Trabajo de pasantía

2008-2009

Estudio de la cromatina en ovinos Criollos Uruguayos.

Acción de agentes clastogénicos.

Pasante: **Franko Graziano**

Carrera: Licenciatura en Ciencias Biológicas - Orientación Genética y Evolución

Lugar de trabajo: Laboratorio de Área Genética de Facultad de Veterinaria

Tutora: Dra. Alicia Postiglioni

Índice

Resumen.....3

Introducción.....4

- Cromatina: heterocromatina, eucromatina.....4
- Modificaciones epigenéticas.....5
- Cromosoma X inactivo.....7
- Alteraciones Cromosómicas.....7
- Agentes Clastogénicos: Afidicolina y 5-azacitidina.....9
- Abordaje a estudios de la cromatina por agentes clastogénicos 11
- Familia Bovidae.....12
- *Ovis aries*: ovino Criollo, cariotipo y homeología 13
- Hipótesis.....15
- Objetivos.....15

Materiales y Métodos.....16

- Animales Experimentales.....16
- Extracción de muestra sanguínea.....16
- Cultivo linfocitario.....17
- Inducción con APC.....18
- Inducción con 5-aza-C.....18
- Procesamiento del cultivo linfocitario.....18
- Elaboración de preparados.....19
- Tinción cromosómica con colorante Giemsa.....20
- Observación al microscopio.....20
- Análisis de metafases.....20

Resultados.....22

- Primer cultivo linfocitario, ovino Criollo hembra del Zoológico.....24
- Segundo cultivo linfocitario, ovino Criollo hembra de San Miguel.....27

Discusión.....29

Agradecimientos.....32

Consulta Bibliográfica.....33

Anexo.....37

Resumen

A nivel de evolución cariotípica dentro de la familia Bovidae (bovinos, ovinos, cabras) se ha demostrado que los procesos fusión/fisión céntrica, juegan un papel fundamental en la especiación cromosómica. Estudios sobre alteraciones cromosómicas en bovinos, como por ejemplo la translocación Robertsoniana, han utilizado agentes clastogénicos en sus experiencias. El daño inducido por estos agentes sobre la cromatina ha permitido identificar regiones inestables del genoma, donde múltiples reordenamientos (macro y microrearreglos) pueden haber acontecido en el proceso de la evolución. En este trabajo se describe la acción de dos agentes clastogénicos sobre la cromatina del ovino Criollo Uruguayo. Estos agentes son, la afidicolina (APC) y la 5-azacitidina (5-aza-C). La APC compite con el dCTP por la ADNpolimerasa α, provocando inestabilidades en regiones ricas en citocinas; la 5-aza-C es un análogo de citocinas que bloquea la acción de la ADN-metiltransferasa; que, actuando como agente hipometilante, inhibe la condensación de la heterocromatina.

Para esto se realizaron cultivos linfocitarios de dos muestras sanguíneas, una perteneciente a un ovino Criollo hembra del Zoológico Villa Dolores, y la segunda a un ovino Criollo hembra del Parque Nacional de San Miguel. En ambos cultivos se realizó un diseño de concentraciones para los dos inductores. En esta pasantía se analizaron los tubos con inducción durante 24 hrs. de APC (0,35μM) y durante 2 hrs. de 5-aza-C (1,5mM y 3mM), además de los controles.

Los tubos de inducción con APC del segundo cultivo no se lograron por error experimental. En la inducción del primer cultivo se observó respuesta a la acción del APC, con alta frecuencia de lesiones cromosómicas (151 lesiones en 91 metafases completas) sin perder su integridad, por lo tanto la concentración 0,35μM podría estar dentro del óptimo para realizar posteriores estudios citogenéticos sobre ovinos Criollos. Se contaron las lesiones y se calculó su frecuencia por tipo cromosómico (monobraqueado, bibraqueado, cromosoma X); por región del cromosoma (pericentromérica, intersticial y subtelomérica)

especialmente en los cromosomas largos; y por cromosoma X, donde se describen por lo menos 3 lesiones.

En cuanto a la inducción con 5-aza-C, se observó despiralización en regiones heterocromáticas en ambas concentraciones (1,5mM y 3mM). Se clasificaron las metafases según el nivel de daño inducido por 5-aza-C, tomándose el nivel 2 como el óptimo (metafases con despiralización sin afectar la identificación de los cromosomas). No se observó gran diferencia en el porcentaje de metafases encontradas en este nivel 2, para las concentraciones 1,5mM y 3mM, siendo para el primero cultivo 19,4% (1,5mM) y 17% (3mM), y para el segundo 8,3% (1,5mM) y 8,2% (3mM). Por primera vez en ovinos se observa el cromosoma X inactivo despiralizado tanto a 1,5mM como a 3mM.

Introducción

CROMATINA

La cromatina es el conjunto de ADN, histonas y proteínas no histónicas que se encuentra en el núcleo de las células eucariotas y que constituye el cromosoma eucariótico.

Las unidades básicas de la cromatina son los nucleosomas. Éstos se encuentran formados por aproximadamente 146 pares de bases de longitud (el número depende del organismo), asociados a un complejo específico de 8 histonas nucleosómicas (octámero de histonas). Cada partícula tiene una forma de disco, con un diámetro de 11 nm y contiene dos copias de cada una de las 4 histonas H3, H4, H2A y H2B. Este octámero forma un núcleo proteico alrededor del que se enrolla la hélice de ADN (de aproximadamente 1.8 vueltas). Entre cada una de las asociaciones de ADN e histonas existe un ADN libre llamado ADN "espaciador", de longitud variable entre 0 y 80 pares de nucleótidos que garantiza flexibilidad a la fibra de cromatina. Este tipo de organización, permite un primer paso de compactación del material genético, y da lugar a una estructura parecida a un "collar de cuentas".

Posteriormente, un segundo nivel de organización de orden superior lo constituye la "fibra de 30nm" compuesta por grupos de nucleosomas empaquetados uno sobre otros adoptando disposiciones regulares gracias a la acción de la histona H1.

Finalmente continúa el incremento del empaquetamiento del ADN hasta obtener los cromosomas que observamos en la metafase, el cual es el máximo nivel de condensación del ADN.

La cromatina se puede encontrar en tres formas:

Heterocromatina, es una forma inactiva, condensada, localizada sobre todo en la periferia del núcleo, se replica en fase S tardía, y se tiñe fuertemente con las coloraciones. La heterocromatina puede ser de dos tipos diferentes:

-la **constitutiva**, idéntica para todas las células del organismo y que carece de información genética, incluye a los telómeros y centrómeros del cromosoma que no expresan su ADN.

-la **facultativa**, diferente en los distintos tipos celulares, contiene información sobre todos aquellos genes que no se expresan o que pueden expresarse en algún momento (genes tejido específico). Incluye al corpúsculo de Barr, que corresponde al cromosoma X inactivo de la hembra de mamíferos.

Eucromatina, representa la forma activa, con menor condensación, está diseminada por el resto del núcleo, se replica en fase S temprana, y se tiñe débilmente con coloración específica del ADN. Es aquí donde se encuentran la mayoría de los genes activos (genes housekeeping) (Alberts, *et al*, 1996).

MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS

La cromatina juega un rol regulador fundamental en la expresión génica. Los distintos estados de compactación pueden asociarse (aunque no unívocamente) al grado de transcripción que exhiben los genes que se encuentran en esas zonas.

La cromatina es, en principio, fuertemente represiva para la transcripción, ya que la asociación del ADN con las distintas proteínas dificulta el procesamiento de las distintas ARN polimerasas. Por lo tanto, existe una variada cantidad de proteínas remodeladoras de la cromatina y modificadoras de histonas.

Existe actualmente lo que se conoce como "código de histonas". Las distintas histonas pueden sufrir modificaciones post-traduccionales, como ser la metilación, acetilación, fosforilación, generalmente dada en residuos lisina o arginina. La acetilación está asociada con activación de la transcripción, ya que al acetilarse una lisina, disminuye la carga positiva global de la histona por lo cual tiene una menor afinidad por el ADN (que está cargado negativamente). En consecuencia, el ADN se encuentra unido menos fuertemente lo que permite el acceso de la maquinaria transcripcional. Por el contrario, la metilación está asociada con la represión transcripcional y una unión ADN-histona más fuerte (si bien no siempre esto se cumple). Por ejemplo, en la levadura *S. pombe,* la metilación en el residuo de lisina 9 de la histona 3 está asociado con represión de la transcripción en la heterocromatina, mientras que la metilación en el residuo de lisina 4 promueve la expresión de genes.

Las enzimas que llevan a cabo las funciones de modificaciones de histonas son las acetilasas y desacetilasas de histonas, y las metilasas y desmetilasas de histonas, que forman distintas familias cuyos integrantes se encargan de modificar un residuo en particular de la larga cola de las histonas.

Además de las modificaciones de las histonas, existen también maquinarias remodeladoras de la cromatina, como por ejemplo SAGA (complejo histona acetil tranferasa), que se encargan de reposicionar nucleosomas, ya sea desplazándolos, rotándolos, o incluso desensamblándolos parcialmente, retirando algunas de las histonas constituyentes del nucleosoma y luego volviéndolos a colocar. En general las maquinarias remodeladoras de la cromatina son esenciales para el proceso de transcripción en eucariotas, ya que permiten el acceso y procesividad de las polimerasas.

Otra forma de marcación de la cromatina como "inactiva" puede darse a nivel de la metilación del ADN, en citosinas que pertenezcan a dinucleótidos CpG. En general la metilación del ADN y de la cromatina son procesos sinérgicos, ya que, por ejemplo, al metilarse el ADN, existen enzimas metiladoras de histonas que pueden reconocer citosinas metiladas, y metilan histonas próximas. Del mismo modo, enzimas que metilan el ADN pueden reconocer histonas metiladas, y así seguir

con la metilación a nivel de ADN.Todas estas modificaciones forman parte de una familia de modificaciones epigenéticas (Alberts, *et al*., 1996).

CROMOSOMA X INACTIVO

El cromosoma X tiene una baja proporción de genes si lo comparamos con otros cromosomas. Está compuesto por muchos segmentos de ADN repetitivo que no codifica para ninguna proteína o su función no es conocida. Solo el 1,7% del cromosoma codifica para proteínas funcionales. Durante el desarrollo embrionario de hembras, más precisamente en las células del macizo celular interno (estadio de blastocito), uno de los dos cromosomas X se inactiva de forma azarosa y permanente en las células somáticas. A este fenómeno se le da el nombre de inactivación del cromosoma X y crea los corpúsculos de Barr. La inactivación de uno de los cromosomas en hembras, asegura que sólo uno de los cromosomas X pueda desempeñar sus funciones, realizándose la compensación de dosis con respecto al macho. Como se nombró anteriormente el X inactivo presenta heterocromatina facultativa (Thompson, 2004).

ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

Las alteraciones cromosómicas, tanto espontáneas como inducidas por agentes clastogénicos constituyen alteraciones del número cromosómico de la especie (alteraciones cromosómicas numéricas) o de la estructura de uno o más cromosomas (alteraciones cromosómicas estructurales) (Savage, 1976).

Alteraciones estructurales

Las alteraciones estructurales constituyen modificaciones espontáneas o inducidas en la estructura cromosómica. Pueden ser clasificadas en cuatro tipos básicos: delecciones y duplicaciones (que respectivamente disminuyen o incrementan la cantidad de material genético del cromosoma involucrado); inversiones (que generan un cambio de sentido en el orden lineal de los genes de una región del cromosoma) y translocaciones (que originan el traslado de un segmento de material genético dentro del mismo o hacia otro cromosoma).

Las alteraciones en los cromosomas que surgen durante el período G1 de la interfase, o sea cuando el cromosoma aún no ha sido replicado, se denominan alteraciones tipo cromosoma (cuando afectan ambas cromátidas) (Fig. 1). Se denominan, en cambio, alteraciones de tipo cromátida (cuando involucra una sola cromátida) a aquellas que se producen en cromosomas ya replicados, es decir que se encuentran en el periodo G2 del ciclo celular (Fig. 2).
(Savage 1976, 1991,1993).

Alteraciones tipo cromosoma

Lesión acromática o gap

Corresponde a una región cromosómica de escasa coloración con lo que puede ser confundida como una fractura cromosómica. Se clasifica como gap toda lesión menor cuyo ancho sea menor que el de la cromátida.

Fractura cromosómica o delección terminal

Se origina por la producción de una fractura en un brazo cromosómico. Esta lesión inicial se duplica como consecuencia del proceso de replicación del ADN (fase S) y en la mitosis subsiguiente se observa un cromosoma duplicado de tamaño inferior al normal y un fragmento acéntrico doble.

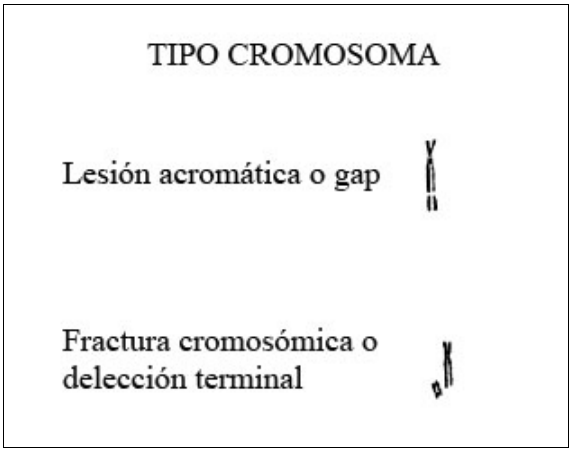

Figura 1. Clasificación de alteraciones tipo cromosoma según Savage (1976).

Alteraciones tipo cromátida

Lesión acromática o gap

Corresponde a una región de cromátida con escasa coloración y que ocasionalmente puede ser confundida con una fractura de cromátida.

Delección simple o fractura de cromátida

Se origina por la producción de una fractura en una sola cromátida generando un fragmento acéntrico.

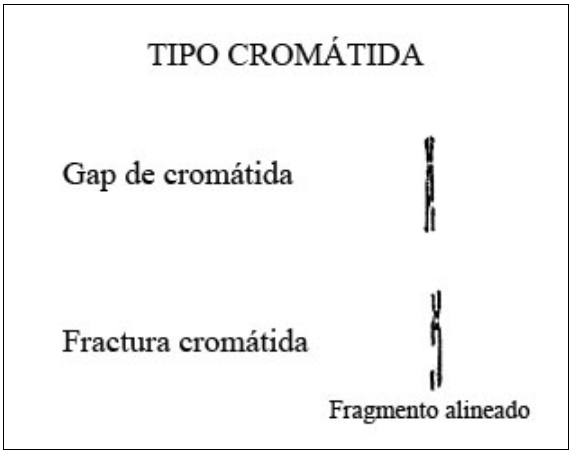

Figura 2. Clasificación de las alteraciones tipo cromátida según Savage (1976).

Extraído de tesis doctoral de la Dra. M. V. Di Tomasso (2007).

AGENTES CLASTOGÉNICOS

Son agentes capaces de producir aberraciones cromosómicas. Se los suele incorporar a cultivos celulares para inducir estas aberraciones. Su acción difiere a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular (G1, S, G2) y concentraciones, ya sea en forma cuantitativa o cualitativa.

En este trabajo se utilizaron dos agentes clastogénicos S-dependientes: afidicolina y 5-azacitidina.

Afidicolina (APC)

La afidicolina es un tetracíclido diterpenoide aislado del hongo *Cephalosporium Aphidicola*. Compite a nivel de dCTP con la ADN polimerasa α, inhibiendo su

función en la replicación del ADN, esto permite identificar regiones ricas en citocinas (Krokan *et al*., 1981).

Sheaff *et al*. (1991) basándose en sus resultados sugiere que la afidicolina no podría ser vista como un análogo de nucleótidos o de dCTP, sin embargo la falta de un grupo fosfato tendría estructuralmente, un parecido a los nucleósidos. Oguro *et al*., (1979) demuestran que el sitio de unión de dCTP es diferente a los sitios de unión de los otros dNTPs. Proponen dos alternativas para los sitios de unión de la afidicolina a la enzima. La primera es que esta se podría unir al sitio de dCTP e inhibir completamente la actividad de la ADN polimerasa α y la segunda es que la afidicolina se podría unir a otro sitio que no sea el catalítico de la enzima y competir solo con dCTP, pero es un mecanismo aun no comprendido. La unión de la afidicolina a la ADN polimerasa α por uno u otro modelo podría causar un cambio conformacional no comprendido que inhibe directamente la reacción del homopolímero. Se sugiere que la unión de la afidicolina estaría en una región hidrofóbica de la enzima ya que ésta es un componente no polar (Oguro *et al*., 1979).

Este agente, potencia sitios de inestabilidad del genoma más predispuestos a sufrir aberraciones cromosómicas. Se utiliza como marcador para estudios de homología cromosómica en regiones dinámicas de la cromatina (Sutherland y Hecht, 1985).

5-azacitidina (5-aza-C)

La 5-aza-C actúa como inhibidor en la condensación de la heterocromatina (constitutiva y facultativa), involucrado en el silenciamiento de la cromatina durante el ciclo celular. Es un análogo de citocinas, el cual presenta un nitrógeno en lugar del carbono 5 del anillo de pirimidina, esto impide que sea metilada por la ADN-metiltransferasa y detiene la función de esta enzima. La metilación de citocinas es parte de un proceso epigenético que provoca la condensación del ADN (Haaf, 1995; Haaf y Schmid, 2000; Pintado y Morón, 2002).

ABORDAJE A ESTUDIOS DE LA CROMATINA POR AGENTES CLASTOGÉNICOS

De acuerdo a estudios realizados previamente en bovinos, hemos seleccionado inductores S-dependientes para realizar un primer abordaje al estudio de la cromatina de los ovinos Criollos Uruguayos. Los inductores utilizados en esta pasantía fueron: la afidicolina (APC) como inhibidor de la ADN polimerasa α en la replicación de los eucariotas, y la 5-azacitidina (5-AZA-C) como agente de descondensación de la cromatina en regiones de ADN hipometiladas (Tellechea *et al.*, 2004; Artigas *et al*., 2008).

Estudios anteriores con inductores clastogénicos en animales de la familia Bovidae en general y bovinos en particular revelan los siguientes resultados:

Estudios de inducción con APC en la translocación rob (1;29), han permitido identificar un lugar de inestabilidad en el brazo corto en posición 0,45 frente a una concentración de 0,30µM, durante un ciclo celular (Artigas *et al*., 2007). Tellechea *et al*. (2004), analizaron posible homología en la región proximal al centrómero por acción de la APC en la rob(1;29) y BTA1, encontrando regiones de inestabilidad diferencial de la cromatina, que establecen heterocigosidad en la región analizada. Rodríguez *et al.* (2001) identificaron cinco sitos frágiles en el cromosoma X, usando en forma indistinta concentraciones de afidicolina de 0,15µM y 0,30µM.

Frente a este inductor, se propone analizar su expresión sobre cromosomas metafásicos del ovino en concentraciones similares a las utilizadas en humanos y bóvidos (0,30µM) (Di Tommaso, 1998; Rodríguez *et al*., 2002; Nicodemo *et al.*, 2008).

En cuanto al inductor 5-aza-C, Danielak-Czech y Slota (2004) encontraron alteraciones en BTA1q25 y en 4 regiones del BTAX, correspondiendo todas a regiones bandas G-, al inducir células linfocitarias con 5-aza-C (50µg/ml, 6hrs). Sin embargo, estos autores encontraron que la expresión de fragilidad cromosómica en el cariotipo del ovino, sometidos a la misma concentración y tiempo, resultó menor.

Llambí y Núñez (2007) describieron fragilidad cromosómica en el cromosoma X (2 regiones) y varios autosomas (16 regiones) a concentraciones menores y durante dos ciclos celulares (4,92μM, 48 hrs).

Artigas *et al*., (2007) utilizaron altas concentraciones de 5-aza-C (1mM), accionando al final de la fase G2. Los autores observaron descondensación en la región paracéntrica y en regiones bandas G+ de la rob1;29 y del cromosoma BTA1, identificándose más de 10 regiones de cromatina despiralizada en los 58 cromosomas autosómicos. El efecto de la 5-aza-C, incluyó regiones pericentroméricas, teloméricas e intersticiales, observándose regiones condensadas, que no fueron alteradas por el inductor. El daño provocado por el inductor en el cromosoma X inactivo de la hembra, se utilizó como control de la inducción sobre heterocromatina facultativa (Haaf, 1995; Haaf & Smith, 2000), obteniéndose en el resto del material regiones con respuesta similar, señalando heterocromatina facultativa con genes tejido específico (Holmquist y Ashley, 2006).

Artigas *et al*. (2007) basándose en las variables de concentración y tiempo, discuten que a bajas concentraciones del inductor y en etapas previas al período G2 de la interfase, el efecto despiralizante de la heterocromatina se minimizaría, proponiendo que la desmetilación actuaría en regiones preferentemente ricas en secuencias génicas “housekeeping” (bandas G-).

FAMILIA BOVIDAE

El genoma de los mamíferos contiene alrededor de 3 Gigabases, distribuídas en la especie *Bos taurus* en 29+XY grupos sinténicos, 26+XY en *Ovis aries* y 29+XY en *Capra hyrcus*; tres especies domésticas pertenecientes a la familia Bovidae.

A nivel de evolución cariotípica, dentro de la familia Bovidae (bovinos, ovinos, cabras) se ha demostrado que los procesos de fusión/fisión juegan un papel fundamental en la especiación cromosómica, estableciéndose un número fundamental (NF) entre 56 y 58, en relación a sus brazos cromosómicos.

Numerosos autores han aceptado al cariotipo de la cabra como el cariotipo “primitivo”, por estar constituido por 30 pares de cromosomas acrocéntricos,

excepto el Y (pequeño metacéntrico), lo cual daría a entender, que los cariotipos de las demás especies de bóvidos, habrían derivado de este cariotipo por medio de fusiones céntricas (Eldridge, 1985).

OVIS ARIES

La oveja (*Ovis aries*) es un mamífero ungulado rumiante doméstico. Se originó a partir de la domesticación del muflón (*Ovis musimon*) en Oriente Próximo hacia el IX siglo A. C. con el objeto de aprovechar su piel, lana, carne y la leche de las hembras. Tienen una longevidad de 18-20 años.

Ovino Criollo

El ovino Criollo es la única raza local del Uruguay que deriva de los primeros animales introducidos desde Europa en el siglo XVII. Corresponde al tipo de ovinos de lana basta, variaciones en la coloración de capa, así como en la pigmentación de mucosas y pezuñas. Mide en promedio unos 60 cm de altura a la cruz. Se considera que es una raza longeva, prolífica y de temperamento activo apta para vivir en terrenos donde la poca abundancia de alimento obliga al pastoreo continuo.

Existen varias majadas en el Uruguay, habiéndose censado 660 animales en 9 establecimientos diferentes.

(Mernies *et al*. 2008)

La majada del Parque Nacional de San Miguel, departamento de Rocha, cuenta con una población de 250 ovinos Criollos, con el propósito de educación e investigación, el zoológico de Villa Dolores de Montevideo cuenta con 11 ovinos Criollos, con igual propósito.

Cariotipo y homeología

El cariotipo del ovino está formado por 54 cromosomas, caracterizado por 3 pares de grandes cromosomas submetacéntricos, siendo el resto de los autosomas, acrocéntricos. Los cromosomas sexuales corresponden a un X acrocéntrico (el más largo) y un pequeño cromosoma Y metacéntrico (Fig. 3).

Los 3 pares de submetacéntricos han sido determinados, como el resultado de fusiones céntricas de 6 pares de cromosomas acrocéntricos encontrados en la cabra, la cual posee todos sus cromosomas acrocéntricos, excepto el Y que es un pequeño metacéntrico. Según Internacional System for Chromosome Nomenclature of Domestic Bovids ISCNDB (2000), Oar1 estaría formado por CHI1 y CHI3, Oar2 por CHI2 y CHI8, y Oar3 por CHI4 y CHI19. También existe una homeología con *Bos taurus*, donde Oar1 estaría formado por BTA1 y BTA3, Oar2 por BTA2 y BTA8, y Oar3 por BTA5 y BTA11.

Además de estos tres pares de submetacéntricos normales, se han descrito seis translocaciones Robertsonianas. Primero fueron descritas las t1 (6; 24), t2 (9; 10) y t3 (7; 25) (Brúere *et al*., 1976, 1979, 1981); en 1994 Pearce describió la t4 (5; 8) y t5 (8; 22); en 1995 Murthy describió la t (6; 26); y en 2003 la t (8; 11) fue descrita por Chaves (Popescu *et al*., 1999; Chaves *et al*., 2003). Este tipo de aberración cromosómica, no causa problemas de fertilidad en ovinos, puesto que no se generarían gametos desbalanceados (Brùere *et al*., 1981). En cambio en bovinos la translocación más frecuente, la rob (1;29), reduce la fertilidad generando gametos desbalanceados que causan mortalidad embrionaria (Gustavsson 1969). Estas diferencias comportamentales de los reordenamientos mencionados, hacen pensar en distintos ordenamientos génicos (o microrearreglos) dentro de los cromosomas homeólogos, como es el caso del BTA1 con Oar1q.

Por otra parte, según la tabla de homeología entre bovidos de ISCNDB 2000, el OARX es homeólogo al BTAX, sin embargo el cariotipo muestra que BTAX es un submetacéntrico, mientras que OARX es un acrocéntrico con pequeños brazos p.

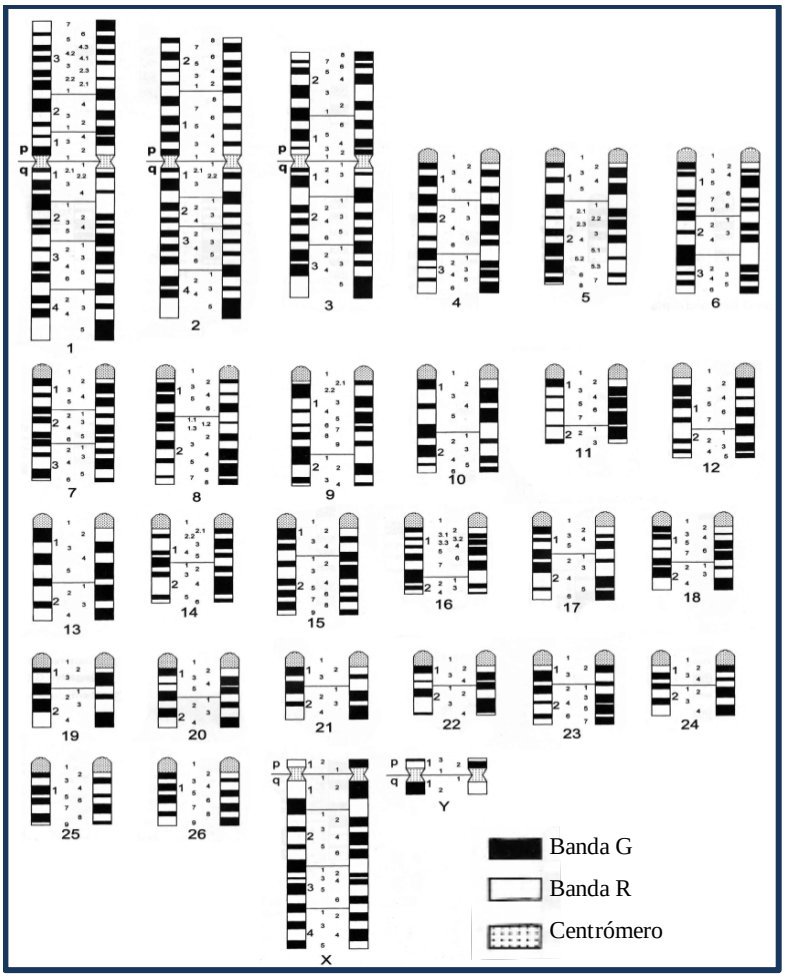

Figura 3. Ideograma del Ovino bandeo G (izquierda) y R (derecha). (Di Berardino *et al*., 2001).

HIPOTESIS

Los cromosomas de ovinos Criollos hembras responden a la acción de agentes clastogénicos en regiones específicas del genoma.

OBJETIVOS

Estudiar como primer abordaje, los cromosomas del ovino enfocado a la expresión de dos inductores: APC y 5-aza-C.

Describir los niveles de daño inducido por 5-aza-C (1,5mM y 3mM) al final de la fase G2.

Detectar regiones con respuesta a la acción de APC (0,35μM) en un ciclo celular y 5-aza-C (1,5mM y 3mM) al final de la fase G2, principalmente en bibraqueados y cromosoma X.

Materiales y métodos

Animales Experimentales

Los estudios citogenéticos fueron realizados sobre 2 ovinos Criollos hembras, pertenecientes a dos población diferentes. Un individuo perteneciente a la población del Parque Nacional de San Miguel, en el departamento de Rocha, y el otro perteneciente a la población del Zoológico Villa Dolores de Montevideo.

Se escogieron ovinos Criollos provenientes de estas localidades y no de establecimientos de producción, para minimizar efectos de la selección artificial.

Extracción de muestra sanguínea

Se tomó una muestra sanguínea por animal, la primera fue tomada el 14/04/2008 de la población del Zoológico, la segunda fue tomada el 05/08/2008 de la población de San Miguel.

En ambos casos se procedió de la misma manera. Previo a la extracción en el campo, en el laboratorio se preparó, una jeringa con heparina sódica (5.000 UI) para evitar la coagulación sanguínea; una nevera portátil con hielo para conservar la muestra; lápiz y cinta para rotularla y alcohol yodado.

Veterinarios y estudiantes de veterinaria, realizaron la extracción de la muestra sanguínea. Fueron extraídos aproximadamente 10mL de sangre periférica de la vena yugular, con jeringa estéril heparinizada en condiciones asépticas. La jeringa con la muestra fue rotulada (fecha e identificación del animal) y colocada de inmediato en la nevera. El mismo día fue trasladada al laboratorio donde se ingresó el cultivo.

Cultivo linfocitario

En los cultivos también se actuó de la misma manera para las dos muestras. En la cámara de flujo laminar, la muestra fue traspasada de la jeringa a varios tubos de cultivo estériles, ubicados en una gradilla y rotulados según el diseño de las tablas 1 y 2. Cada tubo contenía 5mL de medio completo y se le agregaron 6 a 10 gotas de sangre por tubo. Se los tapó con tapones de silicona y selló con parafilm. Luego fueron agitados suavemente, y de allí se los ubicó junto con la gradilla en baño María (Memmert) a 38,5°C (temperatura corporal normal del ovino) por 72 horas.

El medio completo se preparó de la siguiente manera: 100mL de RPMI 1640+ L-glutamina (GIBCO 11875, Invitrogen), 15mL de suero fetal bovino (GIBCO), 2,5mL de fitohemaglutinina (Phytoaemogglutinin M form, Biological industries Kibbutz Beil Haemek, Israel) como mitógeno y 2,5mL de Penicilina-Estreptomicina (10.000 U/mL) (GIBCO) como antibiótico.

30 minutos antes del procesamiento de cultivo, se agregó 50µL (10µg/mL) de colchicina por tubo. En un tubo control de la primera muestra se agregó 15 minutos antes, para comprobar que esta variable no producía cambios significativos en ovinos.

Tabla 1. Diseño del *primer cultivo linfocitario*, la muestra sanguínea fue extraída de un ovino Criollo hembra del Zoológico Villa Dolores.

tubo	Inducción	t. colchicina
8	control	15´
23	control	30´
6	APC (0,35µM)	30´
12	5-aza-C (1,5mM)	30´
13	5-aza-C (1,5mM)	30´
18	5-aza-C (3mM)	30´

Tabla 2. Diseño del *segundo cultivo linfocitario*, la muestra sanguínea fue extraída de un ovino Criollo hembra del Parque Nacional San Miguel.

tubo	Inducción	t. colchicina
1	control	30´
11	control	30´
3	APC (0,35µM)	30´
6	5-aza-C (1,5mM)	30´
9	5-aza-C (3mM)	30´

A las 24 horas se resuspendieron todos los tubos manualmente, para uniformizar el contenido de nutrientes. Al mismo tiempo se controló el estado del cultivo, sobre características como color y presencia de coágulos, siendo el color indicador del pH del medio.

Inducción con APC

24 horas antes del levantado del cultivo, se indujeron los tubos con APC (aphidicolin Sigma AO781-1MG). En los tubos candidatos a APC (0,35µM) se agregaron 5,8µL de solución madre APC (300µM)*[1] previo a la resuspensión del cultivo. Ese mismo día se resuspendieron los demás tubos. Y se volvió a controlar color y coagulación.

Inducción con 5-aza-C

Dos horas antes del levantado del cultivo, se indujeron los tubos con 5-aza-C a concentraciones de 1mM y 3mM. En los tubos correspondientes a inducción con 5-aza-C (1mM), se agregaron 122µL de solución madre y en los candidatos a 5-aza-C (3mM) se agregaron 366µL de solución madre 5-aza-C (10mg/mL)*[2].

Procesamiento del cultivo linfocitario

A las 72 horas de cultivo y luego de haber dejado actuar la colchicina por los últimos 15 o 30 minutos, se comenzó con su procesamiento de la siguiente manera:

Se resuspendieron los tubos de cultivo y se pasó su contenido a tubos cónicos de centrífuga. Los tubos de descarte se dejaron en agua corriente con hipoclorito, y los tapones de silicona en agua corriente con detergente neutro.

Se centrifugaron los tubos a 800 rpm, durante 10 minutos, y se eliminó el sobrenadante con pipeta Pasteur de punta fina, dejando 1/2cm sobre el pellet celular.

Luego se incorporó de 5 - 6ml de solución salina hipotónica (KCL 0,075M)*[3] a 38,5°C (temperatura del cultivo) sobre las paredes, resuspendiendo lentamente con pipeta Pasteur de punta fina, y dejándolo actuar durante 20 minutos. Por cada tubo, se utilizó una pipeta, y se descartó en un recipiente con agua corriente e hipoclorito.

Se detuvo la hipotonía con 6 gotas de solución fijadora Carnoy (3:1 metanol-acético) conservada en freezer por 10 minutos. Pudiendo así además de detener la acción de la solución hipotónica, producir una fijación uniforme.

Luego se comenzó el lavado, centrifugando a 800rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante, se agregó solución 3:1 hasta poco menos de la mitad del tubo, se lo resuspendió y se dejó actuar el fijador durante 15 minutos. El lavado se repitió 2 veces para obtener un sobrenadante traslúcido y pellet limpio.

Finalmente para la fijación de linfocitos, se descartó el sobrenadante translúcido, se agregó fijador 3:1 y se resuspendió, se lo deja actuar durante 30 minutos.

Terminado con el procesamiento del cultivo, se sellan los tubos con tapón de goma y parafilm, todos estos ya con su correspondiente rótulo, y se los ingresa a heladera (4ºC) para su conservación.

Elaboración de preparados

Se colocaron portaobjetos prelimpios en copplin con metanol 70% en el freezer para evitar la evaporación del metanol.

Para cada tubo candidato a analizar se lo centrifugó a 800rpm por 10 minutos, se descartó sobrenadante, se le adicionó fijador 3:1 (metanol: ácido acético) en cantidades dependientes de la concentración de material deseada, y se lo resuspendió con pipeta Pasteur. Se tomó una pequeña porción de la suspensión

celular con la pipeta y se dejó caer de dos a tres gotas desde una altura de 30 a 50 cm sobre el portaobjetos recién retirado del copplin con metanol. Se tomó el portaobjetos con una pinza desde el extremo de la etiqueta, y se lo acercó a la llama del mechero lo necesario como para que el metanol se encienda y en seguida se lo retiró, cuando la llama sobre el porta se consumió junto con el metanol. Se dejó secar el portaobjeto a temperatura ambiente y se rotuló.

Tinción cromosómica con colorante Giemsa

En un copplin de 50ml se incorporó 46.5ml de agua corriente o ddH_2O, 1,5 de metanol, 1,5 de tampón fosfato Sorensen (ph 6,8)*[4] y 1.5ml de solución Giemsa madre*[5]. Se ingresaron las preparaciones secas, y se las dejó durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se retiraron y se enjuagaron bajo chorro de agua corriente, el chorro debe caer sobre la etiqueta y correr por el resto del portaobjeto. Luego se dejan secar a temperatura ambiente o en estufa. En el caso de que se quiera desteñir, se las sumerge en copplin con 3:1 (metanol: ácido acético) hasta que se haya eliminado todo el colorante. Si a las preparaciones se les había adicionado aceite durante su observación es necesario el tratamiento en un copplin con Xilol durante 24 horas a temperatura ambiente.

Observación al microscopio

Como una manera de evaluar la calidad del cultivo se calculó el índice mitótico*[6] para los tubos control.

Se observaron y se capturaron imágenes de metafases de los preparados, utilizando un microscopio óptico Olympus (BX60) con aumento 100X y un Software digitalizador de imágenes (FlashBus FBG, versión 4.2).

Análisis de metafases

Se usaron las imágenes para cuantificar, clasificar y analizar las metafases.

Para los tubos control, se buscó capturar más de 50 metafases completas, y se indicó cuántas de éstas presentaron lesiones espontáneas.

Para los tubos inducidos con APC (0,35μM) se capturaron más de 50 metafases completas, contabilizándose metafases con lesiones, y lesiones según ubicación en el cromosoma (Fig. 4).

Para los tubos inducidos con 5-aza-C se capturaron más de 50 metafases entre completas y cuasi-completas. Estas fueron clasificadas según el nivel de daño inducido por el agente sobre los cromosomas: nivel 0 (no se observa daño), nivel 1 (poco daño, los cromosomas permanecen íntegros), nivel 2 (cromosomas despiralizados, identificables), nivel 3 (cromosomas altamente despiralizados, no identificables) (Figs. 5, 6 y 7). Se identificó el OARX despiralizado, como control de que la 5-aza-C esté actuando sobre heterocromatina facultativa (Fig. 8).

Resultados

Ambos animales analizados presentaron un cariotipo normal (2n=26, XX) de acuerdo con el patrón ovino (Di Berardino *et al*., 2001).

Se observó respuesta de los dos inductores utilizados, en ambos cultivos, como se observa en las figuras 4 a 7. En la inducción con APC (0,35µM) se observaron lesiones en bibraqueados, monobraqueados y el cromosoma X (Fig. 4). En la inducción con 5-aza-C (1,5mM y 3mM) se distinguieron tres niveles de daño sobre las metafases (Figs. 5, 6 y 7). Además, en esta inducción se observó el cromosoma X despiralizado (Fig. 8).

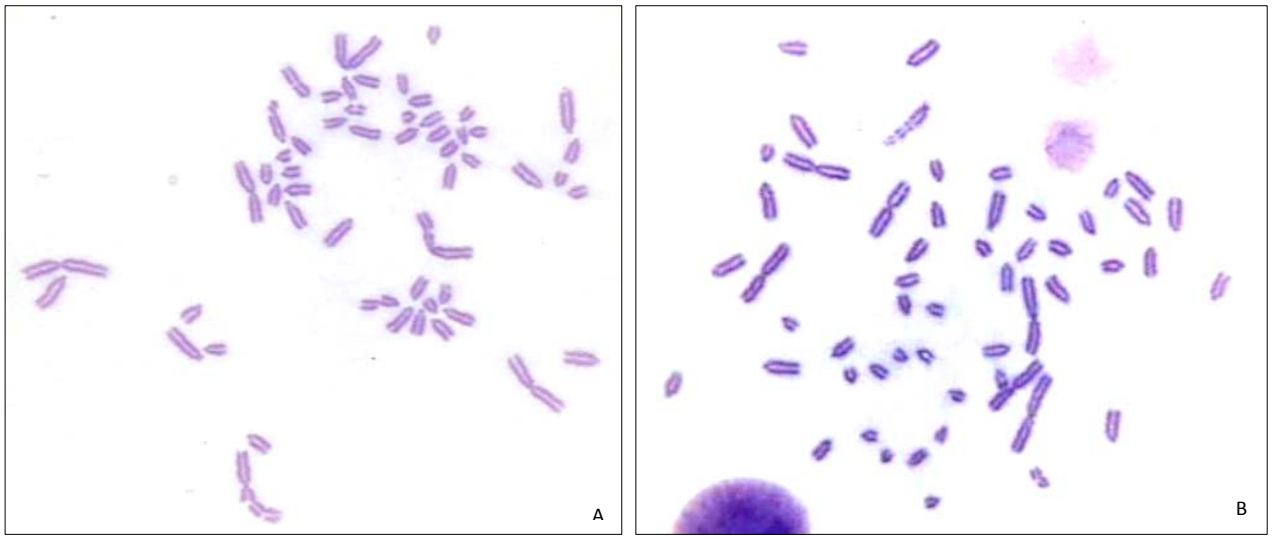

Figura 4. Lesiones en metafases de ovino Criollo hembra inducidas con APC (0,35µM). A- se observan lesiones en acrocéntricos autosómicos y bibraqueados. B- Se observan lesiones en OARX y en acrocéntrico autosómico.

Figura 5. Inducción con 5-aza-C. Nivel 1 de daño cromosómico.

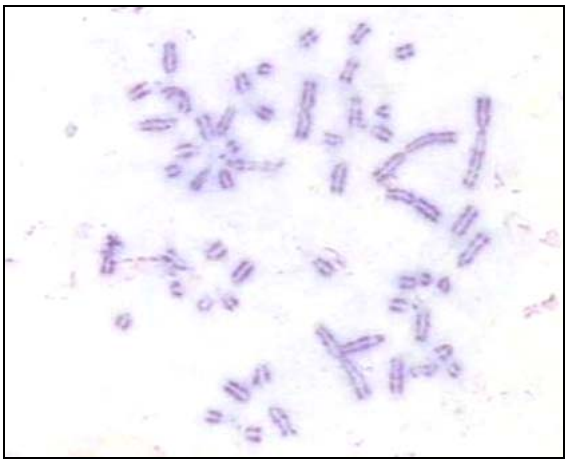

Figura 6. Inducción con 5-aza-C. Nivel 2 de daño cromosómico.

Figura 7. Inducción con 5-aza-C. Nivel 3 de daño cromosómico.

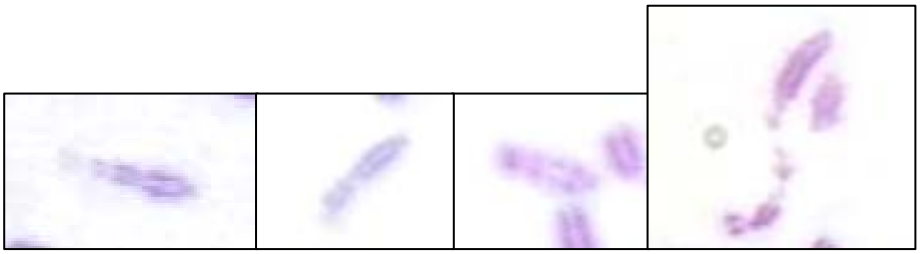

Figura 8. Cromosomas OARX despiralizados por acción de 5-aza-C. La primera imagen de OARX pertenece a un tubo inducido a 3mM, las otras tres fueron inducidas a 1,5mM. Cada OARX de las imágenes pertenece a una metafase distinta.

Primer cultivo linfocitario, ovino criollo hembra del Zoológico.

Los tubos de este cultivo no mostraron cambios de pH. Se encontró material en sus preparados, el índice mitótico del control con 15' de colchicina (tubo 8) fue de 2,8 y el índice mitótico del control con 30' de colchicina (tubo 23) fue de 2,5. Alcanzó con observar solo un preparado por tubo para obtener la cantidad de metafases deseadas (mayor o igual a 50).

Controles y APC (0,35µM).

Tanto para el control con 15 minutos de colchicinado, como para el de 30 minutos, el número de metafases completas encontradas y cantidad de lesiones espontáneas fue casi el mismo, encontrándose 3 y 2 lesiones espontáneas en 57 y 58 metafases respectivamente (tabla 4).

En ambos controles una de las escasas lesiones espontáneas se observó sobre el cromosoma 1, pero en distinta región como muestra la figura 9.

Tabla 4. Lesiones en metafases de controles e inducción con APC (0,35µM). Se indica número y porcentaje de metafases con lesiones, cantidad de lesiones totales y por tipo cromosómico (bibraqueados, monobraqueados autosómicos y OarX). Para los controles se indica entre paréntesis en cuál bibraqueado se observó la lesión.

			lesiones			
tubo	N	N c/lesión	totales	en B	en M	en X
CONTROL(15´col)	57	3 (5,3%)	3	1(Oar1)	2	0
CONTROL(30´col)	58	2 (3,4%)	2	1(Oar1)	1	0
APC(0,35µM)	91	71(78%)	151	53	88	10

N - n° metafases completas, **B** - bibraqueados, **M** - monobraqueados autosómicos, **X** – cromosoma X.

Figura 9. Lesiones espontáneas en controles sobre el OAR1. A- 15' colchicina, lesión en región subtelomérica, B- 30' colchicina, lesión en región intersticial.

Los resultados de APC (0,35µM), muestran un alto porcentaje de metafases que presentan al menos una lesión (78%) respecto al porcentaje indicado para los controles (5,3% y 3,4%). Se observaron 151 lesiones distribuidas en 71 metafases (tabla 4), de las cuales 53 se ubicaron en cromosomas bibraqueados, 88 en monobraqueados autosómicos y 10 en el cromosoma X, ocupando el 35,1%, 58,3% y 6,6% respectivamente (tabla 5).

En bibraqueados la mayoría se encontraron en región intersticial y subtelomérica. En la tabla 5 también aparecen clasificadas las lesiones por región para los monobraqueados, aunque no es un dato confiable a ser analizado, ya que éstos son más pequeños y es menos exacta la separación de las tres regiones. Este procedimiento sería útil solo en cromosomas largos, como sí lo son los bibraqueados y el X. En OARX se distinguen lesiones sobre la región intersticial (6) y subtelomérica (4) (tabla 5, Fig. 10).

Tabla 5. Lesiones por tipo de cromosoma y región cromosómica, inducción con APC (0,35µM).

LESIONES	EN BIBRA:			%
		pericéntrica	9	
		intersticial	23	
		subtelomérica	21	
		total	**53**	**35,1**
	*EN MONOB:			
		pericéntrica	11	
		intersticial	49	
		subtelomérica	28	
		total	**88**	**58,3**
	EN X:			
		pericéntrica	0	
		intersticial	6	
		subtelomérica	4	
		total	**10**	**6,6**
	TOTAL:		**151**	

* monobraqueados autosómicos

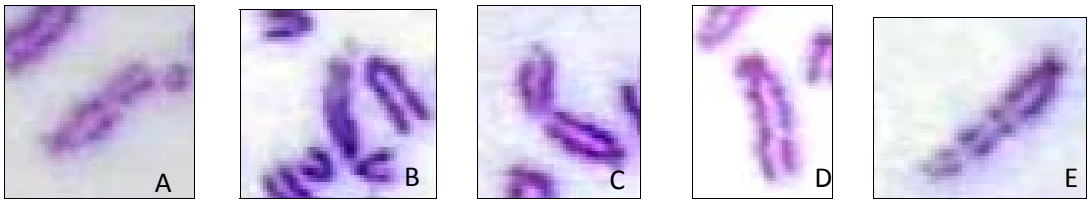

Figura 10. Lesiones en OARX de linfocitos inducidos con APC (0,35µM). Se observan las 10 lesiones descritas para la inducción, 6 en región intersticial y 4 en región subtelomérica. Cada OARX de las imágenes pertenece a una metafase distinta.

De 53 lesiones en bibraqueados, solo 17 pudimos asegurar que se encontraban en el OAR1, 10 lesiones quedaron en duda ya que la diferencia en tamaño entre el OAR1 y el resto de los bibraqueados no era notoria en determinadas metafases. De todas maneras podemos observar que las lesiones se distribuyen en las tres regiones del OAR1, con mayor frecuencia en la región intersticial (tabla 6).

Tabla 6. Lesiones en OAR1. Se ven representadas 17 lesiones que son las más confiables en pertenecer al OAR1.

región	lesiones OAR1	%
peric	2	11,8
inter	10	58,8
subtel	5	29,4

5-aza-C (1,5mM) y 5-aza-C (3mM).

En el mismo preparado se encontraron metafases sin respuesta a 5-aza-C (nivel 0), y metafases con los tres niveles de daño. Los resultados de las tabla 7 y 8 marcan que el porcentaje de metafases dañadas (sumando los 3 niveles) es mayor con 1,5mM que con 3mM (47,1% y 43,1% respectivamente), esto no es lo esperable, pero sin embargo esta diferencia es pequeña (4%) y si nos fijamos en los niveles de daño, claramente vemos mayor porcentaje de metafases con mayor nivel de daño en 3mM (5,1% para 1,5mM y 11,2% para 3mM).

También se observó mayor frecuencia de metafases en nivel 2 en la concentración de 1,5mM, sin gran diferencia, 19,4% contra 17%.

Tabla 7. Niveles de daño en inducción con 5-aza-C (1,5mM). **N**: n° de metafases completas e incompletas.

	N	%
nivel 0	42	42,9
nivel 1	32	32,7
nivel 2	19	19,4
nivel 3	5	5,1
total	98	

Tabla 8. Niveles de daño en inducción con 5-aza-C (3mM). **N**: n° de metafases completas e incompletas.

	N	%
nivel 0	130	46,9
nivel 1	69	24,9
nivel 2	47	17,0
nivel 3	31	11,2
total	277	

Ambas concentraciones presentaron el OARX despiralizado. Las metafases donde se logró identificar el OARX despiralizado presentaban un nivel de daño entre 1 y 2 (tabla 9).

Tabla 9. Número de metafases donde se identificó el OARX despiralizado, separadas por niveles y concentración. **N**: n° de metafases completas e incompletas.

	N X desp	
	1,5mM	3mM
nivel 1	9	2
nivel 2	3	12
total	12	14

Segundo cultivo linfocitario, ovino Criollo hembra de San Miguel.

Controles

Se realizaron 2 preparados por cada uno de los tubos controles (1 y 11), donde solo se logró capturar 33 metafases completas y ninguna presentó lesiones (tabla 10). El índice mitótico del tubo 1 fue de 2,9 y el del tubo 11 fue de 1,2. Se observaron dos lesiones espontáneas en monobraqueados autosómicos.

Tabla 10. Lesiones en metafases de controles del segundo cultivo linfocitario.

			lesiones			
tubo	N	N c/lesión	totales	en B	en M	en X
CONTROLES(30´col)	33	0	0	0	0	0

N - n° metafases completas, **B** - bibraqueados, **M** - monobraqueados autosómicos, **X** – cromosoma X.

En el tubo inducido con APC (0,35µM) no se observó material por error en el procedimiento de cultivo, y fue eliminado.

5-aza-C (1,5mM) y 5-aza-C (3mM).

Se realizaron 3 preparados del tubo 5-aza-C (1,5mM) y 2 preparados del tubo con 5-aza-C (3mM), y se capturaron más de 50 metafases por tubo.

Según los resultados presentados en las tablas 11 y 12, notamos que la 5-aza-C en este segundo cultivo mostró menor daño a menor concentración, como era de esperar. A una concentración de 1,5mM no actúo en un 68,3% de las metafases mientras que en 3mM no actuó en el 47,4% de metafases. Las metafases en nivel 3 aumentaron al aumentar la concentración (1,7% a 12,3%), para nivel 2 se mantuvo el porcentaje (8,3 % y 8,2%) y para nivel 1 aumentó (21,7% a 32,2%).

Tabla 11. Niveles de daño en inducción con 5-aza-C (1,5mM). **N**: n° de metafases completas e incompletas.

	N	%
nivel 0	41	68,3
nivel 1	13	21,7
nivel 2	5	8,3
nivel 3	1	1,7
total	60	

Tabla 12. Niveles de daño en inducción con 5-aza-C (3mM). **N**: n° de metafases completas e incompletas.

	N	%
nivel 0	81	47,4
nivel 1	55	32,2
nivel 2	14	8,2
nivel 3	21	12,3
total	171	

Al igual que el primer cultivo, ambas concentraciones presentaron el OARX despiralizado (tabla 13). Para 1,5mM se observó solo una metafases con el X despiralizado, en un total de 60 y correspondía al nivel 1. Para 3mM se observaron 7 de 151 metafases con el X despiralizado distribuidas en niveles 1 y 2.

Tabla 13. Metafases donde se identificó el OARX despiralizado, separadas por niveles y concentración. **N**: n° de metafases completas e incompletas.

	N X desp	
	1,5mM	3mM
nivel 1	1	5
nivel 2	0	2
total	1	7

Discusión

El daño inducido por los agentes clastogénicos utilizados (afidicolina, y 5-azacitidina) sobre cromosomas de ovinos Criollos, permitió comenzar con las primeras experiencias en este material de animal doméstico.

En el primer cultivo se realizó el colchicinado utilizando una variable en el tiempo de 15'; se expusieron los tubos control a colchicina durante 15' y 30' a concentración constante (10µg/mL). Los resultados demostraron diferencias no apreciables confirmadas por el índice miótico (2,8 y 2,5 respectivamente). Según este resultado, la acción de la colchicina no dependería de este intervalo de tiempo, permitiendo entonces trabajar un importante número de tubos en un periodo de aproximadamente 15 minutos. Esto es apoyado en parte por Verma *et al.* (1995) quien en sus técnicas de cultivo linfocitario para humanos describe como preferencial un tratamiento de colchicinado entre 15 y 20 minutos.

En relación a las inducciones con APC y 5-aza-C, los tubos controles presentaron similar cantidad de lesiones espontáneas, 3 lesiones con 15' y 2 lesiones con 30'. La frecuencia de lesiones espontáneas en los controles fue muy baja para ambos cultivos (tablas 4 y 10) por lo que las lesiones observadas en los tubos con agentes clastogénicos serían lesiones inducidas, o probablemente algunas de

ellas que se observan como espontáneas en controles, en este caso sean potenciadas, como se demuestra en humanos (Sutherland, 1985).

Al inducir linfocitos de ovino Criollo con APC (0,35μM) durante las últimas 24 horas de cultivo, los resultados muestran un alto nivel de daño (comparado con el control), donde se observan lesiones en diferentes cromosomas y regiones cromosómicas. El nivel de daño no llega a afectar la integridad de los cromosomas distinguiéndose claramente. Esta concentración (0,35μM) podría ser la óptima o estar cerca de ella, considerando que en humanos y bovinos la concentración usada es 0,30μM (Di Tommaso, 1998; Rodríguez *et al*., 2002), y que los efectos en ovinos son menor que en bovinos a igual concentración (Danielak-Czech y Slota, 2004).

Según lo ya descrito por Sutherland y Hecht (1985) estas lesiones estarían detectando sitios ricos en citocinas, por lo tanto encontramos un alto número de estos sitios en el ovino Criollo con APC (0,35μM). Se observa mayor frecuencia de lesiones sobre monobraqueados autosómicos que sobre bibraqueados, esto es esperable ya que los primeros son 46 y los segundos 6 en una metafase completa; de todos modos, la frecuencia de lesiones sobre bibraqueados no es baja (35,1%), se debe a que estos cromosomas son los de mayor tamaño, aumentando así la probabilidad de que se encuentre una región sensible al inductor.

Se distinguieron sitios con lesiones en el cromosoma 1, fácilmente distinguible por ser el bibraqueado de mayor tamaño, éste mostró una alta frecuencia de lesiones en región intersticial, indicando una zona rica en citocinas.

Pudimos identificar diez lesiones sobre OARX, distribuídas en región intersticial y subtelomérica, claramente representados en la figura 10. Este dato concuerda con estudios realizados por Rodríguez *et al.,* (2004) quienes describen cinco sitios X frágiles en bovinos inducidos con APC (0,15μM y 0,30μM) ya que BTAX y OARX son homeólogos (Di Berardino *et al.,* 2001). Además, Ponce de León *et al*. (1996) mediante técnica Zoo-Fish identifican homeología entre el segmento cromosómico Xp1.2-p1.4 bovino y el segmento Xq3.5-3.8 ovino, este último segmento está ubicado en región intersticial-subtelomérica, coincidiendo con las

lesiones observadas. También podría existir una homología entre éstas lesiones y los cuatro sitios X frágiles descritos por Nicodemo (2008) en Búfalo, quien trabajó con APC (0,15µM).

Al inducir linfocitos de dos muestras sanguíneas de ovinos Criollos pertenecientes a localidades diferentes con 5-aza-C durante el final de G2 (2hrs.) a concentraciones de 1,5mM y 3mM, se observaron cromosomas metafásicos despiralizados. Dentro de un mismo preparado se observaron metafases con distintos niveles de respuesta al inductor, desde ninguna despiralización hasta metafases con cromosomas totalmente "pulverizados".

Comparando ambos cultivos vemos que al aumentar la concentración de 5-aza-C de 1,5mM a 3mM, también aumenta el nivel de daño provocado por el inductor, observándose mayor despiralización de los cromosomas. Metafases con el nivel 2 de daño, se encuentran con similares frecuencias entre las concentraciones, por lo que no podemos seleccionar, una de estas concentraciones como mejor que la otra con el criterio de obtener un mayor número de metafases que presenten despiralizaciones y a la vez integridad de los cromosomas. Esta selección del nivel óptimo de concentración no es del todo confiable ya que son solo dos muestras y pertenecientes a poblaciones distintas.

El daño de este inductor demetilante, permite diferenciar regiones de heterocromatina constitutiva y facultativa probablemente portadora de genes tejido específico, ya que induce despiralización en zonas de la heterocromatina que serían silenciadas (compactadas) por metilación de citosinas, un proceso epigenético de regulación de la trancripción (Haaf y Schmid, 2000; Pintado y Morón, 2002).

En ambos cultivos se logró identificar el cromosoma X inactivo despiralizado, bajo inducción de 5-aza-C, a ambas concentraciones (1,5mM y 3mM), lo que estaría señalando una respuesta de la heterocomatina facultativa frente a este agente (Fig.8). Metafases donde encontramos el OARX inactivo despiralizado, la 5-aza-C estaría actuando a un nivel que afectaría la heterocromatina facultativa del resto de los cromosomas (Haaf, 1995; Haaf & Smith, 2000).

Estos resultados preliminares alientan a continuar con estudios citogenéticos y moleculares. La acción de la APC (0,35uM) sobre los cromosomas demostró una buena respuesta pudiéndose aplicar a trabajos futuros, probablemente un estudio a nivel poblacional, para poder especificar si estas regiones inestables, representan sitios frágiles, conjuntamente realizar un bandeo G para ubicar más precisamente las lesiones y así poder comparar la homeología, y ver que genes podrían estar afectados. En cuanto a 5-aza-C en ambas concentraciones se mostró un amplio rango de niveles de daño, no pudiéndose optimizar una concentración sobre la otra, aunque en ambas se logró identificar el cromosoma X inactivo del ovino despiralizado por primera vez.

Agradecimientos

A mi tutora Dra. Alicia Postiglioni por haberme dado la oportunidad de realizar esta pasantía, y por su continuo apoyo durante la realización de la misma.

A la Dra. Silvia Llambí por la extracción de muestras en la reserva del Parque Nacional de San Miguel y por sus sugerencias en tareas de laboratorio.

Al Profesor Miguel de Bethencourt por su colaboración y sugerencias en la preparación de los medios de cultivo.

A los Br. Wanda Iriarte y Rody Artigas por su colaboración y sugerencias en tareas del laboratorio, y por la extracción de muestras sanguíneas.

Al Lic. Andrés Iriarte por su colaboración en las observaciones citogenéticas.

A la Dr. Viviana Cuñaro por la extracción de las muestras del Zoológico de Villa Dolores.

A la funcionaria Sra. Iris Hernández, por la preparación del material de laboratorio.

En general, a todos los integrantes del Área de Genética de Facultad de Veterinaria (Universidad de la República) por hacerme sentir siempre como un integrante más del equipo de trabajo.

Consulta bibliográfica

- Alberts, Bruce *et al.*(1996). Biología Molecular de la célula. Barcelona: Ediciones Omega. ISBN 84-282-1011-X.
- Artigas, R., Iriarte, W., de Soto, L., Iriarte, A., Llambí, S., de Bethencourt, M., Postiglioni,A. 2008. Descondensación de la heterocromatina en bovinos criollos portadores de la translocación rob (1;29). Acción del inductor 5-aza-C. Acta Agron (Palmira).57(1) p65-69.
- Artigas, R., Iriarte, A., Tellechea, B., Llambí, S., De Bethencourt, M., Postiglioni, A. Aphidicolin induces break points in heterozygous Robertsonian translocation rob(1;29) from Uruguayan Creole cattle. Journal of Basic and Applied Genetics (In press).
- Bruére AN, Chapman HM, Jaine PM, Morris RM. 1976. Origin and significance of centric fusions in domestic sheep.J Hered. May-Jun;67(3):149-54.
- Bruére AN, Ellis PM. 1979. Cytogenetics and reproduction of sheep with multiple centric fusions (Robertsonian translocations). J Reprod Fertil. 57(2):363-75.
- Bruére AN, Scott IS, Henderson LM. 1981. Aneuploid spermatocyte frequency in domestic sheep heterozygous for three Robertsonian translocations. J Reprod Fertil. 63(1):61-6.
- Chaves R., Adega F., Wienberg J., Guedes-Pinto H., Heslop-Harrison J. 2003. Molecular cytogenetic analysis and centromeric satellite organization of a novel 8;11 translocation in sheep: a possible intermediate in biarmed chromosome evolution. Mammalian genome. pp 706-712.
- Danielak-Czech,B y E. Slota. 2004. Mutagen-induced chromosome inestability in farm animals. Journal of Animal and feed Sciences 13:257:267.
- Di Berardino D, Di Meo G, Gallagher D. 2001. ISCNDB International System for Chromosome Nomenclature of Domestic Bovids. Cytogenet Cell Genet 92: 283-299.
- Di Tomaso, M.V. 1998. Expresión de FRA 3p14 y otros sitios frágiles comunes en linfocitos periféricos de individuos fumadores y no fumadores. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Opción Genética. Depto. de Genética Toxicológica y Patología Cromosómica. IIBCE.

- Di Tomaso, M.V. 2007. Distribución de fracturas inducidas en el cromosoma X de CHO9: Su relación con la síntesis de ADN y la organización de la cromatina. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Opción Genética. Depto. de Genética Toxicológica y Patología Cromosómica. IIBCE.
- Franklin E. Eldrige 1985. Cytogenetic of Livestock.
- Gustavsson, I. 1969. Cytigenetics, distribution and phenotypic effects of a translocation in Swedish cattle. Hereditas 1969;63:68-169.
- Haaf, T. 1995.The effects of 5-Azacitydine and 5-azaDdeoxycytidine on chromosomen structure and function: implications for methylation-associated cellular processes. Pharmac. Thu. Vol. 65. pp. 1946, 1995.
- Haaf, T., Schmid, M. 2000. Experimental condensation inhibition in constitutive and facultative heterochromatin of mammalian chromosomes. Cytogenet Cell Genet 91:113-123.
- Hare, W. C. D y Singh, E. (1979). Citogenética de la Reproducción Animal. Zaragoza, España; Acribia S. A. 80pp.
- Holmquist, G., Ashley, T. 2006. Chromosome organization and chromatin modification: influence on genome function and evolution. Cytogenet & Genome Res114:96-125.
- Krokan,H., Wist, E., Haaland Krokan, R. 1981. Aphidicolin inhibits DNA synthesis by DNA polymerase α and isolated nuclei by a similar mechanism. Nucleic Acids Research.Vol. 9, No. 18 4709-4719.
- Llambí, S. (1995). Estudios Citogenéticos y Amplificación de ADN in vitro en Holando-Uruguayo (Bos taurus) con Problemas Reproductivos. Tesis de Maestría (PEDECIBA). Montevideo, Uruguay. Facultad de Ciencias de la Universidad de la República. 106pp.
- Llambí, S., Núñez,R. 2007. Identification of chromosome fragility using 5'azacytidine in cattle lymphocytes. Arch. Med. Vet. 39, Nº 1, 2007.
- Margaret W. Thompson, Robert L. Nussbaum, Roderick R. McInnes, James Scott Thompson, Huntington F. Willard, Joaquín Salvador Peral, Marta Sedó Fernández. Genética en Medicina: Thompson& Thompsom. Escrito por Publicado por Elsevier España, 2004.

- Mernies, B., Macedo, F., Peralta, D., Fernández, G. 2008. Aspectos relacionados con la permanencia del ovino criollo en el territorio uruguayo. IX Simposio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de recursos Zoogenéticos. Mar del Pata/Bs. As. 2008.
- Nicodemo, D., Coppola, G., Pauciullo, A., Cosenza, G., Ramunno, L., Ciotola, F., Peretti, V., Di Meo, G.P, Iannuzzi, L., Rubes, J., Di Berardino, D. 2008. Chromosomal expression and localization of aphidicolin-induced fragile site in the standard karyotype of river buffalo (Bubalus bubalis) Cytogenet Genome Res 120:178-182.
- Oguro, M., Suzuki-Hori, C., Nagano, H., Mano, Y., Ikegami, S. 1979. Eur. J. Biochem. Y7,603-607.
- Pintado, E., Morón, F. 2001. Metilación y expresión del gen FMR1. Rev Neurol. 33:57-62.
- Ponce de León, F.; Ambady, S.;Hawkins, A.; Kappes, S.; Bishop, M.; Robl, J. y Beattie, C. (1996). Development of a bovine X chromosome linkage group and painting probes to assess cattle, sheep, and goat X chromosome segment homologies. Proc. Natl. Acad. Sci.93: 3450-3454.
- Popescu C.P., Ansari H.A., Bosma A.A., Broad T.E., Brunch T.D., Long S.E., Maher D.W., Pearce P.D.1999. Standard G-, Q-, and R-banded ideograms of the domestic sheep (Ovis aries): homology with cattle (Bos taurus). Report of the committee for the standardization of the sheep karyotype.Cytogenet Cell Genet. 1999;87(1-2):134-42.
- Postiglioni,A., Llambí,S., Arruga,MV. 2001. Fragilidad cromosómica inducida por afidicolina en reordenamientos cromosómicos (1/29) bovinos. Journal of Basic and Applied Genetics (BAG). 2:91
- Postiglioni A, Llambí S, Gagliardi R. De Bethencourt M. 1996. Genetic characterization of Uruguayan Creole cattle. I.Cytogenetic Characterization of a sample of Uruguayan Creole cattle. *Archivos de Zootecnia* 45:(170-171)209-213.
- Postiglioni,A., Llambí,S., Guevara,K. Rincón,G., Arruga,MV. 2002. Common fragile sites expresion in rob(1;29) and their relation with chromosome rearrangements. 15th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals and gene Mapping. . Sorrento, Italia. Chromosome Research 10: (1), 5.

- Rodríguez,V., Llambí,S., Guevara,K., Postiglioni,A., Arruga,M.V. 2001. Analysis of chromosome x fragility induced by aphidicolin in Holando-uruguayo cows (*Holstein-friesian*). Rev. Bras. Reprod. Anim., v.25, n.3, 2001.
- Rodríguez,V., Llambí,S., Postiglioni,A., Guevara,K., Rincón,G., Fernández,G., Mernies,B., Arruga,M.V. 2002. Localization of aphidicolin-induced break points in Holstein-Friesian cattle (Bos taurus) using RBG-banding. Genet. Sel. Evol.34: 649-656.
- Savage, J.R.K.,1976. Annnotation:.Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. Journal of Medical Genetics13:103-122.
- Savage, J.R.K. 1991. Testing the participation of chromosomes in structural aberrations. En: Eukaryotic chromosomes: Structure and functional aspects.(Sobti RC, Obe G, Eds.) Narosa Press, Nueva Delhi, pp 111-125.
- Savage, J.R.K. 1993. Interchange and intra-nuclear architecture. Environmental and Molecular Mutagenesis 22:234-244.
- Sheaff, R., Ilsley, D., Kuchta, R. 1991. Mechanism of DNA Polymerase α Inhibition by Aphidicolin. Biochemistry, 30 (35):8590–8597.
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp Cell Res. 75:304-306.
- Sutherland G, Hecht F 1985. Fragile sites on Human chromosomes. Oxford University Press.
- Tellechea B., Llambí S., de Bethencourt M., Rincón G., Postiglioni A. 2004. Avances en el estudio de la heterocromatina en rob 1;29. Un reordenamiento cromosómico que produce mortalidad embrionaria temprana. XXXII Jornadas Uruguayas de Buiatría. 228-231. 2004.
- Verma, R, Babu, A. 1995. Human chromosomes. Principles and techniques. Mc Graw-Hill.

Anexo

*[1] Cálculos para obtener APC (0,35µM) en un tubo con 5mL de sangre, partiendo de una solución madre de APC (300µM).

$[\ ]_i \cdot V_i = [\ ]_f \cdot V_f$

$V_i = \frac{0{,}35\mu M \cdot 5mL}{300\mu M} = 0{,}0058mL \sim 5{,}8\mu L$

Solución madre:

1mg APC + 10 ml EtOH= 0.3 mM= 300 µM

*[2] Cálculos para obtener 5-aza-C (1mM y 3mM) en un tubo con 5mL de sangre, partiendo de una solución madre de 5-aza-C (10mg/mL).

1 mol = PM 5-aza-C = 244,2mg/mL

1mM_____0,2442mg/mL

$[\ ]_i \cdot V_i = [\ ]_f \cdot V_f$

$V_i = \frac{0{,}2442mg/mL \cdot 5mL}{10mg/mL} = 0{,}1221mL \sim 122\mu L$

1mM_____122µL

3,0mM____366 µL

*[3] *Preparación choque hipotónico con KCl 0,075M*: para 500mL de solución son 2,78 gr KCl y 500mL de ddH_2O.

*[4] *Tampón fosfato Sorensen (ph=6.8)*:

Se preparan por separado dos soluciones, primero se disuelven en 9,08 de KH_2PO_4 (fosfato de potasio) en 50.8ml de ddH_2O, luego se prepara 49,2ml de ddH_2O con 11.8g de $Na_2H\ PO_4$ (fosfato monosódico), esto para un volumen final de 100ml.

Finalmente se mezclan ambas soluciones, bien homogeneizadas, obteniendo así el buffer con el ph deseado (6.8).

Ambas soluciones deben conservarse en la heladera (4°C).

*[5] *Solucion de Giemsa madre*:

Mezclar 1g de Giemsa en polvo con 66ml de metanol homogenizando adecuadamente, luego lentamente se agregan 66ml de glicerol sin dejar de agitar la solución. Una vez que la mezcla se encuentra homogénea se lo ingresa a estufa a 40ºC durante 24 horas. Ya transcurrido este tiempo se lo filltra (con filtro de papel) dentro de la estufa a la misma temperatura.

*[6] Índice mitótico= $\frac{n° \ metafases}{n° \ total \ de \ núcleos} \times 100$