

Descripción de un método simple y económico para el estudio de cariotipos en serpientes*

por

R. Taylor

y

R. Bolaños

(Recibido para su publicación el 6 de mayo de 1975)

ABSTRACT: We describe a method for the preparation of snake chromosomes in metaphase, based on the *in vivo* stimulation of leucocytes with crude phytohemagglutinin from *Phaseolus lunatus* and the *in vitro* blocking of mitosis with colchicine. It has the advantage of preserving the specimen alive without the complications of cell culture, and can be performed under field conditions.

Los principales métodos para la obtención de cromosomas en la metafase de la mitosis pueden agruparse en tres categorías:

1. Preparaciones de médula, gónadas, bazo o hepatocitos de especímenes tratados *in vivo* con colchicina o sulfato de vinblastina y sacrificados unas horas después (3, 4, 7, 10, 12), o bien, médula tratada *in vitro* con colchicina (13).
2. Preparaciones de sangre de especímenes inoculados con fitohemaglutinina (FHA) con el fin de inducir mitosis de leucocitos (9) conjuntamente o seguida de una inoculación de colchicina o sulfato de vinblastina (1, 2).
3. Cultivo *in vitro* de leucocitos en presencia de FHA y posterior tratamiento con colchicina o sulfato de vinblastina para detener la mitosis. En este sistema han sido descritos tanto macrométodos como micrométodos (3, 5, 6, 8).

Las dos primeras categorías incluyen métodos sencillos, pero presentan el inconveniente de que el ejemplar muere sacrificado o por la toxicidad de las drogas utilizadas. Con ejemplares valiosos, que conviene conservar vivos para otros estudios o aplicaciones, estos métodos resultan onerosos. En la tercera categoría no se presentan los inconvenientes apuntados para las anteriores, pero esos métodos resultan técnicamente más complejos y caros, al requerir personal especialmente adiestrado y facilidades de laboratorio para el cultivo de células.

* Instituto Clodomiro Picado, Universidad de Costa Rica.

En nuestro Instituto, dedicado a la obtención de venenos de serpientes para la producción de sueros antiofídicos, resulta conveniente preservar los ejemplares el mayor tiempo posible, por lo que hemos diseñado un método que nos permite estudiar el cariotipo sin sacrificar el espécimen y sin las complicaciones técnicas del cultivo de células *in vitro*. El método consiste en la estimulación *in vivo* de los linfocitos mediante la inoculación de FHA y la detención *in vitro* de la mitosis con colchicina. La descripción del mismo es el objeto de este informe.

MATERIAL Y METODOS

ANIMALES: Serpientes de ambos sexos de los géneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*, *Micrurus*, y *Pelamis*, de la colección del Instituto Clodomiro Picado, fueron utilizadas en el estudio. Se mantuvo a las serpientes en un cuarto con temperatura controlada que osciló entre 24 C en el día y 22 C en la noche.

REACTIVOS: La FHA fue preparada mediante el siguiente procedimiento: 1) se trituran 100 g de semillas secas de *Phaseolus lunatus* "red kidney bean" y se suspenden en 300 ml de solución salina fisiológica amortiguada (pH 7,2); 2) la suspensión se mantiene 1 hora con agitación constante, se filtra a través de tela de "nylon" y se centrifuga a 10.000 rpm (8.500 g) durante 20 minutos; y 3) el sobrenadante claro se diluye con un volumen de la solución salina fisiológica de pH 7,2 y se liofiliza. La redisolución de la FHA para su uso se hace en agua destilada.

El medio para la detención de la mitosis contiene colchicina Merck en concentración de 4×10^{-6} M, 20.000 unidades de penicilina, 25 mg de estreptomycin y 2.000 unidades de heparina por cada 100 ml de solución salina fisiológica de pH 7,2; ocasionalmente fueron utilizados capilares heparinizados de microhematocrito para la recolección de sangre de la cola, omitiéndose el anticoagulante del medio. Antes de su uso, la solución se esteriliza a través de filtros de membrana de acetato de celulosa con poros de 0,22 μ m, se dispensa asépticamente en cantidades de 0,2 ml en tubos de tapa de rosca estériles de 5 ml que se mantienen en congelación. La coloración de los cromosomas se hace con Giemsa 1:60, en amortiguador de fosfatos 0,03 M de pH 6,8 durante 45 minutos.

METODOS: Los especímenes son inoculados s.c. con FHA en cantidad de 0,1 ml por cada 34 g de peso vivo. Entre 24 y 96 horas después, según la especie, se sangran por punción cardíaca o de la vena dorsal a nivel de la cola, cortando un pequeño fragmento del final; entre 0,2 a 0,5 ml de esta sangre se inocula en un tubo con el medio de detención de mitosis. Una vez inoculados, los tubos se incuban a 26 C por 18 a 24 horas. Algunas preparaciones hechas a las 6 ó 12 horas también mostraron resultados satisfactorios. Cuando se emplean capilares heparinizados para microhematocrito para obtener la sangre de la cola, dos de ellos llenos son suficientes para cada tubo.

PREPARACION DE CROMOSOMAS: Una vez transcurrida la incubación, las células se preparan mediante el método de PATTON (10) ligeramente modificado por DEWEESE (comunicación personal) y que, brevemente, consiste de lo siguiente:

- 1) Agregar 5 ml de citrato de Na al 1% e incubar 15 minutos a temperatura ambiente para provocar un choque hipotónico;
- 2) Centrifugar 10 minutos a 600 rpm (centrífuga Internacional tipo clínico), eliminar el sobrenadante y tratar el botón celular con fijador de Carnoy (metanol-ácido acético 3:1), evitando levantarlo al adicionar el fijador;
- 3) Después de 15 minutos a temperatura ambiente el botón celular se resuspende en el fijador y se centrifuga 10 minutos a 600 rpm;
- 4) La operación de resuspensión y centrifugación se repite hasta que el sobrenadante se presente totalmente limpio (3-4 veces);
- 5) El botón celular de la última centrifugación se suspende en 0,5 ml de Carnoy y se filtra a través de tela de "nylon";
- 6) Las láminas para la observación microscópica se preparan colocando unas 4 a 5 gotas de la suspensión celular en portaobjetos limpio; el líquido se inflama hasta su desecación (11) y la preparación se colorea con Giemsa.

RESULTADOS

La FHA cruda presentó un poder aglutinante para eritrocitos humanos grupo 0, similar a la FHA-M Difco. Su toxicidad fue inapreciable en los ejemplares investigados, aún en cantidades de cinco veces la necesaria para la obtención de cariotipos.

La mayoría de los especímenes examinados proporcionaron buenas preparaciones de cromosomas en metafase; sin embargo, hubo una falla de alrededor del 10%.

La Fig. 1 es un ejemplo de las preparaciones que pueden obtenerse por este método en los diferentes géneros de serpientes estudiadas. Aparentemente los ejemplares más jóvenes, aún recién nacidos, dan mejores resultados que los adultos. Existe una variación notoria entre las diferentes especies investigadas con relación al tiempo óptimo para el sangrado después de la exposición a FHA (Cuadro 1). En algunas oportunidades, como en el caso de *B. godmani*, resulta conveniente inocular FHA durante dos días consecutivos, como ha sido sugerido por BAKER *et al.* para *Elaphe subocularis* (1), con el objeto de obtener una mayor cantidad de células en proceso de mitosis.

CUADRO 1

Tiempo óptimo para la obtención de metafases en serpientes
inoculadas con fitohemaglutinina

Especie	Días después de la inoculación de FHA					N **
	1	2	3	4	5	
<i>Bothrops atrox</i>	100*					> 100
<i>B. nasuta</i>	100					> 100
<i>B. picadoi</i>	0	0	100			7
<i>B. godmani</i>	0	0	20	100		5
<i>Lachesis muta</i>	0	0	16	100	24	30
<i>Crotalus durissus</i>	0	0	100	48	12	34
<i>Micrurus nigrocinctus</i>	0	0	.15	0	100	33
<i>M. mipartitus</i>	0	0	20	100		15

* El máximo número de figuras mitóticas por lámina se tomó como el 100% para esa especie y los otros porcentajes fueron determinados con base en este máximo.

** Número máximo de mitosis por lámina.

DISCUSION

El método descrito tiene la ventaja de que no requiere sacrificar el espécimen, que así se conserva para otras aplicaciones y estudios. El equipo necesario para llevarlo a cabo (jeringas, agujas, tijeras, tubos, capilares, tubos con tapa de rosca, centrífuga clínica, etc.), los reactivos y las facilidades de laboratorio, se pueden obtener muy fácilmente, aún en condiciones de trabajo de campo.

Es preciso, antes de aplicar el método a otras especies, géneros o familias diferentes a las utilizadas por nosotros, investigar algunos parámetros que posiblemente variarán, como lo son la cantidad de FHA (algunos resultados nos sugieren que una sobredosis de FHA cruda podría inhibir el apareamiento de leucocitos en mitosis), el tiempo óptimo para la obtención de sangre, el tiempo de acción de la solución hipotónica en la preparación de los cromosomas (7) y la cantidad y concentración de colchicina en los medios de detención de mitosis.

RESUMEN

Se describe un nuevo método para la obtención de cromosomas en metafase de serpientes, que consiste en la estimulación *in vivo* de los leucocitos mediante la inoculación de fitohemaglutinina cruda de *Phaseolus lunatus* y la detención de la mitosis *in vitro* con colchicina. El método tiene la ventaja de preservar vivo el ejemplar para otras aplicaciones y de ser de gran sencillez, pudiendo ser llevado a cabo aún en condiciones de campo.

AGRADECIMIENTOS

Queremos dejar patente nuestro sincero agradecimiento al Dr. Pedro León por la toma de fotografías y por sus valiosos comentarios en la preparación del manuscrito; a los señores Alvaro y Guillermo Flores por el manejo de las serpientes y al Dr. J. DeWeese por facilitarnos el manuscrito de su método.

Esta investigación fue financiada parcialmente por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) de Costa Rica, solicitud N^o 006.

REFERENCIAS

1. BAKER, R. J., J. J. BULL, & G. A. MENGDEN
1971. Chromosomes of *Elaphe subocularis* (Reptilia: Serpentes), with the description of an *in vivo* technique for preparation of snake chromosomes. *Experientia*, 27: 1228-1229
2. BAKER, R. J., G. A. MENGDEN, & J. J. BULL
1972. Karyotypic studies of thirty-eight species of North American snakes. *Copeia*, 1972: 257-265.
3. BEÇAK, W.
1965. Constituição cromossômica e mecanismo de determinação do sexo em ofídios sul-americanos. I. Aspectos cariotípicos. *Mem. Inst. Butantan*, 32: 37-78.
4. FORD, C. E., & J. L. HAMERTON
1956. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Techn.*, 31: 247-251.
5. HASTINGS, J., S. FREEDMAN, O. RENDON, H. L. COOPER, & K. HIRSCHHORN
1961. Culture of human white cells using differential leucocyte separation. *Nature*, 192: 1214-1215.
6. HIRSCHHORN, K., F. BACH, R. L. KOLODNY, L. FORSCHEIN, & N. HASHEM
1963. Immune response and mitosis of human peripheral blood lymphocytes *in vitro*. *Science*, 142: 1185-1187.
7. LEE, R. M.
1969. A widely applicable technic for direct processing of bone marrow for chromosomes of vertebrates. *Stain Techn.*, 44: 155-158.
8. MOORHEAD, P. S., P. C. NOWELL, W. J. MELLMAND, D. M. BATTIPS, & D. A. HUNGERFORD
1960. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.*, 20: 613-616.
9. NOWELL, P. C.
1960. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes *Cancer Res.*, 20: 462-466.
10. PATTON, J. L.
1967. Chromosome studies of certain pocket mice, genus *Perognathus* (Rodentia: Heteromyidae). *J. Mamm.*, 48: 27-37.

11. SCHERZ, R. G.
1962. Blaze drying, by igniting the fixative, for improved spreads of chromosomes in leucocytes. *Stain Techn.*, 37: 386.
 12. SRIVASTAVA, P. K., A. K. SRIVASTAVA, C. H. BOURGEOIS, & F. V. LUCAS
1973. Chromosome preparations from hepatocytes and bone marrow of Chinese hamsters: a direct method. *Genetica*, 44: 608-614.
 13. TJIO, J. H., & J. WHANG
1960. Chromosome preparations of bone marrow cells without prior *in vitro* culture or *in vivo* colchicine administration, *Stain Techn.*, 37: 17-20.
-

Fig. 1. Cromosomas en la metafase de la mitosis pertenecientes a los siguientes géneros: A, *Lachesis*; B, *Pelamis*; C, *Bothrops*; D, *Micrurus*; y E, *Crotalus*. Escala: 10 μm .

