

**Trabajo de pasantía**

**2008-2009**

**Efectos de la afidicolina y 5-azacitidina-C  
sobre cromosomas bibraquiados y sexuales  
en ovinos Criollos Uruguayos.**



**Nombre del pasante:** Irene María da Cruz Güerisoli.

**C.I:**3.812.802-4.

**Carrera:** Licenciatura en Ciencias Biológicas-Orientación Genética y Evolución.

**Año:** 2009

**Lugar de trabajo:** Área Genética. Depto. de Genética y Mejora Animal. Facultad de Veterinaria

**Tutora:** Dra. Alicia Postiglioni

# ÍNDICE

RESUMEN.....	4
I. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. La familia Bovidae y sus especies domésticas ( <i>identificación cromosómica</i> ) .....	6
1.2. Historia y caracterización del cariotipo de <i>Ovis aries</i> .....	7
1.3. Caracterización genética del ovino Criollo.....	9
1.4. Translocación Robertsoniana en el cariotipo del ovino.....	10
1.5. Translocación Robertsoniana (rob1;29) en el cariotipo del bovino.....	11
1.6. Organización de la cromatina y modificaciones epigenéticas.....	12
1.7. Aberraciones cromosómicas.....	13
1.7.1. Aberraciones estructurales ( <i>Clasificación</i> ).....	13
1.8. Aplicación de agentes clastogénicos en cultivos linfocitarios de mamíferos.....	16
1.8.1. Afidicolina.....	16
1.8.2. 5-azacitidina-C.....	18

1.9 Hipótesis.....	20
1.10. Objetivos.....	20
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
2.1. Animales experimentales.....	21
2.2. Diseño experimental.....	21
2.3. Extracción de la muestra sanguínea.....	22
2.4. Preparación del macrocultivo linfocitario.....	22
2.5. Tratamiento del cultivo.....	24
2.6. Inducción de Afidicolina.....	24
2.7. Inducción de 5-azacitidina-C.....	25
2.8. Recolección del macrocultivo.....	25
2.9. Elaboración de las preparaciones citológicas.....	26
2.10. Tinción de las preparaciones.....	26
2.11. Banda G.....	27
2.12. Observación y digitalización de imágenes.....	27
<b>III. RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
3.1. Controles.....	28

3.1.1. Banda G.....	29
3.2. APC 0,3µM.....	30
3.3. 5-azacitidina-C ( <i>Niveles de despiralización</i> ).....	33
3.3.1. 5-azacitidina-C 1,0mM.....	33
3.3.2. 5-azacitidina-C 2,5mM.....	34
3.3.3. Visualización del probable X inactivo despiralizado con 5-azacitidina-C con (1,0mM y 2,5Mm, 2hrs).....	35
IV. DISCUSIÓN.....	36
V. AGRADECIMIENTOS.....	41
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	42
VII. ANEXO.....	49

## RESUMEN

Los ovinos Criollos corresponden a la única raza local del Uruguay que deriva de los primeros animales introducidos desde Europa en el siglo XVII y como consecuencia corresponde a un recurso genético con interés en su conservación. Estudios citogenéticos en esta raza son considerados de base para identificar marcadores cromosómicos que permitan aproximarse a estudios genómicos.

El propósito de esta pasantía fue estudiar el complemento cromosómico de dos ovinos Criollos hembras (por presentar un X genéticamente activo y uno inactivo) profundizando en la estructura cromosómica mediante inductores de actividad clastogénica (afidicolina y 5-azacitidina-C).

La metodología utilizada se basó en cultivos linfocitarios estándares de dos ovinos Criollos hembras, pertenecientes una al Zoológico de Villa Dolores y la otra al Parque Nacional de San Miguel (Rocha). Se obtuvo un número cromosómico de  $2n=54$ , XX organizados en 3 pares de autosomas bibraquiados, 23 pares monobraquiados y un par sexual de morfología acrocéntrica. Se utilizaron dos inductores: la afidicolina (APC,  $0,3\mu\text{M}$ ; 24hrs), que nos aproxima a regiones específicas del genoma ricas en citocinas, identificando lugares de inestabilidad en el complemento cromosómico; y el análogo de base 5-azacitidina-C (5-aza-C,  $1,0\text{mM}$  y  $2,5\text{mM}$ ; 2hrs.) que actúa como un inhibidor en la condensación de la heterocromatina. Este agente es demetilante de citocinas y consecuentemente involucrado en la remodelación de la cromatina durante el ciclo celular. Para el estudio con APC se consideraron dos poblaciones de metafases: **a)** metafases completas ( $2n=54$ , XX) y **b)** metafases incompletas pero presentaban los 6 cromosomas bibraquiados. En ambos casos se identificaron lugares con lesiones en regiones proximales al centrómero, telómero e intersticial de cromosomas bibraquiados. Las frecuencias de lesiones en bibraquiados obtenidas en metafases completas (26%) y metafases incompletas (21,4%) permitieron observar que es igual realizar evaluaciones de lesiones, tomando únicamente a los bibraquiados, como muestra de trabajo. Esto favorece el estudio, de lesiones en determinadas muestras de cromosomas cuando el índice mitótico es bajo.

En el caso de 5-aza-C (1,0mM y 2,5 mM; 2hrs.) se discriminaron tres niveles de despiralización de la cromatina: Nivel 1) las metafases presentan muy pocas descondensaciones y puntos de ruptura; Nivel 2) los cromosomas presentan numerosas descondensaciones en cada metafase, pero preservan su individualidad observándose regiones condensadas en el largo cromosómico y Nivel 3) presentan tantas descondensaciones que dan un aspecto de cromosomas pulverizados, perdiendo su individualidad. Ambas concentraciones con el mismo tiempo de tratamiento (final de G<sub>2</sub>) permitieron observar descondensaciones localizadas en los cromosomas bbraquiados (regiones proximales al centrómero, intersticiales y proximales al telómero) y en cromosomas sexuales. Dentro del nivel 2, se observa la despiralización del probable cromosoma X inactivo, mientras que su homólogo permanece casi inalterado. La concentración de 1,0mM, 2hrs en la muestra sanguínea 1 evidenció un 41,5% de metafases con lesiones cromosómicas mientras que se observó un 42,4% para la muestra sanguínea 2 a pesar de que pertenecen a establecimientos diferentes. La concentración de 2,5mM, 2hrs sólo se analizó en la muestra 1 evidenciándose un 42,7%. En relación al nivel 2 de la muestra 1, se obtuvo un 37% de células con lesiones cromosómicas a 1,0mM mientras que para la concentración de 2,5mM se observó inducción del 25% de las células. Por otro lado para el nivel 3 se observó un 18,6% de células inducidas a 1,0 mM a diferencia de un 28,2% para la concentración de 2,5 mM. Estos estudios preliminares permiten acercarnos a un rango de concentración entre 1,0mM y 2,5mM. Para llegar a conclusiones más certeras que permitan encontrar asociaciones con reordenamiento cromosómicos, se debe aumentar la curva de concentración para ambos agentes, realizar estudios comparativos y posteriormente estudiar el sexo macho.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. La familia Bovidae y sus especies domésticas (*identificación cromosómica*)

La familia de los Bóvidos pertenece al orden artiodáctilo con 142 especies y 42 géneros. Dentro de esta familia se encuentra la subfamilia Caprinae, con dos géneros de especies domésticas, los géneros *Capra* y *Ovis*. Todas las razas domésticas de ovinos descienden del muflón *Ovis musimon* ( $2n=54$ ), siendo uno de los representantes *Ovis aries* ( $2n=54$ ). Todas las razas domésticas de caprinos descienden de la cabra salvaje o beosar de Pasang, *Capra aegagrus* ( $2n=60$ ).

La familia de los Bóvidos también incluye otros mamíferos domésticos, los grandes *Bovinae*. Esta sub-familia comprende a los bovinos; entre ellos *Bos indicus* con joroba y características que los hacen viables para regiones cálidas y *Bos taurus* sin joroba, ampliamente extendidos en nuestro planeta y aptos para regiones no tropicales. Ambas especies, con  $2n=60$ , presentan diferencias en la morfología del cromosoma Y (Sánchez *et al.*, 2007).

Estas especies presentan gran relevancia económica para distintos subproductos alimenticios y comerciales.

Dentro de esta familia se ha ampliamente demostrado que los procesos de fusión y fisión de los brazos cromosómicos, juegan un papel fundamental en la especiación cromosómica (Moreno Millán y Rodero, 1990). Como resultado se observaron diferencias en la dotación cromosómica estableciéndose variación en el número de cromosomas con una relativa conservación del número de sus brazos. Si bien los reordenamientos cromosómicos constituyen un importante mecanismo en la evolución de las especies, estas combinaciones también intervienen en el procesamiento de la transcripción y regulación génica.

Existe amplia documentación sobre fenómenos biológicos observados fuera de la genética Mendeliana como la epigenética, y dentro de ella el “*genome imprinting*”. A nivel evolutivo se transforman en mecanismos de aislamiento reproductivo, y en las especies domésticas antes mencionadas, podrían presen-

tar efectos fenotípicos no esperados debido a alteraciones en la expresión de determinados genes (Vrana *et al.*, 2008).

## 1.2. Historia y caracterización del cariotipo de *Ovis aries*.

Desde principios de siglo XX se vienen estudiando, desde el punto de vista citogenético, las especies *Ovis aries* y *Capra hircus* por sus relaciones evolutivas.

Woodsdaleck, (1922) fue el primero en determinar el número cromosómico del género *Ovis* ( $2n=33$  cromosomas). Posteriormente Shivago, (1931) establece definitivamente el número modal ( $2n=54$ ) del género *Ovis* y ( $2n=60$ ) para el género *Capra*.

A lo largo de la evolución cromosómica han jugado un papel muy importante las translocaciones, y más concretamente las Robertsonianas. De acuerdo con los trabajos de Wurster y Benirschke (1968) Nadler *et al.*, (1971), Bruère, *et al.*, (1972) y Schnedl y Czaker (1974), los cromosomas metacéntricos del género *Ovis* han sido fruto, a lo largo de su evolución, de sucesivas translocaciones Robertsonianas autosómicas a partir del cariotipo ancestral de  $2n=60$  con la consiguiente pérdida de material cromosómico. Debido a las sucesivas translocaciones de cromosomas acrocéntricos y a una selección precigótica se ha dado lugar, a partir del cariotipo ancestral, a una reducción secuencial del número  $2n=60$  a  $2n=54$  en el caso del género *Ovis*, y en el caso del género *Capra* se ha mantenido el número cromosómico ancestral de  $2n=60$  (Moreno Millán y Rodero, 1990). Estos autores tuvieron como objetivo realizar un estudio comparativo de los cromosomas de *Ovis aries* y *Capra hircus* a partir de las longitudes relativas de sus brazos cromosómicos para demostrar la relación evolutiva existente entre ambas especies. Mediante estudios estadísticos sobre las medidas de sus cromosomas, estos autores han observado, por una parte, a partir de que cromosoma se han formado los cromosomas bibraquiados de *Ovis aries* y por otra parte, la existencia de una pérdida de material cromosómico en la evolución del cariotipo primitivo (*Capra hircus*) al cariotipo evolucionado (*Ovis aries*). Estos resultados hacen referencia al obtenido por White (1954), que sugirió que la formación de cromosomas bibraquiados implicaba una rotura cerca del centrómero en un cromosoma acrocéntrico y una posterior

fusión con otro también acrocéntrico. También Evans *et al.*, (1973) concluyó que a partir de estructuras dicéntricas la cantidad de material heterocromático centromérico va disminuyendo a lo largo de la evolución apoyando los estudios de los autores mencionados.

Eldridge (1985) caracterizó a la especie *Ovis aries* por poseer un número  $2n=54$ , diferenciándose los 3 primeros pares, de morfología sub o metacéntrica, del resto de los cromosomas de morfología acrocéntrica. La morfología del cromosoma X se determinó por técnicas citogenéticas convencionales, siendo el más largo de los cromosomas acrocéntricos (Moreno Millán y Rodero, 1990). Sin embargo recientemente, mediante técnicas de bandeado cromosómico R, G, Q, y a través de diversas sondas de marcadores para obtener un mapeo con F.I.S.H. se ha logrado estandarizar ideogramas que permiten la identificación, casi indiscutible, de cada uno de los cromosomas de las 4 especies domésticas identificadas como: *Bos taurus* (BTA), *Ovis aries* (OAR), *Capra hircus* (CHI) y al Búfalo de río *Bubalus bubalis* (BBU). Asimismo se definió el Sistema Internacional de Nomenclatura Cromosómica en Bovinos Domésticos ISCNDB 2000 (Di Berardino *et al.*, 2001).

A través de la elaboración de estos mapas (ISCNDB, 2001) se pudo elucidar que el metacéntrico más grande de la oveja (OAR1) se habría originado a través de la fusión céntrica de CHI1 y CHI3. De la misma forma se observó la homeología entre OAR1p con BTA3 y OAR1q con BTA1

El segundo cromosoma metacéntrico de OVA se formaría por la fusión céntrica de CHI2 y CHI8, y el tercer metacéntrico por la fusión de CHI4 y CHI9.

Por otro lado la relación con el bovino es de OAR2p con BTA8 y OAR2q con BTA2 y por último OAR3p con BTA11 y OAR3q con BTA5 (Di Berardino *et al.*, 2001).

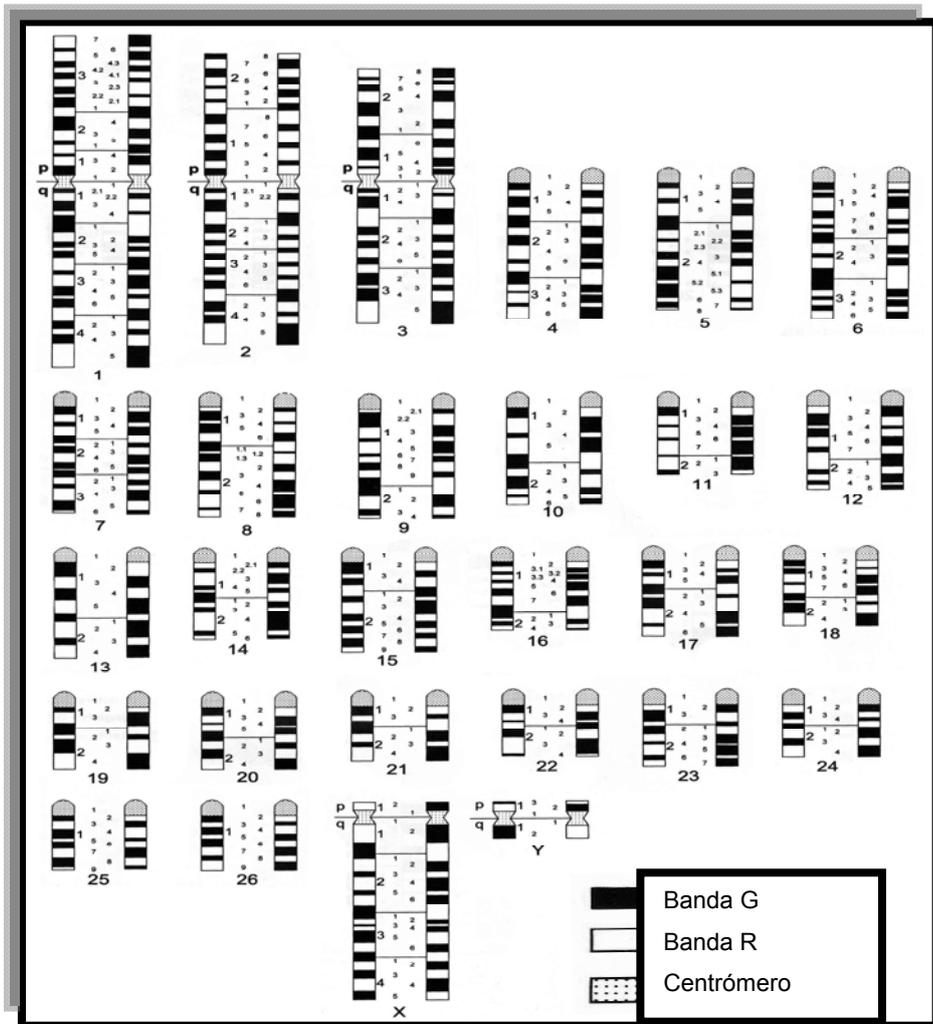


Fig.1.- Ideograma de *Ovis aries* con bandeo G y R, extraído de ISCNDB, 2001.

### 1.3. Caracterización genética del 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. Esta raza se caracteriza por ser pequeña y de perfil fronto-nasal rectilíneo. La altura promedio corresponde a unos 65cm en hembras y 76cm en machos. Los machos pueden presentar policerismo (dos pares de cuernos).

La capa presenta gran variación de colores (blanca uniforme, cárdena, marrón y negra). Las mucosas y pezuñas pueden o no estar pigmentadas.

Su vellón es liviano (2 Kg) y poco uniforme con mezcla de fibras gruesas (30-40 $\mu$ ) y finas (20 $\mu$  en promedio). 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 (Mernies *et al.*, 2007).

Su caracterización cromosómica realizada en esta pasantía demuestra un número diploide cromosómico de  $2n=54$ , similar a lo documentado para otras razas comerciales de la especie *Ovis aries*. Las primeras observaciones fueron presentadas a discusión en las Primeras Jornadas Uruguayas de Genética (da Cruz *et al.*, 2008; Grasso *et al.*, 2008; Graziano *et al.*, 2008).

#### **1.4. Translocación Robertsoniana en el cariotipo del ovino.**

En la especie *Ovis aries*, la alteración más frecuente encontrada corresponde a translocaciones Robertsonianas. Estas alteraciones que, cuando se expresan en condición de heterocigosis produce subfertilidad en bovinos, no presentan un efecto similar en majadas de ovinos comerciales (Bruère, 1974; Bruère y Chapman, 1974). Estas diferencias de alto impacto a nivel reproductivo se fundamentan por el efecto de una selección a nivel gamético, es decir que gametos desbalanceados, aneuploides secundariamente se degenerarían antes de completar la gametogénesis, no participando del proceso de fertilización y por lo tanto no existiendo pérdida de embriones (Gonçalves *et al.*, 1994).

Se han reportado 6 fusiones céntricas de acuerdo a ISCNDB (2001), tales como t1 (6;24) (Bruère 1969), t2 (9;10) y t3 (7;25) (Bruère *et al.*, 1972) luego posteriores estudios localizaron otras translocaciones como t4 (5;8) y t5 (8;22) explicadas por Pearce *et al.*, (1994) y finalmente t6 (6;26) (Murthy *et al.*, 1995), (Chaves *et al.*, 2003).

Las translocaciones cromosómicas son los rearrreglos más comunes en mamíferos alterando al ADN centromérico (ADNs alfoides) que contienen ADN repetido en tándem (ADN satélite). Con el fin de estudiar la naturaleza de las fusiones cromosómicas, en los cromosomas bibraquiados Chaves *et al.*, (2003) describen una nueva translocación Robertsoniana representada por OAR8 y OAR11 sin efectos fenotípicos en el portador. Demostró la naturaleza dinámica de la organización de los ADN satélites en la región centromérica y su importancia en la arquitectura y evolución del genoma. A través de bandeado C se reveló un gran bloque de heterocromatina y la naturaleza dicéntrica de esta translocación. A diferencia del patrón de bandeado observado en OAR1, 2, 3, X e Y, se observó que asentaban muy poco de heterocromatina constitutiva. Los autores

identifican los cromosomas involucrados en la translocación utilizando técnicas de bandeado G, y técnicas de hibridación *in situ* (F.I.S.H.) con sondas para SATI y SATII en los cromosomas 8 y 11. Se comprobó que si los patrones ancestrales de ADN satélite de todos los autosomas acrocéntricos eran similares, entonces OAR 1, 2, y 3 habrían sufrido una reorganización compleja de las secuencias satélites I y II en el proceso evolutivo. Por lo tanto la nueva t(8;11) proporciona fuerte evidencia de ser un paso intermedio en la evolución de los cromosoma bibraquiados de *Ovis aries*.

### **1.5. Translocación Robertsoniana (rob1;29) en el cariotipo del bovino.**

La translocación Robertsoniana rob1;29 fue descrita por primera vez por Gustavsson y Rockborn (1964), y ha sido reportada por ser la fusión céntrica con mayor frecuencia en bovinos (Chaves *et al.*, 2003)

Se la ha estudiado a nivel genético, reproductivo y evolutivo por considerarla un polimorfismo cromosómico que en heterocigosis trae problemas de subfertilidad por mortalidad embrionaria temprana (Dyrendahl y Gustavsson 1979). Esta translocación es de tipo monocéntrica (Di Meo *et al.*, 2006), no presentando ningún efecto fenotípico visible en los portadores. Sin embargo, se ha observado un enlentecimiento en el desarrollo de los embriones portadores de estas aneuploidías frente a embriones normales, promoviendo causas endógenas de origen genético que intervienen en las distintas etapas del desarrollo prenatal, provocando la disminución de las tasas de fertilidad (Artigas *et al.*, 2007). Diversas fuerzas selectivas en todos los estadios del desarrollo contribuyen a una alteración de la tasa generacional, teniendo consecuencias de reducción en la fertilidad, debido a la mortalidad embrionaria. Esto es atribuible a factores genéticos o epigenéticos que incidirían en ciertas problemáticas reproductivas debidas a reordenamientos internos de la cromatina donde estarían involucradas secuencias dinámicas de su genoma (Artigas *et al.*, 2007).

## 1.6. Organización de la cromatina y modificaciones epigenéticas

La organización de la cromatina y las modificaciones estructurales que ésta experimenta, relacionadas con la expresión de los genes, la duplicación del ADN o la progresión del ciclo celular, pueden estar involucrados con la producción, frecuencia y distribución de aberraciones cromosómicas (Alberts *et al.*, 2002).

El término cromatina lo determinó Flemming en 1882 llamándole a la sustancia que compone el núcleo eucariótico con afinidad por colorantes con PH básico. Según sus características iso o heteropícnóticas, se reconocen dos estados de la cromatina: eucromatina y heterocromatina, respectivamente.

Una vez establecidos dichos estados, son mantenidos somáticamente como conformaciones heredables epigenéticamente. Ambos estados de la cromatina, no obstante, se caracterizan por ser dinámicos: la eucromatina remodela su organización a lo largo del ciclo celular, presentando durante la mitosis un grado de compactación mayor al que posee en la interfase; la heterocromatina, en cambio, presenta siempre un estado altamente condensado, experimentando relativamente pocos cambios en su grado de compactación durante el ciclo celular (Albert *et al.*, 2002).

El mantenimiento del estado de la cromatina así como sus cambios conformacionales dependen de factores que actúan de manera epigenética, tales como: **I-** metilación del ADN y unión de proteínas a promotores metilados de los genes, **II-** modificaciones covalentes de los extremos amino-terminales de las histonas (acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación) que limitan las interacciones de estas proteínas con el ADN (Jenuwein y Allis, 2001), **III-** interacción con complejos proteicos remodeladores de la cromatina dependientes de energía que emplean la hidrólisis del ATP para cumplir sus funciones (Sif *et al.*, 1998), **IV-** interacción con pequeños ARN de interferencia que promueven la heterocromatinización (Holmquist y Ashley, 2006).

La eucromatina es transcripcionalmente activa durante la interfase. La heterocromatina facultativa y la  $\alpha$ -heterocromatina constitutiva son genéticamente silenciadas. La heterocromatina facultativa es el resultado de la compensación de dosis por la inactivación de uno de los cromosomas X en mamíferos. Uno de los dos cromosomas X en las células de las hembras de mamíferos es silen-

ciado transcripcionalmente y condensado a través del ciclo celular (Lyon, 1972; Heard *et al.*, 1997). La  $\beta$ -heterocromatina constitutiva, descrita por Heitz (1934) en *Drosophila* y posteriormente identificada en mamíferos (Taruscio y Manuelidis, 1991) presenta genes que se expresan a pesar de su estado heterocromático.

Los cromosomas de los mamíferos están constituidos por una sucesión de compartimentos contiguos (Therman y Susman 1992), que difieren en el grado de compactación de la cromatina y a la vez, en su contenido en secuencias de bases, tiempo de replicación y expresión génica (Holmquist, 1989). Esta distribución de los genes en compartimientos con diferente estructura de la cromatina y momento de la replicación permite realizar un control epigenético de su expresión. Adicionalmente, las características tanto estructurales como funcionales de estos compartimientos podrían constituir factores capaces de modular la distribución del daño cromosómico (Extraído de la tesis Doctoral de Di Tomaso, M.V., 2007).

## **1.7 Aberraciones cromosómicas**

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

### **1.7.1 Aberraciones estructurales (*Clasificación*).**

Las aberraciones estructurales constituyen modificaciones espontáneas o inducidas en la estructura cromosómica. Pueden ser clasificadas en cuatro tipos básicos: deleciones 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 cromosoma o hacia otro cromosoma).

Las alteraciones en los cromosomas que surgen durante el período  $G_1$  de la interfase, o sea cuando el cromosoma aún no ha sido replicado, se denominan aberraciones tipo cromosoma (cuando afectan ambas cromátidas). Se denominan, en cambio, aberraciones de tipo cromátida (cuando involucra una sola cromátida) a aquellas que se producen en cromosomas ya replicados, es decir que se encuentran en el período  $G_2$  del ciclo celular. Ambas se pueden subdividir en discontinuidades (fracturas) y reordenamientos. Las aberraciones del tipo cromátida o cromosómica pueden configurar cambios simétricos o asimétricos. Se denominan cambios simétricos a aquellos que implican un reordenamiento del material genético por diferentes mecanismos pero no conllevan a la pérdida de información hereditaria. Los de tipos asimétricos, implican en general, pérdida de información genética habitualmente bajo la forma de fragmentos acéntricos (Savage 1976, 1991, 1993)

Existe una amplia clasificación de aberraciones estructurales tanto de cromátida como de cromosoma, pero se enfocará en aquellas detectadas en esta pasantía. Las figuras 1 y 2 presentan a manera de esquema la clasificación de lesiones cromosómicas tipo cromosoma y tipo cromátida según Savage (1976; extraído de la tesis Doctoral de Di Tomaso, M.V., 2007).

### *Aberraciones tipo cromosoma*

#### Discontinuidades

#### 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.

#### Delección terminal o fractura cromosómica

Se origina por la producción de una fractura en un brazo cromosómico. Esta lesión inicial se amplifica 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.

## TIPO CROMOSÓMICO



Fig. 2.- Clasificación de aberraciones cromosómicas estructurales de tipo cromosómico según Savage (1976)

*Aberraciones tipo cromátida.*

Discontinuidades

### 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.

## TIPO CROMÁTIDA



Fig. 3.- Clasificación de aberraciones cromosómicas estructurales de tipo cromátida según Savage (1976)

## **1.8 Aplicación de agentes con acción clastogénica en cultivos de linfocitos en mamíferos.**

La etapa del ciclo celular en la que se induce el daño genético origina patrones de aberraciones cromosómicas diferentes según el tipo de agente con actividad clastogénica empleado para producir lesiones en el ADN. Si bien los denominados agentes clastogénicos S-dependientes lesionan el ADN en cualquiera de las etapas del ciclo celular, la conversión de las lesiones moleculares en aberraciones cromosómicas de tipo cromátida requiere la replicación del material hereditario. En la mitosis subsiguiente, por tanto, sólo las lesiones del ADN inducidas durante la fase de G<sub>1</sub> (y no las originadas en G<sub>2</sub>) se expresan como aberraciones cromosómicas (Obe, *et al.*, 1992).

La incorporación en los cultivos linfocitarios de agentes con acción clastogénica (agentes capaces de producir aberraciones cromosómicas) difieren en su acción a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>) ya sea en forma cuantitativa o cualitativa.

Existe gran diversidad de éstos, con los cuales se pueden analizar sus efectos sobre la cromatina durante el ciclo celular. Para ello se deben estimular las células para que ese ciclo dinámico se realice más de una vez. Los cultivos linfocitarios en mamíferos nos permiten cumplir con esa necesidad. La afidicolina y 5-azacitidina-C son agentes con actividad clastogénica S-dependientes. Este grupo produce lesiones en el ADN en cualquiera de las etapas del ciclo celular, pero para visualizar las aberraciones cromosómicas se requiere que la cromatina atraviese una fase de replicación normal para convertir dichas lesiones en aberraciones del tipo cromátida como se mencionó anteriormente.

### **1.8.1. Afidicolina**

La afidicolina (APC) es un tetracíclico diterpenoide aislado de *Cephalosporium Aphidicola*. Es un potente inhibidor selectivo de la DNA polimerasa  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  (Tedeschi *et al*, 2004), actuando a nivel de la replicación así como también a través de diversos mecanismos de reparación del ADN (Speit y Schutz, 2008). Las células en fase S en presencia de afidicolina inhiben la síntesis de ADN,

mientras que las células en otras fases del ciclo celular continúan su ciclo deteniéndose en el límite G<sub>1</sub>/S (Sheaff *et al.*, 1991).

La inhibición de la DNA polimerasa  $\alpha$  fue reportada debido a su actividad competitiva a la incorporación con dCMP (Krokan *et al.*, 1981). Estos autores sugieren que aunque la afidicolina no es estructuralmente similar a ninguno de los dNTPs la competición por la unión al sitio de la DNA polimerasa es el mecanismo de acción que mejor se ajusta a la realidad. 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 en la afidicolina 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 la afidicolina se podría unir al sitio de dCTP e inhibir completamente la actividad de la DNA polimerasa  $\alpha$  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 DNA polimerasa  $\alpha$  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).

Por lo tanto la afidicolina permite identificar regiones de inestabilidad en la cromatina rica en GC, debido a su efecto de antagonismo competitivo con la DNA polimerasa  $\alpha$ . Permite evidenciar regiones en el genoma predispuestas a sufrir aberraciones cromosómicas, sitios preferenciales para la inserción de virus, sitios frágiles, entre otros. Los sitios frágiles son regiones del cromosoma con tendencia a sufrir alteraciones tales como fracturas y discontinuidades que nos estarían indicando sitios de inestabilidad genómica (Sutherland, 2003). Estas regiones se pueden manifestar en forma espontánea en condiciones normales de cultivo celulares, pero otras regiones cromosómicas se rompen no al azar y bajo ciertas condiciones del cultivo como la adición de sustancias químicas inductoras altamente específicas (Fundia y Larripa 1996). La clasificación de los mismos ha sufrido una constante evolución debido a la manifestación citogenética variable y su desigual frecuencia de aparición. Estos se clasifican en raros

y comunes. Los comunes se han observado en todos los organismos y representan un componente normal en la estructura cromatínica, siendo inducidos por afidicolina entre otras drogas (Sutherland *et al.*, 1998). Son sitios conservados evolutivamente con lo que su detección es de gran importancia para el conocimiento de estas regiones cromosómicas para profundizar en estudios filogenéticos y patologías en especies animales.

### 1.8.2 5-azacitidina-C

La metilación del ADN es uno de los mecanismos epigenéticos implicados en la regulación de la expresión génica en los mamíferos. Es vital en el desarrollo embrionario y tiene un papel crítico en el silenciamiento de genes específicos durante la diferenciación celular. Además, participa en la represión de elementos transponibles pudiendo funcionar como un mecanismo de defensa o podría participar en el proceso evolutivo, mantener la estabilidad del genoma, la impronta genética, la inactivación del X entre otras (Rodríguez *et al.*, 2004).

La metilación del ADN en dinucleótidos CpG es uno de los mecanismos epigenéticos implicados en la regulación de la expresión génica en mamíferos. Los patrones de metilación son específicos para cada especie y tipo de tejido. La maquinaria implicada comprende diferentes proteínas reguladoras incluyendo a las ADN metiltransferasas, demetilinas putativas, proteínas de unión a CpG metilados, enzimas modificadoras de histonas y complejos remodeladores de la cromatina. (Rodríguez *et al.*, 2004).

El término epigenética ha sido definido como "*los cambios heredables en la expresión génica que ocurren sin una alteración en la secuencia de nucleótidos del ADN.*" Así, un mecanismo epigenético puede ser entendido como un sistema complejo para utilizar selectivamente la información genética, activando y desactivando diversos genes funcionales (Vrana, 2007).

En mamíferos la metilación del ADN se refiere a la inserción de grupos metilo (CH<sub>3</sub>) en la base nitrogenada citosina. Más detalladamente es el cambio de la deoxicitocina (d<sup>m</sup>C), en presencia de un sustrato que dona los grupos metilo y una enzima que se encarga de transferir dichos grupos. Esta enzima es la ADN metiltransferasa, la cual cataliza la transferencia de grupos metilos del sustrato S-metilcitocina a la citosina produciendo 5-metilcitosina y S-

adenosilhomocisteína. La  $d^mC$  se encuentra en los dinucleótidos CG, secuencias que en 70-80% se encuentran metiladas. Muchas secuencias CGs llamadas islas CpG (por encontrarse en grupos y unidas por grupos fosfatos) no están en su mayoría metiladas. Las islas CpG tienen múltiples sitios de unión a factores de transcripción, actúan como promotores con lo que aproximadamente la mitad de los genes están asociados a islas CpG (Gómez *et al.*, 2006).

La 5-azacitidina-C (5-aza-C), es un análogo de la citosina con un átomo de nitrógeno que reemplaza al carbono en la posición 5 del anillo de pirimidina. No altera estéricamente la estructura de la hélice de ADN, pero el nitrógeno en la posición 5 no puede ser metilado. En este escenario con una ronda de replicación y con la presencia de este análogo es suficiente para que el ADN quede hemimetilado. Para que ambas hebras queden desmetiladas ocurre luego de una segunda ronda de replicación (Haaf, 1995). Por lo tanto, la 5-aza-C actúa inhibiendo la enzima ADN metiltransferasa, inhibiendo la metilación del ADN e impidiendo el mantenimiento de la metilación (Haff, 1995).

La inhibición en la condensación de diferentes tipos de cromatina (heterocromatina constitutiva y facultativa) es altamente dependiente de la concentración y tiempo del tratamiento con 5-aza-C, indicando los diferentes puntos en que actúa y/o mecanismos que dirigen hacia una descondensación cromosómica (Haff, 1995).

Como se mencionó anteriormente los sitios frágiles comunes también se pueden manifestar por la acción de 5-aza-C. La caracterización de estas regiones de fragilidad heredables nos permite profundizar en el conocimiento de la evolución cariotípica, ya que se encuentran asociadas con regiones de recombinación genética, formación de secuencias repetidas de ADN inestable y sitios de metilación (Llambí *et al.*, 2008).

## 1.9. Hipótesis

La inestabilidad de la cromatina en cariotipos de especies domésticas de la familia Bovidae, en forma particular en ovinos Criollos, está asociada a la acción de agentes clastogénicos que pueden estar relacionadas con reordenamientos cromosómicos.

## 1.10. Objetivos

- I. Conocer e identificar los cromosomas que forman el complemento cromosómico del ovino Criollo.
- II. Identificar lugares de inestabilidad de la cromatina en regiones centroméricas, intersticial y teloméricas de cromosomas bbraquiados, por acción de la afidicolina.
- III. Identificar despiralización de la cromatina por la acción de la 5-aza-C en cromosomas bbraquiados y sexuales.
- IV. Evaluar su probable despiralización en el periodo  $G_2$  del ciclo celular.

## II.MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Animales experimentales.

Se utilizaron dos ovinos Criollos hembras, a los efectos de realizar un estudio experimental primario con los cromosomas de esta especie. La experiencia consistió en inducir cultivos linfocitarios, con potencial expresión diferencial en los cromosomas X de la hembra, lo que fundamenta la elección de este sexo.

Una muestra pertenece al Zoológico de Villa Dolores, Intendencia Municipal de Montevideo, escogidas de una población de 11 ovinos Criollos. La otra muestra fue elegida de una majada de 250 animales ubicada en el Parque Nacional de San Miguel en el departamento de Rocha (33° 40'S y 53° 38'W).

Se extrajo sangre periférica de las dos hembras mencionadas para realizar un macrocultivo de linfocitos estándar.

### 2.2. Diseño experimental

En esta pasantía se pretendió realizar un estudio primario con el complemento genético de *Ovis aries* enfocado a la expresión de dos inductores: APC y 5-aza-C. El inductor APC se trabajó a una concentración de 0,3µM similar a humanos, bovinos (Di Tomaso, 1998; Rodríguez *et al.*, 2002; Artigas *et al.*, 2008). El inductor 5-aza-C, fue utilizado en el período G<sub>2</sub> con concentraciones de 1,0 y 2,5mM. Para ambos animales a estudiar se configuró un diseño de tubos antes de comenzar con el procedimiento del cultivo con todas las variables a tener en cuenta con lo que se diagramó una serie de 6 tubos para el ovino Criollo del Zoológico de Villa Dolores (muestra sanguínea 1) y 4 tubos para el ovino Criollo hembra de la reserva de San Miguel (muestra sanguínea 2), como se muestra en las tablas 1 y 2.

**Tabla 1.-**Muestra sanguínea 1, ovino Criollo hembra perteneciente al zoológico de Villa Dolores

Tubo N° 1	Control (30 min. de colchicina)
Tubo N° 2	Inducción con APC 0,3 $\mu$ M (30 min. de colchicina)
Tubo N° 3	Inducción con 5-aza-C 1,0 mM (30 min. de colchicina)
Tubo N° 4	Inducción con 5-aza-C 1,0 mM (30 min. de colchicina)
Tubo N° 5	Inducción con 5-aza-C 2,5 mM (30 min. de colchicina)
Tubo N° 6	Inducción con 5-aza-C 2,5 mM (30 min. de colchicina)

**Tabla 2.-** Muestra sanguínea 2, ovino Criollo hembra ubicado en la reserva Nacional de San Miguel (Rocha)

Tubo N° 1	Control (30 min. de colchicina)
Tubo N° 2	Control (30 min. de colchicina)
Tubo N° 3	Inducción con 5-aza-C - 1,0 mM (30 min. de colchicina)
Tubo N° 4	Inducción con 5-aza-C - 2,5 mM (30 min. de colchicina)

### **2.3. Extracción de la muestra sanguínea.**

Se realizó extracción de sangre periférica, a cada uno de los ovinos Criollos a analizar. La sangre fue extraída de la vena yugular en condiciones de asepsia, utilizándose un anticoagulante heparina sódica (5.000UI) para evitar la coagulación de la misma.

Se extrajeron 10 ml de sangre por animal. Las jeringas se refrigeraron (5 °C aproximadamente) a los efectos que las muestras se mantuvieran en condiciones aceptables para su transporte al Laboratorio de Genética de la Facultad de Veterinaria (Universidad de la República, Montevideo Uruguay).

### **2.4. Preparación del macrocultivo linfocitario.**

Se utilizó la técnica de cultivo linfocitario convencional que consiste en varios pasos.

#### **a) Siembra**

Por cada animal se sembraron diez gotas de sangre entera en tubos que contenían 5 ml de medio de cultivo completo (ver más adelante).

La siembra se realizó en una cámara de flujo y con mechero, para evitar contaminaciones de las mismas. Los tubos se taparon con tapones de silicona, se identificaron y se sellaron con papel de Parafilm.

Los tubos sembrados, se incubaron en baño maría (Mettler) a temperatura constante, 38,5°C (temperatura corporal de las especies en estudio) durante 72 horas.

### *b) Crecimiento del cultivo.*

El cultivo se realizó en medio completo RPMI 1640+ L-glutamina (GIBCO 11875, Invitrogen) como antibiótico Penicillin-Streptomycin (100µg.ml-1) (GIBCO), Suero Fetal Bovino (GIBCO), como mitógeno Fitoheماغlutinina (Phytohemagglutinin M, Biological industries Kibbutz Beil Haemek, Israel). Las proporciones de cada uno de los reactivos por tubo se presentan en la tabla 5.

EL **RPMI 1640** es un medio de cultivo constituido por aminoácidos, precursores de ácidos nucleicos, sales minerales, en proporciones adecuadas para asegurar la sobrevivencia, reproducción y crecimiento de las células que se mantengan en suspensión en él.

La **Penicilina** y la **Estreptomicina** son antibióticos que se adicionan para proteger al cultivo de infecciones bacterianas.

El **Suero fetal** le aporta al medio factores de crecimiento proteicos que van a favorecer el desarrollo de los linfocitos.

La **Fitoheماغlutinina** es una sustancia de origen vegetal que fue identificada por su capacidad de aglutinar los eritrocitos, además se descubrió que tenían la particularidad de estimular la división de los linfocitos, lo que permite utilizarla en cultivos linfocitarios como un agente mitógeno.

**Tabla 3.-**Se muestra la proporción de cada componente por tubo sembrado

RPMI 1640	5ml
Suero fetal bovino	1,5ml
Fitoheماغlutinina	0,25ml
Antibióticos	0,15ml

### *c) Incorporación de colchicina.*

La colchicina que es una sustancia que inhibe la polimerización de las subunidades de tubulina que constituyen el huso acromático y como consecuencia la mitosis de las células se ve interrumpida en la etapa de metafase, estadio que nos interesa por ser en el que los cromosomas se visualizan con mayor claridad. También aumenta el número de células en dicha fase. Dicha sustancia también provoca contracción y separación de los cromosomas por lo que se debe ser cuidadoso en cuanto a la concentración y al tiempo de exposición, excesos en estos parámetros podrían dar lugar a preparados deficientes (Hare y Singh, 1979).

Se incorporó 0,5ml de Colchicina, (10µg/ml), (Biological Industries Kibbutz Beil Haemek, Israel), a cada tubo 30 minutos antes del sacrificio del cultivo. (Tabla 3 y 4).

## **2.5. Tratamiento del cultivo**

Durante las próximas 72 horas, aproximadamente cada 24 horas desde el momento que se ingresaron los tubos al baño de María se agitaron los tubos para resuspender las células, evaluando el desarrollo de los mismos. Luego de este tiempo todos los eritrocitos decantan y el sobrenadante debe presentar el mismo color que el RPMI indicando que está en las condiciones adecuadas. Si este no es el caso es porque hay algún problema con el crecimiento de las células o está contaminado.

## **2.6. Inducción de Afidicolina**

La inducción de los cultivos linfocitarios con afidicolina (0,3µM) \*<sup>1</sup> (Aphidicolin Sigma AO781-1MG), se realizó 24 hrs. antes de procesar el cultivo (Ver Anexo).

## **2.7. Inducción de 5-azacitidina-C**

Por otro lado la inducción con 5-aza-C se realizó 2 horas antes de la recolección del cultivo, correspondiente al período G<sub>2</sub> del ciclo celular. Se utilizó dos concentraciones diferentes, siendo estas 1,0mM\*2 y 2,5mM\*2(Ver Anexo).

El procedimiento para ambos casos de inducción se realizó en condiciones asépticas. Se sacó el tapón con una pinza, inmediatamente se flambeó y luego sin tocar el tubo se agregaron las sustancias con el tubo inclinado para que se mezcle con el suero.

## **2.8. Recolección del macrocultivo.**

Pasadas las 72 horas de incubación se transfirió el material biológico del tubo de cultivo a tubos cónicos de centrifuga de 15 ml (previa resuspensión) para realizar la centrifugación de las mismas durante 10 minutos a 800rpm con el fin de concentrar los linfocitos. Los tubos de descarte, se dejan en agua corriente con hipoclorito; y los tapones de silicona en agua corriente con detergente neutro. Posteriormente para obtener una mayor separación entre los cromosomas luego del centrifugado y de eliminado el sobrenadante se procedió a incorporar aproximadamente 6ml de solución salina hipotónica (KCL 0,075M)\*<sup>3</sup> sobre las paredes resuspendiendo lentamente con pipeta Pasteur de punta fina para favorece la entrada de líquido a la célula dejándolo actuar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó una pipeta por cada tubo, y se descarto en un recipiente con agua corriente e hipoclorito. Las células expuestas a esta solución se hinchan por ósmosis y así los cromosomas se separan, esto facilitará la posterior observación de los mismos. La hipotonía se cortó con 6 gotas de una solución fijadora metanol-acético (3:1) (conservada en freezer) para detener la acción de la solución hipotónica y producir una fijación uniforme. Luego se procedió a lavado, para ello los tubos fueron nuevamente centrifugados a 800rpm durante 10 minutos. Posteriormente se descartó el sobrenadante, se agregó

solución fijadora y se resuspendió dejándolo actuar durante 15 minutos. Este paso se repitió hasta obtener una suspensión translúcida.

La fijación de linfocitos se realizó mediante la incorporación de la misma solución correspondiente a metanol-ácido acético en las proporciones 3:1 respectivamente. Para ello se descartó el sobrenadante translúcido, se agregó fijador y se resuspendió dejándolo actuar durante 30 minutos. Inmediatamente se conservaron los tubos en la heladera, con tapón de goma y parafilm.

## **2.9. Elaboración de las preparaciones citológicas.**

Se realizaron las preparaciones en portaobjetos limpios, utilizándose la técnica de goteo a la llama que consiste en:

1. Obtener el portaobjeto limpio embebido con metanol 70% sin rotular
2. Se selecciona el tubo de trabajo, se centrifuga 10 minutos a 800rpm se descarta el sobrenadante y se le adicionan solución fijadora 3:1 Se resuspende con pipeta Pasteur.
3. Con la pipeta Pasteur se dejan caer unas gotas de células en suspensión en solución fijadora, sobre el portaobjeto embebido de metanol
4. Al instante se pasa por el mechero y se prende fuego (al quemarse el metanol, la gota de fijador con células en suspensión se distribuye uniformemente sobre el portaobjeto).
5. Luego de consumido totalmente el metanol se escurrieron las gotas de agua que quedaron en el porta objeto, se rotularon y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Es conveniente comprobar la calidad del preparado en el microscopio mediante contraste de fase, antes de la tinción.

## **2.10. Tinción de las preparaciones**

*Tinción de los cromosomas con Giemsa al 3%*

Para la tinción cromosómica se agregó en un coppling 46,5ml de ddH<sub>2</sub>O o agua corriente, 3ml de buffer fosfato Sörensen pH 6,8<sup>\*5</sup> y finalmente 1,5ml de

solución Giemsa madre<sup>\*4</sup>. Se resuspendieron y se sumergieron las preparaciones, previamente secadas a temperatura ambiente, en esta solución durante 15 minutos. A continuación, se retiraron, se lavaron con agua corriente y se las dejó secar a temperatura ambiente. (Ver anexo)

## **2.11. Bandas G**

Las bandas G se producen al teñir con Giemsa los cromosomas, después de haber sometido a los mismos a un tratamiento con tripsina que altera la estructura de las proteínas. Las bandas de tinción clara se producen cuando el tratamiento ha modificado las proteínas no histónicas, de modo que cubren al ADN de un modo más eficaz e impiden la fijación del colorante (Hare y Singh, 1979).

### *Método de digestión con Tripsina (0,025M)<sup>\*6</sup>*

Las preparaciones de tubos control sin inducción se dejaron envejecer a 37°C como mínimo durante 48 hrs. Se prepararon una solución de tripsina al 0,25% en PBS (solución salina fosfatada). En un coppling de 50 ml y a temperatura entre 29° a 30° C (baño de María Memmert), se sumergieron las preparaciones entre 20 y 25 segundos. Se cortó la acción de la tripsina sumergiendo las preparaciones en PBS y posteriormente se lavaron con agua destilada. Las preparaciones se dejaron secar y se tiñeron en Giemsa al 3%, como fue explicado anteriormente.

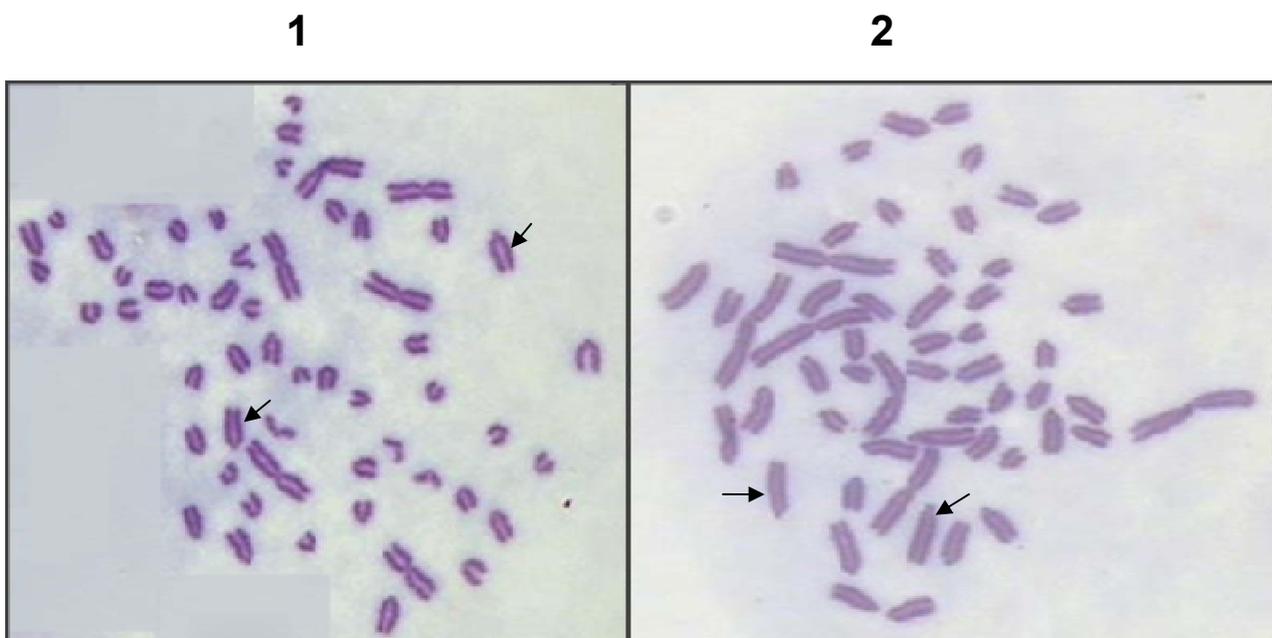
## **2.12. Observación y digitalización de imágenes**

La evaluación y registro de las placas metafásicas se realizó con microscopio óptico Olympus (BX60) y cámara de fotos digital conectada a equipo informático con software de digitalización de imágenes (Kodak Digital Science 1D). La selección de las metafases se realizó primero enfocando el preparado con un aumento pequeño de 10X hasta localizar una zona que contenía metafases. Luego se centró una de ellas y se enfocó con mayor aumento con un objetivo de inmersión de 100X. De esta manera se identificó con gran detalle la morfología de los cromosomas y se los pudo cuantificar.

### III. RESULTADOS

#### 3.1. Tubos controles de inducción (*sin inducción*).

Se analizaron 50 metafases completas para la muestra sanguínea 1 y 33 metafases completas, para la muestra sanguínea 2. Las metafases presentaban el número cromosómico normal de un cariotipo de ovino hembra mostrando un total de 54 cromosomas. Se cuantificaron 46 monobraquiados, 6 bibraquiados y un par sexual monobraquiado. Se constata que la calidad del material de estudio es óptima debido a la baja incidencia de lesiones en los cromosomas (Tabla 4).



**Figura 4.-** Foto de placa metafásica con tinción convencional de Giemsa (obtenida con cámara digital) perteneciente al **1)** ovino Criollo hembra del zoológico de Villa Dolores y **2)** ovino Criollo hembra perteneciente a la reserva San Miguel. Se observa el complemento cromosómico de los ejemplares: 3 pares de autosomas bibraquiados, 23 pares monobraquiados y un par sexual de morfología acrocéntrica ( $2n=54$ , XX). Las flechas indican los probables cromosomas X de las hembras, véase que la calidad del material de estudio es óptima.

**Tabla 4.-** Frecuencia y porcentaje de lesiones en metafases controles (sin inducción) para ambas muestras.

Muestra	Nº de metafases Analizadas	Lesiones cromosómicas.		% en	
		Bibraquiados	Monobraquiados	Bibraquiados	Monobraquiados
<b>sanguínea 1</b>	50	1	2	2%	4%
<b>sanguínea 2</b>	33	0	0	0%	0%



**Fig. 5.** Imagen de una placa metafásica del tubo control (sin inducción), correspondiente a la muestra sanguínea 1. Se indica con la flecha la lesión cromosómica en uno de los 3 pares de bibraquiados.

### 3.1.1. Banda G

Se utilizaron preparados de tubos control sin inducción, para aplicar la técnica de Bando G, de acuerdo a lo expuesto en materiales y métodos.

Las metafases obtenidas no se documentan, por no haber obtenido un bandeo uniforme.

### 3.2. APC 0,3 $\mu$ M

Se establece un diseño de trabajo en el que interesa conocer la frecuencia de sitios de inestabilidad de la cromatina en los cromosomas bibraquiados. Se evaluaron metafases completas 2n=54 y metafases con los 6 cromosomas bibraquiados (metafases incompletas).

Dentro de las metafases completas (N=50), 32 presentaron lesiones y se cuantificaron las mismas según la tabla 5.

**Tabla 5.**- Número y porcentaje de lesiones encontradas en **A**=solo cromosomas bibraquiados, **B**=solo cromosomas monobraquiados, **C**=cromosomas bibraquiados y monobraquiados, en metafases completas (N=50).

<b>Identificación cromosómica</b>	<b>Metafases con lesiones</b>	<b>% de metafases con lesiones</b>
	<b>Total 32</b>	
<b>A</b>	7	21,9%
<b>B</b>	19	59,3%
<b>C</b>	6	18,8%

**Tabla 6.**-Frecuencia y porcentaje del lesiones encontradas en cromosomas bibraquiados en metafases completas (N=50).

<b>Total lesiones en bibraquiados</b>	13
<b>% de metafases con lesiones</b>	26%

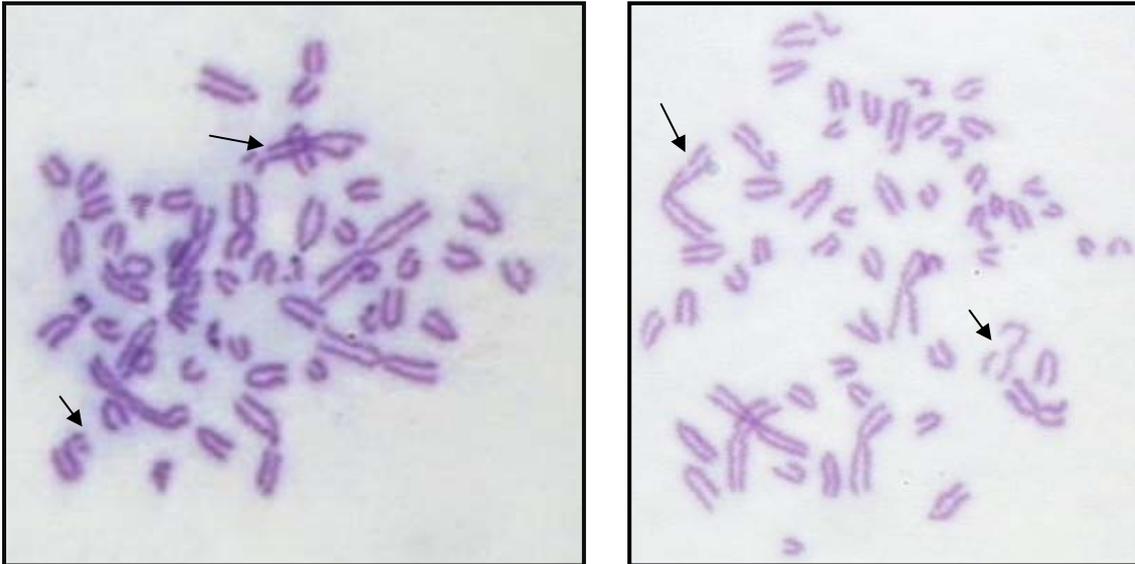


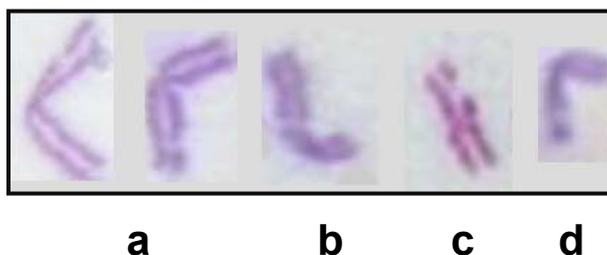
Fig.7. Imágenes de placas metafásicas inducidas con APC 0,3 $\mu$ M para la muestra sanguínea 1. Se observan regiones de inestabilidad de la cromatina en cromosomas bibraquiados y mono-braquiados

Por otro lado se analizaron un total de 70 placas metafásicas incompletas que presentaban los 3 pares de bibraquiados. La presencia de por lo menos una lesión cromosómica en nuestra población de bibraquiados, fue indicador de metafase inducida.

Las lesiones encontradas se clasificaron según como se describió anteriormente en aberraciones cromosómicas estructurales.

**Tabla 7.-** Porcentaje de lesiones observadas en bibraquiados de metafases incompletas y su respectiva clasificación del tipo de lesión producida (N=70).

Metafases con alteraciones cromosómicas	15
Alteraciones estructurales (%)	21,4%
Gap de cromosoma	2
Gap de cromátida	8
Fractura de cromátida/fragmento alineado	4
Fractura cromosómica	1



**Fig. 6.** Se observan las diferentes lesiones en cromosomas bibraquiados como por ejemplo **a)** Gap de cromátida; **b)**Gap de cromosoma; **c)**Fractura de cromátida/fragmento alineado; **d)** Fractura de cromosoma.

**Tabla 8.-** Identificación de regiones de inestabilidad encontradas en bibraquiados. Frecuencia y porcentaje de metafases con lesiones (N=70).

Metafases con lesiones	Regiones donde se encontró inestabilidad
<b>Total 15</b>	
6 (40%)	Proximal al centrómero
4 (26,6%)	Intersticial
5 (33,3%)	Proximal al telómero

### 3.3. 5-azacitidina-C (*Niveles de despiralización*).

La acción de 5-aza-C fue diferencial en el total de metafases analizadas tanto para la concentración de 1,0mM como para la de 2,5mM, 2hrs. Por consiguiente se tomaron en cuenta tres niveles de despiralización con el fin de evaluar las mismas. El nivel 1 las metafases presentan muy pocas descondensaciones y puntos de ruptura. En el nivel 2 los cromosomas presentan numerosas descondensaciones en cada metafase, pero preservan su individualidad observándose regiones condensadas en el largo cromosómico. Las metafases del nivel 3 presentan tantas descondensaciones que dan un aspecto de cromosomas pulverizados, perdiendo su individualidad.

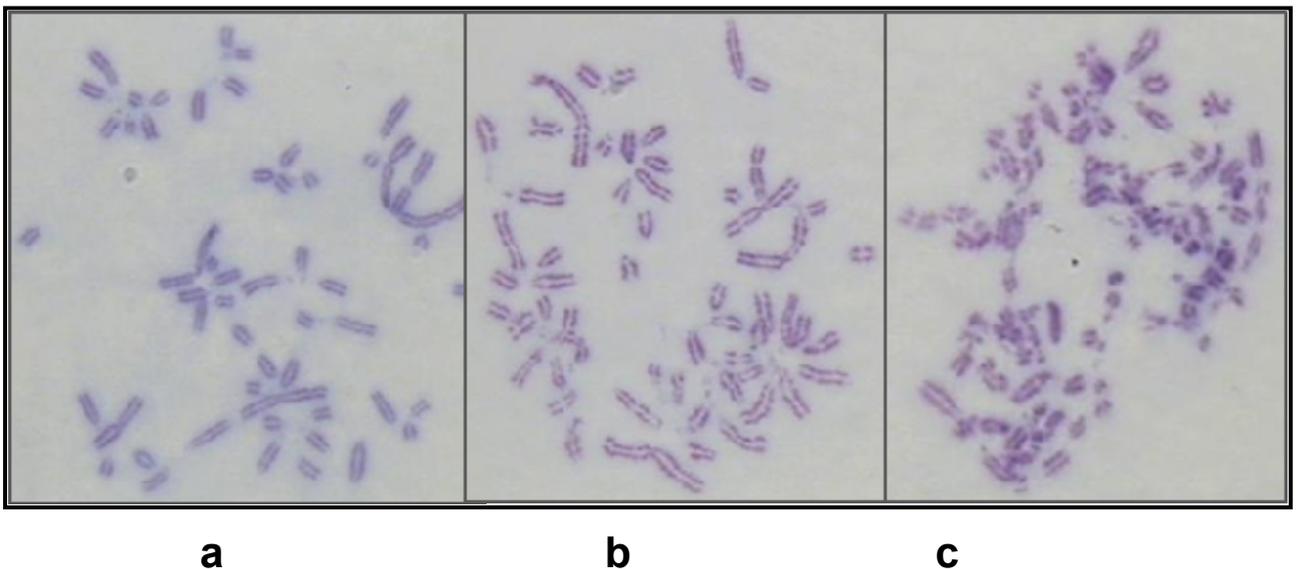


Fig. 8.- Metafases inducidas con 5-aza-C (1,0mM, 2 hrs) en muestra sanguínea 1. a) Nivel 1, b) Nivel 2, c) Nivel 3.

#### 3.3.1. 5-aza-C 1,0 mM

Para la muestra sanguínea 1 se analizaron 65 metafases de las cuales 27 se distribuyeron en los tres niveles descritos anteriormente. Por otro lado para la muestra sanguínea 2 se analizaron un total de 33 metafases en las que se discriminaron 14 divididas con el mismo criterio

**Tabla 9.-** Muestra sanguínea 1 y 2 tratada 5-aza-C 1,0mM, 2hrs. Frecuencias y porcentajes en placas con descondensación cromosómica.

<b>5-aza-C (1,0mM)</b>	<b>N° de metafases analizadas</b>	<b>N° de metafases que no actuó el inductor</b>	<b>N° de metafases que actuó el inductor</b>	<b>Nivel 1</b>	<b>Nivel 2</b>	<b>Nivel 3</b>
Muestra sanguínea 1	65	38 (58,5%)	27 (41,5%)	12 (44,4%)	10 (37,0%)	5 (18,6%)
Muestra sanguínea 2	33	19 (57,6%)	14 (42,4%)	9 (64,3%)	3 (21,4%)	2 (14,3%)

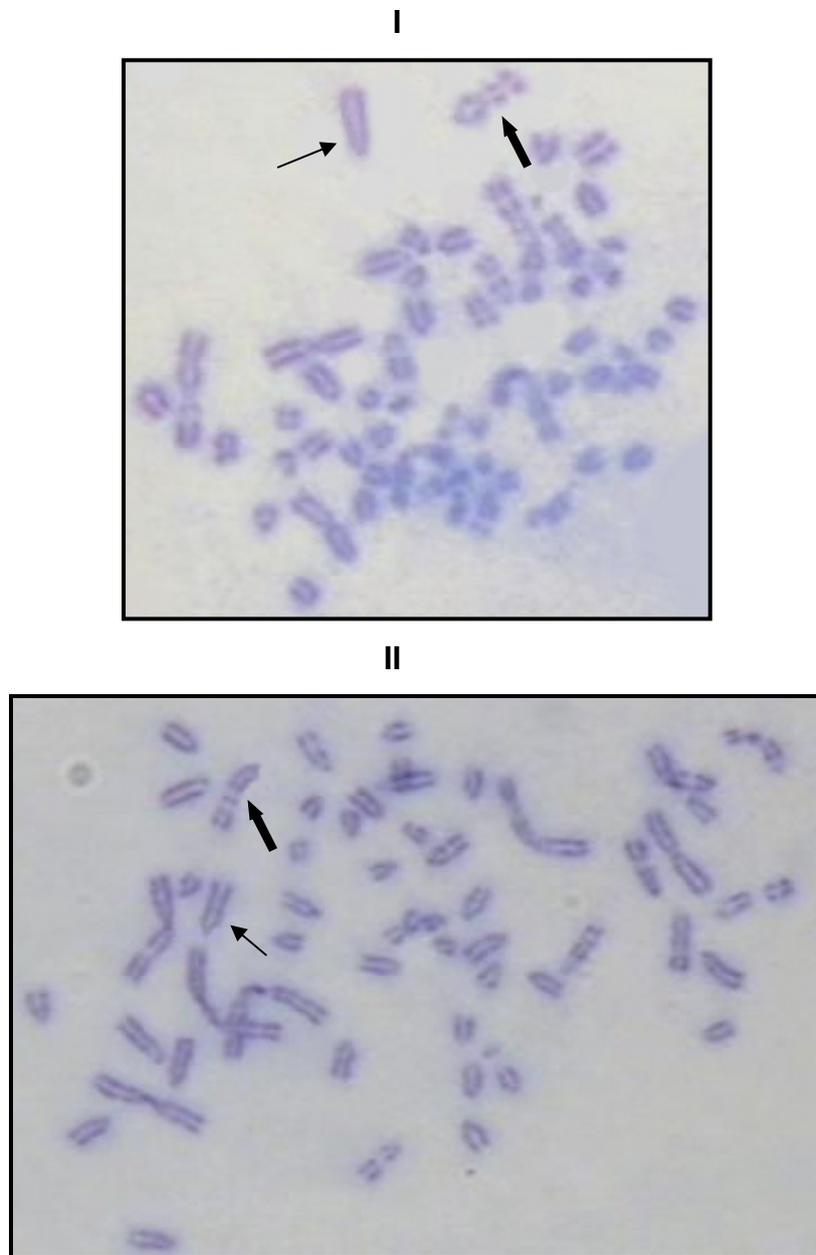
### 3.3.2. 5-azacitidina-C 2,5mM

Para la muestra sanguínea 1 se analizó un total de 75 metafases de las cuales 32 metafases se vieron afectadas por el inductor. Por otro lado para la muestra sanguínea 2 se analizaron 30 metafases de las cuales 9 de ellas actuó el inductor.

**Tabla 10.-** Muestra sanguínea 1 y 2 tratada 5-aza-C 2,5mM, 2hrs. Frecuencias y porcentajes en placas con descondensación cromosómica.

<b>5-aza-C (2,5mM)</b>	<b>N° de metafases analizadas</b>	<b>N° de metafases que no actuó el inductor</b>	<b>N° de metafases que actuó el inductor</b>	<b>Nivel 1</b>	<b>Nivel 2</b>	<b>Nivel 3</b>
Muestra sanguínea 1	75	43 (57,3%)	32 (42,7%)	15 (46,8%)	8 (25%)	9 (28,2%)
Muestra sanguínea 2	30	21 (70%)	9 (30%)	6 (66,6%)	3 (33,4%)	0 (0%)

### 3.3.3. Visualización del probable X despiralizado con 5-azacitidina-C (1,0mM y 2,5mM)



**Fig. 9.** Metafasas de la muestra sanguínea 1 correspondientes al nivel 2 pretratadas con: I) 5-aza-C 2,5mM y II) 5-aza-C 1,0mM. Véase con las flechas gruesas el probable X inactivo despiralizado y con las flechas finas el probable X activo condensado.

#### IV. DISCUSIÓN

El diseño realizado en esta pasantía tuvo resultados que permiten abordar en forma primaria el estudio cromosómico de ovinos Criollos hembras asociado a lesiones y despiralización de la cromatina.

A través de los cultivos linfocitarios sometidos a inducción con diferentes agentes clastogénicos, es posible realizar análisis citogenéticos que permitan determinar la constitución cromosómica (número diploide, morfología cromosómica), al igual que su composición, regiones de inestabilidad de su cromatina, siendo éstas de suma importancia para entender la evolución de esta especie (Wurster y Benirschke, 1968; Nadler *et al.*, 1971; Bruère, *et al.*, 1972; Schnedl y Czaker, 1974; Eldridge, 1985).

Mediante el cultivo linfocitario de ovinos Criollos hembras obtuvimos un número cromosómico de  $2n=54$ , XX organizados en 3 pares de autosomas bibraquiados, 23 pares monobraquiados y un par sexual de morfología acrocéntrica.

El material de estudio fue óptimo, por la calidad de la cromatina en las metafases de cultivos controles (sin inducción) (Figura 4) encontrándose sólo 3 lesiones cromosómicas espontaneas (1 en bibraquiados y 2 en monobraquiados) (Figura 5, Tabla 4). Estos datos permitieron conocer los cromosomas normales del ovino Criollo hembra y dieron confiabilidad a los resultados de las inducciones con las concentraciones y tiempos de la experiencia.

Como primer abordaje se pretendió comenzar con la estandarización de concentraciones y tiempos de exposición de dos inductores (afidicolina y 5-azacitidina-C) durante el ciclo celular del ovino Criollo. De esta manera, se pretendió estudiar las regiones que presentan mayor inestabilidad de la cromatina. La afidicolina se analiza a una concentración similar a la utilizada en humanos y bovinos (Di Tomaso, 1998; Rodríguez *et al.*, 2002; Artigas *et al.*, 2008) siendo de  $0,3\mu\text{M}$  durante 24hrs. (duración de un ciclo celular en mamíferos) permitiendo observar y cuantificar cierta inestabilidad en cromosomas bibraquiados, que se visualizaron como gaps y fracturas tanto de cromátida como de cromosoma (Fig. 6). El estudio primario de expresión de APC ( $0,3\mu\text{M}$ ) en cromosomas bibraquiados del complemento genético de hembras de ovinos Criollos se realizó utilizando el siguiente criterio: **a)** se seleccionaron metafases completas  $2n=54,XX$  inducidas con APC ( $0,3\mu\text{M}$ , 24hrs), (una lesión cromosómica alcanza

para considerarla en la muestra a analizar) cuantificándose en un N=50 aquellas metafases con lesiones solo en bibraquiados (21,9%), solo en monobraquiados (59,3%), en bi y monobraquiados (18,8%) (Tabla 5, Fig. 7).

**b)** se seleccionaron metafases no completas que presentaban los 6 bibraquiados, (una lesión cromosómica alcanza en la muestra de solo bibraquiados) analizándose un N=70, donde se encontró una frecuencia de 21,4% (Tabla 7). Las frecuencias de lesiones en bibraquiados obtenidas en metafases completas (26%) y metafases incompletas (21,4%) permiten realizar evaluaciones de lesiones sobre bibraquiados, tomando únicamente a estos como nuestra muestra de trabajo (Tabla 6 y 7). Esto favorece el estudio, de lesiones sobre determinadas muestras de cromosomas cuando el índice mitótico es bajo.

Estos análisis diversos permiten observar que la acción de la APC sobre el genoma del ovino, a una concentración de 0,3 $\mu$ M es muy débil si lo comparamos con resultados de esta misma concentración y tiempo (24hrs) en humanos, bovinos, búfalos (Di Tomaso, 1998; Rodríguez *et al.*, 2002; Artigas *et al.*, 2008; Nicodemo *et al.*, 2008). Este resultado es apoyado por experiencias de Danielak-Czech y Slota (2004) quienes experimentando con 5-aza-C (50 $\mu$ g/ml, 6hrs) en bovinos, cerdos, ovinos, encuentran porcentajes altos de efectos de la inducción en el genoma de bovino, siendo aproximadamente un 50% menos en ovinos y cerdos. Estos resultados alientan a continuar probando concentraciones más rigurosas de estos inductores en el genoma del ovino y cerdo, a los efectos de lograr estándares para ser utilizados como marcadores cromosómicos de regiones génicas.

Asimismo se cuantificaron regiones específicas de lesiones cromosómicas en bibraquiados, observándose, que un 40% de las lesiones se encuentran a nivel intersticial cercanas al centrómero, un 33,3%, están a nivel intersticial cercanas al telómero y 26,6% a nivel intersticial medio (Tabla 8).

Cabe destacar que una de las propiedades de la afidicolina es que compite con la polimerasa  $\alpha$  preferencialmente con sitios dCTP, impidiendo que continúe la replicación en la fase S del ciclo celular (Oguro *et al.*, 1979), por lo que su expresión sobre cromosomas podría evidenciar regiones de inestabilidad asociadas a contenidos con citocinas. La acción complementaria del otro inductor 5-aza-C, por ser éste un agente demetilante de citocinas podría potenciar los resultados anteriores aproximándonos a regiones ricas en citocinas con potencia-

lidad de estar metiladas. No obstante, técnicas de bandeado cromosómico (GBG y/o RBG) o mediciones con softwares específicos permitirán diferenciar regiones homologables al ideograma y mapas físicos, aproximándose a probables genes asignados en estos lugares específicos inestables como se ha desarrollado en investigaciones del laboratorio, en cromosomas del bovino (Rodríguez *et al.*, 2002; Artigas *et al.*, 2008). La ubicación de estas lesiones, en regiones específicas del cariotipo (ISCNDB, 2001) y una cuantificación más fina que permita definirlo como sitios frágiles, permitirán discutir la posible relación con genes tejido específico, aproximándonos a heterocromatinas dinámicas ubicadas en regiones autosómicas, bandas G positivas (Holmquist, 2006).

Otro de los objetivos planteados en esta pasantía fue la observación de descondensación cromosómica utilizando el análogo de base 5-aza-C. Conceptualmente es útil pensar en la incorporación de la 5-aza-C en el ADN afectando la estructura y función de la cromatina, en pasos secuenciales, los que han sido relacionados con la hipometilación del ADN. Uno de ellos es la inhibición de la condensación de la heterocromatina potencialmente inactiva (Heterocromatina constitutiva y facultativa, bandas G positivas) que ocurre en la primera generación de células sólo a pocas horas luego de la incubación con el análogo (Haaf, 1995),

Después de solo un ciclo de replicación se reduce la metilación de la cromatina y la mayoría del ADN es hemimetilado. Para que ambas hebras estén desmetiladas se requieren dos ciclos de replicación y ocurre en el 50% de las células en división (Haaf, 1995).

Para las observaciones de despiralización de la cromatina en bibrachiados y cromosomas sexuales, se utilizaron dos concentraciones 1,0mM y 2,5 mM, accionando al final de G<sub>2</sub>. Se determinaron tres niveles de acción de la 5-aza-C, en las placas metafásicas según los criterios mencionados anteriormente en resultados (Figura 8).

Para la concentración de 1,0mM, 2hrs en la muestra sanguínea 1 evidenció un 41,5% de metafases inducidas observándose un 42,4% de metafases inducidas para la muestra sanguínea 2. Los resultados fueron similares, teniendo en cuenta que las dos hembras pertenecen a establecimientos diferentes (Villa Dolores y San Miguel) (Tabla 9). Al discriminar los 3 niveles de acción de la inducción, dentro de las metafases con inducción, se encontraron diferencias.

El nivel 2, considerado el óptimo para cada concentración, resultó ser menor en la muestra 2 (21,4%) con respecto a la muestra sanguínea 1 (37%) (Tabla 9). Para la concentración de 2,5mM, 2hrs, los resultados fueron similares a la concentración anterior de 1,0mM en cuanto a porcentaje de metafases inducidas en el cultivo (comparándola con la muestra sanguínea 1). La concentración de 2,5mM, 2hrs sólo se analizó en la muestra 1 evidenciándose un 42,7%, de metafases inducidas. En relación al nivel 2 se observó inducción en el 25% de las células (Tabla 10). Sin embargo a esta concentración (2,5mM, 2hrs.) se observa un 28,2% de metafases inducidas para el nivel 3 a diferencia de lo observado con la concentración de 1,0 mM (18,6% de metafases inducidas) (Tablas 9 y 10). Consecuentemente a mayor concentración el efecto de la 5-aza-C presenta tendencia a la pulverización. Estos resultados preliminares tienden a apoyar concentraciones entre 1,0mM y 2,5mM, 2 hrs., tendiendo a ser más concentrada que la optimizada para bovinos con el mismo tiempo de tratamiento (Haaf y Schmid, 2000).

En relación al cromosoma X se observó despiralización especialmente en el nivel 2. En este nivel, se observa la despiralización del probable cromosoma X, mientras que su homólogo permanece casi inalterado (Fig. 9).

Éste corresponde al cromosoma de replicación tardía que habría sufrido demetilación utilizando estas dos concentraciones de 5-aza-C incorporada en el período G<sub>2</sub> del ciclo celular. Esta expresión ocurre en regiones con citocinas metiladas, ya que el análogo de base actúa sobre la enzima ADN metiltransferasa inhibiendo la metilación del ADN, bloqueando la acción de los grupos metilos y por lo tanto se observa una amplia despiralización de esta heterocromatina facultativa "condicional" (Haaf, 1995; Haaf y Schmid, 2000; Holmquist y Ashley, 2006). Al ser incorporada 2 horas antes del sacrificio del cultivo estaría actuando sobre el final de G<sub>2</sub> momento de condensación de aquella cromatina replicada tardíamente. Evidentemente, estos resultados se encuentran fundamentados por la hipótesis de Lyon para asegurar la compensación de dosis a nivel poblacional entre hembras que tiene dos cromosomas X y machos que tiene un X en mamíferos (Lyon, 1961, 1972).

Tanto para la concentración de 1,0mM como la de 2,5mM adicionado al final de G<sub>2</sub> se observaron regiones descondensadas en cromosomas bibráquios que incluyen regiones proximales al centrómero, intersticiales y proximales al teló-

mero. La acción de este inductor demetilante, permite diferenciar regiones de heterocromatina constitutiva y facultativa probablemente portadora de genes tejido específico. Cuando se observa despiralización en el X inactivo (Figura 9) en las metafases y también despiralización en autosomas es probable que si se desmetila la heterocromatina facultativa del X inactivo también se observen regiones despiralizadas de replicación tardía, que podría ser heterocromatina facultativa, en regiones de cromosomas bibraquiados.

En suma, estos resultados preliminares alientan a continuar con estudios citogenéticos y moleculares, para explicar el significado biológico de estas regiones inestables observadas mediante afidicolina 0,3 $\mu$ M y su relación con la biodiversidad, ambiente, producción y reproducción eficiente de los ovinos Criollos. Se debería realizar un estudio a nivel poblacional, para poder especificar si estas regiones inestables, representarían sitios frágiles. Dicha información puede ser de un gran valor como dato para realizar estudios posteriores en la evolución del cariotipo y genómica comparativa de esta especie.

Estudios que permitan profundizar tratamientos con 5-aza-C, para poder observar que concentración es óptima para revelar la descondensación de regiones de heterocromatina facultativa en bibraquiados y relaciones epigenéticas que llevan a la expresión génica, dinámica y remodelación de la cromatina. Finalmente se debería estudiar el sexo macho a los efectos de comparar ambos sexos.

## V. 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 los Brs. Wanda Iriarte y Rody Artigas por su colaboración en las observaciones citogenéticas y tareas de laboratorio.

Al personal del S.E.P.A.E, por permitir la extracción de las muestras del ovino Criollo hembra, del Parque Nacional de San Miguel.

A la Dr. Bibiana Cuñarro y al Br. Rody Artigas, por la extracción y traslado de las muestras del Zoológico de Villa Dolores.

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 de linfocitos.

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

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

Finalmente agradezco a mis familiares y amigos por su gran apoyo en esta etapa de mi carrera.

## VI. BIBLIOGRAFÍA.

- ❖ Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. 2002. *Biología Molecular de la Célula*. Ediciones Omega, S.A.
- ❖ Artigas, R., Iriarte, W., de Soto, L., Iriarte, A., Llambí, S., de Bethencourt, M., Postiglioni, A. 2007. 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):65-69.
- ❖ Artigas, R., Iriarte, A., Tellechea B., Llambí S., De Bethencourt M., Postiglioni A. 2008. Aphidicolin induces break points in heterozygous Robertsonian translocation rob(1;29) from Uruguayan Creole cattle. *Journal Basic and Applied Genetics* 19 (1): 1-10.
- ❖ Bruère, A.N., Chapman, H.M., Wyllie, D.R. 1972. Chromosome polymorphism and its possible implications in the select Drysdale breed of sheep. *Cytogenetics* 11:233-246.
- ❖ Bruère, A.N., Chapman, H.M. 1974. Double translocation heterozygosity and normal fertility in domestic sheep. *Cytogenetic. Cell Genet.* 13:342-351.
- ❖ Chaves, R., Adegá, 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 rearranged chromosome evolution. *Mammalian genome*. pp706-712
- ❖ da Cruz, I., Iriarte, W., Llambí, S., de Bethencourt, M., Postiglioni, A. 2008. Estudio cariotípico de un ovino criollo hembra inducido con agentes clastogénicos (Afidicolina y 5-azacitidina-C). Resultados preliminares. *Primeras Jornadas de Genética del Uruguay*.

- ❖ Danielak-Czech, B., Slota, E. 2004. Mutagen-induced chromosome instability in farm animals. *J Anim Feed Sci* 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 Meo, G.P., Perucatti, R., Chaves, F. 2006. Cattle rob (1;29) originating from complex chromosome rearrangement as revealed by both banding and FISH-mapping techniques. *Chromosome research*. 14:649-655.
- ❖ 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.
- ❖ Dyrendahl, I., Gustavsson I. 1979. Sexual functions, semen characteristics and fertility of bulls carrying the 1/29 chromosome translocation. *Hereditas* 90:281-289.
- ❖ Eldridge, F.E. 1985. *Cytogenetic of Livestock*. The Avi publishing company. 12:189-215.
- ❖ Evans, H. J., Buckland, R.A., Sumner, A.T. 1973. Chromosome homology and heterochromatin in goat, sheep and ox studied by banding techniques. *Chromosoma* 42, 383-402.
- ❖ Flemming, W. 1882. *Zellsubstanz, kern-und Zellteilung*. Vogel, Leipzig

- ❖ Fundia, A., Larripa, I. 1996. Participación de los sitios frágiles en cáncer. Medicina (Buenos Aires) 56, 393-396.
- ❖ Gómez, L.M., Paez, M.C, Anaya, J.M. 2006. Epigenética y epigenómica de la artritis reumatoidea. Revista Med.14(1)48:60.
- ❖ Gonçalves, HC., Jorge, W., Picudo, S.D., Cury, P.R. 1994. Chromosomal constitution in roo (5/15) goat progeny. Small Ruminant research. 15:73-76.
- ❖ Grasso, N., Artigas, R., Llambí, S., de Bethencourt, M., Postiglioni, A. 2008. Lesiones cromosómicas en metafases linfocitarias de un ovino Criollo hembra (*Ovis aries*) por efecto de afidicolina y 5-azacitidina-C. Estudios preliminares. Primeras Jornadas de Genética del Uruguay.
- ❖ Graziano, F., Iriarte, A., Llambí, S., de Bethencourt, M., Postiglioni, A. 2008. Efectos de agentes S-dependientes (Afidicolina y 5-azacitidina-C) sobre la cromatina de un ovino Criollo hembra. Resultados preliminares. Primeras Jornadas de Genética del Uruguay.
- ❖ Gustavsson, I., Rockborn, G. 1964. Chromosome abnormality in three cases of lymphatic leukaemia in cattle. Nature, 203:absrt.990.
- ❖ Haaf. T. 1995. The effects of 5-Azacytidine 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 heterochromatin of mammalian chromosomes. Cytogenet. Cell Genet 91.113-123.
- ❖ Hare, W. C. D., Singh, E. (1979). Citogenética de la Reproducción Animal. Zaragoza, España; Acribia S. A. 80pp.

- ❖ Heard, E., Clerc, P., Avner, P. 1997. X-chromosome inactivation in mammals. *A Rev Genet* 31:571–610
- ❖ Heitz, E. 1934. Über  $\alpha$ - und  $\beta$ -Heterochromatin sowie Konstanz und Bau der chromomeren bei drosophila. *Biologisches Zentralblatt* 54:588-699.
- ❖ Holmquist, G.P. 1989. Evolution of chromosome bands: molecular ecology of noncoding DNA. *Journal of Molecular Evolution* 28:469-486.
- ❖ Holmquist, G., Ashley, T. 2006. Chromosome organization and chromatin modification: influence on genome function and evolution. *Cytogenet & Genome Res* 114:96-125.
- ❖ Jenuwein, T., Allis, C.D. 2001. Translating the Histone Code. *Science* 293:1074-1079.
- ❖ Krokan, H., Wist, E., Haaland Krokan, R. 1981. Aphidicolin inhibits DNA synthesis by DNA polymerase  $\alpha$  and isolated nuclei by a similar mechanism. *Nucleic Acids Research*. Vol. 9, No. 18 4709-4719.
- ❖ Llambí, S., Coppola, B., Gagliardi, R., Tejedor, T., Arruga, M.V. 2008. Acción de la 5´azaciditidina en cromosomas de células linfocitarias de bovinos. *Acta Agron (Palmira)* 57(1):61-64.
- ❖ Lyon, M. F. 1961. Gene action in the X chromosome of the mouse (*Mus musculus*). *Nature* 190: 372-373.
- ❖ Lyon, M. F. 1972. X-Chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. *Biol. Rev.* 47: 1-35.
- ❖ Mernies, B., Macedo, F., Filonenko, Y., Fernández, G. 2007. Índices zomométricos en una muestra de ovejas criollas Uruguayas. *Arch. Zootec.* 56 (Sup. 1): 473-478.

- ❖ Moreno Millán, M., Rodero, A. 1990. Estudio comparativo de los cromosomas de *Ovis aries* y *Capra hircus* a partir de sus longitudes relativas. Arch. Zootec. 39:153-163. (2)
- ❖ Nadler, C.F., Lay, D.M., Hassinger, J.D.1971. Cytogenetic analysis of wild sheep populations in northern Iran. Cytogenetics 10:137-152.
- ❖ Nicodemo, D., Coppola, G., Pauciullo, A., Cosenza, G., Ramunno, L., Ciotola, F., Peretti, V., Di Meo, G.P, Iannuzzi, L., Rubes, J., Di Bernardino, 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.
- ❖ Obe, G., Johannes, C.,Schulte-Frohlinde, D. 1992. DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. Mutagenesis 7:3-12.
- ❖ Oguro, M., Suzuki-Hori, C., Nagano, H., Mano, Y., Ikegami, S. 1979. Eur. J. Biochem. Y7, 603-607.
- ❖ 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.
- ❖ Rodríguez, M., Téllez, N., Cerbón, M.A., Cervantes, A.2004. Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica. Rev Invest Clín. 56(1):56-71
- ❖ Sánchez, C.A., Jiménez, L.M., Bueno, M.L. 2007. Introgresión genética de *Bos indicus* (Bovidae) en bovinos criollos Colombianos de origen *Bos taurus*. Acta biol.Colomb. vol.13 no.1 Bogotá Jan./Apr. 2008(1)
- ❖ Savage, J.R.K.,1976. Annotation: 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.
- ❖ Schendl, W., Czacker, R. 1974. Centromeric heterochromatin and comparison of G-banding in cattle, goat and sheep chromosomes (*Bovidae*). Cytogenet. Cell Genet. 13: 246-255.
- ❖ Sheaff, R., Illesley, D., Kuchta, R. 1991. Mechanism of DNA Polymerase  $\alpha$  Inhibition by Aphidicolin. Biochemistry, 30 (35):8590–8597.
- ❖ Shivago, P.I. 1931. Karyotypische studien an ungedulten. I-Uber die chromosomenKomplexe der schafe und ziegen. Z. Zellforsch. 13:511-522.
- ❖ Sif, S., Stukenberg, P.T., Kirschener, M.W., Kingston, R.E. 1998. Mitotic inactivation of a human SWI/SNF chromatin remodeling complex. Genes and Development 12:2842-2851.
- ❖ Speit G., Schutz P. The effect of inhibited replication on DNA migration in the comet assay in relation to cytotoxicity and clastogenicity. Mutation research 655: 22-27.
- ❖ Sutherland, G.R., Baker, E., Richards R. I. 1998. Fragile sites still breaking. TIG 14:501-506
- ❖ Sutherland G. 2003. Rare Fragile site. Cytogenet Genome Res 100, 77-84.
- ❖ Taruscio, D. Manuelidis, L.1991. Integration site preferences of endogenous retroviruses. Chromosoma 101:141-156.

- ❖ Tedeschi, B., Cicchetti, R., Argentin, G., Caporossi, M., Parisi P., Vernole, P. 2004. Aphidicolin and bleomycin induced chromosome damage as biomarker of mutagen sensitivity: a twin study. *Mutation research*. 546:55-64.
  
- ❖ Therman, E., Susman, M. 1992. *Human chromosomes. Structure behavior, and effects.* Springer-Verlag, New York.
  
- ❖ Vrana, B.P. 2007. Genomic imprinting as a mechanism of reproductive isolation in mammals. *Journal of Mammalogy*, 88(1):5–23.
  
- ❖ White, M.J.D. 1954 *Animal cytologic and evolution.* Cambridge University Press. London.
  
- ❖ Wodsedalek, J.E. 1922. Studies on the cells of sheep with special reference to spermatogenesis, oogenesis and sex determination. *anat. Rec.* 23:103
  
- ❖ Wurster, D.H, Benirschke, K.1968. Chromosome studies in the superfamily Bovidae. *Chromosoma* 25:152-171.

## VII. ANEXO.

*\*1 Preparación de la afidicolina (PM=338.5)*

Solución madre

1mg APC + 10 ml EtOH= 0.3 mM= 300  $\mu$ M

Solución de trabajo

A 100  $\mu$ l de la solución madre, se agregan 900  $\mu$ l de medio de cultivo (TC199).

Concentración de solución de trabajo: 30  $\mu$ M.

*\*1 Cálculos para obtener APC (0,30 $\mu$ M) en un tubo con 5mL de sangre, partiendo de una solución madre de APC (300 $\mu$ M).*

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

$$V_i = \frac{0,3\mu\text{M} \cdot 5000\mu\text{L}}{30\mu\text{M}} = 50\mu\text{L}$$

*\*2 Preparación de la 5-azacitidina-C (PM=244,2)*

Solución madre

Un vial liofilizado conteniendo 100mg de 5-aza-c se reconstituye en 10ml de medio de cultivo. Se obtiene de esta forma una solución de 10mg/ml

Solución de trabajo

*\*2 Cálculos para obtener 5-aza-C (1,0mM y 2,5 mM) 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

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

$$V_i = \frac{0,2442\text{mg/ml} \cdot 5\text{ml}}{1\text{mM}} = 0,1221\text{ml} \sim 122\mu\text{l}$$

1,0mM\_\_\_\_122 $\mu$ L

2,5mM\_\_\_\_305  $\mu$ L

*\*<sup>3</sup> Preparación choque hipotónico con KCl 0,075M:*

Se mezcla 2,78 gr KCl y 500mL de ddH<sub>2</sub>O, para llegar a 500mL de solución.

*\*<sup>4</sup> Solución 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 40°C durante 24 horas. Ya transcurrido este tiempo se lo filtra (con filtro de papel) dentro de la estufa a la misma temperatura.

*\*<sup>5</sup> Tampón fosfato Sörensen (ph=6.8):*

Se preparan por separado dos soluciones. Primero se disuelven en 9,08 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (fosfato de potasio) en 50.8ml de ddH<sub>2</sub>O. Segundo se prepara 49,2ml de ddH<sub>2</sub>O con 11.8g de Na<sub>2</sub>H PO<sub>4</sub> (fosfato monosódico), 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).

*\*<sup>6</sup> Preparación de tripsina 0,025M:*

La solución stock de tripsina es de 250mg en 100ml PBS. Luego se toman 4ml de solución stock y se llevan a 50ml en PBS.