

**Caracterización cromosómica e
inmunolocalización de proteínas relacionadas con
la estructura de la cromatina en una población del
complejo *Ctenomys Pearsoni***



Foto: <http://evolucion.fcien.edu.uy/fotos/tucu2.jpg>

Tesis de Grado
Licenciatura en Bioquímica

Carlos Javier Urioste Amarillo

CI: 3194276-8

Tutor responsable: Dr. Álvaro Novello.

Sección Genética Evolutiva. Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

Agosto 2008

Índice

Título.....	3
Resumen.....	3
1. Introducción.....	5
1.1 Variabilidad cromosómica en la naturaleza.....	5
1.2 Ctenomys como modelo de estudio.....	5
1.3 Importancia de la evolución de la heterocromatina en este género.....	7
Recuadro 1: Escenario evolutivo de la secuencia SRPC.....	10
1.4 Proteínas BRCA1 y M31: la inestabilidad genética y su relación con la cromatina.....	13
1.4.1 Proteína BRCA1	14
Recuadro 2: características de BRCA1.....	15
1.4.2 Proteína M31	17
2. Objetivos.....	19
3. Materiales y Metodología.....	19
3.1 Trabajo de Campo	19
3.2 Técnicas Citogenéticas.....	21
a. Obtención de Cromosomas Mitóticos.....	21
b. Obtención de cromosomas Meióticos.....	22
c. Análisis de los cromosomas.....	22
d. Bando C en cromosomas meióticos y mitóticos.....	22
e. Bando G	23
f. Procedimiento fotográfico y procesamiento de imágenes.....	23

g. Tinción con nitrato de plata	23
Recuadro 3: Efectos de las técnicas utilizadas en citogenética sobre los cromosomas mitóticos	24
h. Preparaciones para inmunofluorescencia en células somáticas	25
i. Preparaciones para inmunofluorescencia en células germinales	26
j. Técnica de inmunofluorescencia sobre aplastados celulares.....	26
k. Inmunofluorescencia sobre preparados de líneas celulares	27
l. Inmunofluorescencia sobre cortes obtenidos por congelación	27
Recuadro 4: Tinción con DAPI.....	28
4. Resultados.....	28
4.1 Análisis del cariotipo	28
4.2 Análisis del bandeo C en cromosomas mitóticos.....	29
4.3 Análisis del bandeo G en cromosomas meióticos	30
4.4 Análisis de la Meiosis	33
4.5 Inmunolocalización de BRCA1 sobre células en mitosis y en meiosis	34
4.6 Inmunolocalización de M31 en cortes de tejido de meiosis	37
4.7 Inmunolocalización de M31 en líneas celulares MCF-7 y 4T1	37
5. Discusión	39
5.1 Análisis citogenética	39
5.2 Análisis de la Meiosis	39
5.3 Inmuno-citoquímica	45

6. Conclusiones	46
7. Anexo 1. Primeros Eventos en respuesta a las roturas doble hebra (RDH)	48
8. Anexo 2. Recombinación Homóloga.....	52
9. Agradecimientos	55
10. Bibliografía.....	56

Caracterización cromosómica e inmunolocalización de proteínas relacionadas con la estructura de la cromatina en una población del complejo *Ctenomys Pearsoni*

Javier Urioste Amarillo[§]

Tutor responsable: Álvaro Novello

Sección Genética, Facultad de Ciencias, Iguá 4225 P5, Montevideo Uruguay.

Resumen

El género *Ctenomys* en particular, presenta una amplia heterogeneidad cariotípica con números diploides que van desde 10 a 70 cromosomas, así como diferencias en la cantidad y distribución de la heterocromatina. A lo largo de este trabajo se realiza una caracterización citogenética de la población de Carrasco perteneciente al complejo *Ctenomys Pearsoni*. Además se realiza un estudio comparativo de bandeo C y bandeo G entre dicha población y la de San José, *C. pearsoni*, para estudiar diferencias a nivel cariotípico y de la heterocromatina en la evolución de ambas poblaciones. Se estudian los patrones de distribución de la proteína BRCA1, una de las principales proteínas involucradas en la recombinación homóloga en la meiosis y en la reparación por recombinación en células somáticas, en la población de Carrasco. También se estudia la localización de la proteína M31 (homólogo de HP1) en dos líneas celulares de diferentes especies, así como en células de la meiosis de la mencionada población, y se discute su rol en la heterocromatinización y el silenciamiento génico.

[§] E-mail: javierurioste@adinet.com.uy

1- Introducción

1.1- Variabilidad cromosómica en la naturaleza

La diversidad cromosómica presente en poblaciones de numerosas especies se debe principalmente a variaciones numéricas (poliploidía, aneuploidía, cromosomas supernumerarios), las cuales han sido principalmente descritas en plantas e insectos y a variaciones estructurales (John, 1976). Dentro de estas últimas, existen varios mecanismos responsables de la variación del número diploide ($2n$) y el número fundamental (NF), entre los que se cuentan: reordenamientos Robertsonianos, inversiones pericéntricas y paracéntricas, translocaciones recíprocas y fusiones en tándem (Figura 1). Estos reordenamientos pueden ser identificados a través de técnicas de bandeo en las que los cromosomas fijados son sometidos a un tratamiento químico/ enzimático y térmico (John, 1976; King, 1993). Un reordenamiento Robertsoniano implica una fusión de dos cromosomas telocéntricos para formar uno metacéntrico (fusión), o la disociación de un metacéntrico para formar dos telocéntricos (fisión). Consecuentemente, ambos procesos causan una modificación en el número diploide. Las inversiones pericéntricas que involucran un cambio en la posición del centrómero, modifican el número de brazos cromosómicos (NF) (John, 1976; King, 1993). El NF puede modificarse además por la adición o delección de heterocromatina constitutiva (HC) (Patton y Sherwood, 1983).

1.2- *Ctenomys* como modelo de estudio

El género *Ctenomys* en particular, presenta una amplia heterogeneidad cariotípica, con números diploides que van desde 10 en *C. steinbachi*, a 70 en *C. pearsoni* y *C. dorbigny* (Reig y cols., 1992). Esta variabilidad, que se correlaciona con una gran cantidad de reordenamientos cromosómicos, ha sido vinculada con el proceso de explosiva cladogénesis ocurrido en el género, sugiriéndose que la especiación cromosómica podría ser el mecanismo causal de este particular patrón (Massarini y cols, 1996).

Los reordenamientos Robertsonianos se encuentran ampliamente representados entre las especies de *Ctenomys* y pueden haber tenido un papel principal en su evolución cariotípica. Sin embargo, en varias especies ha sido documentada la ocurrencia de otros reordenamientos como inversiones

pericéntricas, deleciones y amplificaciones de eucromatina y heterocromatina (Reig y cols., 1990; Ortells, 1995). Cabe destacar que, aunque el componente principal de heterogeneidad cariotípica en el género es interespecífica, se han reportado varios casos de politipismos (Freitas y Lessa, 1984) y polimorfismos (Novello y cols., 1990). Diversos tipos de reordenamientos han sido relacionados con tal variación: fusiones y fisiones (Freitas y Lessa, 1984; Novello y cols., 1990) inversiones pericéntricas, deleciones y amplificaciones de brazos cortos eucromáticos (Ortells, 1995) y deleciones o amplificaciones de heterocromatina (Massarini y cols., 1992).

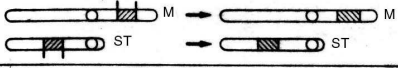
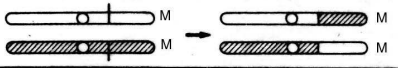
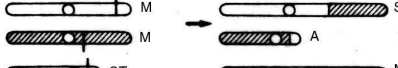
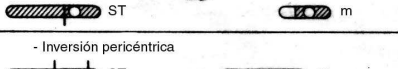
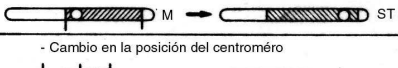
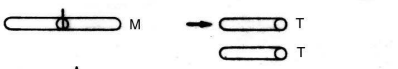
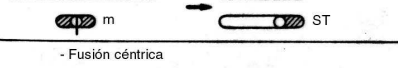
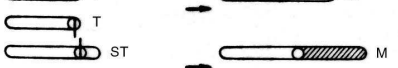
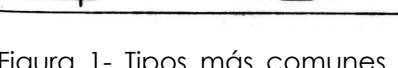
Tipo de reordenamiento	Morfología	Nº crom.	Nº brazos
Sin alteraciones en la estructura o posición del centrómero - Inversión paracéntrica 	Sin cambios		
- Translocación recíproca 	Sin cambios		
Alteración en la posición del centrómero - Translocación recíproca desigual 	2M → SM+ST	Sin cambios	
	2ST → M+m	Si se pierde m:	2 → 1 4 → 2
- Inversión pericéntrica 	ST → M M → ST	Sin cambios	
- Cambio en la posición del centrómero 	ST → M M → ST	Sin cambios	
Cambios que involucran el centrómero - Fisión céntrica 	M → 2T	1 → 2	Sin cambios
	M+m → ST+ST	Sin cambios	
- Fusión céntrica 	2T → M	2 → 1	Sin cambios
	2ST → M+m	Si se pierde m:	2 → 1 4 → 2

Figura 1- Tipos más comunes de reordenamientos cromosómicos estructurales (Extractado de John, 1976).

Ctenomys resulta interesante como modelo de estudio de especiación cromosómica por sus características sociodemográficas y su estructura poblacional. Sin embargo, aunque hay estudios que proponen diversos modelos que podrían explicar la fijación de los reordenamientos cromosómicos que ocurren en el género,

los mecanismos moleculares involucrados en la ocurrencia de los mismos no han sido analizados en profundidad.

1.3- Importancia de la evolución de la heterocromatina en este género

La mayoría de los genomas eucarióticos contienen secuencias de ADN altamente repetido, dispuestas en tándem y ubicadas en o cerca de las regiones teloméricas o centroméricas de los cromosomas. Dichas secuencias, denominadas *ADN satélite*, incrementan la posibilidad de ocurrencia de eventos tales como conversión génica y cruzamiento desigual (*unequal crossing-over*) (Charlesworth y cols., 1986). Miklos (1985) ha postulado que las secuencias altamente repetidas pueden tener un papel importante en la determinación de la estructura centromérica, en el apareamiento y recombinación cromosómica, en la conformación tridimensional del núcleo y en la reorganización del genoma durante los procesos de especiación. Se ha debatido bastante acerca del posible papel del ADN satélite en la evolución cromosómica, principalmente porque se ha observado que las diferencias cromosómicas que distinguen a varias especies no se correlacionan con diferencias en la cantidad de este tipo de ADN (Hartl y Clark, 1989).

Reig y colaboradores (1992) clasifican a la heterocromatina revelada por bandeo C en este género, en los siguientes tipos básicos (Figura 2):

- 1- Heterocromatina ausente en la mayoría de los cromosomas (Figura 2a).
- 2- Heterocromatina presente en el centrómero de algunos cromosomas, escasamente teñida en comparación a aquella que está presente en zonas pericentroméricas en otras especies (*C. torquatus* y *C. pearsoni* y poblaciones de la costa del Uruguay). (Figura 2b).
- 3- Heterocromatina fuertemente teñida presente en áreas pericentroméricas. En este caso la región centromérica y proximal de los brazos cromosómicos se tiñen mediante el bandeo C. El tamaño de las zonas heterocromáticas que rodean al centrómero puede variar entre cromosomas, llegando en algunos casos, a abarcar totalmente los brazos cortos. (Figura 2c).
- 4- Heterocromatina presente en brazos completos: En este caso los brazos cortos y el centrómero de cromosomas bibraquiados son positivos luego del bandeo C.

Sólo en pocos ejemplos el bandeo C se presenta en los brazos largos. Cabe destacar que el cromosoma Y puede presentarse totalmente positivo. Este tipo de bandeo C está presente en *C. rionegrensis* de Uruguay (Figura 2d).

- 5- Heterocromatina telomérica: Esta distribución de heterocromatina es rara, siendo una excepción el caso de *C. latro* (Argentina) (Figura 2e).
- 6- Heterocromatina intersticial: Este patrón de bandeo C no es frecuente en *Ctenomys* y cuando ocurre, se limita a bandas estrechas en uno o en pocos cromosomas como es el caso de *C. perrensis* (Argentina) (Figura 2f).

De acuerdo a deducciones realizadas a partir del criterio del grupo externo, existe una tendencia hacia la acumulación más que a la delección de heterocromatina como modo de evolución en *Ctenomys*. Dicha evolución habría ocurrido a través de adiciones de brazos completos y transformación de eucromatina, no obstante, las adiciones de heterocromatina no concuerdan con el gran número de cromosomas metacéntricos que se encuentran en el género. En general, las tendencias hacia un incremento o disminución en el número cromosómico han sido independientes de los cambios heterocromáticos (Gallardo, 1991).

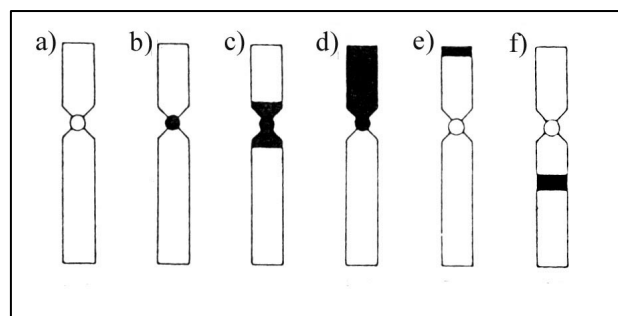


Figura 2- Patrones de distribución de la heterocromatina en *Ctenomys*: a) Heterocromatina ausente, b) Heterocromatina centromérica, c) Heterocromatina pericentromérica, d) Heterocromatina abarcando brazos cortos, e) Heterocromatina telomérica y, f) Heterocromatina intersticial (Reig y cols., 1992).

De acuerdo a los estudios realizados por Rossi y colaboradores (1990), la secuencia repetida Pvu II de *Ctenomys* (SRPC) sería el ADN satélite más abundante en el genoma de estos roedores. Esta secuencia tiene un tamaño de 337 pares de bases y un contenido de pares de bases G + C del 42 %. SRPC está presente en todas las especies del género analizadas con excepción de *C. opimus*, y también en especies de la subfamilia Octodontinae, hermana de la subfamilia Ctenomyinae. Sin embargo, el grado de amplificación de SRPC no es el mismo en todas las especies y se propone un modelo de "círculo rodante" para explicar dicha amplificación (Walsh, 1987). Rossi y cols., (1990) sugieren que el ADN satélite en *Ctenomys* habría evolucionado desde una localización pericentromérica hasta abarcar los brazos cortos de algunos cromosomas.

La SRPC presenta características típicas de ADN satélite: millones de copias de la unidad monomérica: 1.5×10^6 a 2×10^6 copias por núcleo (Novello y cols., 1996a), disposición en tándem demostrada por los patrones de "Southern blot" "en escalera" característicos, y localización en regiones heterocromáticas. Sin embargo, tiene un alto grado de identidad de secuencia con la región U3 de los repetidos terminales largos (LTR) retrovirales, implicados en la regulación transcripcional del genoma del retrovirus y un sitio de unión a factores nucleares, conservado en la mayoría de las copias del ADN satélite de varias especies estudiadas (Pesce y cols., 1994). Estas semejanzas con secuencias retrovirales y la capacidad para unir factores de transcripción la hacen parecida a secuencias dispersas medianamente repetidas y retrovirus endógenos (Rossi y cols., 1990). Aunque probablemente la mayoría de las copias de SRPC no se encuentren accesibles a factores de transcripción in vivo, no es posible descartar que algunas copias dispersas participen en la regulación de la transcripción de genes vecinos (Pesce y cols., 1994).

Recuadro 1- Escenario evolutivo de la secuencia SRPC (Rossi y cols., 1990)

Un precursor de la secuencia SRPC presente en forma oligomérica en el ancestro común de *Ctenomys* y *Octodontomys* habría adquirido, a través de mutaciones puntuales, sitios de reconocimiento para Pvu II u otras enzimas de restricción. Dicha secuencia, probablemente habría tenido alguna subsecuencia que actuaría como origen de replicación. Algún tiempo después de que *Octodontomys* y *Ctenomys* divergieron, una mutación que creó un sitio para Pvu II en uno de los monómeros de SRPC, apareció en esta rama. El monómero que contenía el sitio para Pvu II habría sido amplificado a través de un proceso de intercambio desigual (*unequal crossing-over*) en el ancestro de *Ctenomys*. Esta amplificación continuaría después de que se inició la explosiva cladogénesis la cual condujo a la especiación del género, sin embargo, la tasa de amplificación habría sido distinta para sus diferentes linajes. Según estos autores la mayor parte de la amplificación sería consecuencia de la creación de plásmidos circulares debido a la ocurrencia de intercambios intrahebra seguidos por replicación por círculo rodante y reinserción, mayoritariamente en sitios homólogos (Figura 3). Sin embargo, la reinserción ocasionalmente habría ocurrido en sitios no homólogos, los que se convertirían en "puntos calientes" para futuras reinserciones. Las periodicidades del satélite serían el resultado de la amplificación de monómeros que contenían mutaciones las cuales suprimieron los sitios Pvu II. La expansión de monómeros conteniendo mutaciones que crearon otros sitios de restricción (Eco RI, Hae III), serían el resultado del mismo proceso de amplificación local.

Debido a estas características que resultan inusuales para un ADN satélite, Rossi y colaboradores (1990) plantean que esta secuencia habría tenido un papel relevante en la evolución del genoma del género *Ctenomys*, y postulan para la misma, el escenario evolutivo que se describe en el Recuadro 1.

La alta tasa de reorganización cromosómica relacionada a la explosiva diversificación de especies está sólo parcialmente explicada por los conocimientos de la estructura de poblaciones de *Ctenomys*. Las actuales teorías de evolución cromosómica resultan insuficientes para explicar la múltiple fijación de cambios cromosómicos bajo las tasas conocidas de mutación cromosómica. Un proceso dinámico de amplificación de ADN, como sugieren los trabajos de Rossi y colaboradores (1990), puede haber actuado como factor disparador en la producción de las altas tasas de reorganización cromosómica. Sin embargo, aún no se cuenta con evidencia directa de tal hecho.

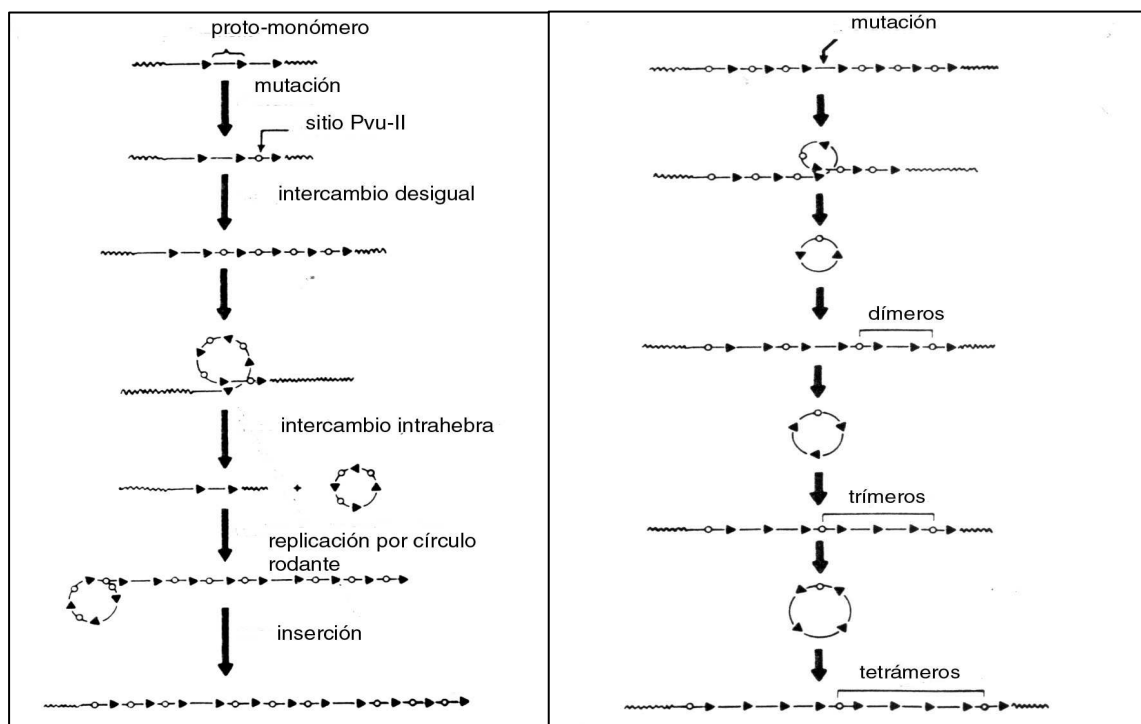


Figura 3- Modelo propuesto para explicar el proceso de amplificación de la secuencia SRPC de *Ctenomys* (Rossi y cols. 1990).

Varias hipótesis nuevas han sido desarrolladas para explicar la relación entre los reordenamientos cromosómicos y la especiación. Algunas investigaciones se han centrado en la viabilidad durante la meiosis de un heterocariotipo para un reordenamiento, o en la alta estructuración de las poblaciones de *Ctenomys* que podrían facilitar la fijación de nuevos homocariotipos (King, 1993; Nevo., 1979). Otras investigaciones han explorado mecanismos moleculares involucrados en el origen de los reordenamientos, en particular, el ADN satélite ha sido el centro de atención al respecto, ya que se le asigna un rol fundamental en la dinámica de los reordenamientos cromosómicos (Garagna y cols., 1997; Slamovits y cols., 2001).

El análisis comparativo realizado en un análisis sobre la relación entre SRPC y los cambios cromosómicos realizado por Slamovits y colaboradores (2001) sugiere que la historia de dicho repetido ha sido extremadamente compleja, con múltiples eventos de ganancia y pérdida en el número de copias.

La amplificación y movimiento del ADN satélite está bien documentada y se ha propuesto como un disparador de la evolución cariotípica (Wichman 1992; Yang y cols., 1997). Este proceso puede tener consecuencias fundamentales en la arquitectura cromosómica. Por ejemplo, Garagna y colaboradores (2001) dilucidaron la organización del ADN satélite en puntos involucrados en translocaciones de cromosomas de ratón. Li y colaboradores (2000) demostraron la

relación de dos tipos de ADN satélite del genoma del *Muntiacus muntjak* con las fusiones en tándem ocurridas en esta especie. Esos estudios apoyan la hipótesis de Wichman y colaboradores (1991) que sugiere que los movimientos intragenómicos de las secuencias repetidas (estudiadas por hibridación in situ en cariotipos ancestrales y derivados), promoverían la evolución cromosómica. Esta hipótesis, además, es consistente con varios casos de evolución cromosómica como la registrada en *Microtus* (Modi, 1993), *Reithrodontomys* (Hamilton y cols., 1990), *Peromyscus* (Bradley y Wichman, 1994) y *Equus* (Bradley y Wichman, 1994).

El análisis de la evolución del número de copias de SRPC junto con la variabilidad cromosómica en los linajes de *Ctenomys* mostró dos patrones distintos. Uno se caracteriza por la alta variabilidad en el número de copias entre linajes muy relacionados acompañada de sustancial variabilidad cromosómica. El otro patrón consiste en un número de copias bastante estable de SRPC dentro de clados cariotípicamente estables (Slamovits y cols., 2001). El análisis sugiere una asociación entre cambios cariotípicos y cambios en el número de copias de SRPC (tanto hacia su incremento como su disminución). Contrariamente, este mismo estudio realizado en tucu tucus revela que la estabilidad en el número de copias de SRPC se acompaña de estabilidad cromosómica (Slamovits y cols., 2001).

1.4- Proteínas BRCA1 y M31: la inestabilidad genética y su relación con la cromatina

El ADN se asocia a octámeros de histonas (2 moléculas de H2A, H2B, H3 y H4), y genera estructuras llamadas nucleosomas (Figura 4). La reparación de las roturas de doble hebra del ADN está estrechamente relacionada al mantenimiento o introducción de cambios en la estructura de la cromatina y al cumplimiento de diversas funciones celulares. Los detalles de este proceso, son objeto de varias investigaciones en la actualidad. Ya es sabido, que las modificaciones postraduccionales de las histonas (fosforilación, metilación, acetilación y ubiquitinación) funcionan como un “*código de histonas*” el cual constituye un sistema de señalización así como de regulación de diversos cambios a nivel del ADN. Esos cambios pueden alterar la compactación de la cromatina y/o reclutar varias proteínas efectoras que tienen influencia sobre la transcripción, compactación y otras funciones tales como la reparación de roturas de doble hebra en el ADN (Kuus-Reichel y cols., 1997).

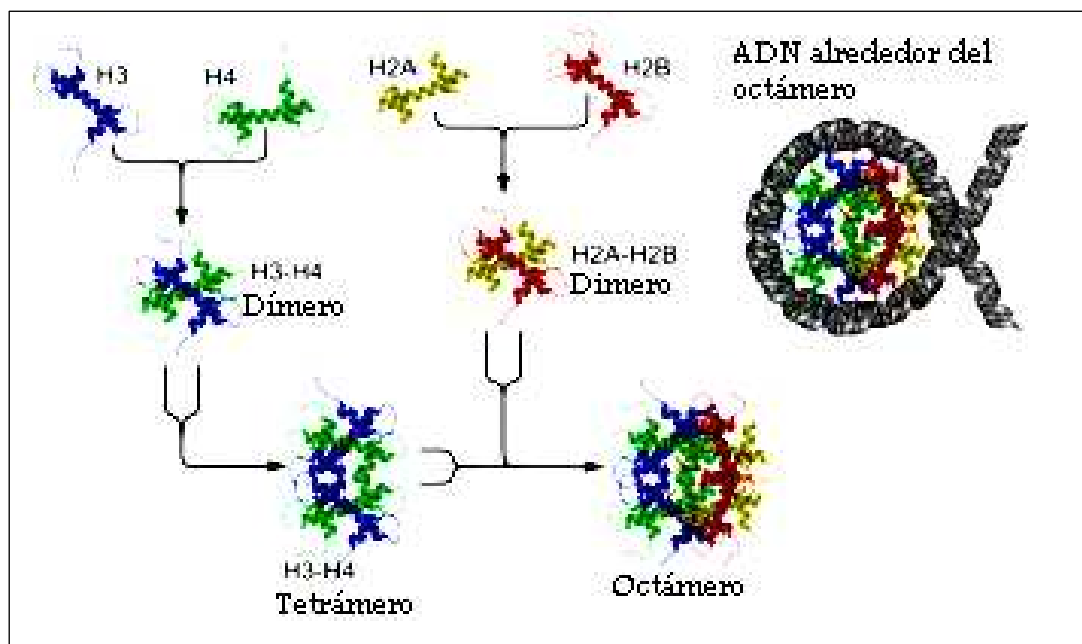


Figura 4- Debido a que procesos tales como reparación del ADN y transcripción deben acceder al ADN, el nucleosoma es una estructura dinámica que está regulada por numerosas modificaciones postraduccionales ubicadas en los extremos N y C terminales de las colas de las histonas (Kuus-Reichel y cols., 1997).

1.4.1- Proteína BRCA1

BRCA1 es una proteína cuya distribución varía a través del ciclo celular y también en respuesta al daño genético (Figura 5).

La unidad de transcripción de BRCA1 contiene 24 exones que abarcan 81.000 bases de ADN. El primer exón no es codificante, la traducción se inicia en el segundo exón. El transcrito de BRCA1 luego del proceso de splicing, codifica una proteína de 1863 aminoácidos, que posee un motivo con forma de anillo cerca del extremo N-terminal, dos motivos de localización nuclear dentro del exón 11 y un dominio localizado cerca del extremo C-terminal denominado dominio BRCT. El dominio en anillo tiene una doble función de unión al ADN y de unión proteica y sus potenciales señales de localización nuclear del exón 11 sugieren que esta proteína reside en el núcleo (Tavtigian y cols. 2007).

BRCA1 se halla en regiones heterocromáticas, comúnmente asociada a complejos formados por cinetocóros-centrómeros y a heterocromatina pericentromérica (Gayle y Lawrence, 2006). Estudios realizados por Gayle y Lawrence (2006) utilizando técnicas inmunológicas demuestran que BRCA1 se localiza en zonas adyacentes o, en sitios donde se hallan grandes bloques heterocromáticos que forman cromocentros. Hohenstein y Giles (2003) plantean que BRCA1 participa en la remodelación de la cromatina a través de la formación de complejos multiproteicos sugiriendo una función tipo "scaffold", donde coordinaría componentes esenciales a nivel espacial y temporal.

La pérdida de función de BRCA1 se halla asociada a defectos en la proliferación celular, debido a la formación de puentes postmitóticos en sitios donde hay gran cantidad de ADN satélite. Esos hallazgos indican que esta proteína está relacionada con la replicación de la heterocromatina, sugiriendo una función novedosa donde la pérdida de BRCA1 contribuye a la inestabilidad genómica (Gayle y Lawrence, 2006).

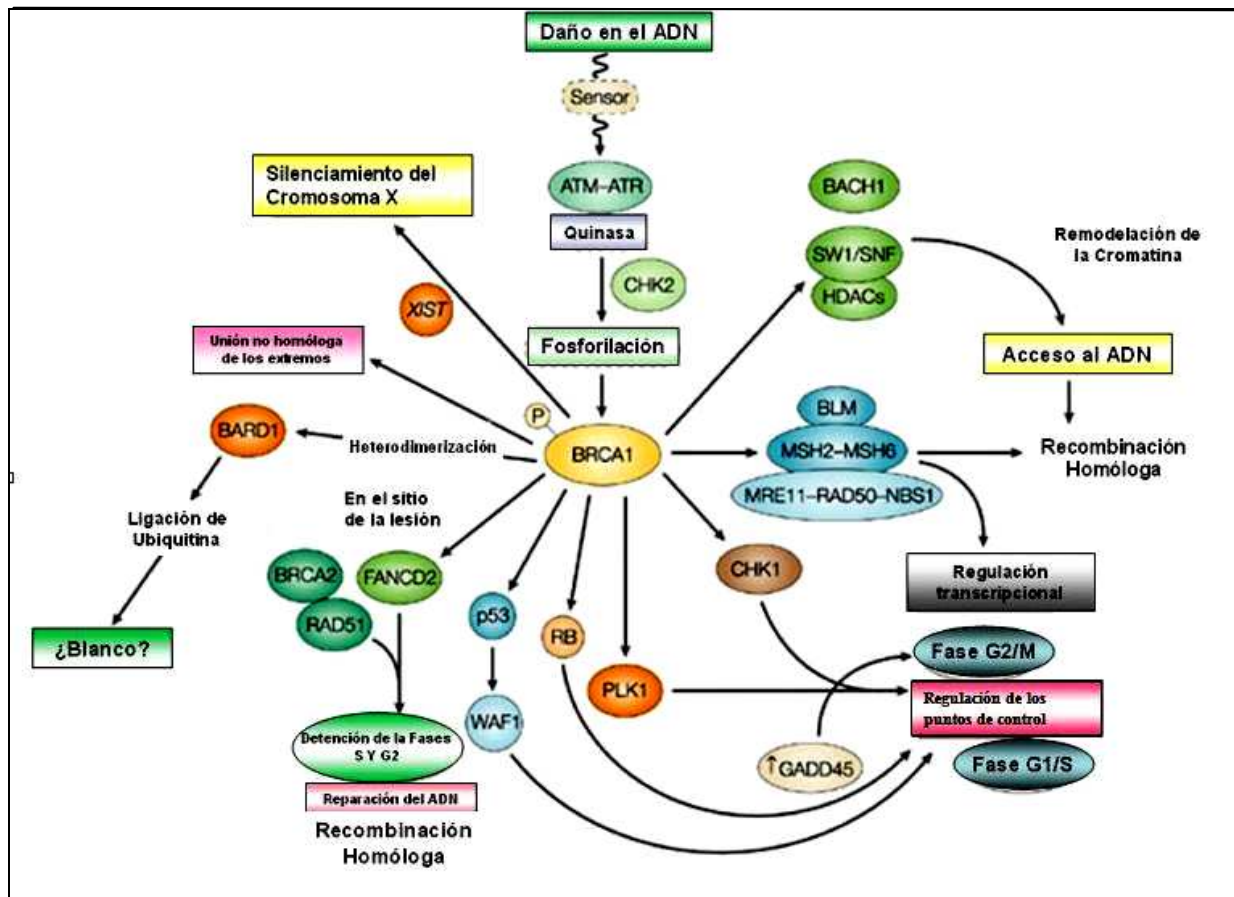


Figura 5- Esquema de BRCA1 con sus dominios funcionales (Steven y Foulkes, 2004).

Recuadro 2- Características de BRCA1 (Steven y Foulkes, 2004)

BRCA1 es un componente crucial de varias vías que regulan la reparación del ADN, la progresión del ciclo celular y regulación transcripcional. El daño en el ADN es uno de los disparadores clave de la activación de BRCA1. Varios sensores de la respuesta al daño que incluyen a la quinasa ATM, y otras quinasas son activadas como consecuencia del mismo. La quinasa CHK2 es también activada y previene la entrada de la célula en división fosforilando a BRCA1 y p53. Algunos de los blancos subsiguientes a la activación de BRCA1 incluyen a p53 y al factor Rb. BRCA2 y RAD51 forman un complejo que se cree interacciona con FANCD2, que se une a BRCA1. Este complejo promueve la detención del ciclo celular en la fase S o en G2. La reparación por recombinación homóloga (HR) ocurre vía el complejo denominado "complejo de vigilancia del genoma asociado a BRCA1", compuesto por las proteínas BLM, MSH2-MSH6, y MRE11-RAD50-NBS1. Este complejo también regula la transcripción. BRCA1 también interacciona con el transcripto específico del cromosoma X inactivo (XIST), mediando el silenciamiento del cromosoma X. Actúa además en la regulación de la otra vía de reparación del ADN denominada unión de los extremos no homólogos (NHEJ). BRCA1 forma complejos con BACH1 y los complejos SW1/SNF para mediar el remodelamiento de la cromatina y la recombinación homóloga. BRCA1 interacciona con las quinasas PLK1 y CHK1 para regular los puntos de control G1/S y G2/M del ciclo celular, ligando a BRCA1 con la apoptosis.

Durante el ciclo celular el genoma es duplicado durante la fase S, para luego segregarlo a las células hijas durante la mitosis (fase M). Para asegurar una alta fidelidad en esta transmisión cromosómica hacia las células hijas, las células han evolucionado para poseer mecanismos extremadamente complejos de transmisión de señales que controlan las diferentes etapas del ciclo celular. Por ejemplo en respuesta a diferentes tipo de daño en el ADN, que incluyen fuentes exógenas como la radiación ionizante, y endógenas como las horquillas de replicación detenidas o el acortamiento telomérico, los puntos de control son activados, teniendo como consecuencia el detenimiento del ciclo celular. Estos impedimentos le dan a la célula el tiempo necesario para iniciar las vías de reparación del ADN y, dependiendo de la naturaleza de la lesión ocurrida, otros programas celulares como la transcripción y la apoptosis pueden ser activados. De esta forma, en respuesta al daño en el ADN, las células activan una red de respuestas que coordina varios procesos.

El daño en el ADN puede conducir a cambios a nivel cromosómico. Para la reparación de rupturas del ADN, las células eucariotas tienen dos caminos posibles: la unión de extremos no homólogos (NHEJ-nonhomologous end-joining) proceso que está propenso a la ocurrencia de errores y la recombinación homóloga (RH), mecanismo que también es responsable de la recombinación meiótica (ver anexo 2). BRCA1 está muy ligada a la RH a través de su interacción con RAD51. Esta proteína utiliza la hebra intacta de ADN como molde para la reparación de la hebra dañada (Hohenstein y Giles, 2003). Estudios basados en técnicas inmunológicas, utilizando anticuerpos anti-BRCA1 realizados sobre espermatoцитos de mamíferos en profase de la meiosis I, muestran que esta proteína se encuentra específicamente asociada a segmentos cromosómicos que no están en sinapsis y a zonas donde la sinapsis está ocurriendo. Los patrones de inmunofluorescencia detectados, coinciden con altos niveles de expresión de BRCA1 observados en profase meiótica de espermatoцитos de mamíferos (Tavtigian y cols. 2007). Por tanto, entre las múltiples funciones de BRCA1, está la de participar en la recombinación tanto a nivel somático (a través de la reparación por recombinación homóloga), como a nivel germinal, participando junto con RAD51 en la sinapsis y la recombinación.

En el caso de la vía de la Recombinación Homóloga en respuesta al daño en el ADN, la maquinaria y el proceso son prácticamente iguales para el caso de la RH en la meiosis (ver anexo 2). BRCA1 y otras proteínas son reclutadas al ADN a los sitios físicos donde ocurrió el daño formando complejos multiproteicos que reparan el

daño confluyendo en la recombinación y otras vías de señalización que ayudan a mantener la estabilidad genómica. En la figura 6 se muestra una micrografía donde se observa la localización de BRCA1 en respuesta a la radiación ionizante y a una droga formadora de Roturas Doble Hebra (RDH).

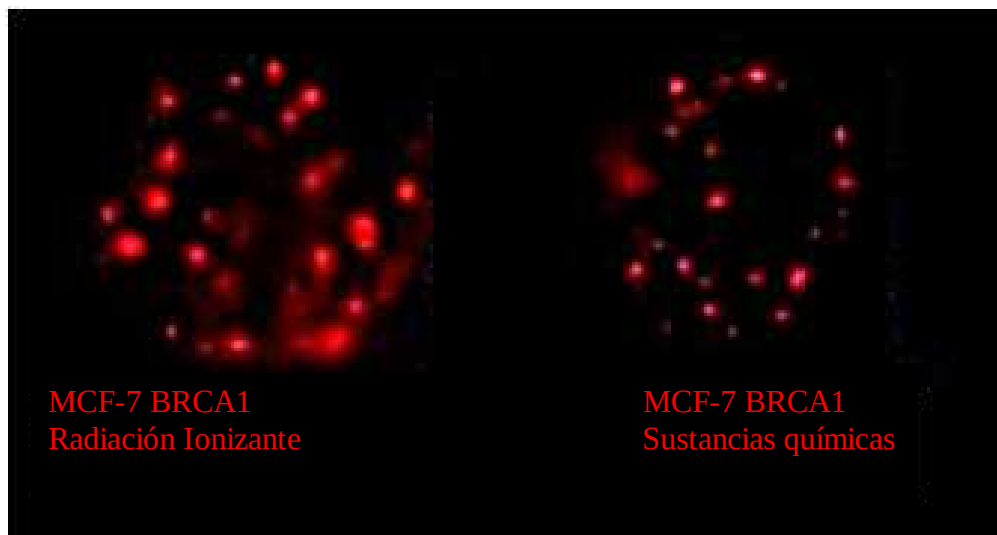


Figura 6- La proteína BRCA1 se localiza en sitios donde se produjeron lesiones debidas a radiaciones ionizantes (figura superior) y a drogas responsables de la formación de roturas doble hebra (figura inferior). El patrón de puntos que aparece es característico de este tipo de lesiones MCF-7 es una línea celular originada de un tumor de mama humano. (Kuus-Reichel y cols., 1997).

1.4.2- Proteína M31

El núcleo meiótico presenta su ADN posee una arquitectura nuclear muy definida, la cual se encuentra organizada en cromocentros heterocromáticos y territorios con menor grado de compactación. Uno de los principales componentes de la heterocromatina es la proteína M31, responsable del proceso que se conoce como silenciamiento génico. Según Hoyer-Fender y colaboradores (2000), la proteína M31 de roedores (homóloga a la proteína HP1) es un modelo válido para analizar la interrelación de la misma y la organización del ADN en el núcleo meiótico. Estos autores encontraron dicha proteína localizada en regiones heterocromáticas organizadas en cromocentros durante el estadio de paquiteno de la meiosis I.

M31 pertenece a una familia de proteínas con cromodominio denominado HP1 que están altamente conservadas a través de las especies (Motzkus y cols. 1999). Existen 3 genes de HP1 de mamíferos que han sido designados HP1 α , HP1 β y HP1 γ respectivamente (Jones y cols., 2000). Para el caso de los roedores, la proteína HP1 β es la proteína homóloga de M31 (Jones y cols., 2000). El cromodominio (chromathin organisation modifier) es una región de 37 aminoácidos, y las proteínas que presentan este dominio conservado están involucradas en la regulación génica por procesos epigenéticos (modificación de la estructura cromatínica) y en la formación de regiones heterocromáticas (Jones y cols. 2000). M31 es homóloga a la proteína HP1 de *Drosophila*, compartiendo una similitud del 77% entre ambas a nivel aminoacídico del cromodominio (Singh y cols., 1991). Se ha demostrado que el cromodominio de M31, puede reemplazar funcionalmente al cromodominio de un homólogo del tipo HP1 en levaduras (*Schizosaccharomyces pombe*) manteniendo la actividad completamente y asociándose a las estructuras heterocromáticas de las zonas centroméricas y teloméricas, así como a otros dominios heterocromáticos, demostrando la conservación de la función desde levaduras hasta humanos (Wang y cols., 2000).

Estudios de HP1 en *D. melanogaster*, proveen uno de los más claros y mejores ejemplos de los mecanismos epigenéticos de regulación génica. Desde ya hace mucho tiempo se conoce el mecanismo de *variegación por efecto de la posición* (VEP) en este modelo. Este proceso se refiere al silenciamiento de genes eucromáticos que han sido integrados a la cercanía de la heterocromatina (wakimoto, 1998; Lechner y cols., 2000). Este silenciamiento génico solo ocurre en algunos tipos celulares, y este estado es transmitido exitosamente a las células hijas dando lugar a patrones variegados o mosaicos de expresión génica. La naturaleza estocástica de este fenómeno, podría ser debida al esparcimiento variable de la heterocromatina a las regiones adyacentes (Singh y Huskisson, 1998, Lechner y cols., 2000)

La heterocromatina, definida clásicamente por su apariencia citológica, está dispersa a través de los cromosomas pero es abundante en las cercanías de los centrómeros y los telómeros. Está frecuentemente compuesta por secuencias repetidas (Wallarth, 1998; Lechner y col., 2000). La familia de proteínas HP1 de mamíferos, poseen distintos patrones de tinción eucromáticos y heterocromáticos en el núcleo, sugiriendo que sus roles se han vuelto especializados o que su

ubicación específica en la cromatina ha sido regulada en forma desigual (Le Douarin y cols., 1996, Ryan y col., 1999, Lechner y cols., 2000).

2- Objetivos

- ✓ Caracterizar desde el punto de vista citogenético la población de Carrasco.
- ✓ Determinar los reordenamientos cromosómicos que la diferencian del cariotipo modal de la especie *C. pearsoni*.
- ✓ Contribuir a analizar el rol de la heterocromatina en la generación de reordenamientos cromosómicos.
- ✓ Analizar la profase meiótica en la población de Canelones.
- ✓ Determinar el rol que cumple la proteína BRCA1 en *Ctenomys* en células somáticas y comparar su función con la descrita en la bibliografía.
- ✓ Analizar el rol de dicha proteína en la meiosis a la luz de lo que se describe en la bibliografía sobre BRCA1.
- ✓ Determinar la posición de M31 en células meióticas de *Ctenomys* y en líneas celulares humana y de ratón, en relación a la heterocromatina, para confirmar su relación con la heterocromatinización y el silenciamiento genético.

3- Materiales y Metodología

3.1- Trabajo de campo

Los animales fueron capturados vivos utilizando trampas Victor Oneida N° 0, adaptadas de modo de evitar que las mismas dañaran sus miembros, dado que dichas lesiones generan importantes inflamaciones que en un plazo no mayor a 72 horas pueden provocar la muerte del animal.

Fueron capturados 15 individuos de la localidad de Carrasco (Departamento de Montevideo, Figura 7a) perteneciente al complejo *C. pearsoni* por la similitud morfológica que presentan estas poblaciones con dicha especie, aunque su estatus taxonómico es debatido, dadas sus diferencias a nivel cromosómico y en algunos casos a nivel de ciertas secuencias mitocondriales o nucleares (D'Elia, 1999; Villar, 2000; Tomasco, 2003). Se seleccionó como modelo de estudio a la población de Carrasco, ya que en estudios previos realizados por Novello y colaboradores (1988), se hallaron polimorfismos intrapoblacionales a nivel cariotípico así como en la ubicación de la heterocromatina constitutiva revelada por el bandeo C. Por ello se compararon los resultados con muestras obtenidas de la localidad típica de *Ctenomys pearsoni* ($2n=70$; Reig y cols., 1992) (Departamento de San José).

A los efectos de contrastar los resultados obtenidos para ésta población en relación a la profase meiótica con los de otra especie marcadamente diferente en cuanto a la cantidad y distribución de heterocromatina, también se analizó el paquiteno de muestras pertenecientes a la especie *Ctenomys rionegrensis* (Departamento de Río Negro). La ubicación de las poblaciones se muestra en el mapa (Figura 7b).



Figura 7a- Foto satelital de la franja costera de la zona de colecta de los especímenes, Carrasco. Los círculos rojos indican los lugares donde se colectaron los animales (Fotografía extractada de Google Earth).



Figura 7b- Mapa mostrando la ubicación de las poblaciones *C. rionegrensis* ($2n=50$), *C. pearsoni* ($2n=70$) y población de Carrasco ($2n=58$) perteneciente al complejo *C. pearsoni*.

3.2- Técnicas citogenéticas

a- Obtención de cromosomas mitóticos

Todos los ejemplares recibieron una inyección subcutánea de levadura activada siguiendo el procedimiento de Lee y Elder (1980) con modificaciones. Transcurridas 24 horas cada animal fue pesado e inyectado intraperitonealmente con una dosis de colchicina al 0.1 % de una solución de 0.15 ml/100 g de peso. Dicho tratamiento antimitótico fue aplicado durante 40 minutos. Luego los individuos fueron anestesiados, colocados en una cámara con cloroformo durante 10 minutos y posteriormente se procedió a su disección. En la misma se extrajeron los dos fémures y las dos tibias, realizándose un orificio en una de las epífisis de cada hueso para transferir la médula a un tubo de centrifuga con una solución hipotónica (KCl 0.075 M). El material fue resuspendido y dejado en reposo durante 15 minutos a 37°C. Luego se agregó fijador (3 partes de etanol y 1 parte de ácido acético) y se centrifugó durante 5 minutos a 1000 r.p.m. Se retiró el sobrenadante y se volvió a agregar fijador y a centrifugar en las mismas condiciones. El procedimiento se repitió una vez más. Se realizaron preparaciones secadas a la llama, las que fueron teñidas con Giemsa (Merck) al 4% en agua destilada durante 5 minutos. Los ejemplares fueron depositados en la colección de la sección Zoología Vertebrados de la Facultad de Ciencias.

b- Obtención de cromosomas meióticos

Para la obtención de las células meióticas a partir de testículos, se liberaron los túbulos seminíferos, cortando y macerando los testículos en solución hipotónica de KCl (0.075 M) (Ford y Evans, 1969). El material fue resuspendido y tratado en la misma forma que se describió en el apartado anterior.

Fueron analizadas no menos de 10 preparaciones por individuo. Las fotografías fueron tomadas en un microscopio Nikon Microphot FX equipado con cámara Nikon D70.

c- Análisis de los cromosomas

Fueron utilizadas un mínimo de diez células en metafase por ejemplar, para la comprobación y obtención del número diploide ($2n$) y del número fundamental (NF). El conteo cromosómico se realizó en un microscopio Nikon Microphot FX. Fueron fotografiadas las mejores metafases para cada ejemplar, con las que se construyó el cariotipo ordenando los cromosomas de acuerdo a su forma y tamaño.

d- Bandeado C en cromosomas mitóticos y meióticos

Las preparaciones mitóticas y meióticas fueron sometidas a bandeo C estándar (Summer, 1971). Luego de una semana de envejecimiento en estufa a 37 °C, se colocaron en una solución 0.2 N de ácido clorhídrico a temperatura ambiente y se lavaron con agua destilada. Posteriormente, fueron tratadas con una solución de hidróxido de bario al 5 % a 50°C por un minuto y finalmente incubadas en una solución salina citratada 2X a una temperatura de 60°C durante 20 minutos. Luego se tiñeron con Giemsa (Merck) al 4 % en agua destilada durante 5 minutos.

También fueron analizadas mediante bandeo C las preparaciones meióticas de todos los machos procesados, cuyas procedencias ya se han detallado. El patrón de bandeo C se determinó en base al análisis de no menos de 10 metafases por individuo. Las fotografías fueron tomadas en un microscopio Nikon Microphot FX equipado con cámara digital Nikon D70.

e- Bando G

Se realizó bando G en las preparaciones mitóticas de todos los individuos pertenecientes a la población de Carrasco siguiendo la técnica de Seabright (1971). Luego del envejecimiento de las mismas durante una semana a una temperatura de 37°C, fueron sumergidas en una solución de tripsina al 0.025 % en buffer fosfato (pH 7.2) a 15°C durante 15-60 segundos. Luego fueron lavadas durante 1 minuto en solución de Hanks (pH 6.9) diluida en agua destilada (1:1) y mantenida en hielo. Finalmente se tiñeron con Giemsa (Merck) al 5 % en buffer fosfato durante 3 a 10 minutos, secadas al aire y montadas en Entellan (Merck). Los cariotipos con bandas G se basaron en el análisis de 10 metafases como mínimo. Las fotografías fueron tomadas en un Microscopio Nikon Microphot FX.

En el Recuadro 3 se resumen los efectos sobre la estructura cromosómica de cada tipo de bando.

f- Procedimiento fotográfico y procesamiento de imágenes

Las metafases y los estadios meióticos fueron fotografiados con película Agfaortho (Agfa). La misma fue revelada con revelador Talbot durante 8 minutos. Las imágenes de metafases con bando G, fueron obtenidas utilizando película Technical Pan Film (Kodak), la cual fue revelada con Microdol (Kodak) durante 10 minutos a 20°C. Para realizar las copias se utilizó papel fotográfico Talbot grado 3 y 4.

Las imágenes obtenidas fueron escaneadas y tratadas con el programa Adobe Photoshop, con el objetivo de mejorar el contraste.

g- Tinción con nitrato de plata

Las preparaciones meióticas fueron teñidas con nitrato de plata según el protocolo de Howell and Black (1980).

Recuadro 3- Efectos de las técnicas utilizadas en citogenética sobre los cromosomas mitóticos**a) Efectos de la fijación en metanol-ácido acético**

Burkholder y Duczek (1982) a través de geles de poliacrilamida, compararon los patrones de bandas obtenidos al correr proteínas extraídas de cromosomas fijados y no fijados en metanol/ácido acético, observando que los mismos eran similares excepto por la histona H1 y por algunas proteínas no histónicas que fueron parcialmente extraídas por el fijador.

b) Efectos del bandeo C utilizando hidróxido de bario

Mediante electroforesis de proteínas extraídas de cromosomas tratados y no tratados mediante bandeo C se comprobó que el ácido clorhídrico utilizado en dicho tratamiento usualmente extrae algunas histonas de cada tipo y pocas proteínas no histónicas. Luego del hidróxido de bario, en los geles se obtuvo un difuso "smear", excepto por una banda prominente a nivel de la histona H4. Esto probablemente se debe a una importante degradación de las proteínas luego del tratamiento. La tinción difusa en los extractos de SSC, también sugiere degradación proteica. Luego del procedimiento completo de bandeo C con hidróxido de bario, también se obtuvo un patrón difuso en el gel, hubo pocas proteínas no histónicas intactas, significativas cantidades de histonas H3 y H4, pequeñas cantidades de H2A y H1 y muy poca H2B persistió en los cromosomas.

En suma, durante el proceso completo de bandeo C utilizando hidróxido de bario, ocurre extracción y degradación de proteínas. Varios de los productos de la degradación parecen permanecer en los cromosomas (Burkholder y Duczek, 1982). Las técnicas de bandeo C extraen la cromatina de las regiones no bandeadas, dejando intacta la heterocromatina constitutiva (Comings y cols., 1973; Pathak y Arrighi, 1973; Burkholder, 1975). Es probable que las interacciones entre proteínas y ADN en las regiones heterocromáticas produzcan una configuración que no es susceptible a los tratamientos de bandeo. Ya que la mayoría de la cromatina de las regiones no bandeadas es extraída durante el tratamiento, muchas de las proteínas residuales observadas en las electroforesis, posiblemente estén localizadas en la heterocromatina constitutiva (Burkholder y Duczek, 1982). Comings y cols. (1977) sugirieron que las histonas podrían estar íntimamente implicadas en la condensación característica de dicha heterocromatina. No obstante, existe evidencia de que proteínas no histónicas, también están relacionadas con esa condensación (Burkholder y Weaver, 1977; Matsukuma y Utakoji, 1977).

Recuadro 3- Continuación**c) Efectos del bandeo G utilizando tripsina**

Burkholder y Duczek (1982) compararon los patrones de bandeo en geles de poliacrilamida de proteínas residuales luego del tratamiento de bandeo G, y los de proteínas extraídas de los controles (cromosomas fijados y no tratados). La intensidad y nitidez de las bandas proteicas en la electroforesis se redujo después del tratamiento de bandeo G con tripsina, en relación a los controles. Hubo incremento en la tinción difusa de fondo en el gel, lo que estaría indicando la presencia de proteínas degradadas de tamaño variable. En general, las proteínas no histónicas fueron bastante sensibles a la tripsina, sobre todo aquellas de alto peso molecular. Las histonas fueron relativamente resistentes a la tripsinización.

En conclusión, es posible afirmar que algunas proteínas no histónicas son solubilizadas durante el bandeo G (Kato y Moriwaki, 1972) y que durante este procedimiento se extraen más proteínas no histónicas de las regiones de interbanda que de las zonas bandeadas (Matsukuma y Utakoji, 1976). La mayoría de los productos de degradación permanecen en los cromosomas tripsinizados, lo que podría tener algún efecto en la subsecuente tinción con Giemsa (Burkholder y Duczek, 1982). Aunque las histonas parecen ser resistentes a la tripsinización, cabe destacar que las bandas G pueden ser producidas sobre cromosomas libres de histonas (Comings y Avelino, 1974), lo que implica que las mismas no tendrían un papel activo en la producción de dicho bandeo. La variabilidad en los efectos sobre las proteínas cromosómicas, que provocan distintos procedimientos de bandeo G (Burkholder y Duczek, 1982), apoyan esta hipótesis.

h- Preparaciones para inmunofluorescencia en células somáticas

Para el análisis de inmunofluorescencia en células somáticas, se utilizaron células provenientes de médula ósea. Las mismas fueron extraídas utilizando una solución hipotónica (0,075 M KCl), y fueron incubadas durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. Una vez centrifugadas se descartó el sobrenadante, y las células se esparcieron sobre un portaobjetos. Posteriormente, se fijaron en una solución de paraformaldehído (Sigma) al 1% en PBS 1 X (buffer fosfato salino pH= 7,2) durante 10 minutos, se cubrieron con un cubreobjetos y se procedió al aplastado del material (Novello y cols. 1996b).

i- Preparaciones para inmunofluorescencia en células germinales

Los testículos fueron disecados y tratados en una solución hipotónica (0,075 M KCl) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego los testículos maceraron en pequeños trozos, y con una aguja se dispersaron las células sobre portaobjetos previamente lavados con etanol 95%. Posteriormente, las células se fijaron en una solución de paraformaldehído (Sigma) al 1% en PBS 1X, durante 10 minutos, se cubrieron con cubreobjetos y se procedió al aplastado del material (Novello y cols., 1996b).

j- Técnica de inmunofluorescencia sobre aplastados celulares

Las preparaciones de células somáticas y germinales se sumergieron en nitrógeno líquido por unos segundos, se retiraron y se quitaron los cubreobjetos con bisturí. Luego, los preparados se lavaron 3 veces en PBS 1X frío (5 minutos por lavado). A continuación se sumergieron en una solución para permeabilizar (Triton 0,5 % en PBS 1X) durante 10 minutos. Posteriormente, se realizaron 3 lavados en PBS 1X (5 minutos por lavado). Los preparados se incubaron a continuación, con el anticuerpo primario anti BRCA1 (hecho en cabra, Dako) en una dilución 1:200 en una solución de BSA (Sero Albúmina Bovina) al 1% en PBS 1X, durante toda la noche a 4°C. Luego se realizaron 3 lavados en PBS 1X frío (5 minutos por lavado). Se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario (hecho en conejo) conjugado al fluorocromo Alexa-594 (Dako) durante 90 minutos a temperatura ambiente en una dilución 1:400 en una solución de BSA al 1% en PBS 1X. Se realizaron 3 lavados en PBS 1X frío (5 minutos por lavado). Finalmente, los preparados se tiñeron con DAPI (4', 6-Diamidino-2-fenilindol) a una concentración de 2µg/ml en buffer Mc Ilvane (0.1 M de ácido cítrico y 0,2 M de fosfato ácido disódico, pH= 7.4), y se montaron en PBS-glicerol (1:1).

En el recuadro 4 se explica la forma como actúa el colorante DAPI.

k- Inmunofluorescencia sobre preparados de líneas celulares

Para el caso de las líneas celulares MCF-7 (línea de tumor mamario humana) y 4T-1 (línea de tumor mamario de ratón), primero se fijaron las células con paraformaldehído (Sigma) al 1% en PBS 1X por 10 minutos. Luego, los preparados se lavaron 3 veces en PBS 1X frío (5 minutos por lavado). A continuación se sumergieron en una solución permeabilizante (Triton 0,5 % en PBS 1X) durante 10 minutos. Posteriormente, se realizaron 3 lavados en PBS 1X (5 minutos por lavado). Los preparados se incubaron a continuación, con el anticuerpo primario anti BRCA1 (hecho en cabra, Dako) en una dilución 1:200 en una solución de BSA (Sero Albúmina Bovina) al 1% en PBS 1X, durante toda la noche a 4°C. Luego se realizaron 3 lavados en PBS 1X frío (5 minutos por lavado). Se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario (hecho en conejo) conjugado al fluorocromo Alexa-594 (Dako) durante 90 minutos a temperatura ambiente en una dilución 1:400 en una solución de BSA al 1% en PBS 1X. Para el caso de los preparados en los que se estudio M31, los mismos fueron incubados con anticuerpo primario anti M31 desarrollado en rata (Singh et al. 1991) en una dilución 1:200 en una solución de BSA al 1% en PBS 1X durante toda la noche a 4°C para posteriormente incubar durante una hora y media con el anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo Alexa-594 (hecho en conejo) (Dako) a una dilución 1:400 en una solución de BSA al 1% en PBS 1X.

Luego todos los preparados son lavados 3 veces en PBS 1X frío (5 minutos por lavado). Finalmente, los preparados se tiñeron con DAPI (4', 6-Diamidino-2-fenilindol) a una concentración de 2µg/ml en buffer Mc Ilvane (0.1 M de ácido cítrico y 0,2 M de fosfato ácido di-sódico, pH= 7.4), y se montaron en PBS-glicerol (1:1).

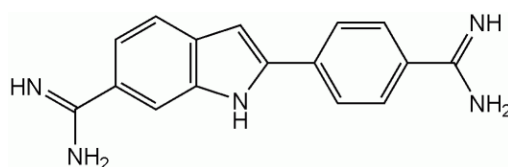
l- Inmunofluorescencia sobre cortes obtenidos por congelación

Los testículos fueron disecados y los tubos seminíferos fueron separados en PBS frío y fijados con paraformaldehído (4% en PBS) durante 90 minutos. Luego, se realizaron lavados en PBS (3 veces 15 minutos cada lavado) e incubación en una solución 20% de sacarosa 4°C durante toda la noche. Posteriormente fueron embebidos en "Tissue Tek" a -20°C y se realizaron cortes de 12 µm en un crióstato. Los cortes fueron incubados con anticuerpo primario anti M31 desarrollado en rata (Singh et al. 1991) en una dilución 1:200 en una solución de BSA al 1% en PBS 1X

durante toda la noche a 4°C para posteriormente incubar durante una hora y media con el anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo Alexa-594 (hecho en conejo) (Dako) a una dilución 1:400 en una solución de BSA al 1% en PBS 1X. Se realizan luego 3 lavados en PBS 1X frío (5 minutos por lavado). Finalmente, los preparados se tiñeron con DAPI (4', 6-Diamidino-2-fenilindol) a una concentración de 2µg/ml en buffer Mc Ilvane (0.1 M de ácido cítrico y 0.2 M de fosfato ácido disódico, pH= 7.4), y se montaron en PBS-glicerol (1:1).

Las observaciones fueron realizadas en un microscopio Nikon FX equipado con cámara fotográfica digital Nikon D70. Se utilizaron las combinaciones de espejos dicroicos recomendados para los fluorocromos unidos al anticuerpo secundario.

Recuadro 4. Tinción con DAPI (<http://www.celldeth.de/apometh/dapi.html>)



4', 6-Diamidino-2-fenilindol (<http://en.wikipedia.org/wiki/DAPI>)

Se sabe que el colorante DAPI forma un complejo con el ADN doble cadena, mostrando una especificidad por los clusters de bases ricos en AT. Cuando el DAPI se une al ADN, su fluorescencia se ve fuertemente incrementada, lo que se interpreta como una interacción energéticamente alta, gracias a la intercalación del colorante entre las bases del ADN. Existe también evidencia que el DAPI se puede unir al surco menor de la hebra de ADN formando puentes de Hidrógeno con los pares de bases AT

4.- Resultados

4.1- Análisis del cariotipo

El análisis de los cromosomas de metafases mitóticas indica un número diploide de 58 sin haberse constatado polimorfismos. El número fundamental es de 78.

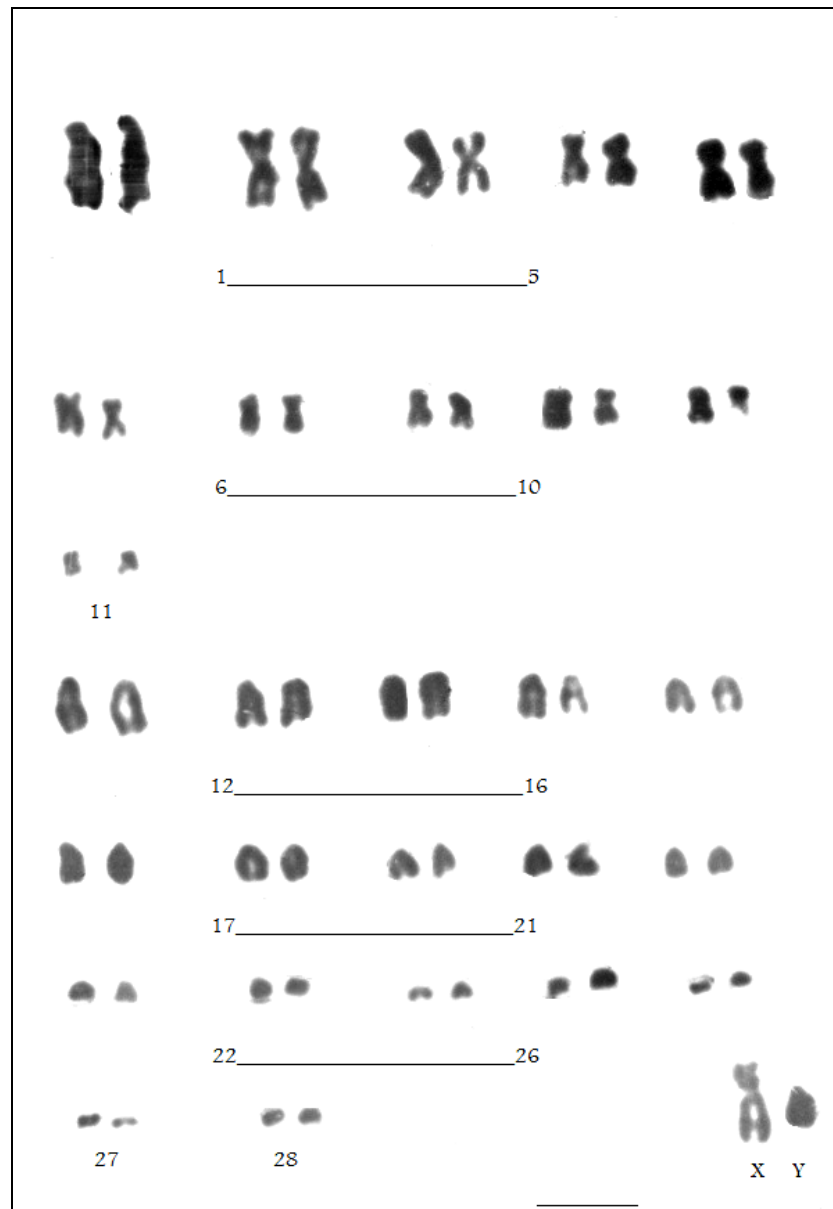


Figura 8- Cariotipo de la población de Carrasco perteneciente al complejo *C. pearsoni*.

4.2- Análisis del bandeo C en cromosomas mitóticos

El bandeo C (Figura 9 y 10) muestra similitud en el contenido de heterocromatina tanto en metafases de células mitóticas de la población de Carrasco como de las muestras de *C. pearsoni*. La heterocromatina se presenta en 2 pares de cromosomas metacéntricos pequeños y en un par de cromosomas telocéntricos, además del cromosoma sexual Y. En el caso de la figura de Canelones cabe destacar que se trata de una hembra, sin embargo, los machos también presentan el cromosoma Y positivo para el bandeo C.

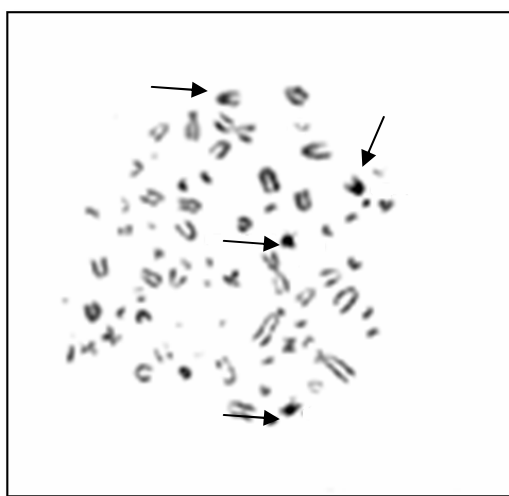


Figura 9- Metáfase proveniente de célula de médula ósea de la población de Carrasco. Las flechas indican los cromosomas positivos para bandeo C.

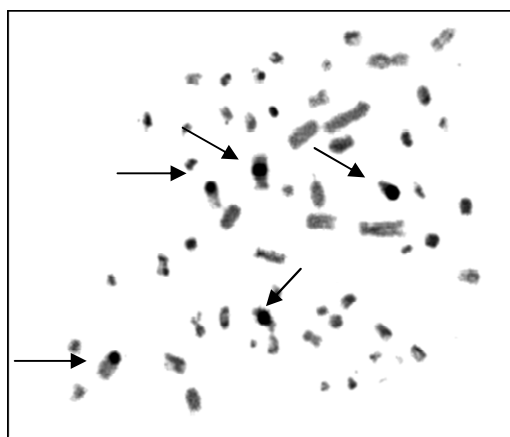


Figura 10- Metáfase proveniente de célula de médula ósea de la *C. pearsoni*. Las flechas indican los cromosomas positivos para bandeo C.

4.3- Análisis del bandeo G en cromosomas mitóticos

El bandeo G (Figura 11, Tablas 1 y 2) revela que hay un gran porcentaje de homología entre los cromosomas de *C. pearsoni* y de la población de Canelones perteneciente al complejo costero. Se observan 4 fisiones o fusiones (ya que no se puede determinar la polaridad de los cambios). Hay 4 cromosomas de *C. pearsoni* que no presentan homología con ningún cromosoma de Canelones (13, 18, 27, 29) y un cromosoma de Canelones que no presenta homología con ningún cromosoma de *C. pearsoni* (4).

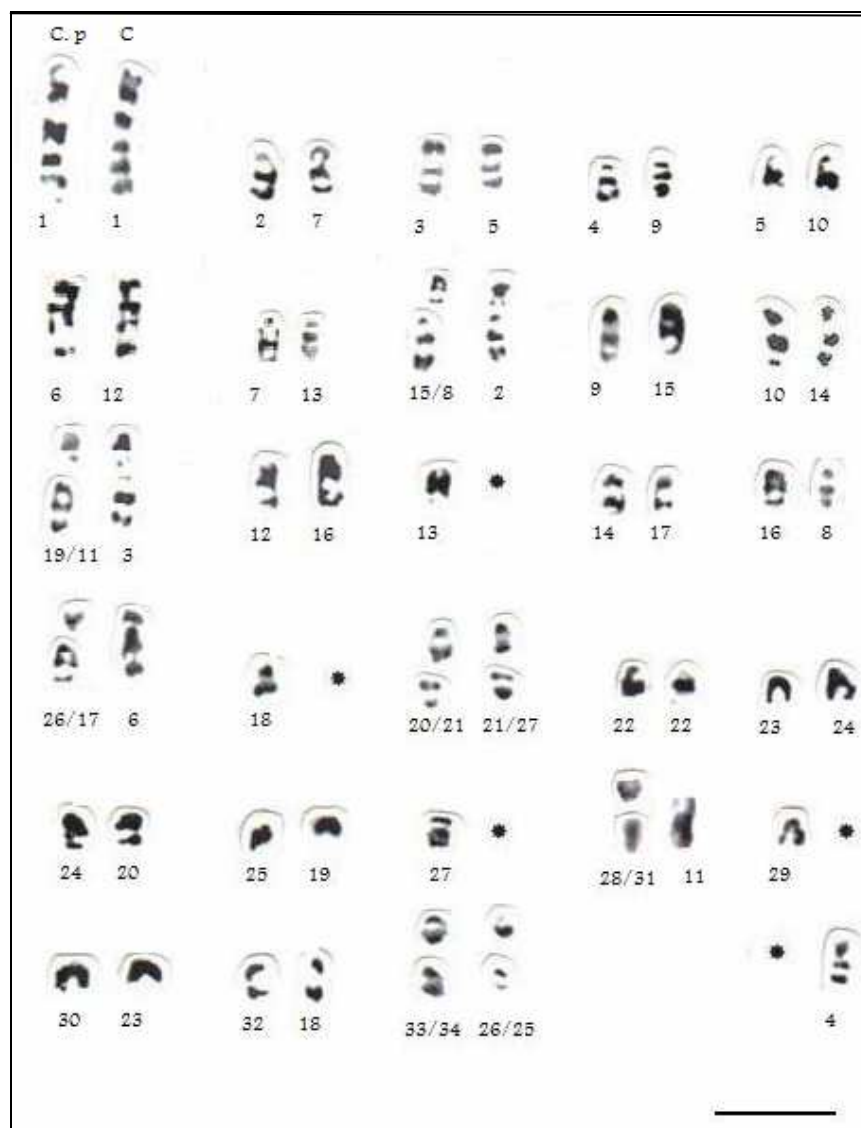


Figura 11- Análisis por bandeo G de cromosomas en metafase. **C.p.** representa a la especie *C. pearsoni* y **C** representa a la población de Canelones.

Homología entre Carrasco (1) y <i>C. pearsoni</i> (2)	
1	2
1	1
3	19/11
2	15/8
26/25	33/34
5	3
6	26/17
10	5
21/27	20/21
9	4
7	2
12	6
22	22
8	16
15	9
14	10
16	12
17	14
13	7
20	24
18	32
23	30
24	23
11	28/31
19	25
Cromosomas únicos	
1	2
4	-
-	13
-	18
-	27
-	29

Tabla 1- Homologías entre cromosomas con bandeo G de la especie *C. pearsoni* y de la población de Canelones. **1** representa a los cromosomas de Canelones y **2** representa a los cromosomas de *C. pearsoni*. Ver Figura 11. Se representan en la parte inferior los cromosomas que no presentan homologías de Canelones (1) y *C. pearsoni* (2). Ver Figura 11.

4.4- Análisis de la meiosis

Se describen los estadios de la profase de la población de Canelones. También se describen las diferencias observadas en el paquiteno de esta población, respecto al paquiteno de la especie *C. rionegrensis* (Figura 7).

Al comienzo de la meiosis los núcleos comienzan a aumentar de tamaño y los cromosomas a condensarse. El primer estadio observado es el zigoteno (Figura 12a y 12b) en el cual el núcleo presenta forma globular y se observan zonas densamente teñidas que resultan de la condensación diferencial de la cromatina. Los cromosomas aparecen como finas hebras aunque no pueden individualizarse completamente.

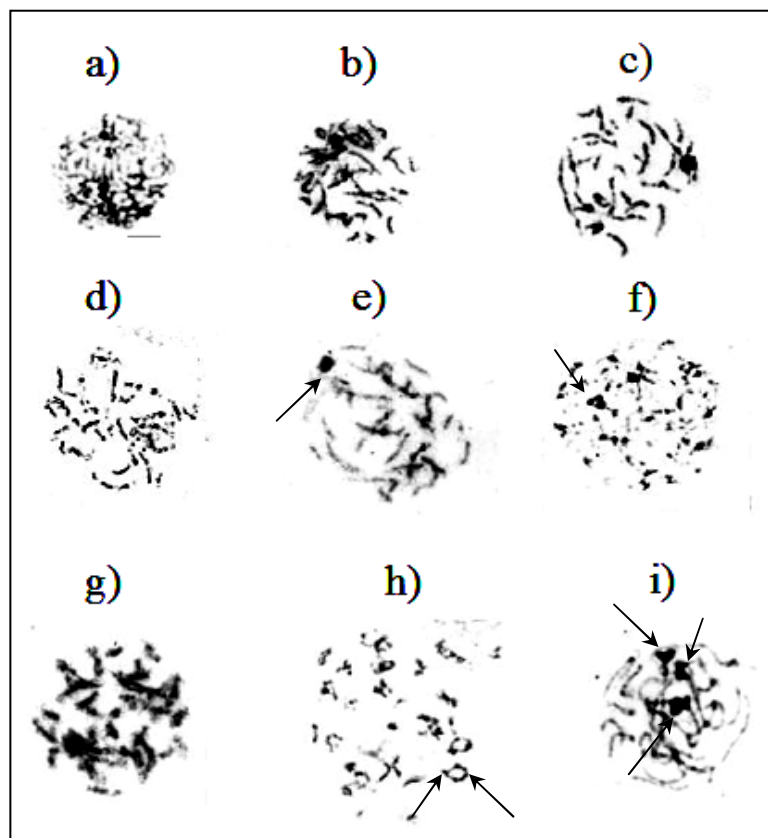


Figura 12- Meiosis de la población de Canelones. Las figuras a) y b) representan el estadio de zigoteno. Las figuras c) y d) representan el estadio de paquiteno. Figura e) Bandeo C, la flecha indica la tinción positiva de un cromocentro característico. Figura f) tinción con nitrato de plata. Figura g), estadio difuso. Figura h), diploteno. Las flechas indican dos quiasmas. Figura i) paquiteno de la población de Río Negro, las flechas indican los 3 cromocentros característicos de esta población.

En esta etapa se inicia el apareamiento de los cromosomas homólogos. En el paquíteno (Figura 12c-d), los bivalentes son fácilmente discernibles, los cromosomas están apareados a lo largo de toda su longitud. Luego del tratamiento con hidróxido de bario, (Figura 12e) el complejo sexual se evidencia con claridad, dado que el cromosoma Y posee heterocromatina en el brazo largo. En este estadio además, se aprecia un cuerpo fuertemente teñido al cual convergen algunos bivalentes, que también puede ser observado luego de la tinción argéntica (Figura 12f). En el caso de *C. rionegrensis* se observan tres de estos cuerpos, en lugar de uno como en el resto de las poblaciones y especies (Figura 12i). Entre los estadios de paquíteno y diploteno ocurre una decondensación de los autosomas, que recibe el nombre de estadio difuso en el cual no es posible diferenciar los bivalentes (Figura 12g). En el diploteno (Figura 12h), los cromosomas experimentan un alto grado de condensación. Los homólogos se separan y permanecen unidos sólo a través de los quiasmas.

4.5- Inmunolocalización de BRCA1 sobre células en mitosis y en meiosis

En la Figura 13 A se observa tinción con DAPI de células provenientes de médula ósea de la población de Carrasco cuya fluorescencia presenta homogeneidad. En la Figura 13 B se muestra la localización de BRCA1 en la misma célula utilizando anticuerpo anti-BRCA1. Las zonas que se marcaron con el anticuerpo aparecen como puntos brillantes. Las marcas muestran un patrón heterogéneo a diferencia de la tinción con DAPI. Las fotografías superiores e inferiores corresponden a células diferentes.

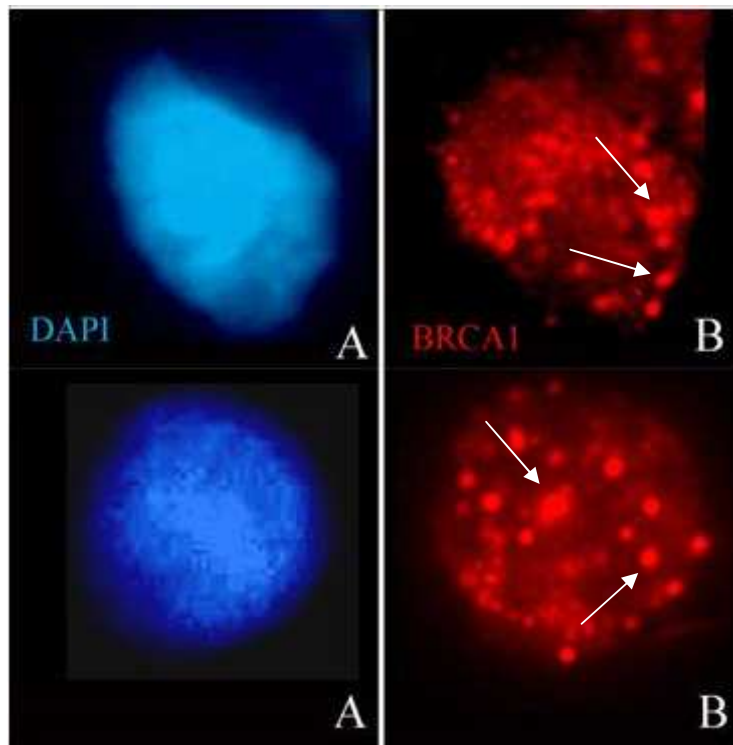


Figura 13- Inmunolocalización de BRCA1 en aplastado de células de la médula ósea de la población de Carrasco. Se muestra para 3 células diferentes la tinción con DAPI (azul) en A, BRCA1 (rojo) en B.

La Figura 14 muestra tinción con DAPI (A) y localización de BRCA1 (B) para células de la profase meiótica en el estadio de zigoteno. El patrón de distribución es diferente al observado para el caso de las células en metafase provenientes de médula ósea. Se aprecia un patrón difuso en la señal emitida por los anticuerpos anti-BRCA1 similar al obtenido a través de la tinción con DAPI, no observándose puntos de alta intensidad de fluorescencia como en las Figura 13B.

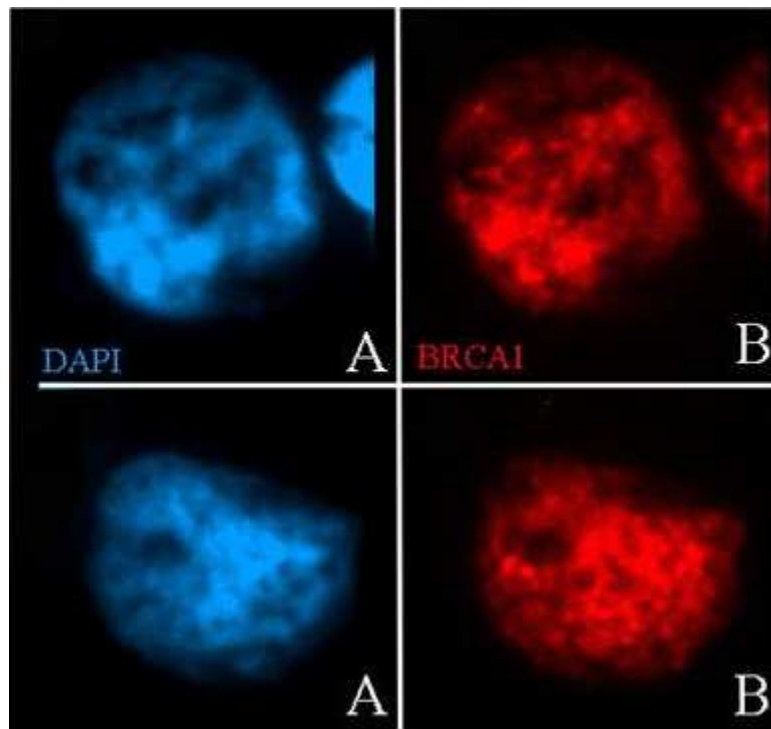


Figura 14- Inmunolocalización de BRCA1 en células de la profase meiótica de la población de Carrasco. En los 2 casos (superior e inferior) se muestra para 2 células diferentes la tinción con DAPI (azul) en A, BRCA1 (rojo) en B.

4.6- Inmunolocalización de M31 sobre cortes de tejido en meiosis

La Figura 15 muestra la inmunolocalización de la proteína M31 en cortes por congelación de testículo de *Ctenomys* de la población de Carrasco. El mismo corte fue teñido con DAPI y con anticuerpo anti-M31. Se observa claramente la presencia de un cromocentro fuertemente teñido con el colorante DAPI (Figura A) y una tinción prácticamente idéntica obtenida con el anticuerpo anti-M31 (Figura B), con zonas de señal difusa y zonas fuertemente teñidas que se corresponderían al único cromocentro heterocromático encontrado en la profase meiótica de Canelones y de todas las poblaciones de la costa analizadas hasta el momento.

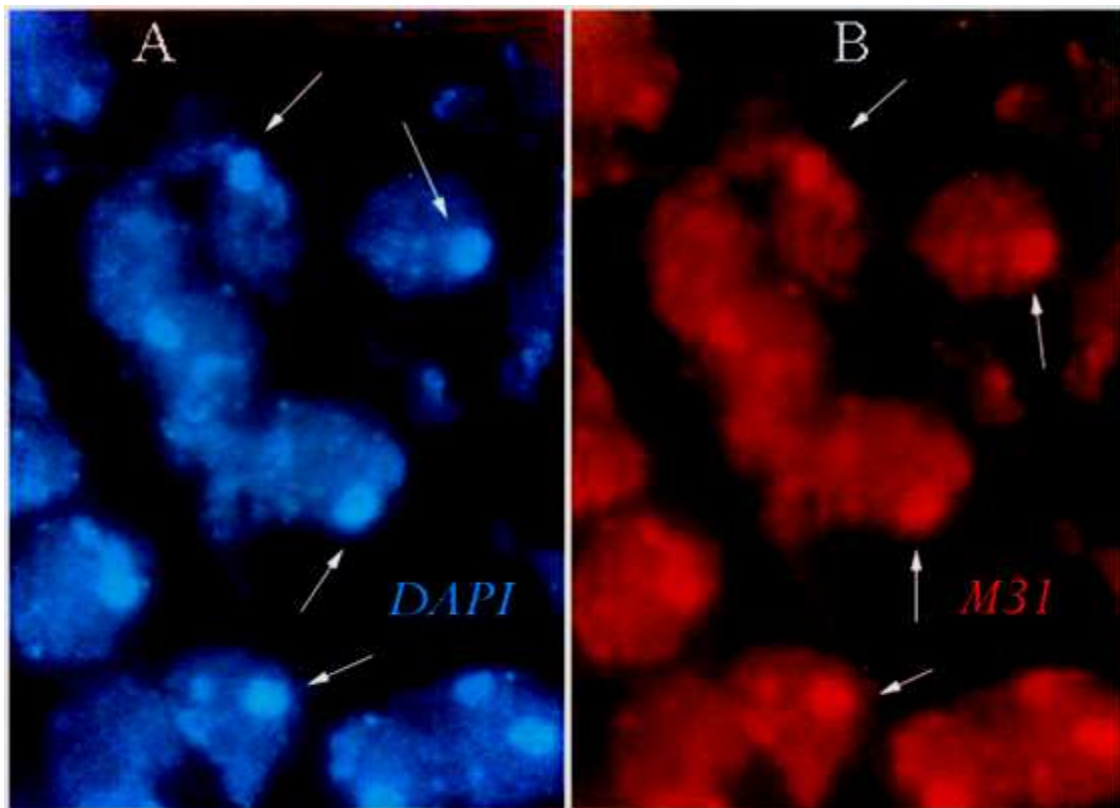


Figura 15- Corte de testículo de la población de Canelones. Células de la profase meióticas. A) tinción con DAPI. B) Inmunolocalización de M31. En la figura 3A se indica con flechas la tinción marcadamente positiva de la heterocromatina concentrada en un único cromocentro. Figura 3B se indica con flechas la localización de M31 cuyo patrón de fluorescencia es prácticamente idéntico al obtenido por DAPI.

4.7- Inmunolocalización de M31 en líneas celulares MCF-7 y 4T1

En la Figura 16 se observa la localización de M31 (B) y la tinción respectiva con DAPI (A) en la línea celular 4T1 de ratón. Para el caso de esta línea celular se pueden observar en ambos casos la presencia de varios cromocentros heterocromáticos. Notar la coincidencia (como en el caso de *Ctenomys*) de la localización a través de la tinción con DAPI y de la señal obtenida por inmunofluorescencia con anticuerpo anti- M31.

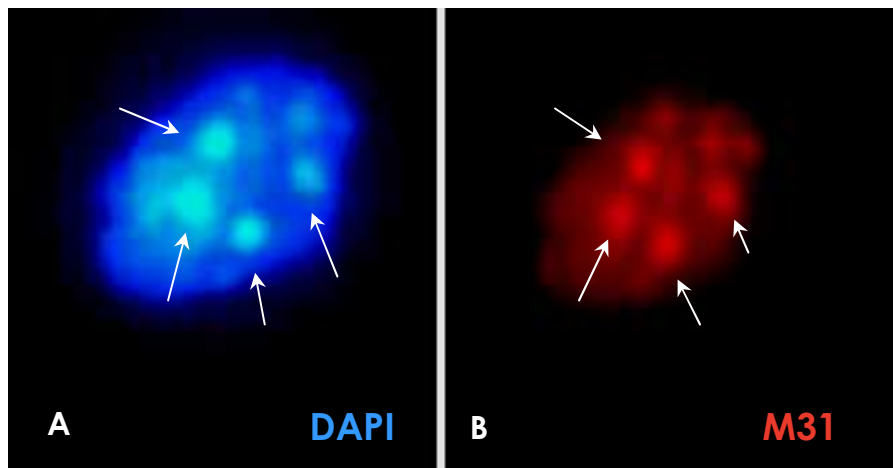


Figura 16- Inmunolocalización de M31 sobre cultivo celular de células de la línea celular de ratón 4T1. Figura A, tinción con DAPI. Las flechas indican las zonas más fuertemente teñidas con el colorante DAPI, que corresponden a secuencias ricas en pares de base AT. Figura B, corresponde a las señales más intensas obtenidas a través del anticuerpo anti-M31.

Para el caso de la línea celular humana MCF-7, la Figura 17B muestra la presencia de 4 cromocentros heterocromáticos intensamente teñidos con el anticuerpo anti-M31. Para el caso de la tinción con DAPI (Figura 17A), se aprecian zonas más brillantes y coincidentes con las observadas con el anticuerpo.

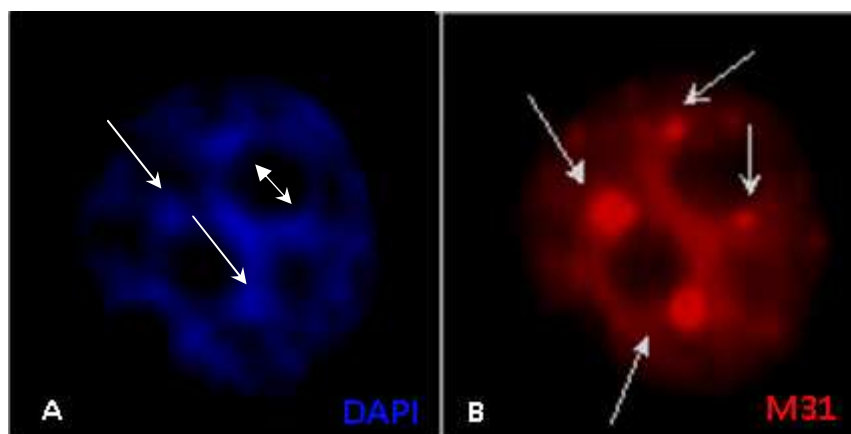


Figura 17- Inmunolocalización de M31 sobre célula de la línea celular humana MCF-7. Figura A, DAPI. Figura B, M31.

5- Discusión

5.1- Análisis citogenético

El análisis del cariotipo de Canelones reveló un número diploide $2n=58$ y un número fundamental $NF=78$ en todas las metafases analizadas. A diferencia de lo reportado previamente por Novello y colaboradores (1988), donde se hallaron cariotipos con $2n=56$ y NF de 77, 78 y 79, no se constataron polimorfismos intrapoblacionales. Sin embargo, presenta una marcada diferencia con las muestras obtenidas de la localidad típica de la especie *C. pearsoni* cuyo $2n=70$ y su $NF=80$ revelan la ocurrencia de reordenamientos cromosómicos, confirmados luego por el bandeo G.

En el bandeo G de las muestras de Carrasco y de *C. pearsoni*, se observa la ocurrencia de fisiones o fusiones (ya que por carecer de datos de ancestralidad para las poblaciones del complejo "*Ctenomys pearsoni*" no se puede determinar la polaridad de los cambios) y de reordenamientos complejos, ya que se hallaron cromosomas en ambas poblaciones que no presentaron homología (denominados cromosomas únicos). Aunque no es posible determinar la polaridad en el sentido de establecer si ocurrieron fisiones o fusiones, es importante destacar que Ortells (1995) mediante el análisis filogenético de los cariotipos con bandas G de 18 poblaciones de *Ctenomys* pertenecientes a 11 especies de Argentina, observó que las fusiones céntricas superaban en frecuencia a las fisiones en un porcentaje de entre 1.6 y 4.6 %. Se ha postulado que en la evolución de los eucariotas, las fusiones cromosómicas han sido más frecuentes que las fisiones (Dobzhansky y cols., 1980). Sin embargo, en un estudio realizado en *Ctenomys* se ha reportado la ocurrencia de una fisión céntrica (Freitas y Lessa, 1984).

Cabe destacar que para esta especie se han reportado inversiones pericéntricas, paracéntricas y delecciones que podrían explicar la presencia de los cromosomas únicos (Villar y cols., 2005). La diferencia en el número de telocéntricos, también puede deberse a la acumulación de distintos tipos de reordenamientos en estos cariotipos, que no pueden ser detectados mediante la técnica de bandas G. En este sentido, Ortells (1995) planteó que si ocurre una inversión pericéntrica en un cromosoma telocéntrico y ésta es seguida de una fisión céntrica, aumenta el número diploide y el número fundamental.

En el bandeo C no se constatan diferencias en la cantidad de heterocromatina constitutiva, ya que en ambos cariotipos se encuentra presente en un par de cromosomas metafásicos pequeños y en un par de cromosomas telocéntricos así como en el cromosoma Y. Este hallazgo contrasta con la hipótesis de varios autores (Rossi y cols., 1990; Wichman y cols., 1994; Slamovits y cols., 2001) quienes plantean que la variación en el número de copias del ADN satélite característico de *Ctenomys*, denominado secuencia SRPC y ampliamente predominante en la heterocromatina constitutiva, se correlaciona con inestabilidad cariotípica. Por el contrario, en este trabajo se observan diferencias a nivel cariotípico y estabilidad en cuanto a la cantidad y localización de heterocromatina constitutiva.

La distribución de la heterocromatina en las poblaciones analizadas corresponde al patrón 2 descrito por Reig y colaboradores (1992) (Figura 2). Como ya fue mencionado, dicho patrón se caracteriza por la presencia de bandeo C en el centrómero de algunos cromosomas. El mismo es característico de otras especies del género como *C. boliviensis*, *C. lewisi* (Bolivia) y *C. sociabilis* (Argentina). Otras poblaciones del complejo *C. pearsoni* como Chihuahua y Barra de Portezuelo comparten el patrón de tipo 2 de distribución de heterocromatina (Villar, 2000). La población de Solís ($2n=70$; $NF=80$) muestra 5 pares de telocéntricos con heterocromatina centromérica, además del brazo largo del cromosoma Y (Novello y cols., 1996b).

C. rionegrensis presenta una distribución de heterocromatina constitutiva que se corresponde con el patrón de tipo 4 descrito por Reig y colaboradores (1992), similar al que presentan las especies del grupo *C. mendocinus* de Argentina (Massarini y cols., 1991). El mismo se caracteriza por la presencia de bandas C en los brazos cortos y el centrómero de cromosomas bibraquiados. La distribución de la heterocromatina constitutiva observada en las poblaciones y especies analizadas, se corresponde con los resultados de estudios moleculares basados en el citocromo b, realizados sobre las tres especies uruguayas de *Ctenomys*. Dichos estudios muestran que *C. pearsoni* y *C. torquatus* forman un grupo cuyo clado hermano es el formado por *C. flamarioni*, *C. mendocinus* y *C. rionegrensis* (DÉlia, 1996; DÉlia y cols., 1999).

Población	Especie	Bandas C (centromérica)	Bandas C (Brazos cortos)
Chihuahua (Maldonado)	Complejo C. <i>pearsoni</i>	1 par M 3 pares T	
Barra de Portezuelo (Maldonado)	Complejo C. <i>pearsoni</i>	3 pares T	
José Ignacio (Maldonado)	Complejo C. <i>pearsoni</i>	3 pares M/SM 1 par T	
Carrasco (Montevideo)	Complejo C. <i>pearsoni</i>	1 par M 1 par T	
Solís (Maldonado)	Complejo C. <i>pearsoni</i>	5 pares T	
Penino (San José)	<i>Ctenomys pearsoni</i>	1 par SM 1 par T	
Villa Serrana (Lavalleja)	<i>Ctenomys torquatus</i>	3 pares M/SM 2 par T	
Río Negro	<i>Ctenomys rionegrensis</i>	2 pares M/SM 3 pares T	5 pares de ST

Tabla 2- Patrones de distribución de heterocromatina en poblaciones y especies de *Ctenomys* del Uruguay.

Como ya fue mencionado, la localización de la heterocromatina constitutiva coincide con la distribución de la secuencia SRPC en las especies de *Ctenomys* analizadas a través de hibridización *in situ* (Rossi y cols., 1990; Rossi y cols., 1993). Para explicar la amplificación de dicha secuencia, se ha planteado el modelo de "círculo rodante" de Walsh (1987). En poblaciones del Uruguay ubicadas en el balneario Solís y en el Departamento de Canelones también se observó que la distribución de la secuencia SRPC coincide con las bandas C y con la tinción con Hoechst 33258 (Novello y cols., 1996a). Para explicar la presencia de la secuencia satélite SRPC en la mayoría de las poblaciones y especies del género y sus patrones de distribución definidos, es necesario considerar algún mecanismo que haya generado homogeneidad de secuencias en el ancestro común y entre cromosomas no homólogos. En el subgénero de roedores *Reithrodontomys*, se ha

planteado la ocurrencia de *evolución concertada* (Dover, 1982), para explicar la distribución y similitud de la secuencia del ADN satélite hallada entre sus especies (Hamilton y cols., 1990). Este concepto, describe procesos a través de los cuales una secuencia es amplificada, homogeneizada a través de todo el genoma y distribuida en cromosomas homólogos y no homólogos. Estos mecanismos incluyen intercambios desiguales (*unequal crossing-over*), conversión génica, transposición de secuencias y mecanismos tipo círculo rodante que actuarían juntos o de forma individual (Nagylaki y Petes, 1981; Maeda y Smithies, 1986). Dichos procesos podrían extrapolarse al género *Ctenomys*, para explicar la presencia de patrones de distribución heterocromática definidos (Reig y cols., 1990) y la presencia de la secuencia SRPC en casi todas sus poblaciones y especies (Reig y cols., 1990; Slamovits y Rossi, 1998). Pesce y colaboradores (1994) proponen una hipótesis alternativa al origen reciente de la secuencia satélite o a los mecanismos de homogeneización de secuencias, como posible explicación para la conservación de la secuencia consenso de SRPC. Dicha hipótesis plantea que, dado que existen sitios de unión a factores nucleares en SRPC, estos podrían actuar como fuerza selectiva promoviendo su conservación a través del género. No obstante, la evolución concertada es la hipótesis con mayor aceptación (Slamovits y Rossi, 1998).

5.2- Análisis de la meiosis

Al analizar la meiosis debemos tener en cuenta que el tamaño y morfología de los núcleos dependen en gran medida de las técnicas utilizadas. No obstante, en forma general, la profase meiótica en *Ctenomys* guarda muchas semejanzas con la de ratón (*Mus musculus*) (Oud y cols., 1979; Oud y Reutlinger, 1981a; Oud y Reutlinger, 1981b) a la que se hará referencia, dado que en *Ctenomys* no ha sido caracterizada la meiosis hasta el momento. En ambos casos al inicio de la misma, (lepto y zigoteno) el núcleo adquiere un aspecto reticular, debido a que algunas zonas cromosómicas se condensan más rápidamente que otras. En el paquiteno temprano, cuando el apareamiento de los cromosomas se completa, estos se contraen causando una disminución en el tamaño del núcleo. Al igual que en el ratón, éste es el primer estadio donde es visible la vesícula sexual, que aparece densamente teñida, dado que el par heteromórfico XY no se encuentra apareado en la mayor parte de su longitud. En las hembras sin embargo, el par XX es activo y no muestra diferenciación con el resto de la cromatina (Mc Kee y Handel, 1993). Más tarde en el paquiteno medio, los cromosomas aparecen asociados. El cuerpo

denso que se evidencia luego del bandeo C y la tinción argéntica, probablemente corresponda al nucléolo. Oud y Reutlinger (1981a) describen para el ratón la existencia de seis sectores positivos para la tinción argéntica que se asocian para formar una estructura única. Dichos autores también observaron tinción positiva asociada a la vesícula sexual. En *Ctenomys*, es posible observar un pequeño cromocentro en la periferia del núcleo en paquiteno mediante tinción con nitrato de plata, que posiblemente se corresponda con la vesícula sexual y que podría representar el producto de la actividad génica de los cromosomas sexuales en este estadio (Oud y Reutlinger, 1981a). En *C. rionegrensis* se observan tres cromocentros en lugar de uno como en la población de Carrasco, que a diferencia de lo que ocurre en el ratón no confluyen en una estructura única. Los mismos pueden ser consecuencia de la asociación de regiones heterocromáticas, ya que dichas regiones, son más abundantes en *C. rionegrensis* que en esta población y en el resto de las especies uruguayas. Cabe destacar además, que proteínas distintas a aquellas asociadas con las regiones organizadoras nucleolares poseen la habilidad de reducir plata y por tanto ser positivas a la tinción argéntica (Oud y Reutlinger, 1981a), lo que podría explicar tal observación.

Al igual que en el núcleo interfásico, existe una arquitectura nuclear en el meiocito. Ella está determinada entre otros factores, por la propia organización de los bivalentes y por su inserción en la envoltura nuclear (Fernández-Donoso y Berrios, 1985). Además constituye un sistema dinámico cuya estabilidad refleja un equilibrio basado en su integración estructural y funcional. Los reordenamientos cromosómicos que puedan ocurrir, se traducirán en nuevas arquitecturas nucleares o equilibrios alternativos, cuya estabilidad e inestabilidad dependerán de propiedades endógenas del sistema (Fernández-Donoso y Berrios, 1985). Una de esas propiedades se relaciona con la cantidad y localización de la heterocromatina. Al igual que lo observado en *Ctenomys*, en el núcleo meiótico de varias especies, la heterocromatina tiende a asociarse y a constituir cromocentros, probablemente debido a su alto contenido de ADN repetido que favorece su condensación y asociatividad características (Ellison y Bar, 1972). Es muy importante ubicar la distribución de dicho ADN en los dominios cromosómicos y nucleares, ya que independientemente de cuál sea su secuencia, la función que desempeñe puede depender directamente de su posición específica (Fernández-Donoso y Berrios, 1985). Shafer y colaboradores (1993) han planteado que cuando genes que normalmente se expresan se trasladan, vía un elemento transponible, a una zona próxima a donde se ubica la heterocromatina, dichos genes se inactivan. Por otra

parte, ha sido observado desde insectos hasta humanos, que la adición de heterocromatina en los cromosomas provoca una redistribución de los quiasmas, generando una disminución en la frecuencia de recombinación (Qumsiyeh, 1994). En el caso de *C. rionegrensis*, para corroborar cuáles de los cromocentros observados corresponden a heterocromatina, (no asociada al nucleolo, ni al complejo sexual) y saber con exactitud el modo en cómo se distribuye en el núcleo, deberían realizarse estudios de hibridización *in situ* con sondas de la secuencia de ADN altamente repetido SRPC. Además, estudios de hibridización *in situ* utilizando sondas de ADN ribosomal, permitirían ubicar las regiones organizadoras nucleolares con mayor precisión dentro del núcleo.

Cabe agregar que investigaciones realizadas por Hinuma (1981), demostraron que el ADN que está en contacto directo con las proteínas de la envoltura nuclear, corresponde principalmente a ADN satélite o a ADN de secuencias moderadamente repetidas. Esto sugiere que el mismo podría constituir cierto tipo de anclaje de la fibra de cromatina a la envoltura nuclear, y por ende, participar en forma importante en la fijación de la posición de los dominios cromosómicos en el núcleo. Estos dominios pueden constituir zonas a través de las cuales se propagan determinados tipos de ADN, en *Ctenomys* por ejemplo, podría ser la secuencia SRPC. También podrían desarrollarse otros fenómenos moleculares como inserciones, transposiciones o conversión génica, que contribuyen a promover la evolución concertada de algunas secuencias (Ohno y cols., 1957; Maeda y Smithies 1986). Esta proposición aparece fuertemente respaldada por el hecho de que el ADN altamente repetido o ADN satélite, distinto en diferentes especies, se distribuye predominantemente en los dominios cromosómicos que aparecen con frecuencia comprometidos en asociaciones (Fernández-Donoso y Berrios, 1985).

En cuanto al resto de los estadios cabe destacar que también en el ratón, la separación parcial de los autosomas y la rápida desespiralización culmina en el estadio denominado difuso, donde el núcleo aparece como una red de finas hebras, donde sólo se distinguen con claridad zonas heterocromáticas como pequeños puntos. Oud y Reutlinger (1981a) plantean que el estado difuso es un corto período del diploteno y lo dividen en tres fases: diploteno pre-difuso, diploteno difuso y diploteno post-difuso. Luego de este período la contracción cromosómica se inicia nuevamente, completándose en la diacinesis. En *Ctenomys* sin embargo, estas etapas no son discernibles y además, el estadio difuso parece tener mayor

duración dada la gran cantidad de veces en las que se observa en las preparaciones meióticas. El diploteno, al igual que lo descrito por Fletcher (1979), está caracterizado por la presencia de bivalentes con dos quiasmas. En los ejemplares estudiados de *Ctenomys* no fue posible observar la fase de diacinesis.

5.3- Inmunocitoquímica

El patrón obtenido para BRCA1 en células somáticas coincide con lo observado en trabajos previos como el de Kuus-Reichel y colaboradores (1997) donde la proteína BRCA1 se localiza en sitios donde se produjeron lesiones inducidas por radiaciones ionizantes o drogas generadoras de rupturas doble hebra, generando un patrón de puntos característico de ese tipo de lesiones muy similar al obtenido en este trabajo (Figura 13). Cabe destacar que se realizaron también en este trabajo estudios de marcaje con anticuerpo anti-BRCA1 con la misma línea celular utilizada por este autor (como también la línea 4T-1) pero sin inducir daño de ningún tipo. Luego de realizado el protocolo, no se encontraron resultados que indiquen la presencia de la proteína, por lo que confirma el hecho de que BRCA1 se localiza y distribuye con el patrón que se muestra en la figura 6 solo si hay lesiones presentes en la cromatina. Aunque en el caso de la población de Carrasco no se indujo daño, investigaciones actuales revelan niveles de daño del ADN para la población de Carrasco, similares a los obtenidos en estudios realizados por Silva y colaboradores (2000) para poblaciones de *Ctenomys* sometidas a la acción de emisiones vehiculares. Cabe destacar que la población de Carrasco está sometida a la contaminación por derivados de hidrocarburos ya que se encuentra sobre una vía sumamente transitada (Figura 7a). Como se mencionó en la introducción BRCA1 es reclutada en sitios donde ocurrió daño genético, para formar complejos proteicos que reparan las lesiones (Kuus-Reichel y col., 1997; Steven y Foulkes, 2004). BRCA1 está muy ligada al proceso de reparación por recombinación homóloga a través de su interacción con RAD51. Como se mencionó en la introducción, esta proteína utiliza la hebra intacta de ADN como molde para la reparación de la hebra dañada (Hohenstein y Giles, 2003).

Estudios basados en técnicas inmunológicas, utilizando anticuerpos anti-BRCA1 realizados sobre espermatoцитos de mamíferos en profase de la meiosis I, muestran que esta proteína se encuentra asociada a segmentos cromosómicos que aún no están en sinapsis y/o en zonas donde la sinapsis está próxima a ocurrir.

Los patrones de inmunofluorescencia detectados, coinciden con altos niveles de expresión de BRCA1 observados en profase meiótica de espermatoцитos de mamíferos (Tavtigian y cols. 2007). Esto es coincidente con los resultados hallados en este estudio ya que la distribución de BRCA1 se limita al zigoteno y no se observa en paquiteno, etapa en la cual la sinapsis está ocurriendo.

La distribución de la proteína M31 coincide con la presencia de heterocromatina en células provenientes de testículo de *Ctenomys*, observándose claramente los cromocentros heterocromáticos tanto para la tinción con DAPI como para la señal emitida por el anticuerpo anti-M31. Más allá de la compactación que los espermatoцитos presenten, este estudio confirma las afirmaciones de Hoyer-Fender y colaboradores (2000), quienes plantean que uno de los principales componentes de la heterocromatina organizada en cromocentros es la proteína 1 (homóloga a la proteína M31 de roedores), responsable del proceso que se conoce como silenciamiento génico. Estos autores encontraron dicha proteína localizada en regiones heterocromáticas organizadas en cromocentros durante el estadio de paquiteno de la meiosis, tal como se confirmó en los análisis realizados en este trabajo. Adicionalmente, los patrones de distribución de M31 observados en una línea celular humana (MCF-7) y otra de ratón (4T1), confirman la teoría de que la proteína 1 (o M31 en este caso), está estrechamente vinculada con la presencia de sitios donde se concentra la heterocromatina denominados cromocentros, ya que también su distribución es coincidente en ambos casos.

6- Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se logró caracterizar a la población de Carrasco desde el punto de vista citogenético. Esta población posee un cariotipo de $2n=58$, $NF=78$, sin encontrarse ningún polimorfismo intrapoblacional a nivel cariotípico.

El análisis de bandeo G muestra que existen diferencia a nivel cariotípico con el cariotipo modal de la especie *C. pearsoni* cuyo $2n$ es igual a 70 y su NF es igual a 80. Se constata que en algún momento de la evolución de esta especie, hubieron reordenamientos cromosómicos del tipo fusión/fisión para el caso de los cromosomas 15/8 y 2; 19/11 y 3; 26/17 y 6; 28/31 y 11 en la especie *C. pearsoni* y la

población de Carrasco respectivamente. También se identifica la presencia de un cromosoma único en esta población, y no se encuentran cromosomas que sean similares a los cromosomas únicos del *C. pearsoni*.

Con lo que respecta a la heterocromatina se puede observar que no existen diferencias a nivel de bandeo C entre la población de Carrasco y la especie *C. pearsoni*, por lo que se plantean 2 hipótesis. La primera sería que los cambios y diferencias que han llevado a la diferenciación cariotípica entre ambas poblaciones del complejo, podría estar desligada de los procesos de amplificación de la heterocromatina y los mecanismos que la generan. La segunda es que dicha diferenciación cariotípica sea reciente, de modo que aún no se evidencia la amplificación o los cambios en la secuencia SRPC a través del bandeo C, como en el caso de las diferencia existentes con otras especies de *Ctenomys* como *C. rionegrensis*. Para testar estas hipótesis, se deberán realizar estudios de hibridación in-situ con la secuencia SRPC.

Se lograron observar y describir los estadíos de zigoteno paquitenos y leptoteno de la profase meiótica de la población de Carrasco, y hacer una comparación de los mismos con la profase meiótica de ratón. Se lograron evidenciar cromocentros que pueden corresponderse tanto a regiones organizadoras nucleolares como a zonas de heterocromatina constitutiva donde se localiza la secuencia SRPC.

De acuerdo a los resultados obtenidos en células somáticas, a la bibliografía existente, y a los datos relevados sobre contaminación, se puede concluir que la proteína BRCA1 estaría cumpliendo un rol en la reparación de daño en el ADN debido a la acción de agentes antropogénicos causantes de daño.

En el caso de la meiosis, en particular el estadío de zigoteno, se logró evidenciar la presencia de altos niveles BRCA1, hecho que coincide con los sucesos de sinapsis y recombinación activa de los cromosomas homólogos previo a la entrada de la célula en paquitenos.

M31 se localiza específicamente en la heterocromatina, demostrado tanto para las líneas celulares como en el caso de *Ctenomys*. Esto indica un importante papel de esta proteína tanto en el mantenimiento de estructuras heterocromáticas como en el silenciamiento génico, de acuerdo con las funciones que cumple M31 descritas en la bibliografía.

7- Anexo 1

Primeros eventos en la respuesta a una rotura doble hebra (RDH)

Para la reparación de roturas del ADN, las células eucariotas tienen dos mecanismos principales posibles: la unión de extremos no homólogos (NHEJ- nonhomologous end-joining) proceso que está propenso a la ocurrencia de errores y la recombinación homóloga (RH), mecanismo que también es responsable de la recombinación meiótica.

La formación de estas lesiones implica que se modifique la cromatina. Como consecuencia de estas alteraciones en la misma, se activa una proteína quinasa denominada ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), miembro de una superfamilia de proteínas quinasas denominada PI3-KK (Fosfatidil inositol 3 quinasa) (Bakkenist y cols., 2003). Esta proteína que esta presente en forma de dímero soluble en el nucleoplasma, se disocia a su forma monomérica activa, y fosforila a una gran variedad de proteínas blanco (Van den Bosch y cols., 2003). Uno de los complejos proteicos que actúa inicialmente con ATM (y que también es blanco de la quinasa) en la detección de estas lesiones es el complejo MRN, el cual está compuesto por tres proteínas, Mre11, Rad50 y Nbs1 (Stracker y cols. 2004) En la figura A1 se muestra un esquema del complejo y su forma de acción.

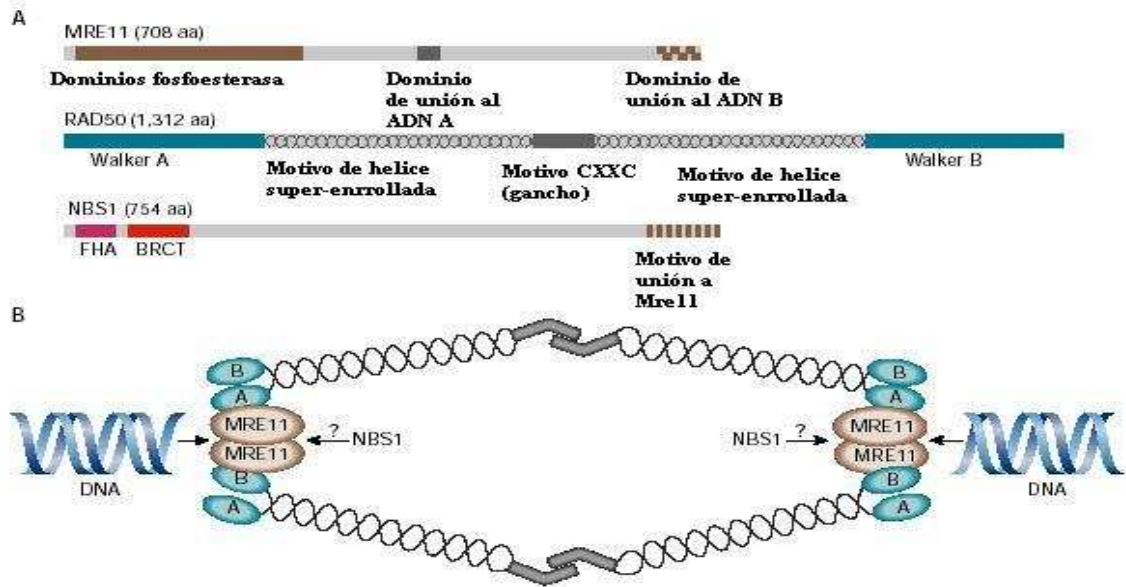


Figura A1- Complejo Mre11/Rad50/Nbs1 o MRN. (A). Proteínas del complejo MRN. Se indican para cada caso los motivos estructurales conocidos. (B). Estructura del complejo MRN. El complejo MRN se une a los extremos del ADN gracias a los motivos de unión presentes en Mre11. Las regiones en hélice súper-enrollada de Rad50 se extienden hacia fuera interactuando a través del motivo en forma de gancho con otro complejo MRN del otro lado de la lesión. El dominio BRCT de Nbs1 es responsable de la unión a BRCA1 (van den Bosch y cols., 2003)

La unión del complejo a los extremos del ADN en el sitio de la lesión es esencial para reclutar a la quinasa ATM a la cromatina. Desde allí ATM puede acceder a otros blancos de fosforilación. Uno de los primeros blancos de acción es la variante de la histona H2A, denominada histona H2AX, colocándose con el complejo MRN (figura A2) (West y cols., 1980; Furuta y col., 2003).

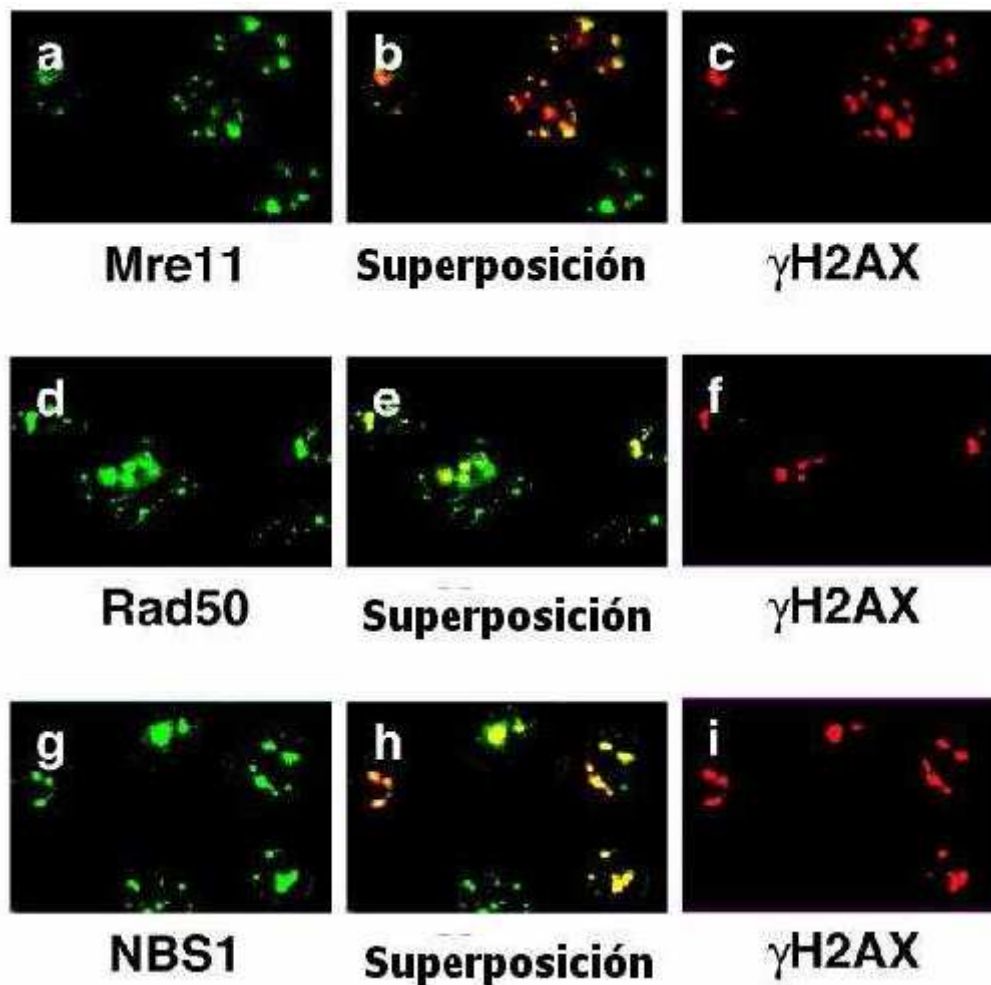


Figura A2- Co-localización de las proteínas Mre11 (verde, panel superior), Rad50 (verde, panel intermedio) y NBS1 (verde, panel inferior) con la forma fosforilada de la histona H2AX (γ -H2AX, rojo) en fibroblastos embrionarios de ratón, luego del tratamiento con la droga CPT (camptothecin), para formar RDHs. En la parte intermedia de cada panel se muestra la superposición de las imágenes, donde se puede apreciar la co-localización de las proteínas en color amarillo. (Furuta y cols., 2003).

Esta fosforilación no solo se da en el lugar físico de la lesión, sino que también hacia ambos lados en un orden de megabases de longitud. La función de esta fosforilación, es crear una estructura proteica tipo "scaffold" para el reclutamiento de mas factores que intervienen en la reparación. A modo descriptivo solamente, la proteína MDC1 (mediator checkpoint protein 1) es la primera en ser reclutada, y unirse a la forma fosforilada de la histona. Luego son reclutadas BRCA1, y otra proteína denominada 53BP1 (p53 binding protein 1). En la figura A3, se muestra un esquema de la respuesta inicial a la formación de una RDH. La función de BRCA1

junto a las otras proteínas del complejo multiproteico formado es la de reclutar proteínas como la recombinasa RAD51, y otras quinasas que intervienen en la detención del ciclo celular, para la correcta reparación de la lesión (van den Bosch y cols., 2003).

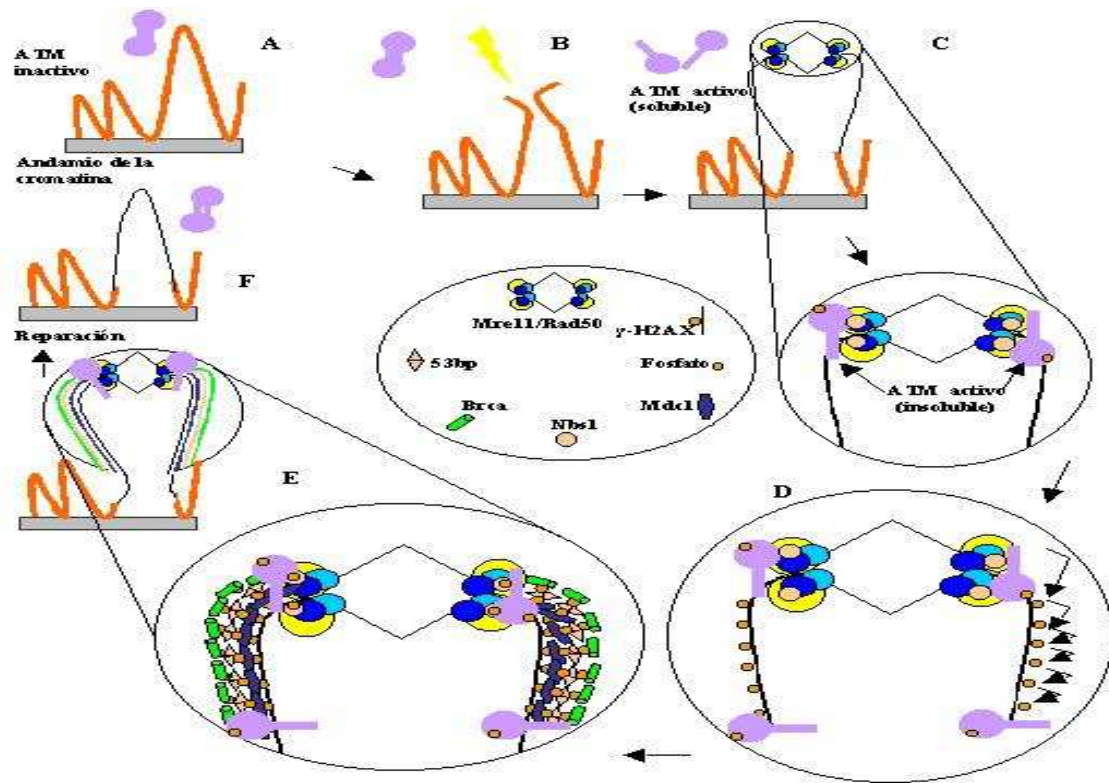


Figura A3- Modelo de respuesta a una RDH. A) Sección sana del cromosoma que muestra tres bucles de cromatina y un dímero de ATM inactivo. (B, C) Inducción de una RDH, modificación de la cromatina, activación de ATM y reclutamiento del complejo MRN. Una vez que este está situado, ATM se une a la cromatina. La línea negra fina indica la cromatina modificada. (D, E) Una ola de fosforilación de la histona H2AX es seguida del reclutamiento de los mediadores MDC1, 53BP1 y BRCA1 que son fosforilados por ATM. La arquitectura molecular de este foco de proteínas es desconocida. (F) Luego de la reparación se desensamblan las proteínas, y se remodela la cromatina. Este modelo sugiere que hay un ATM unido directamente a la lesión y otro integral del foco creciente de proteínas. (Figura modificada de Van den Bosch y cols., 2003).

8- Anexo 2.

Recombinación Homóloga

La recombinación homóloga es uno de los dos principales mecanismos de reparación de las roturas doble hebra (RDH) en el ADN. Este mecanismo no solo es esencial para la reparación de las RDHs, si no que también es necesario para restaurar las horquillas de replicación que se encuentran detenidas a causa de bases alteradas o "nicks en una de las hebras del ADN" durante la replicación del mismo, y además ofrece a las células de un mecanismo para mantener el largo de los telómeros en células que carecen de telomerasa (Sung y cols., 2003). En la meiosis, este mecanismo es de vital importancia, ya que es utilizado por las células para la generación de diversidad. La diferencia entre la recombinación homóloga como vía de reparación y la misma como vía para la generación de diversidad celular recae en como se forman las RDHs en ambos procesos. En el caso de la reparación por recombinación homóloga, las RDHs se forman principalmente por acción de las radiaciones ionizantes como los rayos X, o ciertas drogas como la bleomicina que producen radicales libres que atacan directamente al ADN (Van de Bosch y cols., 2003).

En el caso de la meiosis, este es un proceso finamente controlado, que no se dispara en cualquier momento ni de cualquier forma. El inicio del proceso de recombinación homóloga comienza con la aparición de RDHs iniciadas por una proteína perteneciente a la familia de las Topoisomerasas de tipo II, denominada Spo11 al inicio de la profase meiótica I (Celerin y cols. 2000). En la figura A4 se muestra un modelo de formación de las RDHs por Spo11.

En los organismos eucariotas, la vía de la Recombinación homóloga utiliza las enzimas codificadas por un grupo de genes definido como "grupo de epístasis de RAD52", que fue definido inicialmente en *S. cerevisiae* e incluye los genes, RAD50, RAD51, RAD52, RAD54, RAD55, RAD57, RAD59, MRE11 y XRS2 (Pierce y cols. 2000). Una vez formada la lesión el primer paso es la resección extensa de los extremos 5' del ADN, llevada a cabo por la proteína Mre11 (ver Anexo 1) con su actividad 5' → 3' exonucleasa, y otras nucleasas aún no descritas (Lidney cols. 2004, Lavin y cols. 2004). Como consecuencia se forma un intermediario de ADN simple cadena, el cuál es recubierto por una proteína denominada RP-A la cuál se une

rápidamente en forma inespecífica para estabilizarlo al minimizar la formación de estructuras secundarias (Wold y cols. 1997).

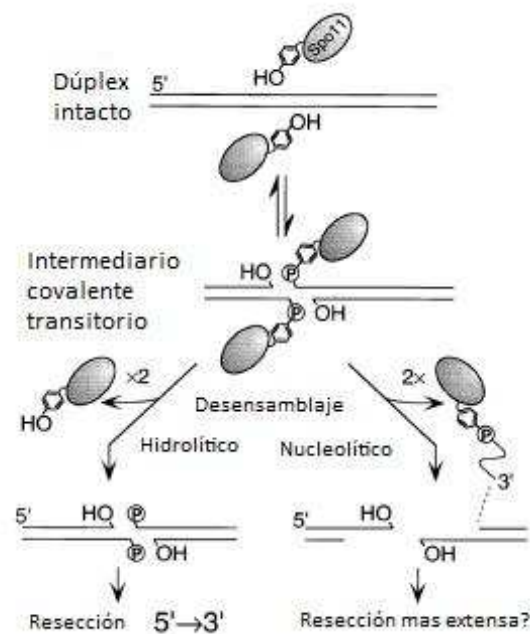


Figura A4- Modelo de acción de la proteína Spo11. Un residuo tirosina del sitio activo de esta enzima, forma un intermediario covalente con el ADN en cada una de las hebras. El mismo se desensambla por una reacción nucleolítica o hidrolítica (Keeney cols. 1997)

El siguiente paso que utiliza la célula consiste en utilizar este ADN simple cadena derivado del procesamiento de la lesión, para realizar un proceso denominado invasión de cadena (Sung y cols., 2003). El producto de esta invasión, es la formación de una estructura denominada D-loop, y el proceso enzimático global es conocido como "apareamiento homólogo del ADN e intercambio de cadena" (Sung y col., 2003). En *E. coli*, la proteína RecA juega un papel fundamental en la recombinación, y el ortólogo de RecA en levaduras y mamíferos es la recombinasa RAD51 (Masahiro y cols. 2005). La proteína RAD51 de mamíferos tiene un dominio central con dos motivos de unión al ADN que también están presentes en las proteínas de levaduras y bacterias (Masahiro y cols. 2005). Como RecA, RAD51 forma un filamento extendido en hélice dextrógiro sobre el ADNsc, conocido como filamento presináptico (Sung y cols., 2003, Masahiro y cols. 2005). Además el complejo formado también posee un motivo de unión al ADN doble cadena, en el cuál residirá el dúplex homólogo (Sung y cols., 2003). RAD51 tiene

una cinética de nucleación bastante lenta en el ADN simple cadena por lo que necesita de otras proteínas que lo ayuden a unirse y a competir en forma eficiente por los sitios ocupados por RP-A (Sung y cols., 2003, Xu y cols., 2001). Aquí es donde intervienen los intermediarios de la recombinación. Un ejemplo de ellos es la proteína RAD52. La unión de del dímero RAD51-RAD52 al ADN simple cadena provee de sitios de nucleación para la unión de RAD51 libre al ADN (Sung y cols., 2003). RAD52 reconoce también a la proteína RP-A unida al ADN simple cadena, propiedad que ayuda al complejo RAD51-RAD52 a ganar acceso en la cromatina (Sung y cols., 2003). Además de RAD52, RAD51 tiene la capacidad de formar dímeros con otras proteínas que cumplen funciones similares a RAD52, para formar el filamento presináptico.

El paso siguiente en el proceso de Recombinación, es la incorporación del dúplex homólogo al sitio activo de RAD51, para la búsqueda de homología. Este proceso es asistido por otra proteína que tiene la capacidad de asociarse con RAD51 denominada RAD54. Esta enzima tiene la capacidad de hidrolizar ATP en presencia de RAD51, para promover la translocación del dúplex de ADN, generando alteraciones topológicas en el ADN que provocan la apertura de las hebras para la búsqueda de homología (Sung y cols., 2003). Como consecuencia de este proceso, se aparean las hebras homólogas.

A continuación se reclutan las ADN polimerasas a cada hebra para sintetizar el ADN que fue degradado en los primeros eventos de la recombinación, y se forma el llamado "intermediario de Holliday" (Masahiro y cols. 2005). La resolución de estos intermediarios es asistida por proteínas como RAD51B, C y D, y una ADN helicasa muy importante denominada BLM (Masahiro y cols. 2005). En la figura A5 se describen resumidamente los pasos involucrados en la vía.

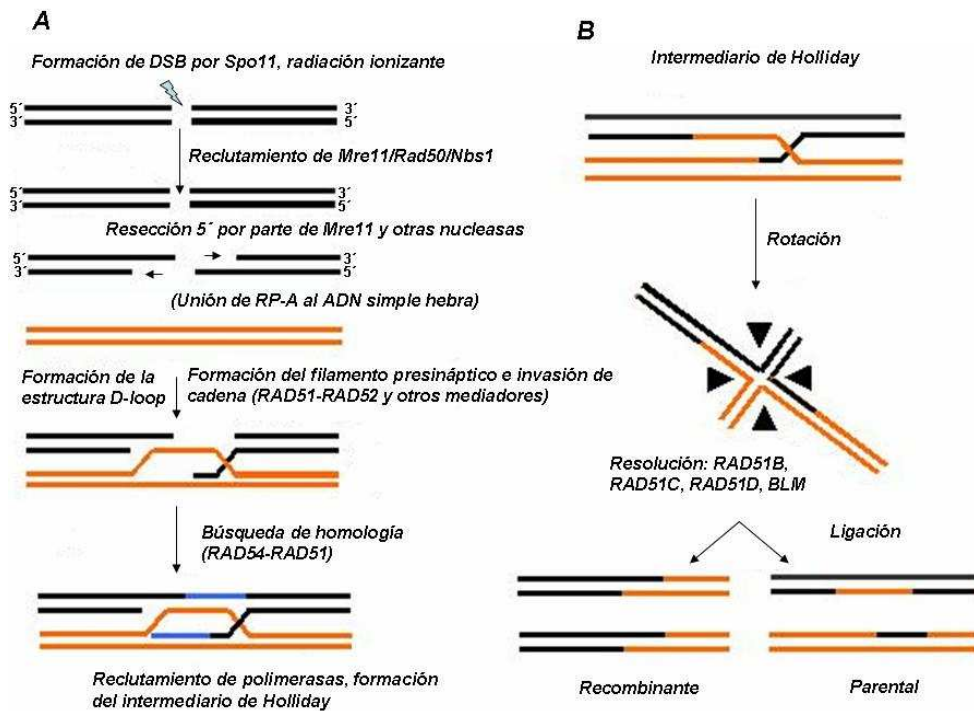


Figura A5- Mecanismo molecular de reparación de las RDHs por recombinación homóloga. Una vez provocada la RDH, los extremos del ADN roto sufren resección 5' de los extremos por nucleasas como Mre11. Luego RAD51 asistida por mediadores se une al ADN simple cadena, y con su otro sitio activo, y asistido por RAD54, se une al ADN doble cadena para realizar la búsqueda de homología. Luego, las ADN polimerasas sintetizan la el ADN perdido copiando de la información del dúplex homólogo (azul), y se forman los llamados intermediarios de holliday (solo se muestra uno en la figura). Este intermediario se resuelve luego de la producción de dos cortes en las hebras seguido de ligación (flechas verticales) dejando dos moléculas de ADN recombinante (izquierda). Cortes en la misma cadena (flechas horizontales) dejan dos moléculas de ADN parentales (derecha).

9- Agradecimientos

Quisiera agradecer especialmente a Silvia Villar, a mi tutor Álvaro Novello, a Mónica Marín y a Prim B. Singh por proporcionarnos el anticuerpo anti-M31.

10- Bibliografía

Bakkenist, C.J. and Kastan, M.B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421: 499–506, 2003.

Bradley RD, Wichman HA. Rapidly evolving repetitive DNAs in a conservative genome: a test of factors that affect chromosomal evolution. *Chromosome Res.*;2(5):354-60, 1994.

Burkholder, G.D. The ultrastructure of G and C-banded chromosomes. *Exp. Cell Research*. 90:269-278, 1975.

Burkholder, G.D. y Duczek, L.L. The effect of chromosome banding techniques on the proteins of isolated chromosomes. *Chromosoma*. 87:425-435. 1982.

Burkholder, G.D. y Weaver, M.G. DNA-protein interactions and chromosome banding. *Exp. Cell Research*. 110:251-262, 1977.

Charlesworth B, Langley CH, Stephan W. The evolution of restricted recombination and the accumulation of repeated DNA sequences. *Genetics*. 112(4):947-62, 1986.

Comings, D. E.; Avelino, E.; Okada, T.A. y Wyandt, H.E. The mechanism of C and G-banding of chromosomes. *Exp. Cell Research*. 77:469-493, 1973.

Comings, D.E. y Avelino, E. Mechanism of chromosomes banding. Evidence that histones are not involved. *Exp. Cell Research*. 86:202-206, 1974.

Comings, D.E.; Harris, D.C.; Okada, T.A. y Holmquist, G. Nuclear proteins. Deficiency of non-histone proteins in condensed chromatin of *Drosophila virilis* and mouse. *Exp. Cell Research*. 105:349-365, 1977.

D'Elia, G. Posición filogenética y dinámica poblacional del roedor subterráneo *Ctenomys rionegrensis*. Tesis de Maestría. PE.DE.CI.BA. Universidad de la República, Uruguay, 1996.

D'Elia, G; Lessa, E.P. y Cook, J.A. Molecular phylogeny of tuco-tucos, genus *Ctenomys* (Rodentia: Octodontidae): Evaluation of the *mendocinus* species group and the evolution of asymmetric sperm. *Journal of Mammalian Evolution*. 6:19-38, 1999.

Dobzhansky, J.; Ayala, F; Stebbins, G.L. y Valentine, J.W. Evolución. Ed. Omega. Barcelona, 1980.

Dover, G., S. Brown, E. Coen, J. Dallas, T. Strachan and M. Trick, The dynamics of genome evolution and species differentiation, pp. 343-372 in *Genome Evolution* edited by G. Dover & R.B. Flavell. Academic Press, 1982.

Ellison, J.R. y Barr, H.J. Quinacrine fluorescence of specific chromosome regions. Late replication and high A:T content in *Samoaia leonensis*. *Chromosoma*. 36:375-390, 1972.

Fernández-Donoso, R. y Berrios, S. La arquitectura nuclear. Pp. 64-121 in *El núcleo, los cromosomas y la evolución* (Fernández-Donoso, R., ed.). UNESCO, Chile, 1985.

Fletcher, J.M. Light microscope analysis of meiotic prophase chromosomes by silver staining. *Chromosoma*. 72:241-248, 1979.

Ford, C.D. y Evans, E.P. Meiotic preparations from mammalian testes. Pp. 461-464 in *Comparative Mammalian Cytogenetics* (Benirschke, K., ed.). Springer-Verlag, Berlin, 1969.

Freitas, T.R.O. y Lessa, E.P. Cytogenetics and morphology of *Ctenomys torquatus* (Rodentia, Octodontidae). *Journal of Mammalogy*. 65:637-642, 1984.

Gallardo, M.H. Karyotypic variation in *Ctenomys* (Rodentia, Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy*. 72:11-21, 1991.

Garagna S, Marziliano N, Zuccotti M, Searle JB, Capanna E, Redi CA. Pericentromeric organization at the fusion point of mouse Robertsonian translocation chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2;98(1):171-5, 2001.

Garagna S, Pérez-Zapata A, Zuccotti M, Mascheretti S, Marziliano N, Redi CA, Aguilera M, Capanna E. Genome composition in Venezuelan spiny-rats of the genus *Proechimys* (Rodentia, Echimyidae). I. Genome size, C-heterochromatin and repetitive DNAs in situ hybridization patterns. *Cytogenet Cell Genet.* 78(1):36-43, 1997.

Gayle J. Pageau and Jeanne B. Lawrence. BRCA1 foci in normal S-phase nuclei are linked to interphase centromeres and replication of pericentric heterochromatin. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 175, No. 5, 693–701, 2006.

Hamilton, M.J.; Honeycutt, R.L. y Baker, R.J. Intragenomic movement, sequence amplification and concerted evolution in satellite DNA in harvest mice, *Reithrodontomys*: Evidence from in situ hybridization. *Chromosoma.* 99:321-329, 1990.

Hamilton, M.J.; Honeycutt, R.L. y Baker, R.J. Intragenomic movement, sequence amplification and concerted evolution in satellite DNA in harvest mice, *Reithrodontomys*: Evidence from in situ hybridization. *Chromosoma.* 99:321-329, 1990.

Hartl, D.L. y Clark, A.G. Principles of population genetics. Sinauer, Massachusetts, 1989.

Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M, Nakai M, Matsumoto T, Kinoshita KI, Shirakawa S, Miyoshi I. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci US A.* 78(3):1887–1891, 1981.

Hohenstein P, Giles RH. BRCA1: a scaffold for p53 response? *Trends Genet.* Sep;19(9):489-94, 2003.

Howell, W.M. and Black, D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015, 1980.

Hoyer-Fender S, Singh PB, Motzkus D. The murine heterochromatin protein M31 is associated with the chromocenter in round spermatids and is a component of mature spermatozoa. *Exp Cell Res.* 254(1):72-9, 2000.

<http://www.celldeath.de/apometh/dapi.html>

<http://www.celldeath.de/apometh/dapi.html>

John, B. *Population Cytogenetics*. The Camelot Press, Great Britain, 1976.

Jones O. David, Cowell Ian G., and Singh B. Prim. Mammalian Chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *BioAssays* 22:124-137, 2000.

Kato, H. y Moriwai, K. Factors involved in the production of banded structures in mammalian chromosomes. *Chromosoma*. 38:105-120, 1972.

King, M. *Species evolution - The role of chromosome change*. Cambridge University Press, London, 1993.

Kuus-Reichel, D., Knott, K, Grauer, L, Cass, M, Newsom, B, Carpenter, P., Saedi, M. Localization of BRCA1 proteins using monoclonal antibodies. Presented at Keystone Symposia "Genetics of Human Cancer: Pathogenesis and Diagnosis" January 31, 1997.

Le Douarin, B., A. L. Nielsen, J. M. Garnier, H. Ichinose, F. Jeanmougin, R. Losson, and P. Chambon. A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors. *EMBO J.* 15:6701-6715, 1996.

Lechner Mark S., Begg Gillian E., Speicher David W., and Rauscher Frank J. Molecular Determinants for Targeting Heterochromatin Protein 1-Mediated Gene Silencing: Direct Chromoshadow Domain-KAP-1 Corepressor Interaction Is Essential. *Molecular and Cellular Biology*, p. 6449-6465, Vol. 20, No. 17, 2000

Lee, M.R. y Elder, F.F. Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigation. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 26:36-40, 1980.

Li YC, Lee C, Sanoudou D, Hseu TH, Li SY, Lin CC. Interstitial colocalization of two cervid satellite DNAs involved in the genesis of the Indian muntjac karyotype. *Chromosome Res*. 8(5):363-73, 2000.

Maeda. M. y Smithies, O. The evolution of multigene families: human haptoglobin genes. *Annual Reviews of Genetics*. 20:81-108, 1986.

Martin F. Lavin, DNA damage checkpoint and repair centers, *Current opinion in Cell Biology* 16:328-334, 2004.

Martina Celerin, Sandra T. Merino, Ana E. Stone, Ann M. Menzie, y Miram E. Zolan. Múltiple roles of Spo11 in meiotic chromosome behaviour. *The EMBO Journal* Vol. 19 No11 pp. 2739-2750, 2000. Michael Lisby, Rodney Rothstein, Localization and repair proteins in eukaryotes, *Biochimie*, 2004.

Masahiro Kawabata, Teruyuki Kawabata, and Masahiro Nishibori. Role of RecA/RAD51 Family proteins in Mammals. *Acta Med. Okayama*, Vol. 59 No. 1, pp. 1-9, 2005.

Massarini, A.I. Reordenamientos cromosómicos y especiación en el género *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae). X Jornadas Argentinas de Mastozoología. Pp. 97-98, 1995.

Massarini, A.I.; Barros, M.A.; Roig, V. y Reig, O.A. Banded Karyotypes of *Ctenomys mendocinus* (Rodentia, Octodontidae) from Mendoza, Argentina. *Journal of Mammalogy*. 72:194-198, 1991.

Massarini, A.I.; Dopazo, H.J.; Bouzat, J.L.; Hasson, E. y Reig, O.A. The population genetic structure of *Cteomys porteousi* (Rodentia, Octodontidae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 20:723-734, 1992.

Matzukuma, S. y Utakoji, T. Non-histone protein associated with centromeric heterochromatin in the mouse chromosome. *Exp. Cell Research*. 105:217-222, 1977.

Matzukuma, S. y Utakoji, T. Uneven extraction of protein in Chinese hamster chromosomes during G-staining procedures. *Exp. Cell Research*. 97:297-303, 1976.

Mc Kee y Handel. Sex chromosomes, recombination and chromatin conformation. *Chromosoma*. 102:71-80, 1993.

Michael van den Bosch, Ronan T. Bree & Noel F. Lowndes. The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes. *EMBO reports* Vol. 4, No. 9, 2003.

Miklos, G.L.G. Localized highly repetitive DNA sequences in vertebrate and invertebrate genomes. Pp. 241-321 in *Molecular Evolutionary Genetics* (MacIntyre, R.J., ed.). Plenum, New York, 1985.

Modi WS. Heterogeneity in the concerted evolution process of a tandem satellite array in meadow mice (*Microtus*). *J Mol Evol*. 37(1):48-56, 1993.

Motzkus, D., Singh, P.B. y Hoyer-Fender, S. () M31, a murine homolog of *Drosophila* HP1, is concentrated in the XY body during spermatogenesis. *Cytogenet Cell Genet*, 86, 83-88, 1999.

Nagylaki, T. y Petes, T. Intrachromosomal gene conversion and the maintenance of sequence homogeneity among repeated genes. *Genetics*. 100:315-335, 1981.

Novello, A., Cortinas, M.N., Suarez, M. y Musto, H. Cytogenetic and molecular analysis of the satellite DNA of the genus *Ctenomys* (Rodentia Octodontidae) from Uruguay. *Chromosome Res*, 4, 335-339, 1996a.

Novello, A., Kralewski, M. y Benavente, R. Immunocytochemistry of soluble and non-soluble nuclear proteins on squash preparations of mammalian meiotic cells. *Chromosome Res*, 4, 622-623, 1996b.

Novello, A.; Lessa, E.; Sambarino, C. and Monzón, S. Chromosomal variation in two populations of the genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae) from Uruguay. *Z. Säugetierkunde*, 1988.

Novello, A.F.; Lessa, E.P.; Sambarino, C. y Monzón, S. Chromosomal variation in two populations of the genus *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae) from Uruguay. *Z. Säugetierkunde*. 55:43-48, 1990.

Ohno, S.; Kaplan, W.D. y Kinoshita, R.. Heterochromatic regions and nucleolus organizers in chromosomes of the mouse, *Mus musculus*. *Exp. Cell Research*. 13:358-364, 1957.

Ortells, M.O. Phylogenetic analysis of G-banded karyotypes among the South American subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (Caviomorpha: Octodontidae), with special reference to chromosomal evolution and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*. 53:189-208, 1995.

Oud, J.L. y Reutlinger, A.H. Chromosome behaviour during early meiotic prophase of mouse primary spermatocytes. *Chromosoma*. 83:395-407, 1981b.

Oud, J.L. y Reutlinger, A.H. The behaviour of silver-positive structures during meiotic prophase of male mice. *Chromosoma*. 81:569-578, 1981a.

Oud, J.L.; Jong, J.H. y Rooij, D.G. A sequential analysis of meiosis in the male mouse using a restricted spermatocyte population obtained by a hydroxyurea/triaziquone treatment. *Chromosoma*. 71:237-248, 1979.

Pathak, S. y Arrighi, F.E. Loss of DNA following C-banding procedures. *Cytogenetics and Cell Genetics*. 12:414-422.

Patton, J.L. y Sherwood, S.W. Chromosome evolution and speciation in rodents. *Annual Review of Ecology and Evolution*. 14:139-158, 1983.

Pesce, C.G., Rossi, M.S., Muro, A.F., Reig, O.A., Zorzopulos, J. y Kornblihtt, A.R. Binding of nuclear factors to a satellite DNA of retroviral origin with marked differences in

copy number among species of the rodent *Ctenomys*. *Nucleic Acids Res*, 22, 656-661, 1994.

Pierce, A. J., Stark, J. M., Araujo, F. D., Moynahan, M. E., Berwick, M., and Jasin, M. Double-strand breaks and tumorigenesis. *Trends Cell Biol.* Nov;11(11):S52-9, 2000.

Qumsiyeh, M.B. Evolution of number and morphology of mammalian chromosomes. *Journal of Heredity*. 85:455-465, 1994.

Recombination Mediators. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, No. 44, pp. 42729–42732, 2003.

Reig, O.A.; Busch, C.; Ortells, M.O. y Contreras, J.R. An overview of evolution, systematics, population biology, cytogenetics, molecular biology and especiation in *Ctenomys*. Pp 71-96 in *Evolution of subterranean mammals of the organismal and molecular levels* (Nevo, E. and Reig, O.A., eds.). Wiley-Liss, New York, 1990.

Reig, O.A.; Massarini, A.I.; Ortells, M.O.; Barros, M.A.; Tiranti, S.I. y Dyzenchauz, F.J. New karyotypes and C-banding patterns of the subterranean rodents of the genus *Ctenomys* (Caviomorpha, Octodontidae) from Argentina. *Mammalia*. 56:603-623, 1992.

Rossi MS, Pesce CG, Reig OA, Kornblihtt AR, Zorzópulos J. Retroviral-like features in the monomer of the major satellite DNA from the South American rodents of the genus *Ctenomys*. *DNA Seq.* 3(6):379-81, 1993.

Rossi MS, Reig OA, Zorzópulos J. Evidence for rolling-circle replication in a major satellite DNA from the South American rodents of the genus *Ctenomys*. *Mol Biol Evol.* 7(4):340-50, 1990.

Ryan, R. F., D. C. Schultz, K. Ayyanathan, P. B. Singh, J. R. Friedman, W. J. Fredericks, and F. J. Rauscher, III. KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Mol. Cell. Biol.* 19:4366-4378, 1999.

Scott Keeney, Craig N. Giroux, and Nancy Kleckner. Meiosis-Specific DNA Double-Strand Breaks Are Catalyzed by Spo11, a Member of a Widely Conserved Protein Family. *Cell*, Vol. 88, 375–384, February 7, 1997.

Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*. 2(7731):971-2, 1971.

Shaffer, C.D.; Wallrath, L.I. y Elgin, S.C.R. Regulating genes by packaging domains: bits of heterochromatin in euchromatin? *Tig*. 9:35-37, 1993.

Singh P. B., J. R. Miller, J. Pearce, R. Kothary, R. D. Burton, R. Paro, T. C. James, and S. J. Gaunt. A sequence motif found in *Drosophila* heterochromatin protein is conserved in animals and plants. *Nucleic Acids Res*. 19:789-794, 1991.

Singh, P. B., and N. S. Huskisson. Chromatin complexes as aperiodic microcrystalline arrays that regulate genome organisation and expression. *Dev. Genet*. 22:85-99, 1998.

Slamovits Claudio H., Cook Joseph A., Lessa Enrique P., and Rossi M. Susana. Recurrent Amplifications and Deletions of Satellite DNA Accompanied Chromosomal Diversification in South American Tuco-tucos (Genus *Ctenomys*, Rodentia: Octodontidae): A Phylogenetic Approach. *Mol. Biol. Evol*. 18(9):1708–1719, 2001.

Slamovits, C. y Rossi, S. . El satélite SRPC de los roedores tuco-tucos es una secuencia plerológica: su evolución y valor filogenético. *Jornadas Argentinas de Mastozoología*. p. 87, 1998.

Steven A. Narod & William D. Foulkes. *Nature Reviews Cancer* 4, 665-676, 2004.

Summer, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Research*. 75:304-306, 1971.

Sung Patrick, Krejci Lumir, Van Komen Stephen, and Sehorn Michael G. Rad51 Recombinase and Recombination Mediators. The Journal of Biological Chemistry Vol. 278, No. 44, pp. 42729–42732, 2003.

Takahisa Furuta, Haruyuki Takemura, Zhi-Yong Liao, Gregory J. Aune, Christophe Redon, Olga A. Sedelnikova, Duane R. Pilch, Emmy P. Rogakou, Arkady Celeste, Hua Tang Chen, Andre Nussenzweig, Mirit I. Aladjem, William M. Bonner, and Yves Pommier. Phosphorylation of Histone H2AX and Activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in Response to Replication-dependent DNA Double-strand Breaks Induced by Mammalian DNA Topoisomerase I Cleavage Complexes. The Journal of Biological Chemistry Vol. 278, No. 22, Issue of May 30, pp. 20303–20312, 2003.

Tavtigian SV, Deffenbaugh AM, Yin L, Judkins T, Scholl T, Samollow PB, de Silva D, Zharkikh A, and Thomas A (2006) Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. J. Med. Genet., 43(4): 295-305.

Tomasco I. Filogeografía del tucu-tucu *Ctenomys pearsoni*: variación del ADN mitocondrial y sus implicancias para la diferenciación cromosómica. Tesis de Maestría. PEDECIBA. Universidad de la República, Uruguay, 2003.

Travis H. Stracker, Jan-Willem F. Theunissen, Monica Morales, Jhon H.J Petrini, The Mre11 complex and the metabolism of chromosome breaks: the importance of holding thins together, DNA Repair, 2004.

Villar S. Caracterización citogenética y alozímica de poblaciones de *Ctenomys* del Uruguay. Tesis de Maestría. PEDECIBA. Universidad de la República, Uruguay, 2000.

Villar S., Martínez-López W., Folle G. and Novello A. .Cytogenetic analysis of different *Ctenomys* (Rodentia, Octodontidae) species from Uruguay using G-banding. Mammalian Biology, Volume 70, Issue 4, Pages 255-260 13 July 2005.

Wakimoto, B. T. Beyond the nucleosome: epigenetic aspects of position-effect variegation in *Drosophila*. Cell 93:321-324, 1998.

Wallrath, L. L.. Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8:147-153, 1998.

Walsh, J.B. Persistence of tandem arrays: implications for satellite and simple-sequence DNAs. *Genetics.* 115:553-567, 1987.

Wang Guozheng, Ma Alicia, Cheok-man Chow, Horsley David, Brown, Nicholas R., Cowell Ian G., Singh B. Prim. Conservation of Heterochromatin Protein 1 Function. *Molecular and Cell Biology*, p. 6970-6983, 2000.

West, M. H., and Bonner, W. M. Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry.*;19(14):3238-45, Jul 8 1980

Wichman HA, Payne CT, Ryder OA, Hamilton MJ, Maltbie M, Baker RJ. Genomic distribution of heterochromatic sequences in equids: implications to rapid chromosomal evolution. *J Hered.*;82(5):369-77 Sep-Oct, 1991.

Wichman, H. A., R. A. Van Den Bussche, M. J. Hamilton and R. J. Baker, Transposable elements and the evolution of genome organization in mammals. *Genetica* 86: 287–293, 1992.

Wold, M. S. Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu Rev Biochem.* pp. 66:61-92, 1997.

Xu H, Wang Y, Bleuit JS, Morrical SW. Mediator proteins orchestrate enzyme-ssDNA assembly during T4 recombination-dependent DNA replication and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(15):8298-305. 2001.

Yang F, O'Brien PC, Wienberg J, Neitzel H, Lin CC, Ferguson-Smith MA. Chromosomal evolution of the Chinese muntjac (*Muntiacus reevesi*). *Chromosoma.* Jun;106(1):37-43, 1997.