrupación compuesta por los SC 40 y 50, poseen capacidades de migración estadísticamente significativas con respecto a los SC previos ( $P < 0,05$ ). La mayor diferencia en los valores del área cubierta se muestran entre los SC 30 y 40 (Fig. 25; Tabla 8).

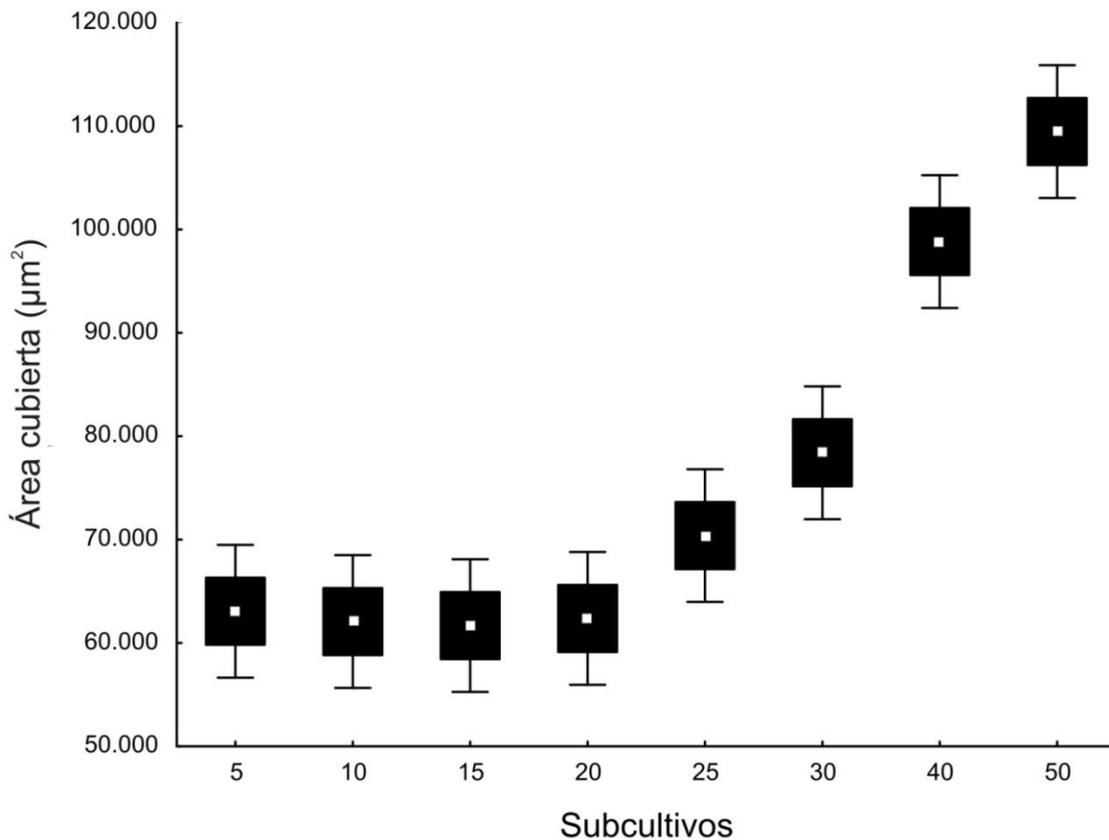


Fig. 25. Migración celular estudiada en distintos SC de la línea celular JPCS<sub>1</sub>. En el eje de las ordenadas se grafica el área cubierta por la migración celular en  $\mu\text{m}^2$  y el de las abscisas representa los subcultivos. Cada caja incluye el promedio (cuadrado blanco)  $\pm$  el error estándar. Las líneas que se extienden por encima y por debajo de cada caja demarcan el intervalo de confianza del 95%.

## 5. DISCUSIÓN

La morfología y las propiedades de las células transformadas difieren claramente de las contrapartes normales; algunas de estas diferencias son evidentes cuando las células se cultivan *in vitro*.

Durante el presente trabajo se realizaron una serie de investigaciones orientadas a dar información sobre los mecanismos que imperan en las primeras etapas de la transformación celular. Las mismas se orientaron a investigar aquellos eventos ocurridos a nivel genético, como también los evidenciados a nivel fenotípico como son el control del crecimiento y la migración celular.

### 5.1. Evolución del cariotipo del al línea celular JPCS<sub>1</sub>

A partir del análisis de la frecuencia del número cromosómico se evidencia un aumento del mismo paralelamente con el número de SCs. Los resultados obtenidos demuestran que los cultivos permanecen con el número modal de la especie originaria de  $2n=44$  cromosomas hasta alcanzar el SC 15, para modificar su número modal a 45 cromosomas en el SC 20 manteniéndose así hasta el SC 25. Por último, el número modal se ve modificado una vez más, alcanzado el valor de 46 cromosomas, manteniéndose hasta el SC 50. Cabe mencionar que en los SCs 15 y 30, los valores de las frecuencias de las modas fueron los más bajos con respecto a otros SCs, indicando etapas de transición. Con respecto al análisis del cariotipo, el único SC que no mostró alteraciones con

respecto al original de la especie en las metafases analizadas fue el SC 5. A partir del SC 10, comienzan a manifestarse una serie de modificaciones, algunas de las cuales persisten en el tiempo y otras no. Las modificaciones con mayor interés para interpretar la evolución del cariotipo de la línea celular JPCS<sub>1</sub> son las concernientes a los cromosomas 18, 6 y 10 según el orden cronológico de aparición durante el mantenimiento del cultivo celular. La presencia de la trisomía del cromosoma 18 comienza en el SC 10, la trisomía y posterior tetrasomía del cromosoma 6 se establecen en los SCs 20 y 40 respectivamente y por último, la deleción que involucra parte de 10p -del(10)(p13)-, se inicia en el SC 30. Estas aberraciones cromosómicas no sólo logran persistir durante el mantenimiento del cultivo celular, sino que además, su frecuencia aumenta significativamente desde su aparición hasta el último SC estudiado (SC 50). Este fenómeno pondría en evidencia una fuerte selección positiva para las células portadoras de dichas aberraciones. Los cromosomas marcadores hallados durante el mantenimiento de la línea celular no manifestaron tener valor para la caracterización citogenética del proceso de transformación, ya que no fueron seleccionados positivamente dado que en ningún caso se mantienen por más de tres SCs consecutivos y sus frecuencias de aparición no superan el 15%. Asimismo, la presencia de células poliploides a lo largo de los SCs analizados fue baja presentando valores del 5 al 12%.

El patrón observado en el presente trabajo de Tesis Doctoral es en parte consistente-coincidentes con los hallazgos de otros grupos de investigación. Entre los que se pueden mencionar, los presentados por Puck y col. (1966),

Bianchi y col. (1975) y Yang y Rossanoff (1977). Puck y col. (1966) observaron la aparición de pseudodiploidía en células obtenidas de piel de conejo después de un mantenimiento durante 500 generaciones *in vitro*. Estos autores demostraron la existencia de una trisomía característica del cromosoma 18 con una alta frecuencia de aparición, sugiriendo que la misma podría ser responsable de la longevidad de las células de conejo en cultivo (Puck y col., 1966). Nuestros resultados, si bien podrían ser concordantes con los presentados por Puck y col., ~~dada por~~ la existencia ~~en ambos casos~~ de +18, no estaríamos en condiciones de afirmar que en ambos casos se trate del mismo elemento cromosómico dado que estos autores no utilizaron técnicas de ~~el cromosoma 18 involucrado en los estudios presentados por estos autores se trate del mismo elemento encontrado en nuestros resultados dada la ausencia de técnicas de~~ bandas cromosómicas en sus estudios en los análisis por ellos realizados. Bianchi y col. (1975) analizaron metafases de cultivos primarios y establecidos al igual que de líneas celulares obtenidas a partir de células de riñón y pulmón de conejos neozelandeses. Es importante destacar que el análisis de estos investigadores se circunscribió a metafases obtenidas mediante técnicas citogenéticas convencionales sin incluir el análisis de bandas cromosómicas. Ellos observaron en las líneas celulares establecidas que el porcentaje de células hiperdiploides se incrementaba desde valores cercanos a un 10% en el SC 10 hasta valores próximos a un 60% en el SC 25, encontrando metafases con 45, 46 y 47 cromosomas. Sorprendentemente, los cariotipos de estas células hiperdiploides mostraron siempre una trisomía del cromosoma 19, al igual que la adición de uno o dos cromosomas de forma

aleatoria en el caso de las metafases con 46 y 47 cromosomas (Bianchi *y col.*, 1975). La disparidad de los resultados reportados por Bianchi *y col.* (1975) con los alcanzados en esta Tesis Doctoral podrían deberse a una diferente nomenclatura clasificatoria de los cromosomas del conejo ~~debido a sin poder descartarse, asimismo,~~ la falta de utilización de técnicas de bandas cromosómicas para permitir la correcta identificación de los mismos. Por último, Yang y Rosanoff (1977) trabajando con varias líneas celulares derivadas de distintos tejidos de embrión de conejo, incluyendo córnea, riñón, hígado, pulmón y piel, observaron que la mayoría de los cultivos originados de córnea, riñón e hígado se volvían poliploides. En contraposición, los cultivos iniciados a partir de pulmón y piel resultaron ser más estables desde el punto de vista cromosómico. Los mismos se volvían pseudodiploides o hiperdiploides. En ~~estos últimos estas líneas celulares,~~ Yang y Rosanoff (1977) propusieron tres patrones de cambios a nivel cromosómico: 1) ganancia de uno o más cromosomas telocéntricos; 2) pérdida de un cromosoma telocéntrico y aparición de un cromosoma marcador metacéntrico y 3) ganancia de un cromosoma marcador telocéntrico grande. A partir de metafases bandeadas se determinó que en los dos primeros patrones se encontraba involucrado el cromosoma 18, en el primer caso apareciendo como trisomía o tetrasomía y en el segundo caso constituyendo un isocromosoma 18 (Yang y Rosanoff, 1977). Los autores llegan a la conclusión de que el cromosoma 18 estaría directamente involucrado en el proceso de transformación de algunas líneas celulares como las obtenidas de piel y pulmón (Yang y Rosanoff, 1977). En correspondencia con estos hallazgos, la línea celular JPCS<sub>1</sub>, objeto del presente

trabajo de Tesis Doctoral, además de la trisomía 18, posee otras aberraciones características no encontradas en los trabajos anteriormente citados. Entre las mismas cabe mencionarse las trisomías 6 e inclusive, en los SCs 40 y 50, tetrasomías del mismo cromosoma al igual que la delección presente en 10p.

El axioma biológico que establece como desarrollo de tumores la acumulación de alteraciones genéticas sobre oncogenes y genes supresores de tumores es ampliamente aceptado como principio fundamental de la biología del cáncer (Nowak *y col.*, 2002). La inestabilidad cromosómica puede ocasionar ganancias o pérdidas de cromosomas enteros o parte de ellos, provocando un aumento de la tasa de la pérdida de heterocigidad. En líneas generales, las ganancias están relacionadas con el incremento de copias de genes mientras que las pérdidas del material génico están relacionadas con la disminución del número de alelos. Existe una gran variedad de ejemplos donde las trisomías están relacionadas con el aumento de la expresión de oncogenes. Algunos de estos están representados por ciertos tipos de cáncer gástrico, leucemias promielocítica aguda y tumores desmoideos que presentan trisomía, tetrasomía y distintos tipos de aberraciones que involucran al cromosoma 8 donde se encuentra el *locus* del oncogen *MYC* (Mayer *y col.*, 2007; Leal *y col.*, 2009; Jones *y col.*, 2010). Otro ejemplo lo constituye la trisomía del cromosoma 7 en el carcinoma renal hereditario, en este cromosoma se encuentra ubicado el *locus* del protooncogen *MET* (Fischer *y col.*, 1998; Zhuang *y col.*, 1998; Schmidt *y col.*, 2004). Asimismo, las delecciones están asociadas, en muchos casos, a la pérdida de alelos de genes supresores de tumores como por ejemplo el *TP53* ubicado en el

cromosoma 17 en la región 17p12. Esta región cromosómica se encuentra delecionada en varios tipos de neoplasia, incluyendo gran parte de los sarcomas humanos, disminuyendo la actividad génica de los mismos (Vogelstein *y col.*, 1988; Sanchez-Cespedes *y col.*, 2001; Vauhkonen *y col.*, 2006; Kaur *y col.*, 2007; Woo H I *y col.*, 2011; Beothe *y col.*, 2012). Dado el nivel resolutivo utilizado por las metodologías de estudio empleadas en la presente investigación no estaríamos en condiciones de afirmar o negar la participación de ganancias o pérdidas de material cromosómico donde estuvieran involucrados oncogenes o genes supresores de tumores y no hayan sido puestos en evidencia en la presente Tesis Doctoral. A modo de ejemplo podrían mencionarse, entre otros al *TP53* cuyo *locus* se ubica en el cromosoma 19, o el oncogen *MYC* cuyo *locus* está ubicado a nivel del cromosoma 3 en la especie por nosotros estudiada (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100009292> y <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100327265> respectivamente), cromosomas que en nuestras observaciones no evidenciaron participar significativamente en las aberraciones tanto numéricas como estructurales observadas durante el mantenimiento de la línea celular.

## **5.2. Secuencias de ADN de microsatélites de la línea celular JPCS<sub>1</sub>**

Los resultados obtenidos en los estudios de las secuencias de ADN microsatélite indican una gran estabilidad en los *loci* analizados durante el mantenimiento de la línea celular JPCS<sub>1</sub>. Este hallazgo es contradictorio con la mayor parte de la bibliografía existente, la cual afirma la adquisición de alguna

nueva variante alélica causada por una disminución de la deficiencia del sistema de reparación por emparejamiento erróneo (Peltomäki *y col.*, 1993; Lynch *y col.*, 1997; Janin, 2000; Saetta *y col.*, 2007; Agostini *y col.*, 2010; Funkhouser *y col.*, 2012). Sin embargo, otros autores y marcando una total correspondencia con nuestros resultados demostrarían la ausencia de inestabilidad en los *loci* de microsatélites en cultivos celulares como Vaco 411, Caco2, Colo205 entre otras, originados a partir de tumores de cáncer esporádico de colon (Eshleman *y col.*, 1998; Parker *y col.*, 2004). Asimismo, cabe destacar que entre un 15 a un 20% de este tipo de cáncer presentan inestabilidad microsatelitaria (Chaves *y col.*, 2000). Según el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos en el taller realizado en 1997: “La inestabilidad en los microsatélites para la detección del cáncer y la predisposición familiar: el desarrollo de criterios internacionales para la determinación de la inestabilidad de microsatélites en cáncer colorrectal”, afirma que no todos los microsatélites son buenos indicadores de inestabilidad genética para el diagnóstico del cáncer (Boland *y col.*, 1998). La probabilidad de que un microsatélite sea susceptible a la inestabilidad está relacionada con la tasa de mutación inherente a la ubicación de dicho marcador y, por ende, es posible sobrestimar la inestabilidad dada por un defecto en el mecanismo de reparación por emparejamiento erróneo (Boland *y col.*, 1998). En el taller se definió un panel de 5 marcadores de microsatélites para la evaluación de algunos tipos de cánceres humanos, con el fin de eliminar una serie de discrepancias existentes entre varios laboratorios. El panel consta de dos marcadores con repeticiones

mononucleotídicas y tres con repeticiones dinucleotídicas. Aquellos tipos de cánceres que presentaran alteraciones en dos o más de estos marcadores se considera que presentan una alta tasa de inestabilidad, mientras que, si es sólo un único marcador el que se encuentra comprometido se considera que posee una tasa baja de inestabilidad. Para distinguir tumores que presenten estabilidad microsatelitaria de los de baja tasa de inestabilidad es necesario extender el panel, razón por la cual se propusieron 19 microsatélites alternativos al panel en el taller. En nuestro caso, el panel fue armado siguiendo el criterio de poseer secuencias dinucleotídicas y los mismos estar distribuidos en distintos cromosomas del complemento del conejo neozelandés. Se utilizaron marcadores dinucleotídicos ya que, en general, presentan tasas de mutación altas y por ende el número de variantes alélicas es alta (Schlötterer, 1998; Goldstein y Schlötterer, 1999; Schlötterer, 2000; Eckert y Hile, 2009). A pesar de los resultados aquí presentados los cuales indican una gran estabilidad genética del panel de 16 microsatélites ensayados en la presente Tesis Doctoral, no implica que en otros *loci* no estudiados ocurra dicho evento. Asimismo, debido al insuficiente conocimiento de los microsatélites en la especie de conejo, es poco probable poder formar un panel de marcadores con las características propuestas por el NCI, ya que son pocos los autores que se han dedicado a esta temática en la especie en cuestión.

Las monosomías y deleciones cromosómicas ocasionan pérdida de la heterocigosis (Lu y Hano, 2008; Ding y col., 2011). Las aberraciones cromosómicas encontradas durante el mantenimiento de la línea celular

deberían ocasionar desbalance de los alelos presentes en los *loci* de microsatélites ubicados en los cromosomas 6, 18 o pérdida de heterocigosidad en la aberración del(10)(p13). Sin embargo, este evento no pudo ser puesto en evidencia mediante el análisis de los marcadores seleccionados para los cromosomas involucrados dado que resultaron ser homocigotas (INRACCDDV0219, INRACCDDV0061 y INRACCDDV0063, respectivamente). Dicho fenómeno, no descarta la ocurrencia de desbalance de los alelos de los marcadores heterocigotas o peérdida de la heterocigosis a nivel microsatelitario en otros *loci* ubicados en los mencionados cromosomas, secuencias nucleotídicas no incluidas en nuestro estudio. Cabe mencionar que tan solo tres de los marcadores utilizados (INRACCDDV0327, INRACCDDV0007 y INRACCDDV0044 ubicados en los cromosomas 1, 5 y 15 respectivamente) presentaron manifestaron ser heterocigotas y no demostraron desbalance de las variantes alélicas presentes en ellos.

### 5.3. Curvas de crecimiento

Los resultados obtenidos del tiempo de duplicación poblacional evidencian que recién a partir del SC 40 se observa una disminución significativa del tiempo de duplicación poblacional, indicando un aumento marcado en la tasa de crecimiento en función del tiempo a partir de dicho SC. Respecto al análisis de la densidad limitante de la proliferación se demuestra la existencia de un aumento en la misma, a medida que aumenta el número de los SCs evidenciando pérdida de la inhibición por contacto. Asimismo, en confluencia la morfología

observada en los primeros SCs demostró un patrón de crecimiento con orientación paralela entre las células (*"fingerprint"*), esta disposición es característica de muchos cultivos celulares con inhibición por contacto. No obstante en etapas de mantenimiento más avanzadas se observó una tendencia a la formación de focos de crecimiento (*"foci"*) donde las células exhiben un patrón de crecimiento desordenado y forman zonas de multicapa celulares indicando una pérdida de la inhibición por contacto. Este comportamiento es consistente con algunas de las características de las células transformadas, las cuales poseen un crecimiento aberrante que se manifiesta, entre otras particularidades, por presentar tasas de crecimiento aumentadas y alcanzar una mayor densidad celular de saturación que sus contrapartes normales, además de la formación de multicapas celulares debido a la disminución de la inhibición de proliferación celular por contacto (Borek y Sachs, 1966a; Dulbecco y Elkington, 1973; Rubin, 2008).

#### **5.4. Independencia de suero**

El análisis de las pendientes de las curvas de crecimiento con independencia de suero manifestó un aumento progresivo del valor de las pendientes a medida que se incrementaban los SCs. Los resultados de la proliferación celular en ausencia de suero- demostraron que a partir del SC 40 existe un aumento significativo en el número de células, dicha tendencia se mantuvo en aumento hasta el SC 50, ~~siendo en éste~~representando un valor dos veces superior al inóculo inicial evidenciando proliferación celular en ausencia

de suero bovino fetal. Este comportamiento es consistente con una de las características de las células transformadas, la disminución de los requerimientos de suero o de factores de crecimiento aportados externamente, debido en parte a la producción autócrina de factores de crecimiento (Todaro y De Larco, 1978; Cross y Dexter, 1991; Sherwood *y col.*, 2008), entre los que podemos mencionar el factor de crecimiento fibroblástico (Marek *y col.*, 2009), a las interleuquinas (Fontana *y col.*, 1984; Sato *y col.*, 2011; Escudero-Lourdes *y col.*, 2012) y al factor de crecimiento derivado de las plaquetas (Shimozato *y col.*, 1996; Majumdar *y col.*, 2009), entre otros. En otras ocasiones, estas células tienen requerimientos reducidos de suero aportados por el medio de cultivo debido a que los sistemas de señalización intracelular están alterados, es decir, no está regulada la actividad de los receptores de los factores de crecimiento o de las vías de transducción de señales como es el caso del gen *erbB* que codifica una forma alterada del receptor para EGF (Elliott *y col.*, 2008).

### 5.5. Crecimiento independiente de anclaje

En ningún momento la línea celular estudiada presentó crecimiento con independencia de anclaje, la cual es una de las características más importantes del proceso de transformación celular, ~~la cual involucrando~~ ~~— involucra~~ modificaciones en las glicoproteínas involucradas en la adhesividad celular al sustrato (Bruyneel *y col.*, 1990; Carraway y Hull, 1991) y modificaciones en las CAM (Yang *y col.*, 2004). Si bien en la actualidad es ampliamente aceptada la correlación entre la tumorigenicidad y la capacidad de crecimiento en medios

semisólidos con Methocel o Agar (Freedman y Shin, 1974; Kahn y Shin, 1979; Costea *y col.*, 2008; Tirino *y col.*, 2009) indicando uno de los eventos más importantes del proceso de transformación celular, este sería el único de los ensayos realizados que descartarían que la línea celular JPCS<sub>1</sub> se encuentre transformada.

### 5.6. Migración celular

En la línea celular JPCS<sub>1</sub>, el proceso de migración celular pone en evidencia la existencia de un aumento gradual de la motilidad celular a partir del SC 25, tendencia que se mantenida hasta el SC 50 coincidiendo con unos de los aspectos utilizados para señalar la transformación celular, como lo es la disminución de inhibición por contacto (Freshney, 2005). Un evento similar ocurre durante el mantenimiento *in vitro* de la línea celular EP156T derivada de epitelio de próstata e inmortalizada mediante la transfección de hTERT, la misma aun conserva muchas de las características del tejido de origen (Kogan *y col.*, 2006). Esta línea celular crece en monocapa y presenta inhibición por contacto, pero tras una extensa subcultivación *in vitro*, el cultivo celular ~~adquirió~~ adquiere características de la transformación celular como ser la pérdida de inhibición por contacto y evidenciar un aumento en la motilidad celular (Ke *y col.*, 2008).

### 5.7. Estado de la línea celular JPCS<sub>1</sub>

Como hemos señalado anteriormente la transformación celular es un proceso multietapa, lo que se hace evidente en base a los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral. Los ensayos orientados a corroborar anomalías en

los distintos niveles citados al principio de esta sección, como son la inestabilidad genética, algunos aspectos del crecimiento aberrante y la migración celular, pusimos en evidencia que las modificaciones en estos niveles no ocurren al mismo tiempo, sino que acontecen como cambios progresivos y secuenciales durante el mantenimiento de la línea celular JPCS<sub>1</sub>. El primero en manifestarse es la inestabilidad genética, la cual es fundamental para el desarrollo de todo proceso de transformación celular como lo propusieran Levan y Biesele (1958). Estos autores afirman acerca del origen de la transformación cancerosa el axioma “el cáncer es la consecuencia de la pérdida de la constancia cromosómica” (Levan y Bielsele, 1958). A pesar que ésta teoría fue perdiendo aceptación, en la actualidad se ha retomado y reformulado debido a la inconsistencia de otras teorías vigentes para explicar el proceso transformación (Walen, 2002). Es ampliamente conocido que las aberraciones cromosómicas originan una gran variabilidad en los cariotipos de las poblaciones celulares presentes en un cultivo celular. Esto quizás, aporte una heterogeneidad genética necesaria para la selección clonal posterior (Mamaeva, 1998; Heng *y col.*, 2006). Este mecanismo de inestabilidad genética y posterior evolución clonal ha sido sugerido como un mecanismo importante para la progresión oncogénica (Nowell, 1976; Gao *y col.*, 2007; Teixeira y Heim, 2011). En el caso de la línea celular JPCS<sub>1</sub>, la inestabilidad cromosómica se expresa en etapas tempranas del mantenimiento *in vitro*, mucho antes de manifestarse los cambios a nivel del control del crecimiento y migración celular. Es evidente que durante la evolución del cariotipo de la línea celular utilizada en el presente

trabajo de investigación, la selección clonal favoreció a aquellas células que poseían aberraciones cromosómicas que resultaron ser patognomónicas de la misma. En primera instancia, en la selección clonal se vieron favorecidas aquellas células que portaron una trisomía para el cromosoma 18, en una segunda etapa aquellas con trisomía en el cromosoma 6 y en tercer instancia las células que presentaron la deleción en el brazo corto del cromosoma 10 junto con aquéllas que presentaron una tetrasomía del cromosoma 6. Cabe resaltar que la evolución del cariotipo no se estabilizó completamente, ya que aún en el último SC estudiado, continúan haciéndose presentes aberraciones cromosómicas de índole estocásticas.

Según Freshney (2005) “la transformación implica el cambio fenotípico permanente espontáneo o inducido resultante de cambios heredables en el ADN y en la expresión génica”. En el caso de la línea celular JPCS<sub>1</sub> presenta una serie de modificaciones fenotípicas en los parámetros del crecimiento celular tales como una disminución del tiempo de duplicación poblacional, pérdida de la inhibición por contacto dada por un aumento de la densidad celular en confluencia y por un aumento en la capacidad migratoria, al igual que una disminución de los requerimientos de suero aportados externamente. Estas características se hacen evidentes en distintas etapas del mantenimiento de la línea celular. No obstante, en todos los casos es a partir del SC 40 donde se presentan las modificaciones más drásticas, lo cual se encuentra correlacionado con la acumulación de aberraciones cromosómicas encontradas durante el mantenimiento del cultivo celular tanto numéricas, e.g., tetrasomía del

cromosoma 6, trisomía del cromosoma 18, como estructurales, e.g., la delección del cromosoma 10. Resulta evidente por consiguiente, que aquellas células que durante la evolución del cariotipo fueron adquiriendo las aberraciones cromosómicas características de esta línea celular se vieron favorecidas siendo seleccionadas positivamente en el seno de la misma. Asimismo, la línea celular utilizada no demuestra crecimiento con independencia de anclaje al sustrato, el cual es un requisito de muchos autores para señalar el estado de la transformación celular (Pérez-Rodríguez *y col.*, 1981; Pérez-Rodríguez *y col.*, 1982). No obstante, según Freshney (2005), para que una línea celular sea considerada transformada debe presentar al menos uno de los tres cambios fenotípicos anteriormente propuestos (sección 1.2.2.2).

Por lo anteriormente expuesto en base a los resultados reportados en la presente Tesis Doctoral, a la línea celular JPCS<sub>1</sub>, a partir del SC 40 podemos considerarla transformada. Sin embargo, el proceso de transformación continúa, poniéndose en evidencia por las modificaciones encontradas en los estudios realizados en el subsiguiente SC 50. La línea celular en cuestión expresa un fenotipo donde las características de proliferación celular se encuentran alteradas teniendo varios puntos coincidentes con la descripción de los parámetros de la transformación propuesta por Freshney (2005), como son la disminución del tiempo de duplicación poblacional, crecimiento en ausencia de suero, pérdida de la inhibición por contacto dado por la disminución de la densidad limitante de la proliferación y aumento en la motilidad celular. El

único ensayo que no concuerda con la anterior descripción es el crecimiento independiente de anclaje.

A pesar de que *O. cuniculus* es una especie utilizada comúnmente en investigación médica y en pruebas en productos de consumo tales como medicamentos y cosméticos, la información respecto a las modificaciones biológicas acontecidas durante el mantenimiento o el cultivo de células provenientes de conejo neozelandés es sumamente escasa o fragmentaria cuando se la compara con otras especies de animales de laboratorio. Los aportes de la presente Tesis Doctoral permiten conocer algunas de las modificaciones acontecidas durante el proceso de transformación *in vitro*. Nuestros hallazgos sientan las bases de futuros estudios que permitirán recabar mayor información sobre los eventos observados, especialmente en aquellos vinculados a aspectos moleculares no incluidos en la presente Tesis Doctoral.

## 6. CONCLUSIONES

Al comienzo de esta investigación nos planteamos una serie de interrogantes vinculados a la transformación de las células fetales de conejo (*Oryctolagus cuniculus*).

Los resultados obtenidos pondrían de manifiesto que existe una serie de indicadores que señalan los acontecimientos ocurridos durante la transformación celular en la línea celular JPCS<sub>1</sub> establecida *in vitro* en la presente investigación.

Por lo expuesto podemos concluir que la línea celular JPCS<sub>1</sub>:

- Presenta inestabilidad cromosómica previa a los cambios en los parámetros de crecimiento y migración celular, evidenciando una tendencia al aumento del número cromosómico (hiperdiploidización), particularmente manifiesto por ganancias en los cromosomas 6 (trisomías y tetrasomías) y 18. Asimismo, demuestra una tendencia a la deleción de una porción del brazo corto del cromosoma 10 -del(10p)(13)- (sección 4.1).

- Exhibe estabilidad a nivel de los *loci* de microsatélites utilizados en el presente trabajo de tesis doctoral, sin haberse encontrado nuevas variantes alélicas, asimismo no se evidenció desbalance de los alelos en los marcadores heterocigotas (sección 4.2).

- Presenta un acortamiento del ciclo celular siendo un cambio abrupto entre los SCs 30 y 40, determinado por la disminución del tiempo de duplicación poblacional (sección 4.3.1).

- Demuestra una tendencia al aumento progresivo de la densidad limitante de la proliferación celular a medida que se incrementa el tiempo de cultivo *in vitro*, exhibiendo una disminución progresiva de la inhibición por contacto (sección 4.3.2).

- En las etapas más avanzadas del mantenimiento de la línea celular se observa un crecimiento con independencia de factores de crecimiento aportados por el suero fetal bovino en el medio de cultivo, demostrando una disminución de las necesidades de los mismos, ya sea por producción autócrina o por presentar algún mecanismo de señalización intracelular alterado (sección 4.4).

- No exhibe crecimiento con independencia de anclaje en ningún momento del mantenimiento del cultivo celular *in vitro* (sección 4.5).

- Exhibe un aumento de la capacidad migratoria de las células a partir del SC 25 tendencia que se acentúa en el SC 40, demostrando una disminución de la inhibición por contacto en concordancia con los ensayos de proliferación celular (sección 4.6).

- Por todo lo expuesto anteriormente la línea celular se encuentra transformada a partir del SC 40.

En resumen los resultados presentados en este trabajo de Tesis Doctoral indican que los eventos de inestabilidad genética, manifestada en este caso por la heteroploidía seguido de una selección clonal, son los eventos iniciales de la transformación celular en los cultivos obtenidos a partir de piel de conejo. Dichos eventos se anticipan a los otros estudiados como son el control de crecimiento aberrante y la migración celular en el proceso de transformación de la línea celular JPCS<sub>1</sub>.

## GLOSARIO

**Apoptosis:** proceso activo de muerte celular programada. Caracterizado por la ruptura del ADN cromosómico, la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear y celular.

**Biopsia:** muestra de un tejido u órgano.

**Cariotipo:** presentación de los pares cromosómicos de una célula ordenados por tamaño y morfología.

**Confluencia:** monocapa celular en la cual todas las células se encuentran en contacto con otras en toda su periferia, y no hay sustrato libre de crecimiento.

**Cromosoma marcador:** cromosoma estructuralmente anormal en el cual no se puede identificar las partes que lo componen.

**Cromosoma homólogo:** Cromosomas que forman un par y recombinan durante la meiosis. Tienen la misma estructura y los mismo *loci* pero distintos alelos.

**Cultivo celular:** crecimiento de células disociadas del tejido original sea por migración celular o dispersión física o química.

**Cultivo celular primario:** cultivo iniciado de células antes del primer subcultivo.

**Diferenciación celular:** proceso por el cual una célula sufre un cambio hacia un tipo celular claramente especializado.

**Electroferograma:** gráfico realizado con los resultados de un análisis genético.

**Factor de crecimiento:** proteína que debe estar presente en el medio ambiente extracelular (medio de cultivo o cuerpo de un animal) para el crecimiento y desarrollo normal de ciertos tipos de células.

**Grupo homogéneo:** se denomina a aquellas poblaciones entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas en el ANOVA.

**Inhibición por contacto:** Inhibición de la motilidad celular y la proliferación celular cuando las células se encuentran en contacto con otras células adyacentes como sucede en un cultivo celular en confluencia.

**Línea celular:** cultivo celular propagado después del cultivo primario.

**Línea celular establecida:** ver línea celular continua.

**Línea celular continua:** línea celular con la capacidad de mantenerse en cultivo de forma infinita. Línea celular establecida y línea celular inmortalizada son términos homólogos con éste.

**Oncogen:** gen capaz de inducir una o más características de las células cancerígenas.

**Protooncogen:** gen celular normal que puede convertirse a un oncogen; un gen con el potencial de causar cáncer pero que requiere de alguna alteración para transformarse en un oncogen.

**Senescencia celular:** pérdida de la capacidad proliferativa de las células en cultivo *in vitro*.

**Subcultivo:** transferencia de células de un recipiente de cultivo a otro.

**Transformación:** conversión de células normales en células tumorales en cultivo.

**Translocación Robertsoniana:** variante de la translocación recíproca que únicamente involucra a cromosomas acrocéntricos.

**Tumorigenicidad:** capacidad de generar tumores.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, col. y, 1993. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260, 812-816.
- Aaronson SA, Jainchill LJ, Todaro GJ, 1970. Murine sarcoma virus transformation of BALB-3T3 cells: lack of dependence on murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 66, 1236-1243.
- Abe R, Tebbi CK, Yasuda H, Sandberg AA, 1982. North american Burkitt-type ALL with a variant translocation t(8;22). *Cancer Genet Cytogenet* 7, 185-195.
- Agostini M, Enzo MV, Morandi L, Bedin C, Pizzini S, Mason S, Bertorelle R, Urso E, Mescoli C, Lise M, Pucciarelli S, Nitti D, 2010. A ten markers panel provides a more accurate and complete microsatellite instability analysis in mismatch repair-deficient colorectal tumors. *Cancer Biomark* 6, 49-61.
- Alexander K, Yang HS, Hinds PW, 2004. Cellular senescence requires CDK5 repression of Rac1 activity. *Mol Cell Biol* 24, 2808-2819.
- Annecke K, Schmitt M, Euler U, Zerm M, Paepke D, Paepke S, von Minckwitz G, Thomssen C, Harbeck N, 2008. uPA and PAI-1 in breast cancer: review of their clinical utility and current validation in the prospective NNBC-3 trial. *Adv Clin Chem* 45, 31-45.
- Barrett JC, 1980. A preneoplastic stage in the spontaneous neoplastic transformation of syrian hamster embryo cells in culture. *Cancer Res* 40, 91-94.
- Bayreuther K, Francz PI, Gogol J, Kontermann K, 1992. Terminal differentiation, aging, apoptosis, and spontaneous transformation in fibroblast stem cell systems *in vivo* and *in vitro*. *Ann N Y Acad Sci* 663, 167-179.
- Beothe T, Nagy A, Farkas L, Kovacs G, 2012. P53 mutation and LOH at chromosome 9 in urothelial carcinoma. *Anticancer Res* 32, 523-527.
- Berginc G, Bracko M, Ravnik-Glavac M, Glavac D, 2009. Screening for germline mutations of MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 genes in Slovenian

- colorectal cancer patients: implications for a population specific detection strategy of Lynch syndrome. *Fam Cancer* 8, 421-429.
- Bernheim A, Berger R, Lenoir G, 1981. Cytogenetic studies on African Burkitt's lymphoma cell lines: t(8;14), t(2;8) and t(8;22) translocations. *Cancer Genet Cytogenet* 3, 307-315.
- Berwald Y, Sachs L, 1963. *In vitro* cell transformation with chemical carcinogens. *Nature* 200, 1182-1184.
- Berwald Y, Sachs L, 1965. *In vitro* transformation of normal cells to tumor cells by carcinogenic hydrocarbons. *J Natl Cancer Inst* 35, 641-661.
- Bianchi M, Larramendy ML, Merani S, Bianchi NO, Zabala J, 1977. Cambios cromosómicos específicos del sarcoma 180 ascítico murino (S180 A). *Mendeliana* 2, 25-37.
- Bianchi NO, Ayres J, Sweet BH, 1975. Diploidy and heteroploidy in cultured cells derived from New Zealand rabbits. *Cytologia* 40, 119-127.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, S S, 1998. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58, 5248-5257.
- Bonatz G, Frahm SO, Andreas S, Heidorn K, Jonat W, Parwaresch R, 1998. Telomere shortening in uterine leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol* 179, 591-596.
- Borek C, Sachs L, 1966a. The difference in contact inhibition of cell replication between normal cells and cells transformed by different carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 56, 1705-1711.
- Borek C, Sachs L, 1966b. *In vitro* cell transformation by x-irradiation. *Nature* 210, 276-278.

- Brack C, Lithgow G, Osiewacz H, Toussaint O, 2000 EMBO WORKSHOP REPORT: Molecular and cellular gerontology Serpiano, Switzerland, September 18-22, 1999. *EMBO J* 19, 1929-1934.
- Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith L, Lescoe M, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, col. y, 1994. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 368, 258-261.
- Bruce SA, Deamond SF, Ts'o PO, 1986. In vitro senescence of Syrian hamster mesenchymal cells of fetal to aged adult origin. Inverse relationship between in vivo donor age and in vitro proliferative capacity. *Mech Ageing Dev* 34, 151-173.
- Bruyneel EA, Debray H, De Mets M, Mareel MM, Montreuil J, 1990. Altered glycosylation in Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells after transformation by murine sarcoma virus. *Clin Exp Metastasis* 8, 241-253.
- Campo MS, 2002. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res* 89, 249-261.
- Carlin C, Phillips PD, Brooks-Frederich K, Knowles BB, Cristofalo VJ, 1994 Cleavage of the epidermal growth factor receptor by a membrane-bound leupeptin-sensitive protease active in nonionic detergent lysates of senescent but not young human diploid fibroblast. *J Cell Physiol* 160, 427-434.
- Carraway KL, Hull SR, 1991. Cell surface mucin-type glycoproteins and mucin-like domains. *Glycobiology* 1, 131-138.
- Costea DE, Gammon L, Kitajima K, Harper L, Mackenzie IC, 2008. Epithelial stem cells and malignancy. *J Anat* 213, 45-51.
- Cristofalo VJ, 1988. Cellular biomarkers of aging. *Exp Gerontol* 23, 297-307.
- Cristofalo VJ, Pignolo RJ, 1993. Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture. *Physiol Rev* 73, 617-638.

- Cristofalo VJ, Sharf BB, 1973. Cellular senescence and DNA synthesis. Thymidine incorporation as a measure of population age in human diploid cells. *Exp Cell Res* 76, 419-427.
- Croce CM, 1991. Genetic approaches to the study of the molecular basis of human cancer. *Cancer Res* 51, 5015-5018.
- Cross M, Dexter TM, 1991. Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. *Cell* 64, 271-280.
- Cupić DF, Tesar EC, Ilijas KM, Nemrava J, Kovacević M, 2011. Expression of matrix metalloproteinase 9 in primary and recurrent breast carcinomas. *Coll Antropol* 35, 7-10.
- Chadwick KH, Leenhouts HP, 1981. *The Molecular Theory of Radiation Biology*. Springer, Berlin.
- Chantry-Darmon C, Urien C, de Rochambeau H, Allain D, Pena B, Hayes H, Grohs C, Crihiu EP, Deretz-Picoulet S, Larzul C, Save C, Neau A, Chardon P, Rogel-Gaillard C, 2006. A first-generation microsatellite-based integrated genetic and cytogenetic map for the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and localization of angora and albino. *Anim Genet* 37, 335-341.
- Chaves P, Cruz C, Lage P, Claro I, Cravo M, Leitão CN, Soares J, 2000. Immunohistochemical detection of mismatch repair gene proteins as a useful tool for the identification of colorectal carcinoma with the mutator phenotype. *J Pathol* 191, 355-360.
- Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN, 1995 Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 4337-4341.
- Da Silva WAJ, Bortolini MC, Meyer D, Salzano FM, Elion J, Krishnamoorthy R, Schneider MP, De Guerra DC, Layrisse Z, Castellano HM, Weimer TD, Zago MA, 1999. Genetic diversity of two African and sixteen South American populations determined on the basis of six hypervariable loci. *Am J Phys Anthropol* 109, 425-437.

- Danø K, Andreassen PA, Grøndahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L, 1985. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res* 44, 139-266.
- Deuel TF, Pierce GF, Yeh HJ, Shawver LK, Milner PG, Kimura A, 1987. Platelet-derived growth factor/sis in normal and neoplastic cell growth. *J Cell Physiol Suppl* 5, 95-99.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, col, 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 9363-9367.
- Ding XJ, Liu MX, Ao L, Liang YR, Cao Y, 2011. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 12q in non-small-cell lung carcinomas. *Virchows Arch* 458, 561-569.
- DiPaolo JA, Donovan P, Nelson R, 1969. Quantitative studies of *in vitro* transformation by chemical carcinogens. *J Natl Cancer Inst* 42, 867-874.
- Dorner M, Zucol F, Berger C, Byland R, Melroe GT, Bernasconi M, Speck RF, Nadal D, 2008. Distinct ex vivo susceptibility of B-cell subsets to epstein-barr virus infection according to differentiation status and tissue origin. *J Virol* 82, 4400-4412.
- Duffy MJ, 2004. The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr Pharm Des* 10, 39-49.
- Dulbecco R, Elkington J, 1973. Conditions limiting multiplication of fibroblastic and epithelial cells in dense cultures. *Nature* 246, 197-199.
- Dumont P, Burton M, Chen QM, Gonos ES, Frippiat C, Mazarati JB, Eliaers F, Remacle J, Toussaint O, 2000. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med* 28, 361-373.
- Eagle H, Foley GE, Koprowski H, Lazarus H, Levine EM, Adams RA, 1970. Growth characteristics of virus-transformed cells. Maximum population

- density, inhibition by normal cells, serum requirement, growth in soft agar, and xenogeneic transplantability. *J Exp Med* 131, 963-979.
- Earle WR, 1943. Production of malignancy *in vitro* IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J Natl Cancer Inst* 4, 165-212.
- Eckert KA, Hile SE, 2009. *Mol Carcinog*. 2009 Apr;48(4):379-88.
- Every microsatellite is different: Intrinsic DNA features dictate mutagenesis of common microsatellites present in the human genome. 48, 379-388.
- Elliott DD, Sherman SI, Busaidy NL, Williams MD, Santarpia L, Clayman GL, El-Naggar AK, 2008. Growth factor receptors expression in anaplastic thyroid carcinoma: potential markers for therapeutic stratification. *Hum Pathol* 39, 15-20.
- Escudero-Lourdes C, Wu T, Camarillo JM, Gandolfi AJ, 2012. Interleukin-8 (IL-8) over-production and autocrine cell activation are key factors in monomethylarsonous acid [MMA(III)]-induced malignant transformation of urothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 258, 10-18.
- Eshleman JR, Donover PS, Littman SJ, Swinler SE, Li GM, Lutterbaugh JD, Willson JK, Modrich P, Sedwick WD, Markowitz SD, Veigl ML, 1998. Increased transversions in a novel mutator colon cancer cell line. *Oncogene* 16, 1125-1130.
- Fan T, Wang D, Zhao J, Wang J, Fu Y, Guo R, 2009. Establishment and characterization of a novel untransfected corneal endothelial cell line from New Zealand white rabbits. *Mol Vis* 15, 1070-1078.
- Fata JE, Werb Z, Bissell MJ, 2004. Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes. *Breast Cancer Res* 6, 1-11.
- Ferber A, Chang C, Sell C, Ptasznik A, Cristofalo VJ, Hubbard K, Ozer HL, Adamo M, Roberts CTJ, LeRoith D, col, 1993. Failure of senescent human fibroblasts to express the insulin-like growth factor-1 gene. *J Biol Chem* 268, 17883-17888.

- Fischer J, Palmedo G, von Knobloch R, Bugert P, Prayer-Galetti T, Pagano F, Kovacs G, 1998. Duplication and overexpression of the mutant allele of the MET proto-oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours. *Oncogene* 17, 733-739.
- Fontana A, Hengartner H, deTribolet N, Weber E, 1984. Glioblastoma cells release interleukin 1 and factors inhibiting interleukin 2-mediated effects. *J Immunol* 132, 1837-1844.
- Ford CE, Pollock DL, Gustavsson I, 1980. Proceedings of the First International Conference for the Standardisation of Banded Karyotypes of Domestic Animals. *Hereditas* 92, 145-162.
- Franken N, Rodermond H, Stap J, Haveman J, van Bree C, 2006. Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nat Protoc* 1, 2315-2319.
- Freedman VH, Shin SI, 1974. Cellular tumorigenicity in nude mice: correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell* 3, 355-359.
- Freshney RI, 2005. Culture of animal cells. A manual of basic technique. Wiley, New York.
- Freshney RI, Sherry A, Hassanzadah M, Freshney M, Crilly P, Morgan D, 1980. Control of cell proliferation in human glioma by glucocorticoids. *Br J Cancer* 41, 857-866.
- Friedl P, Zänker KS, Bröcker EB, 1998. Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function. *Microsc Res Tech* 43, 369-378.
- Funkhouser WKJ, Lubin IM, Monzon FA, Zehnbauser BA, Evans JP, Ogino S, Nowak JA, 2012. Relevance, pathogenesis, and testing algorithm for mismatch repair-defective colorectal carcinomas: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn* 14, 91-103.
- Gao C, Furge K, Koeman J, Dykema K, Su Y, Cutler ML, Werts A, Haak P, Vande Woude GF, 2007. Chromosome instability, chromosome transcriptome, and clonal evolution of tumor cell populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 8995-9000.

- Gey GO, 1941. Cytological and cultural observation on transplantable rat sarcoma produced by the inoculation of altered normal cells maintained in continuous culture. *Cancer Res* 1, 737.
- Gilbert F, Balaban G, Moorhead P, Bianchi D, Schlesinger H, 1982. Abnormalities of chromosome 1p in human neuroblastoma tumors and cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 7, 33-42.
- Giovanella BC, Stehlin JS, Williams LJJ, 1974. Heterotransplantation of human malignant tumors in "nude" thymusless mice. II. Malignant tumors induced by injection of cell cultures derived from human solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 52, 921-930.
- Goldstein DB, Schlötterer C, 1999. *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, London.
- Gorbunova V, Seluanov A, 2009. Coevolution of telomerase activity and body mass in mammals: from mice to beavers. *Mech Ageing Dev* 130, 3-9.
- Graeven U, Rodeck U, Karpinski S, Jost M, Philippou S, Schmiegel W, 2001. Modulation of angiogenesis and tumorigenicity of human melanocytic cells by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *Cancer Res* 61, 7282-7290.
- Halberstaedter L, Doljanski L, Tenenbaum E, 1941. Experiments on the cancerization of cells *in vitro* by means of Rous sarcoma agent. *Br J Exp Pathol* 22, 179-187.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD, 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol Electron* 4, 9.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW, 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.
- Harvey JJ, 1964. An Unidentified virus which causes the rapid production of tumors in mice. *Nature* 204, 1104-1105.
- Hayflick L, Moorhead PS, 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621.

- Heim S, Mitelman F, 1986. Chromosome abnormalities in the myelodysplastic syndromes. *Clin Haematol* 15, 1003-1021.
- Heng HHQ, Stevens JB, Liu G, Bremer SW, Ye KJ, Reddy PV, Wu GS, Wang YA, Tainsky MA, Ye CJ, 2006. Stochastic cancer progression driven by non-clonal chromosome aberrations. *J Cell Physiol* 208, 461-472.
- Herbert B, Pitts AE, Baker SI, Hamilton SE, Wright WE, Shay J W, Corey DR, 1999. Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 14276-14281.
- Herbig U, Sedivy JM, 2006. Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story. *Mech Ageing Dev* 127, 16-24.
- Hertle MD, Adams JC, Watt FM, 1991. Integrin expression during human epidermal development *in vivo* and *in vitro*. *Development* 112, 193-506.
- Hoffman B, Amanullah A, Shafarenko M, Liebermann DA, 2002. The proto-oncogene c-myc in hematopoietic development and leukemogenesis. *Oncogene* 21, 3414-3421.
- Holt SE, Wright WE, Shay JW, 1997. Multiple pathways for the regulation of telomerase activity. *Eur J Cancer* 33, 761-766.
- Hu GF, Riordan JF, Vallee BL, 1997. A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 2204-2209.
- Hynes RO, Humphries KC, 1974. Characterization of the external proteins of hamster fibroblasts. *J Cell Biol* 62, 438-448.
- Janin N, 2000. A simple model for carcinogenesis of colorectal cancers with microsatellite instability. *Adv Cancer Res* 77, 189-221.
- Jenkins DE, Hornig YS, Oei Y, Dusich J, Purchio T, 2005. Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive *in vivo* detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice. *Breast Cancer Res* 7, 444-454.

- Jones L, Wei G, Sevcikova S, Phan V, Jain S, Shieh A, Wong JC, Li M, Dubansky J, Maunakea ML, Ochoa R, Zhu G, Tennant TR, Shannon KM, Lowe SW, Le Beau MM, Kogan SC, 2010. Gain of MYC underlies recurrent trisomy of the MYC chromosome in acute promyelocytic leukemia. *J Exp Med* 207, 2581-2594.
- Joukov V, Kaipainen A, Jeltsch M, Pajusola K, Olofsson B, Kumar V, Eriksson U, Alitalo K, 1997. Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C. *J Cell Physiol* 173, 211-215.
- Kahn P, Shin SI, 1979. Cellular tumorigenicity in nude mice. Test of associations among loss of cell-surface fibronectin, anchorage independence, and tumor-forming ability. *J Cell Biol* 82, 1-16.
- Kang MK, A K, Shin KH, Baluda MA, Park NH, 2004. Senescence occurs with hTERT repression and limited telomere shortening in human oral keratinocytes cultured with feeder cells. *J Cell Physiol* 199, 364-370.
- Kang MK, Guo W, Park NH, 1998. Replicative senescence of normal human oral keratinocytes is associated with the loss of telomerase activity without shortening of telomeres. *Cell Growth Differ* 9, 85-95.
- Karpas A, Dremucheva A, Czepulkowski BH, 2001. A human myeloma cell line suitable for the generation of human monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 1799-1780.
- Katsch K, de Jong SJ, Schmidt M, Müller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, Albrecht JC, Biesinger B, 2012. Species restriction of Herpesvirus saimiri and Herpesvirus ateles: Human lymphocyte transformation correlates with distinct signaling properties of viral oncoproteins. *Virus Res* 165, 179-189.
- Kaur S, Larramendy ML, Vauhkonen H, Böhling T, Knuutila S, 2007. Loss of TP53 in sarcomas with 17p12 to approximately p11 gain. A fine-resolution oligonucleotide array comparative genomic hybridization study. *Cytogenet Genome Res* 116, 153-157.
- Ke XS, Qu Y, Goldfinger N, Rostad K, Hovland R, Akslen LA, Rotter V, Øyan AM, Kalland KH, 2008. Epithelial to mesenchymal transition of a primary

- prostate cell line with switches of cell adhesion modules but without malignant transformation. *PloS one* 3, e3368.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW, 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-2015.
- Kirsten WH, Mayer LA, 1967. Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *J Natl Cancer Inst* 39, 311-335.
- Knuutila S, Teerenhovi L, Larramendy ML, Elonen E, Franssila KO, Nylund SJ, Timonen T, Heinonen K, Mahlamäki E, Winqvist R, col, 1994. Cell lineage involvement of recurrent chromosomal abnormalities in hematologic neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer* 10, 95-102.
- Kogan I, Goldfinger N, Milyavsky M, Cohen M, Shats I, Dobler G, Klocker H, Wasylyk B, Voller M, Aalders T, Schalken JA, Oren M, Rotter V, 2006. hTERT-immortalized prostate epithelial and stromal-derived cells: an authentic in vitro model for differentiation and carcinogenesis. *Cancer Res* 66, 3531-3540.
- Korenberg JR, Freedlender EF, 1974. Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. *Chromosoma* 48, 355-360.
- Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD, 2000. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* 113, 3613-3622.
- Laferté S, Loh LC, 1992. Characterization of a family of structurally related glycoproteins expressing beta 1-6-branched asparagine-linked oligosaccharides in human colon carcinoma cells. *Biochem J* 283, 193-201.
- Lalosević D, Lalosević V, Lazarević-Ivanc L, Knezević I, 2008. BHK-21 cell culture rabies vaccine: immunogenicity of a candidate vaccine for humans. *Dev Biol (Basel)* 131, 421-429.
- Larramendy ML, Huhta T, Vettenranta K, El-Rifai W, Lundin J, Pakkala S, Saarinen-Pihkala UM, Knuutila S, 1998. Comparative genomic

- hybridization in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 10, 1638-1444.
- Lea D, 1946. *Actions of Radiation on Living Cells*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomäki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nyström-Lahti M, col. y, 1993. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer* 75, 1215-1225.
- Leal MF, Martins do Nascimento JL, da Silva CE, Vita Lamarão MF, Calcagno DQ, Khayat AS, Assumpção PP, Cabral IR, de Arruda Cardoso Smith M, Burbano RR, 2009. Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 195, 85-91.
- Lester BR, McCarthy JB, 1992. Tumor cell adhesion to the extracellular matrix and signal transduction mechanisms implicated in tumor cell motility, invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 11, 31-44.
- Levan A, Bielsele JJ, 1958. Role of chromosomes in cancerogenesis, as studied in serial tissue culture of mammalian cells. *Ann N Y Acad Sci* 71, 1022-1053.
- Levine A, 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
- Lewin B, 2001. *Genes VII*. Marbán, Madrid, España.
- Liang CC, Park A, YGuan JL, 2007. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nat Protoc* 2, 329-333.
- Liotta LA, 1987. Biochemical mechanisms of tumor invasion and metastases. *Clin Physiol Biochem* 5, 190-199.
- Look RM, Lim SW, Schreck RR, Lee S, Fuerst MP, Lawrence GN, Kusuanco DA, Kessler CE, Giles FJ, 1995. Burkitt translocation (8;22)(q24;q11) in a patient with multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* 82, 100-102.

- Lu T, Hano H, 2008. Deletion at chromosome arms 6q16-22 and 10q22.3-23.1 associated with initiation of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 11, 357-361.
- Lundblad V, Szostak JW, 1989. A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* 57, 633-643.
- Lynch HT, Smyrk T, Lynch J, 1997. An update of HNPCC (Lynch syndrome). *Cancer Genet Cytogenet* 93, 84-99.
- Macieira-Coelho A, 2000. Comparative biology of cell immortalization. *Prog Mol Subcell Biol* 24, 51-80.
- Majumdar K, Radotra BD, Vasishta RK, Pathak A, 2009. Platelet-derived growth factor expression correlates with tumor grade and proliferative activity in human oligodendrogliomas. *Surg Neurol* 72, 54-60.
- Mamaeva SE, 1998. Karyotypic evolution of cells in culture: a new concept. *Int Rev Cytol* 178, 1-40.
- Marek L, Ware KE, Fritzsche A, Hercule P, Helton WR, Smith JE, McDermott LA, Coldren CD, Nemenoff RA, DT M, Helfrich BA, Bunn PAJ, easley LE, 2009. Fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor-mediated autocrine signaling in non-small-cell lung cancer cells. *Mol Pharmacol* 75, 196-207.
- Martin GM, Sprague CA, Norwood TH, Pendergrass WR, 1974. Clonal selection, attenuation and differentiation in an *in vitro* model of hyperplasia. *Am J Pathol* 74, 137-154.
- Martin SA, Hewish M, Lord CJ, Ashworth A, 2010. Genomic instability and the selection of treatments for cancer. *J Pathol* 220, 281-289.
- Mayer M, Kulig A, Sygut J, Dziki A, Simon D, Latos-Bieleńska A, Ferenc T, 2007. Molecular cytogenetic analysis of chromosome aberrations in desmoid tumors. *Pol J Pathol* 58, 167-171.
- McCormick JJ, Maher VM, 1989. Malignant transformation of mammalian cells in culture, including human cells. *Environ Mol Mutagen* 14, 105-113.
- Mead LJ, Jenkins MA, Young J, Royce SG, Smith L, St John DJ, Macrae F, Giles GG, Hopper JL, Southey MC, 2007. Microsatellite instability markers for

- identifying early-onset colorectal cancers caused by germ-line mutations in DNA mismatch repair genes. *Clin Cancer Res* 13, 2865-2869.
- Mege RM, Matsuzaki F, Gallin WJ, Goldberg JI, Cunningham BA, Edelman GM, 1988. Construction of epithelioid sheets by transfection of mouse sarcoma cells with cDNAs for chicken cell adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 7274-7278.
- Metcalf D, 1990. The colony stimulating factors. Discovery, development, and clinical applications. *Cancer* 65, 2185-2195.
- Miles LA, Plow EF, 1988. Plasminogen receptors: ubiquitous sites for cellular regulation of fibrinolysis. *Fibrinolysis* 2, 61-71.
- Mitelman F, 1994. Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer. Wiley-Liss, New York.
- Mitelman F, 2000. Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat Res* 462, 247-253.
- Monnier VM, 1990. Nonenzymatic glycosylation, the Maillard reaction and the aging process. *J Geront* 45, 105-111.
- Morgan SJ, Darling DC, 1993. Cultivo de Células Animales. ACRIBIA S.A., Zaragoza.
- Nicolson GL, 1976. Trans-membrane control of the receptors on normal and tumor cells. II. Surface changes associated with transformation and malignancy. *Biochim Biophys Acta* 458, 1-72.
- Niewiarowski S, Regoeczi E, Mustard JF, 1972. Adhesion of fibroblasts to polymerizing fibrin and retraction of fibrin induced by fibroblasts. *Proc Soc Exp Biol Med* 140, 199-204.
- Nitta M, Katabuchi H, Ohtake H, Tashiro H, Yamaizumi M, Okamura H, 2001. Characterization and tumorigenicity of human ovarian surface epithelial cells immortalized by SV40 large T antigen. *Gynecol Oncol* 81, 10-17.
- Nowak MA, Komarova NL, Sengupta A, Jallepalli PV, Shih I, Vogelstein B, Lengauer C, 2002. The role of chromosomal instability in tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 16226-16231.

- Nowell PC, 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.
- Ohyashiki JH, Ohyashiki K, Ito H, Toyama K, 1988. Molecular and clinical investigations in Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 33, 119-126.
- Orgel LE, 1963 The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proc Natl Acad Sci USA* 49, 517-521.
- Painter TS, 1926. Studies in mammalian spermatogenesis.V I. The chromosomes of the rabbit. *J Morphol* 43, 1-43.
- Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, col. y, 1994. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 263, 1625-1629.
- Parker AR, Leonard CP, Hua L, Francis RO, Dhara S, Maitra A, Eshleman JR, 2004. A subgroup of microsatellite stable colorectal cancers has elevated mutation rates and different responses to alkylating and oxidising agents. *Br J Cancer* 90, 1666-1671.
- Parker RC, 1961. *Methods of Tissue Culture*. Hoeber Inc., New York.
- Patton KT, Cheng L, Papavero V, Blum MG, Yeldandi AV, Adley BP, Luan C, Diaz LK, Hui P, Yang XJ, 2006. Benign metastasizing leiomyoma: clonality, telomere length and clinicopathologic analysis. *Mod Pathol* 19, 130-140.
- Paul D, Henahan M, Walter S, 1974. Changes in growth control and growth requirements associated with neoplastic transformation *in vitro*. *J Natl Cancer Inst* 53, 1499-1503.
- Paul J, 1975. *Cell & Tissue Culture*. Churchill Livingstone, London.
- Pawlak G, Helfman DM, 2001. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 11, 41-47.
- Peltomäki P, Lothe RA, Aaltonen LA, Pylkkänen L, Nyström-Lahti M, Seruca R, David L, Holm R, Ryberg D, Haugen A, Brøgger A, Børresen AL, de la Chapelle A, 1993. Microsatellite instability is associated with tumors that

- characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 53, 5853-5855.
- Pérez-Rodríguez R, Chambard JC, Van Obberghen-Schilling E, Franchi A, Pouysségur J, 1981. Emergence of hamster fibroblast tumors in nude mice-evidence for *in vivo* selection leading to loss of growth factor requirement. *J Cell Physiol* 109, 387-396.
- Pérez-Rodríguez R, Franchi A, Deys BF, Pouysségur J, 1982. Evidence that hamster fibroblasts tumors emerge in nude mice through the process of two *in vivo* selections leading to growth factor "relaxation" and to immune resistance. *Int J Cancer* 29, 309-314.
- Perry P, Wolff S, 1974. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251, 156-158.
- Phipps SM, Berletch JB, Andrews LG, Tollefsbol TO, 2007. Aging cell culture: methods and observations. *Methods Mol Biol* 317, 9-19.
- Pollard TD, Borisy GG, 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.
- Pontén J, 1971. Spontaneous and virus induced transformation in cell culture. *Virol Monogr* 8.
- Poulios E, Trougakos IP, Chondrogianni N, Gonos ES, 2007. Exposure of human diploid fibroblasts to hypoxia extends proliferative life span. *Ann N Y Acad Sci* 1119, 9-19.
- Puck TT, Waldren CA, Tijo JH, 1966. Some data bearing on the long term growth on mammalian cells *in vitro*. In: PL Krohn. New York, IP, Div. John Wiley & Sons, Inc (Ed.). Symposium on Topics in the Biology of Aging, San Diego - California, pp. 101-123.
- Raskind WH, Disteché CM, Keating A, Singer JW, 1987. Correlation between cytogenetic and molecular findings in human chronic myelogenous leukemia lines EM-2 and EM-3. *Cancer Genet Cytogenet* 25, 271-284.
- Reddy GS, Srinivasan VA, 1992. Use of BHK cell culture-adapted Newcastle disease virus for immunization of chicks. *Vaccine* 10, 164-166.

- Revell SH, 1959. The accurate estimation of chromatid breakage, and its relevance to a new interpretation of chromatid aberrations induced by ionizing radiations. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 150, 563-589.
- Rogalla P, Rohen C, Hennig Y, Deichert U, Bonk U, Bullerdiek J, 1995. Telomere repeat fragment sizes do not limit the growth potential of uterine leiomyomas. *Biochem Biophys Res Commun* 211, 175-182.
- Rønne M, 1984. Fluorouracil synchronization of human lymphocyte cultures. Induction of high resolution R-banding by simultaneous *in vitro* exposure to 5-bromodeoxyuridine/Hoechst 33258. *Hereditas* 101, 205-208.
- Rønne M, 1985. Double synchronization of human lymphocyte cultures: selection for high-resolution banded metaphases in the first and second division. *Cytogenet Cell Genet* 39, 292-295.
- Rønne M, Thust R, 1983. Chromosome banding by *in vitro* exposure to dA-dT probes and BUdR. Relationship between DNA base clusters, replicon pattern, and banding. *Hereditas* 99, 245-250.
- Ross MH, Pawlina W, 2007. Histología. Texto y atlas color con biología celular y molecular. Panamericana, Ciudad Autonoma de Buenos Aires.
- Roth V, 2006. <http://www.doubling-time.com/compute.php>.
- Rubin H, 1997. Cell aging *in vivo* and *in vitro*. *Mech Ageing Dev* 98, 1-35.
- Rubin H, 2008. Cell-cell contact interactions conditionally determine suppression and selection of the neoplastic phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 6215-6221.
- Saetta AA, Stamatelli A, Karlou M, Michalopoulos NV, Patsouris E, Aroni K, 2007. Mutations of microsatellite instability target genes in sporadic basal cell carcinomas. *Pathol Res Pract* 203, 849-855.
- Saksela O, Rifkin DB, 1988. Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu Rev Cell Biol* 4, 93-126.
- Sanchez-Cespedes M, Ahrendt SA, Piantadosi S, Rosell R, Monzo M, Wu L, Westra WH, Yang SC, Jen J, Sidransky D, 2001. Chromosomal alterations

- in lung adenocarcinoma from smokers and nonsmokers. *Cancer Res* 61, 1309-1313.
- Sato N, Sabzevari H, Fu S, Ju W, Petrus MN, Bamford RN, Waldmann TA, Tagaya Y, 2011. Development of an IL-15-autocrine CD8 T-cell leukemia in IL-15-transgenic mice requires the cis expression of IL-15R $\alpha$ . *Blood* 117, 4032-4040.
- Savage JRK, 2001. Chromosome Rearrangements. eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Sax K, 1941. Types and frequencies of chromosomal aberrations induced by X-ray. *Cold Spring Harbor Symposia Quant Biol* 9, 91-103.
- Schlötterer C, 1998. Genome evolution: are microsatellites really simple sequences? *Curr Biol* 8, 132-134.
- Schlötterer C, 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109, 365-371.
- Schlötterer C, Tautz D, 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res* 20, 211-215.
- Schmidt A, Hall MN, 1998. Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 305-338.
- Schmidt LS, Nickerson ML, Angeloni D, Glenn GM, Walther MM, Albert PS, Warren MB, Choyke PL, Torres-Cabala CA, Merino MJ, Brunet J, Bérez V, Borràs J, Sesia G, Middleton L, Phillips JL, Stolle C, Zbar B, Pautler SE, Linehan WM, 2004. Early onset hereditary papillary renal carcinoma: germline missense mutations in the tyrosine kinase domain of the met proto-oncogene. *J Urol* 172, 1256-1261.
- Selby PJ, Thomas JM, Monaghan P, Sloane J, Peckham MJ, 1980. Human tumour xenografts established and serially transplanted in mice immunologically deprived by thymectomy, cytosine arabinoside and whole-body irradiation. *Br J Cancer* 41, 52-61.

- Seluanov A, Chen Z, Hine C, Sasahara TH, Ribeiro AA, Catania KC, Presgraves DC, Gorbunova V, 2007. Telomerase activity coevolves with body mass not lifespan. *Aging Cell* 6, 45-52.
- Seluanov A, Hine C, Bozzella M, Hall A, Sasahara TH, Ribeiro AA, Catania KC, Presgraves DC, Gorbunova V, 2008. Distinct tumor suppressor mechanisms evolve in rodent species that differ in size and lifespan. *Aging Cell* 7, 813-823.
- Seshadri T, Campisi J, 1990. Repression of c-fos transcription and an altered genetic program in senescent human fibroblasts. *Science* 247, 205-209.
- Shade M, Woodward MA, Steel CM, 1980. Chromosome aberrations acquired *in vitro* by human B-cell lines. II. Distribution of break points. *J Natl Cancer Inst* 65, 101-109.
- Sherwood AL, Mutsaers SE, Peeva VK, Robinson C, deSilva CJ, Swanson NR, A LR, 2008. Spontaneously immortalized mouse mesothelial cells display characteristics of malignant transformation. *Cell Prolif* 41, 894-908.
- Shimozato O, Watanabe N, Goto M, Kobayashi Y, 1996. Cytokine production by SV40-transformed adherent synovial cells from rheumatoid arthritis patients. *Cytokine* 8, 99-105.
- Sohal RS, Agarwal S, Dubey A, Orr WC, 1993. Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 7255-7259.
- Sprecher CJ, Puers C, Lins AM, Schumm JW, 1996. General approach to analysis of polymorphic short tandem repeat loci. *Biotechniques* 20, 266-276.
- Staton C, Stribbling S, Tazzyman S, Hughes R, Brown N, Lewis C, 2004. Current methods for assaying angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Int J Exp Pathol* 85, 233-248.
- Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M, 2003. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 33, 919-926.

- Sweet BH, Hilleman MR, 1960. The vacuolating virus, S.V. 40. *Proc Soc Exp Biol Med* 105, 420-427.
- Szuster A, Kosz-Vnenchak M, 2005. Autocrine growth regulation of W12 and GCA cells in culture. *Folia Histochem Cytobiol* 43, 91-102.
- Takenaka Y, Inohara H, Yoshii T, Oshima K, Nakahara S, Akahani S, Honjo Y, Yamamoto Y, Raz A, Kubo T, 2003. Malignant transformation of thyroid follicular cells by galectin-3. *Cancer Lett* 30, 111-119.
- Teixeira MR, Heim S, 2011. Cytogenetic analysis of tumor clonality. *Adv Cancer Res* 112, 127-149.
- Tello-Montoliu A, Patel JV, Lip GY, 2006. Angiogenin: a review of the pathophysiology and potential clinical applications. 4, 1864-1874.
- Testa JR, Graziano SL, 1993. Molecular implications of recurrent cytogenetic alterations in human small cell lung cancer. *Cancer Detect Prev* 17, 267-277.
- Tirino V, Camerlingo R, Franco R, Malanga D, La Rocca A, Viglietto G, Rocco G, Pirozzi G, 2009. The role of CD133 in the identification and characterisation of tumour-initiating cells in non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 36, 446-453.
- Todaro GJ, De Larco JE, 1978. Growth factors produced by sarcoma virus-transformed cells. *Cancer Res* 38, 4147-4154.
- Todaro GJ, Green H, Goldberg BD, 1964. Transformation of properties of an established cell line by SV40 and Polyoma Virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 51, 66-73.
- Tokar EJ, Diwan BA, Waalkes MP, 2010. Arsenic exposure transforms human epithelial stem/progenitor cells into a cancer stem-like phenotype. *Environ Health Perspect* 118, 108-115.
- Tong M, Lloyd B, Pei P, Mallery SR, 2008. Human head and neck squamous cell carcinoma cells are both targets and effectors for the angiogenic cytokine, VEGF. *J Cell Biochem* 105, 1202-1210.
- Toussaint O, Rémacle J, Dierick JF, Pascal T, Fripiat C, Zdanov S, Magalhaes JP, Royer V, Chainiaux F, 2002 From the Hayflick mosaic to the mosaics of

- ageing. Role of stress-induced premature senescence in human ageing. *Int J Biochem Cell Biol* 34, 1415-1429.
- Toy EP, Azodi M, Folk NL, Zito CM, Zeiss CJ, Chambers SK, 2009. Enhanced ovarian cancer tumorigenesis and metastasis by the macrophage colony-stimulating factor. *Neoplasia* 11, 136-144.
- Ulisse S, Baldini E, Sorrenti S, D'Armiento M, 2009. The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 9, 32-71.
- Vagnozzi A, Stein DA, Iversen PL, Rieder E, 2007. Inhibition of foot-and-mouth disease virus infections in cell cultures with antisense morpholino oligomers. *J Virol* 81, 11669-11680.
- Van Zutphen LF, Fox RR, 1977. Strain differences in response to dietary cholesterol by JAX rabbits: correlation with esterase patterns. *Atherosclerosis* 28, 435-446.
- Vauhkonen H, Savola S, Kaur S, Larramendy ML, Knuutila S, 2006. Molecular karyotyping in sarcoma diagnostics and research. *Adv Exp Med Biol* 587, 53-63.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL, 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Eng J Med* 319, 525-532.
- Vogt M, Dulbecco R, 1960. Virus-cell interaction with a tumor-producing virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 46, 365-370.
- von Zglinicki T, Saretzki G, Döcke W, Lotze C, 1995 Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res* 220, 186-193.
- Walen KH, 2002. 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.

- Walsh P, Metzger D, Higuchi R, 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10, 506-513.
- Walton NM, Snyder GE, Park D, Kobeissy F, Scheffler B, Steindler DA, 2009. Gliotypic neural stem cells transiently adopt tumorigenic properties during normal differentiation. *Stem Cells* 27, 280-289.
- Watson JD, Caudy AA, Myers RM, Witkowski JA, 2007. Recombinant DNA: Genes and Genomes : A Short Course. W.H. Freeman & Company, New York.
- Whang-Peng J, 1989. 3p deletion and small cell lung carcinoma. *Mayo Clin Proc* 64, 256-260.
- Wilson MJ, Sellers RG, Wiehr C, Melamud O, Pei D, Peehl DM, 2002. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and their inhibitors, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2, in primary cultures of human prostatic stromal and epithelial cells. *J Cell Physiol* 191, 208-216.
- Woo H I, Kim HJ, Lee SH, Yoo KH, Koo HH, Kim SH, 2011. Acute myeloid leukemia with complex hypodiploidy and loss of heterozygosity of 17p in a boy with Fanconi anemia. *Ann Clin Lab Sci* 41, 66-70.
- Woodhouse EC, F CR, Liotta LA, 1997. General mechanisms of metastasis. *Cancer* 80, 1529-1537.
- Wooster R, Cleton-Jansen AM, Collins N, Mangion J, Cornelis RS, Cooper CS, Gusterson BA, Ponder BA, von Deimling A, Wiestler OD, col. y, 1994. Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. *Nat Genet* 6, 152-156.
- Yang A, J Richards J, P Bowman P, R Guzman R, J Enami J, K McCormick K, Hamamoto S, Pitelka D, Nandki S, 1979. Sustained growth and three-dimensional organization of primary mammary tumor epithelial cells embedded in collagen gels. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 3401-3405.
- Yang DP, Rosanoff EI, 1977. Specific chromosome changes associated with rabbit cell lines cultured *in vitro*. *Cytogenet Cell Genet* 18, 212-230.

- Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA, 2004. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927-939.
- Zalatnai A, Bocsi J, Csákány T, Fekete T, Lásztity J, 1999. Human pancreatic leiomyosarcoma (PZX-7) growing as a serially transplantable xenograft in immunosuppressed mice. *Int J Pancreatol* 26, 33-41.
- Zhu Z, Bohlen P, Witte L, 2002. Clinical development of angiogenesis inhibitors to vascular endothelial growth factor and its receptors as cancer therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets* 7, 743-758.
- Zhuang Z, Park WS, Pack S, Schmidt L, Vortmeyer AO, Pak E, Pham T, Weil RJ, Candidus S, Lubensky IA, Linehan WM, Zbar B, Weirich G, 1998. Trisomy 7-harboring non-random duplication of the mutant MET allele in hereditary papillary renal carcinomas. *Nat Genet* 20, 66-69.