

Impl.

HELENEIDE RESENDE DE SOUZA NAZARETH *pl*

CITOGENÉTICA DE LINHAGENS CELULARES HÍBRIDAS
OBTIDAS POR FUSÃO COM POLIETILENO GLICOL.

Tese apresentada à
Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do
Título de Professor Livre
Docente de Genética Médica.

1978

UNICAMP
BIBLIOTECA

" A idéia que não procura tornar-se palavra é
uma idéia inútil e a palavra que não procura
tornar-se ação é uma palavra inútil "

(Chesterton).

Para Helenira

Dedico esta Tese a todos os funcionários da
Disciplina de Genética da Escola Paulista de
Medicina, amigos diletos e companheiros leais:
Antonio, Christine, Clélia, Décio, Elena,
Gonçala, Joyce, Leila, Marília, Maria Helena,
Maria Isabel, Raquel, Solange e Tereza.

A G R A D E C I M E N T O S

Ao Prof. Dr. Bernardo Beiguelman, Mestre e Amigo, que por seu espírito crítico, lealdade e retidão de caráter, constitui exemplo para o jovem pesquisador brasileiro, meus sinceros agradecimentos pela orientação e apoio com que sempre me brindou.

Ao Prof. Dr. John L. Hamerton, Chefe da Divisão de Genética do Departamento de Pediatria da Universidade de Manitoba, Canadá, por ter gentilmente cedido a linhagem ancestral de hamster chinês e pela presteza com que me recebeu para estagiar em seu laboratório.

Aos Professores Doutores Roland Venkowsky e Cassio R. de Melo Godoi da Escola Superior de Agronomia Luís de Queiroz, pela sugestão do uso do teste de Cramer na avaliação da heterogeneidade das linhagens e pela execução dos cálculos no computador.

À Maria Helena Gonçalves Batista, pelo carinho com que datilografou este texto.

À Christine Hackel, pela feitura dos gráficos.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos que tornou possível meu estágio no Canadá, ocasião em que familiarizei-me com as técnicas empregadas no presente trabalho.

À Laboratil S.A. Industrias Farmacêuticas, pela impressão da tese.

Í N D I C E

	Página
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	
I.1 - Breve revisão histórica	1
I.2 - Fusão celular	6
I.3 - Formação do policariócito de células híbridas " in vitro "	17
I.4 - Seleção de células híbridas	28
I.5 - Utilização de híbridos celulares em Genética Humana	35
I.6 - Objetivos	42
CAPÍTULO II - MATERIAL E MÉTODOS	45
CAPÍTULO III - RESULTADOS	52
CAPÍTULO IV - DISCUSSÃO	56
CAPÍTULO V - CONCLUSÕES	64
CAPÍTULO VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

CAP. I - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

I.1 - Breve revisão histórica

Em 1960 Barski e colaboradores semearam culturas mistas de duas linhagens celulares provenientes de tecido subcutâneo de camundongo, as quais diferiam entre si por suas propriedades morfológicas, bioquímicas, citogenéticas e cancerígenas. Após cerca de quatro meses de cultivo, observaram a formação de um novo tipo celular, que se diferenciava das células das duas linhagens ancestrais por apresentar características intermediárias a ambas e maior taxa de crescimento. Descrevia-se, assim, pela primeira vez, a obtenção de um híbrido celular.

Esse achado foi confirmado por Sorieul e Ephrussi em 1961, que obtiveram e isolaram células híbridas a partir de duas linhagens celulares semelhantes àquelas utilizadas por Barski e colaboradores. Foram esses autores, aliás, os primeiros a sugerir a utilização de híbridos celulares em estudos genéticos de células somáticas. Tal sugestão entretanto, não pôde, ser posta em prática imediatamente, tendo em vista as dificuldades de obtenção de hibridação espontânea. Somente a partir de 1965 é que elas foram ultrapassadas, quando se desenvolveram técnicas de fusão celular artificial e de seleção de híbridos.

Assim, em 1965, Ephrussi e Weiss conseguiram, pela primeira vez, uma linhagem híbrida interespecífica, utilizando células de camundongo com deficiência de quinase de timidina e células diplóides de embrião de rato. Nesse experimento, a detecção e identificação dos híbridos celulares foi facilitada.

tada pelo emprego do meio seletivo HAT, (hipoxantina, aminopterina e timidina) o qual impediu o crescimento das células de camundongo (técnica de Littlefield, 1964).

A técnica de Littlefield foi originalmente idealizada para detectar células híbridas formadas por fusão celular espontânea. O processo baseia-se na hibridação de células com deficiência de quinase de timidina (TK) e transferase de fosforribosil hipoxantina (HGPRT). Tais deficiências não são prejudiciais às células sob condições normais de cultura, uma vez que as enzimas em discussão não tomam parte nos passos biossintéticos do ácido timidílico e das purinas. No entanto, quando a neo-síntese desses nucleotídeos é bloqueada por adição de aminopterina ao meio, as células com deficiência dessas enzimas não podem incorporar timidina ou hipoxantina e, portanto, não sobrevivem. Em oposição, as células híbridas podem sobreviver, uma vez que produzem tanto TK como HGPRT.

Visto que as células de rato crescem em camadas unicelulares, enquanto que as híbridas formam, após alguns dias, pequenas colônias com crescimento estratificado, essas últimas podem ser facilmente isoladas e subcultivadas.

Ainda em 1965 Harris e Watkins, obtiveram híbridos de células humanas (HeLa) e células murinas (células ascíticas de Erlich). Utilizaram o vírus Sendai inativado para aumentar a frequência de fusão, inspirados no trabalho de Okada 1962, que atribuiu a este vírus propriedades fusogênicas. Contudo, a capacidade reprodutiva dos híbridos não pode ser testada, uma vez que as células híbridas foram sobrepujadas em crescimento pelas ancestrais.

A primeira linhagem híbrida estável obtida com células humanas foi conseguida em 1967 por Weiss e Green, que usaram meio HAT para selecionar o ancestral murino deficiente de quinase de timidina. As células humanas foram isoladas por

creceram em camadas unicelulares e por terem crescimento lento.

A hibridação celular vem sendo utilizada desde 1965 como um poderoso método para estudo genético de células somáticas, pois ele permite que sejam ultrapassadas barreiras de natureza ética, como aquelas inerentes a cruzamentos experimentais na espécie humana. Além disso, outras vantagens podem ser vislumbradas, tais como:

1º- Facilidade de realização de estudos bioquímicos, imunológicos e de microscopia eletrônica.

2º- Maior facilidade de controle de fatores ambientais.

3º- A unidade básica de estudo passa a ser a célula, permitindo que se analise, por intermédio do estabelecimento de clones, milhões de descendentes a partir de um único indivíduo.

4º- O tempo de geração é reduzido a 24 horas.

Deve-se ressaltar, no entanto, que as seguintes limitações ocorrem do emprego desse método:

1º- Só poderão ser estudados genes que se expressam em células cultivadas.

2º- Processos envolvendo interações de vários tecidos ou órgãos não podem ser avaliados.

3º- As células em cultura estão expostas a um ambiente artificial. Como já foi assinalado no início deste capítulo, Sorieul e Ephrussi em 1961, foram os primeiros autores a vislumbrar a importância de híbridos celulares em estudos genéticos de células somáticas. Alertavam, no entanto, que o alcance dessa meta dependia tanto da obtenção de linhagens interespecíficas estáveis, quanto da existência de marcadores genéticos que se expressassem ao nível celular.

A primeira barreira foi ultrapassada com os resul-

tados obtidos por Ephrussi e Weiss em 1965. Restava, contudo, verificar se tais linhagens híbridas possuiriam um cariótipo suficientemente estável, se haveria segregação cromossômica de tal ordem a permitir correlação fenótipo-genótipo e, finalmente, se ambos genomas ancestrais seriam funcionais nas células híbridas.

A resposta a essas questões também foi fornecida por Weiss e Ephrussi em 1966, quando eles obtiveram sete diferentes tipos de híbridos somáticos rato x camundongo. Esses híbridos celulares eram viáveis e capazes de proliferação rápida e aparentemente indefinida. A evolução cariotípica de uma dessas linhagens foi estudada em detalhe, tendo os autores encontrado perda de 5 a 10% dos cromossomos, com a maioria das mudanças ocorrendo "in vitro" durante os primeiros meses. Foi verificado também, haver perda preferencial de cromossomos de rato.

A expressão de ambos genomas ancestrais nas células híbridas foi evidenciada pelos achados de Gershon e Sachs (1963) e Spencer e col. (1964), utilizando antígenos H₂ de histocompatibilidade. Confirmação desse fato foi obtida por Ephrussi e Weiss (1965) ao analisarem as isozimas da desidrogenase de lactato (LDH) e a enzima B glucoronidase nas células ancestrais e nas híbridas. Assim, verificaram que as linhagens híbridas continham LDH-5 características das duas espécies, identificáveis por mobilidade eletroforética diferencial.

Quanto à B glucoronidase encontraram nas células híbridas enzima com sensibilidade ao calor e mobilidade eletroforética intermediárias. Interpretaram essa última observação admitindo que a B glucoronidase pode ser um polímero e que moléculas híbridas interespecíficas podem ser formadas nos híbridos celulares. A partir de então inúmeras publicações

têm confirmado não só a estabilidade de linhagens híbridas como também a expressão de ambos genomas ancestrais nessas linhagens.

No concernente aos marcadores genéticos com expressão detectável em cultura de células tem-se que eles vêm sendo observados em número crescente. Em 1975 já haviam sido conhecidos cerca de 100 "loci" gênicos em cromossomos humanos específicos, por intermédio de estudos de híbridos somáticos interespecíficos (Hamerton, 1975; Bodmer, 1975; Ruddle e Meera Khan, 1975).

I.2 - Fusão celular

Uma vez que a frequência de fusão celular espontânea é um evento raro, inúmeras tentativas foram feitas para aumentar a frequência de fusão celular por tratamento de culturas mistas de células com tripsina, digitonina, fitohemaglutinina, polilissina, neuraminidase e baixas temperaturas (Poste, 1972). Tais tentativas, no entanto, foram infrutíferas.

Ephrussi e Sorieul (1962) foram os primeiros a sugerir que a capacidade de provocar fusão celular observada em certos vírus, poderia ser explorada com o objetivo de aumentar a produção de linhagens celulares híbridas. Nesse mesmo ano Okada descreveu que o vírus Sendai inativado por luz ultravioleta poderia provocar fusão de células. Mais tarde, Okada e Murayama (1965) e Harris e Walkins (1965) verificaram que o vírus Sendai inativado por luz ultravioleta, poderia ser usado para fundir células de diferentes tipos ou mesmo de espécies diversas.

Esses relatos, acrescidos ao de Yerganian e Nell (1966), provocaram a vulgarização do uso do vírus Sendai inativado, tanto por luz ultravioleta como por B propiolactona, na obtenção de células híbridas. Apesar de ter trazido resultados positivos a adoção de tal agente fusogênico foi, pois, de certa forma, arbitrária. De qualquer modo, o agente de fusão celular mais bem estudado até o momento é o vírus Sendai (HVJ, vírus hemaglutinante do Japão).

O tipo de fusão celular promovido pelo vírus Sendai é o denominado FFWO (fusion from without), que não requer replicação intracelular do vírus. A fusão parece estar diretamente associada com a partícula viral, não havendo sido descritos, até o momento, fatores específicos que possam ser responsabilizados pela mesma. A fusão é precedida por forte aglu

tinuação das células expostas às partículas virais.

Admite-se que ocorre fusão de duas membranas, quando as interações entre elas são maiores que as interações moleculares dentro de uma única membrana. Sendo assim, para que haja fusão as membranas plasmáticas das duas células, devem estar em contacto molecular direto. Pouco se sabe a respeito da conceituação de contacto molecular, uma vez que a natureza da adesão intercelular é desconhecida.

A maioria das evidências referentes à interação entre as superfícies celulares em processo de fusão é proveniente de estudos de microscopia eletrônica. As dificuldades inerentes à interpretação de imagens de microscopia eletrônica, aliadas ao problema de definição precisa dos limites espaciais da periferia celular emprestam a essas evidências um valor apenas descritivo.

Poste (1972) tenta explicar a interação das superfícies celulares durante a fusão, tomando como ponto de partida a teoria DLVO. Essa teoria desenvolvida por Derjaguin e Landau (1941) e Verwey e Overkeek (1948) para explicar a interação de partículas coloidais liófilas, considera que a interação energética de superfícies celulares é resultante de forças atrativas e repulsivas. Forças eletrostáticas tenderiam a manter as superfícies separadas, enquanto as forças atrativas do tipo London-Van der Waals tenderiam a favorecer o contacto entre as mesmas. A aproximação íntima de duas células seria portanto impedida por uma considerável barreira energética. Uma vez vencida essa barreira, as células entrariam no chamado "mínimo primário", em que suas membranas ficariam separadas por poucos Angstroms. As células seriam, então, mantidas juntas por forças atrativas com energia igual à das pontes físico-químicas formadas entre elas.

Usando essa teoria Poste examinou os fatores que

influenciariam o contacto entre membranas plasmáticas durante a fusão celular induzida por virus. Considerações teóricas indicavam que a aproximação íntima da superfície celular antes de ocorrida a fusão, poderia ser conseguida se aproximação e contacto fossem feitos por microvilosidades com raio de curvatura menor que $0,1\mu$. Microvilosidades com tais dimensões enfrentariam forças eletrostáticas repulsivas significativamente menores que as sofridas por projeções maiores como, por exemplo, pseudópodes. Fato interessante é que microvilosidades com pequeno raio de curvatura são encontradas tanto em fusão celular induzida por virus quanto por agentes fusogênicos não virais. Além disso, a capacidade de diferentes tipos de células entrarem em fusão está diretamente relacionada com a de produzir microvilosidades.

Poste (1972) adverte que, apesar de o contacto entre superfícies celulares poder ser tratado segundo a teoria DLVO, as células são estruturas dinâmicas, sendo as interações entre elas influenciadas tanto por propriedades mecânicas da periferia celular quanto por forças locomotoras geradas pelas próprias células.

Considerando como válida a associação entre formação de microvilosidades e contacto celular Poste (1972) inferiu que a espessura da parede celular seria fator importante na possibilidade de fusão entre células.

Favorecendo essa última assertiva encontrou as seguintes evidências:

1ª- As células com pequena capacidade fusogênica mostram parede celular mais espessas e menor quantidade de microvilosidades que as células com grande capacidade fusogênica.

2ª- A espessura da parede de células engajadas no processo de fusão por virus apresenta-se significativamente

reduzida.

3º- A maior capacidade de fusão de linhagens celulares estabelecidas "in vitro" em relação a linhagens celulares diplóides secundárias e primárias poderia ser explicada pelo fato de as primeiras terem parede celular mais delgada. Da mesma maneira, linhagens celulares primárias que possuem parede celular mais espessa que as secundárias são menos capazes de entrar em processo de fusão que as últimas.

4º- A fusão celular induzida por vírus é restrita a células com parede de espessura inferior a 35\AA , o que sugere que células com paredes mais espessas que 35\AA são incapazes de entrar em fusão porque são inaptas a produzir um contacto íntimo.

A redução da espessura da parede celular, que precede à fusão induzida por vírus, parece resultar de digestão promovida por enzimas lisossômicas liberadas na parede celular. As mudanças de espessura da parede celular, bem como a fusão são bloqueadas pela ação de agentes estabilizadores de lisossomos.

Allison (1967, 1968) e Poste e Allison (1971) propuseram que a modificação induzida pelos lisossomos na parede celular é um evento necessário em todas as formas de fusão celular. É importante salientar, aqui, que vários agentes químicos, físicos e biológicos com capacidade fusogênica apresentam também a propriedade de labilizar lisossomos.

Embora a ativação lisossômica e a modificação da superfície celular por enzimas lisossômicas pareçam ser necessárias para que ocorra fusão, está claro que tal evento, por si só, é incapaz de promover fusão celular. Realmente, muitos agentes citotóxicos são incapazes de promovê-la, apesar de produzirem alterações lisossômicas idênticas às encontradas na fusão celular.

Dingle (1968, 1969) sugeriu que a susceptibilidade à fusão das membranas poderia ser aumentada pela presença de uma proporção relativamente alta de ácidos graxos de cadeia curta, pela incorporação de isômeros cis e pela presença de grupos polares nas cadeias de hidrocarbonetos. Essas propriedades poderiam aumentar a área de superfície ocupada por cada molécula e, por redução das forças de Van der Waals entre elas, poderiam criar uma membrana instável que seria facilmente fundida. Infelizmente, nada se conhece em detalhe à respeito da composição das membranas engajadas no processo de fusão, razão pela qual as proposições de Dingle deverão esperar por dados experimentais futuros.

Rubin (1967, Güttler e Clausen (1969) e Lucy (1970) sugeriram que a formação de lisofosfatídeos dentro do sistema de membranas poderia promover fusão celular. O fato de o tratamento de células com lisolecitina poder induzir fusão celular (Poole e col., 1970) dá suporte a essa hipótese. O aparecimento de lisolecitina em membranas tem sido detectado também, durante a fusão de grânulos cromafins e de histamina com a membrana plasmática durante o processo de exocitose. Considerando como correta a sugestão de que há participação de lisofosfatídeos em fusão de membranas, deve-se ter em mente que tal participação deverá se restringir a pontos localizados, de maneira a não ameaçar a integridade da membrana celular. Sendo assim, as enzimas lisossômicas parecem participar do processo de fusão celular, tanto digerindo a parede celular, como estimulando a formação de compostos que provocam lise dentro das membranas plasmáticas nos locais de fusão.

Contrariando a hipótese da participação da lisolecitina na fusão de membranas, há o fato de esta substância não ter sido encontrada em membranas plasmáticas submetidas a fu

são por vírus. Deve-se lembrar, no entanto, que a quantidade de lisolecitina requerida pode ser muito pequena, além de ha ver limitações técnicas da análise de lipídios, as quais são exacerbadas pelo fato de o processo de fusão ser uma reação extremamente rápida.

Poste (1972) propõe que o processo de fusão deve ter semelhança com o observado em fenômenos naturais como en docitose, exocitose e digestão intracelular.

Woodin e Wienecke (1964) estudando os eventos bioquímicos que acompanham a desgranulação de leucócitos, um processo que envolve fusão dos grânulos leucocitários com a membrana plasmática, sugerem que a remoção de Ca^{+2} e de ATP das membranas poderia produzir áreas locais de decréscimo de rigidez estrutural, as quais poderiam ser suscetíveis à fusão. A remoção do Ca^{+2} da membrana poderia, também, aumentar o número de sítios de ligação livres disponíveis dentro da membrana, propiciando, portanto, interação molecular e ligação com sí tios livres de membranas adjacentes.

Woodin e Wienecke (1964) também sugeriram que a remoção de Ca^{+2} e de ATP da membrana é iniciada por hidrólise de ATP ligado à membrana por intermédio da ATPase da membrana do grânulo leucocitário. Consideraram que a hidrólise de ATP poderia criar adenosina difosfato (ADP) e uma alta concentração de ortofosfato dentro da membrana, a qual poderia compe tir ou ligar-se ao Ca^{+2} deslocado.

Os eventos que ocorrem na despolarização de membranas de células excitáveis são semelhantes aos descritos por Woodin e Wienecke (1964). Abood (1966, 1969) propôs uma teoria para despolimerização de membrana que é praticamente idêntica ao esquema descrito por Woodin e Wienecke.

As similaridades entre os fenômenos de membrana na secreção e despolarização são também enfatizados pela teoria

de Abood, para explicar o mecanismo de liberação de grânulos secretores de vários tipos de célula, como por exemplo, os processos excitóticos envolvendo a fusão da membrana do grânulo com a membrana plasmática.

O paralelismo entre fatores que regulam secreção e aqueles que regulam despolarização de membranas levaram Poste (1970) e Poste e Allison (1971) a propor a existência de similaridades básicas nos eventos responsáveis por fusão e despolarização de membranas.

O esquema exposto acima requer deslocamento de Ca^{+2} e de ATP da membrana, para que se inicie fusão. Poder-se-ia, portanto, esperar que a concentração de Ca^{+2} e ATP disponível para a membrana nessa fase fosse crítica, não ocorrendo fusão se Ca^{+2} ou ATP estivessem continuamente presentes para estabilizar a membrana. Woodin e Wienecke (1964) verificaram que a fusão de grânulos leucocitários com a membrana plasmática é inibida por altas concentrações de ATP e Ca^{+2} , cada qual estando apto a agir independentemente. Esse efeito é também observado na liberação de grânulos secretores de vários tipos de células. Além disso, a fusão celular induzida por vírus, bem como a fusão de mioblastos durante a miogênese "in vitro" são inibidas por Ca^{+2} em concentrações idênticas àquelas que impedem a fusão de membranas na fase de liberação de secreção. Outro fato digno de nota é que a despolarização, tanto de sistema de membranas excitáveis por estímulos elétricos quanto por estímulos químicos, é inibida por concentrações de Ca^{+2} e ATP idênticas àquelas que provocam inibição de fusão celular.

Ainda em relação ao esquema proposto acima tem-se a salientar que o deslocamento de Ca^{+2} e ATP das membranas é efetuado pela ATPase associada à membrana. Existem evidências de que inibidores de ATPase, impedem a liberação de produtos de secreção por inibição da fusão dos grânulos secretores

com a membrana plasmática. Com referência a ação desses inibidores de ATPase em fusão celular, no entanto, há apenas o relato de Norrby (1966), que refere a ação inibidora da florizina em fusão de células Iul06 na presença do vírus do sarampo.

Vários estudos têm mostrado que a ATPase associada à fusão de grânulos secretores com membrana plasmática não é do tipo transporte ativo, sendo geralmente aceito que a mesma é ativada por Ca^{+2} e Mg^{+2} . A inibição de fusão celular induzida por vírus Sendai, encontrada quando foi omitido do meio de cultura o Mg^{+2} , poderia ser uma evidência indireta da participação da ATPase dependente de Ca^{+2} e Mg^{+2} .

A participação da ATPase dependente de Ca^{+2} em fusão de membrana é também sugerida pelos seguintes achados:

1º- Tanto a fusão celular quanto a de grânulos secretores com a membrana plasmática não ocorre na ausência de Ca^{+2} , sendo significativamente reduzida em concentrações baixas de Ca^{+2} .

2º- A fusão de segmentos de membranas nas junções da zona ocludens, depende de um deslocamento contínuo do Ca^{+2} pelo complexo $\text{Ca}^{+2}-\text{Mg}^{+2}-\text{ATPase}$, deslocamento esse inibido por altas concentrações de Ca^{+2} .

As evidências obtidas de estudos de fusão de grânulos secretores com a membrana plasmática sugerem que o complexo $\text{Ca}^{+2}-\text{Mg}^{+2}-\text{ATPase}$ pode estar associado com uma proteína contrátil, possivelmente ligada diretamente com o Ca^{+2} e ATP da membrana como um complexo mecanoenzimático.

Poste (1972) propõe que o deslocamento de Ca^{+2} de membranas poderia envolver um processo rápido e reversível de troca catiônica, em que as macromoléculas da membrana agiriam como trocadores de ions, estando a membrana portanto, apta a existir em dois estados, isto é, o normal associado ao Ca^{+2} e o estado susceptível à fusão, dissociado de Ca^{+2} .

A fusão parece requerer, pois, transições rápidas e reversíveis da conformação macromolecular da membrana, induzida por ligação com Ca^{+2} . Nesse sentido, as mudanças na fusão poderiam assemelhar-se intimamente ao modelo "two-stable-state" de despolarização em membranas celulares excitáveis.

O deslocamento do Ca^{+2} da membrana poderia provocar uma queda na resistência da mesma, fato bem demonstrado em membranas de células excitáveis. Uma queda de resistência ocorre em segmentos de membrana plasmática durante a formação de vesículas endocitóticas, tendo sido tal fenômeno atribuído ao deslocamento do Ca^{+2} nessas regiões. Uma vez que a ligação membrana- Ca^{+2} é importante para a manutenção da estrutura de certos lipídeos carregados negativamente, o deslocamento desse íon poderia provocar mudanças na configuração das macromoléculas da membrana.

A falta de informações precisas sobre a estrutura de membranas impede que se tire conclusões à respeito da configuração das macromoléculas de membrana durante a fusão.

Poste em 1972 sugeriu que o fenômeno de fusão de membrana fosse dividido em quatro estágios:

- 1- Contacto-Aproximação íntima das membranas, de tal sorte que a distância entre as mesmas seja menor que 10Å .
- 2- Indução-Deslocamento de Ca^{+2} e ATP das membranas
- 3- Fusão-Estabelecimento de ligações estáveis entre membranas.
- 4- Estabilização-Volta das membranas recentemente fundidas à condição normal, por intermédio de religação do Ca^{+2} e ATP às membranas.

Além do vírus Sendai e da lisolecitina foram utilizadas vesículas lipídicas unilamelares como agente de fusão celular (Papahadjopoulos e col., 1973). A idéia de se utili

zar vesículas lipídicas com tal finalidade adveio da observação, ao microscópio eletrônico, de grande número de gotículas de lipídeos em contacto direto com a membrana plasmática de células em processo de fusão após tratamento por lisolecitina (Akong e col., 1972). O mesmo foi observado em lisossomos isolados de leucócitos (Hawiger e col., 1969).

O mecanismo pelo qual vesículas lipídicas causam fusão celular não é conhecido. Papahadjopoulos e col. (1973) admitem que ocorra fusão entre as vesículas e membranas de duas células adjacentes, por intercalação das primeiras entre as últimas. Formar-se-ia, então, uma ponte entre as células a qual se alargaria, levando à completa fusão das células.

Os resultados encontrados por esses autores apontam a necessidade de as vesículas lipídicas possuírem carga elétrica negativa, o que sugere que a interação de cargas elétricas é condição essencial para ocorrer íntimo contacto entre vesículas e superfície celular.

Em 1974 um novo agente de fusão celular foi descrito, o polietilenoglicol, também conhecido como PEG (Kao e Michayluk, 1974; Constabel e Kao 1974 e Kao e col., 1974). Esse agente, utilizado inicialmente em fusão de protoplastos de plantas, mostrou-se também eficiente na obtenção de heterocariocitos de células de mamíferos (Pontecorvo, 1975; Davidson e Gerald, 1976; Davidson e col., 1976 e Maul e col., 1976).

O polietilenoglicol provoca uma forte aglutinação celular, permitindo contacto íntimo entre as células. Segundo Kao e Michayluk (1974) a aglutinação promovida pelo PEG pode envolver atração dos protoplastos por forças eletrostáticas. Constabel e Kao (1974) observaram que a adição de sais de cálcio à solução de PEG aumenta o poder aglutinante do mesmo. De acordo com os autores supracitados o PEG agiria como uma ponte molecular entre as superfícies de protoplastos adjacentes,

seja diretamente ou por intermédio de Ca^{+2} . Acreditam eles que a fusão resulta do distúrbio e redistribuição de cargas quando as moléculas de PEG são eluídas por lavagem com meio de cultura.

I.3 - Formação do policariócito e de células híbridas " in vitro "

Células especializadas de diferentes tipos ou de espécies diversas podem entrar em fusão espontânea ou provocada por agentes apropriados. Formam-se, então, policariócitos, isto é, células multinucleadas, que recebem a denominação de homocariócito ou heterocariócito, conforme provenham da fusão de células de uma única população ou de populações celulares diferentes.

A origem de cada núcleo pode ser identificada por diferenças morfológicas ou por marcação de uma das linhagens ancestrais por timidina triciada (Harris e Walkins, 1965).

Já foram obtidos heterocariócitos e híbridos celulares de espécies tão diferentes quanto o homem e a galinha, mas o híbrido somático mais exótico conseguido até agora é o de células humanas e de mosquito.

Os policariócitos de células animais formados "in vitro" são capazes de sintetizar proteínas, RNA e DNA permanecendo metabolicamente ativos por várias semanas. No entanto, diferentemente dos policariócitos de fungos, eles não têm capacidade de proliferação contínua.

Ocasionalmente os núcleos dos policariócitos entram em fusão, originando células mononucleadas que podem produzir linhagens híbridas. Na maioria das vezes a fusão nuclear ocorre em policariócitos binucleados, uma vez que em células multinucleadas só alguns núcleos entram simultaneamente em divisão. A divisão nuclear de células multinucleadas não é, em geral, acompanhada de formação de fuso e citocinese (Harris e Watkins, 1965; Handmaker, 1971).

Apesar de a formação de linhagens híbridas a partir de heterocariócitos multinucleados ser, até o presente, um

evento raro, Ricciuti e Ruddle 1973 já a obtiveram provocando a fusão de 3 linhagens portadoras de marcadores cromossômicos e enzimáticos diferentes.

Nabholz (1969), por outro lado, apresentou observações que reforçam a hipótese de que as linhagens híbridas com mais de um conjunto cromossômico de um ou de ambos ancestrais, podem ter se originado por poliploidização antes ou depois do processo de fusão celular.

As observações de Harris e col. (1965) demonstram que ambos os genomas ancestrais são ativos, pelo menos no que concerne às funções celulares essenciais.

A célula híbrida resultante parece conter, inicialmente, um complemento cromossômico de cada núcleo ancestral, como evidenciado em estudo cariotípico realizado 24, 48 e 72 horas após a fusão (Harris e Watkins, 1965). Após algum tempo de cultivo, no entanto, ocorrem perdas cromossômicas em intensidade variável conforme a fusão seja intra ou interespecífica.

Em cruzamentos intraespecíficos o grau de perda cromossômica é moderado (Sourieul e Ephrussi, 1961; Gershon e Sachs, 1963 e Yoshida e Ephrussi, 1967) apesar de, em alguns casos, o número de cromossomos ser aproximadamente igual à soma do número cromossômico das células ancestrais (Barski e col., 1960; Littlefield, 1964; Engel e col., 1969). O maior grau de perda cromossômica ocorre em linhagens híbridas oriundas da fusão de linhagens ancestrais heteroplóides. A perda mais rápida é observada quando uma das linhagens ancestrais é altamente maligna e a outra diplóide normal (Handmaker, 1973). De modo geral, a capacidade da célula maligna de formar tumor é grandemente diminuída no híbrido e, em quase todos os casos, a reexpressão da malignidade está correlacio-

nada à perda cromossômica (Harris e col., 1969).

Os híbridos intraespecíficos oriundos da fusão de células normais diplóides são tetraplóides estáveis. No entanto, quando uma célula heteroplóide é cruzada com uma diplóide, o híbrido é sempre heteroplóide. Parece, portanto, que a característica que confere estabilidade ao complemento cromossômico é perdida ou suprimida pela célula heteroplóide.

O padrão característico do comportamento cromossômico de híbridos somáticos interespecíficos é a perda preferencial dos cromossomos de um dos ancestrais. Essa característica faz desses híbridos um material excelente para análise genética.

Logo após os primeiros ciclos de divisão observa-se uma perda cromossômica significativa (Harris e col., 1965; Jami e col., 1971; Handmaker, 1971) mas após essa primeira fase, a intensidade das perdas cromossômicas diminui.

Weiss e Ephrussi, 1966 foram os primeiros a notar perda preferencial de cromossomos de uma das espécies ancestrais. A partir de então, a literatura pertinente tem demonstrado o seguinte esquema:

<u>Tipo de cruzamento:</u>	<u>Espécie que sofre perda cromossômica:</u>
Camundongo x rato	rato (Weiss e Ephrussi, 1966)
Hamster chinês x camundongo	camundongo (Scaletta e col., 1967)
Hamster sírio x camundongo	camundongo (Migeon, 1968)
Hamster chinês x rato canguru	rato canguru (Jakob e Ruiz, 1970)
Camundongo x homem	homem (Weiss e Green, 1967)
Hamster chinês x homem	homem (Kao e Puck, 1970)
Camundongo x macaco	macaco (Kit e col., 1970; Periman e col., 1972).

A maioria dos dados à respeito de segregação cromossômica interespecífica refere-se a cruzamentos entre células

las humanas e de camundongo. Embora a segregação cromossômica preferencial de cromossomos humanos tenha sido a regra nesse tipo de cruzamento, Jami e col. encontraram dominância do genoma humano com conseqüente segregação de cromossomos de camundongos. O mesmo foi encontrado por Croce (1976), quando cruzou macrófagos de peritônio de camundongo, bem como células obtidas de um teratocarcinoma de camundongo, com células de fibrosarcoma humano.

Existem numerosas hipóteses para explicar a perda preferencial de uma das espécies ancestrais de híbridos inter específicos. A primeira delas foi enunciada por Kao e Puck (1970), os quais sugeriram que a diferença da taxa de crescimento das células ancestrais determinaria o grau e direção da perda cromossômica nas células híbridas. Os achados de Handmaker (1971) e de Graves (1972) contradizem, no entanto, essa hipótese, uma vez que notaram eliminação preferencial dos cromossomos das células ancestrais com maior taxa de crescimento. Labella e col. (1976), também não encontraram correlação entre taxa de crescimento e constituição cromossômica em híbridos estáveis de hamster chinês e camundongo.

A interação dos diferentes controles envolvidos no ciclo mitótico foi estudada detalhadamente em linhagens híbridas interespecíficas, uma vez que havia sugestões de que tais fatores poderiam influir na segregação preferencial. Parece haver, em geral, uma sincronização em dois momentos do ciclo mitótico, a saber, na fase inicial da síntese do DNA e no início da mitose (Graves, 1972; Rao e Johnson, 1974). No restante observa-se considerável autonomia dos cromossomos de cada espécie ancestral, os quais podem completar os estágios do ciclo mitótico em tempos diferentes.

Graves (1972), por exemplo, comparando os ciclos mitóticos e o padrão de replicação de tres híbridos somáticos

de camundongo e hamster-chinês, com os ciclo e padrão de replicação dos ancestrais, encontrou que o início da síntese de DNA era sincronizado, mas que os cromossomos de hamster chinês terminavam a duplicação mais cedo. O comprimento do período S no híbrido era igual ao do ancestral camundongo (o mais longo) e o padrão terminal da síntese de DNA entre os cromossomos do hamster ancestral era similar ao padrão dos mesmos nas células híbridas. Assim, enquanto eram sincronizadas no início da fase S, a taxa e padrão de síntese de DNA pareciam ser regulados de modo autônomo.

Essas características poderiam conduzir a dois tipos de instabilidade no híbrido: 1º- se os cromossomos da espécie que completou a síntese de DNA promovessem o início da mitose, aqueles cromossomos da espécie ancestral ainda não duplicados ou em fase de replicação poderiam ser eliminados; 2º se após o início da mitose sincronizada, os cromossomos de uma das espécies ancestrais completassem a condensação mitótica anteriormente, poderiam provocar a eliminação de cromossomos da outra espécie ancestral devido ao atraso dos mesmos na migração para a placa metafásica e/ou segregação anafásica.

Bennett e col. (1976) estudando híbridos obtidos por polinização de Hordeum vulgare por Hordeum bulbosum, verificaram que o comportamento dos mesmos era muito similar ao de híbridos somáticos interespecíficos. Nesses híbridos, no entanto, a eliminação preferencial de cromossomos de H. bulbosum, não poderia ser explicada por retardo da síntese de DNA, uma vez que neles a duração da fase S é similar à de H. vulgare. Por outro lado, encontraram tanto retardo de migração de cromossomos para a placa metafásica, como falha de segregação anafásica. Não conseguiram, porém, estabelecer correlação entre esses eventos e condensação cromossômica.

Ainda em 1976, Labella e colaboradores, estudando

híbridos somáticos de camundongo e hamster chinês, não encontraram correlação entre replicação retardada de DNA e perda cromossômica preferencial de uma das espécies.

Ruddle (1972) sugeriu que em híbridos somáticos de homem e camundongo há uma falta de disjunção casual de cromossomos humanos e murinos, e que haveria seleção preferencial de células híbridas com cariótipo humano parcial. Handmaker (1971), contudo, examinando metáfases que aparecem 72 horas após a fusão de células humanas com as de camundongo, verificou que, enquanto algumas células híbridas perdiam poucos cromossomos humanos, a grande maioria tinha perdido mais da metade do complemento cromossômico humano. Isso implica em que o mecanismo responsável pela perda dos cromossomos humanos não é um processo recíproco, como a falta de disjunção, o qual produziria número igual de células com excesso de cromossomos humanos. Conclui Handmaker que o decréscimo do número de cromossomos humanos em híbridos de camundongos e homem é devido, principalmente, à perda preferencial dos mesmos e não a seleção contra células que os contém em grande quantidade.

Outro fator que tem sido referido como importante na manutenção e integridade de um genoma em linhagens híbridas interespecíficas é a sua duplicação. O genoma duplicado seria protegido de eliminação por intermédio de certas funções que seriam permitidas nessa situação. Davidson em 1974 observou que a proteína S-100 não era expressa em células gliais de rato e fibroblastos de camundongo quando a relação entre os genomas era de 1 S : 1 S. Por outro lado essa mesma proteína era observada em híbridos 2 S de células gliais : 1 S de fibroblastos. Situação similar também foi observada em cruzamentos de células humanas com as de camundongo, quando se constatou que híbridos 1 S humano: 2 S camundongo retêm mais

cromossomos humanos do que híbridos 1 S : 1 S (Davidson, 1974).

Híbridos de células humanas e de camundongo são incapazes de produzir RNA ribossômico 28 S característico da espécie humana, embora produzam quantidades normais de RNA 28 S de camundongo. Essa observação sugeriu que a ausência do rRNA 28 S humano estaria correlacionada com a perda preferencial de cromossomos humanos (Elliceiri e Green, 1969; Bramwell e Handmaker, 1971; Marshall e col., 1975). Foi demonstrado que a falta de produção de RNA ribossômico humano não era devida à ausência de cromossomos humanos organizadores de nucléolo no híbrido (Marshall e col., 1975; Miller e col., 1976).

Contudo, Miller e col., (1976) observaram que os cromossomos humanos organizadores de nucléolo presentes em linhagens híbridas camundongo x humano não eram corados pela técnica Ag-AS (específica para detectar região organizadora de nucléolo - NOR). Parecia pois, interessante verificar se nas linhagens camundongo x homem onde houvesse perda preferencial de cromossomos de camundongo, haveria somente expressão da atividade de organizadores nucleolares humanos. Tal fato foi constatado por Miller e colaboradores em 1976, os quais, analisando linhagens híbridas obtidas por fusão de células humanas com macrófagos de peritônio, bem como de células de teratocarcinoma de camundongo, observaram que havia expressão de atividade somente nas regiões NOR humanas. As regiões NOR de camundongo não se coraram pela técnica Ag-AS, embora os cromossomos portadores das mesmas estivessem presentes em alta frequência nas linhagens híbridas. Além disso, os híbridos apresentavam somente RNA ribossômico 28 S humano.

Os resultados desses autores sugerem que a interação entre cromossomos de camundongo e humanos em híbridos celulares não é unicamente determinada pela origem das duas células ancestrais. É possível que a relação entre certos cro

mossomos de camundongo e cromossomos humanos, pode determinar a supressão diferencial da atividade NOR de uma das espécies ancestrais.

Em híbridos hamster sírio x camundongo há produção de ambos RNA ribossômico, mas a quantidade relativa de cada um varia de acordo com a relação entre cromossomos de camundongo e de hamster (Elliceiri, 1972; Sayavedra e Elliceiri, 1975).

Os achados de Bennett e col. (1976) em híbridos de Hordeum parecem reforçar essa última hipótese. Realmente, tais autores verificaram que a perda significativa de cromossomos de H. bulbosum ocorre no endosperma a partir do segundo dia após a polinização e no embrião após o terceiro dia, ocasião em que se inicia a produção de grande quantidade de proteínas. Bennett e col. (1976) especularam, baseados em seus dados e nos de outros autores, que observaram o mesmo em híbridos de diferentes plantas se não existe correlação entre a perda cromossômica preferencial e a taxa de síntese proteica. Sugerem que a repentina eliminação cromossômica é causada por mudanças na interação cromossomo-fibras do fuso, em virtude de carência proteica. De acordo com essa teoria, permaneceriam os cromossomos da espécie que conseguissem formar ligações normais com o fuso.

Além disso Bennett e col. (1976) argumentam que foi observada correlação entre os comportamento cromossômico e nucleolar em numerosos híbridos de plantas onde ocorreu eliminação cromossômica preferencial. Os complementos haplóides de H. vulgare e H. bulbosum contêm, respectivamente, dois e um cromossomos organizadores de nucléolo, enquanto que o híbrido diplóide apresenta dois, ao invés de tres como seria o esperado.

Nada é conhecido à respeito da natureza do fuso na

célula híbrida, nem em relação à organização dos centríolos. O fuso tanto poderia ser um produto híbrido, quanto derivado de uma das espécies. De qualquer modo, ele poderia ser menos funcionante para os cromossomos de uma das espécies ancestrais.

A seleção celular, embora não pareça ser o fator primordial na direção e intensidade da perda cromossômica, deve ter um papel importante. Os dados até agora obtidos sugerem que a dominância parcial de um genoma sobre outro pode resultar da competição entre algumas isoenzimas essenciais, as quais são sintetizadas por ambos ancestrais e que poderiam mostrar diferenças em propriedades cinéticas, de afinidade pelo substrato, etc. Desse modo, o genoma híbrido poderia não funcionar como uma unidade integrada. De fato, a perda cromossômica assimétrica é mais pronunciada quando a distância taxonômica das espécies ancestrais é maior.

Ocorrida a perda cromossômica inicial, as linhagens híbridas interespecíficas continuam perdendo cromossomos paulatinamente, podendo alcançar um equilíbrio após alguns meses. Nesse momento podem ser retidos um ou mais cromossomos da linhagem ancestral que sofreu perda cromossômica significativa. Se a linhagem híbrida estiver crescendo em meio não seletivo, poderá perder todos os cromossomos de um dos ancestrais.

Outro ponto que tem sido motivo de debates é aquele referente à retenção casual ou não de cromossomos específicos, tendo sido esse assunto estudado em híbridos interespecíficos de células humanas e de roedores.

Estudos cromossômicos de híbridos celulares realizados antes da descrição das técnicas de obtenção de bandas, sugeriam que a segregação de cromossomos humanos era casual (Matsuya e Green 1969; Nabholz e col., 1969). As análises de muitos marcadores humanos, no entanto, indicavam que certos

grupos de ligação e, portanto, cromossomos, eram retidos mais frequentemente que outros em linhagens híbridas (Santachiari e col., 1970).

Quando o estudo citogenético de linhagens híbridas foi realizado com a utilização de técnicas de bandamento, verificou-se que a frequência observada de diferentes cromossomos humanos em clones independentes desviava-se daquela esperada no caso de segregação casual.

Assim, os cromossomos 8, 9, 14 e 16 eram os menos retidos nas linhagens estudadas por Pearson (1973) e por Ruddle (1973). Já os cromossomos 3, 11, 12, 13, 19, 20, 21, 22 e Y, estão entre os mais frequentemente encontrados (Boone e col., 1972; Douglas et al., 1973; Pearson, 1973; Norum e Migeon, 1974; Brown e Shows, 1975).

Estudos realizados em clones primários independentes indicaram que diferentes cromossomos humanos tendem a ser retidos em diferentes clones. Do mesmo modo, clones formadas por fusão de diferentes linhagens de células ancestrais retêm diferentes combinações cromossômicas (Allderdice e col., 1973; Povey e col., 1974).

Apesar de parecer que a segregação de cromossomos humanos em células híbridas não é independente, a probabilidade de um determinado cromossomo ser retido no híbrido poderia ser independente da probabilidade dos outros cromossomos serem.

Croce e col. (1973) ao estudarem híbridos (homem x camundongo) mantidos em meio HAT, verificaram que 80% das células, além de terem o cromossomo 17 humano, retinham também o cromossomo 7. Quando colocaram as células híbridas na presença de BudR, verificaram a perda do cromossomo número 17 (portador do gene determinador de TK), mas a permanência do

cromossomo humano número 7 em vários clones. Esse achado de mostrava não haver interdependência obrigatória entre os dois cromossomos.

Shows e Brown em 1975, por outro lado, sugeriram a existência de segregação concordante entre os cromossomos 13 e 16 humanos.

Rushton (1976) encontra 22 correlações significantes, ao estudar 15 clones híbridos independentes, apesar de que, pela teoria estatística de comparações múltiplas, o resultado esperado deveria ser de aproximadamente 7 se as associa - ções entre dois pares de cromossomos fosse casual.

I.4 - Seleção de células híbridas

Uma vez estabelecida a fusão celular, alguns polícaríocitos sofrem fusão de seus núcleos, podendo originar células híbridas com capacidade de proliferação indefinida. Há a necessidade, no entanto, de se isolar as células híbridas das ancestrais, pois essas últimas competindo com as híbridas poderão sobrepujá-las em taxa de crescimento. A eliminação das células ancestrais pode ser obtida através dos seguintes processos:

1º- Seleção natural

A seleção natural ocorre quando as células híbridas proliferam mais rapidamente que as ancestrais havendo, então, possibilidade de as últimas serem eliminadas por replicação e troca de meio. Como já foi referido anteriormente, esse fenômeno de "vigor híbrido" é raro.

2º- Seleção visual

A maioria das células híbridas são resultantes de fusão nuclear de policariócitos binucleados. São células de maior tamanho, assumindo, algumas vezes, morfologia diferencial em relação às ancestrais. É o caso por exemplo de células híbridas resultantes de fusão entre células de linhagens estabelecidas de camundongo e fibroblastos humanos cultivados. Enquanto as células de camundongo são pequenas, triangulares, altamente refráteis e com orientação casual no cultivo, os fibroblastos humanos cultivados são fusiformes, longos e de orientação paralela na cultura. Já as células híbridas são altamente refráteis, menos fusiformes que as ancestrais humanas tendo uma orientação intermediária na cultura. Se a mistura celular for semeada em baixa densidade e submetida à ação de um agente fusogênico, como o vírus Sendai por exemplo, as colônias híbridas podem ser facilmente isoladas e subcultivadas

graças a sua morfologia diferencial.

3º- Seleção relacionada com as características de crescimento das células

As características de crescimento das células podem ser utilizadas como um meio de selecioná-las. É o caso por exemplo, das células linfóides que não aderem ao frasco de cultivo e podem ser eliminadas pela simples troca de meio.

Se as duas células ancestrais têm taxas de crescimento grosseiramente diferentes, aquela com crescimento mais lento ou limitado "in vitro" pode ser eliminada por replicagem. É o caso, por exemplo, de células diferenciadas e de fibroblastos humanos mantidos em cultura por muito tempo.

4º- Seleção contra um ou ambos ancestrais usando marcadores genéticos

Seleção desse tipo foi empregada pela primeira vez por Littlefield que utilizou o meio HAT para a seleção de híbridos obtidos por fusão espontânea entre duas sublinhagens de células L de camundongo deficientes de HGPRT e TK.

As células híbridas aparentemente expressaram a atividade de ambas enzimas, pois foram aptas a utilizar timidina e hipoxantina do meio quando a neosíntese de purinas e pirimidinas foi bloqueada pela aminopterina.

O emprego desse meio seletivo representou um avanço metodológico significativo e tem sido o mais utilizado em experimentos de hibridação celular. Por essa razão passaremos a descrever de maneira sintética as propriedades da seleção HAT.

A - Seleção HAT

Células mutantes de mamíferos podem adquirir resistência a análogos da purina, tais como 8-azaguanina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina e 6-azahipoxantina, a qual é acompa

nhada por perda da capacidade de utilizar os metabólitos naturais hipoxantina ou guanina, como única fonte de purina.

Em condições normais todas as células são capazes de realizar neo-síntese das purinas necessárias. Na presença, porém, de níveis inibitórios de aminopterina ou ametopterina, um análogo do ácido fólico que bloqueia a redutase do ácido fólico, ocorre inibição tanto de neo-síntese de purinas quanto de outras reações de simples transferência de carbono, que resultam em síntese de timidilato e certos aminoácidos. A redução do dihidrofolato em tetra-hidrofolato catalizada pela redutase é necessária em 2 passos da biossíntese de purinas (Fig. 1) e na conversão do ácido desoxiuridílico em ácido timidílico pela sintetase de timidilato (Fig. 2). A inibição da síntese do timidilato pode ser evitada adicionando-se timidina ao meio, para que ela seja utilizada pelas células de mamíferos pela via metabólica selvagem da pirimidina (Fig. 2). Da mesma maneira, a neo-síntese de purinas só será obtida se as células estiverem aptas a utilizar purinas préformadas na fonte ou precursores fornecidos ao meio.

A formulação do meio HAT contendo hipoxantina (10^{-5} M), aminopterina ($3,2 \times 10^{-6}$ M) e timidina (10^{-5} M) pode depender do tipo de célula e da composição do meio de crescimento, incluindo o nível de purinas do soro. Se o meio não contém o aminoácido não essencial glicina, esse deverá ser adicionado em concentração de 10^{-4} M. Tais meios são denominados de THAG ou GHAT. Outra variação desse meio é substituir a aminopterina por azaserina, um análogo da glutamina que inibe a biossíntese de purinas.

O meio HAT é duplamente seletivo, isto é, os produtos de dois locos gênicos HGPRT e TK, devem estar presentes a fim de que as células sobrevivam na presença de aminopterina.

Outros meios seletivos que se utilizam de marcado-

res genéticos vêm sendo testados e utilizados em escala crescente. É o caso, por exemplo, dos meios seletivos AA e HAM. O meio seletivo AA descrito por Kusano e col. (1971) consiste em meio de cultura ao qual se adiciona adenina ($5 \times 10^{-5}M$) e alanosina ($5 \times 10^{-5}M$).

Como pode ser visto na Fig. 1 a neo-síntese de ácido adenílico (AMP) é feita a partir do ácido inosínico em duas passagens sequenciais: 1- conversão de ácido inosínico em adenilatossuccinato (SAMP), que requer aspartato; 2- quebra do adenilatossuccinato e formação de ácido adenílico e fumarato. Em presença de alanosina ocorre inibição da neo-síntese do ácido adenílico no passo sintetase. A sobrevivência da célula dependerá, pois, de uma fonte exógena de ácido adenílico, conseguida através da conversão de adenina em AMP por ação da transferase da adenosina fosforribosil (APRT). Células deficientes dessa enzima não conseguirão sobreviver.

O meio HAM, descrito por Chan e col. (1975) contém hipoxantina, aminopterina e 5-metildeoxicidina. O seu mecanismo seletivo baseia-se no bloqueio da biossíntese de purinas, pela aminopterina e conversão de hipoxantina em ácido inosínico via HGPRT e timidina a ácido timidílico via TK. Sob essas condições há requerimento absoluto de timidina. Se a célula tem capacidade de produzir desaminase de deoxicidina (dcD) a 5-metildeoxicidina fornecida no meio pode ser convertida em timidina. Se a célula for deficiente para dcD ela perecerá.

De um modo geral os experimentos de hibridação celular utilizam seleção contra ambas linhagens ancestrais, valendo-se de marcadores genéticos em uma delas e características diferenciais de crescimento na outra.

Outros artifícios podem ser usados para a seleção de uma das linhagens, como, por exemplo, sensibilidade dife

rencial à temperatura, a drogas e a agentes virais. O primeiro deles foi utilizado na seleção de linhagens híbridas de células de inseto e humanas, com as células ancestrais humanas inibidas por crescimento em meio de cultura de inseto e as ancestrais de inseto por incubação do cultivo a 36°C.

Para a seleção de células ancestrais humanas é comum o emprego de ouabain ou estrofantina, um glicosídeo cardíaco que, em concentrações de 3×10^{-8} a 1×10^{-7} M, inibe o crescimento de fibroblastos humanos de passagens precoces. As células de roedores são, em geral, resistentes a tais concentrações de ouabain, somente sendo afetadas por concentrações da ordem de 1×10^{-3} M.

Zepp e col. (1971) em um experimento visando a obtenção de híbridos entre células humanas e de inseto, utilizaram um vírus citopatogênico para eliminar células ancestrais humanas.

A seleção de uma das linhagens ancestrais poderia ser feita antes da hibridação, conforme proposto por Pontecorvo em 1971. Isso seria obtido submetendo a linhagem ancestral a radiações X e γ ou por tratamento com bromodeoxiuridina e posterior exposição a luz ultravioleta. A produção de quebras cromossômicas provocadas por esses agentes provocaria a eliminação preferencial dos cromossomos da linhagem tratada, ao mesmo tempo que diminuiria a viabilidade da mesma no cultivo.

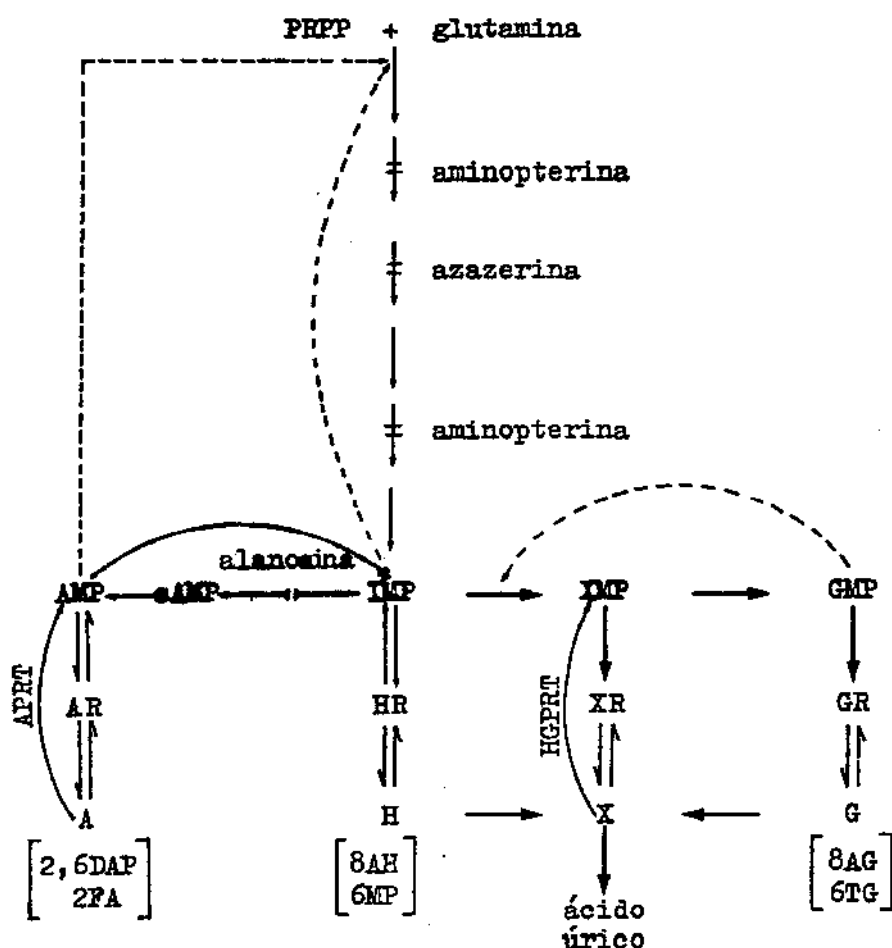


Fig. 1- Biossíntese, reutilização, interconversão e passos catabólicos de purinas

APRT- fosforribosiltransferase da adenosina; HGPRT- fosforribosiltransferase da hipoxantina-guanina; A- adenina; AR- adenosina; AMP- adenosina 5'monofosfato; G- guanina; GR- guanosina; GMP- guanosina 5'monofosfato; H- hipoxantina; HR- inosina; IMP- inosina 5'monofosfato; PRPP- 5'fosforribosil 1-pirofosfato; sAMP- ácido adenilossuccínico; X- xantina; XR- xantósina; XMP- xantósina 5'monofosfato; 2,6DAP- 2,6 diaminopurina; 2FA- 2 fluoroadenina; 8AH- 8 azahipoxantina; 6MP- 6 mercaptopurina; 8AG- 8 azaguanina; 6TG- 6 tioguanina; setas pontilhadas - retrainibição.

1.5 - Utilização de híbridos celulares em Genética Humana

Como já se mencionou anteriormente, a produção de linhagens híbridas de células somáticas ofereceu oportunidade ímpar para o desenvolvimento da Genética Humana, visto que essa metodologia é particularmente útil em estudos de mapeamento cromossômico e complementação genética.

Até 1967 os estudos de ligação na espécie humana eram limitados à análise de segregação gênica ou de deficiências cromossômicas em famílias. Em consequência dessa limitação no início de 1969 conhecia-se apenas 10 grupos de ligação autossômica, sendo somente cinco deles aceitos com segurança. Em nenhum caso porém, os autossomos portadores dos grupos de ligação tinham sido identificados (Levitan e Montagu, 1971).

O primeiro loco autossômico (TK) foi localizado em 1967 por Weiss e Green que, ao estudarem híbridos somáticos de células humanas e de camundongo obtiveram clones, os quais, após crescimento em meio HAT por 50 a 100 gerações celulares re tinham apenas um cromossomo do grupo E. Esse cromossomo foi posteriormente identificado como sendo o número 17 (Matsuya e col. 1968).

Para que se tenha uma idéia do avanço proporcionado por essa metodologia basta verificar que em 1973 já eram conhecidos 24 locos autossômicos e no ano seguinte esse número passava a 40. Atualmente conhece-se a localização precisa de 70 locos autossômicos sendo que 40 outros aguardam confirmação.

Quanto ao cromossomo X, 95 locos foram situados por estudos de famílias e dois através de híbridos de células somáticas (McKusick, 1976). O estudo de híbridos tem, contudo, contribuído para a localização regional desses locos no cromossomo X, bem como para o esclarecimento da seqüência linear desses genes.

O método de mapeamento utilizando híbridos somáti

cos baseia-se na correlação entre os marcadores genéticos utilizados e os cromossomos em clones híbridos derivados independentemente.

Os testes de mapeamento podem ser divididos em três categorias: teste de sintenia, teste de localização gênica e teste de localização regional do gene.

O teste de sintenia considera a correlação entre marcadores fenotípicos que segregam juntos entre clones híbridos. Se os marcadores segregam juntos, pode-se considerar que estejam localizados no mesmo cromossomo. Erros experimentais de vários tipos podem proporcionar resultados falsos. Assim, falsos negativos podem ser obtidos por causa de quebras cromossômicas ou de falhas na detecção de produtos presentes. Falsos positivos podem resultar de rearranjos cromossômicos ocorridos "in vitro" ou devido à ausência de segregação casual dos cromossomos. Esse tipo de teste não localiza os genes, nem dá informação à respeito da distância entre eles.

O teste de localização gênica baseia-se na correlação entre a segregação de um cromossomo específico e dos fenótipos. Ele permite, pois, que se saiba em que cromossomo do complemento localizam-se genes específicos ou grupos de sintenia. Serve, também, para confirmar os resultados do teste de sintenia. Não fornece, porém, informações à respeito da localização do gene no cromossomo. Resultados falsamente negativos podem ser obtidos por erros técnicos na detecção do fenótipo ou, quando a frequência cromossômica é baixa. Resultados falsamente positivos podem aparecer quando a identificação cromossômica é difícil ou, quando dois cromossomos segregam juntos por acaso.

A localização regional de genes pode ser obtida de vários modos. Pode-se, por exemplo, utilizar linhagens humanas portadoras de translocações ou deficiências cromossômicas. Es-

sas linhagens são, em geral, obtidas a partir de um indivíduo com alterações fenotípicas devido à presença de aberrações cromossômicas não equilibradas. Um exemplo desse tipo de alteração cromossômica que forneceu informações à respeito de localização gênica regional é a translocação KOP.

Essa é uma translocação entre o braço longo do cromossomo X e praticamente todo o cromossomo 14. A translocação dividiu o cromossomo X em dois segmentos denominados Xp (segmento contendo o braço curto) e Xq (segmento que contém o braço longo). Verificou-se que os genes PGK, HGPRT e G6PD estão localizados no braço longo (Ricciuti e Ruddle, 1973).

Experimentos utilizando diferentes translocações poderiam levar à determinação da ordem dos genes ao longo do cromossomo bem como à localização regional desses genes.

Outro modo de se determinar a localização regional de genes é utilizar translocações e deficiências que ocorrem esporadicamente durante o cultivo de clones híbridos. Pode-se, ainda, provocar essas aberrações tratando as culturas por agentes químicos, físicos ou biológicos. Através desse método, localizou-se o gene da quinase de timidina (TK) no braço longo do cromossomo 17 (provavelmente na banda q21-22). Os dados sugeriram, também, que esse gene está em íntima ligação com o gene da quinase de galactose (Elsevier e col., 1974).

Outro fator que pode ser utilizado na localização regional de genes é o efeito de posição. Hamerton e col. (1975) localizaram o gene da desidrogenase 1 de isocitrato (IDH-1) na banda q11 do cromossomo 2, através dessa metodologia. Isso foi possível devido a ocorrência "in vitro" de uma translocação entre o cromossomo 2 humano e um cromossomo de hamster chinês. Apesar de os dois derivados cromossômicos terem sido retidos nas células híbridas não foi detectada a presença de IDH-1, o que levou Hamerton e col. a interpretar o fato como resultante de

deficiência física do gene ou de inativação fisiológica do mesmo por efeito de posição.

Em 1975 (Third International Workshop on Human Gene Mapping) existiam as seguintes informações à respeito da localização regional de genes em cromossomos humanos:

Cromossomo número	Número de locos confirmados	Provisórios	Discordantes
1	9	9	-
2	3	4	4
3	-	-	2
4	2	5	-
5	1	3	-
6	3	1	-
7	-	12	1
8	1	1	-
9	5	1	2
10	3	2	-
11	4	6	-
12	2	5	-
13	2	1	-
14	2	1	-
15	4	3	-
16	2	3	-
17	1	2	-
18	1	-	-
19	2	-	-
20	2	2	-
21	2	5	-
22	-	1	-
X	5	-	-

Os locos confirmados são aqueles localizados regionalmente em pelo menos dois laboratórios. O termo provisório

refere-se a localizações detectadas por meio de trabalhos irrefutáveis realizados em apenas um laboratório. Os discordantes são aqueles em que os resultados apresentados por diferentes laboratórios são contraditórios.

Ruddle e Creagan em 1975, chamam a atenção para a necessidade de se obter maiores informações à respeito de mapeamento de cromossomos humanos. Mapas genéticos de alta resolução e densidade poderiam ser úteis em diagnóstico pré-natal e aconselhamento genético.

A detecção de caracteres fenotípicos por análise de células do líquido amniótico é restrita aos genes que se expressam nessas células. A detecção de caracteres que não se expressam em células de líquido amniótico, ou para os quais não existem técnicas adequadas de identificação pode ser feita de maneira indireta. Isso pode ser conseguido por meio do método denominado detecção indireta por ligação (IDL - Ruddle e Creagan, 1975). Para que ele seja utilizável há necessidade de que o loco a ser pesquisado esteja em íntima ligação (distância menor que 10cM), com outros cujos produtos gênicos se expressam em células de líquido amniótico. Outros requisitos necessitam ser preenchidos tais como: 1º- o loco indicador deverá ser polimórfico e as formas variantes deverão segregar de maneira apropriada na família em questão; 2º- informação precisa a respeito da distância entre os dois locos (indicador e o da doença) para que se possa calcular o risco de transmissão da doença, levando em consideração a recombinação meiótica.

Já existem vários grupos de ligação descritos que permitiriam a utilização desse método. É o caso, por exemplo, da distrofia muscular miotônica e o loco secretor, bem como da hemofilia A e o loco da desidrogenase de 6-fosfato de glicose.

Contudo, para que tal método possa ser utilizado em larga escala há a necessidade de localização de maior número de

marcadores. Segundo Ruddle e Creagan (1975) isso só será factível quando tivermos mais de 1000 genes mapeados. Acreditam esses autores que dentro da próxima década tal situação será alcançada.

Quanto aos estudos de complementação genética, eles têm sido efetuados tanto em policariócitos quanto em células híbridas oriundas de fusão intra e interespecífica.

Vários estudos têm demonstrado a viabilidade de análise de complementação genética em híbridos intraespecíficos humanos. Assim é que Silagi e col. (1969) obtiveram complementação genética por hibridação de uma linhagem diplóide de fibroblastos de um paciente com acidúria orótica com uma linhagem humana heteroplóide estabelecida "in vitro".

A primeira linhagem apresentava deficiência de descarboxilase de oritidina 5' monofosfato (OMP) e pirofosforilase de OMP, além de possuir a variante eletroforética B de desidrogenase de 6-fosfato de glicose (G6PD). A linhagem heteroplóide era deficiente de HGPRT e expressava a variante eletroforética A de G6PD. As células híbridas possuíam descarboxilase de OMP, pirofosforilase de OMP, HGPRT e ambas as formas de G6PD.

Outros grupos de complementação foram descritos como, por exemplo, o de xeroderma pigmentosum (XP). Verificou-se por esse método que a síndrome de De Sanctis-Cachione era geneticamente distinta da síndrome clássica de XP (de Weerd-Kastelein e col., 1972).

Posteriormente estudos colaborativos de Kraemer e col. (1975) e Weerd-Kastelein e col. (1974) demonstraram haver 5 grupos de complementação para XP o que evidencia uma grande heterogeneidade genética desse grupo nosológico.

O mesmo tipo de observação foi feito para as doenças de Tay-Sachs e Sandhoff (Ropers e col., 1975; Thomas e col., 1974; Galjaard, H. e col., 1974, entre outros). Assim, a isozi

ma hexosaminidase A é formada nos heterocariócitos obtidos a partir da fusão de células de pacientes com as doenças de Tay-Sachs e de Sandhoff, não o sendo nas células ancestrais.

Híbridos celulares têm sido utilizados em inúmeras outras áreas tais como estudo de organização do genoma, controle genético de malignidade, mapeamento genético comparativo de primatas, estudos de diferenciação celular e ação gênica, etc.

I.6 - Objetivos

As páginas anteriores deixam transparecer a preocupação dos pesquisadores em encontrar agentes químicos que apresentem a propriedade de promover fusão celular.

Apesar de o vírus Sendai inativado ter sido usado amplamente com essa finalidade, inúmeros inconvenientes advêm de sua utilização. Realmente, além de ser de produção laboriosa, ele é ineficaz sobre determinados tipos de células. Sua atividade pode ser variável dependendo do lote empregado, ele apresenta decréscimo de atividade com o tempo, além do que possibilita a introdução de fragmentos de informação viral nas células tratadas. A potencialidade de fusão do vírus Sendai não pode ser testada antes do processo, em virtude de não se conhecer os componentes virais responsáveis pelo mesmo.

Outros agentes de fusão celular foram testados, tendo-se mostrado porém, menos eficientes que o vírus Sendai. É o caso, por exemplo, da lisolecitina, cujo efeito lítico sobre membranas, provoca danos celulares de tal ordem que torna sua utilização impraticável.

Quanto às vesículas unilamelares, além de terem eficiência menor do que o vírus Sendai, não são factíveis em qualquer laboratório. De fato, o preparo das vesículas unilamelares exige o emprego de fosfolípídeos altamente purificados, os quais só podem ser obtidos em laboratórios que contam com equipamentos apropriados. Além disso, há que se considerar que o processo de preparação das vesículas é bastante laborioso.

Foi, pois, com euforia que a comunidade científica recebeu as publicações do grupo de Kao em 1974, as quais apresentavam um novo agente "fusogênico" que parecia preencher os quesitos até então procurados. Realmente, o polietilenoglicol

(PEG) além de ser um produto barato, parecia apresentar eficiência similar ao vírus Sendai, além de não possuir os inconvenientes característicos dos outros agentes promotores de fusão celular.

Pontecorvo (1975) estimulado pelos dados apresentados por Kao e sua equipe, realizou experimentos com células de hamster chinês, de camundongo e humanas. Seus resultados confirmaram a eficiência do PEG, tendo demonstrado que esse agente era perfeitamente utilizável tanto em culturas de monocamadas, quanto em suspensões celulares.

Em 1976, Maul e col. estudaram o processo de fusão celular induzido pelo PEG valendo-se de microscopia óptica e eletrônica. Verificaram que o processo era extremamente rápido, o que dificultava a caracterização exata dos passos iniciais da fusão celular. De qualquer modo, ao microscópio óptico notaram os primeiros sinais de fusão 9 minutos após a remoção do PEG. A partir de então há uma rápida fusão em numerosas áreas, sendo o processo acelerado quando as culturas são incubadas em estufa a 37°C. Por outro lado, observaram que ao microscópio eletrônico já é possível constatar extensa fusão 3 minutos após a eluição do PEG sendo que, após 30 minutos ela está praticamente completa, com espessamento das membranas e continuidade das células, que assumem morfologia de sincício. Os estágios finais da fusão mostram um significativo aumento de microvilosidades sobre a maioria das células.

Ainda em 1976 Davidson e col. em duas publicações relataram a repetição dos experimentos de Pontecorvo (1975), tendo apresentado simplificações técnicas e testado as concentrações e peso molecular do PEG na hibridação de células de mamíferos. Concluíram que a combinação ótima em termos de eficiência de hibridação era PEG-P.M. 1000 a 50%.

Apesar de os fatos supracitados sugerirem que o PEG

é eficiente na produção de híbridos celulares, restava saber se tais híbridos podem constituir linhagens suficientemente estáveis, de maneira a serem utilizadas em programas de análise genética de células somáticas. Da mesma maneira havia necessidade de se conhecer a evolução cariotípica dessas linhagens, bem como o padrão de segregação dos cromossomos.

Em vista disso, propusemo-nos a realizar esse estudo utilizando híbridos celulares obtidos a partir de fusão de células de hamster chinês com linfócitos humanos com o auxílio do PEG.

Os objetivos em mente foram os seguintes:

1º- Verificar se as linhagens híbridas obtidas apresentavam segregação preferencial de cromossomos humanos.

2º- Verificar a intensidade de perda de cromossomos humanos em linhagens híbridas mantidas em meio não seletivo, por meio da análise cariotípica de diferentes passagens.

3º- Estudar o grau de heterogeneidade das linhagens, visando a sua utilização na produção de clones.

4º- Pesquisar a ocorrência de retenção ou segregação preferencial de cromossomos humanos específicos.

CAP. II - MATERIAL E MÉTODOS

No presente experimento foram utilizadas duas linhagens de hamster chinês cedidas gentilmente pelo Dr. John L. Hamerton, do Departamento de Genética - Health Sciences Centre Winnipeg - Canadá. Uma delas era pseudodiplóide, com número modal igual a 22 cromossomos (variação de 20 a 24 cromossomos) que apresentava 15% de células tetraplóides (CHW 1102). A outra, aproximadamente tetraplóide, possuía um número modal de 43 cromossomos (variação de 39 a 45 cromossomos - CHW 1103).

Ambas as linhagens são deficientes de transferase de hipoxantina-guanina fosforribosil. Essa deficiência enzimática foi conseguida por meio de tratamento da linhagem celular selvagem de hamster chinês com metilmetanosulfonato (10^{-3} M) durante duas horas e 30 μ g/ml de 8-azaguanina (Gee e col, 1974). A linhagem CHW 1103, foi obtida a partir da CHW 1102, por tratamento com colquicina (Hamerton e col. - dados não publicados).

Essas linhagens são mantidas em crescimento em meio MENA Fc10 (meio mínimo essencial de Earl suplementado com 1,0mM de piruvato de sódio, 0,1mM de cada um dos aminoácidos não essenciais e 10% de soro bovino fetal).

Antes da fusão as células foram cultivadas em meio MENA Fc10 contendo 10 μ g/ml de 6-tioguanina e 10 μ g/ml de 8-azaguanina por, pelo menos, 10 dias. Esse procedimento foi utilizado com a finalidade de eliminar células selvagens, eventualmente presentes na cultura por mutação recorrente.

A suspensão celular do ancestral hamster chinês foi obtida por tripsinização das culturas. Após lavagem das células por duas vezes em solução fisiológica de Hanks, o material foi centrifugado e as células diluídas em meio mínimo de Earl (MEM). Foi realizada, então, a contagem do número de células

e feita diluição em MEM de acordo com a concentração de células desejada.

O experimento utilizou, também, linfócitos de sangue periférico de um indivíduo normal do sexo masculino.

A separação dos leucócitos foi realizada de acordo com o seguinte procedimento:

1º- 5ml de sangue periférico heparinizado foram adicionados a 8 tubos contendo 3ml de Ficoll Isopaque (peso específico 1,076 - 1,078).

2º- A mistura foi centrifugada a 1000 r.p.m. durante 20 minutos.

3º- Desprezado o sobrenadante, a camada de leucócitos foi retirada de cada tubo e transferida para tres tubos contendo solução fisiológica de Hanks.

4º- Após centrifugação dessa mistura, o sedimento dos tres tubos foi reunido em um tubo contendo solução salina de Hanks.

5º- As células foram lavadas em solução de Hanks por duas vezes e diluídas em MEM.

Fusão:

Foram realizados tres "cruzamentos":

- I- 5×10^6 células CHW 1103 x 5×10^6 linfócitos
- II- 5×10^6 células CHW 1103 x 5×10^6 linfócitos
- III- 10×10^6 células CHW 1102 x 10×10^6 linfócitos.

O procedimento empregado na fusão (Pontecorvo, 1975) foi o mesmo para todos os cruzamentos:

1º- As células ancestrais foram misturadas e então centrifugadas por 5 minutos a 900 r.p.m.

2º- O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspensão por 30 segundos em 1ml de solução de PEG (1:1 em meio mínimo de Earl).

3º- Decorridos os 30 segundos 9ml de MEM foram adi

cionados aos tubos os quais foram centrifugados a 900 r.p.m. por 5 minutos.

4^o- O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em MEM e incubado a 37^oC por 5 minutos.

5^o- Os tubos foram novamente centrifugados e o sedimento ressuspenso em MENA Fc10.

6^o- O material foi, então, incubado a 37^oC por mais 30 minutos.

7^o- O material foi centrifugado e o sedimento referente aos cruzamentos I e II ressuspenso em 5ml de MENA Fc10, enquanto aquele do cruzamento III foi diluído em 10ml de MENA Fc10.

8^o- 1ml da suspensão foi distribuído em 5 placas de Petri de 60mm de diâmetro.

9^o- Decorridas 24 horas, o meio MENA foi substituído por meio THAG (meio MENA Fc10 mais timidina, hipoxantina, aminopterina e glicina). Cerca de 10 a 15 dias depois da fusão verificou-se em cada uma das placas de Petri a presença de colônias supostamente híbridas, pelo fato de estarem crescendo em meio seletivo.

Coleta das colônias e expansão das linhagens híbridas:

As colônias foram coletadas de acordo com o seguinte procedimento:

1^o- O meio THAG foi retirado.

2^o- Às colônias escolhidas foi aposto um cilindro de aço inoxidável, o qual foi fixado com uma graxa especial esterilizada.

3^o- 4 gotas de solução de tripsina (0,05%) foram colocadas dentro do cilindro e retiradas em seguida. Este procedimento destina-se à lavagem das células, uma vez que o soro contido no meio bloqueia a ação da tripsina.

4^o- Mais 4 a 5 gotas de solução de tripsina foram adicionadas ao cilindro.

5^o- Após 3-5 minutos a tripsina foi retirada, sendo adicionado o meio THAG.

6^o- A suspensão de células foi, então, transferida para 2 placas de Petri de 35mm, as quais foram incubadas a 37^oC em atmosfera de 5% de CO₂.

7^o- Quando o crescimento se iniciou o meio foi trocado a cada 2 dias.

8^o- Cerca de uma semana após a coleta das colônias, o meio THAG foi substituído por meio McCoy 5a modificado (Schwarg: Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino.

9^o- Quando se notou a confluência das culturas, as células foram tripsinizadas e transferidas para placas de Petri de 60mm de diâmetro. A cada uma das tripsinizações corresponde uma passagem.

10^o- Cada vez que ocorria confluência das células elas eram tripsinizadas e redistribuídas em placas de Petri de 60mm, até que se tivesse 3 a 4 placas de Petri com material.

11^o- Uma das placas era reservada para continuar a replicação da linhagem, enquanto as outras eram reservadas para o estudo cariotípico das linhagens.

Preparação citológica para estudo cromossômico:

Duas a tres placas de Petri de 60mm foram incubadas com colquicina 10⁻⁵M, 2 horas antes da fixação, desde que apresentassem células com alto índice mitótico e não estivessem confluentes. Essa situação era alcançada entre as 6^a e 12^a passagens, aproximadamente 2 a 3 semanas após a coleta das colônias.

Decorridas 2 horas, as culturas sofreram o seguinte tratamento:

1^o- O meio era desprezado e, após lavagem com trip

sina, cada placa recebeu 2ml dessa protease.

2º- Após cerca de 5 minutos de incubação das placas a 37°C, as células se desprenderam das mesmas. Adicionou-se, então, às placas cerca de 3ml de meio para bloquear a ação de tripsina.

3º- As suspensões celulares de todas as placas de Petri foram reunidas em um tubo de centrífuga siliconizado, o qual foi centrifugado a 1000 r.p.m/10 minutos.

4º- Após desprezar o sobrenadante ressuspendeu-se o sedimento em KCl 0,075M (solução hipotônica) e incubou-se o material a 37°C por 30 minutos.

5º- Decorridos os 30 minutos, o material foi centrifugado a 700 r.p.m/5 minutos.

6º- O sedimento foi fixado adicionando-se, gradualmente, uma solução fixadora de metanol - ácido acético 3:1.

7º- Após cerca de 24 horas o fixador foi trocado 3 vezes. O sedimento foi, então, ressuspenseo em 1-2ml de fixador fresco.

8º- As lâminas foram feitas segundo o método de secagem ao ar, sem a utilização de aquecimento.

Coloração das lâminas:

As lâminas foram coradas com dihidroclorato de quinacrina, segundo a técnica modificada de Casperson (1970). A coloração das lâminas foi feita em geral 3 a 7 dias após a montagem das mesmas, segundo o seguinte procedimento:

1º- Hidratação das lâminas após passagens de dois minutos nos alcoois absoluto, 70°GL e 50°GL, e de 5 minutos em alcool 20°GL.

2º- Incubação das lâminas em tampão McIlvaine pH 4,5 durante 5 minutos, à temperatura ambiente.

3º- Incubação das lâminas em solução de dihidroclor

reto de quinacrina (Sigma nº Q-0250) a 0,5% em tampão McIlvaine pH 4,5 durante 20 minutos à 36°C.

4ª- A diferenciação das lâminas foi realizada por incubação em tres frascos contendo tampão McIlvaine pH 4,5.

5ª- As lâminas foram montadas em tampão McIlvaine pH 4,5, utilizando-se lamínulas 24x40mm, as quais foram vedadas com esmalte de unha.

Análise cromossômica:

A análise cromossômica foi realizada em microscópio Zeiss equipado com luz ultravioleta (HBO-200), filtro de excitação KP-500 e filtro barreira de 490nm.

De cada linhagem foram fotografadas 20 células, usando objetiva de imersão (100 x) e filme H & W VTE (The H & W Co. St. Johnsbury, VT; USA). Para linhagem número 7 fotografamos 14 células. A análise cromossômica detalhada foi realizada utilizando-se cópias fotográficas de 24x18cm, em papel F-3 ou F-4 - Kodak.

14 linhagens foram estudadas neste experimento: 8 provenientes do cruzamento I (1; 1a; 2; 3; 3a; 3b; 3c e 4); 2 provenientes do cruzamento II (5 e 6) e 4 provenientes do cruzamento III (7, 8, 9 e 10).

As linhagens 1 e 1a, bem como as linhagens 3, 3a, 3b e 3c, foram obtidas a partir de colônias coletadas das placas de Petri 1 e 3 respectivamente. As demais linhagens foram coletadas de placas de Petri independentes.

O primeiro exame cariotípico foi realizado de 6 a 12 passagens após a coleta das colônias, como já referido anteriormente. A partir de então foram realizadas preparações cromossômicas a cada 10 passagens, num total de 4 fixações. Inicialmente analisou-se citogeneticamente o material obtido nas 1ª e 3ª fixações. Quando houve mudança drástica na composição cariotípica da linhagem ou quando havia ausência de cro

mossomos humanos por ocasião da 3ª fixação, o material da 2ª fixação era estudado. Nos casos pertinentes, ou seja quando se notou acentuada perda cromossômica ou indícios de seleção celular, a 4ª fixação também foi analisada.

CAP. III - RESULTADOS

A análise cariotípica das 14 linhagens, demonstrou os resultados apresentados na tabela I. Essa tabela inclui os valores da média e desvio padrão do número total de cromossomos, número de cromossomos de hamster chinês (Cg), número de cromossomos humanos (Hs), número de rearranjos (R) e de fragmentos não identificados (FNI). A quase totalidade dos rearranjos refere-se a cromossomos de hamster chinês. Em duas linhagens foram observados rearranjos de cromossomos humanos, os quais compreenderam deficiências dos cromossomos X e 8 respectivamente (3c e 3b).

Por ocasião da terceira fixação das linhagens 4, 6 e 7 não foram encontradas células com cromossomos humanos identificáveis. As linhagens 6 e 7 apresentaram, por ocasião da primeira fixação, duas populações celulares, uma das quais com ausência de cromossomos humanos. Esse fato levou-nos a analisar a segunda fixação dessas três linhagens. Em uma das 20 células analisadas na primeira fixação da linhagem 3b, não foram detectados cromossomos humanos. A linhagem 3c, por outro lado, apresentou uma diminuição drástica do número de cromossomos humanos por ocasião da terceira fixação (de 9,7 na primeira fixação para 1,9 na terceira). Esses achados levaram à análise das segunda e quarta fixações de ambas as linhagens.

Na terceira fixação da linhagem 3c foram observadas 13 células com apenas dois cromossomos humanos, o cromossomo número 10 e o cromossomo X com deficiência do braço longo (del (HsX)(pter → q13::q26 → qter). Seis das células restantes continham os seguintes cromossomos humanos: 3, 6, 10, 12, 13, X e Y (1 célula); 10 e 19 (1 célula); 10 (4 células) e Xq- (1 célula). Em uma célula não foram identificados cromossomos humanos.

TABELA I- Resultados da análise cariotípica das 14 linhagens.

(\bar{x} = média; $s(x)$ = desvio padrão; Cg = cromossomos de hamster chinês; Hs = cromossomos humanos; R = rearranjos; FNI = fragmentos cromossômicos não identificados).

Nº da linhagem/ Nº da passagem	Nº total de cromossomos		Nº de Cg		Nº de Hs		Nº de R		Nº de FNI	
	\bar{x}	$s(x)$	\bar{x}	$s(x)$	\bar{x}	$s(x)$	\bar{x}	$s(x)$	\bar{x}	$s(x)$
1/6	51,1	3,7	33,4	4,0	8,8	2,0	2,6	1,5	6,2	3,1
1/26	47,8	1,6	32,3	1,8	6,7	1,5	2,0	0,8	6,7	2,3
1a/6	45,5	3,2	29,2	4,1	3,3	1,0	4,2	1,6	8,8	2,7
1a/27	44,3	2,8	28,0	2,7	2,7	0,9	5,0	1,5	8,7	3,1
2/7	57,6	5,0	35,1	3,1	9,3	1,5	4,2	0,9	10,6	2,8
2/25	54,3	2,6	31,4	2,2	8,5	1,2	4,9	1,4	9,4	1,6
3/7	52,8	3,9	30,7	3,0	10,7	2,2	2,9	0,8	8,6	2,0
3/27	50,8	2,2	31,2	1,7	9,6	1,3	2,5	0,6	7,7	1,6
3a/9	45,8	2,5	26,6	3,0	4,4	0,9	6,4	1,4	8,6	2,1
3a/30	46,1	1,4	26,1	1,7	3,1	0,8	7,6	1,4	8,2	1,7
3b/12	45,9	2,6	32,2	2,3	2,8	1,6	4,4	1,0	7,5	1,9
3b/22	43,8	2,8	30,8	3,4	2,5	0,9	4,0	1,6	7,5	2,0
3b/33	44,0	2,4	31,0	2,0	2,1	0,9	6,2	2,0	5,9	1,9
3b/41	* 42,8 44,3	2,1 0,9	31,2 31,5	4,5 2,5	0,0 1,3	- 0,5	2,3 4,0	1,2 1,1	9,0 8,6	1,8 2,0
3c/8	47,2	5,8	27,3	2,2	9,7	2,3	1,1	1,0	9,0	3,6
3a/18	46,0	2,7	30,3	4,2	2,9	2,2	3,5	2,0	9,7	2,4
3a/28	46,2	3,4	31,9	2,4	1,9	1,3	4,0	1,2	9,1	2,1
3a/40	44,4	2,7	31,2	1,8	1,7	0,4	4,6	1,7	7,6	2,5
4/8	52,1	2,2	31,6	3,6	6,3	1,6	2,8	1,4	10,8	4,3
4/18	* 42,8 42,5	2,0 0,5	28,2 26,8	3,0 2,7	0,0 1,0	- -	3,6 2,6	1,0 1,1	11,0 12,2	2,5 2,7
5/8	47,8	4,0	28,4	2,4	7,5	1,4	3,5	1,5	8,2	2,7
5/28	47,1	3,6	29,3	2,8	5,0	1,4	4,3	1,5	8,5	3,3
6/9	* 41,0 48,6	1,4 3,2	30,0 33,3	2,0 2,9	0,0 2,8	- 0,4	4,0 3,3	0,8 1,0	5,5 9,1	0,6 1,8
6/18	* 41,7 46,2	1,4 2,5	27,1 32,0	2,5 2,2	0,0 2,2	- 0,9	6,2 4,0	1,0 1,4	8,3 4,0	1,2 1,9
7/7	** 21,1 51,8	1,2 5,7	17,1 31,0	2,3 4,1	0,0 7,2	- 3,9	2,3 4,3	0,6 0,7	1,7 9,1	1,6 6,0
7/27	*** 44,4 52,0	2,6 (1 cél.)	31,2 31,0	2,6 -	0,0 5,0	- -	6,8 6,0	2,0 -	6,1 10,0	2,0 -
8/7	64,4	8,2	35,0	6,0	5,3	1,0	9,5	2,0	14,5	4,3
8/29	66,4	6,9	39,6	4,9	4,1	1,7	9,6	1,8	13,0	3,1
9/7	47,5	3,2	30,7	3,0	6,1	1,1	5,7	1,5	4,9	2,5
9/29	48,7	4,2	32,5	3,1	5,9	1,5	5,5	1,5	4,7	2,4
10/9	68,5	7,8	36,5	7,0	7,5	2,0	7,7	1,9	16,7	5,7
10/29	64,1	5,1	37,2	6,4	7,5	1,0	7,1	1,8	12,1	3,5

* duas populações celulares; ** duas populações celulares: uma diplóide e outra tetraplóide.

Em 89% das células tetraplóides foram detectados cromossomos humanos.

*** só foram consideradas células tetraplóides.

Células apresentando somente os cromossomos humanos, 10, X e Xq- foram encontradas em frequência significativa tanto na segunda quanto na quarta fixações (tabela II).

A fim de verificar se houve diminuição significativa do número de cromossomos humanos entre as primeira e terceira fixações, aplicamos o teste não paramétrico de Wilcoxon (Sokal e Rohlf, 1969) a 11 linhagens (tabela III). As diferenças não foram significativas em relação a apenas 3 linhagens (3a, 9 e 10).

Fato digno de nota foi observado na linhagem 7, em que duas populações celulares distintas se apresentaram por ocasião da primeira fixação. Uma das populações foi aproximadamente diplóide ($\bar{x} = 21,1$; $s(x) = 1,2$ cromossomos) e a outra tetraplóide ($\bar{x} = 51,8$; $s(x) = 5,7$ cromossomos), quanto ao complemento cromossômico de hamster chinês. Em 89% das células tetraplóides (porcentagem baseada em 100 células analisadas ao microscópio) foram detectados cromossomos humanos, mas nas células diplóides tal identificação não ocorreu. Foram fotografadas e analisadas em detalhe 14 células da população tetraplóide e 20 da população diplóide.

Com o intuito de verificar a origem dessas duas populações realizou-se uma comparação entre elas e a linhagem ancestral de hamster chinês, no que concerne a marcadores e rearranjos cromossômicos (tabelas IV e V). Para tanto foram fotografadas 20 células diplóides e 20 células tetraplóides da linhagem CHW 1102 (essa linhagem apresenta 15% de células tetraplóides).

Foram considerados como marcadores, rearranjos cromossômicos que se estabilizaram nas linhagens ancestrais. A denominação rearranjo foi por nós adotada para alterações de origem recente na cultura, tanto das linhagens ancestrais, quanto das híbridadas.

TABELA II- Frequência, em porcentagem, de células contendo os cromossomos
10 e X -- linhagem 30.

Passagem Nº	Cromossomos humanos		Rearranjos Cg	Outros complementos cromossom. humanos	Rearranjos Cg
	10 e X	10 Xq-			
8	5	-	R(M ₄ /?) ; R(Y) R(iso 8q) ; R(M ₄ /3q)	95	R(iso 8q) ; R(M ₄ /3q) R(2/?) ; R(3q-) R(4q-)
18	5	15	R(M ₄ /?) ; R(Y) R(iso 8q) ; R(1q-) R(1q-) ; R(3q-) R(2q-) ; R(4q-) R(2 iso q)	30	R(iso 8q) ; R(3p-) R(2q-) ; R(4q-)
28	-	65	R(M ₄ /?) ; R(Y) R(1q-) ; R(iso 8q) R(iso 2q) ; R(3q-) R(M ₄ /?) ; R(Y) R(iso 8q) ; R(7q-) R(M ₁ /2) ; R(1q-) R(3p-) ; R(M ₁ del) R(M ₁ /M ₁)	12	R(iso 8q) ; R(4p-) R(M ₁) ; R(1p-) R(1q-)
40	-	80		-	-

TABELA III

Linagem Nº	Varição do Nº de cromossomos Hs 1ª fixação	3ª fixação	Teste de Wilcoxon	C Crítico	α
1	5 - 14	4 - 9	315,5	312	0,001
1a	1 - 5	1 - 5	272	262	0,05
2	6 - 12	7 - 12	274	273	0,025
3	5 - 15	6 - 11	265,5	262	0,05
*3a	1 - 5	2 - 5	253,5	262	0,05
3b	1 - 4	1 - 2	312,0	295	0,005
3c	2 - 12	1 - 7	371	312	0,001
5	3 - 9	1 - 7	367,5	312	0,001
8	3 - 6	2 - 6	308,5	295	0,005
*9	4 - 9	3 - 8	206,5	262	0,05
*10	3 - 12	4 - 10	201	262	0,05

* diferenças não significativas.

TABELA IV- Marcadores e rearranjos da linhagem 7/7

Células diplóides	Nº de céls.	Células tetracêntricas	Nº de céls.
$M_1M_4; R(1q/2q); R(2p-)$	1		
$M_1M_4; R(1q/2q); R(2p-); R(1q-)$	1		
$M_1M_4; R(1q/2q); R(4q-); R(2q-); R(1q-)$	1		
$M_1M_4; R(1q/2q); R(4q-); R(1q-)$	2	$2M_1 2M_4; R(1q/2q); 2R(4q-); R(1q-); R(2p-)$	1
$M_1M_2M_4; R(1q/2q); R(4q-); R(1q-)$	2	$M_1M_2 2M_4; 2R(1q/2q); 2R(4q-); R(1q-)$	1
		$2M_1 2M_2 2M_4; 2R(1q/2q); 2R(4q-); R(1q-)$	1
		$M_1M_2 2M_4; 2R(1q/2p); R(4q-); R(1q-)$	1
$M_1M_2 2M_4; R(1q/2q); R(4q-)$	1		
$M_1M_2 M_4; R(1q/2q); R(4q-)$	5	$2M_1M_2 2M_4; 2R(1q/2q); 2R(4q-)$	1
		$2M_1M_2 2M_4; 2R(1q/2q); R(4q-)$	1
		$2M_1 2M_4; 2R(1q/2q); R(4q-); R(6/?)$	1
		$2M_1M_2M_4; 2R(1q/2q); R(4q-); R(6/?)$	1
$M_1M_2M_4; R(1q/2q); R(4q-); R(3p-)$	3		
$M_2M_4 R(1q/2q); R(4q-)$	3	$2M_1 2M_4; 2R(1q/2q); 2R(4q-)$	1
		$M_1 2M_4; 2R(1q/2q); 2R(4q-)$	1
		$M_1M_4; 2R(1q/2q); 2R(4q-)$	1
		$2M_1 2M_4; 2R(1q/2q); 3R(4q-)$	1
		$M_1 2M_4; 2R(1q/2q); 2R(4q-); R(M_1 q-)$	1
$M_1M_2M_4; R(4q-)$	1		

TABELA V- Marcadores e rearranjos cromossômicos da linhagem CHW 1102

Células diplóides (Nº cromossomos: x 21,6; s(x) 0,8)	Nº de célis.	Células tetraplóides (Nº cromossomos: x 40,4; s(x) 1,5)	Nº de célis.
R(3p-); M ₁ , M ₂ , M ₄	1	R(3p-)	6
R(1q-); M ₁ , M ₂ , M ₄	1	R(3p-)(2 cópias)	1
R(4q-); M ₁ , M ₂ , M ₄	1	R(3q/M ₄)	1
Nenhum rearranjo; M ₁ , M ₂ , M ₄	17	R(3p-); R(2q/M ₁)	1
		R(3p-); R(M ₄ /?)	3.
		R(3p-); R(3/?)	1
		R(1/M ₁)	1
		R(2p/1q)(4 cópias)	1
		R(1/M ₁); R(3q/M ₄)(2 cópias)	1
		R(3q/M ₄); R(3p-); R(M ₁ q-)	1
		Anel	1
		Dicêntricos não identificados (2 cópias)	2
		Dicêntrico não identificado	1

As outras tres linhagens em que o ancestral hamster chinês foi a linhagem CHW 1102 apresentaram por ocasião da primeira fixação um número médio de cromossomos de 64,4 ; $s(x) = 8,2$ (linhagem 8); 47,5; $s(x) = 3,2$ (linhagem 9); 68,5 ; $s(x) = 7,8$ (linhagem 10). O número médio de cromossomos de hamster chinês encontrado nessas mesmas linhagens foi de 35,0; $s(x) = 6,0$, de 30,7; $s(x) = 2,9$, e de 36,5; $s(x) = 7,0$. Esses valores se aproximam do número de cromossomos de hamster chinês da população tetraplóide da linhagem CHW 1102, ou seja , 31,8; $s(x) = 3,1$.

A heterogeneidade das linhagens híbridas , foi avaliada pela utilização do método de Cramer (Kendall e Stuart, 1961) para medida de associação, calculada a partir de uma tabela de dupla entrada com n_i fileiras (r) e n_j colunas (c). O coeficiente de Cramer (C) é dado pela fórmula:

$$C = \left\{ \frac{\chi^2}{n \min (r-1, c-1)} \right\} , \text{ onde}$$

χ^2 representa o " quadrado de contigência "

$$\text{igual a } \sum_{ij} \frac{D_{ij}^2}{n_i \cdot n_j/n} \equiv n \left\{ \sum_{ij} \frac{n_{ij}^2}{n_{ij}} - 1 \right\} , \text{ sendo}$$

$$D_{ij} = n_{ij} - n_i \cdot n_j/n.$$

Os valores encontrados para as 14 linhagens acham-se relacionados na tabela VI.

As freqüências em porcentagem dos cromossomos humanos presentes nas primeira e terceira fixações das 14 linhagens híbridas foram relacionadas na tabela VII.

A freqüência em porcentagem com que cada cromossomo humano apareceu nas 188 células referentes à primeira fixa

TABELA VI

Coefficientes C de Cramer

Linagem	C
1	0,270
1a	0,498
2	0,182
3	0,228
3a	0,374
3b	0,720
3c	0,239
4	0,304
5	0,164
6	0,314
7	0,342
8	0,280
9	0,315
10	0,274

TABELA VIII- Frequência em porcentagem de poliploidia e endorreduplicação na primeira fixação das 14 linhagens estudadas.

Linhagem Nº	Varição Nº total cromossomos	% células com Nº modal	% Endorreduplicação	% Poliploidia	Nº total células
1/6	43 - 59	85	5	10	342
1a/6	41 - 53	80	18	2	386
2/7	49 - 67	96	3	1	254
3/7	46 - 60	87,5	9,0	3,5	316
3a/9	41 - 49	81,3	13,7	5,0	414
3b/12	43 - 55	79,0	17,9	3,1	378
3c/8	38 - 69	86,0	13,0	1,0	440
4/8	49 - 55	93	5	2	403
5/8	42 - 46	86	6,6	7,4	385
6/9	42 - 46	83	1,4	3	300
7/7	22 - 44	77,9	17,6	4,5	300
8/7	51 - 75	92	4,1	3,9	210
9/7	39 - 54	92,6	3,2	-	216
10/9	53 - 78	95,6	2,0	2,4	209

ção das 10 linhagens independentes é apresentada na figura 2. As colunas pontilhadas, hachuradas e em branco referem-se, - respectivamente, à presença de duas cópias, uma cópia e pelo menos uma cópia de cada cromossomo humano.

Células poliplóides e endorreduplicadas foram encontradas em todas as linhagens, com frequências variando de 1 a 10% e 2 a 18%, respectivamente (tabela VIII).

CAP. IV - DISCUSSÃO

A análise citogenética mostrou que as linhagens híbridas obtidas por fusão com PEG apresentam estabilidade suficiente para serem utilizadas em programas de mapeamento genético.

Os dados demonstram retenção de cromossomos humanos em frequências variáveis, sugerindo que a perda dos mesmos em larga escala deve ter ocorrido nos estágios imediatamente subsequentes à formação dos híbridos. Esse fato é amplamente aceito, tendo sido demonstrado nas publicações de Harris e col. 1965; Weiss e Ephrussi, 1966; Matsuya e col. 1968 ; Handmaker, 1971; Allderdice e col. 1973, entre outros.

A diminuição do número de cromossomos humanos observada entre as primeiras e terceira fixações foi significativa em 8 das 11 linhagens testadas. Não parece haver correlação entre essa diminuição e o número de cromossomos de hamster chinês presentes em cada linhagem, uma vez que a variação do mesmo não foi significativa.

A maioria dos autores aceita que a diminuição do número cromossômico do complemento humano, após numerosas passagens é devida à perda gradual dos mesmos. Nossos dados não parecem confirmar ser essa a única hipótese explicativa. Realmente, na linhagem 3c demonstrou-se que essa diminuição foi devida, principalmente, à seleção de células com menor número de cromossomos humanos. Nessa linhagem a análise da primeira fixação demonstrou a existência de uma célula com apenas dois cromossomos humanos (10 e X), a qual parece ter sido selecionada em passagens subsequentes.

Na tabela II acham-se discriminados os valores em porcentagem das células contendo apenas os cromossomos 10 e X humanos. Na primeira fixação observou-se 5% de células com os cromossomos 10 e X; na segunda fixação foram detectadas 5% de

células com cromossomos 10 e X, 50% de células com cromossomos 10 e Xq-, e 15% de células com o cromossomo número 10. 65% das células da terceira fixação apresentavam os cromossomos 10 e Xq-, 15% o cromossomo número 10 e 5% o cromossomo Xq-. Na quarta fixação a porcentagem de células com os cromossomos Xq- e 10 foi de 80%, enquanto 15% das células apresentavam o cromossomo 10, e 5% o Xq-.

Esses achados sugerem que as células com cromossomo número 10 e Xq-, provieram da célula contendo os cromossomos X e 10 presente na primeira fixação. Tal sugestão foi fortalecida ao se estudar os rearranjos presentes nas diferentes células dessa linhagem (tabela II). Verificou-se que havia um rearranjo do cromossomo Y de hamster chinês presente somente em células portadoras de cromossomos 10 e X; 10 e Xq-; apenas o 10 ou apenas o Xq-.

Tais fatos demonstram que ocorreu uma seleção das células contendo o menor número de cromossomos humanos, uma vez que houve aumento da frequência das mesmas, à medida que se analisava passagens mais tardias da linhagem.

Nas linhagens 4, 6 e 7 não foram encontrados cromossomos humanos por ocasião da terceira fixação, ao passo que na linhagem 3b uma das 20 células analisadas na primeira fixação não apresentava cromossomos humanos identificáveis. A análise da segunda fixação das três primeiras linhagens demonstrou a presença de duas populações celulares, o mesmo tendo sido observado na quarta fixação da linhagem 3b.

Essas observações sugerem seleção de células com ausência de cromossomos humanos, o que poderia ser explicado por sua maior taxa de crescimento, uma vez que o ciclo de replicação da linhagem ancestral hamster chinês é de aproximadamente 12 horas, enquanto que o do ancestral humano é de cerca de 24 horas.

As células desprovidas de cromossomos humanos poderiam ter sido originadas por perda de todos os cromossomos do complemento humano inicialmente presentes. Poderiam também ser células contaminantes do ancestral hamster chinês, - que foram mantidas quando em meio seletivo, por difusão da HGPRT produzida pelas células híbridas (cross-feeding). A partir do momento em que as linhagens híbridas foram transferidas para meio não seletivo, a frequência de tais células teria aumentado, uma vez que possuem menor tempo de duplicação.

Outras evidências de seleção celular foram observadas nas linhagens 1a e 3b. Na linhagem 1a por ocasião da primeira fixação foram encontradas duas células apresentando duas cópias do cromossomo número 3, e uma cópia do cromossomo número 14. Na terceira fixação 11 células possuíam esse mesmo cariótipo. Com referência à linhagem 3b foi observada na primeira fixação uma célula contendo os cromossomos humanos 8 e 22, ao passo que na terceira fixação foram encontradas nove células com esse complemento cromossômico.

Já em 1968 Matsuya e col. relataram que o número de cromossomos humanos exercia influência sobre a taxa de crescimento de linhagens híbridas de células de camundongo e humanas. Esses autores observaram que o tempo de duplicação da linhagem ancestral murina era de aproximadamente 15 horas, enquanto que as linhagens híbridas contendo cerca de 10 cromossomos humanos apresentavam um tempo de duplicação de cerca de 35-60 horas. Por outro lado, linhagens híbridas com menos de 4 cromossomos humanos, levaram de 25-30 horas para completar o ciclo celular. Para aquelas linhagens em que o único representante do complemento cromossômico humano era o portador do gene de TK, o tempo de duplicação foi de 23 horas.

Na tentativa de demonstrar que o alongamento do tempo da duplicação era decorrente do aumento da duração do período S, Matsuya e col. (1968), incubaram as culturas em meio contendo timidina triciada por uma hora. Os dados desses autores não evidenciaram qualquer efeito do número de cromossomos humanos sobre a duração do período S, sugerindo que o aumento do tempo de duplicação deve ser decorrente de influências exercidas pelos mesmos em outros estágios do ciclo celular.

Observação semelhante foi feita por Labella e col. (1973, 1976) que, em linhagens híbridas de hamster chinês e camundongo, verificaram haver um aumento da frequência de células híbridas com um número menor de cromossomos de camundongo, quando analisavam passagens mais tardias.

Na linhagem 7 observou-se, como já comentado anteriormente, a presença de duas populações celulares por ocasião da primeira fixação. Uma das populações era aproximadamente diplóide, não possuindo cromossomos humanos identificáveis, enquanto que a outra, aproximadamente tetraplóide, reteve cromossomos humanos em 89% das células. As seguintes explicações poderiam ser aventadas para esse fato:

1ª- A população tetraplóide poderia ter sido originada por fusão entre uma célula tetraplóide de hamster chinês e uma célula humana.

Como já afirmamos anteriormente a linhagem ancestral de hamster chinês CHW 1102 apresenta cerca de 15% de células tetraplóides. A população diplóide teria se originado de células diplóides contaminantes, mantidas em cultura por "cross-feeding" quando em meio seletivo. Após terem sido transferidas para meio não seletivo, poderiam ter sobrepujado as tetraplóides em crescimento.

2ª- A população tetraplóide teria se originado por

fusão entre duas células diplóides de hamster chinês e uma célula humana, sendo a população diplóide, eventualmente, originada por células contaminantes.

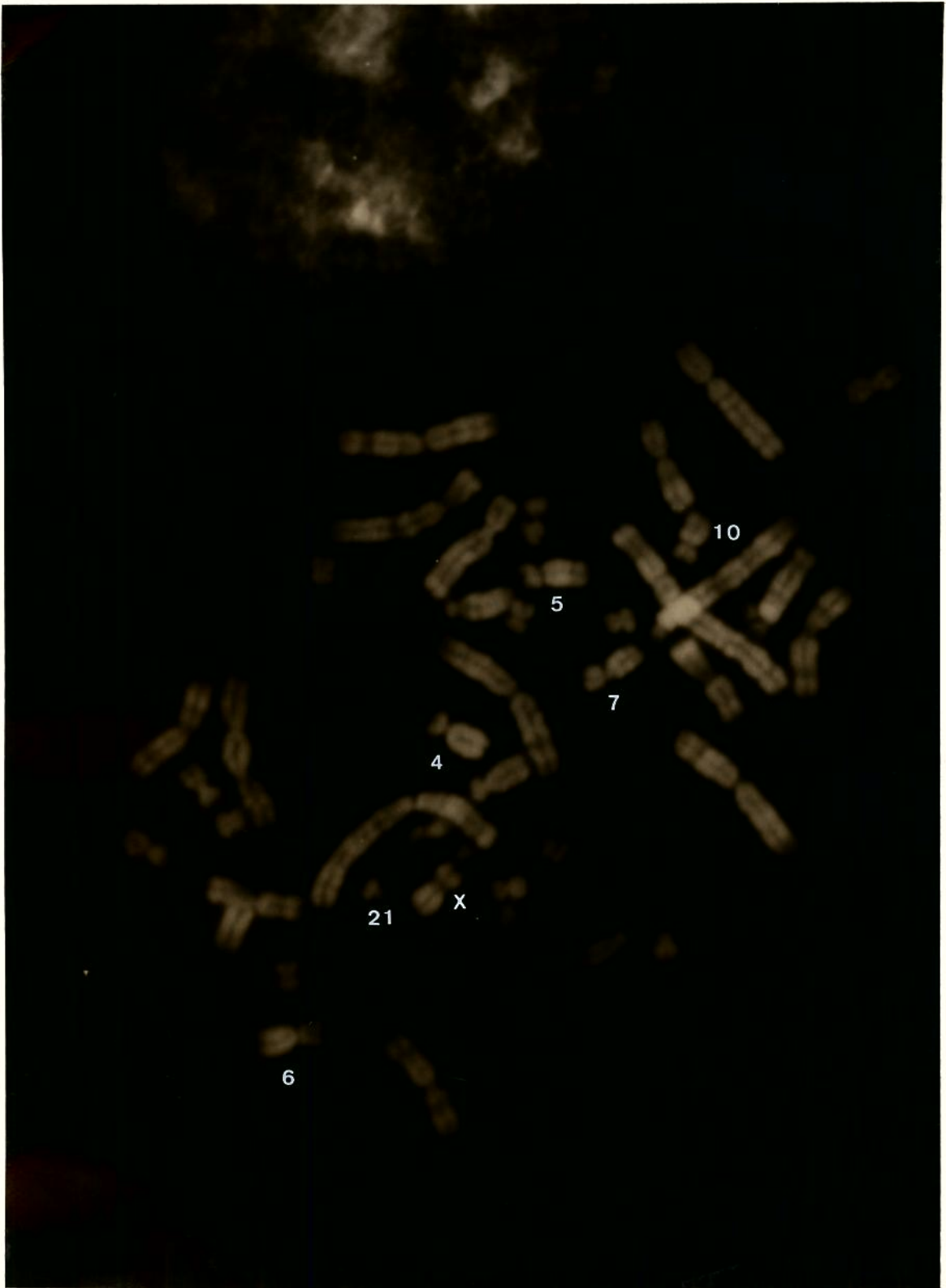
3^a- Originalmente havia somente células diplóides com cromossomos humanos. Algumas células entraram em endorreduplicação produzindo células tetraplóides, nas quais os cromossomos humanos foram mantidos. As células diplóides teriam se originado daquelas que não entraram em endorreduplicação - ou como segregantes das tetraplóides, com posterior perda dos cromossomos humanos. Quando a linhagem foi transferida para meio não seletivo, poderiam ter sobrepujado as tetraplóides - por possuírem maior taxa de crescimento.

A análise detalhada dos cromossomos de hamster chinês dessa linhagem mostrou certas similaridades entre as duas populações celulares, no concernente a rearranjos e marcadores cromossômicos (tabela IV). O padrão da linhagem ancestral CHW 1102 era muito diferente daquele da linhagem 7/7. O mesmo pode ser dito com referência ao número médio de cópias de cada cromossomo de hamster chinês em células diplóides e tetraplóides de ambas linhagens. (Fig. 1).

Esses fatos sugerem que ambas populações celulares da linhagem 7 devem ter se originado de uma célula comum em que os rearranjos básicos ocorreram em estágios iniciais.

Os seguintes pontos falam a favor da terceira hipótese explicativa:

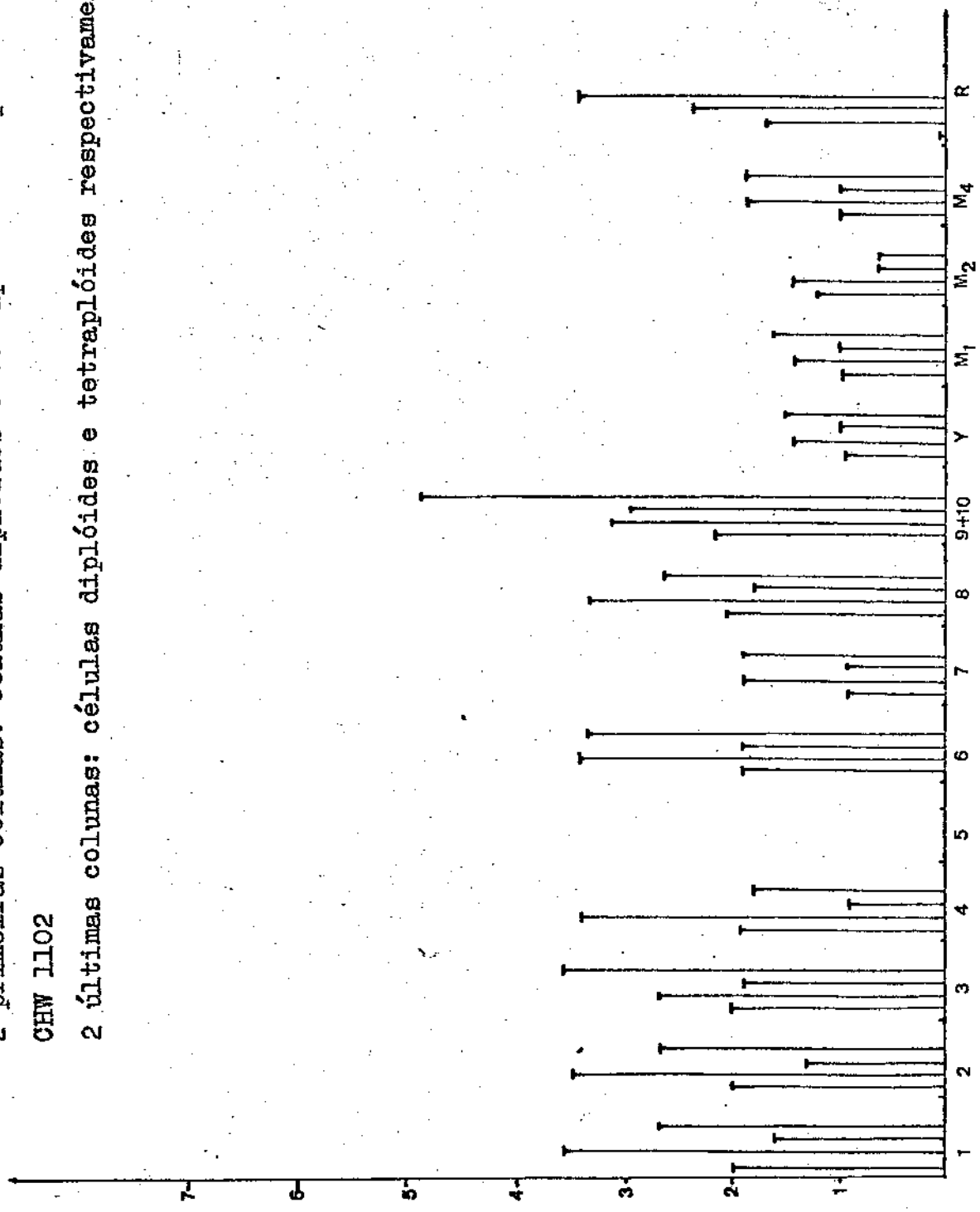
a) Endorreduplicação e poliploidia parecem ser eventos comuns em culturas de células de longa duração. De acordo com alguns autores, as células poliplóides "in vitro" tendem a entrar num ciclo parassexual, a fim de retornar ao cariótipo original (Hughes, 1968; Ruddle, 1961; Hsu e Kellog, 1960, entre outros).



Metáfase de célula híbrida da linhagem 5.

Fig. 1- Número médio de cópias dos cromossomos de hamster chinês de linhagens CHW 1102 e 7/7.

2 primeiras colunas: células diplóides e tetraplóides respectivamente -
 CHW 1102
 2 últimas colunas: células diplóides e tetraplóides respectivamente - 7/7.



Endorreduplicação e poliploidia foram observadas em todas as 14 linhagens estudadas, tendo as suas freqüências variado de 2 a 18% para endorreduplicação, e de 1 a 10% para poliploidia.

b) Labella e col., 1973, encontraram em linhagens híbridas de hamster chinês e camundongo dois complementos de hamster chinês e menos de um complemento de camundongo. Seus resultados mostraram que o complemento cromossômico de hamster chinês sofreu poliploidização logo após a fusão. Admitem esses autores que a poliploidização ocorreu para minimizar o crescimento desigual dos dois ancestrais. Fato que contraria essa hipótese é apresentado por Kao e Puck (1970), os quais obtiveram linhagens híbridas de hamster chinês e células humanas, que retiveram somente um complemento cromossômico de hamster. Deve-se lembrar, no entanto, que tais células podem ter se originado como segregantes de tetraplóides, uma vez que esses autores analisaram passagens tardias das linhagens.

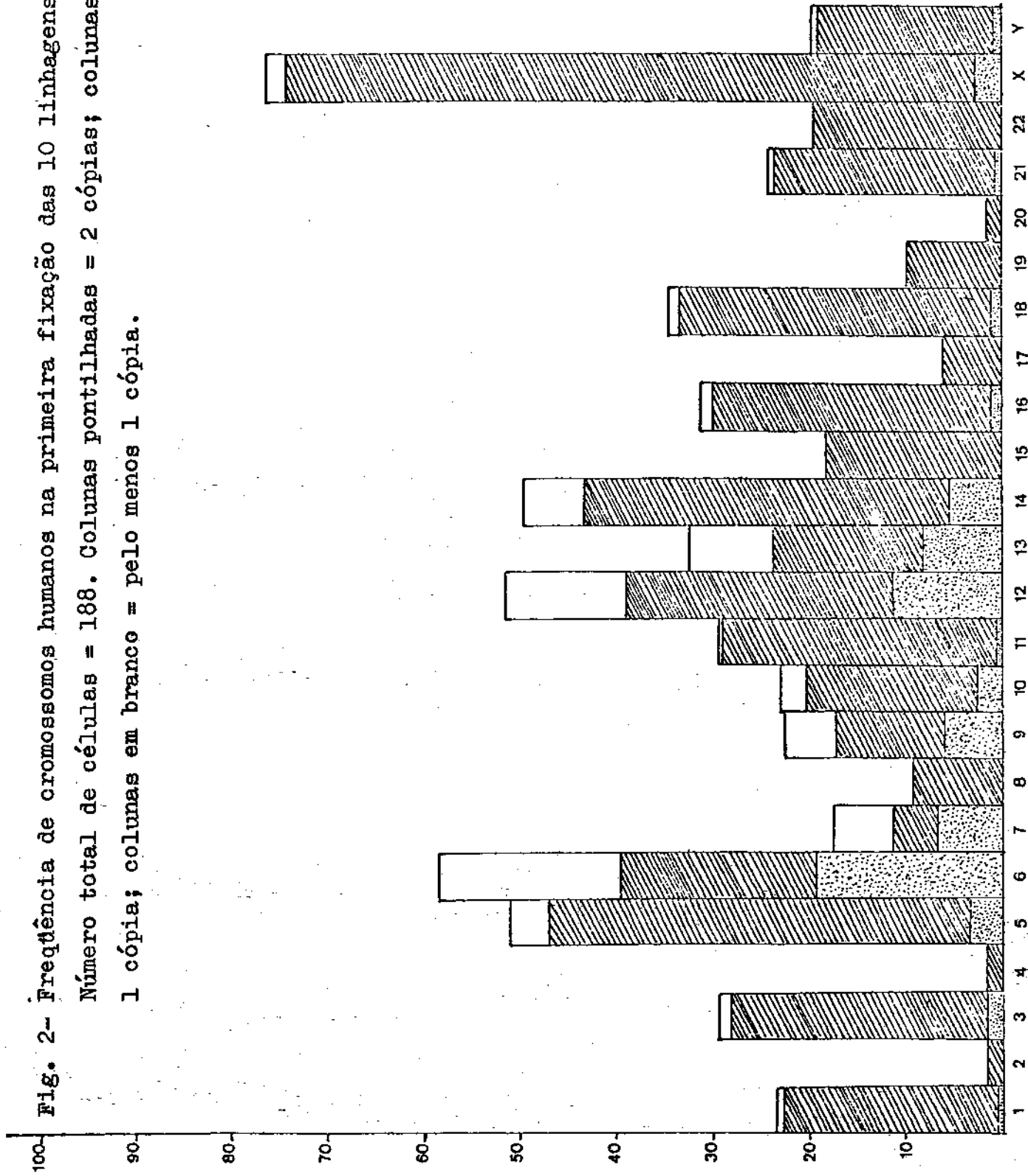
c) Nas linhagens 8, 9 e 10 em que o ancestral hamster chinês foi também a linhagem CHW 1102, observou-se um número de cromossomos de hamster aproximadamente tetraplóide. Parece pouco provável que em todas as 4 linhagens somente células tetraplóides tenham sido engajadas no processo de fusão.

A distribuição dos diferentes cromossomos do complemento humano foi variável entre as linhagens estudadas. Verificou-se que todos os cromossomos humanos foram retidos pelo menos uma vez, havendo, no entanto, uma nítida diferença quanto as freqüências com que apareceram (tabela VII).

A Fig. 2 representa graficamente as freqüências em porcentagem dos cromossomos humanos retidos nas 188 células da primeira fixação das 10 linhagens independentes estudadas.

Nota-se que os cromossomos X, 3, 5, 6, 11, 12, 13, 14, 16 e 18 foram os mais frequentemente retidos enquanto que

Fig. 2- Freqüência de cromossomos humanos na primeira fixação das 10 linhagens independentes.
 Número total de células = 188. Colunas pontilhadas = 2 cópias; colunas hachuradas = 1 cópia; colunas em branco = pelo menos 1 cópia.



os cromossomos número 2, 4, 8, 17 e 20 foram os presentes em menor frequência.

Os dados mais recentes da literatura indicam, que a retenção ou perda de cromossomos humanos em híbridos celulares interespecíficos não é casual. (Allderdice e col., 1973 ; Norum e Migeon, 1974; Rushton, 1976). Os resultados obtidos - por diferentes autores, (tabela IX) demonstram, preferência - de retenção de determinados cromossomos humanos embora não exista homogeneidade de achados. Isso sugere que a retenção ou perda preferencial estaria subordinada a condições inerentes a cada experimento.

O que nos parece mais importante, no entanto, é que os achados supracitados podem não ser reais. De fato, nossa - observação de seleção celular em pelo menos 5 linhagens, invalidam qualquer tentativa de se demonstrar retenção preferencial de cromossomos humanos em linhagens híbridas com numerosas passagens. Acreditamos que tal análise poderia ser mais fidedigna se realizada logo após a formação dos híbridos.

Além disso, não deve ser esquecido que as condições de cultura, sistema seletivo empregado, bem como outros fatores que possam conferir maior viabilidade a determinados cariótipos devem estar interferindo no sistema. A importância - da confirmação de retenção preferencial de certos cromossomos humanos é crucial, já que essa situação pode provocar determinações errôneas de grupos de ligação.

Treze das 14 linhagens analisadas, mostraram-se nitidamente homogêneas com valores de C menores que 0,5. A obtenção de clones portadores de diferentes cromossomos humanos, só seria portanto vantajosa em uma das linhagens.

O único método que tem sido utilizado para se verificar heterogeneidade de linhagens celulares híbridas é o pro

TABELA IX

Frequências em porcentagem de cada cromossomo humano retido em linhagens híbridas analisadas por diferentes autores.

Cromossomo número	Allderdice e col., 1973 (homem - camundongo)	Norum e Higson, 1974 (homem - camundongo)	Rushton, 1976 (homem - camundongo)	Presente trabalho (homem - hamster)
1	9	46	-	23,4
2	6	-	-	1,0
3	26	38,9	42,0	29,2
4	10,5	-	-	2,1
5	8,0	-	47,0	51,0
6	10,5	44	-	58,5
7	10,5	17	43,0	17,5
8	0,04	-	28,0	8,5
9	10	30,5	5,0	22,8
10	12	-	21,0	23,4
11	10,5	38,9	63,0	29,2
12	23	52	46,0	51,6
13	29	-	-	33,0
14	7	-	9,0	48,9
15	25	-	-	18,0
16	2	-	12,0	31,4
17	23	86,5	73,0	5,8
18	23	-	10,0	34,0
19	39	-	75,0	9,6
20	35,5	-	42,0	2,6
21	30,5	-	55,0	23,9
22	28	-	40,0	19,1
X	31	-	65,0	76,0
Y	21	1,6	-	19,7

posto por Miller em 1973. Tal método não apresenta, no entanto, valores quantitativos da heterogeneidade, o que torna a interpretação da mesma bastante subjetiva.

CAP. V - CONCLUSÕES

1º- Nas 14 linhagens estudadas foi observada segregação preferencial dos cromossomos humanos.

2º- A seleção celular parece ser um fator importante na evolução cariotípica de linhagens híbridas interespecíficas.

3º- A retenção ou perda preferencial de determinados cromossomos humanos é, a nosso ver, assunto que merece estudos adicionais, visto que nossas observações indicam que fatores tais como seleção celular, podem estar viciando os resultados obtidos por diferentes autores.

4º- O desequilíbrio, em termos de ciclo celular, - das linhagens ancestrais de híbridos interespecíficos, pode ser fator desencadeante de poliploidização e, conseqüentemente, influir na configuração cariotípica dessas linhagens híbridas.

5º- O PEG produziu linhagens híbridas com estabilidade suficiente para permitir o emprego das mesmas na análise genética de células somáticas.

CAP. VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOOD, L. G. - Intern. Rev. Neurobiol., 9:223, 1966. apud
POSTE, G. 1972. op. cit.

ABOOD, L. G. In: S. EHRENPREIS & O. C. SOLNITZKY Ed., Neuro
sciences Research. New York, Academic Press, 1969. v. 2,
p. 41. apud POSTE, G. 1972. op. cit.

AKONG, Q. F.; F. C. CRAMP; D. FISHER; J. I. HOWELL & J. A.
LUCY - Studies on chemically induced cell fusion. J. Cell
Sci., 10:769, 1972.

ALLDERDICE, P. W.; O. J. MILLER; P. L. PEARSON; G. KLEIN &
H. HARRIS - Human chromosomes in 18 man-mouse somatic
hybrid cell lines analysed by quinacrine fluorescence.
J. Cell Sci., 12:809, 1973.

ALLISON, A.C. - Perspect. Virol., 5:29, 1967. apud POSTE, G.
1972. op. cit.

ALLISON, A. C., In: E. E. BITTAR & N. BITTAR Ed. The Biological
basis of medicine. New York, Academic Press, 1968. v. 1,
p. 209. apud POSTE, G. 1972. op. cit.

BARSKI, G.; S. SORIEUL & F. CORNEFERT - Production dans des
cultures "in vitro" de deux souches cellulaires en associa
tion, des cellules de caratère "hybride". C. R. Acad. Sci.
(Paris), 251:1825, 1960.

BENNETT, M. D.; R. A. FINCH & I. R. BARCLAY - The time rate
and mechanism of chromosome elimination in Hordeum hybrids.
Chromosoma (Berl.), 54:175, 1976.

- BODMER, W. F. - Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 6. Human Gene Mapping 3. Baltimore Conference 1975. Birth Defects: Original Article Series., 12:24, 1976.
- BOONE, C. M. & F. H. RUDDLE - Interspecific hybridization between human and mouse somatic cells: Enzyme and linkage studies. Biochem. Genet., 3:119, 1969.
- BOONE, C. M.; T. R. CHEN & F. H. RUDDLE - Assignment of three human genes to chromosomes (LDH to 11, TK to 17 and IDH to 20) and evidence for translocation between human and mouse chromosomes in somatic cell hybrids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69:510, 1972.
- BRAMWELL, M. E. & S. D. HANDMAKER - Ribosomal RNA synthesis in human-mouse hybrid cells. Biochim. biophys. Acta, 232:580, 1971.
- BROWN, J. A.; S. GOSS; H. P. KLINGER; O. J. MILLER; S. OHNO & M. SINISCALCO - Report of the committee on the genetic constitution of the X and Y chromosomes. Human Gene Mapping 3. Baltimore Conference 1975. Birth Defects: Original Article Series., 12:54, 1976.
- BROWN, J. A. & T. B. SHOWS - Chromosomes segregation in man-rodent and muntjac-rodent somatic cell hybrids. Abstr. In: 27th Meet Am. Soc. Hum. Genet., p. 21A, 1975. apud RUSHTON 1976. op. cit.

- CASPERSSON, T.; L. ZECH; C. JOHANSSON & E. J. MODEST - Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. Chromosoma (Berl.), 30:215, 1970.
- CHAN, T. S.; C. LONG & H. GREEN - A human-mouse somatic cell hybrid line selected for human deoxycytidine deaminase. Somat. Cell Genet., 1:81, 1975.
- CHU, E. H. Y. & S. S. POWELL - Selective systems in somatic cell genetics. Advances in human Genetics., 7:189, 1976.
- CONSTABEL, F. & K. N. KAO - Agglutination and fusion of plant protoplast by polyethylene glycol. Can. J. Bot., 52:1603, 1974.
- CROCE, C. M. - Loss of chromosomes in somatic cell hybrids between H-T 1080 human fibrosarcoma cells and mouse peritoneal macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73:3248, 1976.
- CROCE, C. M.; B. B. KNOWLES & H. KOPROWSKI - Preferential retention of human chromosome C-7 in human (thymidine kinase deficient) mouse hybrid cells. Exp. Cell Res., 82:457, 1973.
- DAVIDSON, R. L. - Control of expression of differentiated functions in somatic cell hybrids. In: R. C. DAVIDSON & F. DE LA CRUZ Ed., Somatic Cell Hybridization. New York, Raven Press, 1974. p. 131.

- DAVIDSON, R. L. & B. EPHRUSSI - A selective system for the isolation of hybrids between L cells and normal cells. Nature, 205:1170, 1965.
- DAVIDSON, R. L. & P. S. GERALD - Improved techniques for the induction of mammalian cell hybridization by polyethylene glycol. Somat. Cell Genet., 2:165, 1976.
- DAVIDSON, R. L.; K. A. O'MALLEY & T. B. WHEELER - Polyethylene glycol induced mammalian cell hybridization: Effect of polyethylene glycol molecular weight and concentration. Somat. Cell Genet., 2:271, 1976.
- DE WEERD-KASTELEIN, E. A.; W. KEIJZER & D. BOOTSMA - Genetic heterogeneity of xeroderma pigmentosum demonstrated by somatic cell hybridization. Nature New Biol., 238:80, 1972.
- DE WEERD-KASTELEIN, E. A.; W. KEIJZER & D. BOOTSMA - A third complementation group in xeroderma pigmentosum. Mutat. Res., 22:87, 1974.
- DERJAGUIN, B. V. & L. D. LANDAU - Acta physiochem. (URSS), 14: 633, 1941. apud POSTE, G. 1972. op. cit.
- DINGLE, J. T. - Vacuoles, vesicles and lysosoma. Brit. med. Bull., 24:141, 1968.
- DINGLE, J. T., In: J. T. DINGLE & H. B. FELL Ed. Lysosomes in Biology and Pathology. Amsterdam, North Holland Publ., 1969. v. 2, p. 421. apud POSTE, G. 1972. op. cit.

- DOUGLAS, G. R.; P. A. GEE & J. L. HAMERTON - Chromosome identification in Chinese hamster-human somatic cell hybrids. Nobel Symp., 23:170, 1973.
- ELLICEIRI, G. L. & H. J. GREEN - Ribosomal RNA synthesis in human-mouse hybrid cells. J. mol. Biol., 41:253, 1969.
- ELLICEIRI, G. L. - The ribosomal RNA of hamster-mouse hybrid cells. J. Cell Biol., 53:177, 1972.
- ELSEVIER, S. M.; R. S. KUCHERLAPATI; E. A. NICHOLS; K. WILLECKE; R. P. CREAGAN; R. E. GILES; J. K. MCDOUGALL & F. H. RUDDLE - Assignment of the gene for galactokinase to human chromosome 17 and its regional localization to band q21-22. Nature, 251:633, 1974.
- ENGEL, E.; B. J. MCGEE & H. HARRIS - Cytogenetic and nuclear studies on A₉ and B₈₂ cells fused together by Sendai virus: the early phase. J. Cell Sci., 5:93, 1969.
- EPHRUSSI, B. - Hybridization of somatic cells and phenotypic expression. Symp. fundamental Cancer Res (Houston), 19: 486, 1965. apud WEISS, M. C. & B. EPHRUSSI, 1966a. op. cit.
- EPHRUSSI, B. - Hybridization of somatic cells. Princeton, New Jersey. Princeton University Press. 1972.
- EPHRUSSI, B. & S. SORIEUL. In: MERCHANT, J. D. & J. V. NEEL, Ed., Approaches to the genetic analysis of mammalian cells. Ann Arbor, Michigan, University of Michigan Press, 1962, p. 81. apud POSTE, G., 1972. op. cit.

EPHRUSSI, B. & M. C. WEISS - Interspecific hybridization of somatic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 53:1040, 1965.

GALJAARD, H.; A. HOOGEVEEN; H. A. DE WIT-VERBEEK; A.J.J. KEIJZER; W. KEIJZER; A. WESTERVELD & D. BOOTSMA - Tay-Sachs and Sandhoff's disease intergenic complementation after somatic cell hybridization. Exp. Cell Res., 87:444, 1974.

GEE, P. A.; M. RAY; T. MOHANDAS; G. R. DOUGLAS; H. R. PALSER; B. J. RICHARDSON & J. L. HAMERTON - Characteristics of an HPRT - deficient Chinese hamster cell line. Cytogen. Cell Genet., 13:437, 1974.

GERSHON, D. & L. SACHS - Properties of a somatic hybrid between mouse cells with different genotypes. Nature, 198:912, 1963.

GRAVES, J. A. M. - DNA synthesis in heterokaryons formed by fusion of mammalian cells from different species. Exp. Cell Res., 72:393, 1972.

GRAVES, J. A. M. - Cell cycles and chromosome replication patterns in interspecific somatic hybrids. Exp. Cell Res., 73:81, 1972.

GUTTLER, F. & J. CLAUSEN - Changes in lipid pattern of HeLa cells exposed to immunoglobulin G and complement. Biochem. J., 115:959, 1969.

- HAMERTON, J. L. - Report of the committee on the genetic constitution of chromosomes 1 and 2. Human Gene Mapping 3. Baltimore Conference 1975. Birth Defects: Original Article Series, 12:7, 1976.
- HAMERTON, J. L.; T. MOHANDAS; P. J. MCALPINE & G. R. DOUGLAS - Assignment of three human gene loci to regions of chromosome 2. Cytogenet. Cell Genet., 14:3, 1975.
- HANDMAKER, S. D. - Cytogenetic analysis of a Chinese hamster mouse hybrid cell. Nature, 233:416, 1971.
- HANDMAKER, S. D. - Genetic analysis of somatic cell hybrids. Oxford, 1971. PhD thesis. Univers. Oxford. apud HANDMAKER, S. D., 1973. op. cit.
- HANDMAKER, S. D. - Hybridization of eukariotic cells. Annual Rev. Microbiol., 27:189, 1973.
- HARRIS, H. - Cell fusion. Cambridge, USA. Harvard Univ. Press, 1970.
- HARRIS, H. & J. F. WATKINS - Hybrid cells derived from mouse and man: Artificial heterokaryons of mammalian cells from different species. Nature, 205:640, 1965.
- HARRIS, H.; J. F. WATKINS; G. LE M. CAMPKELL; E. P. EVANS & C. E. FORD - Mitosis in hybrids cells derived from mouse and man. Nature, 207:606, 1965.

- HARRIS, H.; O. J. MILLER; G. KLEIN; P. WORST & T. TACHIBANA
Suppression of malignancy by cell fusion. Nature, 223:363,
1969.
- HAWIGER, J.; R. D. COLLINS; R. G. HORN & M. G. KOENIG - Inte
raction of artificial phospholipid membranes with isolated
polimorphonuclear leucocytic granules. Nature, 222:276,
1969.
- HUGHES, T. S. - Cytogenetical polymorphism and evolution in
mammalian somatic cells in vivo and in vitro. Nature, 217:
518, 1968.
- HSU, T. S. & D. S. KELLOGG - Mammalian chromosomes in vitro.
XII Experimental evolution of cell populations. J. Nat.
Cancer Inst., 24:1067, 1960.
- JAKOB, H. & F. RUIZ - Preferential loss of kangaroo chromoso-
me in hybrids between Chinese hamster and kangaroo-rat so-
matic cells. Exp. Cell Res., 62:310, 1970.
- JAMI, J.; S. GRANDCHAMP & B. EPHRUSSI - Sur le comportement
caryologique des hybrides cellulaires homme x souris.
C. R. Acad. Sci. (Paris), 272:323, 1971.
- KAO, F. T. & T. T. PUCK - Quantitation of mutagenesis by phy-
sical and chemical agents. J. Cell Physiol., 74:245, 1969.
- KAO, F. T.; T. T. PUCK - Genetics of somatic mammalian cells:
Linkage studies with human-Chinese hamster cell hybrids.
Nature, 228:329, 1970.

KAO, K. N. & M. R. MICHAYLUK - A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. Planta (Berl.), 115:350, 1974.

KAO, K. N.; F. CONSTABEL; M. K. MICHAYLUK & O. L. GAMBORG
Plant protoplast fusion and growth of intergeneric hybrid cells. Planta (Berl.), 120:215, 1974.

KAO, F. T.; C. JONES & T. T. PUCK - Genetics of somatic mammalian cells: Genetic, immunologic, and biochemical analysis with Chinese hamster cell hybrids containing selected human chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73:193, 1976.

KENDALL, M. G. & A. STUART - The general r x c table: measurement of association. In: _____, The Advances theory of statistics. New York, Hafner Publishing Company, 1961. v. 2, p. 557.

KIT, S.; K. NAKAJIMA; T. KURIMURA; D. R. DUBBS & R. CASSINGENA
Monkey-mouse hybrid cell lines containing the SV40 genome in a partially repressed state. Int. J. Cancer, 5:1, 1970.

KRAEMER, K. K.; H. G. COON; R. A. PETINGA; S. F. BARRET; A. E. RAHE & J. H. ROBBINS - Genetic heterogeneity in xeroderma pigmentosum: Complementation groups and their relationship to DNA repair rates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72:59, 1975.

KUZANO, T.; C. LONG & H. GREEN - A new reduced human-mouse somatic cell hybrid containing the human gene for adenine phosphoribosyltransferase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68:82, 1971.

- LABELLA, T.; P. ANATI & C. MARIN - Relationship between the ratio of parental chromosomes and parental doubling times in Chinese hamster-mouse somatic cell hybrids. J. Cell Physiol., 81:347, 1973.
- LABELLA, T.; G. COLLETTA & G. MARIN - A synchronous DNA replication and asymmetrical chromosome loss in Chinese hamster mouse somatic cell hybrids. Somat. Cell Genet., 2:1, 1976.
- LEVITAN, M. & A. MONTAGU - Linkage, In:_____, Textbook of human genetics. London. Oxford University Press, 1971, p. 370, 418.
- LEWIN, B. - Somatic Cell Hybridization. In:_____, Gene Expression 2. Eukaryotic chromosomes. New York, John Wiley, Sons Press, 1975. p. 387.
- LITTLEFIELD, J. W. - Selection of hybrids from matings of fibroblasts "in vitro" and their presumed recombinants. Science, 145:709, 1964.
- LUCY, J. A. - The Fusion of biological membranes. Nature, 227: 815, 1970.
- MARSHALL, C. J.; S. D. HANDMAKER & M. E. BRAMWELL - Synthesis of ribosomal RNA in synkarious and heterokaryons formed between human and rodent cells. J. Cell Sci., 17:307, 1975.
- MATSUYA, Y.; H. GREEN & C. BASILICO - Properties and uses of human-mouse hybrid cell lines. Nature, 220:1199, 1968.

MATSUYA, Y. & H. GREEN - Somatic cell hybrid between the established human line D₉₈ and 3_{T3}. Science, 163:697, 1969.

MAUL, GERD G.; Z. STEPLEWSKI; J. WEIKEL & H. KOPROWSKI - Time sequence and morphological evaluations of cells fused by polyethylene glycol. In vitro, 12:787, 1976.

MCKUSICK, V. A. - Human Gene Mapping 3. Baltimore Conference 1975. Third Workshop on Human Gene Mapping. Birth Defects: Original Article Series. 12:1, 1976.

MERRA, K. P.; A. WESTERVELD; E. M. WURGER-FIGURELLI & D. BOOTSMA - Alpha galactosidase in man-Chinese hamster somatic cell hybrids. Cytogenet. Cell Gen., 14:3, 1975.

MIGEON, B. R. - Hybridization of somatic cells derived from mouse and Syrian hamster: Evolution of karyotype and enzyme studies. Biochem. Genet., 1:305, 1968.

MILLER, D. A.; V. G. DEV; R. TANTRAVAHU & O. J. MILLER - Suppression of human nucleolus organizer activity in mouse-human somatic hybrid cells. Exp. Cell Res., 101:235, 1976.

MILLER, O. J. - Analysis of heterogeneity. Chromosome identification. Nobel Symposium, 23:177, 1973.

MILLER, O. J.; D. A. MILLER; V. G. DEV; R. TANTRAVAHU & C. M. CROCE - Expression of human and suppression of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cell hybrids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73:4531, 1976.

NABHOLZ, M. - Studies on somatic hybridization as a tool for the genetic analysis of man. Stanford, 1969. PhD Thesis, Stanford University. apud RUDDLE, F. H., 1972. op. cit.

NABHOLZ, M.; V. MIGGLIANO & W. BOEDMER - Genetic analysis with human-mouse somatic cell hybrids. Nature, 223:358, 1969.

NORREBY, E. - Arch. ges. Virusforsch., 18:333, 1966. apud POSTE, G., 1972. op. cit.

NORUM, R. & B. R. MIGEON - Non-random loss of human markers from man-mouse somatic cell hybrids. Nature, 251:72, 1974.

OKADA, Y. - Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from Ehrlich's ascite tumor cells. I. Microscopic observation of giant polynuclear cell formation. Exp. Cell Res., 26:98, 1962.

OKADA, Y. - Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ virus from Ehrlich's ascite tumor cells. II. Quantitative analysis of giant polynuclear cell formation. Exp. Cell Res., 26:108, 1962.

OKADA, Y. & F. MURAYAMA - Biken, J., 8:7, 1965. apud POSTE, G. 1972, op. cit.

PAPAHADJOPOULOS, D.; G. POSTE & B. E. SCHAEFFER - Fusion of mammalian cells by unilamellar lipid vesicles: Influence of lipid surface charge, fluidity and cholesterol. Biochem. biophys. Acta, 323:23, 1973.

- PEARSON, P. - The limits of recognition of human chromosomes in hybrid cells. Nobel Symposium, 23:179, 1973. apud RUSHFON, 1976. op. cit.
- PERIMAN, P.; S. TYRREL & A. S. RABSON - Herpevirus saimiri in marmoset-mouse hybrid cell lines. J. Nat. Cancer Inst., 49:387, 1972.
- PONTECORVO, G. - Inductive of directional chromosome elimination in somatic cell hybrids. Nature, 230:367, 1971.
- PONTECORVO, G. - Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. Somat. Cell Genet., 1:397, 1975.
- POOLE, A. R.; J. I. HOWELL & J. A. LUCY - Lysolecithin and cell fusion. Nature, 227:810, 1970.
- POSTE, G. - Mechanisms of virus-induced cell fusion. Int. Rev. Cytol., 33:157, 1972.
- POSTE, G. & A. C. ALLISON - Membrane fusion reaction: A theory. J. theor. Biol., 32:165, 1971.
- POVEY, S.; D. M. SWALLOW; M. BOBROW; I. CRAIG & V. VAN HAYNINGEN - Probable assignment of the locus determining human red cell acid phosphatase ACP₁ to chromosome 2 using somatic cell hybrids. Ann. hum. Genet., 38:1, 1974.
- RAO, P. N. & R. T. JOHNSON - Regulation of cell cycle in hybrid cells. In: B. CLARKSON & R. BASERGA, Ed., Cold Spr. Harb. Conf. on Cell proliferation 1. control of proliferation in animal cells. 1974, p. 785. apud BENNETT et al, 1976 op. cit

- RICCIUTI, F. C. & F. H. RUDDLE - Assignment of three gene loci (PGK, HGPRT, G6PD) to the long arm of the human X-chromosome by somatic cell genetics. Genetics, 74:661, 1973.
- ROBERS, H. H.; K. H. GRZESCHIK & E. BUHLER - Complementation after fusion of Sandhoff and Tay-Sachs fibroblasts. Human-genetik, 26:117, 1975.
- RUBIN, H. - In: B. D. DAVIS & L. WARREN, Ed. The Specificity of cell surfaces. New Jersey, Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1967. apud POSTE, G., 1972. op. cit.
- RUDDLE, F. H. - Chromosome variation in cell populations derived from pig kidney. Cancer Res., 21:885, 1961.
- RUDDLE, F. H. - Linkage analysis using somatic cell hybrids. Adv. hum. Genet., 3:173, 1972.
- RUDDLE, F. H. - Linkage analysis in man by somatic cell genetics. Nature, 242:65, 1973.
- RUDDLE, F. H. & R. P. CREAGAN - Parasexual approaches to the genetics of man. Ann. Rev. Genet., 9:407, 1975.
- RUDDLE, F. H. & P. L. KHAN - Report of the committee on the genetic constitution of autosomes other than chromosomes 1, 2 and 6. Human Gene Mapping 3. Baltimore Conference 1975. Birth Defects: Original Article Series., 12:31, 1976.
- RUSHTON, A. R. - Quantitative analysis of human chromosome segregation in man-mouse somatic cell hybrids. Cytogenet. Cell Genet., 17:243, 1976.

SANTACHIARI, A. S.; M. NABHOLZ; V. MIGGIANO; A. J. DARLINGTON & W. BODMER - Linkage between human lactate dehydrogenase B and peptidase B genes. Nature, 227:248, 1970.

SAVAYAVEDRA, M. S. & G. L. ELLICEIRI - Regulation of species specific ribosomal RNA in a somatic cell hybrid. Biochem. biophys. Acta, 378:216, 1975.

SCALETTA, L. J.; N. B. RUSHFORTH & B. EPHRUSSI - Isolation and properties of hybrids between somatic mouse and Chinese hamster cells. Genetics. 57:107, 1967.

SHOWS, T. B. & J. A. BROWN - Segregation of esterase D and adenine phosphoribosyltransferase in somatic cell hybrids: Gene linkage or chromosome association. In. Rotterdam Conference (1974): Second International Workshop on human gene mapping. Birth Defects: Original Article Series., 2:260, 1975.

SILAGI, S.; G. DARLINGTON & S. A. BRUCE - Hybridization of two biochemically marked human cell lines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 62:1085, 1969.

SOKAL, R. R. & F. JAMES ROHLF - Non parametric methods in lieu of single classification anova. In: _____, Biometry. San Francisco, Freeman and Company, 1969. p. 392

SORIEUL, S. & B. EPHRUSSI - Karyological demonstration of hybridization of mammalian cells in vitro. Nature, 190:653, 1961.

SPENCER, R. A.; T. S. HARSCHKA; D. B. AMOS & B. EPHRUSSI - Co-dominance of isoantigens in somatic cell grown "in vitro". J. Nat. Cancer Inst., 33:893, 1964.

- THOMAS, G. H.; H. A. TAYLOR; C. S. MILLER; J. AXELMAN & B. R. MIGEON - Genetic complementation after fusion of Tay-Sachs and Sandhoff cells. Nature, 250:580, 1974.
- VERWEY, E. J. A. & J. T. G. OVERBEEK - In: Theory of stability of lyophobic colloids. Amsterdam, Elsevier, 1948. apud POSTE, G., 1972. op. cit.
- WEISS, M. C. & B. EPHRUSSI - Studies of interspecific (rat x mouse) somatic hybrids. I. Isolation, growth and evolution of the karyotype. Genetics, 54:1095, 1966a.
- WEISS, M. C. & B. EPHRUSSI - Studies of interspecific (rat x mouse) somatic hybrids. II. Lactate dehydrogenase and -glucuronidase. Genetics, 54:1111, 1966b.
- WEISS, M. C. & H. GREEN - Human-mouse hybrid cell lines containing partial complements of human chromosomes and functioning human genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 58:1104, 1967.
- WESTERVELD, A. & P. M. KHAN - Evidence for linkage between human loci for 6-phosphogluconate dehydrogenase and phosphoglucomutase-1 in man-Chinese hamster somatic cell hybrids. Nature, 236:30, 1972.
- WOODIN, A. M. & A. A. WIENEKE - The participation of calcium, adenosine triphosphate and adenosine triphosphatase in the extrusion of the granule proteins from the polymorphonuclear leucocyte. Biochem. J., 90:498, 1974.
- YERGANIAN, G. & M. NELL - Hybridization of dwarf hamster cells by UV-inactivated Sendai virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 55:1066, 1966.

YOSHIDA, M. C. & B. EPHRUSSI - Isolation and karyological characteristics of seven hybrids between somatic mouse cells in vitro. J. Cell Phys., 69:33, 1967.

ZEPP, H. D.; J. H. CONOVER. K. HIRSHHORN & H. L. HODAS - Human-mosquito somatic cell hybrids induced by ultraviolet-inactivated Sendai virus. Nature New Biol., 229:119, 1971.