

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

ESTUDIOS GENETICOS EN LA RAZA CANINA CIMARRÓN URUGUAYO

Por

**Gabriela COSTA
Jorge ESTÉVEZ
Ana GOROZURRETA**



TESIS DE GRADO presentado como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
(Orientación Medicina Animal)

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2007**

080 TG
Estudios genéti
Costa, Gabriela

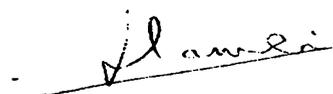


FV/27510

TESIS DE GRADO aprobado por:

Presidente de Mesa:

Alicia Postiglioni
Nombre completo y firma



Segundo Miembro (Tutor):

Silvia Llambí
Nombre completo y firma

Tercer Miembro:

Danilo Fila
Nombre completo y firma

Co Tutor:

Nombre completo y firma

Fecha:

20/12/2007

Autores:

Gabriela Costa
Nombre completo y firma

Autores:



Jorge Estévez
Nombre completo y firma

Autores:

Ana Gorozurreta
Nombre completo y firma

AGRADECIMIENTOS

- A nuestras familias por el apoyo incondicional durante toda la carrera.
- A nuestra tutora Dra. Silvia Llambí por comprometerse con nuestra tesis y apoyarnos durante todo el proceso.
- A las Dras. Rosa Gagliardi y Mónica Martínez, a Miguel de Benthencourt y Rody Artigas por su colaboración en la extracción y el procesado de las muestras, así como también con la corrección del trabajo.
- Al Área de Genética en general por su constante colaboración y por soportarnos dentro de la misma.
- A todos los propietarios de los perros empleados en éste trabajo y en especial a Osvaldo Panzzini, propietario de la perra a estudio.
- A la Sociedad de Criadores de Cimarrones Uruguayos por contactarnos con los propietarios de los perros.
- Al Dr. Víctor de Oliveira, al Dr. Gonzalo Ferreira y Alfredo Silveira por facilitarnos la tarea de recolección de muestras y datos en general.
- A los Drs. Danilo Fila, Inés Pisón y Alejandro Benech por realizar los métodos paraclínicos empleados en la perra a estudio.
- Al Área de Mejora Genética por facilitarnos material para el trabajo.
- Al Área Bioquímica por permitirnos utilizar el espectrofotómetro.
- A nuestros amigos por acompañarnos en esta etapa.
- Al personal de Biblioteca por los servicios brindados.

Esta tesis está dedicada a la memoria de:

La Dra. Claudia Silveira por ser quien nos introdujo en el conocimiento y aprecio de esta raza, por ser la impulsora de estos trabajos para que no se pierda nuestro Cimarrón. Esperando de nuestra parte haber colaborado en algo a esto, sabiendo que nunca lo hubiéramos logrado como ella.

CUADRO DE CONTENIDOS	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	VII
1. <u>RESUMEN</u>	1
2. <u>INTRODUCCIÓN</u>	2
3. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	4
3.1 HISTORIA DE LA RAZA CANINA CIMARRÓN URUGUAYO.....	4
3.2 ESTANDARD RACIAL.....	8
3.3 GENÉTICA MOLECULAR.....	9
3.3.1 <u>Marcadores Moleculares de ADN y variabilidad poblacional</u>	9
3.3.2 <u>RAPDs y su aplicación en el estudio de variabilidad poblacional</u>	10
3.4 CARACTERES DELETÉREOS Y CARACTERÍSTICAS DE BASE GENÉTICA.....	12
3.5 CITOGENÉTICA EN CANINOS.....	13
3.5.1 <u>Cariotipo canino</u>	13
3.5.2 <u>Aberraciones cromosómicas</u>	14
3.5.3 <u>Desarrollo sexual normal en el canino</u>	15
3.5.4 <u>Diagnóstico de las alteraciones del desarrollo sexual</u>	16
3.5.5 <u>Desórdenes del desarrollo sexual cromosómico</u>	17
3.5.6 <u>Desórdenes del desarrollo sexual gonadal</u>	18
3.5.7 <u>Desórdenes del desarrollo sexual fenotípico</u>	18
3.5.7.1 Hembras pseudohermafroditas.....	18
3.5.7.2 Machos pseudohermafroditas.....	19
4. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	20
4.1 GENÉTICA MOLECULAR.....	20

4.1.1 <u>Características de la muestra</u>	20
4.1.2 <u>Extracción de sangre</u>	21
4.1.3 <u>Extracción del ADN</u>	22
4.1.4 <u>Cuantificación de ADN</u>	22
4.1.5 <u>Amplificación de marcadores RAPDs</u>	22
4.1.6 <u>Análisis Estadístico y parámetros poblacionales</u>	23
4.2 CARACTERES DELETÉREOS Y CARACTERÍSTICAS DE BASE GENÉTICA	23
4.3 ESTUDIO DE UN CASO DE INTERSEXUALIDAD	24
4.3.1 <u>Enfoque Molecular</u>	25
4.3.1.1 Extracción de ADN a partir de sangre.....	25
4.3.1.2 Extracción de ADN a partir de pelo.....	25
4.3.1.3 Gen Sry.....	26
4.3.2 <u>Enfoque Citogenético</u>	26
4.3.2.1 Extracción de sangre.....	26
4.3.2.2 Cultivo Linfocitario.....	26
4.3.2.3 Realización de preparaciones citológicas.....	27
4.3.2.4 Visualización y conteo de metafases.....	27
5. <u>RESULTADOS</u>	28
5.1 ESTUDIOS REALIZADOS CON LOS MARCADORES MOLECULARES RAPDs	28
5.2 CARACTERES DELETÉREOS Y CARACTERÍSTICAS DE BASE GENÉTICA	29

5.3 ESTUDIO DE UN CASO DE INTERSEXUALIDAD.....	30
5.3.1 <u>Informe de Examen Ginecológico</u>	30
5.3.2 <u>Enfoque Molecular</u>	31
5.3.3 <u>Enfoque Citogenético</u>	32
6. <u>DISCUSIÓN</u>	33
6.1 MARCADORES MOLECULARES RAPDs.....	33
6.2 CARACTERES DELETÉREOS Y CARACTERÍSTICAS DE BASE GENÉTICA.....	34
6.3 ESTUDIO DE UN CASO DE INTERSEXUALIDAD.....	34
7. <u>CONCLUSIONES</u>	36
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	37

LISTA DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Animales pertenecientes a la región sur (Grupo 1).....	21
Cuadro 2. Animales pertenecientes a la región noreste (Grupo 2).....	21
Cuadro 3. Secuencias y contenido en GC de los primers utilizados en las reacciones de PCR.....	22
Cuadro 4. Características de los marcadores RAPDs utilizados y resumen de los resultados obtenidos al realizar las amplificaciones por PCR.....	28
Cuadro 5. Frecuencia de aparición de caracteres deletéreos en la muestra estudiada de la raza Cimarrón Uruguayo.....	30
Cuadro 6. Frecuencia cromosómica observada.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura I. Taxonomía simplificada de la familia Canidae.....	4
Figura II. Distintas alteraciones que involucran a los cromosomas sexuales en caninos y patologías asociadas.....	15
Figura III. Ficha utilizada durante la encuesta sobre caracteres deletéreos y características de base genética.....	24
Figura IV. Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio, donde se observa amplificaciones para el marcador RAPD 401.....	29
Figura V. Examen particular de reproductor en el animal intersexuado....	31
Figura VI. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se observa amplificación del gen Sry.....	32
Figura VII. Placas metafásicas 78, XY; 77, XO; 78, XY con bandeó GBC..	33

1. RESUMEN

La raza Cimarrón Uruguayo se genera de un núcleo reproductivo con un bajo número de machos, postulándose una alta consanguinidad. Se plantea: a) analizar su variabilidad genética por medio de marcadores moleculares de RAPDs; b) realizar un relevamiento de características deletéreas; c) estudiar un animal intersexuado (nivel citogenético y molecular). Se emplearon once RAPDs en 40 muestras de ADN, perteneciente a dos zonas del país (sur y noreste). El promedio del índice de similitud de bandas (BSF) fue 0,91, indicando homogeneidad en ambas muestras. El polimorfismo de loci fue de 14,90%. La distancia genética de Nei fue de 0,1613 y el valor de identidad genética de 0,8511. Se relevaron características fenotípicas en 100 animales: obteniéndose un 4% de prognatismo, descartándose la presencia de sexta uña y carácter anuro. Se obtuvo un 2,27% de criptorquidismo bilateral. Se procesó un intersexo por cultivo linfocitario obteniéndose 68% de placas con $2n=78$, XY y 32% con $2n=77$, XO. Se extrajo ADN de sangre y folículo piloso para amplificar un fragmento del gen Sry, resultando negativo para la muestra problema de pelo. Se identifica una estrecha relación entre las dos muestras analizadas con bajo polimorfismo no descartándose la existencia de consanguinidad.

SUMMARY

The Uruguayan Cimarron canine breed is generated from a reproductive nucleus with a low number of males, being postulated high consanguinity. It is proposed: a) to analyze their genetic variability using RAPDs molecular markers; b) to carry out a report of deleterious characteristics; c) to study an intersexed animal (at molecular and cytogenetic level). Eleven RAPDs were used in 40 samples of DNA, belonging to two areas of the country (south and northeast). The average band-sharing frequency was 0,91, which indicated homogeneity in the analyzed samples. Loci polymorphism was 14,9%. Nei's genetic distance was 0,1613 and genetic identity was 0,8511. Phenotypic characteristics were analyzed in 100 animals: being obtained 4% of prognathism, being discarded the presence of sixth fingernail and tail absence character. It was obtained 2,27% of bilateral cryptorchidism. An intersexed animal was processed by lymphocyte cultivation, being obtained 68% of metaphases with $2n=78$, XY and 32% with $2n=77$, XO. DNA isolation was made from blood and hair follicle to amplify a region of the Sry gene, being negative for the sample obtained from hair. A strong relationship was identified between the two samples analyzed with a low polymorphism, not being discarded the presence of consanguinity.

2. INTRODUCCIÓN

El Cimarrón Uruguayo es la única raza canina autóctona del País. Su origen es incierto aunque se estima que proceden de perros Mastines y Lebreles introducidos durante la conquista de estas tierras. Muchos de estos perros fueron abandonados por sus propietarios pasando a un estado de asilvestramiento donde por selección natural sobrevivieron los más aptos al medio. Al no tener un depredador natural que controlara de alguna forma el crecimiento de la población, éstos se constituyeron en un problema para los primeros pobladores. Debido a esto en el año 1792 se ordena por ley la matanza de dichos animales. Algunas madres con sus progenies se refugiaron en montes y sierras del noreste uruguayo (Cerro Largo, Treinta y Tres y Rocha) logrando así escapar a la matanza generalizada realizada por el hombre (Assunção, 1997). Descendientes de aquellos cimarrones servirían luego como base genética para la preservación y oficialización de la raza. De este hecho podría desprenderse que durante el proceso de recuperación los criadores incurrieron en practicar cruzamientos consanguíneos debido al bajo número de machos utilizados como reproductores (Silveira y col., 2002). En el año 2000 en un plan integrado para la preservación de la raza se efectuó la caracterización morfológica, funcional y reproductiva, comenzándose con la caracterización molecular mediante la utilización de marcadores moleculares de ADN, con el objetivo de conocer aspectos sobre la variabilidad genética intraracial (Llambí y col., 2004). El avance tecnológico de los últimos años aplicado al estudio del mapeo genético mediante marcadores moleculares de ADN ha permitido profundizar en el conocimiento del genoma canino y su relación con la variedad genética. Los RAPDs (random amplification of polymorphic DNA) son un tipo de marcador molecular altamente polimórfico que se utilizan cuando se desconoce las secuencias de ADN. Estos permiten analizar una muestra poblacional y conocer la variabilidad genética intra e interracial. Aunque todos los animales empleados en este trabajo son descendientes de los perros provenientes del núcleo originario, en las distintas regiones del país se ha seleccionado haciendo hincapié en diferentes características morfológicas. Por ello es de interés no solo realizar el estudio como una única población, sino también comparar las posibles variantes existentes en las dos regiones donde se encuentran en mayor número (noreste y sur).

En cuanto a los estudios genéticos, cuando se está intentando caracterizar una raza, es importante conocer la frecuencia de aparición de genes deletéreos o no deseables. Estos generalmente se manifiestan cuando existe una elevada tasa de endogamia (Barba y col., 2000). Para determinar la ocurrencia de dichos caracteres uno de los métodos empleados es efectuar una encuesta a nivel poblacional. Mediante ésta se obtendrá una "fotografía" del momento actual de esa muestra poblacional, lo cual sirve para tomar las medidas pertinentes para evitar que se continúen manifestándose en su descendencia. Dentro de las características no deseables en el Cimarrón Uruguayo son consideradas faltas graves eliminatorias el prognatismo, enognatismo, pelo largo, blanco fuera de los lugares establecidos, el criptorquidismo uni o bilateral y cualquier atipicidad racial.

Los caninos presentan una fórmula cromosómica de $2n=78$, XY los machos, y 78, XX las hembras. A nivel citogenético diversas patologías del tracto reproductor (intersexos, criptorquídea, hipoplasia testicular) se han relacionado con alteraciones cromosómicas. La intersexualidad correlacionada a las anomalías cromosómicas es rara en los animales domésticos. Los casos mas comunes que involucran las anomalías cromosómicas son (XY, XX/XY, XY/X0, X0, XXY/X0) y se pueden dividir como verdaderos hermafroditas a los que presentan tejido testicular y ovárico a la vez, y en pseudohermafrodita a los individuos que presentan gónadas de un sexo y rasgos fenotípicos del otro (Chaffaux y col., 1980). El pseudohermafrodita puede ser macho o hembra, y en el perro puede ocurrir casi en la misma frecuencia (Chaffaux y col., 1990).

Dado que la raza canina Cimarrón Uruguayo es un recurso genético autóctono, es de interés realizar estudios a nivel genético para determinar cual es su situación actual, y poder de este modo tomar las medidas pertinentes para su conservación.

OBJETIVOS

- 1- Evaluar la variabilidad genética intrarracial utilizando marcadores moleculares RAPDs en dos muestras poblacionales no consanguíneas de criadores localizados en distintas zonas del país.
- 2- Realizar una encuesta a criadores y propietarios de canes de la raza Cimarrón Uruguayo con la finalidad de obtener datos sobre la aparición de caracteres deletéreos y características de base genética.
- 3- Realizar el estudio citogenético-molecular de un caso clínico de intersexo en un ejemplar de la raza Cimarrón Uruguayo.

3. REVISION BIBLIOGRAFICA

3.1 HISTORIA DE LA RAZA CANINA CIMARRÓN URUGUAYO.

El Cimarrón uruguayo es la única raza canina autóctona del País, presente en el mismo desde hace más de trescientos años. Pertenece al género *Canis familiares*, siendo el mas antiguo de los animales domesticados por el hombre, y de los que puede decirse, como del caballo, que ya no existen tipos o razas salvajes y que todos, de un modo u otro, o son domésticos o descendientes de animales en vías de domesticación. (Assunçao, 1997).

Dentro de la gran familia Canidae, existen varios géneros (Figura 1). El género *Canis* engloba a los lobos (*Canis lupus*), coyotes (*Canis latrans*), chacales (*Canis aureus*) y perros (*Canis familiaris*).

Español	Inglés	Científico
Perro Doméstico	Domestic Dog	<i>Canis familiaris</i>
Lobo Común	Wolf	<i>Canis lupus</i>
Lobo Rojo	Red Wolf	<i>Canis rufus</i>
Coyote	Coyote	<i>Canis latrans</i>
Chacal Común	Golden Jackal	<i>Canis aureus</i>
Chacal de Dorso Franjeado	Side-striped Jackal	<i>Canis adustus</i>
Chacal de Lomo Negro	Black-backed Jackal	<i>Canis mesomelas</i>
Chacal Simien	Simien Jackal	<i>Canis simensis</i>
Licaón	African Hunting Dog	<i>Lycaon pictus</i>
Zorro Polar	Arctic Fox	<i>Alopex lagopus</i>
Zorro Holoártico	Red Fox	<i>Vulpes vulpes</i>
Zorro Corsac	Corsac Fox	<i>Vulpes corsac</i>
Zorro de Bengala	Bengal Fox	<i>Vulpes bengalensis</i>
Zorro Tibetano	Tibetan Sand Fox	<i>Vulpes ferrilata</i>
Zorro Cana	Blanford's Fox	<i>Vulpes cana</i>
Zorro del Desierto	Sand Fox	<i>Vulpes rueppellii</i>
Zorro Pálido	Pale Fox	<i>Vulpes pallida</i>
Zorro de El Cabo	Cape Fox	<i>Vulpes chama</i>
Zorro Veloz	Kit Fox	<i>Vulpes velox</i>
Fenec	Fennec	<i>Vulpes zerda</i>
Tanuki	Raccoon Dog	<i>Nyctereutes procyonoide</i>

Figura I. Taxonomía simplificada de la familia Canidae.

Se han encontrado registros que desde incluso antes de la edad de bronce el perro ya acompañaba al Hombre en Europa. Desde épocas inmemoriales se ha seleccionado, para conformar animales de determinado tamaño, forma, pelaje e incluso carácter. Esta selección dirigida, ha determinado la formación de la mayoría de las razas existentes. El Cimarrón por el contrario es el resultado de una selección natural de más de tres siglos, sobreviviendo únicamente los más aptos al medio donde se desarrollaron.

En lo referente al continente Americano, no caben dudas de que los perros domésticos ya se encontraban desde antes de la conquista. Son innumerables los documentos que hacen referencia a esto. Además de los

vocablos indígenas que hacen referencia onomatopéyicamente al ladrido, como lo es la denominación de “yagua”, para referirse a ellos por parte de los guaraníes, o “chtergua” para los araucanos (Gallardo, 1963).

Junto con los conquistadores también llegaron a América perros de guerra, de los cuales se cree descenderían los cimarrones, debido a que no existe conocimiento fehaciente de la existencia de perros prehispanicos en el Río de la Plata. Las razas introducidas fueron el Lebrél (Galgo Español) y el Mastín Español, descendiente del Dogo (Molosus) y del Alano (Genealogía de Buffón). El Mastín Español era un perro braquimorfo, de cráneo grande y ancho, hocico mediano, pecho ancho y costillar bien amplio, grupa ligeramente más alta que la cruz o igual, orejas grandes semi-caídas. El tamaño de mediano a grande, entre 60 y 80 cms. El pelaje con predominio de los bayos con extremos distales negros, a veces atigrados, negros, y manchados de blanco y negro, o castaño. Con respecto al Lebrél, se puede decir que presentaba características diferentes a los que encontramos en la actualidad. Este estaba emparentado cercanamente con el Mastín y era un perro de talla media, siendo menos aerodinámico que el galgo actual. El Galgo Español de aquella época es descrito como un perro dolicomorfo, de cráneo mediano y de hocico fino y largo, orejas levantadas o semi-dobladas, patas fuertes y enjutas, lomo casi horizontal, cola mediana más bien fina que gruesa, muy ágiles en la carrera y vivaces en el ataque de presa. Su pelo era corto, siendo sus colores variados, dándose con cierta preferencia los bayos y rojizos atigrados, por otro lado agrisados o negros. El porque la raza lleva el nombre Cimarrón, proviene desde la época de la conquista, donde este vocablo fue empleado en América para calificar a todo lo que habiendo sido domestico o civilizado se volvía al estado libre o salvaje, empleándose para denominar a caballos, ganado, perros, hierbas, e incluso al hombre, siendo uno de los americanismos mas antiguos (Assunção, 1997). La retroversión al tipo salvaje primitivo nunca fue completa, todos ellos conservaron caracteres que revelan claramente su procedencia de progenitores adaptados a la domesticación. Otra prueba de la ya existencia y aplicación del vocablo cimarrón es la que consta en la primera edición del Diccionario de la Real Academia de la Lengua, (1729-1736) “Cimarrón, Na-Adj.-Sylvestre, indómito, montaraz...”. También fue definido por nuestro primer diccionarista Daniel Granada, “Cimarrón, Na-Adj.-Animal montaraz o planta silvestre, en contraposición al domestico o manso y a la que se cultiva en las huertas. Así se dice perro cimarrón, vaca cimarrona, apio cimarrón...”. Magariño Cervantes en “Palmas y Ombues” cita “ En el Plata aplicase el adjetivo cimarrón con característico significado al perro salvaje, oriundo de los que trajeron los españoles y que se propagaron de un modo asombroso, especialmente en la rivera oriental (nuestro país), ahuyentando y destruyendo los ganados, aterrorizando a las poblaciones diseminadas en nuestras vastas soledades, y hasta haciendo imposible el transito por la serranías donde tenían sus madrigueras; tal era su numero y ferocidad”.

Dadas las condiciones de abundancia en el continente desde fines del siglo XVI, la reproducción prácticamente sin control del ganado y el modo de aprovecharlo que tenían sus habitantes, donde realizaban grandes matanzas de ganado vacuno del que solo se aprovechaba el cuero y el sebo, aseguró

el alimento de los cimarrones favoreciendo la proliferación de grandes jaurías. El número de perros fue tal que llegaron a ser considerados plaga, siendo temidos por los pobladores debido a los ataques que realizaban al rodeo y a los transeúntes. Debido a esto el Virrey de la Banda Oriental, Nicolás de Arredondo, alentó a los pobladores a realizar "batidas" con el fin de eliminarlos. Es sabido que en el año 1795 el Alcalde de Villa Soriano, Juan Bautista Núñez organiza corridas a los perros de su jurisdicción, en la cual todos los vecinos y hacendados estaban obligados a participar. Así mismo el comisionado de Villa de Melo (Cerro Largo) José Gutiérrez del Hoyo, comunica en 1807 el éxito de las operaciones realizadas en contra de los perros cimarrones (Silva Valdés, 1957). En una gran batida comandada por José Gervasio Artigas, que se extendió desde la barra del Cebollatí hasta la sierra de Aceguá, se dice (algunos creen en forma exagerada) que se eliminaron unos 300.000 perros; también se sabe que gran cantidad de madres con sus proles se refugiaron en los montes del Olimar, sierras del Otazo y Cerro Largo. En este mismo periodo el naturalista y estadista Félix de Azara, quien junto a Artigas recorrió estas regiones, hace referencia a los perros cimarrones y a su origen; "proceden de los domésticos que han adquirido la libertad y faltándoles que comer, o por riñas entre ellos se van a los campos; son los cimarrones corpulentos y en mi dictamen de la raza que Buffón llama "Gran Danois", que creo llamamos "Lebrel" pero a mi ver tienen el pelo más áspero, el hocico algo más largo y agudo, las orejas gruesas y el cuello más abultado que los domésticos de la propia casta. Por lo que hacen á colores, los más son roxisos, bayos, barcinos y negros, aunque también los hay manchados de todos colores (Assunção, 1997). Queda claro que aún mucho antes de ser reconocido en nuestro tiempo como la raza del Uruguay, el perro Cimarrón era apreciado como tal, y ya en esos tiempos comenzaba a mostrar características que hasta hoy mantiene. Ejemplo de este reconocimiento es la forma en que nuestro prócer se refiere a estos animales, al responderle a la propuesta que le realizaran los invasores portugueses, de rendirse pacíficamente: "Que quando le faltasen hombres había de criar perros cimarrones para acabar con los porteños"; frase que popularmente se ha repetido algo modificada pero con igual sentido (Cuando me quede sin soldados, pelearé con perros cimarrones).

Hasta aquí los hechos marcaron lo que fue la primera separación del hombre, por un lado debido a la abundancia de ganado en la campaña y por otro a la falta de un hogar fijo de sus dueños, obligándolos a buscar su propio sustento. Una segunda separación perro-Hombre ocurriría más tarde, debido a las guerras civiles. Dadas las condiciones de miseria en que quedarían la campaña y sus pobladores, se volvería a ver nuevamente ganado en estado salvaje y jaurías de cimarrones. La aparición de la rabia, introducida por los invasores ingleses, contribuye a la leyenda de horror que tuvo como protagonista al perro Cimarrón. El Padre Dámaso Antonio Larrañaga en su diario del viaje de Montevideo a Paysandú, hace referencia a lo antes mencionado; "Vive por todas partes en esos campos donde es la plaga mayor de aquella provincia; destruye más de la décima parte de los ganados que forman la mayor riqueza de aquellos habitantes" (Assunção, 1997). Al igual que en épocas pasadas los visitantes de nuestra región hacen referencia al aspecto morfológico y fanaeróptico que presentaba el Cimarrón.

El naturalista francés Alcides D'Orbigny en el año 1827 comenta; "pertenecen a una raza particular caracterizada por su aspecto que recuerda un poco a la de los mastines. El color es variable, de tinte por lo común uniforme, rosáceo (colorado o castaño) o amarillo (bayo), son a menudo rayados, del lomo a los flancos, en cuyo caso los nativos los llaman barcinos" (D'Orbigni, 1945).

La última persecución del Cimarrón comenzaría luego de culminada la Guerra Grande. En el año 1852 en el Rincón del Tacuarí en una sola batida se aniquiló 3.000 perros. Este tipo de incursiones se harían comunes por aquellos tiempos, remitiéndose las mandíbulas para dar constancia de tales matanzas. Con la ayuda de los venenos primero y con el alambrado de los campos, la refinación de los ganados, con el fin de las guerras civiles, junto a la desaparición de la vieja gauchería, se produce también la muerte y transfiguración del perro Cimarrón, siendo la inmensa mayoría exterminados, solo en muy pocos lugares agrestes y tradicionales del país, sobreviven algunos ejemplares (Assunção, 1997). Algunas madres cimarronas junto con su progenie se refugiaron en montes y sierras del noreste uruguayo (Cerro Largo, Rocha, Treinta y Tres) logrando así escapar a la matanza. Estos perros luego del periodo de asilvestramiento, toman contacto con el Hombre cuando éste se asienta en la campaña. Hacendados de la época se dedicaron a cuidar y conservar algunos ejemplares, impidiendo cruzamientos con otras razas en un intento de mantener y preservar sus características originales. Eran utilizados para vigilancia y trabajos de campo. Posteriormente en el siglo XX con el fin de conservar los cimarrones que aun existían, se presenta por primera vez en 1960 en una exposición del Kennel club Uruguayo, un perro Cimarrón de 15 años y un cachorro. Uno de los nichos donde se hallaban perros cimarrones, conservando aun su tipicidad racial, se encontraba en la zona del arroyo Zapallar en los establecimientos "Zapallar" y "Sarandí" de Lisandro Rodríguez, y del "Zurdo" Ramos a orillas del arroyo del Oro en Treinta y Tres (Bouton, 1961). Otros nichos donde sobreviviera esta raza natural del país y que durante cientos de años pobló la campaña Oriental, fueron los establecimientos rurales de Ubilla en la cuarta sección de Treinta y Tres, y el capataz Moreira en Cebollatí sexta sección de Rocha, entre otros. Con el fin de rescatar, y formalizar lo que venían haciendo individualmente criadores del noreste, es que se crea en Montevideo La Sociedad de Criadores de Cimarrones Uruguayos el 12 de Octubre de 1988. Tal sociedad se impone buscar en todo el territorio nacional, especialmente en Cerro Largo, Treinta y Tres y Rocha, ejemplares, que si bien podían ser mestizos, servirían como base genética para la preservación posterior de la raza. Esta tarea se iniciaría con la elección de 17 ejemplares, los cuales reunían las características morfológicas que representaban a los animales originalmente. En el año 1989 se funda la Sociedad de Criadores de Cimarrones de Cerro Largo, donde se encontraban los criadores más antiguos. Los primeros perros registrados fueron: Cimarrona, Nerón, Boca, Overon, Fefo, Sansón, Tana, e Isabel. Posteriormente se continuaron recabando datos mediante la medición de ejemplares, y observación de características fanerópticas para realizar una tipificación más exacta del Cimarrón, con lo cual se terminó de conformar el estándar de la raza. En la actualidad el Cimarrón Uruguayo se

encuentra reconocida, no solo a nivel nacional (1989, K.C.U) como la única raza canina nativa, sino que también obtuvo el reconocimiento primario (período de prueba de cinco años) por la F.C.I. (Federación Cinológica Internacional) el 21 de febrero de 2006. Esta federación es considerada máxima autoridad a nivel mundial, estableciendo para el reconocimiento internacional de una raza, que la misma debe contar con al menos 900 ejemplares inscriptos y como mínimo 8 líneas abiertas para evitar la consanguinidad en los cruzamientos. La raza es criada en todo el país y son más de 5000 los Cimarrones registrados en el K.C.U (Mascotas Show Magazines, 2006).

3.2 ESTANDAR RACIAL.

El Cimarrón Uruguayo es un animal de talla media, fuerte, compacto, musculoso y ágil; algo más largo que alto. De temperamento sagaz, tranquilo y de gran coraje cuando decide el ataque, ladra únicamente cuando hay motivos. La cabeza es de forma troncopiramidal, siendo el cráneo más ancho que largo. El stop es moderado y el hocico moderadamente ancho, no más largo que el cráneo. Se prefieren los ojos oscuros a los claros, las orejas son de tamaño mediano, realizándose al criterio del criador el corte de las mismas en forma de oreja de puma. Se busca que la mordida sea en tijera no descalificándose aquellos animales que muerden en pinza. El tronco es compacto, profundo, de lomo recto o algo ensillado. Grupa de buen largo y ancho, con una inclinación de 30 grados. La cola presenta una inserción media, gruesa en su nacimiento, su largo debe llegar al garrón y presentar forma de sable. Presentan marcado dimorfismo sexual con una altura a la cruz que alcanza los 56 a 61 cm. en machos, mientras que en las hembras debe oscilar entre los 53 y 58 cm. Se admite una tolerancia de ± 2 cm. El peso en adultos es de 34 a 45 Kg. en machos y de 27 a 36 Kg. en las hembras. En cuanto al color predominan los atigrados en todas sus variedades sobre los bayos (leoninos y colorados), permitiéndose el blanco únicamente a nivel del pecho y parte distal de los miembros. El pelo es corto y liso y en cuanto al color de la capa son aceptados todos con excepción de los negros y blancos sólidos, habiendo una marcada preferencia entre los criadores por las capas atigradas frente a las bayas (Silveira y col., 1998a, b; Silveira y col., 2002). La pigmentación de la trufa es negra. Con respecto al iris predominan los de tono oscuro y en la mayoría de los animales se observó la presencia de subpelo (Silveira y col., 2002). Respecto a su funcionalidad, el Cimarrón es un perro muy versátil, apto en el medio rural para el trabajo con el ganado bovino como también para su uso en la caza mayor, la vigilancia y defensa, y compañía (Fernández, 2002). Se consideran faltas graves eliminatorias, el prognatismo, enognatismo, criptorquidismo, pelo largo, blanco fuera de los lugares establecidos y falta de tipicidad (<http://www.kcu.com.uy>).

3.3 GENETICA MOLECULAR

3.3.1 Marcadores Moleculares de ADN y variabilidad poblacional

Los marcadores moleculares son biomoléculas que están relacionadas con un rasgo genético. Las biomoléculas que pueden ser utilizadas como marcadores moleculares son, las proteínas ya sean antígenos o isoenzimas y el ADN mediante genes conocidos, secuencias conocidas, o fracción de secuencias y función desconocidas. Un marcador molecular puede ser monomórfico cuando es invariable en todos los organismos estudiados, y polimórfico cuando presenta diferencias en el peso molecular, estructura, secuencia o sitios de restricción o actividad enzimática. Para la realización de este trabajo se emplearon los marcadores moleculares polimórficos basados en la secuencia de ADN, y dentro de estos los RAPDs. Un marcador de ADN es simplemente un punto de referencia en un cromosoma, que puede o no corresponder a un gen, indicando variaciones individuales en la secuencia de ADN intra o interpoblacionales. Estas variaciones pueden ser en un único nucleótido, o en una secuencia larga de ADN (Picca y col., 2004). Dentro de los marcadores moleculares basados en el ADN tenemos por un lado a los RFLP (polimorfismo en el tamaño de los fragmentos de restricción) que se basan en la detección de fragmentos de ADN de distinto peso molecular mediante la digestión con la misma enzima de restricción, en diferentes organismos. Otros marcadores utilizados son los AFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados), así como los minisatélites o VNTR (variabilidad en el número de repeticiones en tandem) los cuales están basados en repeticiones de secuencias del genoma que contienen de nueve a 100 pares de bases, siendo el número de repeticiones variables y en eso se basa su polimorfismo. Los microsatélites o SSR (secuencias simples repetidas) son regiones genómicas hipervariables, propensas a sufrir mutaciones, constituidas por repeticiones en tandem de unos pocos pares de bases (dos, tres, cuatro nucleótidos simples) flanqueadas por secuencia de copia única (Picca y col., 2004). El polimorfismo en estos marcadores está dado por la variabilidad del número de repeticiones en tandem de los individuos de la población a estudio, y el tamaño del microsatélite. Los RAPD (fragmentos polimórficos de ADN amplificados aleatoriamente) son los marcadores moleculares empleados en la realización de este trabajo, por lo que serán tratados en particular mas adelante.

Para el estudio de la genética poblacional son empleados los marcadores moleculares, aportándonos información para caracterizar y estudiar la variabilidad genética. Existen parámetros estadísticos que nos sirven para cuantificar la variabilidad genética y de esta manera poder resumir de modo sencillo la información que nos aportan dichos marcadores. Dentro de los parámetros estadísticos existentes, de relevancia para este trabajo tenemos: a) El Contenido de información polimórfica (PIC), evalúa la información que nos brinda un marcador en la población de acuerdo a las frecuencias alélicas, y oscila entre 0 y 1 b) Distancia genética, mide el grado de diferenciación existente entre poblaciones de una misma especie, o entre especies, logrando cuantificar esa diferencia mediante distintos índices de distancia. La distancia genética de Nei's (Nei, 1972), expresa la probabilidad

de que al escoger un alelo al azar de la población A y un alelo al azar de la población denominada B, ambos alelos sean iguales. c) H, índice promedio de diversidad Nei's (probabilidad de que un locus con dos alelos, elegidos al azar dentro de una población, son diferentes uno de otro). d) BSF (Índice de bandas compartidas, o similitud de patrón de bandas (Band Sharing frequency, BSF), f) P=% de polimorfismo se estima como: $P = \frac{\text{N}^\circ \text{ de loci polimórficos}}{\text{n}^\circ \text{ total de loci}} \times 100$, considerando que un locus es polimórfico sólo si la frecuencia del alelo más común es inferior a un valor arbitrario, que típicamente es 0.99 o 0.95 (dependiendo del tamaño de las muestras) (Hoelzel, 1992).

3.3.2 RAPDs y su aplicación en el estudio de variabilidad poblacional.

Los marcadores moleculares RAPDs utilizan iniciadores ("primers") arbitrarios amplificando regiones al azar del genoma mediante la técnica de la PCR (Polymerase Chain Reaction) (Williams y col., 1986).

El método no requiere de un conocimiento previo del genoma de los organismos. Los iniciadores preferiblemente deben pertenecer a grupos estándar para facilitar la comparación de resultados entre laboratorios (Xena de Enrech, 2000).

La aplicación de este método es útil en mapas genéticos, genética de poblaciones y epidemiología. Otra importante particularidad que señalan estos autores respecto a la mayoría de los marcadores RAPD es su carácter dominante: no es posible distinguir cuando un segmento de ADN ha sido amplificado a partir de un locus heterocigoto (1 copia) u homocigoto (2 copias). En los raros casos en que los marcadores RAPD son codominantes se observan como segmentos de diferentes tallas amplificados a partir de un mismo locus. Por esta razón, para utilizar los marcadores RAPD para elaborar mapas genéticos deben usarse líneas puras homocigóticas como parentales. El método RAPD fue adoptado de inmediato por su simplicidad y bajo costo, no requerir de marcadores radioactivos y utilizar cantidades mínimas de ADN. Las bandas generadas se pueden clasificar de acuerdo a su intensidad de tinción (fuerte, mediana, débil) frente al bromuro de etidio, lo cual puede ser un reflejo de la especificidad de la amplificación. Debido a su "herencia dominante", los marcadores RAPD se expresan como presencia o ausencia de un producto amplificado, lo cual se traduce en una pérdida de información si se les compara con marcadores heredados como "codominantes", como es el caso de las isoenzimas. Sin embargo, los RAPDs proveen una enorme fuente de datos y por lo tanto pueden ser más informativos acerca de la estructura de las poblaciones y su diversidad genética que las isoenzimas.

Los RAPDs, son altamente polimórficos. Se utilizan cuando se desconoce las secuencias de ADN y los loci amplificados se consideran anónimos. La utilización de éstos nos permite profundizar en la caracterización genética de razas con fines de conservación y cría animal (Olivier y col., 1999; Soto y col., 2002). Los RAPDs permiten analizar una muestra poblacional y conocer variabilidad genética intra e interpoblacional. El principio de esta metodología

se basa en la amplificación de ADN genómico mediante PCR utilizando oligonucleótidos (cebadores) de pequeño tamaño (10 bases) diseñados con una secuencia aleatoria. La reacción de PCR se realiza en condiciones poco restrictivas con una etapa de hibridación a baja temperatura por lo cual todas aquellas regiones donde se produzca la unión de estos (en lugares suficientemente próximos y situados en las cadenas opuestas de ADN), resultan amplificadas (loci). Como resultado de las amplificaciones se obtiene un patrón de bandas o fragmentos de distinto peso molecular (pares de base, pb) característicos del cebador y del ADN blanco. Las diferencias en el patrón de bandas (polimorfismo) se produce por diferencias entre individuos debido a mutaciones en las secuencias de unión de los cebadores (Rincón y col., 2000). La amplificación de una mezcla de muestras de ADN (pool de ADN) ha sido utilizada en diversas especies para evaluar de forma rápida la capacidad de un gran número de iniciadores y detectar polimorfismo específico de razas o poblaciones (Rincón y col., 2000; Gwakisa y col., 1994).

El uso de los RAPDs es menos costoso, laborioso y nos permite analizar un mayor número de muestras en comparación con la utilización de otro tipo de marcadores moleculares tales como los microsatélites.

Rothuizen y van Wolferen, 1993 realizan el primer reporte de la aplicación de esta técnica en análisis de variabilidad genética en perros. A partir de allí estos marcadores han sido utilizados en diversos estudios como análisis filogenéticos de la familia Canidae y búsqueda de polimorfismos en el genoma canino (Stepniak y col., 2002).

Existen antecedentes de la utilización de RAPDs para analizar variabilidad y distancia genética en razas caninas autóctonas españolas como galgo Español, Podenco, Perro de Agua Español y Alanos (Morera y col., 2001; Morera y col., 1999). Existen distintas series de RAPDs como la 5UBC que ha sido utilizada para estudios de variabilidad racial en bovinos Criollos, Hereford y Holando (Rincón y col., 2000).

En la raza Cimarrón Uruguayo en el año 2000 se comenzó con la caracterización molecular mediante la utilización de la serie 5UBC de RAPDs con el objetivo de conocer aspectos sobre la variabilidad genética intra racial (Llambí y col., 2004).

3.4 CARACTERES DELETÉREOS Y CARACTERÍSTICAS DE BASE GENÉTICA.

En cuanto a los estudios genéticos cuando se esta caracterizando una raza es importante conocer la frecuencia de aparición de caracteres deletéreos no deseables. Estos generalmente se manifiestan cuando existe una elevada tasa de endogamia (Barba y col., 2000). De hecho podría pensarse que durante el proceso de recuperación de esta raza los criadores recurrieron a cruzamientos consanguíneos (Silveira y col., 2002).

Internacionalmente la cría canina esta ocupada por un importante número de razas cosmopolitas, todas ellas protegidas y reconocidas internacionalmente, pero en todos los países existen poblaciones nativas que en muchos casos corren peligro de extinción por la presión que reciben de esas otras razas foráneas mejor implantadas (Delgado y col., 1996). Lo anteriormente mencionado y el hecho de ser el Cimarrón considerado plaga en el siglo XIX determinaron que muy pocos ejemplares sobrevivieran, por lo que el tamaño efectivo de la población inicial al momento de su recuperación fue reducido. Una de las preocupaciones de La Sociedad de Criadores es el no conocer la consanguinidad media de la población, sumándosele a esto el riesgo de aumentar los apareamientos endogámicos debido al restringido número de machos utilizados como reproductores en el proceso de recuperación racial (Silveira y col., 2002). Los cruzamientos endogámicos aumentan la probabilidad de ocurrencia de genes deletéreos, si es que éstos hubieran estado presentes en la población original.

La mayoría de los desórdenes heredables en caninos descubiertos hasta el momentos son rasgos autosomales recesivos, ocurriendo por mutaciones en un solo gen (Patterson y col., 1989). En los desordenes autosomales recesivos, la mutación en un solo alelo no es suficiente para causar la enfermedad fenotípica cuando el otro alelo es normal. La enfermedad se expresa cuando ambos alelos tienen la misma mutación, o sea que son homocigotos recesivos (rr), por consiguiente recibieron un alelo (r) de la madre y otro igual del padre, siendo ambos progenitores portadores de la característica (Meyers-Walen, 2003). El riesgo de heredar esos alelos es el mismo en machos y hembras ya que el gen se localiza en un autosoma y no en uno de los cromosomas sexuales. Cuando uno solo de los padres es portador la característica no se expresará, pero parte de su descendencia serán portadores. En ausencia de una prueba de ADN para detectar un rasgo indeseable el criador no sabrá que el animal es portador hasta que la característica se exprese en su descendencia. Muchos desordenes son prevalentes solo dentro de una determinada casta. Si un porcentaje alto de individuos son portadores sería desaconsejado eliminar a todos, ya que resultaría en la pérdida de diversidad genética. Los portadores son animales clínicamente normales, así el estado de portador puede pasar inadvertido y seguir transfiriendo la característica (Meyers-Walen, 2003). Se han catalogado

recientemente 360 enfermedades heredables (Ostrander y col., 2000; Patterson, 2000), y alrededor de 130 de estas presentan herencia Mendeliana simple (Sargan, 2004). Las enfermedades genéticas en el perro son de las causas de morbilidad más comúnmente observadas en la clínica veterinaria, pero no representan ni el 50% de las causas de mortalidad (Sargan, 2004). Dentro de características con base hereditaria tenemos alteraciones de maxilares (prognatismo, enognatismo), paladar hendido, presencia de sexta uña (polidactilia o presencia de uno o más dedos extras de carácter ancestral), carácter anuro (ausencia de cola). Otra característica con base hereditaria es la criptorquidia. Esta es una anomalía de carácter congénito que consiste en la falta de descenso de uno (criptorquidia unilateral) o ambos testículos (criptorquidia bilateral) hacia el escroto (Ortiz, 2003). El o los testículos están permanentemente fuera del escroto pero localizado/s en un punto normal de su trayecto de descenso, a diferencia de lo que ocurre con el testículo ectópico. Siendo una posible localización de el o los testículos no descendidos la cavidad abdominal, o el canal inguinal (Jainudeen y Hafez, 1993). Las posibles causas de criptorquidismo se pueden clasificar en anatómicas, hormonales y genéticas. Dentro de las causas de origen anatómico podrían mencionarse, la hernia inguinal, anomalías de epidídimo, y persistencia del canal peritoneovaginal, entre otras. A nivel hormonal se ha planteado la posibilidad de que anomalías en la secreción del factor MIF (factor inhibidor de Müller) podría ser la causa de la criptorquidia en la raza Schnauzers miniatura (Goldschmidt y col., 2001). Como causa genética en perros se ha observado la presencia de un mosaico 78XY/79XXY en un ejemplar criptórquido bilateral (Goldschmidt y col., 2001). En el perro esta patología presenta un patrón de herencia autosómica recesiva (Memon y Tibary, 2001). Criptórquidos unilaterales perpetúan este rasgo si se aparean, por eso es aconsejable no utilizarlos como reproductores (Nelson y Couto, 2005), obviamente los animales que presentan criptorquidia bilateral son estériles. El testículo no descendido permanece en la cavidad abdominal, en donde la temperatura es más elevada, causando degeneración testicular (Jainudeen y Hafez, 1993). No se afecta la producción de testosterona, por lo que los machos criptórquidos presentan un comportamiento sexual normal (Memon y Tibary, 2001). La neoplasia testicular es 13 veces más probable en el testículo sin descender, siendo los tumores de las células de Sertoli los de mayor incidencia (Nelson y Couto, 2005).

3.5 CITOGENÉTICA EN CANINOS.

3.5.1 Cariotipo canino.

El cariotipo representa el juego completo de todos los cromosomas que se encuentran en una célula, de manera tal que se encuentren ordenados de forma decreciente y respetando su morfología; ubicándose en primer lugar los cromosomas metacéntricos, luego los de morfología intermedia como pueden ser los submetacéntricos y por último los acrocéntricos. El cariotipo es una característica particular de cada especie pudiendo ser los cariotipos de especies cercanamente emparentadas, muy similares (Hare y Singh, 1979).

Los caninos presentan una fórmula cromosómica de $2n = 78, XX$ las hembras y $2n = 78, XY$ los machos, constituida por 38 pares de autosomas de morfología acrocéntrica y un par sexual con morfología submetacéntrica siendo el X de gran tamaño con respecto del resto de los pares autosómicos. El cromosoma sexual Y es también de morfología metacéntrica pero de pequeño tamaño (citológicamente se observa como un cromosoma de aspecto puntiforme) (Halnan, 1989).

3.5.2 Aberraciones cromosómicas.

En los animales domésticos existen diversas patologías asociadas a alteraciones a nivel cromosómico, conocidas como aberraciones cromosómicas. Dichas aberraciones se pueden dividir en estructurales y numéricas, produciéndose como consecuencia de errores en la mitosis, meiosis o durante la fecundación. (a) Las aberraciones numéricas son aquellas donde la dotación cromosómica difiere de la normal para una especie determinada, definiéndose así la heteroploidía. A su vez la heteroploidía se puede clasificar en euploidías cuando la célula presenta una dotación cromosómica que puede triplicar o cuatriplicar etc. (triploide, tetraploide) la cifra haploide normal, y en aneuploidias cuando la célula presenta uno o más cromosomas de más o de menos, denominándose a la ausencia de un cromosoma monosomía y a la ausencia de un par de cromosomas completos nulisomía. Por el contrario la presencia de uno, dos, tres, etc. cromosomas adicionales para un determinado par de homólogos se denomina trisomía, tetrasomía, etc (Hare y Singh, 1979). (b) Las aberraciones cromosómicas estructurales se pueden clasificar en dos grupos, dependiendo de en qué etapa del ciclo se originen, siendo de tipo cromosoma y cromátida. Las primeras se producen en la fase G1 del ciclo, antes de la replicación del ADN, y las de tipo cromátida se originan en la fase G2 después de la duplicación. Existen un gran número de aberraciones estructurales dentro de las cuales se encuentran las deleciones, cromosomas en anillo o anulares, inversiones, cromosomas dicéntricos, translocaciones recíprocas, entre otras (Halnan, 1989). En caninos se han detectado translocaciones por fusión céntrica (translocaciones Robertsonianas) tanto en perros anatómicamente normales, como en aquellos que presentaban alguna alteración. Aunque no es sabido exactamente cual es la implicancia de las aberraciones cromosómicas en la fertilidad del perro, si es probable de que con las mismas se podrían generar gametos y por ende embriones desequilibrados, que tengan un efecto negativo sobre la fertilidad del individuo portador (Hare y Singh, 1979). En cuanto a las aberraciones numéricas en los caninos se encuentran las aneuploidias, como la monosomía del cromosoma X, las trisomías XXY o XXX, y quimerismos de los cromosomas sexuales (Switonski y col., 2004). Muchos casos de intersexos, han sido asociados a diferentes anomalías cromosómicas en las especies domésticas (Hare y Singh, 1979).

A nivel citogenético diversas patologías del tracto reproductor (intersexos, criptorquidea, hipoplasia testicular, hipoplasia ovárica y disgenesia gonadal) se han relacionado con alteraciones cromosómicas tales

como aneuploidias de los cromosomas sexuales (Figura II) (Switonski y col., 2004, Halnan, 1989).

RAZA	NÚMERO CROMOSÓMICO	PATOLOGÍA REPRODUCTIVA
Doberman Pinscher	77,X0	Ovarios pequeños e infantiles.
Miniature American Eskimo	77,X0	Ovarios pequeños y fibrosos, sin folículos ni desarrollo de cuerpo lúteo.
Toy Poodle	78,XX/77,X0	Ciclos anormales, folículos persistentes.
Munsterlander	78,XX/77,X0	Infertilidad.
Cruza	78,XX/78,XY	Masculinización incompleta de genitales externos (animal intersexuado).
Cruza	78,XY/78,XXY	Criptorquidia bilateral.
Cocker Americano, Pug Carlinos, Beagles	78,XX/78,XY	Hermafroditismo verdadero (intersexo).

Figura II. Distintas alteraciones que involucran a los cromosomas sexuales en caninos y patologías asociadas.

3.5.3 Desarrollo sexual normal en el canino.

En los mamíferos, la determinación del sexo esta basada en la presencia de dos cromosomas idénticos para conformar una hembra (XX) o dos distintos para el macho (XY). Se cree que esto es el resultado de un largo proceso evolutivo, surgiendo de un par autosomal hereditario común. En algunos mamíferos como los marsupiales los cromosomas X e Y presentan niveles de homología diferentes al resto, lo que apoya la teoría de una gradual diferenciación estructural, que comenzaría en torno del gen Sry (Manolakov y col., 2006). El normal desarrollo sexual de los mamíferos se cumple mediante tres pasos correlativos, los cuales dependen de la correcta culminación del paso previo. El primer paso a cumplir es el establecimiento del sexo cromosómico, luego el desarrollo del sexo gonadal y por último el desarrollo del sexo fenotípico. Durante la fertilización se establece el sexo

cromosómico y genético, siendo los cigotos tempranos XX y XY indiferenciados sexualmente hasta el inicio de la determinación del sexo gonadal. Durante el estado indiferenciado los embriones tienen dos gónadas indiferenciadas los conductos de Wolff (mesonéfricos), y los conductos de Müller (paramesonéfricos), la cresta urogenital y el tubérculo genital (Griffin y Wilson, 1980; Meyers-Walen y Patterson, 1989a; Hare, 1976). La morfología de los genitales externos en la etapa indiferenciada se asemeja más al fenotipo femenino que al masculino. Los órganos reproductores internos, incluyendo las gónadas y las estructuras excretoras se originan del mesodermo intermedio (Noden y De Lahunta, 1990). La determinación del sexo gonadal induce a que la gónada indiferenciada sea ovario o testículo. La gónada indiferenciada está programada para convertirse en ovario, pero puede ser desviada de este camino por la exposición temprana a señales de inducción testicular que están bajo control genético (Concannon y col., 2001). En los mamíferos dos genes son importantes en la determinación testicular, el Sry (región determinante del sexo en el cromosoma Y) y el Sox9 (Koopman, 1999). El gen Sry es quien codifica el factor determinante testicular en los mamíferos, y es el único gen ligado al cromosoma Y que es necesario y suficiente para iniciar el desarrollo testicular. Dax-1 es un gen ligado al X. Cuando hay una duplicación en esta región del cromosoma X humano, el testículo no se desarrolla en individuos XY a pesar de la presencia de un gen Sry normal (Goodfellow y Camerino, 1999). El desarrollo del sexo fenotípico es el último paso en el desarrollo sexual prenatal, aquí también la vía femenina es el camino a seguir si el fenotipo indiferenciado por defecto no tiene señales masculinizantes. La diferenciación de los órganos sexuales internos, accesorios, y genitales externos ocurre en respuesta a la presencia o ausencia de dos hormonas testiculares, la testosterona y la Sustancia Inhibidora Mülleriana (MIS) u hormona Anti-Mülleriana (AMh). Los conductos Müllerianos se atrofian en respuesta a MIS. La testosterona es directamente responsable de la masculinización de los conductos de Wolf. La secreción de MIS por las células de Sertoli marca el principio del testículo embrionario funcional (Concannon y col., 2002). El gen Sry es quien comienza la cascada que determina la diferenciación hacia lo masculino del embrión indiferenciado bipotencial. Es el gen determinante mayor del sexo, ya que es requisito previo para determinar la formación de testículos normales, siendo un interruptor molecular (Manolakov y col., 2006). En ausencia del Sry los ovarios se desarrollan normalmente en la hembra (Sinclair y col., 1990; Kennedy y Molinero, 1993; Hubler y col., 1999). Otros genes que en menor medida estarían involucrados en el desvío de las gónadas y el tracto reproductivo hacia el fenotipo masculino son el Sox9 y el Ftz F1. En el embrión hembra el cromosoma Y no esta presente, y por consiguiente el Sry no se expresa, por lo que permite a las gónadas desarrollarse hacia lo femenino. La cascada genética en la hembra al no tener el control del Sry, comienza con el gen Dax1 (regulado por genes como Wnt4 y SF1) produciendo enzimas de aromatasa, desarrollándose así las gónadas femeninas (Manolakov y col., 2006).

3.5.4 Diagnóstico de las alteraciones del desarrollo sexual.

Para lograr un diagnóstico definitivo de una patología reproductiva de esta índole, es necesario categorizar los desórdenes por el primer paso anormal. Clasificándose estos desordenes como anomalías del sexo cromosómico, anomalías del sexo gonadal, o anomalías del sexo fenotípico (Meyers-Wallen y Patterson, 1986). En los animales que se presume puedan llegar a tener este tipo de desordenes, se debe seguir la metodología siguiente: a) En primer lugar se debe determinar si la alteración comenzó en el sexo cromosómico, para lo cual se debe observar el cariotipo del individuo (XX o XY), y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para determinar la presencia o ausencia del gen Sry, b) Si no se observó alteración en el paso anterior se debe descartar la alteración en el sexo gonadal, para lo cual se deben realizar exámenes histológicos buscando testículos, ovarios, u ovotestis anormalmente presentes. c) Por último, si no se han encontrado desordenes en la formación del sexo cromosómico y del sexo gonadal, se debe descartar la alteración en el desarrollo del sexo fenotípico. Para lo cual se debe realizar un estudio macroscópico e histológico de los genitales internos y externos, y cuando es posible definir el desorden por etiología genética (Concannon y col., 2001).

3.5.5 Desórdenes del desarrollo sexual cromosómico.

Los animales que presentan este tipo de alteraciones tienen una anomalía en el número o en la estructura de los cromosomas sexuales, siendo detectable por el cariotipo de los linfocitos sanguíneos o por los fibroblastos de la piel (Concannon y col., 2001). Aquellos con trisomía o monosomía del cromosoma sexual (XXY, XXX, o XO), tienen genitales subdesarrollados y son estériles, pero generalmente tienen genitales externos masculinos (XXY), femeninos (XXX o XO) o ambiguos. Los síndromes XXY y XO han sido bien descritos en seres humanos como los síndromes de Klinefelter y de Turner, respectivamente. Ambos síndromes han sido publicados en perros y gatos (Meyers-Wallen y Patterson, 1986; Meyers-Wallen y Patterson, 1989b; Lofstedt y col., 1992), y el síndrome XXX ha sido publicado en perros (Johnston, 1985). Otro de los desordenes sexuales cromosómicos son las quimeras, estos individuos están compuestos por dos o más poblaciones celulares (XX / XY), cada una proveniente de diferentes individuos, pudiendo presentar genitales externos de hembra/ ambiguo/ macho, y a nivel gonadal ovario/ ovotestis/ testículos (Meyers-Wallen, 2000). Los quimerismos se definen como primarios cuando al analizar distintos tejidos del organismo encontramos la presencia de estas líneas celulares. Mientras que se denomina quimerismo secundario cuando estas líneas aparecen en un solo tejido como es el caso de las llamadas hembras freemartins (hembras masculinizadas infértiles nacidas mellizas de un macho) (Hare y Singh, 1979, Meyers-Wallen, 2000).

Los mosaicos son también individuos integrados por dos o más poblaciones celulares, pero las células se originan dentro del mismo individuo. El sexo gonadal de las quimeras y mosaicos depende de la proporción de células XX y XY presentes en la gónada indiferenciada en el momento de la determinación del sexo gonadal y de la capacidad de esas células para formar testículos u ovarios funcionales. Entonces el tipo de

gónada formada determina el sexo fenotípico. Han sido publicados varios trabajos en perros y/ o gatos (Meyers-Wallen y Patterson, 1986). La trisomía, monosomía, y los mosaicos pueden resultar de la no disyunción cromosómica durante la meiosis o mitosis, mientras que el quimerismo puede resultar de la fusión de cigotos (Concannon y col., 2001).

3.5.6 Desórdenes del desarrollo sexual gonadal.

Son aquellos donde el sexo cromosómico y el gonadal no concuerdan, la meiosis y la fertilización son normales resultando en individuos XX o XY, pero con una gónada inapropiada. Estos individuos van hacer XY con tejido ovárico (XY con reversión sexual), o XX con tejido testicular (XX con reversión sexual) (Sommer y Meyers-Wallen, 1991). Solamente han sido diagnosticados en perros individuos XX con reversión sexual en sus dos variantes, machos XX, y los verdaderos hermafroditas XX, siendo una condición familiar en Cocker Spaniels, Pugs, Beagles, Kerry Blue Terriers, y Weimaraners (Meyers-Wallen y Patterson, 1989b). Los verdaderos hermafroditas XX, tienen por lo menos un ovotestis, Un cocker Spaniels macho hermafrodita con piometra fue reportado, presentando ovotestis bilateral (Kim y Kim, 2006). El grado de masculinización fenotípica está relacionado con la cantidad de tejido testicular presente. Estos individuos pueden tener genitales externos femeninos, o un clítoris agrandado que se asemeja a un pene con hueso (*hueso del clítoris*). Los machos XX tienen generalmente un prepucio desplazado caudalmente, un pene con hipospadia, y son criptóquidos bilaterales (Concannon, 2001). Para llegar al diagnóstico de estas patologías además de los exámenes histológicos en busca de tejidos gonadales que no concuerden con el sexo cromosómico, se puede incluir una prueba molecular para detectar la presencia o ausencia del Sry. Debido a que la reversión sexual XX Sry-negativa es el tipo que se ha documentado en perros de raza pura y es probable que sea heredada (Meyers-Wallen y col., 1999; Meyers-Wallen y col., 1995). La reversión sexual XX Sry-positiva es causada por un mecanismo genético diferente y no se ha descrito en perros o gatos.

3.5.7 Desórdenes del desarrollo sexual fenotípico.

En las anomalías sexuales fenotípicas, la composición cromosómica y gonadal concuerdan, pero los genitales tienen alguna característica del sexo opuesto (Meyers-Wallen y Patterson, 1986). Este tipo de animales en general son categorizados como hembras pseudohermafroditas o machos pseudohermafroditas.

3.5.7.1 Hembras pseudohermafroditas.

Las hembras caninas pseudohermafroditas son 78, XX, y tienen ovarios bilaterales. Los órganos derivados de los conductos Müllerianos se desarrollan normalmente, formando los oviductos, el útero, y la vagina craneal. Los órganos andrógeno dependientes se masculinizan durante el desarrollo fenotípico (Meyers-Wallen y Patterson, 1989a), variando desde un simple agrandamiento del clítoris hasta genitales externos casi de machos

normales, con formación inclusive de una próstata interna. Las causas iatrogénicas incluyen la administración de andrógenos o progestágenos durante la gestación. Se debe evitar la administración de esteroides durante la gestación, particularmente durante el período en que normalmente los genitales internos y externos caninos se desarrollan (días 34 - 46, contando desde el pico de LH sérica (d0) en la perra (Meyers-Wallen y col., 1991; Meyers-Wallen y col., 1993).

3.5.7.2 Machos pseudohermafroditas.

Los machos caninos pseudohermafroditas son 78, XY y tienen testículos bilaterales, pero genitales internos o externos femeninos. Se reconocen dos categorías de pseudohermafroditismo en macho:

♦ Falla en la regresión del conducto Mülleriano: los derivados de los conductos Müllerianos se desarrollan normalmente, por lo cual los perros afectados tienen oviductos bilaterales, un útero completo con cervix, y la porción craneal de la vagina, además de los genitales masculinos (Meyers-Wallen y Patterson, 1989a). Testículos escrotales bilaterales o criptorquidismo unilateral o bilateral pueden estar presentes. En estos machos pseudohermafroditas se puede presentar piómetra, infección del tracto urinario, infección de la próstata, o tumor de células de Sertoli. El diagnóstico es confirmado por la presencia de una constitución cromosómica de 78, XY, testículos bilaterales, y la presencia de todos los derivados del conducto Mülleriano. El defecto se hereda como rasgo autosómico recesivo (Meyers-Wallen y col., 1989), por lo tanto las hembras y los machos pueden ser portadores. Los perros homocigóticos afectados que tienen un testículo descendido generalmente son fértiles y transmitirán el rasgo a toda la descendencia, produciendo perros portadores o afectados. El Síndrome del Conducto Mülleriano Persistente (SCMP) ha sido reportado en el Schnauzer miniatura y en el Basset Hound. Una condición de intersexo que puede ser SCMP también ha sido publicada en un gato Persa (Meyers-Wallen y Patterson, 1989a). Fue reportado el caso de un macho pseudohermafrodita (78, XY) con fenotipo femenino, que presentaba el útero y la vagina normales, estructura endocrina femenina, y con la particularidad de poseer un clítoris hipertrofiado, testículos y un seminoma conectado con el útero en la posición del ovario. Esto se explicaría por una posible inactivación parcial de genes presentes en el cromosoma Y, similar a los que están involucrados en la determinación testicular parcialmente inactivos. Por lo cual presenta testículos aparentemente normales y su estructura endocrina es femenina (Volpe y col., 2000). Un caso similar se presentó en una perra de tres años pero que presentara genitales externos ambiguos, siendo también un macho pseudohermafrodita (del Amo y col., 2001).

♦ Falla de la masculinización andrógeno-dependiente: la regresión del conducto Mülleriano ocurre como en los machos normales, pero las estructuras que requieren de andrógenos para la masculinización no se desarrollan normalmente. Esta falla en la masculinización puede ser desde leve, donde ocurre alguna masculinización, hasta severa, donde no ocurre ninguna masculinización (falla completa).

Estos fenotipos pueden estar causados por defectos en:

- la hormona luteinizante (LH) o receptores de LH.
- la producción de andrógenos.
- la conversión de testosterona (T) a dihidrotestosterona (DHT) por la 5-alfa-reductasa.
- el receptor de andrógeno.

Los defectos en la hormona LH, los receptores de LH, la producción de andrógenos, y la 5-alfa-reductasa no se han documentado en el perro o gato como causa de pseudohermafroditismo. Solo han sido diagnosticados en pequeños animales los defectos del receptor de andrógeno, denominándose feminización testicular (FmT). Los síndromes de feminización testicular (FmT) son causados por mutaciones del gen X ligado al receptor de andrógeno. Aunque la producción de testosterona y conversión a dihidrotestosterona es normal, los órganos blancos no pueden responder apropiadamente. Hay una falla completa de la masculinización andrógeno-dependiente cuando el receptor de andrógenos es no funcional, y parcial cuando es parcialmente funcional (Concannon, 2001).

Cuando hay un receptor no funcional, las características andrógeno-dependientes tales como los derivados del conducto de Wolff están ausentes, y los derivados del conducto de Müller también pero esto es lo esperado en un macho normal ya que la regresión del conducto de Müller es dependiente del MIS y no de los andrógenos. Los machos afectados a menudo se presentan como hembras con fallas para ciclar y esterilidad. Cuando el receptor de andrógenos tiene función parcial, el diagnóstico de FmT es incompleto. El espectro causado por estos defectos se extiende desde individuos con genitales ambiguos a hembras fenotípicas que son infértiles. Esto ha sido reportado en un perro mestizo, por Peter y colaboradores en 1993 (Concannon, 2001).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 GENÉTICA MOLECULAR

4.1.1 Características de la muestra

En este trabajo se utilizaron once marcadores RAPDs en 40 muestras de ADN de perros cimarrones, 20 provenientes de la zona sur (14 hembras y 6 machos; Grupo 1), y las 20 muestras restantes del noreste del país donde se encontraba el núcleo originario (12 hembras y 8 machos; Grupo 2).

Cuadro 1. Animales pertenecientes a la región sur (Grupo 1).

Nombre	Tatuaje	F.Nac.	Sexo	Capa
Chabela de Alférez	CI. 01 KS 8	11/9/04	H	Baya
Bozal de los Charrúas	CI. 02 RR 4	31/7/01	M	Atig.
Chalouá	CI. 03 EQ 183	26/10/00	H	Atig. Col.
Palermo del Candombe	CI. 05 MD 7	10/11/00	M	Bayo
Tierno del Fusna	CI. 06 FU 21	29/11/03	M	Atig. Col.
Cala de Cabaite	CI. 07 JL 14	29/5/03	H	Atig.
Milonga de Quilligan	CI. 08 EQ 177	6/4/00	H	Atig.
Rosenda de Minga	CI. 09 ZG 11	6/1/04	H	Atig.
Anahí de Quilligan	CI. 10 DQ 63	6/9/93	H	Atig.
Bilú del Guayabo	CI. 11 FD 2	20/8/03	H	Atig.
Gacho de Quilligan	CI. 12 EQ 210	20/8/03	M	Bayo
Juana del Rastro	CI. 14 DR 32	8/10/05	H	Bayo
Hurón del Rastro	CI. 15 UI 8	10/10/11	M	Atig.
Caña Bonita de la Guarida	CI. 16 RN 1	11/99	H	Atig.
Caña Tacuara de la Guarida	CI. 17 RN 2	03/02	H	Atig.
Purificación de Quilligan	CI. 18 EQ131	6/12/98	H	Atig.
Guyunusa de Quilligan	CI. 19 EQ		H	Atig.
Gabino de Quilligan	CI. 20 EQ36		M	Atig.
Batovi de Quilligan	CI. 50 EQ128		H	Atig.
Xuxa de Scoober	CI. 51 QU2		H	Atig.

Cuadro 2. Animales pertenecientes a la región noreste (Grupo 2).

Nombre	Tatuaje	F.Nac.	Sexo	Capa
Gaicho	CI. 21	06/91	M	Atig.
Teka	CI. 22	26/2/06	H	Atig.
Boris	CI. 23	11/02	M	Atig.
Tucán Lima	CI. 24	10/02	M	Atig.
India	CI. 25	06/05	H	Atig.
Kai de los Robles	CI. 26 ZT 30	10/6/99	H	Atig.
Pucara de los Robles	CI. 27 ZT 49	20/5/00	M	Bayo
María Laura de Lima	CI. 28 RL 1	8/98	H	Atig.
María Lena de Lima	CI. 29 RL 7	1/12/99	H	Atig.
Caicobé de los Robles	CI 30 ZT 32	19/11/99	M	Atig.
Hortensia de las Morochas	CI.31 VO 16	19/6/05	H	Atig.
Tango del Zapallar	CI. 32 CP 1	1998	M	Atig.
Isolina de Caraguata	CI. 33 WG2	17/10/ 99	H	Atig.
Catriel de Caraguata	CI. 34 WG1	27/5/98	M	Atig.
Chuza de Cebollatí	CI. 35 SC21	20/4/99	H	Atig.
Bomba de Palleros	CI. 36 EP9		M	Atig.
Tana del Zapallar	CI. 39		H	BayoCol
Duquesa d Bañado Medina	CI.41		H	Atig.
Tana de los Robles	CI. 42 BO1	27/11/92	H	Baya
Mahindra	CI.45		H	Bayo

4.1.2 Extracción de sangre.

Se le extrajo 5 ml de sangre a todos los ejemplares que componen la muestra a analizar, a partir de la vena anterobraquial mediante jeringas de

10cc con agujas 18G. Se utilizó anticoagulante EDTA (2gr), el cual había sido incorporado previamente a cada jeringa. La sangre obtenida de esta manera fue trasladada de inmediato y en forma refrigerada al Laboratorio de Genética de la Facultad de Veterinaria para su posterior procesamiento.

4.1.3 Extracción del ADN.

Se realizó la extracción del ADN a partir de 5ml de sangre entera procedente de dichos ejemplares. Para la obtención del ADN se utilizó la técnica convencional de extracción con solventes orgánicos (fenol/ cloroformo/ alcohol isoamílico) y precipitación con etanol (John y col., 1991). Se evaluó el ADN extraído mediante corrida electroforética en gel de agarosa al 1% (1g de agarosa, 100ml de TAE 1X, 2.5 µl BET), siendo visualizado mediante un transiluminador de luz UV (modelo Cole-Palmer, francés), observándose bandas de alto peso molecular, las cuales se corresponden con el ADN genómico.

4.1.4 Cuantificación de ADN.

Se calculó la concentración de las muestras de ADN a partir de las absorbancias obtenidas mediante un espectrofotómetro a 260nm (Bausch y Lomb, spectronic 21, U.S.A., Área Bioquímica). Una vez conocida la concentración del ADN de cada muestra se procedió a realizar la mezcla o pools de cada subpoblación en cantidades iguales de ADN. Quedando así representado cada uno de los 40 animales de igual manera, conformando el Grupo 1 (ADN de los 20 animales provenientes de la zona sur del País), y el Grupo 2 (ADN de los 20 animales provenientes del noreste del País).

4.1.5 Amplificación de marcadores RAPDs.

Se estandarizó las reacciones de PCR (Gene e Technet, ingles) para marcadores RAPDs de la serie N ° 5UBC (University of British Columbia) utilizándose los cebadores de la serie (401, 403, 405, 415, 428, 430, 434, 438, 439, 440, 441).

Cuadro 3. Secuencias y contenido en GC de los primers utilizados en las reacciones de PCR.

Primer	Secuencia	Contenido GC
401	TAG GAC AGT C	50 %
403	GGA AGG CTG T	60 %
405	CTC TCG TGC G	70 %
415	GTT CCA GCA G	60 %
428	GCC TGC GGT A	70 %
430	AGT CGG CAC C	70 %
434	TCG CTA GTC C	60 %
438	AGA CGG CCG G	80 %
439	GCC CCT TGA C	70 %
440	CTG TCG AAC C	60 %
441	CTG CGT TCT T	50 %

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen final de 25ul con un contenido de 10xPCR buffer, 1,5 mM MgCl, 0,15mM de cada dNTP, 0,2mM de cebador y 0,75 U de Taq polimerasa. El programa de PCR consistió en los siguientes pasos: una desnaturalización del ADN a 94 ° C - 2min (1 ciclo) seguido de 35ciclos de 94 ° C-2min/36 ° C-1min/72 ° C-1min y una extensión final de 5min a 72 ° C. Luego de culminadas las reacciones, se colocaron ambos pools (7 ul) en el gel de agarosa al 3%, donde se realizó la corrida electroforética y se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 ug/ml) para lograr visualizar las bandas bajo luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular se utilizó una escalera de ADN de 100-1000 pb. Para el estudio de las bandas de amplificación se utilizó el software de análisis de imágenes, Kodak Digital Science (1D, versión 3.0).

4.1.6 Análisis Estadístico y parámetros poblacionales.

Para la estimación de la variabilidad genética en las poblaciones se empleó el índice de bandas compartidas (BSF).

La fórmula de BSF expresa:

$$BSF = 2N_{xy} / (N_x + N_y). \text{ (Hoelzel, 1992).}$$

Donde: N_{xy} corresponde al número de bandas compartidas por las dos muestras poblacionales.

N_x bandas que aparecen en las poblaciones x.

N_y bandas que aparecen en las poblaciones y.

Utilizando el programa PopGene 32 versión 1.31 para marcadores dominantes se realizaron los cálculos de identidad genética de Nei (I), % de polimorfismo (P), distancia genética (Yeh y col., 2000).

4.2 CARACTERES DELETÉREOS Y CARACTERÍSTICAS DE BASE GENÉTICA.

Se realizó un relevamiento a criadores y propietarios para obtener datos sobre caracteres deletéreos y características de base genética utilizando un modelo de ficha donde se registraron los datos completos de cada animal (Figura). Se relevó un n=100 animales, recabándose datos de éstos y de los animales directamente emparentados. En dicha encuesta se tomaron datos de 62 animales inscriptos en el K.C.U y de 38 no inscriptos pero que presentaban la tipicidad de la raza, ya que aún se siguen inscribiendo perros base. Los datos fueron recabados en perros que viven en distintas partes del país.

Se tomaron en cuenta los caracteres: tipo de mordida (siendo tomado como normal para la raza la mordida en tijera no excluyéndose la mordida en pinza), la criptorquidea (unilateral o bilateral), presencia de sexta uña (indicativo de ancestralidad), carácter anuro y observaciones de malformaciones o patologías que puedan tener una base hereditaria.

<u>Nombre Animal</u>	-			
<u>Criadero/Propietario</u>	-			
<u>Veterinario</u>	-			
<u>Tatuaje</u>	-			
<u>F.Nacimiento</u>	-			
<u>Sexo</u>	-			
<u>Capa</u>	-			
<u>Tipo de mordida</u>	<u>Normal (pinza/tijera)</u>	<u>Prognatismo (Acortamiento de la mandíbula superior con respecto a la inferior)</u>		<u>Enognatismo (Acortamiento de la mandíbula inferior con relación a la superior)</u>
	-	-		-
<u>Sexta uña (polidactilia)</u>	<u>Presencia</u>		<u>Ausencia</u>	
	-		-	
<u>Carácter Anuro (ausencia de cola)</u>	<u>Presencia</u>		<u>Ausencia</u>	
	-		-	
<u>Criptorquidea</u>	<u>Unilateral (Presencia de un solo testículo en el escroto)</u>	<u>Izq</u>	<u>Der</u>	<u>Bilateral (Falta total de los testículos en el escroto)</u>
	-	-	-	-
<u>OBSERVACIONES (Malformaciones o patologías que puedan tener una base hereditaria)</u>	-			

Figura III. Ficha utilizada durante la encuesta sobre caracteres deletéreos y características de base genética.

4.3 ESTUDIO DE UN CASO DE INTERSEXUALIDAD.

Se estudió un caso clínico de una perra cimarrona de ocho años, llamada Cala que presentaba una alteración de orden reproductivo, posiblemente relacionado a una patología de base genética (intersexualidad). Dicho animal nació de una camada de seis cachorros (2 machos y 4 hembras). El motivo de consulta fue la ausencia de celo y comportamiento de macho durante la micción. Se realizó el examen objetivo general y particular de reproductor.

Dentro de los exámenes colaterales existentes, se realizó colpocitología y ecografía (Nelson y Couto, 2005). La primera fue realizada por el Dr. Danilo Fila y la ecografía abdominal fue efectuada por la Dra. Inés Pisón.

4.3.1 Enfoque Molecular.

4.3.1.1 Extracción de ADN a partir de sangre.

Se realizó la extracción del ADN a partir de 5ml de sangre entera procedente de dicho ejemplar. Para la obtención del ADN se utilizó la técnica convencional de extracción con solventes orgánicos (fenol/ cloroformo/ alcohol isoamílico) y precipitación con etanol (John y col., 1991). Se evaluó el ADN extraído mediante corrida electroforética en gel de agarosa al 1% (1g de agarosa, 100ml de TAE 1X, 2.5 µl BET), fue teñido con bromuro de etidio (0,5 ug/ml), siendo visualizado mediante un transiluminador de luz UV (Cole-Palmer, francés).

4.3.1.2 Extracción de ADN a partir de pelo.

Se extrajeron muestras de pelo teniendo en cuenta que éstos presentarían el folículo piloso, del cual se obtuvo el ADN. Para lo cual se siguió la siguiente metodología (Walsh y col., 1991).

- Se lavó el pelo para reducir la superficie sucia y los contaminantes por inmersión en agua estéril en un recipiente limpio de 50 ml.

- Luego se tomaron 6 pelos, se les cortó una porción de 1 cm. desde la raíz y se los colocó en Eppendorff de 1,5 ml. Como el pelo puede contener material celular en la superficie que puede ser o no del donante del pelo, es aconsejable cortar una porción adyacente a la raíz para emplearla como control.

- Se le agregó 200 µl de chelex al 5 %.

- Posteriormente se incubó en estufa a 56 ° C por toda la noche.

- Luego de esto se vortió a alta velocidad por 5-10 segundos.

- Se incubó en agua hirviendo por 8 minutos.

Nota: Chequear que el pelo esté completamente inmerso en la solución de Chelex antes de hervir.

- Se vortió nuevamente a alta velocidad por 5-10 segundos.

- Luego se microcentrifugó por 2-3 minutos a 10.000-15.000x g.

Una vez extraído el ADN (muestras de sangre y de pelo) se procedió a la amplificación por PCR junto al marcador de Sry.



4.3.1.3 Gen Sry

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen final de 25ul para el ADN extraído, con un contenido de 10xPCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,15mM de cada dNTP, 0,2mM de cebador y 0,75 U de Taq polimerasa. El programa de PCR consistió en los siguientes pasos: una desnaturalización del ADN a 94 ° C -2min (1 ciclo) seguido de 35ciclos de 94 ° C-2min/36 ° C-1min/72 ° C-1min y una extensión final de 5min a 72 ° C.

Como controles positivos y negativos de amplificación del gen Sry se utilizó ADN extraído de sangre y de pelo de macho y hembras normales, respectivamente. También como control negativo de amplificación de PCR se utilizó un tubo con mix de PCR pero sin ADN.

- Seq. # 5909 Sry F GAA CGC ATT CTT GGT GTG GTC TC

- Seq. # 5910 Sry R GGC CAT TTT TCG GCT TCT GTA AG

4.3.2 Enfoque Citogenético.

4.3.2.1 Extracción de sangre.

Se extrajo una muestra de sangre de 5ml., de la vena antero braquial del animal en estudio con jeringas de 10cc. estériles heparinizadas (150 UI Heparina sódica) y agujas descartables 18G en condiciones de asepsia. Las muestras fueron refrigeradas y transportadas de inmediato al Laboratorio de Genética de la Facultad de Veterinaria para su procesado.

4.3.2.2 Cultivo Linfocitario.

La fuente de células en división utilizada más frecuentemente para el análisis cromosómico en cultivos a corto término, son los linfocitos de la sangre periférica (Hare y Singh, 1979). Se utilizó la técnica de cultivo de linfocitos de acuerdo al protocolo de Moorhead y col., 1960, con modificaciones (Halnan, 1989). Siendo el medio de cultivo Completo:

- RPMI 1640

- Suero Fetal Bovino (nutriente para las células en crecimiento) (10%).

- Fito hemaglutinina (mitógeno que estimula la división celular) (2.5 ug/ml).

- Heparina (nutriente para las células en crecimiento) (15 UI/ml).

- Penicilina (impide el crecimiento de microorganismos) (100 UI/ml).

- Estreptomina (impide el crecimiento de microorganismos) (100 ug/ml).

Para la obtención de cromosomas mitóticos se utilizaron 8 tubos en los cuales se colocaron, 5 cc del medio de cultivo antes mencionado, y luego se sembraron 8 a 10 gotas de la muestra de sangre extraída al ejemplar a estudio. Las maniobras fueron realizadas en cámara de flujo para una mejor asepsia. Los tubos sembrados se incubaron en baño María a temperatura constante de 38 ° C durante 72 horas. Los cultivos fueron resuspendidos diariamente, evaluándose también su desarrollo al mismo tiempo. Cuarenta minutos antes de culminar la incubación de los cultivos sembrados se le agregó 50 ul. de colchicina (0,10 ul/ml.) a cada tubo. Este fármaco se utiliza para inhibir la polimerización de las moléculas de tubulina, por lo que detiene la migración de los cromosomas desde la placa metafásica hacia los polos celulares, aumentando de esta forma el número de metafases por cultivo (Hare y Singh, 1979). Al cumplirse las 72 horas de incubación, los cultivos fueron sacrificados, las células resuspendidas, se centrifugó por diez minutos a 800 revoluciones por minuto (Rev./ min.) y se les extrajo el sobrenadante. Luego de lo cual se le agregó 10 ml. de solución hipotónica (KCl 0,075 M.) a cada tubo y se lo dejó actuar por 20 minutos a temperatura ambiente, para que por osmosis las células se expandan y facilite de esta manera la observación. Posteriormente se le agregó 10 gotas de solución metanol-acético (3/1) para su fijación. Luego los tubos fueron centrifugados por 10 minutos a 800 Rev./ min., se les extrajo el sobrenadante y se les agregó 5 ml. del fijador antes mencionado, permaneciendo por treinta minutos a temperatura ambiente para luego ser centrifugados. Este proceso de lavado fue repetido hasta que el sobrenadante se mostró limpio. Por último se extrajo el sobrenadante, dejando las células resuspendidas en 1 ml. de fijador.

4.3.2.3 Realización de preparaciones citológicas.

Para la obtención de preparados se colocó un par de gotas de la suspensión celular en un portaobjetos previamente sumergido en metanol al 70%. Luego se flamearon los portaobjetos para fijar las extensiones celulares.

Se realizó la técnica de bandeo G para identificación de los pares cromosómicos utilizando tripsina al 1% diluida en buffer fosfato dibásico (0.067 M) y suero fisiológico). Los preparados fueron teñidos con el colorante Giemsa al 3% en buffer fosfato Ph 6,8 durante 15 minutos.

4.3.2.4 Visualización y conteo de metafases.

La metafase es la etapa de la mitosis en donde los cromosomas llegan a su mayor grado de compactación, por lo tanto es el mejor momento para ser observados y estudiados. Se procedió a observar y contar 100 metafases por medio de microscopio óptico (Olympus, modelo BX60FS, japonés), las imágenes fueron capturadas con cámara digital (U-ULS100HG, japonés) conectada a equipo informático con software de digitalización de imágenes Flash Bus MV_FBG32 (Pertenece al Área Genética).

Para el conteo cromosómico se utilizó el programa informático de dominio público UTHSCSA Image Tool Versión 3.0 desarrollado por el centro

de ciencia y salud de la Universidad de Texas (U.S.A) (Instalado en las computadoras del Área Genética).

5. RESULTADOS

5.1 ESTUDIOS REALIZADOS CON LOS MARCADORES MOLECULARES RAPDs.

Con la serie de 11 oligonucleótidos se observaron bandas, tanto para la población del sur (Grupo 1) como para la noreste (Grupo 2) y se obtuvo un total de 47 loci de amplificación siendo siete de ellos polimórficos (14,9%). El tamaño de los fragmentos estuvo comprendido entre 266 y 1828 pb (cuadro 4). El promedio de BSF al comparar las dos poblaciones fue de 0.91 con un índice promedio de diversidad de Nei's ($H=0,08$). La distancia genética entre ambas poblaciones fue de 0,16, con un índice de identidad genética de Nei's (0,85).

Cuadro 4. Características de los marcadores RAPDs utilizados y resumen de los resultados obtenidos al realizar las amplificaciones por PCR.

Iniciador	Secuencia (% GC)	Rango Amplificación	Total fragmentos amplificados	N ° loci Polimórficos	BSF
401	TAG GAC AGT C (50% GC)	755-1680	9	2	0.88
403	GGA AGG CTG T (60% GC)	767-1439	6	1	0.9
405	CTC TCG TGC G (70% GC)	1033	1	-	1
415	GTT CCA GCA G (60% GC)	440-1424	6	-	1
428	GGC TGC GGT A (70%GC)	1088	1	-	1
430	AGT CGG CAC C (70% GC)	630-1274	3	1	0.8
434	TCG CTA GTC C (60%GC)	458-990	3	-	1
438	AGA CGG CCG G (80% GC)	266-1205	5	-	1
439	GCC CCT TGA C (70% GC)	447-1142	5	1	0.89
440	CTG TCG AAC C (60% GC)	495-1231	2	1	0.67
441	CTG CGT TCT T (50% GC)	569-1828	6	1	0.91

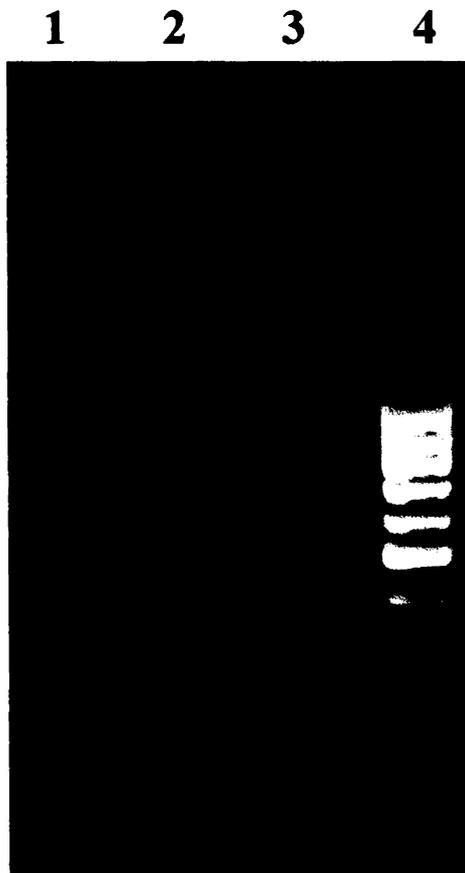


Figura IV. Gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio, donde se observa amplificaciones para el marcador RAPD 401. 1.- amplificación del grupo 1; 2.- amplificación del grupo 2; 3.- control negativo; 4.- marcador de peso molecular (100-1000 pb).

5.2 CARACTERES DELETÉREOS Y CARACTERÍSTICAS DE BASE GENÉTICA.

En cuanto a la coloración de la capa, el 84% presentó capa atigrada y 16% capa color bayo. En el cuadro 5 se muestran las frecuencias absolutas de características deletéreas y/ o con base hereditaria.

Dentro de otras observaciones con base hereditaria, ya sea en los animales encuestados o parientes directos, se nos informó de la existencia de: seis animales que presentaban displasia de cadera, dos con carga de pelos en los cuartos, dos cachorros con pelo largo, seis cachorros overos, dos cachorros con colas fusionadas, y uno con paladar hendido.

Cuadro 5. Frecuencia de aparición de caracteres deletéreos en la muestra estudiada de la raza Cimarrón Uruguayo.

Característica	Frecuencia Absoluta
Mordida Normal (en pinza)	27
Mordida Normal (en tijera)	69
Prognatismo	4
Sexta uña	0
Carácter anuro	0
Criptorquidia bilateral	
(N machos = 44)	1
N total (machos y hembras)	100

5.3 ESTUDIO DE UN CASO DE INTERSEXUALIDAD.

5.3.1 Informe de Examen Ginecológico (Realizado por el Dr. Danilo Fila).

En el examen objetivo general sobre el animal a estudio, se observó una perra de conformación grande con sobrepeso evidente. Luego se realizó el examen objetivo particular de reproductor evaluando por inspección y palpación los órganos genitales externos y la vagina. El animal presentó una vulva de conformación y tamaño normal para una perra en anestro. En el vestíbulo y la vagina, a la inspección por vaginoscopía la mucosa mostró coloración y textura normal, presentando de forma anormal la desembocadura de la uretra sobre el techo de la vagina (dorsal). También se observó un pliegue de mucosa desde dorsal a ventral sobre la zona posterior a la unión vestíbulo-vaginal. Teniendo en cuenta la vaginoscopía y el tacto vaginal, dicha vagina termina en un fondo de saco ciego que no continúa hacia craneal. El útero no se palpó por vía trans-abdominal.

En la colpocitología se observaron mayoritariamente células parabasales (cerca al 100%), en suma se describe como anestro.

En la ecografía abdominal (realizada por la Dra. Inés Pisón) no se encontró la presencia de estructuras ováricas (lo que puede ser esperable en anestro), pero tampoco se encontraron estructuras uterinas, no siendo una observación normal puesto que el animal no fue sometido a histerectomía.

En suma el diagnóstico clínico sería un anestro primario con malformaciones orgánicas.



a



b

Figura V. Examen particular de reproductor en el animal intersexuado, donde se observa en **a**: la zona perineal y parte caudal de vagina s/p para un animal en anestro. **b**: se aprecia el fenotipo femenino normal del animal, sin presentar a nivel abdominal o perineal alteración alguna.

5.3.2 Enfoque Molecular.

Se obtuvo amplificación de un fragmento del tamaño esperado (130pb) de una secuencia del gen Sry en ADN extraído de sangre del animal problema, así como en los machos normales utilizados como control (en ADN de muestras de sangre y folículo piloso). En las muestras de ADN provenientes de folículos pilosos de la perra en estudio y en muestras de ADN extraídas de sangre y folículo piloso de hembras cimarronas normales no se observó amplificación del gen Sry (Figura VI).

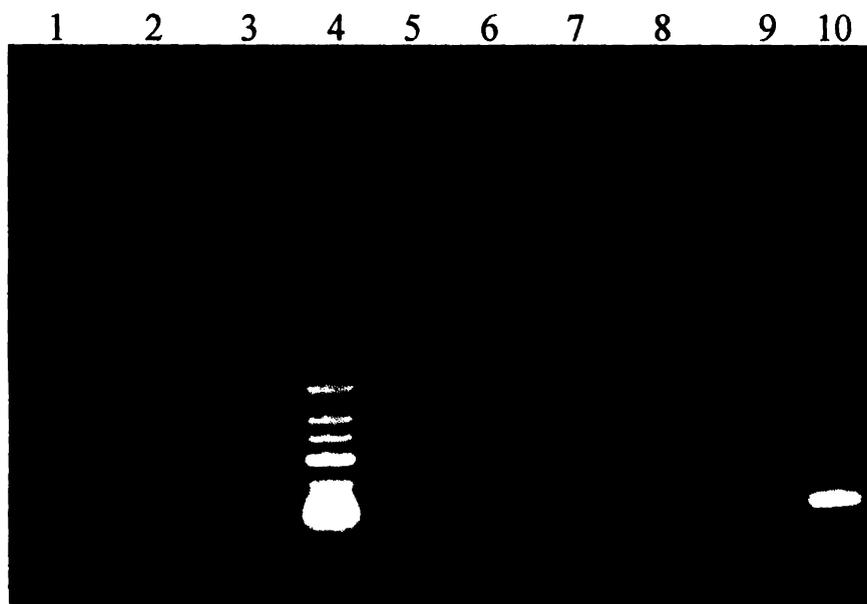


Figura VI. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se observa: 1, 2 y 10.- banda de amplificación del gen Sry en muestra de ADN extraído de sangre de hembra problema, machos controles respectivamente, 6.- banda de amplificación del gen Sry en muestra de sangre extraída con técnica de chelex de la hembra problema, 8.- banda de amplificación del gen Sry en muestra de folículo piloso extraído con técnica de chelex de macho control normal. 3, 5, 7, 9.- ausencia de amplificación de Sry en muestras de ADN de sangre de hembra normal, control negativo, ADN de células de folículo piloso de hembra problema y de hembra normal respectivamente. 4.- marcador de peso molecular (100-1000 pb).

5.3.3 Enfoque Citogenético.

Del análisis de 100 placas metafásicas se evidenció la presencia de células 78, XY y células 77, XO (cuadro 6 y figura 7). En la observación de placas metafásicas con bandeado G, los cromosomas autosómicos, presentaron todos una morfología acrocéntrica, mientras que el cromosoma X se presentó como un gran submetacéntrico y el Y como un pequeño cromosoma de morfología submetacéntrica que se observó de forma puntiforme (figura 7).

Cuadro 6. Frecuencia cromosómica observada.

Cromosomas	Frecuencia Absoluta
77, XO	32
78, XY	68
Total (placas metafásicas contabilizadas)	100



Figura VII. a: Placa metafásica 78, XY, b: Placa metafásica 77, XO, c: Placa metafásica 78, XY con bandeo GBC.

6. DISCUSIÓN

6.1 MARCADORES MOLECULARES RAPDs.

Los resultados obtenidos en este estudio con los RAPDs 401, 403 y 434 mostraron un mayor número de bandas de amplificación cuando se comparan con estudios de variabilidad intrapoblacional realizados anteriormente en el perro cimarrón (Llambí y col., 2004). Sin embargo en el presente trabajo los RAPDs 401 y 403 mostraron un BSF superior (0.88 y 0.9) al encontrado por dichos autores (0.79 y 0.86) respectivamente. Teniendo en cuenta el total de los marcadores utilizados encontramos un BSF alto (0.91), un bajo polimorfismo ($P=14.9\%$) e índice promedio de diversidad de Nei's ($H=0.08$) que nos estarían indicando que ambas poblaciones presentan una alta homogeneidad e identidad genética para estos marcadores. Por otro lado ambas poblaciones mostraron estar a una distancia genética de 0.16, con un índice de identidad genética de Nei's alto (0.85) con lo cual podríamos inferir que pertenecen a un núcleo genético común. Esto podría deberse al bajo número fundacional de machos utilizados como reproductores cuando se comenzó con el rescate y estandarización de la raza (Silveira y col., 2002). En distintas razas caninas autóctonas de España se observó que la variabilidad genética encontrada mediante marcadores moleculares RAPD fue menor que la detectada utilizando marcadores moleculares microsatélites (Morera y col., 2001; Morera y col., 1999). Debemos tener en cuenta que la serie de RAPDs utilizada ha sido escogida sin un conocimiento previo de su valor como detectores de polimorfismo en la especie canina.

Al obtener un bajo porcentaje de polimorfismo, con esta serie de RAPDs es que se propone continuar el estudio de variabilidad genética en el perro Cimarrón Uruguayo y su comparativa con otras razas mediante la

utilización de marcadores moleculares codominantes como ser microsatélites, seleccionando aquellos altamente polimórficos para la especie.

6.2 CARACTERES DELETÉREOS Y CARACTERÍSTICAS DE BASE GENÉTICA.

En cuanto a la coloración de la capa, los resultados obtenidos en nuestro trabajo (84% capa atigrada y 16% capa color bayo) estarían evidenciando que en los criadores se continúa prefiriendo la capa atigrada en acuerdo con los estudios realizados previamente por Silveira y col., 2002. En cuanto a alteraciones del aparato reproductor se encontró un animal con criptorquidia bilateral (2.27%). Similares resultados han sido reportados para esta característica en la raza perro de agua español (2.17%) (Barba y col., 2000). En un relevamiento realizado en Inglaterra sobre un total de 3518 caninos de diferentes razas, la frecuencia de criptorquidia se estimó en un 6.8% (Yates y col., 2003), por lo cual esta alteración en el Cimarrón Uruguayo podemos considerarla como de baja incidencia.

Barba y col., 2000, han comunicado que en el perro de agua español para alteraciones mandibulares (prognatismo) la frecuencia ha sido moderadamente alta (10.82%). En nuestro relevamiento, dicha característica ha sido encontrada en menor frecuencia (4%).

En otras razas españolas como el perro Maneto (agrupación racial autóctona de Andalucía) la frecuencia de prognatismo (2.94%) se encuentra dentro de límites similares al Cimarrón Uruguayo (Barba y col., 1998). Debemos tener en cuenta que en el estándar oficial de la raza, el criptorquidismo y el prognatismo son faltas eliminatorias (www.kcu.com.uy/cimarron). Es importante destacar que en el presente relevamiento se descartó la presencia del carácter anuro (ligado a factores de letalidad) y del carácter sexta uña (asociado con ancestralidad racial).

6.3 ESTUDIO DE UN CASO DE INTERSEXUALIDAD

La intersexualidad correlacionada con anormalidades cromosómicas son un fenómeno biológico poco común en animales domésticos (Volpe y col., 2000). En el caso a estudio, el animal presentó una fórmula cromosómica compuesta por dos líneas celulares X0/XY a nivel linfocitario existiendo una monosomía del cromosoma X. Pudiendo clasificarse por el estudio cromosómico y la descripción clínica como un caso de intersexo cromosómico. La presencia de quimerismos linfocitarios (XX/XY) es bien conocida en distintas especies de animales domésticos (hembras freemartins infértiles). En nuestro caso no hemos identificado la presencia de células XX en las placas metafásicas analizadas, aunque no podríamos descartar la presencia de las mismas debiendo aumentar el número de observaciones celulares realizadas en los cultivos linfocitarios. El hecho de encontrar una monosomía del cromosoma X (77, X0), nos orientaría a pensar que esta línea celular podría originarse como producto de una no disyunción mitótica durante las primeras etapas embrionarias (Concannon y col., 2001). Si bien por el tipo de placentación de los caninos no sería frecuente la ocurrencia de

anastomosis vasculares a nivel de membranas fetales debemos considerar la posibilidad de existencia de intercambio fetal o de fusión embrionaria ya el animal en estudio nació de una camada con un total de 6 animales siendo 2 de ellos del sexo masculino.

Al encontrar amplificación de la secuencia del gen Sry en ADN de sangre y ausencia de la misma en ADN de folículo piloso se pondría en evidencia de que las células XY se encontrarían en el primer tejido y no en células de folículo piloso. Con lo cual podríamos decir que se trataría de un quimerismo de tipo secundario. Otro estudio con el que se podría establecer la inexistencia del cromosoma Y a nivel de otros tejidos que no sea la sangre, es el cultivo de fibroblastos extraídos por medio de biopsia epitelial para estudio citogenética (Halnan, 1979). Este es un método invasivo no permitido por ser considerado cruento para el animal por parte de sus propietarios. Al no poder realizar una laparotomía exploratoria, biopsia y examen histológico nos es imposible determinar una clasificación definitiva del animal intersexuado, ya que no es posible saber que gónada esta presente (ovario/ovotestis/testículo). Los síndromes de FmT pueden ser causados por mutaciones del gen X ligado al receptor de andrógeno. Los animales diagnosticados con este síndrome, pueden presentarse como hembras con infertilidad, presentando una fórmula cromosómica de 78, XY (Concannon, 2001). En el presente caso se encuentran dos líneas celulares diferentes, por lo que sería un mecanismo diferente el causal de la patología.

La existencia de la desembocadura de uretra a nivel de techo de una vagina que termina en fondo de saco ciego y la observación ecográfica de ausencia de estructuras uterinas estarían indicando alteración de órganos derivados de conductos Müllerianos.

En la constitución del sexo fenotípico intervienen varias hormonas y proteínas receptoras (testosterona, receptor de andrógenos, Sustancia Inhibidora Mülleriana MIS, etc) (Meyers-Wallen y Patterson, 1989a, Alam y col, 2007). La diferenciación de los órganos sexuales internos, accesorios, y genitales externos ocurre en respuesta a la presencia o ausencia de testosterona y de MIS. Por lo cual es posible que este animal se halla inclinado hacia lo femenino al no existir la presencia de estas hormonas, o que los órganos blancos de estas no hayan respondido por falla en los receptores de andrógeno, denominándose feminización testicular (FmT). Como proyección futura deberíamos realizar un control hormonal en dicho animal para lograr una caracterización más exacta de este intersexo.

7. CONCLUSIONES

- ♦ Los 11 RAPDs analizados mostraron un alto índice de bandas compartidas (0,91), una distancia genética de 0,1613 y un valor de identidad genética de 0,8511 por lo que se concluye que ambas poblaciones (noreste y sur) presentan una alta homogeneidad e identidad genética para estos marcadores y que pertenecerían a un núcleo genético común.
- ♦ En cuanto a caracteres deletéreos y características con base hereditaria, habiendo detectado animales con prognatismo (4%) y criptorquidia bilateral (2,27%) se concluye la importancia de ejercer un control de selección de reproductores riguroso ya que su expresión afecta la capacidad reproductiva y adaptativa de los animales. El presente trabajo aporta información sobre caracteres fenotípicos con base hereditaria que podría ser utilizada en planes de conservación de la raza.
- ♦ En cuanto al estudio de la perra con alteraciones reproductivas se puede concluir que este animal es incapaz de reproducirse, siendo un intersexo cromosómico, con quimerismo secundario a nivel linfocitario XY/XO. No siendo posible clasificarlo como verdadero Hermafrodita o Pseudohermafrodita ya que no se conoce su diferenciación gonadal ni su perfil hormonal.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Alam MR, Cho YG, Cho SJ, Lee JL, Lee HB, Tae HJ, Kim IS, Kim NS. (2007). **Male pseudohermaphroditism in dogs: Three case reports.** *Veterinarian Medicine*: 52(2):74-78.
2. Assunção, F. (1997). **El perro cimarrón.** Apartado de la Revista del Instituto Histórico y Geográfico del Uruguay: 37:23 –72.
3. Barba C, Castro R, Moreno-Arroyo B, Sierra AC, Camacho ME. (2000). **Frecuencias de aparición de caracteres deletéreos en el perro de Agua Español que afectan a la conservación de la raza.** *Archivos de Zootecnia*: 49:101-105.
4. Barba C, García de los Ríos JV, Delgado, Ginés J. (1998). **Planificación de un programa de conservación y preservación en la agrupación racial del Perro Maleta.** *Archivos de Zootecnia*: 47: 497-501.
5. Bouton, RJ. (1961). **La vida rural en el Uruguay.** Montevideo, Monteverde, 560p.
6. Concannon PW, England G, Verstegen J. (2001). **Recent advances in small animal reproduction.**
Disponible en: www.ivis.org. Consultado el: 5/7/2007.
7. Chaffaux S, Nudelmann N, Durand V, Crihiu EP. (1990). **Le pseudohermaphroditisme male. A propos du cas d'un chien intersexué 78, XX.** *Recueil de Médecine Vétérinaire*: 166:125–132.
8. Chaffaux S, Mailhac JM, Crihiu EP, Popescu CP, Cotard JP. (1980). **L'intersexualité chez le chien (Canis familiaris). A propos de quatre cas.** *Recueil de Médecine Vétérinaire*: 156:179–192.
9. D'Orbigny, A. (1945). **Viajes a la América meridional.** Ediciones Futuro, Colección Eurindia, Buenos Aires, 172p.
10. Del Amo A, De Luca J, Zufriategui L, Armocida A, Barbeito C, Gobello C. (2001). **Male pseudohermaphroditism in a dog: A case report.** *Theriogenology*: 1:1-11.
11. Delgado JV, Rodero A, Barba C, Camacho ME, Gómez M. (1996). **Conservación de los recursos genéticos caninos: Canis et felis.** Madrid, Luzán, 120p.
12. Fernández, G. (2000). **Situación de los recursos genéticos locales del Uruguay.** *Archivos de Zootecnia*: 49:333–340.
13. Gallardo, G. (1963). **La plaga de los perros cimarrones.** *Revista Historia (Buenos Aires)*, N°31, pp 70-90.
14. Goldschmidt KB, El-Jaick LM, Souza ECQ, Carvalho VLS, Moura IM, Benevides F. (2001). **Cryptorchidism associated with 78,XY/79,XXY mosaicism in dog.** *Israel Veterinary Medical Association*: 56 (2):56-58.
15. Goodfellow PN, Camerino G. (1999). **DAX-1, an "Anti-testis" gene.** *Cellular and Molecular Life Sciences*: 55:857-863.
16. Gwakisa PS, Kemp SJ, Teale AJ. (1994). **Characterization of zebu cattle breeds in tanzania using RAPD markers.** *Animal Genetics*: 26:89–94.
17. Halnan, C. (1989). **Cytogenetics of animals.** C. A. B. Internacional, editado por Universidad de Sidney, 570p.
18. Hare WCD, Singh E. (1979). **Citogenética de la reproducción animal.** Zaragoza, España, Acribia S. A., 80p.

19. Hoelzel AR. (1992). **Molecular genetic analysis of populations**. 2ª Ed. Great Britain, Ed. Oxford, 315 p.
20. Jainudeen MR y Hafez ESE. (1993). **Incapacidad reproductiva en machos**, en: Hafez, E. S. E. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 6ª edición, Estados Unidos, Interamericana McGraw-Hill, pp 271-292.
21. John SW, Weitzner G, Rozen R, Scriver CR. (1991). **A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes**. Nucleic Acid Research: 19(2):408.
22. Johnston, SD. (1985). **X trisomy in an airedale bitch with ovarian dysplasia and primary anestrous**. Theriogenology: 24:597- 607.
23. Kennedy P, Miller RB. (1993): **The female genital system**, en: Jubb K.V.F. Kennedy P.C., Palmer N., Pathology of Domestic Animals, 4th ed, Academic Press Inc., San Diego, California, pp 348–357.
24. Kim KS, Kim O. (2006). **A hermaphrodite dog with bilateral ovotestes and pyometra**. Journal of Veterinary Science: 7(1):87–88.
25. Koopman, P. (1999). **Sry and Sox9: Mammalian Testis-determining Genes**. Cellular and Molecular Life Sciences: 55:839-856.
26. Landarte, A. (2006). **El Cimarrón pasó a ser una de las siete razas nacionales en Latinoamérica**. Mascotas Show Magazines, depósito legal 160.561, año dos N ° V:12-13.
27. Llambí S, Separovich MJ, Fernández G, Arruga MV. (2004). **Primeros estudios moleculares en el perro Cimarrón del Uruguay**. Veterinaria, Montevideo: 39:65 –68.
28. Llambí S, Separovich MJ, Silveira C, Fernández G. (2002). **Primeros estudios con marcadores moleculares en el Perro Cimarrón del Uruguay**. III Simposio Iberoamericano sobre la Conservación de los Recursos Zoogenéticos Locales y el Desarrollo Rural Sostenible. Montevideo. Sección I, p I.7. Dep. Legal. 323.203.
29. Lofstedt RM, Buoen LC, Weber AF. (1992). **Prolonged proestrus in a bitch with X chromosomal monosomy (77, XO)**. Journal of the American Veterinary Medical Association: 200:1104-1106.
30. Manolakou P, Lavranos G, Angelopoulou R. (2006). **Molecular patterns of sex determination in the animal kingdom: A comparative study of the biology of reproduction**. Reproductive Biology and Endocrinology: 4(59):1-23.
31. Memon M, Tibary A. (2001). **Canine and feline cryptorchidism. Recent advances in small animal reproduction**. Disponible en: www.ivis.org. Consultado el: 5/7/2007.
32. Meyers-Wallen, VN. (2003). **Ethics and genetic selection in purebred dogs**. Reproduction in Domestic Animals: 38:73–76.
33. Meyers-Wallen, VN. (2000). **CVT update: Inherited disorders of the reproductive tract in dogs and cats**, en: Kirk RW, Bonagura JD eds. Current Veterinary Therapy XIII, Philadelphia, WB Saunders Co, pp 904-909.
34. Meyers-Wallen VN, Schlafer D, Barr I. (1999). **Sry-negative XX sex reversal in purebred dogs**. Molecular Reproduction and Development: 53:266-273.

35. Meyers-Wallen VN, Bowman L, Acland GM. (1995). ***Sry-negative XX sex reversal in the German Shorthaired Pointer dog.*** Journal of Heredity: 86:369-374.
36. Meyers-Wallen VN, Lee MM, Manganaro TF. (1993). ***Mullerian inhibiting substance is present in embryonic testes of dogs with persistent mullerian duct syndrome.*** Biology of Reproduction: 48: 1410 -1418.
37. Meyers-Wallen VN, Manganaro TF, Kuroda T. (1991). ***The critical period for mullerian duct regression in the dog embryo.*** Biology of Reproduction: 45:626 -633.
38. Meyers-Wallen VN, Donahoe PK Ueno S, Manganaro TF, Patterson DF. (1989). ***Mullerian inhibiting substance is present in testes of dogs with persistent müllerian duct syndrome.*** Biology of Reproduction: 41:881-888.
39. Meyers-Wallen VN, Patterson DF (1989a). ***Disorders of sexual development in dogs and cats,*** en: Kirk RW, ed. Current Veterinary Therapy X, Philadelphia, WB Saunders Co., pp 1261-1269.
40. Meyers-Wallen VN, Patterson DF (1989b). ***Sexual differentiation and inherited disorders of sexual development in de dog.*** Journal of reproduction and fertility: 39:57– 64.
41. Meyers-Wallen VN, Wilson JD, Griffin JE. (1989). ***Testicular feminization in a cat.*** Journal of American Veterinary Medical Association: 195:631-634.
42. Meyers-Wallen VN, Patterson DF. (1986). ***Disorders of sexual development in the dog,*** en: Morrow DA ed. Current Therapy in Theriogenology, 2nd ed, Philadelphia, WB Saunders Co., pp 567-574.
43. Moorhead M, Nowell P, Mellman J, Battips D, Hunyerford D. (1960). ***Chromosome preparations of leucocytes cultured in human peripheral blood.*** Experimental Cell Research: 20:613-616.
44. Morera Sanz L, de Andrés D, Barbancho J, GarridoJ, Barba C. (1999). ***Detección de variabilidad genética por microsatélites en el Alano Español.*** Archivos de Zootecnia: 48:72-77.
45. Morera L, Barba C, Garrido J. (2001). ***Detección de variabilidad en razas caninas qutóctonas españolas mediante marcadores RAPD.*** Archivos de Zootecnia: 50:379–382.
46. Nei M. (1972). ***Genetic distance between populations.*** American Naturalist: 106:283-292.
47. Nelson RW y Couto CG. (2005). ***Medicina interna de animales pequeños.*** 3ª edición. Buenos Aires, Inter-médica, Volumen 2, 912p.
48. Noden DM y De Lahunta A. (1990). ***Embriología de los animales domésticos.*** Zaragoza, España, Acribia, 399p.
49. Olivier M, Meehl M, Lust G. (1999). ***Random amplified polymorphic DNA (RAPD) sequences as markers for canine genetic studies.*** Journal of Heredity: 90:78– 82.
50. Ortiz Suárez, N. (2003). ***Criptorquidia en perros y gatos.*** Disponible en: www.uco.es. Consultado el: 20/12/2006.
51. Ostrander EA, Galibert F, Patterson DF. (2000). ***Canine genetics comes of age.*** Trends in Genetics: 16:117-124.

52. Patterson DF, Aguirre GA, Fyfe JC, Giger U, Green PL, Haskins ME, Jezyk PF, Meyers-Wallen VN. (1989). ***Is this a genetic disease?*** Journal of Small Animal Practice: 30:127–139.
53. Patterson DF. (2000). ***Companion animal medicine in the age of medical genetics.*** Journal of Veterinary Internal Medicine: 14: 1-9.
54. Picca A, Helguera M, Salomón N, Carrera A. (2004). ***Marcadores moleculares.*** Biotecnología y Mejoramiento vegetal. INTA, Buenos Aires, Argentina: 61-68.
55. Rincón G, Dangelo M, Gagliardi R, Kelly L, Llambí S, Postiglioni A. (2000). ***Genomic polymorphism in Uruguayan Cróele cattle using RAPD and microsatellite markers.*** Research in Veterinary Science: 69:171–174.
56. Sargan DR. (2004). ***Inherited diseases in dog.*** Mammalian Genome: 15:503-506.
57. Silva Valdés, J. (1957). ***Los perros cimarrones.*** Almanaque del Banco de Seguros del Estado, Montevideo, 256p.
58. Silveira C, Fernández G, Barba C. (2002). ***Primeros datos de la caracterización etnológica del perro Cimarrón.*** Archivos de Zootecnia: 51:223–228.
59. Silveira C, Fernández G, Barba C. (1998a). ***El perro cimarrón, la raza canina autóctona del Uruguay.*** Archivos de Zootecnia: 47:533–536.
60. Silveira C, Mernies B, Fernández G, Barba C. (1998b). ***Estudio biométrico de una población canina de la raza Cimarrón.*** Archivos de Zootecnia: 47:529-532.
61. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths B, Smith M, Foster J, Frischauf AM, Lovell Badge R, Good Fellow PN. (1990). ***A gene from the Human sex-determining region encodes a portion with homology to a conserved DNA-binding modification.*** Nature: 346:240–244.
62. Sommmmer MM, Meyers-Wallen VN. (1991). ***XX true hermaphroditims in a dog.*** Journal of American Veterinary Medical Association:178(3): 435–438.
63. Soto Huipe M, Zavala Páramo G, Cano Camacho H, Lopéz Mesa J. (2002). ***Analisis de dos poblaciones de gallinas Criollas (Gallus domesticus) Utilizando RAPD's como marcadores moleculares.*** Técnica Pecuaria en México: 40(3):275-283.
64. Stepniak E, Zagalska M, Switonski M. (2002). ***Use of RAPD Technique in Evolution Studies of tour Species in the Family Canidae.*** Journal of Applied Genetics: 43(4): 489-499.
65. Switonski M, Szczerbal I, Nowacka J. (2004). ***The dog genome map and its use in mammalian comparative genomic.*** Journal of Applied Genetics: 45(2):195 -214.
66. Volpe P, Izzo B, Pia Di Meo G, Perucatti A, Iannuzzi L. (2000). ***Male pseudo-hermaphroditism in a dog: a clinical case.*** Veterinary Record: 146:532-533.
67. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. (1991). ***Chelex 100 as a médium for simple extraction of DNA PCR-based typing from forensic material.*** Biotechniques: 10(4):506-513.

68. Williams JGK, Kubelik AR, Livak JJ, Rafalski JA, Tingey SV. (1986). ***DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.*** Nucleic Acids Research: 18(22):6531-6535.
69. Xena de Enrech, N. (2000). ***Una década de aplicaciones del método RAPD: Alcances y límites en el estudio de relaciones genéticas en plantas.*** Acta Científica Venezolana: 51:197-206.
70. Yates D, Hayes G, Heffernan M, Beynon R. (2003). ***Incidence of cryptorchidism in dogs and cats.*** Veterinary Records: 152(16):502-504.
71. Yeh FC, Yang R, Boyle TJ, Ye Z, Xiyun JM. (2000). ***Pop gene 32, Microsoft Windows-Based freeware for population genetic analysis, version 1.32.*** Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.