

**REGIONES DE INESTABILIDAD CROMOSÓMICA
POTENCIADAS POR AGENTES CON ACTIVIDAD
CLASTOGÉNICA (5-AZACITIDINA-C Y AFIDICOLINA)
EN OVINOS CRIOLLOS URUGUAYOS.**



Andrés Nicolás Grasso Palas

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

Facultad de Ciencias, Universidad de la Republica, UDELAR.

2008

Área Genética de la Facultad de Veterinaria

***Tutora:* Dra. Alicia Postiglioni**

Resumen

Se han realizado numerosos estudios sobre la familia Bovidae, tanto a nivel productivo, reproductivo como evolutivo. Los complementos cromosómicos de los bóvidos, sobre todo los domésticos, están compuestos por autosomas monobraquiados, a excepción de *Ovis aries* que posee 3 pares de bibraquiados, posiblemente producto de translocaciones Robertsonianas a lo largo de la evolución. Este reordenamiento se considera uno de los mecanismos de especiación cromosómica más representativa dentro de la familia Bovidae. Estas cromosomas presentan homeología con cabras y bovinos, por lo que, dentro del contexto de respuesta a inductores con actividad clastogénica, nos permitirán inferir acciones en determinadas regiones de la cromatina, puntualmente regiones de inestabilidad en el genoma.

Se realizaron macrocultivos linfocitarios de hembras de ovino Criollo provenientes del Zoológico de Villa Dolores (Departamento de Montevideo), y del Parque Nacional de San Miguel (Departamento de Rocha). Con el propósito de observar regiones de inestabilidad en su genoma, se trabajó con dos agentes, la afidicolina (APC) a una concentración $0,3\mu\text{M}$ durante 24 horas, y la 5-azacitidina (5-aza-C) $2,0\text{mM}$ y $3,5\text{mM}$ 2 horas antes de levantar el cultivo (periodo G2 del ciclo celular). En ambos casos se observó respuesta frente a dichos agentes. De la evaluación de los tubos control se reveló un 5,74% de lesiones espontáneas. Con APC, se observó que el 50% de las placas presentaban lesiones en diferentes regiones cromosómicas, de estas, un 28,06% presentaba lesiones en los metacéntricos. Mediante la confección de un segundo diseño, en el cual las placas a cuantificar tenían como único requisito la presencia de los 6 bibraquiados, se observó que un 22,5% de las placas presentaban lesiones en diferentes regiones de estos cromosomas. Para el caso de la 5-aza-C se observó una acción diferencial dentro de un mismo cultivo, pudiendo clasificarse en 4 niveles de acción. Se tomó como óptimo para localizar regiones de despiralización de la cromatina, al nivel dos, puesto a que podía observarse la morfología característica del cromosoma X inactivo, pudiéndose inferir en base a esto que, las regiones de despiralización observadas podrían tratarse de heterocromatina facultativa. Se observaron

despiralizaciones tanto a nivel pericentromérico, intersticial y subtelomérico. Es necesario seguir experimentando con diferentes concentraciones de ambos agentes, a fin de estandarizarlas pudiendo de este modo hacer mayores inferencias en cuanto a los reordenamientos y compactación de la cromatina, y sus consecuencias sobre genes que afecten caracteres productivos, reproductivos y evolutivos.

1. Introducción

1.1.1. Descripción de la familia Bovidae y su ubicación en los Artiodáctylos

Los artiodáctilos son el grupo más amplio y diverso de mamíferos ungulados terrestres, que incluyen alrededor de 220 especies vivientes ubicadas en 10 familias. Por definición, en los artiodáctylos, el plano de simetría de cada pata pasa entre el tercer y cuarto dedo, encontrándose éstos en pares. En todas las especies dentro de este orden está reducido el número de dígitos, por lo menos por la pérdida del primero, y la reducción del segundo y quinto (Myers, 2001). Estas extremidades están recubiertas por pezuñas, las que apoyan para caminar, motivo por el cual se los llama ungulados (no solo a artiodactylos, sino también a perisodactylos). Este grupo tiene ejemplares nativos de todo los continentes menos Australia y Antártida, apareciendo en el registro fósil en el Eoceno temprano (Myers, 2001). Estos mamíferos pueden ser herbívoros u omnívoros.

Dentro de este grupo existen muchos animales que tienen su estómago modificado, con 4 cámaras (rumen, retículo, omaso y abomaso) y poseen microorganismos específicos, adaptación que contribuye a su dieta en base a celulosa. A este suborden se los denominó Ruminantia, caracterizado también por presentar astas en el frontal, al menos los machos. La mayoría de los taxones vivientes de este grupo caen dentro de dos familias: Bovidae (ganado, cabras, ovejas y antílopes) y Cervidae, existen otras cuatro familias representadas por muy pocas especies hoy en día, son Antilocapridae, Giraffidae, Moschidae y Tragulidae (Prothero y Foss, 2007).

Representados por aproximadamente 137 especies distribuidas en 45 géneros diferentes, los bóvidos (familia Bovidae), contienen algunas especies de particular interés económico, como lo son *Ovis aries* (ovino doméstico), *Capra hircus* (cabra) pertenecientes a la subfamilia Caprinae, y *Bos taurus*, *Bos indicus* (ganado vacuno). Lo que ha llevado a un intenso estudio de estos ejemplares.

1.1.2. Homeología cromosómica entre las diferentes especies de bóvidos

En relación a sus cariotipos, la mayoría de los cromosomas autosómicos en bóvidos domésticos son del tipo acrocéntrico o monobraquiado, con algunas excepciones, como los tres pares de cromosomas metacéntricos (bibraquiados) en *O. aries*, o los cinco pares de submetacéntricos en el búfalo de río (Di Bernardino *et al.*, 2001).

Existen también otras variantes, como por ejemplo dentro del género *Ovis*, en las cuales la dotación cromosómica varía entre $2n=42$ (*Oreamnos americanus*), $2n=56$ (*Ovis musimon*), pasando por cariotipos intermedios, hasta $2n=60$ (*Capra hircus*) siempre variando en el número de metacéntricos pero manteniendo su número fundamental (número de brazos cromosómicos) en todos los casos. Estos cromosomas bibraquiados presentes en numerosos bóvidos se habrían originado por eventos de fusiones céntricas entre dos acrocéntricos (Di Meo. y Iannuzzi, 1995).

La naturaleza acrocéntrica de los cromosomas de la mayoría de los bóvidos es un problema a la hora de confeccionar sus respectivos cariotipos (Di Bernardino *et al.*, 2001), por lo que mediante técnicas de bandeo cromosómico, como bandeo R, G o Q, se ha arribado a ideogramas estándares que permiten la identificación casi inequívoca de cada uno de los cromosomas bovinos (Di Bernardino *et al.*, 2001; Popescu *et al.*, 1999).

Se ha establecido una nomenclatura universal para nombrar los cromosomas, para *B. taurus* (BTA), para *O. aries* (OAR) y para *C. hircus* (CHI). Esta nomenclatura, los ideogramas estándares y la confección de mapas con diversos marcadores moleculares asignados a cada cromosoma con la relativa homeología entre las especies de bóvidos, constituyen una poderosa y útil herramienta clínica, evolutiva y citogenética (Di Bernardino *et al.*, 2001).

El bandeo cromosómico de las especies *O. aries* y *C. hircus*, permiten identificar que el metacéntrico más grande de la oveja se habría originado a partir de la fusión céntrica de CHI1 y CHI3 (Brùere *et al.*, 1976). Además se observó homeología entre OAR1p con BTA3 y OAR1q con BTA1 (Popescu *et al.*, 1999). El segundo metacéntrico en tamaño de *Ovis aries* se formaría por la fusión céntrica de CHI2 y CHI8, así como el último metacéntrico por la fusión

de CHI4 y CHI9. Estos patrones de homeología proponen al cariotipo de *Capra hircus* como ancestral (Brùere *et al.*, 1976, Popescu *et al.*, 1999). En cuanto al cromosoma X de *O. aries*, el acrocéntrico mas grande, en comparaciones tempranas que tratan de reconstruir el cromosoma X ancestral de bovinos, ovinos y caprinos, basados en técnicas de bandeo G, observando patrones homólogos, han postulado que la fracción BTAXq es homólogo al Xq35-38 de la oveja y cabra (Ponce de León *et al.*, 1996).

1.1.3. Consecuencias de las fusiones céntricas a nivel reproductivo y evolutivo

Diversas patologías, muchas de ellas del tipo reproductivo, tienen como consecuencias anomalías provocadas por macroarreglos, donde se producen rearrreglos de la cromatina. Algunas de estas alteraciones traen problemas de fertilidad en las poblaciones, teniendo consecuencias de índole económica en rodeos comerciales. La acumulación de información de tales anormalidades y sus efectos en la performance reproductiva, promueven una evaluación biológica de estos reordenamientos (Popescu, 1990).

Las anormalidades en la estructura cromosómica por lo general no tienen grandes efectos en la expresión fenotípica, pero son asociadas frecuentemente con desórdenes reproductivos. En el ganado, ovejas y cabras las translocaciones del tipo Robertsonianas parecen ser las más frecuentes (Popescu, 1990). Algunos autores como Di Meo, en su trabajo publicado en el 2006, atribuyen el nacimiento de la citogenética en los animales domésticos debido al descubrimiento de la translocación Robertsoniana 1;29 por Gustavsson en 1964, la primera descrita en animales domésticos. La translocación Robertsoniana involucra la fusión de dos cromosomas acrocéntricos (BTA1 y BTA29 en este caso) con la pérdida o reordenamiento de los brazos pequeños. (Chaves *et al.*, 2000). Esta translocación a diferencia de otras, es monocéntrica, lo que sugiere un antiguo origen (Di Meo *et al.*, 2006). Mediante técnicas de bandeo C, G y R se determinó su único centrómero, producto de la pérdida del centrómero del BTA29 y la retención del centrómero del BTA1 (Chaves *et al.*, 2000), además de revelar un gran bloque

heterocromático localizado próximo al brazo q (Di Meo *et al.*, 2006). Un estudio más detallado de la rob (1;29), realizado por Eggen y colaboradores (1994) permite una mejor comprensión del origen de la translocación, Mediante el mapeo por técnicas de inmuno hibridación “*in situ*” F.I.S.H. (Di Meo *et al.*, 2006), del marcador microsatélite INRA 143, se demuestra que además de la fusión céntrica se dio una inversión pericéntrica, y la pérdida de repetidos centroméricos (ADN satélite) del tipo I y IV, además de la pérdida de heterocromatina centromérica (Chaves *et al.*, 2000).

La translocación rob(1;29), considerada un polimorfismo cromosómico, está ampliamente distribuida en diferentes razas comerciales de bovinos así como en reservas naturales de esta misma familia (Postiglioni *et al.*, 1996). Y puesto que en heterocigosis se ve afectada la fertilidad de los animales portadores, se la estudia desde los puntos de vista: genético, o sea naturaleza de la cromatina en la región pericentromérica de la translocación, a nivel productivo por producir pérdidas económicas al provocar subfertilidad, y a nivel evolutivo como posible mecanismo de especiación dentro de la familia Bovidae por fusiones céntricas.

El hecho de que, embriones portadores de la translocación tengan una viabilidad reducida con respecto a los normales, puede estar dado por el silenciamiento de genes que quedarían en la región heterocromática facultativa de la translocación. Tratamientos con afidicolina (APC) para identificación de citocinas, y 5-azacitidina para descondensar regiones con citocinas metiladas, realizadas sobre la translocación rob1;29 demuestran la presencia de citocinas afectadas por la acción del inductor 5-aza, en regiones paracentroméricas de la translocación (Postiglioni *et al.*, 2002; Artigas *et al.*, 2008)

En ovinos, se han descrito translocaciones del tipo Robertsoniano, pero éstas no tendrían efectos aparentes en los animales portadores (Brùere y Ellis 1979).

Estas translocaciones parecen ser el macroarreglo más común en mamíferos. Hasta el momento se han reportado solamente unas pocas fusiones céntricas, t1 (6; 24), t2 (9; 10) y t3 (7; 25) en ovinos. Estas tres fueron intensamente estudiadas por Brùere y colaboradores, en una serie de trabajos en un rodeo de Nueva Zelanda (Brùere *et al.*, 1976, 1979, 1981). Los autores demostraron que los animales portadores de dichas translocaciones (en condiciones de

hetero- y homocigosis) no tenían ninguna desventaja reproductiva frente a animales normales para la translocación. Puesto que los gametos desbalanceados no participaban en la fecundación por ser eliminados por selección (Brùere y Ellis, 1979). Otras translocaciones han sido reportadas, t4 (5; 8) y t5 (8; 22) descritas por Pearce en 1994, y finalmente t6 (6; 26) por Murphy (Popescu *et al.*, 1999; Chaves *et al.*, 2003). En un trabajo de Chaves (2003), se describe una nueva translocación Robertsoniana que involucra a los OAR8 y OAR11, siendo los individuos portadores fenotípicamente normales. Mediante técnicas de bandeo C se reveló un gran bloque de heterocromatina y la naturaleza dicéntrica de la translocación. Contrastando con el patrón de bandeo observado en OAR1, 2, 3, X e Y, se vio que poseían poco o nada de heterocromatina constitutiva. Posteriormente se realizó un bandeo G mostrando que la translocación 8;11 provenía del OAR8 y el 11. Ambos bandeos, e hibridaciones con sonda para Sat I y Sat II, permitieron inferir que cada uno de los metacéntricos en ovino están formados por fusiones céntricas de dos acrocéntricos con ADN Sat I proximal y Sat II distal. Sin embargo los patrones de hibridación en los cromosomas metacéntricos muestran que la evolución después de la fusión es más compleja ya que se identifican reordenamientos en el ADN Sat II y eventualmente en la cromatina (Chaves *et al.*, 2003).

1.2. *Ovis aries*

1.2.1. *Características generales*

La oveja doméstica es extremadamente versátil y existe en una amplia variedad de hábitats, desde montañas hasta lugares de condiciones desérticas. (Grzimek, 1990). Los detalles físicos de la especie doméstica *Ovis aries* varían entre las diferentes razas. A su vez, con frecuencia existe dimorfismo sexual, siendo las hembras de menor tamaño. Presenta una cola más larga que las especies salvajes, sin embargo frecuentemente esta es removida en los rodeos comerciales. El género *Ovis* se caracteriza por la presencia de glándulas situadas en una depresión en el hueso lacrimal, en la ingle y en sus pezuñas.

Estas glándulas secretan un fluido que le da el olor característico de las ovejas. Los cráneos de las ovejas domésticas difieren de los salvajes en que la cavidad es de menor tamaño así como las orbitas.

La selección en la raza, para los caracteres de interés económico, ha producido ejemplares con y sin lana, cuernos, una pigmentación variada como blanco, marrón y negro, habiendo así una considerable diversidad entre las más de 200 diferentes razas (Reavill, 2000).

1.2.2. Reseña histórica Ovino Criollo Uruguayo

El ovino Criollo Uruguayo se encuentra hoy en nuestro país gracias a la introducción de la especie *Ovis aries*, por colonizadores españoles al continente americano (Fernández, 2000; Mernies *et al.*, 2007). En el siglo XVIII arriban a la Banda Oriental los primeros ovinos provenientes de Buenos Aires. Estos animales descendían de los ovinos españoles introducidos durante la colonización del Perú (Camacho *et al.*, 2000). Estas majadas iniciales debieron estar constituidos por ovinos de razas autóctonas españolas como la Churra, la Manchega, la Rasa y la Canaria, ejemplares que fueron introducidos por los primeros colonos (Peralta *et. al*, 1992). El lanar se dispersó de forma rápida porque no era apreciado por su carne, la que se obtenía del abundante ganado vacuno, ni tampoco por su lana (Camacho *et al.*, 2000; Mernies *et al.*, 2007). Así, estos ovinos se esparcieron libremente, adaptándose a las diferentes condiciones ambientales (Mernies *et al.*, 2007). Recién a mediados del siglo XIX fue cuando se retomó la cría del ovino Criollo, por un cambio en la industria textil. Lo que llevó a una merinización de los rebaños Criollos originales (Camacho *et al.*, 2000).

Actualmente quedan muy pocas majadas de esta raza, una de ellas se encuentra en el Parque Nacional de San Miguel (Departamento de Rocha). Además, se pueden ubicar en establecimientos tradicionales que mantienen pequeñas majadas para consumo interno y para el uso de la lana con fines artesanales (Mernies *et. al*, 2007).

2.3. Características del ovino Criollo

Esta raza se caracteriza por ser pequeña y de perfil fronto-nasal rectilíneo. La capa presenta gran variación de colores (blanca uniforme, cárdena, marrón y negra). Las mucosas y pezuñas pueden o no, estar pigmentadas. Los machos suelen presentar policerismo (dos pares de cuernos), uno superior grueso y uno inferior más fino y encorvado hacia la cara. El peso promedio de los carneros es de 55 kg y las ovejas 37 kg (Mernies *et al.*, 2007). Al igual que los ovinos del tronco Churro, los Criollos no presentan lana en la cara y miembros.

Son animales de carne magra, pequeños su altura promedio es de 65 cm en hembras y de 76 cm en machos. Su vellón es liviano (media de 2 kg), generalmente de color blanco, y poco uniforme con mezcla de fibras gruesas (30-40micras) y fibras más finas (20 micras de promedio) (Mernies *et al.*, 2007). El principal uso de este vellón es la confección de artesanías (Camacho *et al.*, 2000). 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 (Fernández, 2000).

2.4. Genoma ovino

Al 2006, habían sido descritos 186.664 ESTs para *Ovis aries*. Además se postuló el mapa de ligamiento promedio para el ovino, con el que se cubre completamente el genoma. Este abarca 3580 cM, y comprende 1374 marcadores (88% son microsatélites) representados en 1333 loci. Una diferencia con la mayoría de los demás mamíferos, es que los mapas autosómicos difieren en ovinos machos y hembras, 3817 cM y 3146 respectivamente. Alrededor del 50% de esta expansión en machos ocurre a nivel de centrómeros y telómeros (Maddox y Cockett, 2007).

Su número diploide es $2n=54$, con 26 pares de autosomas y dos cromosomas sexuales. Todos sus autosomas son acrocéntricos a excepción de 3 pares grandes de metacéntricos. En cuanto a sus cromosomas sexuales, el X es el mayor acrocéntrico, el que puede ser identificado sin técnicas de bandeo a

diferencia de los demás autosomas acrocéntricos. El cromosoma Y, es un pequeño metacéntrico, que a menudo se lo ve como una pequeña gota cuadrada (Cocket *et al.*, 2001).

1.2.5. *Mapa citogenético del ovino*

Múltiples mapas citogenéticos están disponibles para muchos rumiantes domésticos, estas son herramientas útiles para estudiar la complejidad de sus genomas así como también la evolución cromosómica entre la familia Bovidae. En el año 2007 se presentó un mapa citogenético avanzado para ovinos, el que contiene 452 marcadores y abarca casi todas las bandas R de este genoma (Figura 1) (Di Meo *et al.*, 2007).

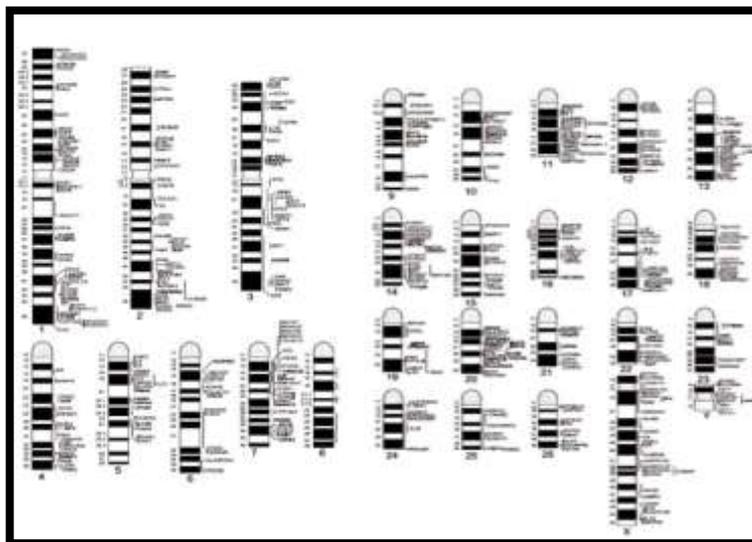


Figura 1. Ideograma estándar para banda R de ovino (tomado de Di Meo *et al.*, 2007)

1.3. *Organización de la cromatina*

En las células eucariotas, el ADN genómico interacciona con proteínas histónicas y no-histónicas para formar la cromatina. La unidad básica de la cromatina se conoce como nucleosoma, el cual consta de 146pb enrollados en un octámero de histonas. Las enzimas modificadoras de histonas, complejos remodeladores de la cromatina, y la metilación del ADN, son componentes de

un intrincado mecanismo epigenético que ayuda en la compactación además de organizar el genoma en dominios discretos de cromatina.

Esta organización, está involucrada en numerosos procesos metabólicos del ADN, como la replicación, transcripción, recombinación y reparación del ADN (Grewal y Jia, 2007).

En 1928, Heitz, diferencia la heterocromatina de la eucromatina en cuanto a su compactación durante interfase. La eucromatina se encuentra menos compactada y generalmente se transcribe de forma más sencilla, por otro lado la heterocromatina esta generalmente más compactada siendo inaccesible para la maquinaria de transcripción.

Las diferentes regiones cromosómicas, centrómero y telómero, que contienen una mayor densidad de elementos repetidos, como el ADN satélite y elementos transponibles, son blanco para la formación de heterocromatina. Estas regiones se mantienen compactadas durante el ciclo celular y se las conoce como heterocromatina constitutiva.

Sin embargo la heterocromatina que puede cambiar su conformación frente a señales celulares y actividad génica, se la conoce como heterocromatina facultativa (Grewal y Jia, 2007).

La función primaria de la metilación del ADN es una modificación epigenética que mantiene y/o determina la estructura heterocromática del X inactivo, así como el silenciamiento génico.

Según la hipótesis de Lyon, uno de los cromosomas X de la hembra se compacta para asegurar la compensación de dosis a nivel poblacional entre hembras y machos, que tiene un X en mamíferos (Lyon, 1961, 1972).

1.3.1. Caracterización de la cromatina por bandeo cromosómico.

Frecuentemente la cromatina suele ser clasificada en dos grandes grupos, heterocromatina y eucromatina, las que difieren tanto en estructura como en función.

Técnicas de bandeo cromosómico permiten diferenciar los tipos de cromatina, por ejemplo, las bandas G claras eucromatinicas tienen gran numero de genes,

predomina GC, contienen SINEs (short interspersed nuclear secuencias) y replican tempranamente. Por otro lado las bandas G son pobres en genes, conteniendo genes tejido específicos con islas CpG hipometiladas, son ricas en AT, contienen LINEs (long interspersed nuclear secuencias) y se caracterizan por su replicación temprana en la fase S del ciclo celular. Otra técnica de bandeado, la banda C, permite evidenciar heterocromatina constitutiva en donde se localizan la mayor parte de secuencias satélites repetidas no codificantes. Se las asocia mayoritariamente a la región centromérica, sin embargo pueden observarse en regiones intersticiales y teloméricas (Korenberg y Rykowski, 1988).

1.3.2. Regiones de inestabilidad genómica

Un ejemplo de ello es a lo que se les ha denominado sitios frágiles a regiones del genoma donde ocurren rearreglos y/o fracturas de forma no azarosa (Sutherland *et al.*, 1998; Fuster *et al.*, 1999; Wang, 2006).

Citogenéticamente se los define como lugares de tinción leve, gaps o fracturas del ADN visible en los cromosomas mitóticos, cuando son sometidos a condiciones específicas de cultivos (Wang, 2006). En un principio se los observó como una curiosidad citogenética, luego se correlacionó un sitio frágil en cromosoma X humano como un marcador de cierta patología de retardo mental, la cual hoy lleva su nombre, el síndrome de X frágil (Sutherland *et al.*, 1998). Se ha determinado que este fenotipo es causado por el silenciamiento de un gen ligado al X, *FMR1*, por la expansión de un trinucleotido CGG (más de 200), en la región 5' UTR de este. De esta forma, no se traduce la proteína FRMP. Esta proteína en individuos normales (menos de 55 repetidos CGG), interacciona con una ribonucleoproteína para la transcripción de 432 genes, los que se verán afectados por la expansión de CGG en FRAXA (sitio frágil, de este retardo mental) (Brown *et al.*, 2001). Tratamientos con nucleasas han mostrado una naturaleza heterocromática de FRAXA y estudios de microscopía electrónica han revelado que el gap visto en metafase contiene una fibra de cromatina de 25nm que une las porciones cromosómicas (Wang, 2006).

Se ha demostrado una estructura inusual de la cromatina asociada a los sitios frágiles. Estudios recientes han revelado que además del daño en el ADN, las modificaciones de histonas, pérdidas en chaperonas de histonas y alteraciones en la condensación pueden disparar los mecanismos de reparación así como los puntos de control del ciclo celular. Estos descubrimientos combinados con que ATR, BRCA1 y SMC están implicados en la expresión de sitios frágiles, permite formular la hipótesis de la formación de sitios frágiles, por una particular estructura cromatínica. Esta estructura puede servir como un bloque, para enlentecer o detener la horquilla de replicación, o promover la formación de estructuras secundarias, o provocar fallas en la condensación de la cromatina. Estos tres motivos pueden desencadenar las respuestas de los checkpoints del ciclo celular, pero si alternativamente logran escapar a estos puntos de control aumentan el número de rupturas y rearrreglos cromosómicos en regiones de inestabilidad genómica (Wang, 2006).

Al la fecha, se han identificado una gran cantidad de sitios frágiles en diferentes especies, y se los ha clasificado según su frecuencia de expresión en una población dada. Se entiende por sitio frágil común, a aquel que aparece en una alta frecuencia en la población, pero en una baja frecuencia en las placas metafásicas analizadas bajo ciertos inductores como lo son, afidicolina, 5-azacitidina y bromodeoxi-uridina. Por otro lado, los sitios frágiles que aparecen en baja frecuencia en la población, pero que están presentes en la mayoría de las metafases analizadas expuestas a Distaminicina, a un medio pobre en Folato o Bromodeoxiuridina, se los denomina sitios frágiles raros (Sutherland *et al.*, 1998).

1.3.3. Afidicolina

Este agente es una micotoxina diterpenoide la que es capaz de inhibir tanto al ciclo celular como a la replicación de ADN (Tedeschi *et al.*, 2004). Además de sus efectos citotóxicos se ha demostrado que es un potente inhibidor de las ADN Polimerasas α , δ y ϵ (Tedeschi *et al.* 2004; Kuriyama *et al.*, 2008) así como también de diversos mecanismo de reparación del ADN (Speit y Schutz, 2008). Ha sido descrito que defectos en la pol α aumentan la

inestabilidad genómica (Kuriyama *et al.*, 2008). Otra de las propiedades descritas de la afidicolina es que compete con la polimerasa de manera preferencial con sitios ricos en citosinas, 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.

1.3.4. 5-Azacitidina-C

Se lo ha descrito como un análogo de base de la citosina, cuya diferencia es que en el anillo de purina, en posición 5 tiene un nitrógeno en lugar de un carbono. Puesto que este nitrógeno no interviene en la formación de enlaces de hidrógeno, permite que la 5-aza-C se aparee normalmente con G, sin provocar ningún efecto en la estructura de la doble hebra. Además una vez que se incorpora (en fase S) la 5-aza-C en el duplex de ADN, no puede ser metilada por la metil transferasa por no tener el carbono en la posición 5 del anillo, otra particularidad es que se une covalentemente a la metil transferasa inhibiéndola, haciendo imposible la metilación de otros nucleótidos de citosina en el periodo G2 del ciclo celular. Esta serie de características fueron presentadas por Haaf y Schimd en su trabajo publicado en el 2000.

Estudios recientes de inducción con 5-aza-C (10mM), en período G2 de cultivos linfocitarios de bovinos Criollos, revelan una intensa acción de este inductor sobre regiones centroméricas de monobraquiados, autosomas y uno de los cromosomas X de la hembra (Artigas *et al.*, 2008).

1.3.5. Alteraciones cromosómicas

El daño y reparación del ADN lleva a la formación de las aberraciones cromosómicas, las que son microscópicamente visibles (Obe *et al.*, 2002). Dicho daño puede darse de forma espontánea o ser inducido por diferentes agentes, denominados clastogénicos. A grandes rasgos se diferencian dos tipos de alteraciones, las que afectan el número de cromosomas, por lo que llevan el nombre de numéricas, y las que afectan la estructura cromosómica, denominadas estructurales.

Para las alteraciones estructurales es necesario tener en cuenta la fase del ciclo celular en la que ocurre el daño, el tipo de agente clastogénico, así como el mecanismo de reparación tras la lesión producida. En cuanto a los clastogénicos, pueden dividirse en dos categorías, vinculadas a la fase del ciclo celular donde el daño es provocado, como S-dependientes y S-independientes. En estos últimos, la alteración observada en mitosis, pone en evidencia en que etapa del ciclo fue realizado el daño. Por lo tanto, si el daño fue realizado en G1 se observarían lesiones tipo cromosoma (ambas cromátidas afectadas), como dicéntricos, gap cromosómico, translocaciones simples y recíprocas, anillos céntricos y acéntricos, deleciones intersticiales y terminales. Por otro lado, si la lesión es causada al comienzo de la fase S se observarían aberraciones tipo cromátida, como deleciones intersticiales y terminales, duplicaciones-deleciones, anulares, trirradiales y cuadrirradiales, gap de cromátida, fractura de cromátida y fracturas de isocromátida. Sin embargo también puede observarse alguna aberración tipo cromosoma en esta etapa del ciclo. En el caso que el daño sea causado al final de S o G2, se observarían solamente aberraciones tipo cromátida. En cuanto a los agentes S-dependientes, como su nombre lo indica, necesitan de la fase de replicación para que se pueda poner en evidencia la alteración, las que son exclusivamente de tipo cromátida. (Savage, 1976; Obe *et al.*, 1992)

2. Hipótesis

Debido a que los cromosomas bibráquiados de la especie *Ovis aries* serían producto de translocaciones Robertsonianas, deben presentar regiones de inestabilidad las que se pondrán en evidencia con la afidicolina y la 5-azacitidina.

3. Objetivos del trabajo

En este primer abordaje, se pretende:

- Conocer los cromosomas del ovino hembra, clasificarlos según su morfología.

- Estudiar regiones de mayor inestabilidad genómica en los cromosomas del ovino Criollo hembra, utilizando agentes con actividad clastogénica. Analizar la expresión de sitios de inestabilidad inducidos por la afidicolina sobre los cromosomas bibraquiados, reconocer el tipo de lesión y cuantificar sus frecuencias.
- Estudiar regiones de despiralización de la cromatina, mediante la acción de la 5-aza-C, en el período G2; identificar regiones diferenciales de la cromatina.

4. Materiales y métodos

4.1. *Animales Experimentales*

Se utilizaron ovinos hembras Criollas, escogidos al azar, de dos poblaciones diferentes: Zoológico de Villa Dolores, Intendencia Municipal de Montevideo y Parque Nacional de San Miguel (Depto. Rocha) correspondiente a los Servicios de Parques del Ejército (SE.PA.E.).

El hecho de haber escogido animales provenientes de esas localidades y no de establecimientos de producción, fue por el motivo de que estos no estarían siendo tan arduamente seleccionados por productores. Suponiendo que de esta forma presentarían una mayor variabilidad por procesos naturales y no artificiales.

4.2. *Técnica de macrocultivo linfocitario para análisis citogenético:*

Toma de muestras de sangre venosa periférica

Los ovinos Criollos fueron inmovilizados manualmente (sin anestesia) por veterinarios y colaboradores para ejecutar la toma de muestras sanguíneas.

Previo a esto, en el laboratorio, se prepararon jeringas con heparina sódica (5.000 UI) para evitar la coagulación sanguínea.

De cada uno de los individuos muestreados, se extrajo 10ml de sangre periférica de vena yugular, con jeringa estéril previamente heparinizada en

máximas condiciones de asepsia logradas en el lugar. Estas muestras fueron inmediatamente colocadas a refrigeración (5°C aproximadamente) en nevera portátil herméticamente cerrada con hielo. Pudiendo de esta forma mantenerlas en buenas condiciones para así, poder trasladarlas hasta el laboratorio de Genética de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay.

4.2.1. Medio de cultivo completo

Se utilizo RPMI 1640 + L-glutamine (GIBCO 11875, Invitrogen), como antibiótico Penicillin-Streptomycin (GIBCO), Suero Fetal Bovino (GIBCO), como mitógeno fitohemaglutinina (Phytoemagglutinin M, Biological industries Kibbutz Beil Haemek, Israel). Las proporciones de cada uno de los reactivos por tubo se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1.- Resumen de los componentes ingresados a cada tubo, desde la preparación del medio, siembra de muestra, hasta la instancia de levantar el cultivo y parte del procesamiento.

RPMI	Mitógeno	SBF	Antibióticos	Gotas de	Temp	Tiempo	Tiempo	Colcemid (10µg/ml.)	tiempo
1640	Pha			Sangre	Incubación	incubación	colcemid		Hipotónica (KCL (0,75M)
5ml	0.25ml	1.5ml	0.15ml	6 a 10	38,5°C	72hrs	30' o 15'	0.05ml	25' a 30'

4.2.2. Siembra y Diseño experimental

De cada uno de los animales en estudio, se sembraron 10 gotas de sangre entera por tubo de cultivo rotulado que contenía medio de cultivo completo. Este trabajo se realizó en cámara de flujo con mechero, a fin de evitar las posibles contaminaciones. Se sellaron los tubos con tapones de silicona y parafilm, para ingresarlos a baño Maria (Mettmert), donde fueron incubados durante 72 horas a temperatura constante. En nuestro caso, como se trabajó con la especie *Ovis aries*, el baño fue programado a 38,5°C

aproximadamente, ya que esta temperatura debe ser igual o un poco mayor a la corporal de la especie en estudio.

Para el ovino Criollo del Zoológico de Villa Dolores y el de la reserva de San Miguel, se diagramó una serie de tubos, 23 y 11 respectivamente con diferentes variantes (tabla 2 y 3).

Tabla 2.- Diseño de primer cultivo linfocitario, correspondiente al ovino Criollo del Zoológico Villa Dolores, Montevideo, Uruguay.

Tubo N° 3	Control (15 min de colchicina)
Tubo N° 5	Inducción con APC 0,3 μ M (30 min de colchicina)
Tubo N° 14	Inducción con Aza-C 20 mM (30 min de colchicina)
Tubo N° 15	Inducción con Aza-C 20 mM (30 min de colchicina)
Tubo N° 21	Inducción con Aza-C 20 mM (30 min de colchicina)
Tubo N° 22	Control (30 min de colchicina)

Tabla 3.- Diseño de segundo cultivo correspondiente al ovino Criollo proveniente de la Reserva del Parque de San Miguel, Rocha, Uruguay.

Tubo N° 01	Control
Tubo N° 04	Afidicolina – 0,40 μ M - 24 hs
Tubo N° 07	5-Azacidina-C - 2,0 mM - 2 hs
Tubo N° 10	5-Azacidina-C - 3,5 mM - 2 hs
Tubo N° 11	Control

4.2.3. Tratamiento del cultivo

Durante los 3 días de incubación, aproximadamente cada 24 horas desde el momento en que se ingresaron los tubos al baño, se los agitó con el fin de resuspender las células. Antes de la resuspensión, se evalúa el color del sobrenadante, en el cual se espera que estén creciendo los linfocitos, como control del Ph del medio. Si este es igual al del medio de cultivo indica un Ph no ácido.

4.2.4. Inducción con afidicolina

La inducción con afidicolina (APC) con una concentración final de 0.30 μM se realizó 24 horas antes de procesar el cultivo.

4.2.5. Inducción con 5-azacitidina

Se realizó el tratamiento con 5-aza-C con una concentración final de 2,0mM y 3,5mM, dos horas antes de levantar el cultivo.

4.2.6. Colchicinado del cultivo

En el caso del primer cultivo, el colcemid (Colcemid solution, 10 $\mu\text{g/ml}$, Biological industries Kibbutz Beil Haemek, Israel) se incorporó en una misma concentración pero a dos tiempos diferentes, 15' y 30' antes de la hora estipulada para el levantamiento del cultivo (tabla 1 y 2). Para el segundo cultivo se utilizó la misma concentración pero se adicionó, solamente, 30' antes de procesar el cultivo.

4.3 Procesamiento del cultivo

Ya cumplidas las 72 horas de incubación, el material biológico de cada tubo de cultivo es resuspendido y pasado a tubos cónicos de centrifuga de 15 ml. Los tubos de descarte, se dejan en agua corriente con hipoclorito; y los tapones de silicona en agua corriente con detergente neutro.

Se realiza la centrifugación de las muestras durante 10 minutos a 800rpm, posteriormente se descarta el sobrenadante dejando una capa sobre el pellet (células).

Luego del centrifugado y de eliminado el sobrenadante se incorporó de 5 a 6ml de solución salina hipotónica (KCL 0,075M) sobre las paredes resuspendiendo lentamente con pipeta Pasteur de punta fina, dejándolo actuar durante 20 o 25 minutos a temperatura ambiente. Por cada tubo, se utilizó una pipeta, y se descarto en un recipiente con agua corriente e hipoclorito. Se detuvo la hipotonía con 6 gotas de solución fijadora Carnoy (3:1 metanol-acético PPA) conservada en freezer. Pudiendo así además de detener la acción de la solución hipotónica, producir una fijación uniforme. Luego de una fijación

homogénea de las células, se comienza con el lavado. Para ello, se centrifugan las células a 800rpm durante 10 minutos. Se descarta luego el sobrenadante (dejando una capa nuevamente), se agrega solución 3:1, se lo resuspende y se deja actuar el fijador durante 15 minutos. El lavado se repitió, realizando siempre los mismos pasos, hasta obtener un sobrenadante traslucido y un pellet blanco correspondiente al botón celular buscado.

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

4.4. Elaboración de preparados

4.4.1 Obtención de preparaciones por dispersión o goteo

Se colocan portaobjetos, previamente preparados en "copping" con metanol 70% y se conservan en freezer para evitar la evaporación de este alcohol (ver apéndice).

Una vez escogido el tubo a analizar se lo centrifuga a 800rpm por 10 minutos, se descarta sobrenadante, se le adiciona fijador 3:1 (metanol: ácido acético) y se lo resuspende con pipeta Pasteur. Se toma una pequeña porción de la suspensión celular con pipeta Pasteur y se dejan caer de dos a tres gotas sobre el portaobjetos recién retirado del coping con metanol desde una distancia de 30 a 50 cm. Se toma el portaobjetos con la preparación desde el extremo de la etiqueta, se acerca el extremo opuesto al mechero y se retira, para después dejarlo a temperatura ambiente y rotularlo.

Antes de la tinción es conveniente comprobar la calidad del preparado en el microscopio mediante contraste de fase.

4.5 Técnica de Banda G

Se utilizó Tripsina (0,025M), diluída en PBS (solución salina fosfatada), en baño a 29-30°C. Los tiempos se ajustaron entre 25 a 35 segundos, lavando inmediatamente en PBS. Luego las preparaciones se tiñeron con Giemsa pH 6.8

(1.5ml Giemsa; 1.5ml Buffer A; 1.5ml. buffer B; 1.5ml metanol; completar a 50ml en agua destilada).

Solución stock: 250mg.tripsina en 100ml PBS.

Tomar 4ml de solución stock y llevar a 50ml de PBS

4.6. Tinción cromosómica con colorante Giemsa al 3%

En copplin de 50ml se incorpora 46.5ml de ddH₂O, 3ml de tampón fosfato Sorensen y 1.5ml de solución Giemsa madre. Se ingresan las preparaciones, las que deben estar secas, y se las deja durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo se retiran y se lavan con agua corriente, luego se dejan secar a temperatura ambiente o en estufa en tiempo necesario. En el caso de que se quiera desteñir, se las sumerge en coppling con 3:1 (metanol:ácido acético) hasta que se haya eliminado todo el colorante, si a las preparaciones se les había adicionado aceite de inmersión durante su observación, es necesario el tratamiento en Xilol de éstas durante 24 horas a temperatura ambiente.

4.7. Observación, evaluación del cultivo y captura de imágenes.

Se utilizó microscopio Olympus (BX60) con un software para captura de imágenes (Kodak Digital Science 1D) con un aumento de 100X (lente de inmersión en aceite). La evaluación del cultivo se realizó, basándose en el índice mitótico*, sobre preparaciones de los tubos controles tratados con diferentes tiempos de colchicina (ver apéndice).

4.8. Criterio de Clasificación para 5- aza-C

Se asignarán diferentes niveles a las placas metafísicas observadas, 0 en las que no se ve acción del agente, 1 leve acción, 2 acción moderada y 3 pulverizados.

5. Resultados

Las muestras analizadas del primer cultivo (ovino Criollo hembra del Zoológico de Villa Dolores) y del segundo cultivo (ovino Criollo hembra del Parque Nacional de San Miguel) resultaron similares en la evaluación de los tubos controles, mientras presentaron diferencias en cuanto a la expresión de los inductores.

5.1. Evaluación del cultivo

Ésta se realizó basándose en el índice mitótico. Se escanearon preparaciones de tubos control (de los dos animales) tratados con colchicina a diferentes tiempos: 15 min. y 30 min. Se evaluaron 10 campos en cada preparación, basándose en: número de metafases frente al número total de células. Se obtuvieron los siguientes resultados: para el primer cultivo: a) 15min: IM=3,51%; b) 30min: IM=4,55%; para el segundo cultivo c) 30min: IM=4,46%.

5.2. Controles

Se analizaron un total de 87 y 33 metafases completas para los tubos control del primer y segundo individuo respectivamente, ambas hembras coincidieron con la descripción fenotípica normal anteriormente planteada. En base a esto se pudo constatar el complemento diploide de estos dos ovinos Criollos, $2n=54$, XX, con sus tres pares de metacéntricos, fácilmente distinguibles (figura 2), sus dos cromosomas X, y demás autosomas acrocéntricos. En el caso de los cromosomas sexuales acrocéntricos, éstos se caracterizan por presentar un marcado brazo p (figura 3).

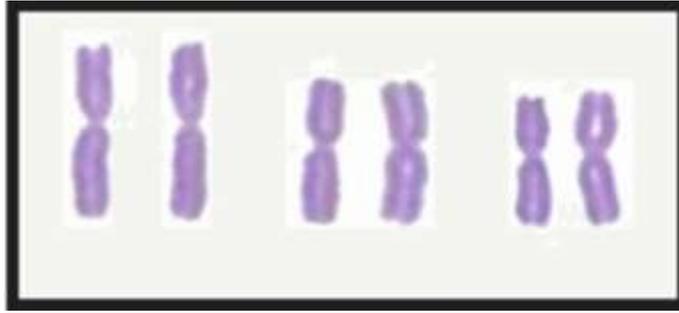


Figura 2.- Se presentan los tres pares de metacéntricos ordenados, OAR1, OAR2 y OAR3 de izquierda a derecha.

5.3. *Bandeo G*

Puesto que el patrón de bandas obtenido no resultó uniforme, no fue posible confeccionar el cariotipo (no se muestran resultados).



Figura 3.- Metafase obtenida de un tubo control del primer individuo, en el cual se observa el complemento cromosómico $2n=54, XX$, los tres pares de metacéntricos, los 23 pares de autosomas acrocéntricos y el par sexual señalado con flechas.

De las 87 metafases completas analizadas para el primer cultivo, se observaron solo 5 metafases con diferentes lesiones (gaps y fracturas). Estas alteraciones se las posicionó de forma estimativa en las distintas regiones cromosómicas; pericentroméricas, intersticiales y subteloméricas (Tabla 4).

Tabla 4- Se muestra el número de lesiones en tubo control (sin inducción) en los diferentes cromosomas y su posible ubicación en las diferentes regiones cromosómicas.

Lesiones	Gap			Fractura		
	Pericentrom	Intersticial	Subtelomeric	Pericentrom	Intersticial	Subtelomeric
Metacéntrico	0	0	2	0	0	0
Acrocéntrico	0	1	0	0	2	0

Para el segundo cultivo linfocitario no se observó ninguna lesión en las 33 metafases completas analizadas.

5.4. Tratamiento con afidicolina

Como se pretende estudiar la acción del inductor APC sobre los cromosomas bibraquiados de *O. aries*, se establecen dos diseños de cuantificación para las metafases analizadas, en el primero se toman en cuenta las metafases completas (metacéntricos, acrocéntricos y sexuales), y para el segundo se tiene como único requisito la presencia de los tres pares de bibraquiados, para que la metafase sea tomada en cuenta, de manera de ejercer una mayor presión de la muestra seleccionada

En base al primer diseño, de las 62 metafases analizadas para el tubo tratado con APC 0,3µM del primer cultivo, se observaron 46 metafases completas de las cuales 28 presentaron lesiones, tanto en los cromosomas monobraquiados como en los bibraquiados. O sea que un 60,8% de las metafases se encontraban dañadas en el tubo con APC, mientras que en los controles se observó sólo un 5,74% de metafases con lesiones (figura 4).

a

b

Figura 4.- Se presentan a modo de diagrama (diagrama de Venn) el número de metafases afectadas. a) tubo control (sin inducción), el rectángulo blanco representa el total de metafases completas analizadas, el círculo verde las metafases que presentaron lesiones sólo a nivel de los acrocéntricos, el azul las placas en las que se vió lesiones en metacéntricos, y la intersección en amarillo, corresponde al número de placas con lesiones en ambos cromosomas .b) tubos con la inducción de APC 0,3µM durante 24 horas, cada uno de los colores presentados tienen el mismo significado.

Las lesiones cromosómicas encontradas se las clasificó y posicionó de forma estimativa en las diferentes regiones cromosómicas (pericentromérica, intersticial, telomérica) (tabla 5). Se observaron lesiones tanto en cromosomas metacéntricos como acrocéntricos (Figura 5), obteniéndose un 26,08% de placas metafásicas que presentaron lesiones en bibraquiados (Figura 4).

Tabla 5- Lesiones cromosómicas y tipo de alteración observada en metafases completas con inducción de APC 0,3µM 24horas

Lesiones	Gap			Fractura		
	Pericentrom	Intersticial	Subtelomeric	Pericentrom	Intersticial	Subtelomeric
Metacéntrico	1	6	6	2	0	1
Acrocéntrico	9	10	6	1	4	4

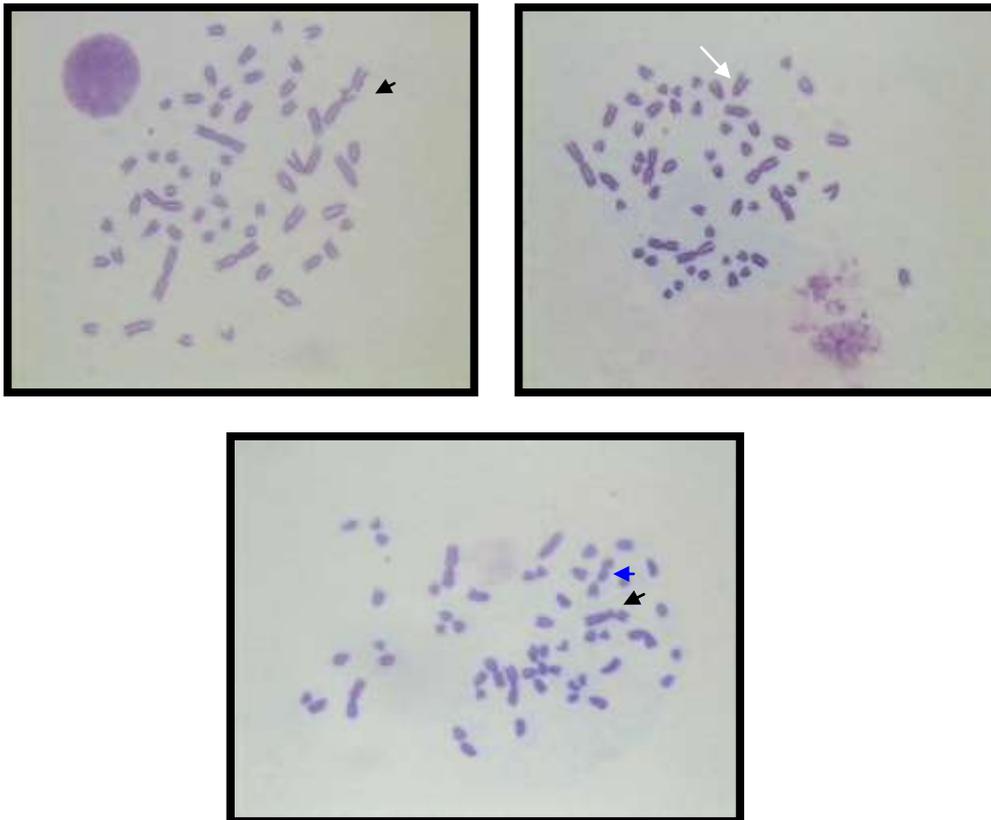


Figura 5.- Metafasas completas con diferentes tipo de daño, obtenidas del tratamiento con APC $0.3\mu\text{M}$ durante 24 horas. La flecha negra indica fractura de cromátida pericentromérica en metacéntrico, posiblemente se trata del OAR2. La flecha blanca señala gap de cromátida, mientras que la azul fractura de cromátida.

A los efectos de ser más riguroso en la elección de las muestras a analizar (lesiones sobre bibraquiados) y potenciar los resultados, se tomaron en cuenta todas aquellas metafases con los 6 bibraquiados, siendo ahora ésta la población a analizar (segundo diseño anteriormente planteado). Para las metafases sin inducción el número fue de 90 viéndose 2 de ellas con lesiones en los cromosomas metacéntricos. Por otro lado, para la inducción con APC $0,3\mu\text{M}$ 24 horas, se observa un total de 62 metafases, contabilizándose 14 que presentaban daño a nivel de los metacéntricos (tabla 6) en reiteradas oportunidades con más de una lesión por placa (figura 5).

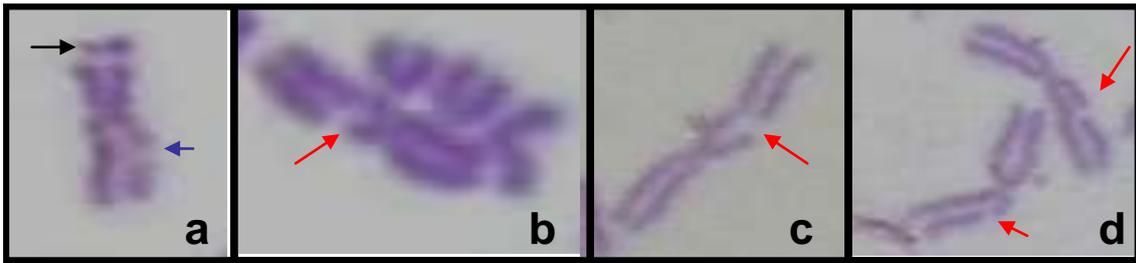


Figura 6.- Diferentes lesiones en los metacéntricos a y b) lesiones observadas en los tubos sin inducción; c y d) lesiones observadas con la inducción de APC 0,3 μ M. La flecha negra indica gap de cromosoma y las rojas fractura de cromátida.

Tabla 6.- Lesiones en metacéntricos y tipo de alteración observada en metafases con los 6 bibraquiados para controles (sin inducción) y con inducción (APC 0,3 μ M, 24 hrs.)

	Lesiones en metacéntricos		
	Placas afectadas	Gaps	Fracturas
Control	2,7%	3	2
APC	22,5%	27	9

En el caso del segundo cultivo, las observaciones de inducción con la solución de trabajo de APC no se pudieron realizar por un problema de manejo de la inducción.

5.5. Tratamiento con 5-azacitidina-C

Este agente, incorporado dos horas antes de levantar el cultivo (en periodo G2 del ciclo celular) actuó de forma diferencial entre las metafases, pudiendo encontrarse placas con diferentes niveles de descondensación para una misma inducción (Figura 7).

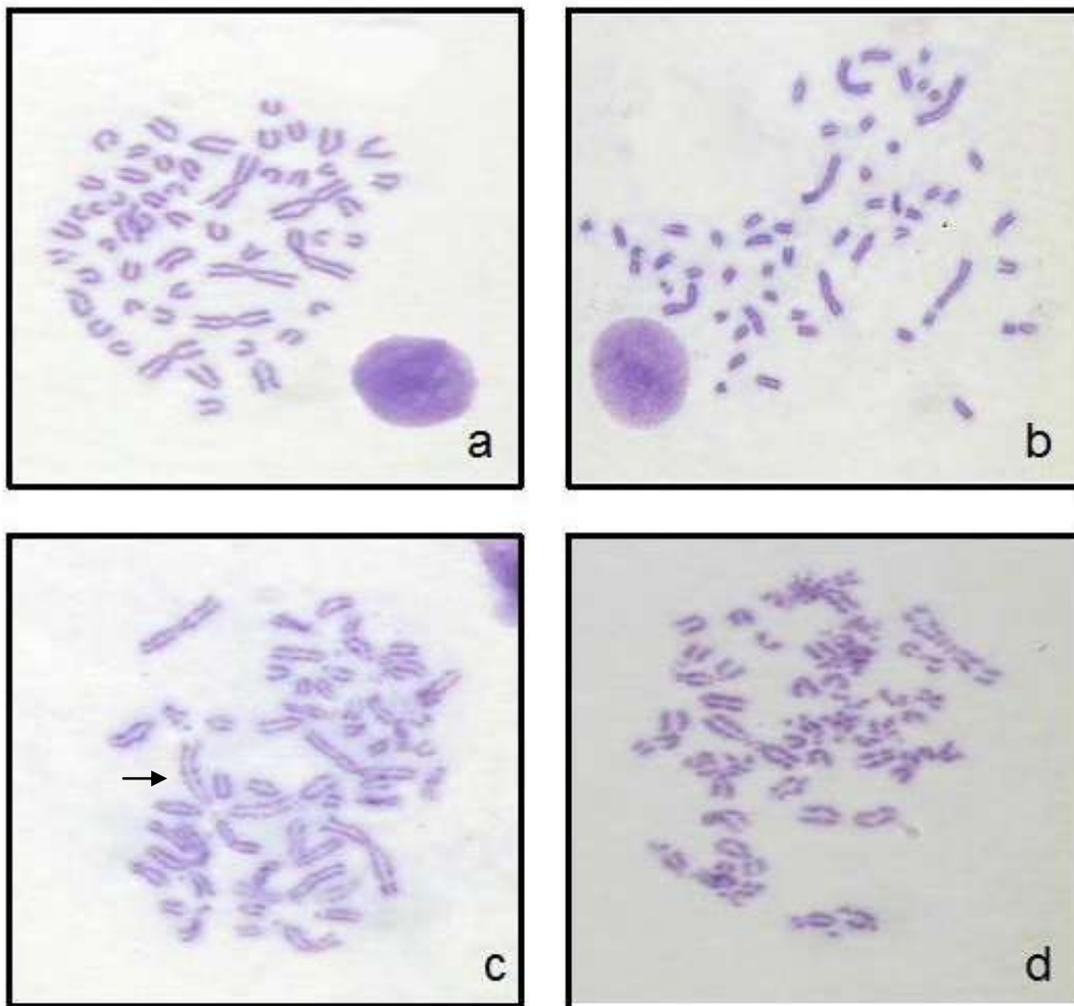


Figura 7.- Metafases de la inducción con 5-aza-C (2,0mM, dos horas), a) sin acción aparente del inductor, b) muy pocos puntos de despiralización, c) descondensación en varios cromosomas, se marca el X inactivo con una flecha, d) placas en las que los cromosomas se encuentran pulverizados.

5-aza-C 2mM primer cultivo

En este cultivo, se utilizó solamente la concentración de 2mM de 5-aza-C dos horas antes de levantarlo. En cuanto a las 113 placas analizadas, provenientes de tres tubos diferentes, se observó que 92 presentaban algún grado de descondensación (tabla 7).

Tabla 7.- Número de metafases observadas y cuantificadas en muestras control (0mM) e inducidas con 5-aza-C (2mM) en el primer cultivo.

	Placas		Nivel Cero	Nivel Uno	Nivel Dos	Nivel Tres
	analizadas	afectadas				
Control	87	0	87	0	0	0
5-aza	113 (100%)	92(81,4%)	21(18,6%)	46 (40,7%)	35(30,9%)	11(9,8%)

5-aza 2mM segundo cultivo

En cuanto a las 40 metafases analizadas, tan sólo una no exhibía algún grado de descondensación (tabla 8)

Tabla 8.- Número de metafases observadas y cuantificadas en muestras control (0mM) e inducidas con 5-aza-C (2mM) en el segundo cultivo.

	Placas		Nivel Cero	Nivel Uno	Nivel Dos	Nivel Tres
	Analizadas	afectadas				
Control	33	0	33	0	0	0
5-aza	40(100%)	39 (97,5%)	1(2,5%)	22(55%)	8(20%)	9 (22,5%)

5-aza 3,5mM segundo cultivo

Se capturaron 81 metafases a concentraciones más alta de las cuales 75 presentaron descondensaciones (tabla 9).

Tabla 9.- Número de metafases observadas y cuantificadas en muestras control (0mM) e inducidas con 5-aza-C (3.5mM) en el segundo cultivo.

	Placas		Nivel Cero	Nivel Uno	Nivel Dos	Nivel Tres
	analizadas	afectadas				
Control	33	0	33	0	0	0
5-aza	81(100%)	75(92,5%)	6(7,4%)	41 (50,6%)	20 (24,6%)	14(17,3%)

En todos los casos, se observó un mayor número de metafases en el nivel uno, pero se determinó como óptimo, para el análisis de regiones de inestabilidad el nivel dos, por observarse en algunas placas el X inactivo descondensado y los autosomas no perdieron su identidad, (Figura 7c). Este cromosoma se identificó por su morfología particular (Figura 3)

6. Discusión

El diseño realizado en este trabajo tuvo resultados que permiten emprender en forma primaria el estudio cromosómico de ovinos Criollos asociado a lesiones y despiralización de la cromatina.

6.1. Condiciones de cultivo

Se realizaron dos cultivos linfocitarios: Primer cultivo, hembra de ovino Criollo del Zoológico de Villa Dolores; segundo cultivo, hembra de ovino Criollo del Parque Nacional de San Miguel. Para poder evaluar las condiciones de los cultivos se calcularon los IM, obteniéndose un IM=3,51% (15min de colchicina) y IM=4,53% (30min de colchicina) para el primer cultivo, y un IM=4,46% para el segundo cultivo.

6.2. Complemento cromosómico de *Ovis aries*

En base a los resultados obtenidos de los tubos control (sin inducción) de ambos cultivos, se pudo verificar tanto el complemento cromosómico como la morfología de los cromosomas que lo componen. Se observan los 3 pares de metacéntricos (figura 2), los 23 pares de autosomas acrocéntricos, más 2 pares de morfología acrocéntrica que corresponden a los 2 cromosomas sexuales, obteniéndose la fórmula cromosómica de $2n=54, XX$ (figura 3). Estos datos preliminares, se presentaron para discusión en las Primeras Jornadas Uruguayas de Genética (da Cruz *et al* 2008; Grasso *et al* 2008; Graziano *et al*; 2008).

6.3. Acción del agente afidicolina

A los efectos de poner en evidencia los diferentes puntos de inestabilidad cromosómica asociados al genoma del ovino Criollo, se analizaron los diferentes tipos de daño, que resultan de la acción de un agente S-dependiente, la afidicolina. El hecho de que el tiempo de incubación con APC haya sido de 24 horas (duración de un ciclo celular en mamíferos) es justamente a fin de asegurar que los linfocitos pasen por la fase S del ciclo celular (de síntesis de ADN) y poder interpretar las lesiones observadas. Como se dijo anteriormente la APC también inhibe las polimerasas α , δ y ϵ (Tedeschi *et al*, 2004; Kuriyama *et al*, 2008) así como también diversos mecanismos de reparación del ADN (Speit y Schutz, 2008). Además, se ha descrito que, defectos en la polimerasa α aumentan la inestabilidad genómica (Kuriyama *et al*. 2008). Por lo que, mecanismos de reparación que tendrían que solucionar los errores cometidos en el período S no podrían llevarse a cabo, observándose gaps y fracturas, tanto de cromátida como de cromosoma en la mitosis subsiguiente (figura 4, 5c y 5d).

A los efectos de obtener las frecuencias de sitios inestables en los cromosomas bibraquiados (3 pares) se analizaron dos poblaciones de metafases: a) aquellas en que se consideró la presencia de todos los cromosomas (metafases completas); b) aquellas con la población objetivo de análisis (6 cromosomas bibraquiados). En los controles de ambos casos, no existieron diferencias: a) 2,2%; b) 2,7% de lesiones espontáneas.

La cuantificación de la acción del inductor resultó para el primer caso de un 26,08% de lesiones frente a un 22,5% para el segundo caso. Esta tendencia a una mayor frecuencia para el caso de un menor número de metafases cuantificadas, pero completas, no se ajusta a lo esperado probabilísticamente. Por lo que se piensa que la variable concentración, debe estar jugando un importante papel en el ajuste de la óptima acción de este inductor. Esta propuesta es apoyada por los trabajos de Danielak-Czech y Slota (2004) quienes experimentando con 5-aza-C (50 μ 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.

Si tomamos en cuenta las concentraciones de APC (0,3uM) utilizadas en otros cultivos linfocitarios en mamíferos: humano, bovino, búfalo (Di Tomaso,1998; Rodriguez *et al.*, 2002; Artigas *et al.*, 2008; Nicodemo *et al.*, 2008) todos con igual duración (24 hrs) podemos pensar que para el caso de los ovinos, la concentración debería ser más alta. Frente a estos resultados se propone establecer una serie de concentraciones, con igual duración, a partir de 0,3uM. cuyos resultados deberán ser monitoreados por bandeado cromosómico y comparar los resultados por el estandar (Di Bernardino D. *et al.*, 2000). Este logro para cromosomas bibraquiados y cromosomas X's en machos y hembras, permitirá ser utilizados como marcadores cromosómicos y poder asociarlos a regiones génicas como se realiza en el hombre y animales domésticos, entre otros (Di Tommaso, 1998; Llambí *et al.*, 2008; Artigas *et al.*, 2008) a los efectos de lograr estándares para ser utilizados como marcadores cromosómicos de regiones génicas pudiéndose comparar la homeología por mapas comparativos entre especies relacionadas filogenéticamente.

La ubicación de las regiones específicas de lesiones de la cromatina permitirán relacionarlas con bandeos de replicación temprana, tardía, teniendo en cuenta que, si estas lesiones subyacen en bandas G positivas, la cromatina corresponde a la replicación tardía (ricas en AT), alojándose genes tejido específico a diferencia de las bandas R positivas que se diferencian por ser ricas en secuencias nucleotídicas GC, y replicación temprana (Korenberg y Rykowski, 1988; Holmquist y Ashley, 2006) con el enfoque de lo discutido en el trabajo de Artigas *et al.*, 2008).

Una vez que se tenga estandarizada la concentración de APC se podría realizar un estudio de carácter poblacional, a fin de determinar la posible existencia de algún sitio frágil en los cromosomas del ovino Criollo. El estudio preliminar realizado en esta pasantía permite observar una fractura probablemente ubicada en el brazo p del OAR2 tanto en el material control(0%inducción) (lesión espontánea) como en el tubo con inducción (0,3uM APC).

Otra experiencia que seria interesante realizar, seria la inducción de APC a las 24 horas de ingresado el cultivo, dejar que el agente actúe un ciclo y

después eliminarlo mediante lavados para finalmente levantar el cultivo 24 horas después que se retiró el agente. Esto permite que los cromosomas que sufrieron lesiones por la APC sean reparados dando origen a diferentes aberraciones. Un estudio de estas características fue realizado por Fuster y colaboradores (1999), en el cual realizando lo anteriormente planteado en cultivos linfocitarios humanos observaban deleciones e inversiones que reproducían cromosomas de otros primates, pero en frecuencias bajas (Fuster et al, 1999). Como el modelo de formación de los diferentes cromosomas de la familia Bovidae se encuentran basados en macro y micro-reordenamientos, posiblemente debido a regiones de inestabilidad cromosómica, sería interesante incursionar en estas problemáticas que pueden estar asociadas a genes involucrados en problemas de interés nacional (Vaiman, 1999).

6.4. Acción del agente 5-aza-C

Los resultados fueron óptimos, permitiendo realizar la evaluación. Los datos de tubos control e inducidos fundamentan lo expresado, siendo que para todos los controles el porcentaje de metafases con despiralización fue del 0 %, mientras que para las concentraciones de 5-aza-C durante dos horas de 2,0mM (primer cultivo), 2,0mM (segundo cultivo) y 3,5mM (segundo cultivo), el porcentaje de metafases afectadas fue del 81,4%, 97,5% y 92,5% respectivamente (tablas 7, 8 y 9).

Para el caso de este análogo de base, 5-aza-C (2hrs.), se vió una acción notablemente diferencial entre las metafases obtenidas afectadas, pudiendo así discriminar entre cuatro niveles según el grado de descondensación de la cromatina. Como se planteó anteriormente el nivel cero corresponde a metafases sin acción aparente del inductor, las de nivel 1 con una leve acción, nivel dos un mayor número de cromosomas descondensados y finalmente el nivel tres a cromosomas pulverizados.

Una posible explicación para estos niveles tan diferenciados dentro de un mismo tubo, podría deberse a que las células se encontraban en diferentes etapas dentro de G2, que la distribución del análogo a la hora de la inducción no fue de forma homogénea, ya que los cultivos no son sincronizados. Se observó para las dos concentraciones utilizadas tanto para el primer como

segundo cultivo, que el mayor número de metafases coincidía con el nivel 1. Sin embargo el nivel óptimo sería el 2, donde logra verse, en algunas metafases el cromosoma X inactivo además de algunos puntos de despiralización en los autosomas. De esto, podría desprenderse que la cromatina descondensada en los diferentes autosomas podría ser facultativa como la del X inactivo (Haaf, 1995), aunque el proceso de la despiralización es mucho más complejo, ya que interviene cambios en proteínas que pueden estar involucradas en esta dinámica (Grewal y Jia, 2007).

La función primaria de la metilación del ADN es una modificación epigenética que mantiene y/o determina la estructura heterocromática del X inactivo, así como el silenciamiento génico. Una vez que estos patrones de metilación son determinados, se heredan en líneas somáticas. Sin embargo la enzima 5-metilcitosina no se incorpora en la nueva hebra en el duplex hemimetilado, sino que metilasas de mantenimiento unen grupos metilo a las citosinas. La 5-aza-C, debe ser incorporada durante la replicación tardía para impedir la acción de las metilasas de mantenimiento, de todas formas se ha determinado que la acción de este análogo depende de dos variables concentración y tiempo (Haaf y Schimd, 2000).

Además en el estudio realizado por Danielak-Czech y Slota (2004), en bovinos, cerdos y ovinos, se observó que en experiencias con 5-aza-C (50µg/ml, 6hrs) en bovinos se evidenció un mayor efecto sobre su genoma, mientras que en cerdos y ovinos era marcadamente menor (50%). Similar a lo expuesto para el otro inductor (APC), sería de carácter informativo emplear concentraciones mayores sobre el genoma ovino y porcino, con el fin de lograr una concentración que permita llegar a un estándar para ser utilizado como marcador cromosómico. Con esto se demuestra como a una misma concentración y tiempo, pero en diferentes especies, la acción de la 5-aza-C actúa de forma diferencial.

La incorporación de este análogo de base al final de G2 (dos horas antes de levantar el cultivo) causaría la hipometilación del cromosoma X inactivo, el cual replica sobre el final de la fase S, impidiendo de esta manera su correcta compactación para la mitosis. Este fenómeno de inhibición de la heterocromatinización estaría dado por la acción de la 5-aza-C al bloquear las metiltransferasas impidiendo la metilación de las citosinas. O sea que estaría

actuando sobre el final de G2 momento de condensación de aquella cromatina replicada tardíamente (Haaf y Schmid, 2000, Holmquist y Ashley, 2006).

Para los casos estudiados en esta pasantía: a) primer cultivo (2,0mM); b) segundo cultivo (2,0mM y 3,5mM) con un mismo tiempo de tratamiento (2hrs.) se permitió observar descondensaciones localizadas en los cromosomas bibrachiados tanto en regiones proximales al centrómero como intersticiales así como también proximales al telómero, además del cromosoma sexual inactivo. Seguramente estas regiones de descondensación se corresponderían con regiones heterocromáticas facultativas cuya modificación epigenética para la regulación en la expresión génica sería la metilación. No obstante, cabe destacar que la 5-aza-C debe estar interviniendo en otros mecanismos además de la metilación del ADN.

6.5. Perspectivas

Es necesario seguir profundizando en el estudio de las diferentes regiones de inestabilidad genómica, con el fin de poder comprender más en detalle la naturaleza de la cromatina en esas regiones. Debido a que la dinámica de la cromatina en estos sitios puede traer consecuencias sobre la expresión diversos genes que actuarían a nivel productivo, reproductivo y evolutivo.

7. Agradecimientos

A mis familiares y amigos, por su gran apoyo en esta etapa, y durante toda de mi carrera.

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, un integrante más del equipo de trabajo.

8. Bibliografía

- Artigas R., Iriarte A., Tellechea B., Llambí S., De Bethencourt M., Postiglioni Al.. 2008. Aphidicolin induces break points in heterozygous Robertsonian translocation rob(1;29) from Uruguayan Creole cattle. *Journal of Basic and Applied Genetics* 19(1): 1-10.
- Brown V., Jin P., Ceman S., Darnell J. C, O'Donnell W. T., Tenenbaum S. A., Jin X., Feng Y., Wilkinson K. D., Keene J. D, Darnell R. B., y Warren S. T. 2001. Microarray Identification of FMRP-Associated Brain mRNAs and Altered mRNA Translational Profiles in Fragile X Syndrome. *Cell*, Vol. 107, 477–487,
- Bruère A.N., Chapman H.M., Jaine P.M., Morris R.M. 1976. Origin and significance of centric fusions in domestic sheep. *J Hered.* May Jun;67(3):149-54.
- Bruère A.N., Ellis P.M. 1979. Cytogenetics and reproduction of sheep with multiple centric fusions (Robertsonian translocations). *J Reprod Fertil.* 57(2):363-75.

- Bruère A.N., Scott I.S., Henderson L.M. 1981. Aneuploid spermatocyte frequency in domestic sheep heterozygous for three Robertsonian translocations. *J Reprod Fertil.* 63(1):61-6.
- Camacho Vallejo M.E., Delgado Bermejo J.V., Barba Capote C.J. 2000. Recursos genéticos de animales domésticos en España: situación actual y sistemas tradicionales de explotación. *Archivos de zootecnia*, ISSN 0004-0592, Vol. 49, Nº 187.pags. 423-430 .
- Chaves R., Helsop-Harrison J., Guedes-Pinto H. 2000. Centromeric heterochromatin in the cattle rob(1;29) translocation: a-satellite I sequences, in-situ MspI digestion patterns, chromomycin staining and C bands. *Chromosome Research* 8:621-626.
- 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 banded chromosome evolution. *Mammalian genome*. Pp 706-712.
- Chaves R., Guedes-Pinto H., Heslop-Harrison J. 2005. Phylogenetic relationships and the primitive X chromosome inferred from chromosomal and satellite DNA analysis in Bovidae. *Proc. R. Soc. B* (2005) 272, 2009–2016.
- Cockett N., Shay T., y Smit M. 2001 Analysis of the sheep genome. *Physiol genomics*. 7: 69-78.
- 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.P., Gallagher D.S., Hayes H., Iannuzzi L. (coordinator) (eds). 2001. ISCNDB 2000: International System for Chromosome Nomenclature of Domestic Bovids. *Cytogenet Cell Genet* 92:283–299.
- Di Meo G.P. y Iannuzzi L. 1995. Comparative FISH mapping of bovid X chromosomes reveals homologies and divergences between the subfamilies Bovinae and Caprinae. *Cytogenet Cell Genet* 2000;89:171 176.
- Di Meo G.P., Hayes H., Gautier M., Laurent P., Eggen A., Iannuzzi L. 2000. Localization by FISH of the 31 Texas nomenclature type I markers to both Q- and R-banded bovine chromosomes. *Cytogenet Cell Genet.* (3-4):315-20.
- Di Meo G.P. Perucatti R, Chaves F. 2006. Cattle rob(1;29) originating from complex chromosome rearrangements 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.
- Eggen A, Oustry A, Vaiman D, Ferretti L, Fries R, Cribiu EP.1994. Bovine syntenic group U7, previously assigned to Gbanded chromosome 25 in the ISCNDA nomenclature, assignsto R-banded chromosome 29. *Hereditas* 121: 295Y300.
- Fernández, G. 2000. Situación de los recursos genéticos domésticos locales del Uruguay. *Archivos de zootecnia*, ISSN 0004-0592, Vol. 49, Nº 187, pags. 333-340

- Fuster C., Miró R., Egozcue J. 1999. Chromosome aberrations induced by aphidicolin. *Mutation research*. 430(1) 47-53.
- 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.
- Grewal SI y Jia S. 2007. Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet*. 8(1):35-46. Review.
- Grzimek, B. 1990. *Grzimek's Encyclopedia of Mammals*. NY: McGraw Hill. Pp360-409
- Haaf T. y Schimd M. 2000. Experimental condensation inhibition in the constitutive and facultative heterochromatin of mammalian chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetic*. 91:113-123.
- Holmquist, G., Ashley, T. 2006. Chromosome organization and chromatin modification: influence on genome function and evolution. *Cytogenet & Genome Res*114:96-125.
- Korenberg J.R. y Rykowski M.C. 1988. Human genome organization: *Alu*, Lines, and the molecular structure of metaphase chromosome bands. *Cell* 53:391-400.
- Kuriyama I., Mizuno T., Fukudome K., Kuramochi K., Tsubaki K., Imamoto N., Sakaguchi K., Sugawara F., Yoshida H. y Mizushina Y. 2008. Effects of

Dehydroalrenusin Derivative, a selective DNA Polymerase α inhibitor, on DNA replication in cultured cells. *Molecules* (13) 2948-2961.

- 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 muscults*). *Nature* 190: 372-373.
- Lyon, M. F. 1972. X-Chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. *Biol. Rev.* 47: 1-35.
- Maddox, J., Cockett N. 2007. An update on sheep and goat linkage maps and other genomic resources. *Small Ruminant research*, doi:10.1016/j.smallrumres.2007.01.008
- Mernies, B., F. Macedo, Y. Filonenko y G. Fernández .2007. Indices zoométricos en una muestra de ovejas Criollas uruguayas. *Arch. Zootec.* 56: 473-478.
- Myers, P. 2001. "Artiodactyla" (On-line), *Animal Diversity Web*. Accessed January 25, 2009 at <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Artiodactyla.html>.
- 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.

- Obe G., Pfeiffer P., Savage, J.R.K., Johannes C., Goedecke W., Jeppesen P., Natarajan A.T., Martínez-López W., Folle G.A., Drets M.E. (2002) Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat. Res.*, 504: 17-36.
- Oguro, M., Suzuki-Hori, C., Nagano, H., Mano, Y., Ikegami, S. 1979. *Eur. J. Biochem.* Y7, 603-607.
- Peralta M., Pedraza P., Pérez Otero R. 1992. El borrego Chiapas: una raza local mexicana de origen español. *Archivos de zootecnia*, ISSN 0004-0592, Vol. 41, N° 154.
- Ponce De León F., Ambady S., Hawkins G., Capees S., Bishop M., Robl J., 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. USA*. Vol. 93, pp. 3450-3454. *Genetics*.
- Popescu. 1990. Conséquences des anomalies de la structure chromosomique chez les animaux domestiques. *Reprod Nutr Dev. Suppl1*, 105s-116s.
- 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, Gagliardi R. De Bethencourt M. 1996 Genetic characterization of Uruguayan Creole cattle. I. Cytogenetic Characterization of a sample of Uruguayan Creole cattle. *Arch Zootec* 45:(170-171)209-213.
- Postiglioni, A., Llambí, S., Guevara, K., Rincón, G., Arruga, M.V. 2002. Common fragile sites expression in rob(1;29) and their relations with chromosome rearrangements. 15th ECACGM P8.

- Postiglioni A., Artigas R., Iriarte W., De Soto L., Iriarte A., Llambi S., De Benthencourt M. 2007. Descondensación de la heterocromatina en ovinos criollos portadores de la translocación robertsoniana rob(1;29). Acción del inductor 5-azacitidina-C. Acta Agrom (Palmira) 65-69.
- Prothero D. R., Foss S.C. 2007. The Evolution of Artiodactyls. Edition: illustrated. Publicado por Johns Hopkins University Press, ISBN 0801887356, 9780801887352. (367). 4-8.
- Reavill, C. 2000. "Ovis aries" (On-line), Animal Diversity Web. Accessed January 20, 2009 at http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Ovis_aries.html.
- 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. Annotation: Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. Journal of Medical Genetics13:103-122.
- Speit G., Schutz P. 2008. 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., Baker E., Richards R. 1998. Fragile sites still breaking. Trends Genetics Dec;14(12):501-6.
- 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.

- Vaiman, D. 1999. The Molecular genetics of cattle. In: The genetics of cattle. Eds. R.Fries and A. Ruvinsky. CAB International.
- Wang, Y. 2006. Chromatin structure of human chromosomal fragile sites. Cancer letters 232. 70-78.

9. Apéndice

9.1. Solución hipotónica

Para la solución hipotónica (KCl 0,075M) utilizada en el cultivo linfocitario, se adiciono cada 2.78g de cloruro de potasio (KCl) 500ml de ddH₂O.

9.2. 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.

9.3. Tampón fosfato Sorensen (ph=6.8)

Se preparan por separado dos soluciones,

Solución A KH₂PO₄: Pesar: 9.08gr de KH₂PO₄, Llevar a 50.8ml de ddH₂O

Solución B Na₂H PO₄: Pesar: 11.8g de Na₂H PO₄, Llevar a 49,2ml de ddH₂O.

Mezclar partes iguales de A y B para obtener un pH de 6,8.

9.4. Preparación de la solución madre de afidicolina (PM=338.5)

1mg APC + 10 ml EtOH= 0.3 mM= 300 µM

9.5. Solución de trabajo de afidicolina

A 100 µl de la solución madre, se agregan 900 µl de medio de cultivo (TC199).

Concentración de solución de trabajo: 30 µM.

9.6. Preparación de la solución de trabajo de la 5-azacitidina-C (PM=244,2)

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

9.7. Preparación de portaobjetos para realizar preparados

Se los sumerge durante 20 minutos en acido acético al 45%, luego se lo pasa por alcohol etílico al 35% otros 20 minutos, finalmente se los limpia con gaza

estéril, para colocarlos en coplin con metanol 70%, el que se conserva en freezer.

9.8. Índice mitótico

Se tomaron 10 campos al azar con el objetivo de 10X. Se contó el número de metafases y se lo dividió por el número total de núcleos.

$$IM = (\text{metafase} / \text{total de núcleos}) \times 100$$

15 minutos de colchicina, primer cultivo

$$IM = 3,51\%$$

30 minutos de colchicina primer cultivo

$$IM = 4,53\%$$

30 minutos de colchicina segundo cultivo

$$IM = 4,46\%$$

Índice

Resumen.....	II
1. Introducción	
1.1.1. Descripción de la familia Bovidae y su ubicación en los Artiodáctylos.....	1
1.1.2. Homeología cromosómica entre las diferentes especies de bovidos.....	2
1.1.3 Consecuencias de las fusiones céntricas a nivel reproductivo y evolutivo.....	3
1.2. <i>Ovis aries</i>	
1.2.1. Características generales.....	5
1.2.2. Reseña histórica Ovino Criollo Uruguayo.....	6
1.2.3. Características del ovino Criollo.....	7
1.2.4. Genoma ovino.....	7
1.2.5. Mapa citogenético del ovino.....	8
1.3. Organización de la cromatina.....	8
1.3.1. Caracterización de la cromatina por bandeo cromosómico....	9
1.3.2. Regiones de inestabilidad genómica.....	10
1.3.3. Afidicolina.....	11
1.3.4. 5- Azacitidina.....	12
1.3.5. Alteraciones cromosómicas.....	12
2. Hipótesis.....	13
3. Objetivos del trabajo.....	13
4. Materiales y métodos.....	14
4.1. Animales Experimentales.....	14
4.2. Técnica de macrocultivo linfocitario para análisis citogenético: Toma de muestras de sangre venosa periférica.....	14
4.2.1. Medio de cultivo completo.....	15
4.2.2.Siembra y Diseño experimental	15
4.2.3. Tratamiento del cultivo.....	16
4.2.4 Inducción con afidicolina.....	16
4.2.5 Inducción con 5-azacitidina	17
4.2.6. Colchicinado del cultivo.....	17

4.3. Procesamiento del cultivo.....	17
4.4. Elaboración de preparados.....	18
4.4.1 Obtención de preparaciones por dispersión o goteo.....	18
4.5. Técnica de Banda G.....	18
4.6 Tinción cromosómica con colorante Giemsa al 3%	19
4.7. Observación y toma de imágenes de las placas.....	19
4.8. Criterio de clasificación para 5- aza-C.....	19
5. Resultados.....	19
5.1. Evaluación del cultivo.....	20
5.2. Controles.....	20
5.3. Bando G.....	22
5.4. Tratamiento con afidicolina	23
5.5. Tratamiento con 5-azacitidina.....	25
6. Discusión.....	27
6.1. Condiciones de cultivo.....	27
6.2. Complemento cromosómico de <i>Ovis aries</i>	27
6.3. Acción del agente afidicolina	28
6.4. Acción del agente 5-aza-C.....	30
6.5. Perspectivas	32
7. Agradecimientos.....	33
8. Bibliografía.....	33
9. Apéndice.....	41
9.1 Solución hipotónica.....	41
9.2 Solución de Giemsa madre.....	41
9.3 Tampón fosfato Sorensen (ph=6.8)	41
9.4 Preparación de la solución madre de afidicolina.....	41
9.5 Solución de trabajo de afidicolina.....	41
9.6 Preparación de la solución de trabajo de la 5-azacitidina-C.....	41
9.7. Preparación de portaobjetos para realizar preparados.....	41
9.8. Índice mitótico.....	42