

**UNIVERSIDAD DE CORDOBA**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS  
AGRÓNOMOS Y DE MONTES**

**“CARACTERIZACIÓN CITOGENÉTICA DEL GANADO  
BOVINO CRIOLLO ARGENTINO”  
(Bos taurus, L.)**

**D. Enrique Ruben Genero  
Cordoba, 2001.**

**INDICE**

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>7</b>
<b>III: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>11</b>
<b>1.- EL ganado bovino criollo</b>	<b>13</b>
1.1.- Origen y difusión del ganado bovino criollo	13
1.2.- El bovino criollo Argentino	16
1.2.1.- Características externas	16
1.2.2.- Pelaje del bovino criollo	18
1.3.- El bovino criollo patagónico	19
<b>2.- El cromosoma metafásico eucariótico en los mamíferos</b>	<b>21</b>
2.1.- Los cromosomas fijados sin tratamiento de pretinción	21
2.1.1.- La tinción con Giemsa	21
2.1.2.- Las tinciones fluorescentes	21
2.2.- Estudios cromosómicos con tratamiento de pretinción	22
2.2.1.- El bandeo C	22
2.2.2.- El bandeo G	23
2.2.3.- El bandeo reverso o bandeo R	25
2.2.4.- Detección de estructuras específicas, “bandeo” NOR	25
2.3.- Nomenclatura de los métodos de bandeo	26
<b>3.- Los cromosomas en los bóvidos</b>	<b>27</b>
3.1.- El cariotipo normal	27
3.2.- Alteraciones del cariotipo	28
3.3.- Polimorfismo cromosómico	31
<b>4.- Los cromosomas tratados con endonucleasas de restricción</b>	<b>32</b>
4.1.- Tipos de endonucleasas de restricción	32
4.2.- Empleo de endonucleasas de restricción en estudios citogenéticos	33
4.3.- Factores determinantes de la acción de las endonucleasas	34
4.3.1.- Influencia de las condiciones experimentales en el bandeo con enzimas de restricción	34
4.3.2.- Frecuencia y tamaño de la diana de restricción de las endonucleasas	35
4.4.- Método de preparación y fijación	36
<b>IV. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>39</b>
<b>1.- Material</b>	<b>41</b>
1.1.- Material biológico	41
1.2.- Material instrumental	41

1.2.1.-Cultivo celular	41
a) Reactivos	42
b) Aparataje	42
c) Material de laboratorio	42
1.2.2.-Análisis cromosómico	43
a) Reactivos.	43
b) Aparatos ópticos	43
1.2.3.-Medio de cultivo, soluciones, tampones y mezclas de reacción	43
a) Medio de cultivo sintético	44
b) Solución mitogénica	44
c) Antibióticos	44
d) Inhibidor mitótico	44
e) Solución hipotónica	44
f) Solución de fijación	45
g) Solución tampón fosfato	45
h) Solución de tripsina	45
i) Solución de tinción de Giemsa	45
j) Soluciones para bandeo C	45
k) Solución para bandeo NOR	46
l) Soluciones para bandeo secuencial R-NOR	46
m) Soluciones para Intercambios de Cromátidas Hermanas	46
n) Solución de reacción con Endonucleasas de Restricción	47
o) Soluciones tampón de incubación específicos de las endonucleasas para una actividad del 100%	47
1.2.4.-Suplemento para los medios	47
a) Suero fetal bovino	47
b) Plasma autólogo	48
<b>2.-Métodos</b>	<b>49</b>
2.1.-Toma de muestras sanguíneas	49
2.1.1.-Condiciones de la toma de sangre	49
2.1.2.-Condiciones del transporte	49
2.2.-Preparación del cultivo celular	50
2.3.-Procedimiento de cosecha del cultivo	50
a) Detención de las divisiones mitóticas	50
b) Tratamiento de las células	50
2.4.-Técnica de bandeo	51
2.4.1.-Bandeo G	51
2.4.2.-Bandeo C	52
2.4.3.-Bandeo NOR	52
2.4.4.-Bandeo Secuencial R-NOR	53
2.4.5.-Intercambios de Cromátidas Hermanas	54
2.4.6.-Técnica de digestion de las endonucleasas de restricción	55
2.4.7.-Técnica secuencial Hinf I-C	56

2.5.-Preparación de cariotipos	57
2.5.1.-Técnica de observación	57
2.6.-Técnica de medida de los cromosomas	58
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>61</b>
<b>1.-Medidas cromosómicas</b>	<b>63</b>
1.1.-Longitudes relativas medias de los diferentes pares cromosómicos	63
1.2.-Índice centromérico y Razón entre brazos	64
 <b>2.-Identificación cromosómica</b>	 <b>65</b>
2.1.-Bandeo GTG	65
2.2.-Bandeo CTG	65
2.3.-Localización de las regiones organizadoras nucleolares	65
2.4.-Intercambios de cromatidas hermanas (SCE)	66
 <b>3.-Bandeos inducidos por las endonucleasas de restricción sobre cromosomas fijados de bovino criollo patagónico</b>	 <b>67</b>
3.1.-Modelos de bandeo inducidos por digestión de los cromosomas fijados con endonucleasas de restricción	69
3.1.1.-Modelo de bandeo inducido por Alu I (5'..GA↓CT..3')	69
3.1.2.-Modelo de bandeo inducido por Hae III (5'..GG↓CC..3')	71
3.2.-Heterogeneidad de la heterocromatina	73
 <b>4.-Anomalías cromosómicas.</b>	 <b>74</b>
4.1.-Translocación robertsoniana 1/29	74
4.2.-Polimorfismo cromosómico	74
<b>VI. TABLAS Y FIGURAS</b>	<b>77</b>
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	<b>125</b>
<b>1.-Medidas cromosómicas</b>	<b>127</b>
1.1.-Longitudes relativas medias de los diferentes pares cromosómicos	127
 <b>2.-La distribución cromosómica de los diferentes patrones de bandeos clásicos en bovinos criollos patagónicos esta conservada</b>	 <b>128</b>
2.1.-La localización de las bandas C fue centromérica	129
2.2.-Bandeo GTG	130
2.3.-Bandeo secuencial R-NOR	131
2.4.-Intercambios de cromatidas hermanas (SCE)	132

<b>3.-Susceptibilidad de la cromatina a las endonucleasas de restricción en cromosomas fijados de bovino</b>	<b>134</b>
<b>4.-Respuesta de los NOR a las endonucleasas de restricción</b>	<b>139</b>
<b>5.-Anomalías cromosómicas</b>	<b>140</b>
5.1.-La translocación 1/29	140
5.2.-Polimorfismo cromosómico	142
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	<b>145</b>
<b>IX. RESUMEN</b>	<b>149</b>
<b>X. SUMMARY</b>	<b>153</b>
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>157</b>

## **I. INTRODUCCIÓN**

El desarrollo y aplicación en los últimos años de la citogenética en animales domésticos de interés zootécnico, han conducido a la descripción y conocimiento de sus cromosomas desde el más amplio espectro. Los estudios han abarcado desde la identificación del número modal de la especie en cuestión, hasta, y aquí se une el campo de la citogenética con el de la genética molecular y la bioquímica, el conocimiento y localización de los genes sobre los cromosomas, lo que se denomina “mapeo genético”. No hay que olvidar que uno de los aspectos más trascendentales de cara al propio animal, y por supuesto de cara a la Producción Animal, han sido los estudios conducentes a analizar la

incidencia y los efectos de los cambios cromosómicos, tanto numéricos como estructurales, que pueden tener lugar en animales domésticos, y más concretamente en el ganado vacuno.

Desde que en 1964 **Gustavsson** y **Rockborn** describieron por primera vez una alteración cromosómica en el ganado vacuno, la Translocación Robertsoniana 1/29, encontrada en animales de la raza Blanca y Roja Sueca, ha podido observarse posteriormente, por muy diversos autores, en prácticamente todas las razas de la especie bovina (*Bos taurus*, L.) y en los cinco continentes (**Popescu 1980**). Estudios posteriores del propio **Gustavsson** (**Gustavsson,**



1969) entre otros, pusieron de relieve que ésta anomalía cromosómica, en estado heterocigotico, producía un efecto deletéreo en las hembras portadoras, hijas a su vez de un padre portador, cual era el de una sensible reducción de fertilidad. Al margen de éste efecto productivo, el estudio de ésta alteración permitió conocer mejor diversos aspectos del comportamiento cromosómico, sobre todo a nivel de proceso meiótico y de obtención de embriones.

En la República Argentina existe una raza de ganado vacuno que se puede decir autóctona y originada como consecuencia de los animales traídos en los primeros años posteriores al Descubrimiento. Esta raza, por tanto, se encuentra formada por animales del tronco Europeo y pertenecientes pues a la especie *Bos taurus* (L). Al igual que ocurre con otras tantas razas

existentes a lo largo del subcontinente Americano, recibe el nombre de raza Criolla, en este caso Criolla Argentina. Dentro de la misma existe un grupo poblacional reducido y asilvestrado, localizado en el Sur del país y que podríamos denominar ganado bovino Criollo Argentino biotipo Patagónico. Estos animales poseen características únicas que lo diferencian del resto de los bovinos Criollos existentes en la República Argentina, ya que se encuentran perfectamente adaptados al medio, una región con un clima muy frío y extremadamente riguroso. Además se entienden como los únicos descendientes directos del ya extinto ganado bovino Criollo Pampeano, y que por razones de aislamiento geográficas se han mantenido aislados de otras razas. Estas características hacen que sea muy importante la conservación y mejora de ésta

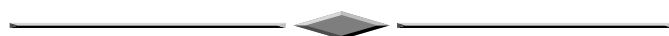
población, justificadas por razones de muy diversa índole, como pueden ser razones de tipo científico, cultural, histórico y presumiblemente económico.

No debemos olvidar que de cara al establecimiento de un plan de conservación y de mejora genética de éste grupo poblacional, es indiscutible la necesidad de la realización de los estudios citogenéticos, por una parte para conocimiento, en sentido estrictamente científico, de las características cromosómicas de éstos animales y por otra parte, y no menos importante, la detección de individuos portadores de alteraciones cromosómicas.

Para el estudio de los cromosomas de ésta raza, hemos utilizado no solamente las técnicas habituales en Citogenética Animal sino que se han analizado los mismos bajo la óptica de otras técnicas

en genética, técnicas de genética molecular. Así se han evaluado los resultados del uso, para la obtención de bandeos cromosómicos, de distintas Enzimas de Restricción o Endonucleasas de Restricción. Los primeros estudios con éstas enzimas se basaron en el análisis de ADN aislado previamente, siendo usadas por primera vez en cromosoma fijados por **Sahasrabudde y Col.** en 1978. Posteriormente **Lima de Faria y col. (1980)** hicieron uso de alguna de ellas para analizar cromosomas de *Muntiacus muntjak*, en los que observaron un cierto bandeo, lo que demostró que éstas enzimas podían escindir la molécula de ADN cromosómica y producir una diferenciación lineal en el cromosoma ya fijado. Nuestro interés en ésta tecnología estriba precisamente en poner de relieve y discutir la posibilidad de utilización de

estas enzimas con unos resultados que, en algunas de ellas, podrían ser equiparables a los de las técnicas habituales.



## **II. OBJETIVOS**

Los objetivos planteados en la presente tesis doctoral han sido:

1.-Contribuir al conocimiento de las características cromosómicas del ganado bovino, particularmente el ganado bovino Criollo Argentino Biotipo Patagónico (*Bos taurus*, L.).

2.-Analizar los cromosomas de ésta raza para detectar la presencia de posibles anomalías cromosómicas, identificando, en su caso, los cromosomas implicados en los cambios cromosómicos.

3.- Evaluar y discutir la incidencia de las anomalías cromosómicas tanto numéricas como estructurales que pudieran aparecer.

4.- Aplicar técnicas de genética molecular para la obtención de diferenciación cromosómica, evaluando la utilización de algunas enzimas de restricción como metodología para el estudio del cromosoma bovino.

### **III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## 1. EL GANADO BOVINO CRIOLLO

### 1.1.- ORIGEN Y DIFUSIÓN DEL GANADO BOVINO CRIOLLO.

La historia del vacuno criollo comenzó en el año 1493, cuando Colón trajo los primeros ejemplares vacunos de España a la isla La Española (la actual Santo Domingo). Es lógico suponer que los animales se compraron cerca de los puertos de Andalucía y también en las Islas Canarias, donde habían sido llevados hacía dos décadas desde esos mismos puertos. El historiador **Gonzalo Hernández de Oviedo**, escribió en 1535 que los animales que se embarcaban para América provenían de aquellos lugares.

Según **John Rouse** (1977), las razas bovinas

españolas de las que pueden descender los bovinos criollos americanos pueden ser las actuales Andaluza Negra, Retinta, Berrenda y Cacerreña. Si bien no se conocen descripciones más exactas de las razas traídas a América, parece más probable que hayan predominado las dos primeras, pues las dos últimas tienen pelaje mayormente blanco y en las que se trajeron predominaban las hoscas y doradillas. Todas estas razas se han criado en España desde tiempo inmemorial para la producción de carne en forma extensiva. La raza Retinta es conocida como “el vacuno de la España seca”, por su adaptación a ambientes rigurosos.

**Carrazzoni (1998)** cita al historiador **Edmundo Wernicke**, como el que, después de investigar los Archivos de Indias, sostuvo que las razas que se trajeron mayoritariamente fueron las Andaluzas y las Portuguesas. Hay que recordar que la raza Berrenda en Negro y la raza Aracena de Portugal descienden de un mismo tronco conocido como la raza Berrenda Ibérica. En cuanto a la raza Retinta, su cría se hacía, y se hace, mayormente en el sudoeste de España, sobre el límite con Portugal, por lo que está íntimamente relacionada con las razas Portuguesas.

Por otra parte, según **Inchausti y Tagle (1946)**, las razas que más contribuyeron a formar el vacuno criollo fueron las Andaluzas.

En definitiva todas las razas Ibéricas hasta aquí citadas fueron las que se

trajeron mayoritariamente al Nuevo Mundo y de sus cruzamientos se originó la raza bovina Criolla.

La primera difusión de los animales llegados de España, se produjo en las islas Grandes Antillas: La Española; Puerto Rico, Jamaica y Cuba, cronológicamente en ese orden; pasando luego al continente, siendo Panamá el primer lugar de desembarco, allá por el año 1513 aproximadamente.

Con los vacunos provenientes de La Española y Cuba se pobló Méjico a partir de 1521 y de allí fueron llevados a Estados Unidos, donde con el tiempo dieron lugar a la raza Longhorn actual. El ganado Criollo Argentino, en cambio, proviene del ganado que fue llevado a Panamá y que posteriormente se difundió por Perú, Chile y Bolivia. Hay



suficientes pruebas genéticas, tanto de grupos sanguíneos como de pelajes, que demuestran que todos los bovinos Criollos de las Américas se encuentran emparentados, lo que pone de relieve fehacientemente su mismo origen.

El número total de animales vivos llevados a América no se conoce, pues no todos llegaban a desembarcar. Unos morían por diversas causas y se arrojaban al mar; otros eran sacrificados para servir de alimento o bien morían por falta de agua. Por todo ello, se calcula que fueron menos de mil cabezas las que llegaron al Continente Americano.

Luego de la conquista del Imperio Inca, los Españoles comenzaron a difundir sus ganados con sus expediciones hacia el Sur. Desde Lima partieron los conquistadores llevando ganado vacuno hacia

Chile, Bolivia, Paraguay y el Norte Argentino, donde, procedentes de Potosí, llegaron a Tucuman en **1549** con **Juan Nuñez del Prado**. Poco tiempo después arribarían también desde Chile con el fundador de Santiago del Estero, **Don Francisco de Aguirre**.

En **1555** los hermanos **Goes** arrearon desde Brasil siete vacas y un toro, que fueron los primeros vacunos que llegaron a Asunción (Paraguay), de donde también con el tiempo algunos descendientes poblarían el Nordeste de Argentina.

En **1568 Felipe de Cáceres** y **Juan de Garay** llevaron desde Santa Cruz de la Sierra (Bolivia) varios cientos de animales al Paraguay. Casi con seguridad que muchos hijos de estos animales fueron los que posteriormente arrearía el mismo **Juan de Garay** en **1573** y **1580**, para la fundación

de Santa Fe y Santa María de los Buenos Aires. Finalmente algunos animales arribaron al Río de la Plata en viajes desde España, con escala en las Canarias y a veces en Brasil.

Es indudable que la mayor parte de los bovinos que fueron poblando Argentina fueron descendientes de los miles de cabezas que se trajeron de Bolivia, Chile, y de los que llegaron a Asunción desde las poblaciones del Alto Perú, aclaración que cabe hacer porque algunos autores sostuvieron equivocadamente a fines del siglo pasado, que la ganadería Argentina provenía de las vacas y el toro de los hermanos Goes, que podían tener sangre de razas holandesas.

Los animales de todos estos orígenes conformaron el gran rebaño que se diseminaría desde Jujuy (Norte de Argentina) hasta el río

Colorado (Centro-Sur de Argentina) (Carrazzoni 1998).

## **1.2.- EL BOVINO CRIOLLO ARGENTINO**

Definimos de esta manera a los animales que descenden, en forma pura y directa, de aquellos que trajeron los Españoles a América en la época Colonial. Esta población presenta características morfológicas, genéticas y de comportamiento que le son propias y permiten definirla como una raza.

### **1.2.1.- CARACTERÍSTICAS EXTERNAS**

El ganado bovino Criollo Argentino se caracteriza por ser un animal anguloso, longilíneo y descarnado, respondiendo su apariencia más al del ganado de tipo lechero. La línea dorso-

lumbar se presenta, en general, ligeramente deprimida. La grupa tiene una inserción de cola saliente y alta, algo adelantada y oblicua. La cola es larga, no demasiado gruesa y móvil, siendo muy característico que la misma repose sobre la grupa del animal. La cabeza es larga en la hembra y algo mas corta en el macho. Los cuernos nacen en la misma línea de prolongación de la nuca, dirigidos horizontalmente en la base, después hacia delante y arriba.

La vaca Criolla es de tamaño mediano, con un peso adulto que oscila alrededor de los 420 kilogramos. Con una ubre de mediano desarrollo y bien conformada y con pezones medianos; la producción de leche es de unos 5 litros diarios. Alcanza una edad media elevada.

La vaca Criolla no presenta dificultades al parto,

resultando el ternero más bien pequeño y longilíneo en su conformación. La aptitud materna es buena, siendo la mortalidad predestete muy baja, inferior al 3% (**Holgado y col. 1988**).

El toro Criollo es grande con relación a la vaca, pesando entre 600 y 800 kilogramos. Es naturalmente mucho más musculoso.

La característica más destacable desde el punto de vista del comportamiento, es su extrema mansedumbre, lo que posibilita el manejo en determinadas condiciones de explotación. Posee una gran capacidad de desplazamiento lo que permite utilizar amplias áreas de pastoreo.

El toro arrea las hembras durante el servicio, manteniendo unidades reproductivas, lo que puede resultar extremadamente importante en campos grandes con monte y/o serranías.

### **1.2.2.-PELAJE DEL BOVINO CRIOLLO**

En la raza bovina Criolla existen, en apariencia, todos los colores de capa presentes en *Bos taurus* (L.). Esto no resulta sorprendente si se piensa que se trata en buena medida de una raza natural; pero no se podría considerar como una población silvestre ya que este tipo de poblaciones tienen habitualmente una gran uniformidad en los colores de la capa. Tal vez la mejor interpretación sea que esta raza es claramente doméstica, lo cual se evidencia por su mansedumbre y su adaptación a vivir con el hombre.

El color del pelaje, en bovinos, viene determinado básicamente por los pigmentos negro y colorado, que unidos a la falta de pigmentación da el blanco y modificados por una serie de factores de extensión, restricción, distribución,

intensidad y dilución, determinan la variación de las distintas capas en el bovino, y particularmente en el ganado Criollo.

Los genes responsables fueron descritos en otras razas e históricamente se viene usando la nomenclatura propuesta por **Ibsen (1933)**. Estos genes, en el ganado bovino Criollo, son, básicamente, los que controlan las capas coloradas (gen R), capas negras (gen B), capas blancas (gen N), apareciendo otras muy diversas capas en sus interacciones con genes modificadores, con el ambiente, la edad y el sexo (**Rabasa, 1976**).

### **1.3.-EL GANADO BOVINO CRIOLLO PATAGONICO**

**Rodríguez C.A. y col. (1989)**, hallaron en un sector

del Parque Nacional Los Glaciares, ubicado en el Sudoeste de la provincia de Santa Cruz, una población asilvestrada de bovinos Criollos. No existían hasta esa fecha indicios de la existencia de bovinos Criollos en estado de pureza racial en ninguna de las provincias Patagónicas.

Estos bovinos asilvestrados, que deben ser capturados por personal entrenado, presentan la particularidad de haber permanecido desde principios de siglo en un sector del Parque Nacional Los Glaciares totalmente cerrado por barreras naturales, que no permite el ingreso y/o egreso de animales de otras razas.

Esta población posee dos características únicas que lo diferencian del resto de los bovinos Criollos existentes en la Argentina. Por un lado son los únicos descendientes directos del Criollo Pampeano,

ya extinguido, y por otro se han adaptado a una región con un clima más frío. Estas dos características son las que le hacen merecedor de un Plan de Mejora y Conservación **(Rodríguez C.A y Martínez R.D 1992)**.

Debido a la importancia que tiene este grupo poblacional, se está llevando a cabo un plan de conservación (in-situ y ex-situ) de este Biotipo, a través de un convenio firmado entre la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora y la Administración de Parques Nacionales. La conservación in-situ, consiste básicamente en la formación de planteles. En la actualidad hay dos funcionando, uno en su lugar de origen y otro en el campo experimental de La Lomada en plena zona pampeana, cerca de la propia Facultad, y formado en 1996. Ambos planteles se

encuentran bajo la dirección técnica de la Cátedra de Genética Animal de la Facultad (**Martínez y col. En prensa**).

Para la conservación ex-situ se está desarrollando un banco de germoplasma (semen y embriones congelados) que funciona en el Campo Experimental de la Facultad.

Desde el punto de vista productivo el ganado vacuno Criollo de Biotipo Patagónico, presenta algunas características particulares que le hacen merecedor de un análisis algo más detallado.

Por una parte la facilidad al primer parto de vacas Hereford cruzadas con Criollo Patagónico en relación a las cruzadas con toros

también Hereford. De manera significativa, se ha evidenciado una reducción de partos distócicos y de la mortalidad perinatal (**Martínez R.D. y Rodríguez C.A. 1995**).

Por otra parte los animales Criollo Biotipo Patagónico presentan una mayor deposición de grasa corporal en relación a animales Criollos de otro origen, como son los localizados en el noroeste del país. La grasa está relacionada con el metabolismo energético (mantenimiento, producción y equilibrio térmico), por lo tanto es probable que se modifique la cantidad y la distribución de la grasa corporal en relación con la adaptación a los diferentes climas.

## 2. EL CROMOSOMA METAFÁSICO EUCARIÓTICO EN LOS MAMÍFEROS

### 2.1.- LOS CROMOSOMAS FIJADOS SIN TRATAMIENTO DE PRETINCIÓN

#### 2.1.1.- LA TINCIÓN CON GIEMSA

Una vez que los cromosomas se encuentran sobre el portaobjeto, pueden examinarse por diferentes técnicas. Así, si excluimos el contraste de fases de cromosomas no teñidos, el recuento cromosómico, la observación de puntos frágiles sobre los cromosomas e incluso el análisis de la heterocromatina se efectúa, con frecuencia, por medio de la tinción con colorantes como el Giemsa (Halnan, 1989). Este colorante tiñe, en circunstancias normales, uniformemente a los cromosomas sin especificidad

sobre el ADN cromosómico (Mac Gregor, H.C. y J. Varley 1983).

#### 2.1.2.- LAS TINCIONES FLUORESCENTES

La técnica de bandeo fluorescente con quinacrina (bando Q) u otras sustancias afines inducen un modelo de bandas constantes y reproducibles, características de cada pareja (Marki, U. y D.R. Osterhoff 1985).

Los factores principales implicados en la producción de bandas de los cromosomas teñidos con quinacrina son: la distribución de pares de bases A-T y pares de bases G-C en el ADN (Pachmann U. y R: Rigler 1972), las proteínas cromosómicas, principalmente no histónicas (Marki, U. y D.R. Osterhoff 1985), que

reducen la afinidad y la cantidad límite de colorante que puede unirse a una cantidad fija de ADN y las fluctuaciones en la concentración de ADN a lo largo del cromosoma (**Caspersson, T. y col. 1971**).

Sin embargo, aunque las bandas Q son equivalentes a otros tipos de bandas (bandas G), no están recomendadas para el estudio del bandeo de los cromosomas vacunos por tener una baja resolución (**Gustavsson, I. y col. 1976**).

## **2.2.-ESTUDIOS CROMOSÓMICOS CON TRATAMIENTO DE PRETINCIÓN**

### **2.2.1- EL BANDEO C**

Las bandas obtenidas con este tratamiento se ajustan a la definición clásica de

heterocromatina constitutiva (**Arreghi, F.E. y T.C. Hsu 1971**), detectándose en los cromosomas de todos los organismos donde han intentado demostrarse, aunque su número varía enormemente entre las poblaciones estudiadas.

Este bandeo se consigue por una extensa desnaturalización del ADN, seguida de renaturalización selectiva de las secuencias repetitivas existentes en las regiones teñidas (**Arrighi, F.e. y T.C. Hsu 1971; Hsu, T.C. y F.e. Arrighi 1971**).

Ello fue puesto de manifiesto a través de diferentes caminos, bien por los resultados de hibridación in situ (**Pardue, M.L. y J. Gall 1970**), bien mediante la reacción de los cromosomas a anticuerpos específicos del ADN desnaturalizado (**Dev, V.G. y col. 1972**), o bien por



los análisis de microscopía electrónica que han indicado que la cromatina se pierde en áreas de bandas C negativas (**Latt, S.A. 1976**).

Sin embargo, no parece existir una relación firme entre el grado de condensación de los bloques de ADN y su capacidad de producir bandas C, y aunque se tiñe perfectamente ADN satélite no lo hace con exclusividad (**Mac Gregor, H.C. y J. Varley 1983**). En algunas especies, las bandas C pueden contener más de una secuencia satélite que, posiblemente, también estén dispersas en el ADN eucromático, como se ha demostrado en el hombre, primates y otros animales domésticos (**Gosden, J.R. y col. 1975; Gosden, J.R. y col. 1977**).

### 2.2.2.- EL BANDEO G

Poco después de la aparición de las técnicas de bandas C, se comunicó una técnica que proporcionaba una distribución más detallada de bandas que se denominaron bandas G (**Schnedl, W. 1971; Drets, M.E. y M.W. Saw 1971; Sumner, A.T. y col. 1971**).

Para describir los mecanismos de producción de estas bandas se han emitido diferentes hipótesis:

1.-Los tratamientos que inducen bandas G no originan pérdidas significativas de la cromatina cromosómica (**Comings, D.E. y col. 1973**), al contrario que lo que ocurre por ejemplo con el bandeo C. En este mismo sentido, **Sumner y Evans (1973)** no observaron relación alguna entre cantidad de ADN que permanece sobre el cromosoma y el patrón de bandas.

2.-**Latt, S.A. (1976)** observó que las bandas G pueden ser producidas mediante la pre-incubación de los cromosomas a una temperatura suficientemente alta como para producir la renaturalización de secuencias ricas en A-T. Además, existen evidencias de que en las bandas G positivas se encuentran localizadas preferentemente secuencias repetitivas (**Pierpont, M.E. y J.J. Yunis 1977; Yunis, J.J. y col. 1977**), mientras que las secuencias que codifican para ARNm citoplasmático están predominantemente localizadas en las bandas G negativas. Esto podría explicar las diferencias en la composición de proteínas entre bandas claras y oscuras, pero esto no ha sido totalmente aclarado (**Mac Gregor, H.C. y J. Varley 1983**).

3.-Se ha postulado que las proteínas implicadas en las bandas G son proteínas no

histónicas (**Comings, D.E. y col. 1973**), ya que los cromosomas fijados han perdido las histonas y, además, si se eliminan completamente con HCl 0,2 N, aún pueden obtenerse bandas G (**Comings, D.E. y col. 1973; Sumner, A.T. y col. 1973**). Por esto las proteínas histónicas podrían jugar un papel clave en las estructuras de las subunidades cromosómicas en solución, mientras que las no histónicas se deberían considerar como las mayores determinantes en la estructura bandeada de los cromosomas fijados (**Latt, S.A. 1976**).

4.-Se ha determinado mediante autoradiografía (**Garnner, E. y H.J. Evans 1971**) y mediante la incorporación de un análogo de la timina, la 5-bromodeoxiuridina (BrdU), que las bandas G positivas corresponden a las regiones de replicación tardía de los

cromosomas (**Crossen, P.E. y Col. 1975; Dutrillaux, B. 1975; Kim, M.A. y col. 1975**).

### **2.2.3.- EL BANDEO REVERSO O BANDEO R**

Otra manera de enfocar el análisis de la naturaleza del bandeo G, ha sido la observación de los cromosomas a partir de una serie de tratamientos, que han dado como consecuencia un patrón de bandas “reverso” del patrón G (**Latt, S.A. 1976**). Este bandeo reverso, denominado bandeo R, fue descrito por **Dutrillaux y Lejeune (1975)**, y sugirieron que las divisiones de los cromosomas metafásicos pueden ser invariantes, dado que las regiones así definidas pueden estar diferencialmente afectadas por los tratamientos particulares.

### **2.2.4.- DETECCIÓN DE ESTRUCTURAS ESPECÍFICAS, “BANDEO” NOR**

**Goodpasture y Bloom (1975)** describieron el método de tinción con plata para las Regiones del Organizador Nucleolar (NOR). Este método se ha empleado para investigar y delimitar la posición y actividad de los genes de ARNr 18s y 28s sobre los cromosomas de un gran número de especies (**Goodpasture, C. y S.E. Bloom 1975; Miller, O.J. y col. 1976; Arruga, M.V. 1989;**). La aparición de tinción sobre un cromosoma parece ser el resultado de la unión de la plata al componente con proteínas ácidas del NOR activo en la interfase precedente, más que al ADN de esa porción del cromosoma (**Howell, W.M. 1977; Busch, H y col. 1982**). La especificidad de esta tinción

es elevada en mamíferos. Sin embargo, una sobreexposición a la plata origina no sólo la tinción NOR sino también la de los centrómeros, llegando incluso a afectar al cromosoma completo. (Goodpasture, C. y S.E. Bloom 1975; Howell, W.M. y col. 1977). Por otra parte algunas modificaciones relativamente pequeñas de la técnica han producido la tinción de las regiones ricas en pares de bases A-T y las regiones satélites de los cromosomas humanos o los centriolos (Howell, W.M. y T.E Denton al 1976; Howell, W.M. y col. 1977).

En un estudio, en sementales de la especie bovina, se pudo demostrar que el patrón de bandas NOR era característico de cada animal (Mayr B. y col. 1987) y que la frecuencia de distribución de los mismos entre los distintos pares de cromosomas homólogos, así como el

número en cada par, estaba claramente controlado por el genotipo (Mayr B. y col. 1989).

### **2.3.- NOMENCALTURA DE LOS MÉTODOS DE BANDEO**

En la Conferencia de París (1971) se acordó una nomenclatura cromosómica de la especie humana lo suficientemente clara como para ser utilizable en otras muchas especies de animales. De esta forma las necesidades del establecimiento de una nomenclatura cromosómica de algunos bandeos, en animales domésticos, quedaron cubiertas. En esta Conferencia se definió una banda como **“una parte del cromosoma claramente distinguible de los segmentos adyacentes por aparecer más clara u oscura después del tratamiento con diferentes métodos de bandeo” (ISCN 1985).**

La nomenclatura para las bandas está principalmente basada en los métodos utilizados para producirlas. Así, las bandas C incluirían a aquellos métodos que son capaces de demostrar heterocromatina constitutiva; el bandeo Q agruparía a aquellos métodos que utilizan la quinacrina o sus derivados para diferenciar bandas a lo

largo de los cromosomas; las bandas G reunirían los métodos que demuestran bandas a lo largo de los cromosomas utilizando colorante de GIEMSA y el bandeo R (bandas reversas) a aquellos métodos que produzcan un patrón de bandas opuesto en intensidad de tinción al obtenido con bandas G (Sumner, A.T. 1990).

### **3.-LOS CROMOSOMAS EN LOS BOVINOS**

#### **3.1.-EL CARIOTIPO NORMAL**

El cariotipo normal para el ganado bovino domesticado (*Bos taurus*, L.) sigue el esquema de los miembros de la familia bovidae: 60 cromosomas, incluyendo 58 autosomas y 2 gonosomas. Todos los autosomas son acrocéntricos, sus centrómeros son terminales, y difieren solamente en su tamaño. Los

cromosomas sexuales son fácilmente identificables por sus centrómeros que están situados en la región media. El cromosoma X es similar en tamaño al autosoma más largo, mientras que el cromosoma Y es uno de los cromosomas más cortos del cariotipo bovino (Crițiu y Popescu, 1974a).

#### **3.2.-ALTERACIONES DEL CARIOTIPO**

El desarrollo y aplicación en los últimos años de las técnicas citogenéticas en animales domésticos de interés zootécnico, han conducido a la descripción y conocimiento de numerosos cambios cromosómicos tanto numéricos como estructurales.

Durante el 3<sup>er</sup> Coloquio de Citogenética para Animales Domésticos, allá por 1977, el número total de animales examinados desde el punto de vista citogenético de este ganado se estimó en unos 13.000 animales de 80 razas bovinas diferentes (**Popescu 1977**).

En la actualidad ese número supera los 30.000, hecho que coloca al ganado vacuno, junto al hombre y al ratón, y después de ellos, como las especies de mamíferos más estudiadas desde su aspecto cromosómico.

Obviamente, el número de animales examinados varía mucho de una raza a la otra y entre áreas geográficas (**Fechheimer, 1973; Halnan, 1976; Tschudi, 1984; Kovacs, 1984; Eldrige y col. 1984**). Particularmente en Sudamérica, según **Moraes, y Col. (1980)** y **Pinheiro y Col. (1981)**, ese número asciende a unos 500 animales en total, no llegando al centenar los analizados en la República Argentina.

Una de las alteraciones del cariotipo más frecuente en el ganado bovino es la alteración estructural denominada translocación de tipo Robertsoniano 1/29.

La translocación robertsoniana 1\29 se describe como la translocación entre dos cromosomas acrocéntricos, no homólogos, el 1 y el 29, siendo estos los pares más grande y más pequeño del cariotipo vacuno respectivamente, dando

origen a un cromosoma submetacéntrico de mayor tamaño.

En 1964 **I. Gustavsson** y **G. Rockborn** identificaron por primera vez esta translocación en tres animales de la raza Roja y Blanca Sueca. A partir de la descripción inicial en Suecia, se ha podido observar en prácticamente todas las razas bovinas analizadas.

La frecuencia de animales portadores de la translocación en estado heterocigótico, varía mucho, dependiendo de la raza o bien de la cantidad de animales estudiados. Así en la raza Blanca Británica su incidencia a llegado a ser de hasta el 60 % (**Eldridge 1975**). Otro ejemplo de lo dicho sería lo que ha ocurrido en el ganado bovino de raza Retinta Española. Inicialmente se observó una frecuencia del 29% (**Moreno Millán y col. 1991**), situándose en la actualidad su frecuencia

en torno al 10% (**Moreno Millán, y col. 1995**).

Hay que poner de relieve que entre los factores que también ha mostrado jugar un papel importante en la variación de la frecuencia de ésta alteración es la ubicación geográfica de los mismos y el tipo de cubrición de las hembras, inseminación artificial o monta natural (**Frebling y col. 1987**).

La presencia de la translocación 1/29 en un cariotipo equilibrado cromosómicamente, al igual que otros cambios estructurales, no tiene, en los portadores, ningún efecto visible sobre el fenotipo. Sin embargo hijas de toros portadores manifiestan un incremento en los porcentajes de retorno a servicio, en los índices de rechazo, en la tasa reproductiva y en el período entre partos (**Gustavsson 1969; Refsdal 1976; Moreno Millán y col. 1992**).

Varios autores demostraron cómo esta alteración tiene influencia en la fertilidad de los animales. **Foulley y Frebling (1985)** calcularon un promedio del 12% de disminución neta en la tasa de fertilidad de las hembras portadoras, porcentaje nada despreciable, y que evidentemente tiene un reflejo económico por cuanto las pérdidas debida a esta alteración pueden ser en algunos casos de importancia (**Gustavsson 1969, 1970**). Este hecho ha provocado que las Administraciones Públicas de algunos países hayan tomado conciencia del problema y hayan establecido controles para eliminar los animales portadores como reproductores. Ello ha conllevado que la tasa de la translocación ha ido descendiendo en todas aquellas razas en las que se ha intervenido.

En cuanto a su origen, se acepta por la Comunidad Científica que ésta anomalía cromosómica fue originada en Europa Continental y se habría extendido al resto del mundo por cruces raciales entre razas europeas y razas autóctonas, cruces realizados con el objeto de mejorarlas (**Popescu, 1982**)

En Sudamérica se han realizado algunos estudios para detectar la presencia de esta alteración. Así **Madriz y col. (1991)** en Venezuela; **Igartúa y col. 1985**) en Argentina y **Postiglioni y col. (1996)** en Uruguay.

### 3.3.-POLIMORFISMO CROMOSÓMICO

El polimorfismo cromosómico observado en el ganado vacuno se circunscribe a uno sólo de su cromosomas, el cromosoma sexual Y. En 1962 **Crosley y Clark** encontraron que el cromosoma Y del ganado



vacuno europeo era submetacéntrico. Por otra parte en 1968 **Kieffer y Cartwright** mostraron por primera vez que éste cromosoma en los toros Cebú no era idéntico al del ganado europeo sino de tipo acrocéntrico. Los toros de las razas Brahman y Santa Gertrudis, originados a partir de Cebús de la India, tienen un cromosoma Y de este tipo. La morfología acrocéntrica ha sido también confirmada en razas Cebuinas en Asia y África. Sin embargo **Halnan (1976)**, estudiando la raza cebuina sudafricana Africander, detectó la presencia de un cromosoma Y submetacéntrico similar al del ganado europeo.

Pero dentro de algunas razas se ha observado otro polimorfismo aún más sutil. Se trata de cromosomas sexuales Y anormalmente alargados. El primer caso fue descrito por **Fechheimer (1973)** en la raza Ayrshire, descubriéndose

posteriormente en otras razas como en la raza Charolais (**Cribiu y Popescu 1974b**). En este último caso, el cromosoma Y del toro Charolais analizado presentaba un patrón de bandas G similar a la de un cromosoma Y normal. Este hecho excluye la posible hipótesis de un reordenamiento cromosómico, explicándose éste cromosoma por un grado más alto de desespiralización de la cromatina. Posteriormente se observaron otros casos como los descritos por **Cribiu (1975)** en la misma raza Charolais y en la Montbéliard.

Dentro del polimorfismo cromosómico se podría encuadrar el caso descrito por **Potter y Upon (1979)**. Estos autores observaron en un toro de raza Jersey la presencia de su cromosoma sexual Y con una morfología metacéntrica, no habiéndose detectado ésta morfología en ningún otro animal.

## 4.-LOS CROMOSOMAS TRATADOS CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

### 4.1.- TIPOS DE ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Las endonucleasas de restricción han sido definidas como “**endonucleasas que reconocen y cortan una secuencia nucleotídica específica, fragmentando la doble cadena del ADN en secuencias específicas**” (Babu, A. 1988).

Las endonucleasas de restricción las hay de tres tipos, según corten al ADN en fragmentos de mayor o menor número de pares de bases. Así las que cortan el ADN mayor a 1000 pares de bases de un punto de reconocimiento asimétrico, se denominan de tipo I. Las que reconocen secuencias de ADN entre 4 y 6 pares de bases, y cortan dicha

secuencia, se denominan de tipo II. Las que reconocen el ADN en secuencias asimétricas de 5-7 pares de bases y cortan la secuencia localizada 24-26 pares de bases más adelante, se denominan de tipo III. (Lewin, B. 1985).

Para Miller, D.A. y col. (1983) la mayor especificidad de las endonucleasas de tipo II resulta más interesante para aplicar en la investigación citogenética, ya que cada enzima reconoce y corta únicamente secuencias de 4-6 pares de bases de longitud.

Tanto Mezzanotte y col. (1983b) como Miller y col. (1983), informaron que el tratamiento de cromosomas humanos con aquellas enzimas cuyas secuencias de reconocimiento están formadas por 4 ó 5 pares de bases, y su

posterior tinción con GIEMSA, daban lugar a un patrón de tinción diferencial. Por ello y a partir de ahora en el presente trabajo, cuando hablemos de endonucleasas de restricción nos referiremos exclusivamente al tipo II.

#### **4.2. EMPLEO DE ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN EN ESTUDIOS CITOGENÉTICOS**

Los estudios citogenéticos en los que se han aplicado endonucleasas de restricción han puesto de relieve cómo determinadas regiones cromosómicas difieren, fuertemente, en términos de composición de bases (**Mezzanotte y col. 1983a; Mezzanotte y col. 1983b; Miller y col. 1983**). Esto ha posibilitado su aplicación al análisis de la naturaleza y distribución de ciertas regiones cromosómicas

de los mamíferos (**Babu, A. y col. 1988**), lo que ha proporcionado un buen número de observaciones en cromosomas preparados por el método convencional de fijación y secado al aire, ya que en estas condiciones el material cromosómico se manifestó sensible a la acción de diferentes enzimas de restricción (**Sahasrabudhe, C.G. y col. 1978**).

#### **4.3.- FACTORES DETERMINANTES DE LA ACCIÓN DE LAS ENDONUCLEASAS**

Existen muchos factores que intervienen en la obtención de una diferenciación estructural del cromosoma, es decir un bandeo. A continuación analizaremos algunas de ellas.

##### **4.3.1.- INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES EN**

## **EL BANDEO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN**

Las condiciones de experimentación influyen significativamente en la calidad del bandeo obtenido sobre cromosomas fijados. Esas condiciones son entre otras el envejecimiento y calentamiento de las preparaciones cromosómicas, la concentración de glicerol en la solución de reacción y la duración del tratamiento. (**Zhang, S.Z: y W.F. Dong 1989**).

Por una parte las muestras, dejadas envejecer de 3-15 días a temperatura ambiente, se pueden utilizar para bandear, pero la diferenciación será peor cuanto más vieja sea la preparación, por lo tanto no se produciría ninguna diferenciación.

Por otra parte el calentamiento de las preparaciones a 85°C durante unas dos horas produce la inhibición del bandeo.

Si se incrementa la concentración de glicerol en la solución de reacción se puede alterar la capacidad acción de las endonucleasas de restricción, de manera que por ejemplo para la enzima HAE III se produce la inhibición de su actividad cuando dicha concentración alcanza el 37,5% y obteniéndose el óptimo al 7,5% (**Zhang, S.Z: y W.F. Dong 1989**).

Por último el tiempo de incubación afecta a la producción de bandas. Para algunas enzimas como HAE III si se incrementa el tiempo de incubación, se incrementa su efecto.

### **4.3.2 FRECUENCIA Y TAMAÑO DE LA DIANA**

## DE RESTRICCIÓN DE LA ENDONUCLEASA

La frecuencia de la diana de resticción, es decir, la frecuencia de las secuencias de reconocimiento de las enzimas, afectan a la acción de las mismas.

En este sentido, se ha observado que los cromosomas se tiñen débilmente cuando son pretratados con ADNasa I o nucleasa micrococal, ya que estas nucleasas rompen el ADN con una gran frecuencia, produciendo fragmentos muy pequeños, de unos pocos pares de bases, que son extraídos fácilmente. Por ello al teñir los cromosomas con GIEMSA se observa la reducción total de la intensidad de tinción (**Alfi, O.S. y col. 1973**). **Miller y col. (1983)** a partir de estos datos sugirieron que un mecanismo similar pueden dar lugar a distintos patrones de banda si se usan endonucleasas de restricción, que extraigan

fragmentos de pocos cientos de bases de los cromosomas y por tanto esta extracción diferencial de ADN puede ser la causa de bandeo. Esto fue confirmado posteriormente por **Babu (1988)**.

No hay que olvidar tampoco que la longitud de la secuencia diana juega un papel importante en la digestión del ADN de los cromosomas, siendo esa longitud propia de cada endonucleasa. Obviamente, las endonucleasas con secuencias de reconocimiento de 4 ó 5 pares de bases cortarán ADN con más frecuencia que aquellas enzimas cuyas secuencias tienen 6 pares de bases, de manera que podríamos predecir una mayor pérdida de ADN cuando utilicemos las primeras (**Gosálvez y col. al 1987**). Se ha observado que las enzimas Alu I y Hae III eliminan selectivamente entre el 50% y 70% del ADN de cromosomas

fijados (**Bianchi, M.S. y col. 1985**).

#### **4.4.- MÉTODO DE PREPARACIÓN Y FIJACIÓN**

Según **Hancock, J.M. y Sumner (1982)**, el procedimiento comúnmente utilizado para realizar preparaciones de cromosomas metafásicos, es decir, la fijación con ácido acético-alcohol metílico (Fijador CARNOY 3:1), afecta a la cromatina ya que extrae gran cantidad de proteínas, lo que permite un fácil acceso de los enzimas al ADN y como consecuencia la producción de un patrón de bandas claro. Por otra parte se ha observado que mediante la fijación se puede inducir la desnaturalización del ADN, la desnaturalización de las proteínas y la pérdida de las estructuras nucleosómicas alterando seriamente la producción de bandas (**Gall,**

**J.G y M.L. Pardue 1969; Shapiro, I.M. y col. 1978; Kuo, M.T. 1982**).

Contradictoriamente la técnica de fijación de cromosomas con fijador Carnoy, para ciertos autores como **Perreti y col. (1990)**, es necesaria para la producción de bandeo sobre cromosomas metafásicos. Estos autores, demostraron que, pese a que la fijación incrementa la resistencia de los cromosomas a la digestión, permite mejorar la calidad del patrón de bandas inducido por el enzima. Sin embargo **Burkholder y Schmidt (1986)** obtuvieron otros resultados al analizar el efecto de la enzima Eco RI sobre cromosomas de ratón fijados y sin fijar, respetando dicha enzima la región centromérica de los cromosomas fijados o no. Llegaron pues a la conclusión de que la fijación mantiene la morfología cromosómica y por tanto no favorece un bandeo diferencial.

Esta disparidad de resultados nos lleva a pensar que el mantenimiento de la organización estructural nativa por medio de la fijación de los cromosomas con acético-metanol puede afectar a los resultados de la digestión. Por una parte dificultando el acceso de las enzimas al ADN cromosómico. En un estudio sobre la actividad de Alu I y Hinf I sobre cromosomas de la línea celular de ratón L929, **Gosalvez y col. (1990)** observaron que se producían diferencias entre algunas bandas obtenidas sobre un cromosoma marcado de dicha línea celular preparada para microscopía electrónica en la que no se utilizaba la fijación en metanol-acético y las mismas bandas obtenidas sobre el mismo cromosoma

preparado para microscopía óptica y fijado. Evidentemente concluyeron que la accesibilidad a las dianas de restricción puede estar modulado por el método de preparación de los cromosomas.

En este sentido **Burkholder (1989)** sostiene que el rango de tamaños de fragmentos que pueden ser extraídos tras la digestión enzimática de los cromosomas aislados y no fijados en el ratón, varía de 4000 pares de bases a 2000 pares de bases, siendo muy distinto a los tamaños de fragmentos extraídos en cromosomas fijados.

## **IV. MATERIAL Y METODOS**



## **1.- MATERIAL**

### **1.1.- MATERIAL BIOLÓGICO**

Los datos presentados en esta tesis han sido recogidos a partir de 52 animales de la especie bovina (*Bos taurus*, L.), de la raza Bovina Argentina de origen Patagónico. La distribución por sexo fue la siguiente: 32 hembras y 20 machos. Todos los animales son provenientes de la Provincia de Santa Cruz (región patagónica situada al Sur de Argentina) y localizados en el Campo Experimental La Lomada perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora (Argentina).

Los animales fueron tanto adultos como jóvenes, de ambos sexos y aparentemente sanos. De cada uno de ellos se tomó una muestra de sangre periférica mediante el sistema vacutainer.

Además, se analizaron 6 terneros resultados de un cruzamiento entre un toro portador de un polimorfismo cromosómico con 16 vacas de otra raza.

### **1.2.- MATERIAL INSTRUMENTAL**

#### **1.2.1.- CULTIVO CELULARES**

a) Reactivos:

Los productos utilizados para la realización de los cultivos celulares fueron suministrados por SIGMA y GIBCO BRL. La preparación de los mismos fue realizada siguiendo las recomendaciones del fabricante.

b) Aparataje:

Para asegurar las condiciones de mayor asepsia y esterilidad de los cultivos se utilizó una cabina de flujo laminar horizontal para dos operadores FILTRAR.

Los cultivos de las células de sangre integral se llevaron a cabo en un incubador con control de la temperatura SAN JOR.

Para los tratamientos de los cultivos mencionados, tratamientos requeridos para la eliminación de medio nutritivo

y el resto de pasos hasta la fijación celular, se utilizaron las centrífugas, Rolco (Modelo 2036) y Megafuge (HERAEUS) de 48 tubos.

Para la preparación de los correspondientes medios de cultivos y el desarrollo del protocolo citado en métodos se utilizaron diversos aparatos, tales como: baño termostático con agitador ELECTROTEM, pHmetro FBR, balanza de precisión METTLER (Modelo AE 163) y agitador magnético FBR .

c) Material de laboratorio:

Se dispuso del material habitual de laboratorio para desarrollar el protocolo citado en el método. Sin embargo, indicaremos que los cultivos se realizaron en tubos de centrífuga de 15 ml estériles con tapa a rosca CORNING.

## **1.2.2. -ANÁLISIS CROMOSÓMICO**

### a) Reactivos:

La realización de tratamientos de las células para la obtención de los cromosomas metafásicos y hasta la obtención de los bandeos se llevó a cabo utilizando productos de calidad reactiva, suministrados por las casas comerciales SIGMA, MERCK, GIBCO, ROCHE, KODAK y AGFA.

### b) Aparatos Ópticos:

Las observaciones de campo claro fueron realizadas bajo los microscopios ópticos de la marca NIKON (Modelo ALPHAPHOT YS) y Reichert Polivar. Las microfotografías de campo claro se tomaron con una cámara NIKON (Modelo F M 2) con disparador automático y KONIKA FT-1.

Las microfotografías se tomaron con objetivos de 40x y 100x (inmersión) en película AGFA de 100 ASA e Ilford Pan F de 50 ASA de sensibilidad. Reveladas en papel KODAK brillante de dureza 2 ó 3.

## **1.2.3.- MEDIOS DE CULTIVO, SOLUCIONES, TAMPONES Y MEZCLAS DE REACCIÓN**

Las soluciones, tampones y otras mezclas utilizadas en nuestro laboratorio han sido preparadas con antelación y, por ello, aunque la mayoría permanecen activas durante meses, es frecuente que necesiten mantenerse en refrigeración (4-8°C) o congelación (-20° C).

a) Medio de cultivo sintético:

\* Medio nutritivo RPMI-1640 con L-glutamina y bicarbonato sódico (SIGMA).

-Medio para 1l.  
-Agua bidestilada a temperatura ambiente.

-Equilibrar el medio a pH 7.4

-Ajustar el volumen hasta 1l y esterilizar por filtración, filtros de 0.2 µm (STERIVET-Millipore).

-Para su conservación, Congelar a -20° C.

-Utilizar a temperatura ambiente

b) Solución Mitogénica

-Phytohemaglutinina M (DIFCO, Código 0528).

-Rehidratar con 5 ml de Agua bidestilada estéril.

-Phytohemaglutinina P (DIFCO, Código 3110).

-Rehidratar con 5 ml de Agua bidestilada estéril.

-Añadir a 1 l de medio

c) Antibióticos:

Solución preparada de SIGMA:

-Penicilina 10.000 UI/ml.

-Estreptomicina 10 mg/ml.

-Anfotericina 25 µg/ml.

d) Inhibidor Mitótico:

-Colchicina 10 mg.

-Agua bidestilada estéril 10 ml.

-Añadir a cada cultivo (Concentración final 1.25 µg/ml).

e) Solución Hipotónica:

-KCL 0,56 gr.

-Agua bidestilada 100 ml.

-Utilizar una sola vez y a 37°C.

f) Solución de Fijación:

Fijador Carnoy (1:3)  
-Ácido acético glacial: 1 vol.  
-Metanol: 3 vol.  
-Mantener en refrigeración a 4°C.  
-Utilizar recién preparada.

g) Solución Tampón fosfato:

Tampón Soremsen. Aunque existen dos tipos de solución de Sorensen, hemos utilizado un tipo basado en la mezcla de dos sales, una sódica y la otra potásica,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4+2\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Las proporciones utilizadas fueron las siguientes para un pH=6.8:

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4+2\text{H}_2\text{O}$ , 9.25 gr.  
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 6.53 gr.  
-Agua bidestilada, 1l

h) Solución de Tripsina:

-Tripsina, 0.05 gr.  
-Solución Tampón de Soremsen, pH 6.8, 100 ml  
-Utilizar a 37°C  
Para detener la acción enzimática:

-Suero fetal bovino, 5ml  
-Solución Tampón de Soremsen, pH 6.8, 100 ml

i) Solución de Tinción de Giemsa:

-Colorante Giemsa, 5 ml.  
-Solución Tampón de Soremsen, pH 6.8, 100 ml

j) Soluciones para bandeó C:

Solución de ClH 0,2 N:  
-ClH puro 0,7 ml.  
-Agua destilada hasta 100 ml.

Solución saturada de hidróxido bórico ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ):  
- $\text{Ba}(\text{OH})_2$  5 gr.  
-Agua destilada hasta 100 ml.

-Formol al 40%, 1 ml.  
- $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada, 39 ml  
-Acetato de Sodio al 10%, 6 gotas

Solución 2x SSC:  
Cloruro sódico 0,3 M  
- $\text{ClNa}$  17,535 gr.  
Citrato trisódico 0,03 M  
- $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
8,823 gr.  
-Agua destilada hasta 1000 ml.

Solución de Acetato de Sodio:  
-Acetato de Sodio, 1 gr.  
- $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada, 9 ml.

l) Soluciones para bandeos secuenciales R-NOR:

k) Solución para bandeos NOR:

Solución tampón borato:  
-Sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 0,1 M, 14,2 gr.  
-Tetraborato de sodio ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ) 0,0095 M, 1,91 gr.  
-Agua bidestilada hasta 1000 ml.  
-Ajustar a pH 9,2.

Solución de Plata 1:  
-Nitrato de plata, 1 gr.  
- $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada, 2 ml.

Solución de Plata 1:  
-Nitrato de plata, 1 gr.  
- $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada, 2 ml.

Solución de Plata 2:  
-Nitrato de plata, 1 gr.  
- $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada, 1,25 ml.

m) Soluciones para Intercambios de Cromátidas Hermanas:

- $\text{NH}_3$ , 1,85 ml.

Solución de formalina:

Solución salina citratada (0,5 x SSC):

-NaCl 4,38 gr.

-Citrato trisódico dihidratado ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ )  
2, 20 gr.

-Agua destilada hasta 1000 ml.

-Ajustar pH 7,5

n) Solución de reacción con endonucleasas de restricción:

Preparar la solución específica para cada enzima en tubos eppendorf y de la siguiente forma:

-Tampón específico de cada Endonucleasa 10  $\mu$ l.

-Agua bidestilada desmineralizada 90  $\mu$ l.

-Homogeneizar con la micropipeta, intensamente.

-Añadir de 30 a 40 U de endonucleasa.

-Mezclar de nuevo hasta homogeneizar.

o) Soluciones tampón de incubación específicos de las endonucleasas, para una actividad del 100%:

Para Hae III (Tampón M):

-Tris-HCl 10 mM.

-NaCl 50 mM.

-10 mM  $MgCl_2$

-dithioerythritol (DTE)

1 mM.

-pH 7,5 (a 37° C).

Para Alu I, EcoRI y Hinf I (Tampón H):

-Tris-HCl 50 mM.

-NaCl 100 mM.

- $MgCl_2$  10 mM.

-dithioerythritol (DTE)

1 mM.

-pH 7,5 (a 37°C).

#### **1.2.4.-SUPLEMENTOS PARA LOS MEDIOS**

a) Suero Fetal Bovino (FCS; SEBAM):

-Inactivar durante 30  
min al bañomaría a 56°C.

b) Plasma autólogo:

-Extraído del propio  
animal a estudiar.

-centrifugar la muestra  
de sangre recibida.

-Extraer sobrenadante.

-Añadir al medio de  
cultivo.



## 2. MÉTODOS

Los estudios citogenéticos en animales domésticos comienzan con la obtención de cromosomas metafásicos por técnicas conocidas. El método de cultivo a corto término utilizado (De Grouchy y col., 1964), ligeramente modificado, está muy extendido en la obtención sistemática de células mitóticas. En esta tesis se utilizó como fuente de linfocitos a cultivar, sangre periférica obtenida por punción venosa.

### 2.1. TOMA DE LA MUESTRA SANGUÍNEA

La extracción de la sangre de los animales se realizó asépticamente por punción venosa en la yugular, previa depilación y

desinfección con etanol al 70%.

#### 2.1.1 CONDICIONES DE LA TOMA DE SANGRE

-Extraer la sangre con sistema de tubos VACUTAINERS estériles, al vacío y heparinizados de 10ml.

-Los tubos se agitan de forma suave para homogeneizar.

#### 2.1.2. CONDICIONES DEL TRANSPORTE

-Disponimos de neveras portátiles con acumuladores de frío. Sin embargo deben tomarse precauciones para evitar que las muestras se congelen por contacto con los mismo acumuladores.

## 2.2. PREPARACIÓN DEL CULTIVO CELULAR

-Añadir a tubos estériles de 15 ml de capacidad:

-7,5 ml de Medio RMPI 1640 (SIGMA).

-1,5 ml de Plasma Autólogo o bien Suero de Bovino Fetal.

-0,2 ml de solución antibiótica-antimicótica.

-0,2 ml de la solución mitogénica.

-0,5 ml de sangre integral.

La puesta en cultivo de la sangre periférica obtenida se realizó en una cámara de flujo laminar (FILTRAR) para cultivo celulares.

Identificados los tubos, se colocaron en una incubador a 37° C. durante 72 horas.

En esta tesis se realizaron dos cultivos por muestra para obtener suficiente

cantidad de células en división. En algunos casos se realizaron cultivos a una muestra repetida.

## 2.3. PROCEDIMIENTO DE COSECHA DEL CULTIVO

El procedimiento para llevar las células desde los cultivos hasta los portaobjetos es el siguiente:

a) Detención de las divisiones mitóticas:

-Una hora antes de de finalizada la incubación, se añaden 100 µl de una solución de colchicina, con una concentración final 1.25 µg/ml.

-Mantener en incubación hasta cumplir las 72 horas de cultivo.

b) Tratamiento de las células: El tratamiento de las células se realizó de forma

estándar, constando básicamente de:

-Tratamiento hipotónico (CIK 0,075 m) 25 minutos a 37°C.

-Fijación (fijador Carnoy 3:1) durante 2 horas mínimo a 4-8° C.

-Lavados sucesivos con el mismo fijador.

-Extensión al aire sobre los portaobjetos.

-Tinción de algunas extensiones con Giemsa al 5% en buffer fosfato, pH 6,8, durante 10 minutos.

-Guardar el resto para aplicación de bandeo.

-Aquellas preparaciones que vayan a utilizarse en tratamientos con enzimas de restricción, se almacenaron a -20°C en un congelador, con objeto de evitar de esta forma el envejecimiento excesivo (Fernández, 1995).

## 2.4 TECNICA DE BANDEO

Se usan para identificar los cromosomas permitiendo determinar la estructura y secuencia de cada cromosoma en forma individual.

### 2.4.1.- BANDEO G

Se ha utilizado una modificación de la técnica original de Seabright (1971), que consiste en:

-Las preparaciones obtenidas de la manera anteriormente descrita, y envejecidas solo 24-48 horas, y no teñidas, se trataron con tripsina (Difco 1:250) al 0,05% en tampón Soremsen, durante un tiempo variable dependiendo de la antigüedad de las preparaciones.

-Inmediatamente se lavan dos veces con solución de inactivación de la tripsina.

-Se lavan de nuevo en tampón fosfato

-Se tiñen con Giemsa al 10% en el mismo tampón, durante 5 minutos .

-Se montan en EuKitt.

#### 2.4.2.- BANDEO C

En líneas generales, para la tinción de la heterocromatina constitutiva, utilizamos el método de original descrito por **Sumner (1972)** modificado.

-Lavar abundantemente las preparaciones, obtenidas unas 24 horas antes, con agua bidestilada.

-Introducir en CIH 0,2 N durante 5 min. a temperatura ambiente.

-Lavar abundantemente con agua bidestilada.

-Introducir en una solución saturada al 5% de Hidróxido Bórico  $Ba(OH)_2$  durante 5 minutos a 55°C.

-Lavar abundantemente con agua bidestilada.

-Introducir las preparaciones en una solución 2XSSC a 55°C, 20 min.

-Lavar abundantemente con agua bidestilada.

-Teñir con Giemsa al 70% en solución tampón pH 6,8 durante 15 minutos.

-Lavar abundantemente con agua bidestilada.

-Secar al aire.

-Montar en Eukitt.

#### 2.4.3.- BANDEO NOR

Las preparaciones obtenidas de la manera anteriormente descrita, apartados 3-3, y no teñidas, se trataron como sigue:

-Sobre los portaobjetos envejecidos unos días, se colocan 3 gotas de la solución de **plata 1**.

-Inmediatamente se cubre y se mantiene a 60°C durante 4 minutos.

-Lavar abundantemente con agua bidestilada de forma

que el cubreobjetos se elimine suavemente.

-Dejar secar al aire.

-Colocar, una vez secadas las preparaciones, 2 gotas de formol neutro más dos gotas de la solución de **plata 2**.

-Cubrir de nuevo y dejar a temperatura ambiente durante 8-10 minutos.

-Hacer un control al microscopio de contraste de fases.

-Lavar abundantemente con agua bidestilada de igual forma que antes.

-Contrateñir con Giemsa al 1% en tampón fosfato pH 6,8.

-Montar los portaobjetos con EuKitt.

#### **2.4.4.- BANDEO SECUENCIAL R-NOR**

Para el estudio del bandeo secuencial R-NOR se hace uso de la 5-Bromo-2-deoxyuridina (BrDU), análogo de la Timina, adicionándola a

los cultivos celulares al final de la fase S, obteniéndose así una nueva reorganización cromomérica de la cromatina. Esta reorganización da como resultado una imagen contraria a la obtenida con el bandeo G, de ahí que se denomine “reversa” o R. A las preparaciones obtenidas después de la recogida de los cultivos, se le aplica una modificación de la técnica de bandeo NOR y obtendremos sobre la misma preparación ambos bandeos.

El protocolo a seguir es el siguiente:

-7 horas antes de concluir las 72 horas de cultivo, se añaden a los mismos BrDU en una concentración final de 10-30  $\mu\text{gr/ml}$ .

-Una vez obtenidas y secas se tratan con tampón borato a pH 9 durante 20 min. a temperatura ambiente.

-Lavar abundantemente con agua destilada y dejar secar totalmente.

-Colocar tres gotas, sobre cada portaobjetos, de una solución filtrada de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) al 50% P/V.

Una vez cubiertos con sus correspondientes cubreobjetos, se colocan dentro de una cámara húmeda, en un incubador a  $37^\circ\text{C}$  durante 15-17 horas.

-Una vez transcurrido este tiempo, se observan a contraste de fases y si no han aparecido los NORs se dejan incubar algún tiempo más.

-Observados los NORs se lavan las preparaciones suave y abundantemente con agua destilada.

-Teñir con Acridina Naranja al 1% en tampón Soremsen pH 6,8 durante 20 min.

-Lavar abundantemente con agua destilada.

-Para acelerar el bandeo R, las preparaciones se montan

con el mismo tampón y se exponen a la luz de una lámpara UV a unos 20 cm de distancia durante 5-7 horas, procurando que no se seque el tampón.

-Lavar con agua destilada y montar en fresco para la observación de las metafases con NOR al microscopio de luz transmitida y de las bandas R en las mismas metafases al microscopio de reflexión.

#### **2.4.5.- INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS**

En el momento de realización de los cultivos, se adicionan a los mismos Bromodeoxyuridina (BrDU) a una concentración final de  $5 \mu\text{gr/ml}$ . Después de transcurridas las 72 horas de cultivo (correspondientes a 3 ciclos celulares), se trataron de forma habitual hasta conseguir las preparaciones. El protocolo

seguido a continuación es el siguiente:

-Las preparaciones se tiñen con Bisbenzimidida (Hoechst 33258) en SSC x 0,5, a pH 7,5, durante 30 min.

-Lavar con agua destilada.

-Cubrir con un portaobjetos y poner bajo luz UV durante 90 min.

-Quitar los cubreobjetos y lavar con agua destilada.

-Introducir en SSC x 0,5 durante 60 min. a 50°C en baño maría.

-Lavar con agua destilada.

-Teñir con una solución de Giemsa al 5% en tampón fosfato pH 6,8, durante 20 min.

-Observar.

#### **2.4.6.- TÉCNICA DE DIGESTIÓN CON LAS ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN**

En esta tesis hemos utilizado enzimas de restricción de tipo II, ya que según **Miller y col. (1983)** éstas son capaces de reconocer secuencias de ADN relativamente cortas y cortarlas de forma específica, incluso en los cromosomas fijados con metanol y ácido acético e inmobilizadas sobre un portaobjetos. El tratamiento de los cromosomas humanos con aquellas enzimas con dianas de reconocimiento de 4 ó 5 pares de bases, y posteriormente teñidas con Giemsa, produjeron un modelo de bandeo claro. Este bandeo según **Babu (1988)**, aparece como consecuencia de que las regiones teñidas de oscuro de los cromosomas representan áreas resistentes a la endonucleasa en cuestión, mientras que las regiones ligeramente teñidas o no teñidas se corresponden con áreas susceptibles.

En la tabla I aparecen las endonucleasas de restricción más frecuentes y sus tampones.

El método seguido para obtener bandeos inducidos por las enzimas de restricción, fue, básicamente, el mismo para todos los casos. El protocolo a seguir es el fruto de ligeras modificaciones de los descritos por **Mezzanotte y col. (1983b)**, **Miller y col. (1983)** y **Mezzanotte y col. (1986)**, **Fernández (1995)**.

El método seguido ha sido:

-Proceder a la descongelación de los porta-objetos.

-Si se cree oportuno pueden lavarse, previamente a su uso, en etanol al 95% durante 5 minutos.

-Añadir 50 µl de la mezcla de reacción con el enzima, recién preparada, y colocar un cubreobjetos.

-Introducir en cámaras húmedas las preparaciones e incubar a 37°C, dejándolas un tiempo de 12 horas.

-Lavar abundantemente con agua bidestilada, eliminando el cubreobjetos.

-Teñir con Giemsa al 5% en tampón Sorensen pH 6,8 durante 10 minutos.

Simultáneamente se realiza un control usando otra preparación del mismo animal y en las mismas condiciones de almacenaje, pero utilizando sólo la mezcla de la reacción sin enzima (**Fernández 1995**).

#### **2.4.7. TECNICA SECUENCIAL Hinf I-C**

Mediante esta técnica pretendemos observar un posible polimorfismo de la heterocromatina cromosómica en el ganado vacuno Criollo Argentino.



El protocolo a seguir es el siguiente:

-Sobre preparaciones recién sacadas del congelador de  $-20^{\circ}\text{C}$ , añadir una concentración de enzima diluida en su tampón de incubación específico, a una concentración final de  $1\text{ U}/\mu\text{l}$ .

-Poner cubreobjetos y dejar digerir durante toda una noche (unas 12 horas) en una cámara húmeda y a  $37^{\circ}\text{C}$ .

-Lavar suavemente las preparaciones con agua destilada.

-Teñir con Giemsa al 5% en tampón fosfato pH 6,8 durante 10 min.

-Lavar con agua destilada.

-Observar a microscopio y microfotografiar.

-Desteñir con el fijador estándar y lavar con agua destilada.

Una vez obtenidas las fotografías, se aplica a las preparaciones una

modificación de la técnica habitual de bandeo C (Sumner, 1972). El protocolo seguido es el siguiente:

-Tratar con CIH 0,2 N durante 15 min. a temperatura ambiente.

-Lavar con agua destilada.

-Tratar con hidróxido bórico ( $\text{Ba}(\text{OH})_2$ ) al 5% a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 10 min..

-Lavar de nuevo suavemente con CIH y con agua destilada.

-Tratar con SSC x 2 a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 20 min.

-Lavar con agua destilada.

-Teñir con Giemsa al 10% en tampón fosfato ph 6,8 durante 20 min.

-Montar y observar.

## **2.5. PREPARACIÓN DE CARIOTIPOS**

### **2.5.1 TÉCNICA DE OBSERVACIÓN**

El número de células metafásicas examinadas en cada animal, representativo con vistas a realizar un diagnóstico, fue entre 10 y 20 metafases (**Hook 1977**). Los pasos realizados son:

-Elección de las mejores metafases.

-Microfotografiar las células con metafases más idóneas, es decir, con un grado medio de contracción de los cromosomas y bien separados unos respecto a otros.

-Aplicación de las técnicas de medida.

## **2.6. TÉCNICA DE MEDIDA DE LOS CROMOSOMAS**

Para la toma de las medidas se han elegido 10 metafases de cada animal. Los criterios de selección de las mismas han sido los siguientes:

-Buena dispersión de los cromosomas en la placa metafásica, evitando aquellas que posean cromosomas en cabalgamiento.

-Metafases con un grado medio de contracción en sus cromosomas.

-Tomar las medidas sobre la cromátida más larga.

-Mayor contraste y delimitación del contorno cromosómico.

Las medidas reales se tomaron con un calibre de una precisión de 0,05 mm. sobre diez veces el negativo y los estadísticos han sido calculados con el programa de cálculo SAS.

Comoquiera que, a pesar de todas las condiciones anteriores y debido a que el grado de contracción de los cromosomas es diferente de una a otra metafase, no sólo dentro de diferentes cultivos celulares sino dentro del propio cultivo, se hace imprescindible,

a la hora de poder unificar las medidas morfométricas, la unificación de las mismas. Así las medidas obtenidas se han calculado en base a la longitud relativa de los cromosomas. Para ello se realiza una normalización previa de los datos y sobre ellos se calculan los estadísticos.

La longitud relativa de cada cromosoma se calcula, según la expresión utilizada de forma habitual en citogenética (**Gustavsson 1969; Cribiu y Popescu 1974, Arruga y Zarazaga 1985; Moreno Millán y Rodero 1990**), como valor relativo al complemento haploide. Esta expresión es la siguiente:

$$Lr_i = \frac{1.000 \times A_i}{A_i / 2 + X}$$

de donde en cada individuo  
 $Lr_i$  = Longitud relativa del iésimo cromosoma.

$A_i$  = Longitud real del iésimo cromosoma en mm.

$X$  = Longitud real del cromosoma X de los machos y longitud real media en las hembras.

Se han calculado para cada par de cromosomas homólogos y brazos homólogos, la longitud relativa media como anteriormente se ha expuesto, la varianza, la desviación típica y el error estándar.

De igual modo para los cromosomas bibraquiales se han calculado los valores medios del índice centromérico, el cual tiene la siguiente expresión, según **Levan y col. (1964)**.

$$i = \frac{100 \times s}{c}$$

donde  
 $i$  = índice centromérico.

s = longitud brazo corto

c = longitud total.

$$r = \frac{q}{p}$$

La razón entre brazos cromosómicos es la razón existente entre el brazo largo (q) y el brazo corto (p) de un cromosoma. Se calcula mediante la expresión:

donde

r = razón entre brazos

p = longitud del brazo corto

q = longitud del brazo largo



## **V. RESULTADOS**

## 1. MEDIDAS CROMOSOMICAS

### 1.1- LONGITUDES RELATIVAS MEDIAS DE LOS DIFERENTES PARES CROMOSOMICOS

En la especie *Bos taurus* (L.) el complemento cromosómico es de  $2n=60$  cromosomas. En la tabla II (Fig. 1) se presentan las longitudes medias relativas de los pares de autosomas de esta especie ordenadas de mayor a menor, obtenidas a partir de las medidas relativas de cada uno de los pares de cromosomas en el total de los animales estudiados. Se completa esta tabla con las longitudes relativas medias de los cromosomas sexuales X e Y.

Al comparar las longitudes relativas medias se puede observar cómo el cromosoma X supera en tamaño al cromosoma 1 de acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis. Por otro lado el cromosoma Y se sitúa entre los cromosomas 21 y 22 y en el último lugar se ubica el cromosoma 29.

En el estudio del coeficiente de variación de cada par cromosómico podemos apreciar los límites de esta variación que se sitúan para los autosomas en 2,35% para el par cromosómico 13 hasta un 7,25% en el par 29.

En cuanto a los cromosomas sexuales, hay que

señalar que en el Y se ha estimado un coeficiente de variación que podemos considerar más elevado que el del X. Asimismo el X presenta un coeficiente de variación alto, un 4,10%.

En la Tabla III y la fig 2 se comparan estos mismos resultados con otras razas Epañolas, Francesas y Suecas, observándose que entre los cromosomas X no aparecen grandes diferencias y sin embargo en cuanto al cromosoma Y ésta raza presenta un tamaño mayor.

cromosomas bibraquiales del ganado bovino Criollo, es decir el cromosoma X y el Y. Por sus medidas podemos clasificar estos cromosomas como submetacéntricos. El resto de los cromosomas, aunque aparentemente presentan un solo brazo, en prácticamente todas las metafases analizadas y fotografiadas aparece un diminuto brazo corto, por lo que deben encuadrarse bajo la terminología de acrocéntricos, término aceptado por prácticamente todos los autores consultados.

## **1.2. INDICE**

### **CENTROMERICO Y**

### **RAZON ENTRE BRAZOS**

La Tabla IVa nos muestra el índice centromérico y la razón entre brazos calculados para los

## **2.-IDENTIFICACIÓN CROMOSOMICA**

### **2.1.- BANDEO GTG**

Para comparar los resultados obtenidos con la técnica de bandeo GTG en bovinos Criollos Patagónicos, hemos realizado un montaje fotográfico con los cariotipos diploides, siguiendo lo propuesto por la **ISCNDA (1990)**. Como puede observarse en la figura 3, la similitud entre los bandeos GTG de todos los cromosomas es comparable al modelo idiogramático propuesto por la **ISCNDA**.

### **2.2.- BANDEO CTG**

Con éste bandeo podemos detectar la heterocromatina constitutiva.

En el bovino Criollo Patagónico los resultados

obtenidos indican tras tratamiento alcalino, todos los autosomas del complemento presentan, la región centromérica densamente teñida (figura 4), localizada, en todos los animales analizados, sobre el extremo centromérico y caracterizada por ser la tinción más oscura que el resto del brazo cromosómico.

Por otro lado, hemos observado que el cromosoma sexual X no expresa bandas C en la región centromérica y que el cromosoma sexual Y fue fácil de identificar, gracias a que apareció teñido en todo su longitud. Ello indica la cualidad heterocromática del cromosoma Y de éste ganado.

### **2.3.-REGIONES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES:**



## **RECUESTO Y LOCALIZACIÓN**

Segun **Mayr y col. (1985)**, las Regiones del Organizador Nucleolar pueden detectarse como cuerpos oscuros en las regiones teloméricas de las parejas de autosomas 2, 3, 4, 11 y 28 en el ganado vacuno. Sin embargo, no todos los cromosomas portadores de NOR presentaron sus telómeros teñidos con sales de plata (figura 5), debido a que este método marca los telómeros cuando sus genes ribosómicos fueron activos en la interfase anterior (**Howell, 1977**).

En el presente trabajo se han identificado como cromosomas portadores de NORs activos los cromosomas 2, 3, 4, 11 y 28, mediante la aplicación de un bandeo secuencial R-NOR (Figura 6) (**Di Berardino y Col. 1985**).

La Tabla IVb nos muestra la distribución de NORs activos por célula analizada. En ella podemos observar que la media está situada en 5,65 con un error estándar de 0,31.

Hemos observado también que a veces los cromosomas portadores de NORs activos aparecen asociados. Así observamos que cuando los cromosomas presentan sus cromátidas perfectamente independientes, las asociaciones se producen cromátida a cromátida, una con una o una con dos (fig. 7).

## **2.4. INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS (SCE)**

Se ha determinado el número promedio de intercambios de cromátidas hermanas sobre el recuento de los mismos ocurridos en las denominadas metafases M2 y

M3. Estas células son aquellas que han sufrido al menos dos ciclos de replicación en presencia de BrDU (Bromodeoxiuridina) y sobre ellas se efectúa el recuento (Fig. 8, 9 y 10).

Los resultados obtenidos nos ponen de relieve que el número promedio en el conjunto de animales

analizados es de 4,2 con un error estándar de 1,2 (Tabla V). Por otra parte no hemos encontrado diferencias significativas entre el número de intercambios obtenidos en los dos sexos, siendo los valores de 4,1 y de 4,6 en hembras y en machos respectivamente.

### **3.- BANDEOS INDUCIDOS POR LAS ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN SOBRE CROMOSOMAS FIJADOS DE BOVINO CRIOLLO PATAGÓNICO**

El criterio seguido en esta tesis para la elección de las endonucleasas de restricción utilizadas para digerir los cromosomas metafásicos fijados, ha sido el indicado por **BABU (1988)**. Según éste autor únicamente aquellas enzimas cuyas secuencias de reconocimiento están constituidas por 4 ó 5 pares de

bases pueden inducir tinción diferencial con colorante Giemsa. También hemos utilizado alguna endonucleasa de restricción con secuencia diana de 6 pares de bases para confirmar éste extremo.

Con ello, en este trabajo hemos podido observar los tres tipos de efecto que **BABU**

(1988) sugiere como probables tras la aplicación de endonucleasas de restricción sobre los cromosomas fijados teñidos con Giemsa que son los siguientes:

A) Las endonucleasas que por la aparente ausencia de efecto no producen tinción diferencial clara, caso de la EcoRI.

B) Las endonucleasas que producen un patrón semejante a las bandas G, como es el caso de la Hae III y Hinf I.

C) Las endonucleasas que producen un patrón semejante a las bandas C, ya sea por coloración positiva o negativa (“gaps”), como a veces Hae III, Alu I y Hinf I lo producen.

Aunque la frecuencia de corte de las dianas están relacionadas con el número de pares de bases que componen dicha secuencia, la organización

de la cromatina puede afectar a la producción de bandeos por digestión de ADN en las regiones donde se concentra la secuencia diana.

Según nuestros resultados, podemos deducir que los cromosomas de los bovinos Criollos Patagónicos fueron afectados, en diferente medida, por las endonucleasas de restricción Alu I, Hae III y EcoRI, alterando tanto la calidad como la intensidad de tinción con Giemsa de los cromosomas de este ganado.

Hemos considerado no atacados, o atacados en baja proporción, aquellas áreas que presentaron una tinción positiva con Giemsa. Cuando observamos una disminución de la intensidad de tinción Giemsa consideramos que se ha producido una extracción de ADN de la cromatina en dichas regiones. El grado máximo de extracción de ADN pudo ser observado por una tinción

Giensa negativa de las áreas afectadas produciéndose huecos (“gaps”) en ellas.

obtenidos por la digestión con ésta enzima de los cromosomas fijados de éste ganado.

### **3.1. MODELOS DE BANDEO INDUCIDOS POR DIGESTIÓN DE LOS CROMOSOMAS FIJADOS CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN**

Hemos observado diferentes efectos de digestión, según las enzimas de restricción empleadas, Alu I, Hae III, EcoR I, en los cromosomas bovinos fijados, que han dado lugar a varios modelos de digestión. Estos modelos serán analizados en los siguientes apartados.

#### **3.1.1. MODELO DE BANDEO INDUCIDO POR ALU I (5'..GA↓CT..3')**

El modelo de bandeo obtenido por esta endonucleasa se asemeja a un modelo de bandeo C. La figura 11 ilustra los efectos y modelo de bandeo

Por un lado, hemos observado que ésta endonucleasa redujo, intensamente, la coloración de la tinción Giemsa en toda la longitud de los brazos cromosómicos. La digestión con Alu I de los cromosomas fijados de estos bovinos indica la existencia de una gran cantidad de secuencias dianas a lo largo de toda la longitud de los cromosomas de esta especie.

Fueron observadas regiones de escasa o nula resistencia a la acción de Alu I, induciendo, incluso, en algunos casos a un efecto tan intenso que llegó a producir verdaderos huecos (“gaps”).

Las regiones heterocromáticas descritas por medio del bandeo CBG, mostraron tanto una tinción débilmente positiva en el

extremo centromérico de los autosomas como un decrecimiento intenso (huecos) de las regiones paracentroméricas en algunos de los autosomas. Estas regiones intensamente digeridas dieron lugar a la formación de bandas C negativas (figura 12), indicando la presencia de una fracción de heterocromatina muy enriquecida en secuencias dianas Alu I. Además aunque la localización de estas áreas digeridas se corresponde con el de las bandas C, el tamaño fue inferior en todos los casos ya que un pequeño brazo corto resistió siempre el ataque enzimático. De ello, se dedujo que existieron dos regiones diferenciadas en la heterocromatina.

El tratamiento enzimático de cromosomas fijados de bovinos dio lugar a patrones de bandeado diferentes en los cromosomas. Esta endonucleasa de restricción permitió diferenciar dos

fracciones en la región de bandas C que tuvieron la siguiente distribución:

-Los extremos centroméricos de todos los autosomas se caracterizaron por su susceptibilidad a la acción enzimática, confirmado por la presencia de un brazo corto ligeramente teñido y de menores dimensiones al obtenido por la técnica de bandeado C, que indicó la existencia de una pequeña cantidad de heterocromatina no digerida. Así, fue posible observar que la heterocromatina de las bandas C de los autosomas de esta especie resiste a la acción de la Alu I.

-Adicionalmente se detectó una segunda fracción de herocromatina caracterizada por digestión intensa, cuyo resultado fue la producción de huecos (“gaps”), con Alu I. Así, los huecos subcentroméricos observables en algunos de los autosomas de esta especie nos

revelan la presencia de ADN satélite muy enriquecido en la secuencia diana de Alu I, sobre la heterocromatina de las bandas CBG.

-En cuanto a los cromosomas sexuales, hemos observado la ausencia de huecos en todos los cromosomas X del ganado vacuno analizado. Sin embargo, el cromosoma Y de todos los animales analizados mostró un ligero hueco paracentrómerico similar al descrito en algunos autosomas.

Por todo lo anterior, pudimos interpretar estos resultados en los siguientes terminos:

1) La presencia de dos fracciones dentro de la región de heterocromatina de los autosomas del ganado vacuno, caracterizadas por su sensibilidad a Alu I.

2) La intensidad de tinción, localización y el aspecto de los cromosomas encontrados fue aparentemente homogéneo en todos los individuos analizados. Aunque el tamaño de huecos y regiones teñidas no presentaban homogeneidad.

### **3.1.2. MODELO DE BANDEO INDUCIDO POR HAE III (5'..GG↓CC..3')**

El tratamiento de cromosomas fijados de bovino Criollo Patagónico (*Bos taurus*, L.) con Hae III indujo a la producción de un bandeo semejante al bandeo G (bandeo-G-Hae III) en todos los cromosomas del complemento, lo que permitió hacer una identificación fiable y precisa de las parejas cromosómicas homólogas y el establecimiento de los cariotipos de restricción de los animales en estudio siguiendo la recomendación de

la **ISCNDA (1990)** (Fig. 13). La obtención de los cariotipos de restricción con Hae III tiene interés ya que permitirán identificar los cromosomas implicados en diferencias polimórficas heterocromáticas o la detección del efecto de la digestión sobre los cromosomas portadores de los NORs. Nosotros utilizaremos como modelo comparativo del cariotipo de bandeo-G-Hae III, el ideograma de bandeo G propuesto por **ISCNDA (1990)**.

Según el efecto producido por Hae III sobre las regiones heterocromáticas, y a diferencia de lo que sucedió con Alu I, se pudieron establecer los siguientes efectos sobre diferentes tipos cromosómicos y sus regiones:

1) Las regiones centroméricas de los cromosomas acrocéntricos, tras la digestión enzimática y tinción con Giemsa, presentaron una fracción parcialmente digerida en su totalidad y

localizada en el extremo de dicha región, como una pequeña banda centromérica visible a modo de un pequeño brazo corto.

Este modelo de bandeo sugiere la existencia de una concentración diferenciada de la secuencia diana de Hae III sobre la heterocromatina, menos concentrada en el extremo centromérico.

2) En el caso del cromosoma Y se ha observado una ligera banda de mayor resistencia situada entre la constricción primaria y el área digerida. Por otro lado, el cromosoma X muestra un bandeo similar al bandeo G, y no un bandeo C claro tras el tratamiento enzimático con Hae III.

3) Las regiones portadoras de los organizadores nucleolares (NOR) localizadas en las regiones teloméricas de los cromosomas 2, 3, 4, 11 y 28

de ganado vacuno (**Mayr y col 1985**), aparecieron como áreas no teñidas (huecos) después del tratamiento con Hae III como era de esperar, ya que los NORs están asociados a regiones de ADN rico en pares de bases GC en los que existirá una mayor probabilidad de encontrar la diana de restricción de esta enzima. En general, el efecto fue muy intenso sobre estas regiones, incluso mayor al observado con esta endonucleasa sobre centrómeros cromosómicos. Por ello, fue muy difícil evidenciarlos en las microfotografías. Su tinción fue totalmente negativa, originando la ausencia de la banda terminal.

### **3.2. HETEROGENEIDAD DE LA HETEROCROMATINA**

En la Figura 4 aparece el patrón de bandas C obtenido en los animales de objeto del presente estudio. Hemos

observado que un pequeño tratamiento de los cromosomas extendidos y fijados con la endonucleasa de restricción Hinf I, produce una digestión diferencial de los bloques heterocromáticos. El tratamiento posterior de los cromosomas para obtener el bandeo C, produce una tinción diferente en algunas regiones heterocromáticas, resultando un patrón C muy distinto al estándar y mostrándose pues una heterogeneidad entre ellos (Figura 14 a y b). Este hecho fue observado ya por **Hidas y Gustavsson en 1992**.

El patrón de bandas C secuencial al tratamiento con Hinf I resulta muy diferente del convencional. Esto se debe a que ciertos bloques heterocromáticos desaparecen como consecuencia de la digestión con la enzima, mostrando una apariencia muy pálida. La heterogeneidad observada se ha encontrado no sólo entre los bloques



heterocromáticos de los diferentes cromosomas sino dentro de los mismos. En este caso los cromosomas presentan un delgado segmento teñido en

el medio o en la parte distal del bloque heterocromático afectado (Figura 14 b).

## 4.- ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS

### 4.1 TRANSLOCACIÓN ROBERTSONIANA 1/29

Uno de los objetivos propuestos en la realización de la presente tesis doctoral ha sido el análisis de la translocación 1/29, su detección, la evaluación de su incidencia en la población y del efecto de la misma sobre la fertilidad de las hembras portadoras.

En el transcurso del trabajo no se ha encontrado ningún animal portador de ésta anomalía, siendo los valores de fertilidad de la población muy alta, ya que evaluando los resultados de gestación y partos en el total de las hembras, no se

encontró la más mínima reducción, teniendo todas las vacas unos partos absolutamente normales.

### 4.2 POLIMORFISMO CROMOSÓMICO

La Tabla VI muestra las medias obtenidas en el tamaño relativo, el índice centromérico y la razón entre brazos del cromosoma Y de los machos analizados, todos ellos sin relación de parentesco al menos que nos conste, pertenecientes a la raza bovina objeto de la presente tesis. Dos de ellos presentan unas medidas relativas de sus cromosomas Y significativamente mayores que

las medidas del resto (Figura 15).

En la misma tabla VI se muestra los valores medios de los índices centroméricos y la razón entre brazos en todos los animales analizados. En ella podemos observar que los dos animales con altas medidas relativas, presentan a su vez valores de índice centromérico menores que los del resto, siendo sus cromosomas Y más submetacéntricos. El mismo

resultado se ha obtenido atendiendo a la razón entre brazos.

La Tabla VII muestra los resultados del test t de homogeneidad de medias realizado a las medidas anteriores, observándose que las diferencias encontradas son significativas.

## **VI. TABLAS Y FIGURAS**

## TABLA I

Endonucleasa de restricción utilizadas, dianas, tampón de incubación indicado por el fabricante para una actividad del 100%

<b>Endonucleasa</b>	<b>Diana</b>	<b>Tampón de incubación</b>
<b>Alu I</b>	AG↓CT TC↓GA	H
<b>EcoR I</b>	G↓AATTC CTTAA↑G	H
<b>Hae III</b>	GG↓CC CC↑GG	M
<b>Hinf I</b>	G↓ANTC CTNA↑G	H

Tampón H y M: ver página 47

**TABLA II.**

Tamaño relativo promedio de cada par cromosómico

Par cromosómico	Media	$\sigma_{n-1}$	CV	SE
1	50,05	2,83	3,36	0,31
2	46,49	1,82	2,90	0,20
3	43,75	1,51	2,81	0,16
4	42,23	1,21	2,60	0,13
5	41,18	1,17	2,62	0,13
6	39,92	1,24	2,78	0,14
7	39,20	1,02	2,58	0,11
8	38,37	1,19	2,84	0,13
9	37,35	0,96	2,62	0,10
10	36,46	1,11	2,89	0,12
11	35,24	0,83	2,58	0,09
12	34,32	0,71	2,46	0,08
13	33,54	0,62	2,35	0,07
14	32,49	0,85	2,83	0,09
15	31,43	0,79	2,82	0,09
16	30,67	0,70	2,73	0,07
17	30,16	0,75	2,87	0,08
18	29,40	0,56	2,54	0,06
19	28,64	0,68	2,89	0,07
20	28,14	0,73	3,04	0,08
21	27,68	0,77	3,17	0,08
22	26,72	0,95	3,64	0,10
23	25,82	1,01	3,88	0,11
24	25,12	1,02	4,02	0,11
25	24,07	1,07	4,29	0,12
26	23,24	1,20	4,71	0,13
27	22,03	1,22	5,01	0,13
28	20,66	1,49	5,91	0,16
29	18,65	1,82	7,24	0,20
X	57,00	5,47	4,10	0,60
Y	26,98	3,38	6,82	0,37

### **TABLA III**

Comparación de las longitudes relativas cromosómicas obtenidas en esta tesis, con las obtenidas por otros autores

Par cromosómico	Criollo	Lidia	Francesa	Sueca
1	50,05	55,86	54,43	53,86
2	46,49	49,89	48,68	49,46
3	43,75	47,29	45,91	45,23
4	42,23	45,24	44,09	43,5
5	41,18	44,09	42,86	42,35
6	39,92	42,91	41,74	41,2
7	39,20	41,76	40,64	40,2
8	38,37	40,62	39,57	39,48
9	37,35	39,49	38,31	38,12
10	36,46	37,69	37,07	36,97
11	35,24	36,44	35,64	34,89
12	34,32	34,53	34,18	32,88
13	33,54	33,29	32,81	31,66
14	32,49	32,05	31,8	30,87
15	31,43	31,16	30,8	30,58
16	30,67	30,12	29,93	30,01
17	30,16	29,1	29,1	29,22
18	29,40	27,91	28,37	28,68
19	28,64	26,79	27,6	28,48
20	28,14	26,23	26,82	27,57
21	27,68	25,32	26,25	26,71
22	26,72	24,43	25,44	26,71
23	25,82	23,61	24,57	25,56
24	25,12	22,61	23,57	24,77
25	24,07	21,37	22,65	23,76
26	23,24	20,32	21,64	23,12
27	22,03	19,19	20,74	22,47
28	20,66	18,05	19,78	20,22
29	18,65	16,63	18,38	18,09
X	57,00	56	56,32	53,67
Y	26,98	18,4	23,46	24,59

## TABLA IV

### a) Índice centomérico y razón entre brazos para los cromosomas X e Y del bovino Criollo Argentino Patagónico

CROMOSOMA	INDICE CENTOMERICO	RAZON ENTRE BRAZOS
X	37	1,7
Y	46,9	1,13

### b) Distribución de NORs activos por célula analizada.

Media de NORs Activos	Desviación típica	Desviación muestral	Error estándar
5,65	1.35	1,38	±0,318

## TABLA V

**Frecuencia de Intercambios de Cromátidas Hermanas (SCE) en el ganado vacuno Criollo Argentino biotipo Patagónico**

**Valores medios  $\pm$  SEM**

	<b>N° Metafases</b>	<b>SCE <math>\pm</math> SEM</b>
<b>Machos</b>	<b>50</b>	<b>4,6 <math>\pm</math> 1,3</b>
<b>Hembras</b>	<b>76</b>	<b>4,1 <math>\pm</math> 0,8</b>
<b>Total</b>	<b>126</b>	<b>4,2 <math>\pm</math> 1,6</b>



**TABLA VI**

**En esta tabla se muestran tamaño relativo, índice centromerico y razón entre brazos de cromosomas Y de toros normales y polimorficos**

<b>Animales</b>	<b>N<sup>a</sup> de células</b>	<b>Tamaño relativo</b>	<b>Índice centromerico</b>	<b>Razón entre brazos</b>
<b>Referencia</b>	40	26,91±0,22	47,56±0,20	1,09±0,17
<b>Toro 1</b>	30	29,42±0,51	38,67±0,29	1,58±0,16
<b>Toro 21</b>	35	29,61±0,32	44,34±0,49	1,50±0,17

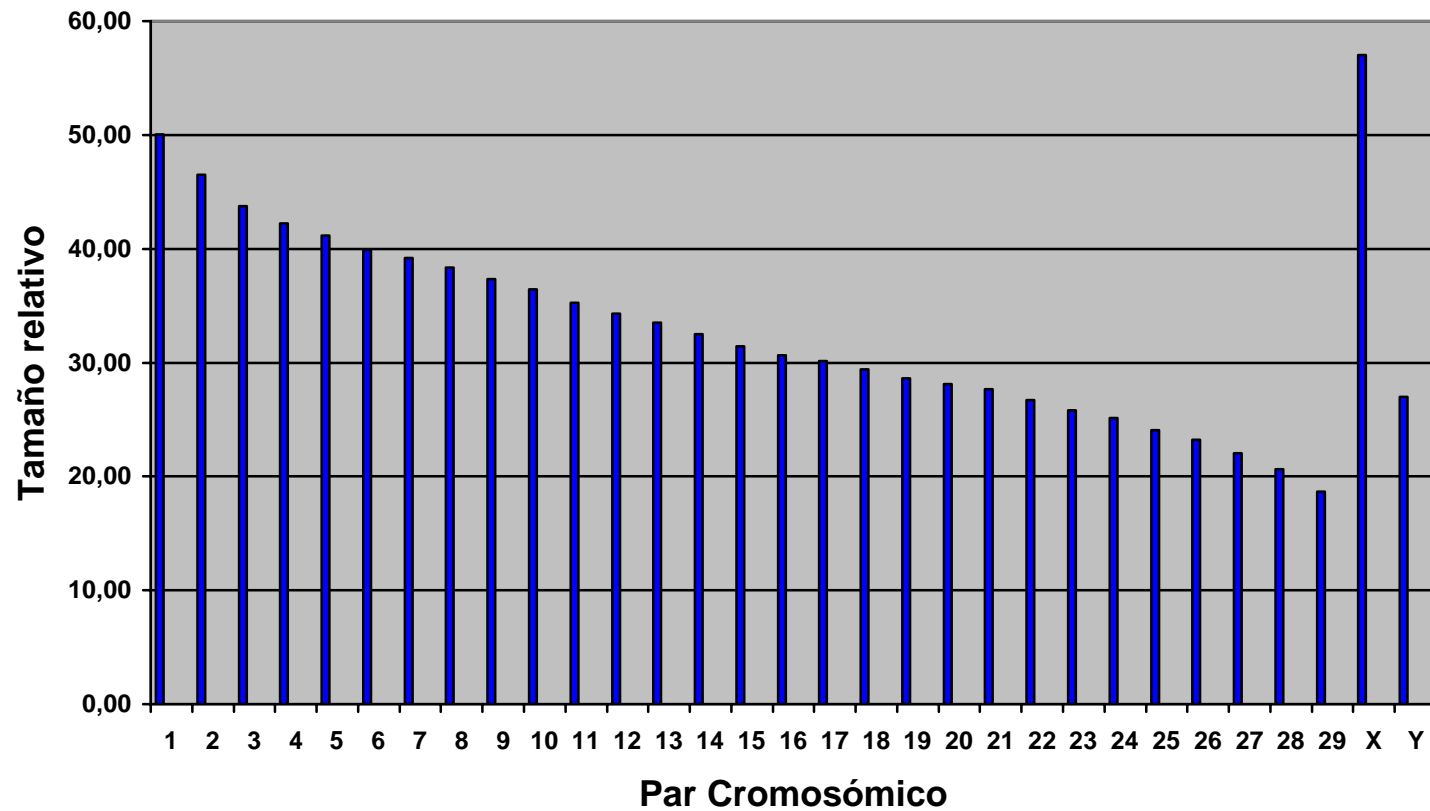
## TABLA VII

### Comparación del tamaño relativo del cromosoma Y

<b>Tamaño relativo</b>		<b>t</b>	<b>significancia</b>
<b>Toro referencia 26,91</b>	Toro 1 29,42	4,38	p<0,001
<b>Toro referencia 26,91</b>	Toro 2 29,61	6,79	p<0,001

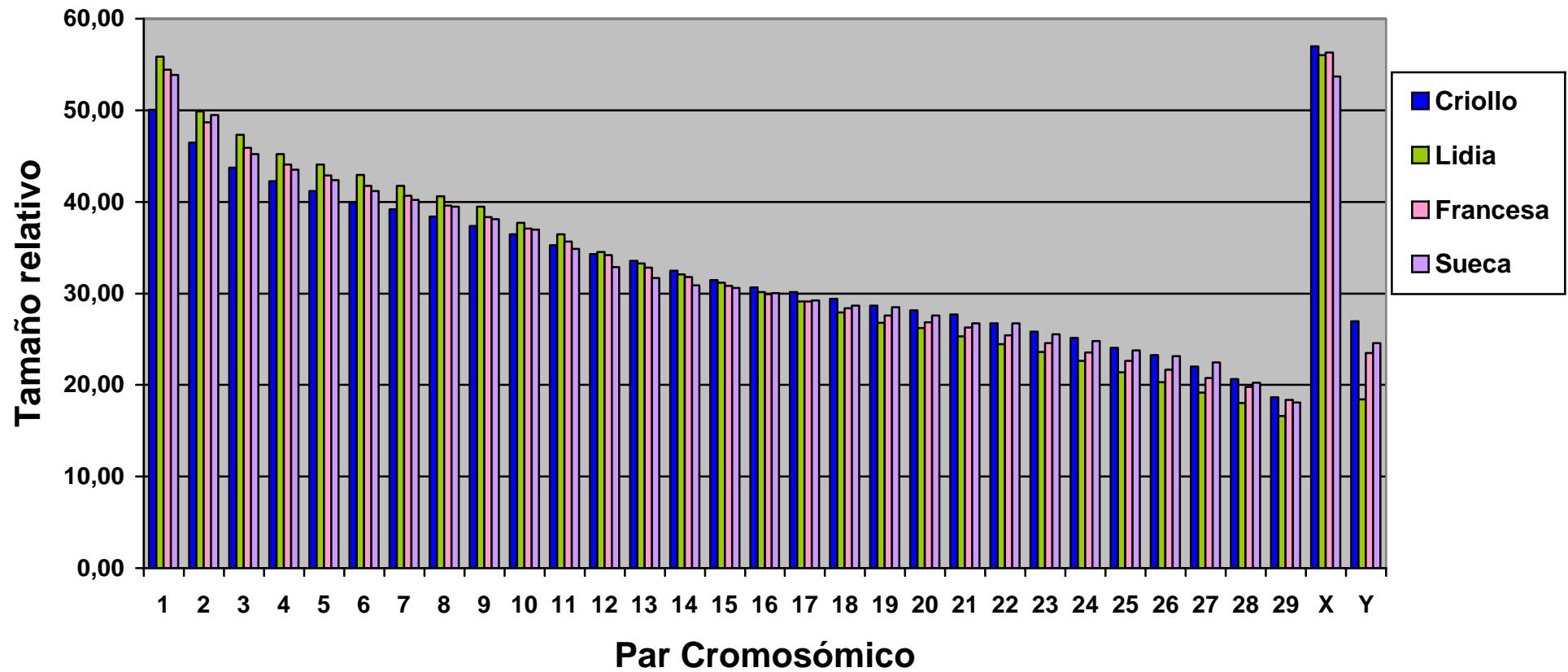
# FIGURA 1

## Tamaño cromosómico del bovino Criollo Argentino Patagónico

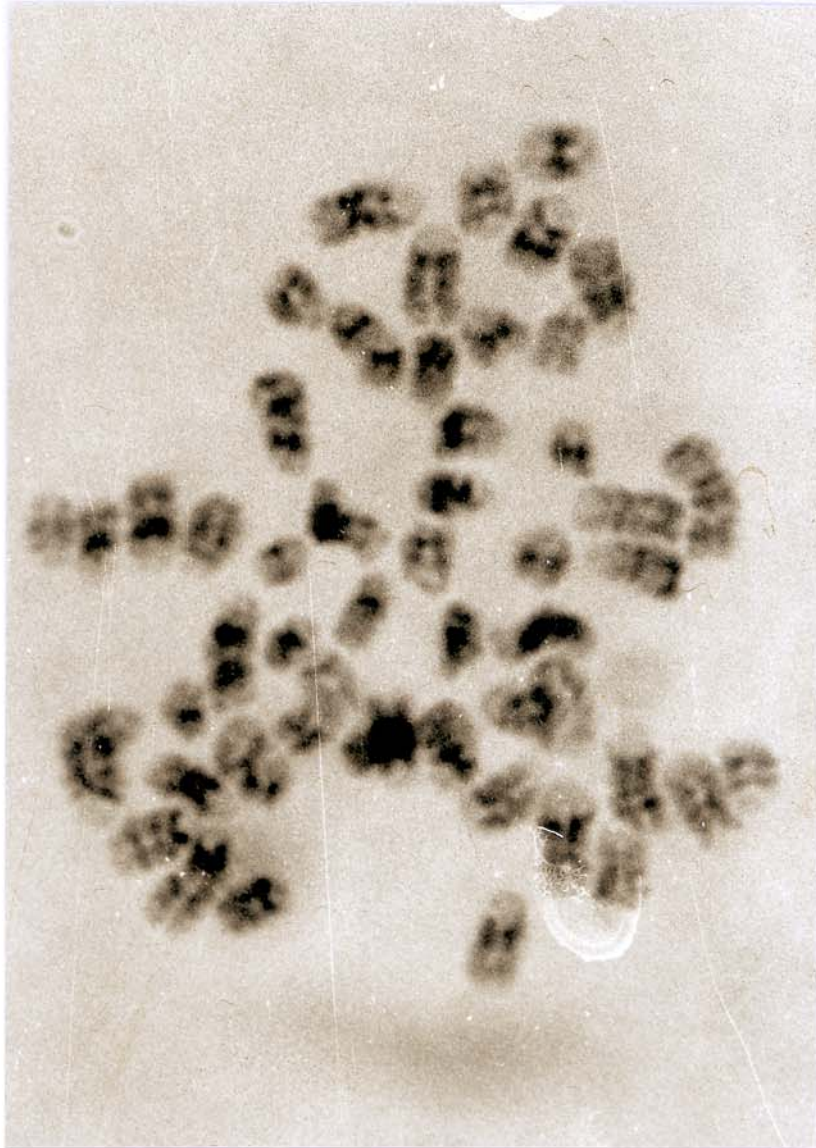


**FIGURA 2**

**Comparación del tamaño cromosómico relativo en distintas razas Bovinas**

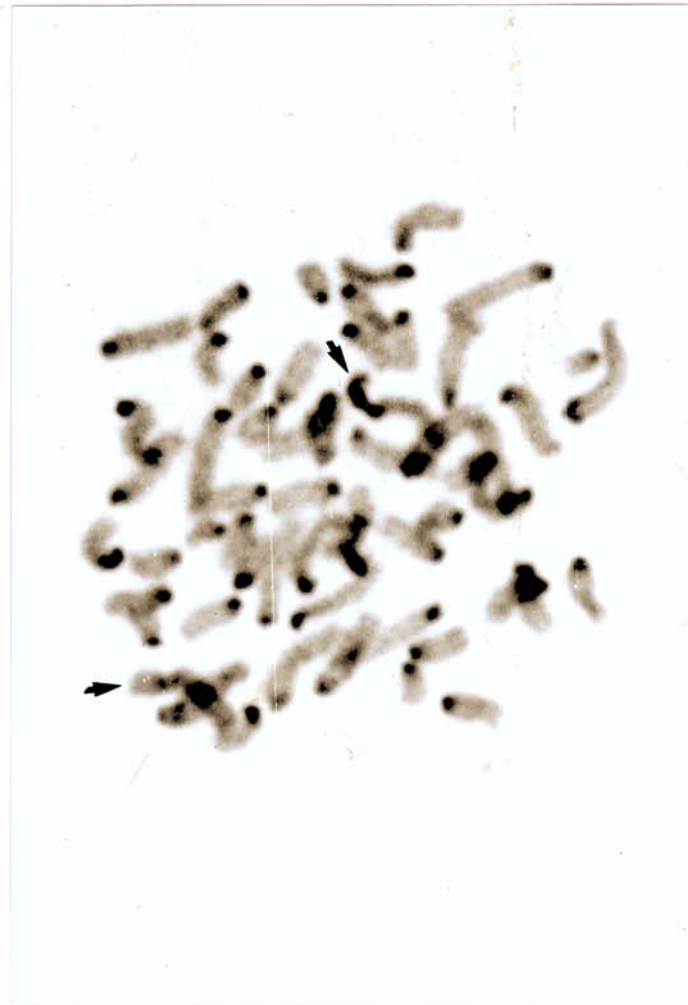


**FIGURA 3**



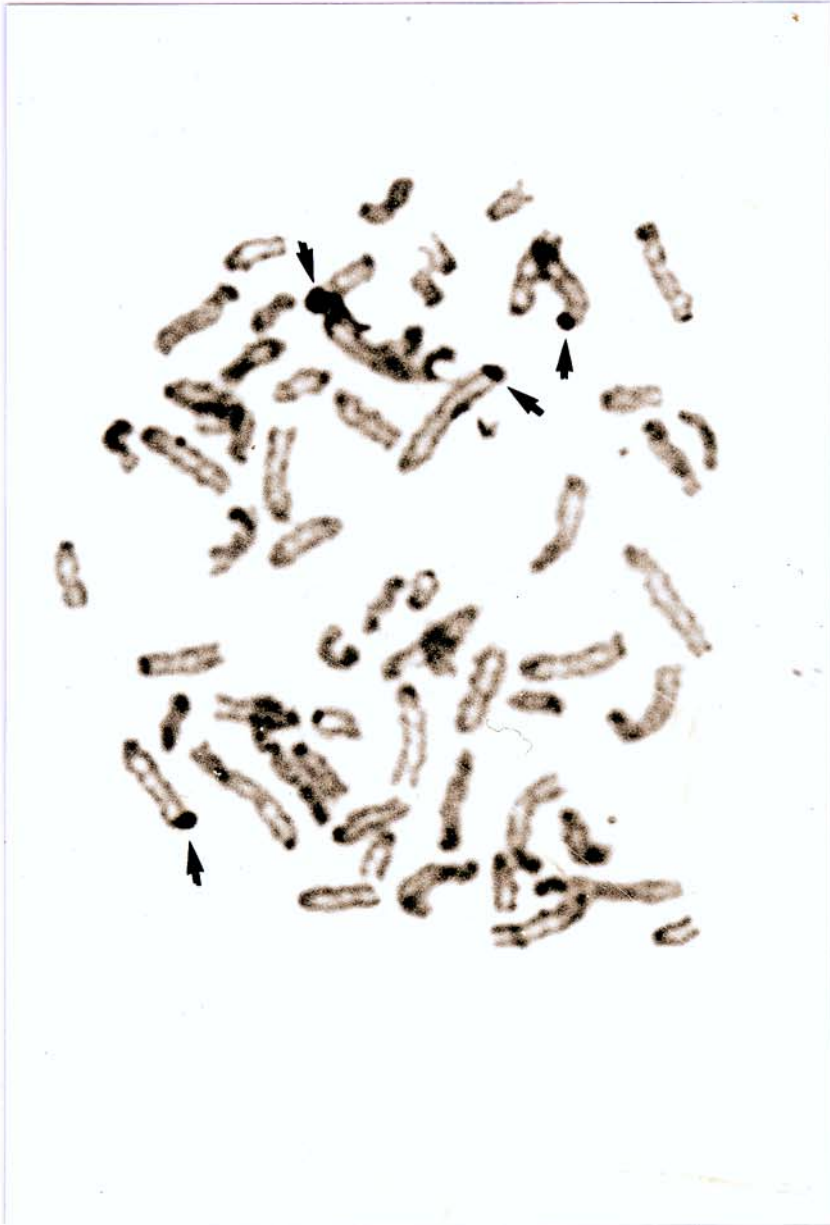
**Metafase mostrando bandeio GTG**

**FIGURA 4**



**Metafase mostrando bandeo CTG.  
Los cromosomas X e Y están señalados**

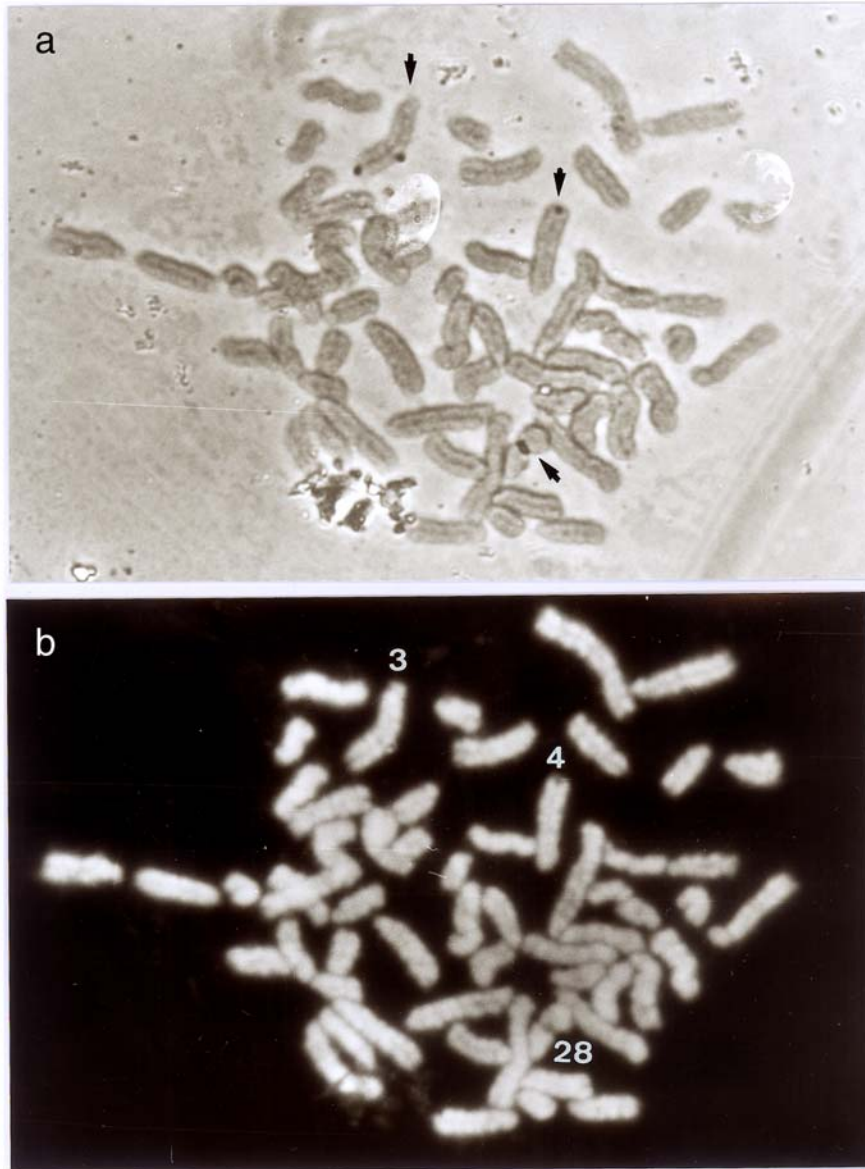
**FIGURA 5**



**Metafase mostrando NORs.**

**FIGURA 6**

**Bandeo secuencial R-NOR: a) Metafase mostrando cromosomas con NORs activos. b) La misma metafase en bandeo R, con identificación de los cromosomas portadores.**



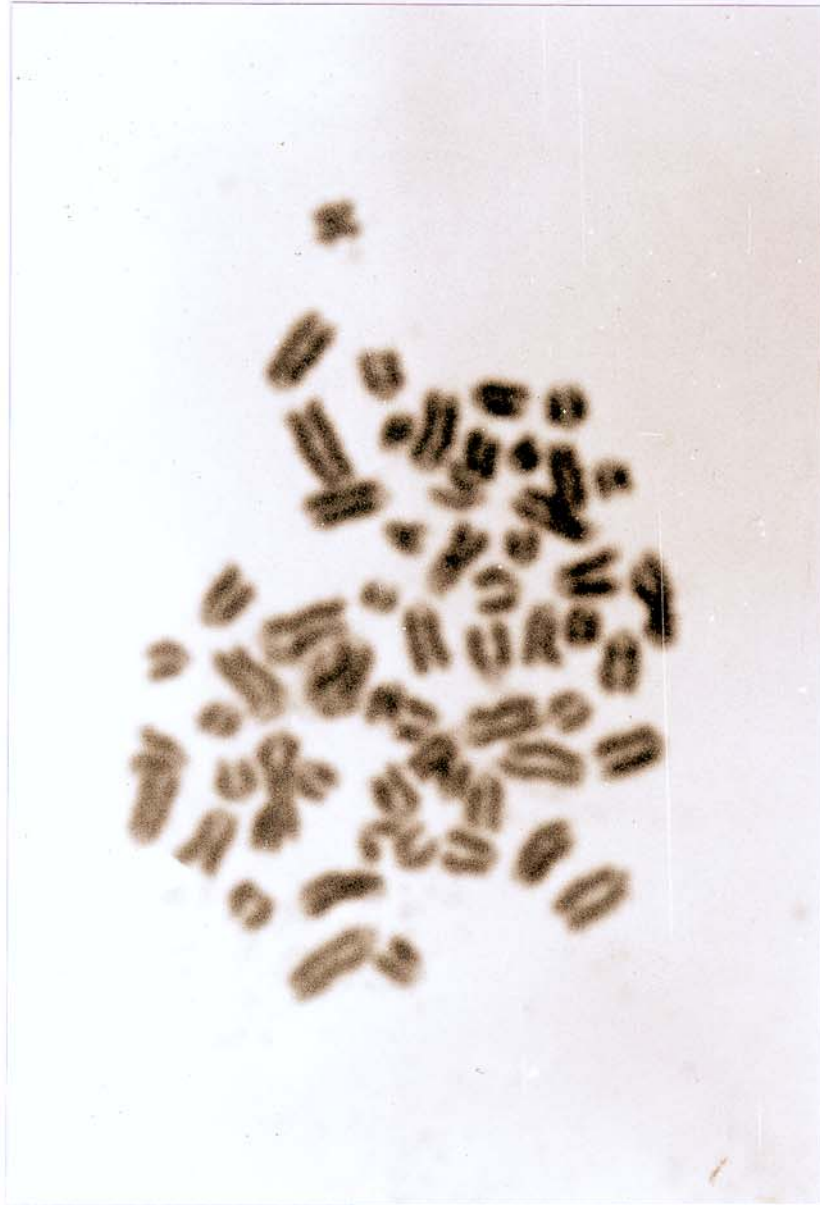


**FIGURA 7**



**Metafase mostrando NORs. activos asociados**

**FIGURA 8**



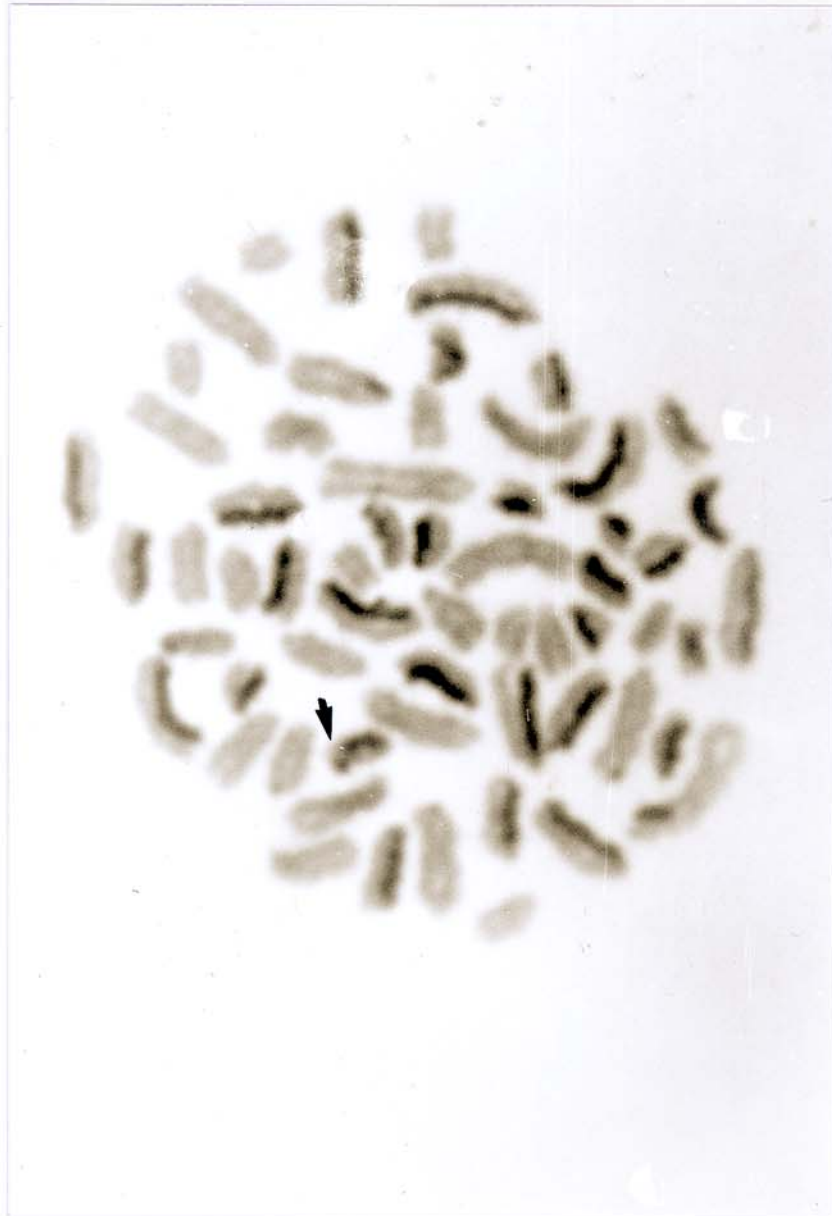
**Metafase M1 mostrando todos sus cromosomas sin diferenciación cromatídica**

**FIGURA 9**



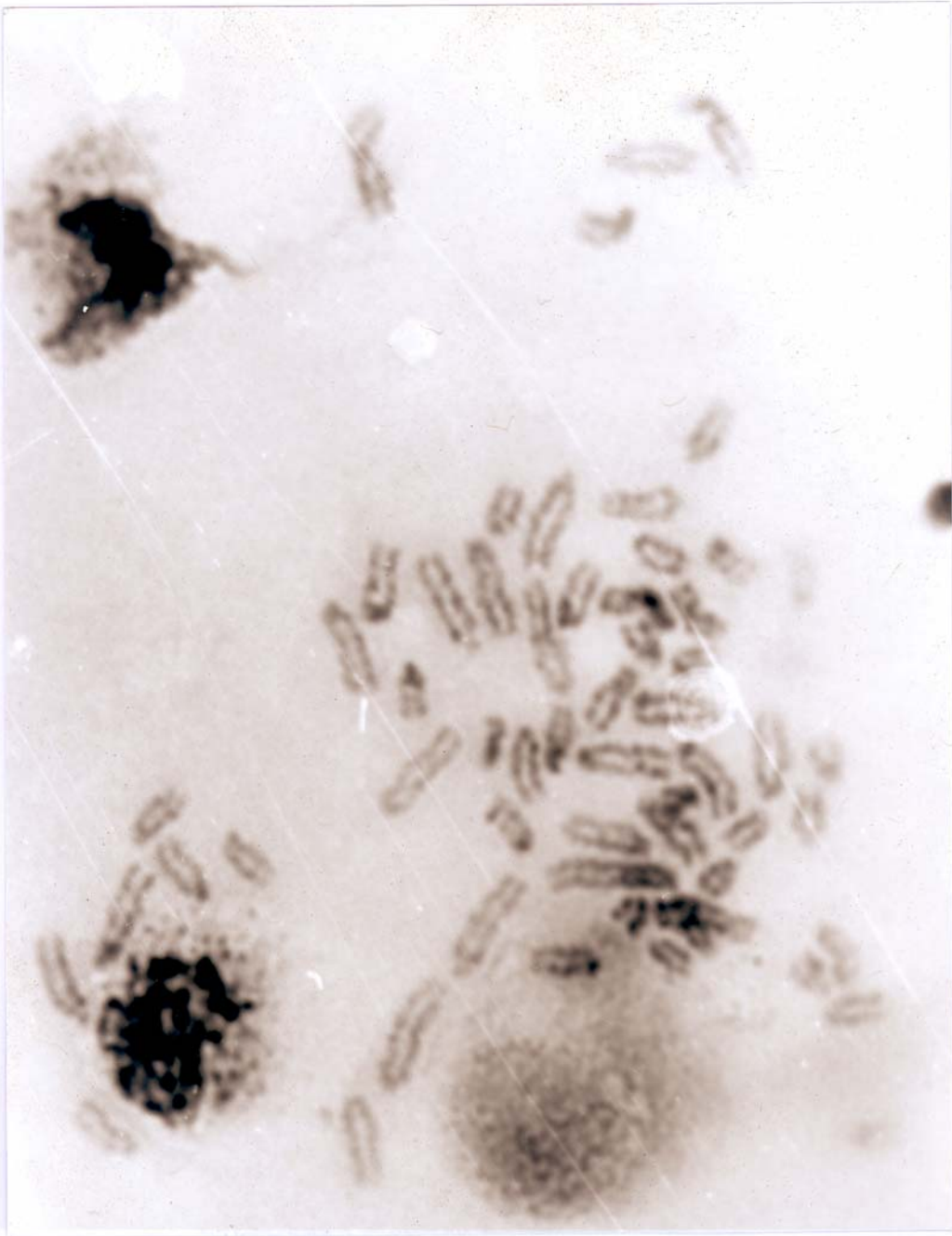
**Metafase M2 mostrando todos sus cromosomas con diferenciación cromatídica. Las flechas indican los intercambios presentes.**

**FIGURA 10**



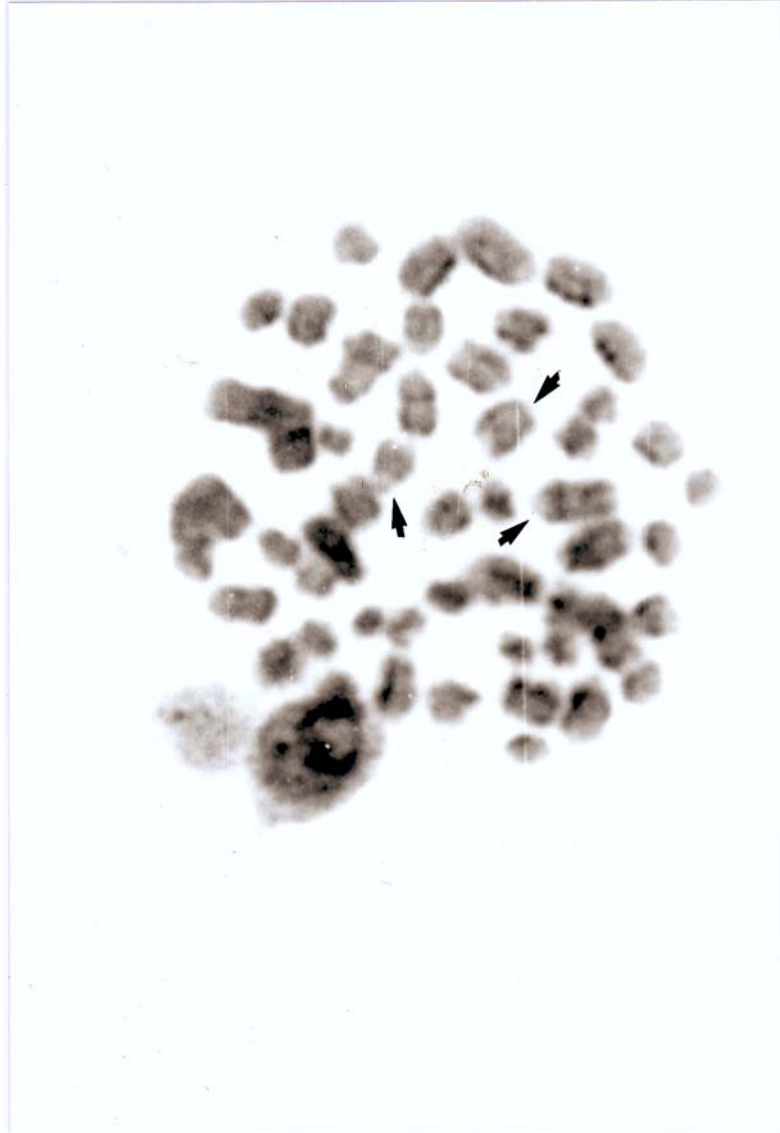
**Metafase M3 mostrando algunos cromosomas con diferenciación cromatídica. La flecha indica un intercambio presente.**

**FIGURA 11**



**Metafase mostrando modelo de bandeado inducido por Alu I.**

**FIGURA 12**

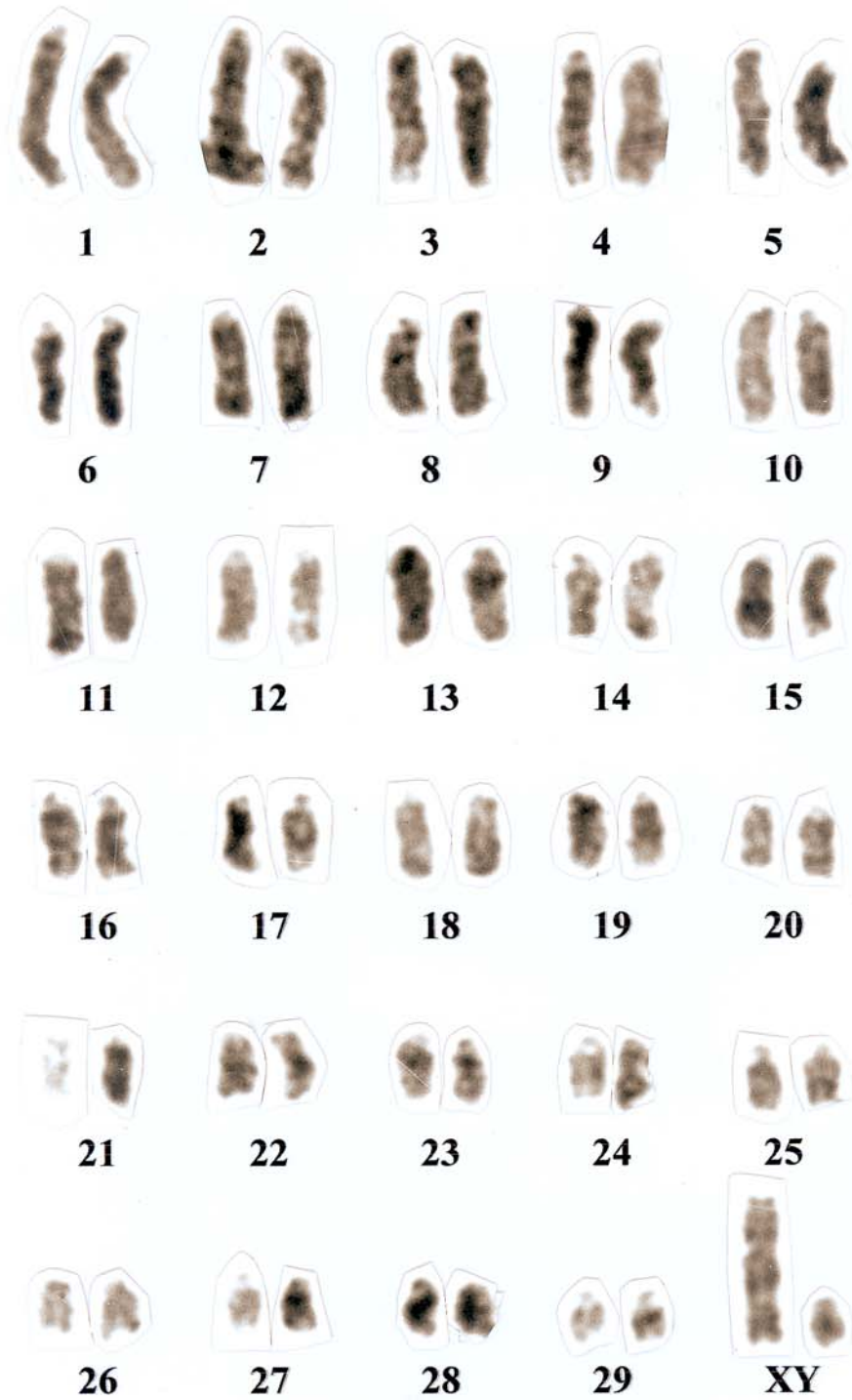


**Metafase mostrando modelo de bandeo inducido por Alu I.  
Las flechas indican regiones intensamente digerida formando banda C  
negativa**



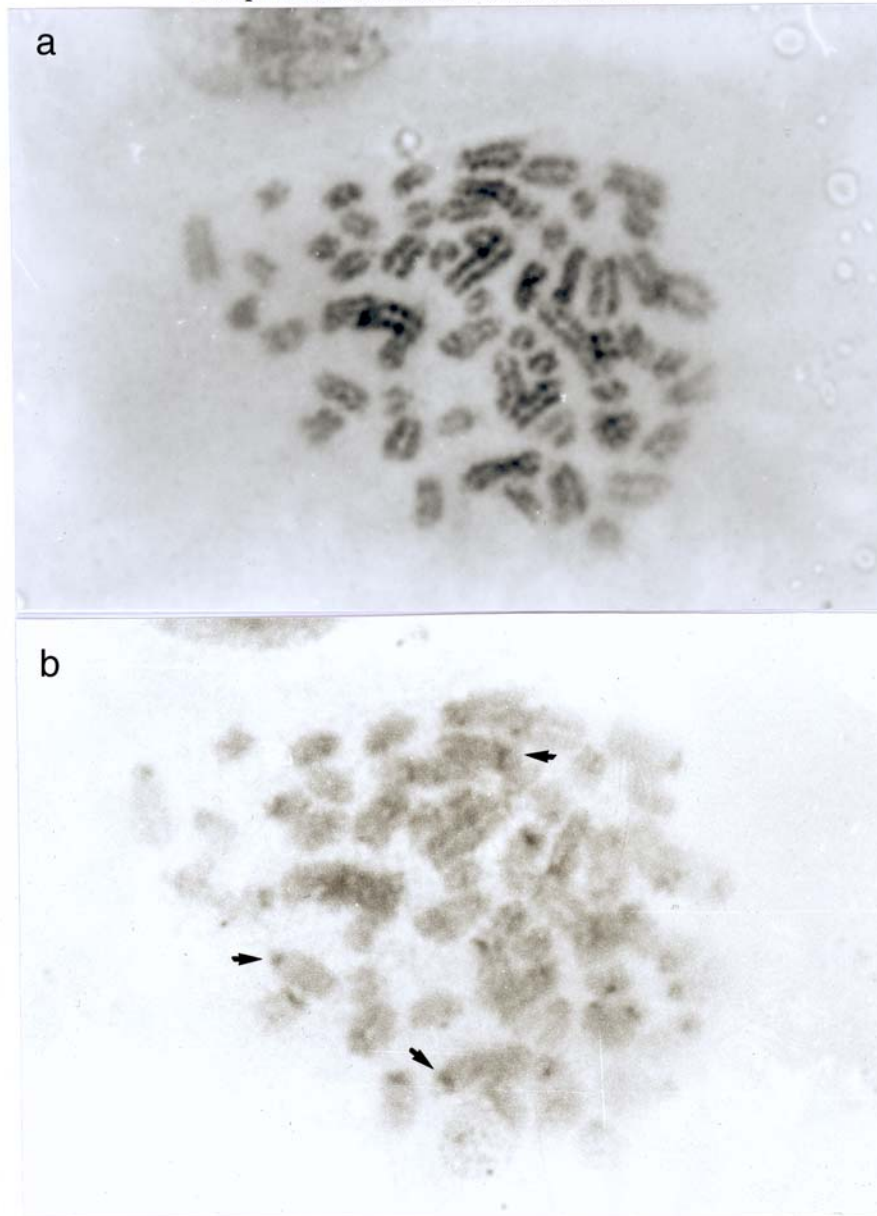
### FIGURA 13

Cariotipo de bandeo G-HaeIII obtenido por digestión de los cromosomas metafásicos y teñidos con Giemsa.



### FIGURA 14

Tratamiento con Hinf I y subsiguiente bandeado C en una placa metafásica: a) El tratamiento con la enzima revela una diferente resistencia de la heterocromatina. b) La misma metafase en bandeado C. Las flechas señalan algunos bloques heterocromáticos que mantienen una parcial estabilidad a la coloración.





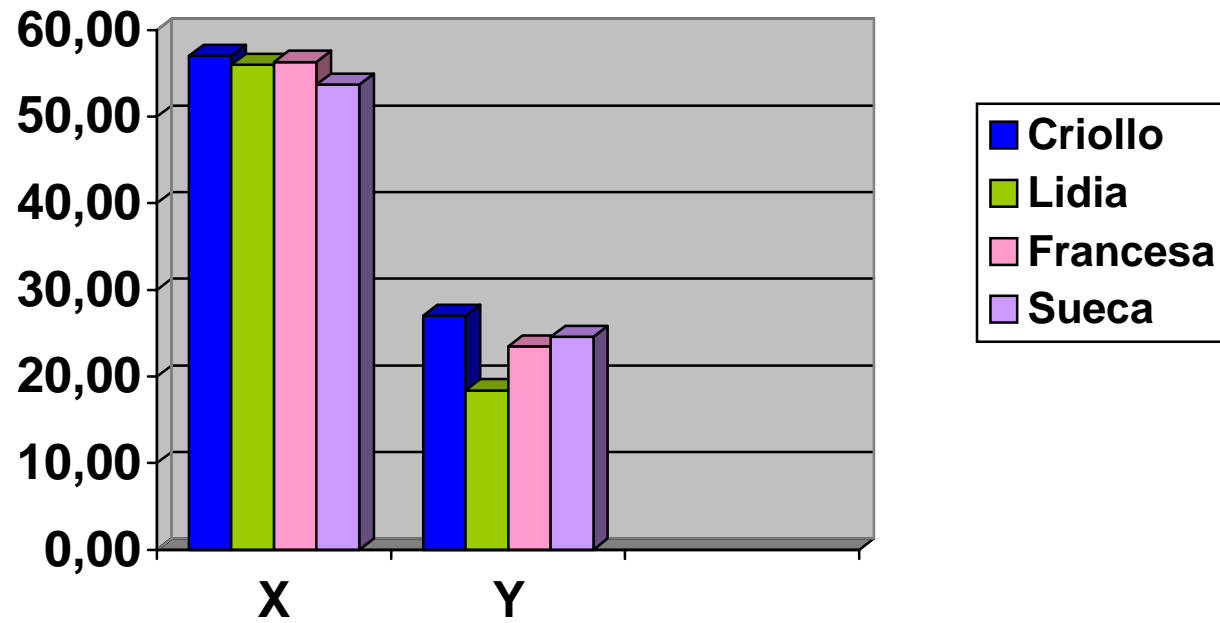
**FIGURA 15**



**Metafase mostrando un cromosoma sexual Y anormalmente largo y claramente submetacéntrico.**

**FIGURA 16**

**Comparacion del tamaño relativo del cromosoma X e Y en distintas razas bovinas razas bovinas**



## **VII. DISCUSIÓN**

## 1.- MEDIDAS CROMOSÓMICAS

### 1.1. LONGITUDES RELATIVAS MEDIAS DE LOS DIFERENTES PARES CROMOSÓMICOS

En la tabla III y en la figura 2 se indican los valores de las longitudes relativas medias calculadas en esta tesis para el ganado bovino Criollo Argentino Patagónico, y las obtenidas por otros autores como **Gustavsson (1969)** en la raza Roja y Blanca Sueca; **Cribiu y Popescu (1974)** en varias razas francesas y por **Arruga y Zarazaga (1985)** en el ganado de lidia. Al comparar estos valores se puede observar que, en los diez primeros pares,

los cromosomas del ganado criollo son menores a los de las otras razas. A partir del par once los cromosomas de ganado criollo están muy cerca de los valores de las otras. Para finalmente superar a las razas de Lidia y francesas. Estas características cromosómicas particulares, evidencian la posible variación que se presenta en una especie, esto nos permite pensar en la importancia de construir los ideogramas para detectar la presencia de polimorfismos en algunos autosomas.

Cuando comparamos los valores de las longitudes relativas medias de los

cromosomas sexuales, observamos un mayor tamaño tanto para el cromosoma X como para el Y.

**Sharma y Raman (1973) y Nanda y Raman (1981)** sugirieron que el alargamiento en el tamaño del cromosoma X en los mamíferos, mediante la adición de heterocromatina, fue acompañada del alargamiento del cromosoma Y. Según estos resultados, el cromosoma Y adquirió un carácter heterocromático y, por ello, probablemente quedaría implicado en el incremento de ADN rico en AT de la región paracentromérica del

cromosoma X. Para **Sharma y Raman (1973)** éste incremento conservaría la paridad cuantitativa de la heterocromatina de los cromosomas sexuales .

En concordancia con otros autores (**Darré y col., 1974 y Arruga y col., 1982**) la población estudiada en ésta tesis muestra, evidentemente, que la mayor diferencia de tamaño se produce en el cromosoma Y, como puede observarse en la figura 16.

## **2.- LA DISTRIBUCIÓN CROMOSÓMICA DE LOS DIFERENTES PATRONES DE BANDEOS CLÁSICOS EN LOS BOVINOS CRIOLLOS PATAGÓNICOS**

Como en otras especies animales, los cromosomas de

los bovinos Criollos estudiados en la presente tesis, poseen

patrones de bandeo constantes y distintivos para cada pareja de cromosomas, lo que permite, en unos casos, la identificación de sus estructuras. Estos hechos son de máximo interés si tenemos en cuenta que los cromosomas de una gran parte de las especies, incluida la familia Bovidae, son de morfología semejante. Los resultados obtenidos ponen de relieve que el patrón de bandas se encuentra conservado.

No obstante, la resolución proporcionada por cada patrón de banda en cada brazo cromosómico no sólo depende del número de bandas obtenidas en cada pareja de cromosomas, sino también de su tamaño, su intensidad de tinción y su posición relativa (Evans y col 1973).

## **2.1.- LA LOCALIZACIÓN DE LAS BANDAS C FUE CENTROMÉRICA**

Los resultados obtenidos sobre bandeo C, fueron similares a los obtenidos por **Buckland y Evans (1978)**, confirmando las características de las zonas donde se localiza la heterocromatina constitutiva del ganado vacuno.

Las bandas C de los bovinos analizados se localizaron con exclusividad en las regiones centroméricas y han servido, clásicamente, para observar, como hemos dicho anteriormente, las regiones ricas en heterocromatina constitutiva (**Sumner, 1972**).

Hay aclarar que no sólo en las regiones centroméricas se encuentra la heterocromatina constitutiva, ni todas las bandas C se corresponden con ésta heterocromatina (**Catala y col., 1981**). Además hay que decir también que el bandeo C no puede diferenciar entre heterocromatina que posea una o varias familias de ADN

repetitivo (**Bianchi, 1990; Miller y col. 1983**). En relación a todo esto muy diversos autores han citado el hecho de que no todos los bloques heterocromáticos se encuentran situados en la región centromérica de los cromosomas, sino en otras partes del cromosoma, como puede ser la zona intersticial del cromosoma X. Este hecho es importante en algunas especies de manera que puede tomarse como medida de diagnóstico de anomalías ligadas a los cromosomas sexuales X, como ocurre en el ganado equino (**Moreno Millan y col., 1989**).

Por otro lado, los cromosomas sexuales difieren de los autosomas en la escasa cantidad de heterocromatina que son capaces de expresar. Según nuestros resultados, debemos exceptuar al cromosoma Y que aparece con frecuencia completamente teñido, aunque débilmente, indicando la existencia de ADN

satélite sobre toda la longitud del cromosoma. Este resultado también fue observado por **Buckland y Evans (1978)**. Sin embargo, **Popescu (1989)** parece discrepar de lo anteriormente dicho, puesto que localizaba la heterocromatina del cromosoma Y sobre la mitad del brazo corto.

En segundo lugar, hemos observado variabilidad en la proporción de heterocromatina centromérica en los cromosomas de los bovinos estudiados. **Buckland y Evans (1978)** indicaron que constituyen la propiedad estructural menos conservada de los cromosomas durante la evolución de las especies.

## 2.2.- BANDEO GTG

La descripción del patrón de bandas G ha sido homogeneizada por la Conferencia Internacional para la Estandarización del Cariotipo

de Animales Domésticos (ISCNDA, 1990). Nuestros resultados revelan básicamente las características que la ISCNDA da para los cromosomas de esta especie. No obstante hemos tratado de detectar las características que en 1994 **Kaftanovskaya y Serov** observaron sobre algunos cromosomas, confirmado en un trabajo posterior por **Fernández (1995)**. Se trata de poner de relieve algunas bandas supracentroméricas en determinados cromosomas, con apariencia de muy pequeño brazo corto (cap-like band). Estas características las hemos detectado en aquellos autosomas donde las bandas heterocromáticas han sido más amplias, por ejemplo los cromosomas 1, 2, 3, 4 y 6 del bovino Criollo, apareciendo algo semejante a un brazo corto más teñido con la técnica de bandeado GTG.

Otra característica que hemos querido observar es la descrita por los mismos autores referida a la localización en la región paracentromérica de los cromosomas 1, 16, 22 y 26, de unas bandas adicionales en la especie vacuna y que no aparecieron recogidas estas bandas en los cromosomas 22 y 26 según el ideograma de la **ISCNDA (1990)**. Mediante bandeado GTG estos bandeos adicionales no han sido observados por nosotros con suficiente claridad.

### 2.3 BANDEO SECUENCIAL R-NOR

Las Regiones del Organizador Nucleolar (NOR) se han localizado en posición terminal en un total de cinco pares de cromosomas, los correspondientes a los pares 2, 3, 4 11 y 28, no observándose ninguna estructura similar en otra posición, como podría tratarse de alguna constricción



secundaria. La identificación de los cromosomas portadores coincide con los propuestos por **Di Berardino y col. (1985)**, no encontrándose más diferencia que la propia de la presencia de NORs activos en las células.

En este sentido hemos de hacer referencia al hecho de que el número promedio de NORs activos es característico de cada animal, poniéndose así de relieve una diferenciación intraindividual fruto, como sugirieron **Mayr y col (1987)** en esta especie, de la existencia de diferentes tipos de poblaciones celulares que se distinguen por su diferente número de organizadores activos.

Otro hecho al que hay que hacer referencia es el de la presencia de asociaciones entre cromosomas portadores de NORs activos. Estas asociaciones tienen su origen en la formación de los nucleolos, ya sea porque dos o más

cromosomas estén implicados en su formación (por un proceso de sinergismo) o por la ocurrencia de una fusión entre dos o más cromosomas durante la interfase para su formación (**Henderson y Bruère, 1977**).

Los complejos de asociación entre varios cromosomas portadores de NORs activos son más frecuentes si poseen mayores cantidades de rDNA o bien cuanto mayor sea la tinción de plata (Ag), que depende de la actividad NOR (**Moreno Millán 1988**).

## 2.4 INTERCAMBIOS DE CROMÁTIDAS HERMANAS (SCE)

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, con un promedio de 4,2 intercambios por célula, nos muestran unos valores de intercambios de cromátidas hermanas inferiores,

significativamente, a los obtenidos por otros autores, en otras razas bovinas y en animales sanos. Así **Rangel-Figueiredo y col. (1995)** obtuvieron unos valores en la raza Maronesa (Norte de Portugal) de 6,6 intercambios por célula, mientras **Iannuzzi y col (1991)** obtuvieron valores de 7,9; 7,1 y 7,3 intercambios en las razas Podolian, Friesian y Romagna respectivamente. En éste último caso se pusieron de manifiesto unas diferencias significativas entre las dos primeras.

Se ha observado que cuando se analizan los intercambios de cromátidas hermanas en animales o células de cualquier especie sometidos a condiciones de experimentación, se produce un incremento significativo en su número ( **Catalán y col. 1993;** **Ocaña Quero y col. 1997**). Por otra parte también se ha observado que animales

vacunos portadores de la translocación robertsoniana 1/29 presentan un incremento en el número de Intercambios de forma significativa, de modo que puede llegar hasta valores de 8,1 en el caso de homocigotos para dicha translocación (**Rangel-Figueiredo y col. 1995**). Estos estudios se han llevado a cabo en razas muy seleccionadas, estando situada la raza objeto de nuestro estudio dentro de lo que podríamos denominar razas naturales, es decir, razas sobre las que el hombre no ha intervenido en mucho tiempo.

En este sentido, en la presente tesis se ha estudiado una población sobre la que solamente ha actuado, por un determinado tiempo, la selección natural. A la vista de todo ello podríamos concluir que, a pesar de que existen realmente diferencias entre razas en cuanto al número de intercambios, la población

estudiada representaría una situación particular y característica, ya que dicho número de intercambios es muy bajo y podría ser indicativo de estabilidad, habida cuenta además de que en ésta raza no se han encontrado animales portadores de alteraciones cromosómicas como la citada translocación robertsoniana 1/29.

Por último hemos referimos al hecho de que en nuestro trabajo no hemos encontrado diferencias significativas entre sexos, al igual que algunos autores han detectado en otras razas (Catalán y col. 1995; Rangel-Figueiredo y col. 1995).

### 3.- SUSCEPTIBILIDAD DE LA CROMATINA A LAS ENDONUCLEASA DE RESTRICCIÓN EN CROMOSOMAS FIJADOS DE BOVINO

Los resultados obtenidos en esta tesis fueron coincidentes con los de Ueda y col. (1987) con respecto a la clasificación, que por sus efectos, se pueden agrupar las diferentes endonucleasas. Esta

clasificación es la siguiente:

A) Enzimas que no tuvieron efecto aparente como la EcoRI.

B) Enzimas que produjeron bandas G y bandas C como la Hae III y la Hinf I.

C) Enzimas que sólo indujeron la formación de bandas C como la AluI.

Dada la similitud de nuestros resultados con los de otros autores como Miller y col. (1984) y Zhang y Dong (1989) en cromosomas metafásicos humanos, y los de

**Ueda y col. (1987)** en cromosomas de muntjac indio (*Muntiacus muntjak*, L.), hemos asumido la misma explicación dada por estos autores sobre el mecanismo de bandeo con enzimas de restricción para cromosomas de los bovinos. Así la cantidad de ADN extraído por una endonucleasa dada es proporcional a la frecuencia de las dianas de reconocimiento. Fragmentos de ADN cortos, de tamaño comprendido entre 350-200 pares de bases serían extraídas (**Miller y col. 1984**) mientras que los fragmentos mayores de 1000 pares de bases quedarían retenidas (**Bianchi y col. 1990**).

Los tratamientos realizados con endonucleasas, como Alu I, provocaron una disminución generalizada de la tinción cromosómica de los cromosomas fijados de la especie en estudio. Esta disminución de la tinción, supone una extracción

generalizada del ADN cromosómico, con excepción de cierta cantidad de ADN satélite de la región heterocromática de las bandas C. Estos resultados coinciden con las observaciones de **Hörz y col. (1974)** en cromosomas humanos con las que se demostraron que Alu I es capaz de degradar intensamente el ADN de la banda principal de la cromatina y, en cambio, respetar ADN satélite.

Otras endonucleasas de restricción utilizadas en el presente trabajo, como Hae III o Hinf I, también respetaron ciertas regiones de ADN satélite mientras que degradaron en mayor medida a otras. Sus efectos sobre el ADN del resto de la eucromatina localizada en los brazos cromosómicos fueron homogéneos en la especie analizada.

Así mismo **Miller y col. (1983)** y **Mezzanotte y col. (1983a,b)** demostraron que el

efecto de la digestión de algunas endonucleasa de restricción sobre los cromosomas fijados consistió en la reducción casi uniforme de la tinción sobre la eucromatina y no de toda la heterocromatina. Por ello, no fue sorprendente observar resultados similares con enzimas como la Alu I, aplicados a cromosomas metafásicos del ganado vacuno. En cambio, Hae III produjo un patrón fiable, similar al bandeo bandeo G. Este mismo efecto ha sido observado sobre cromosomas fijados de otros mamíferos, permitiendo una identificación cromosómica menos confusa que con las otras endonucleasas empleadas en este trabajo.

Por otro lado, aunque existe aún gran controversia sobre los mecanismos de bandeo con endonucleasas de restricción, algunos autores, indicaron que el ADN de todas las regiones cromosómicas

tienen la misma accesibilidad (Miller y col. 1983., Bianchi y col. 1985), mientras que otros, sugieren que el enrollamiento diferencial de la cromatina puede afectar la accesibilidad de la enzima (Mezzanotte y col. 1985 y Burkholder, 1989). Los estudios ultraestructurales han mostrado el contraste existente entre la naturaleza fuertemente empaquetada de la heterocromatina y las regiones adyacentes no heterocromáticas (no bandeadas con bandeo C) representada por fibras organizadas libremente (Elsbeth y col.1985). Por esta razón, la presencia de bloques que se diferenciaron en la resistencia mostrada después del tratamiento con Alu I y Hae III, y particularmente con Hinf I, en regiones heterocromáticas de los cromosomas bovinos, podría indicar que la accesibilidad a la acción enzimática estaría restringida por la conformación de la cromatina.

Existe una clara unanimidad, entre los autores consultados, de los efectos de las endonucleasas de restricción sobre las fracciones eucromáticas. Sin embargo no existió tal unanimidad en la heterocromatina de los cromosomas fijados. En este trabajo hemos encontrado que la respuesta de los cromosomas fijados de esta especie en estudio a dos endonucleasas de restricción (Alu I, Hae III) fue, en general, semejante a la observada por **Bianchi y col. (1990)** en el alce (*Alces alcep, L.*) con estas mismas enzimas.

Cuando los cromosomas fijados son tratados con Hinf I y posteriormente tratados para obtener bandeo C, se ha observado una muy diferente susceptibilidad de los bloques heterocromáticos durante el tratamiento de bandeo, apareciendo zonas fuertemente teñidas en algunos cromosomas, mientras otros aparecen

homogéneamente teñidos. Este hecho pone de relieve que hay que profundizar en el estudio de las enzimas de restricción que inducen un cierto patrón de bandas o que producen cambios, aparentemente sin efectos visibles, pero que sí producen un ataque diferencial de los bloques heterocromáticos.

Ya **Mayr y col (1973)** observaron que los bloques heterocromáticos en el bandeo C en el ganado vacuno aparecían como muy homogéneos e incluso después de digestiones con diversas enzimas (**Hidas y Gustavsson, 1992**). Los resultados obtenidos en el presente trabajo, confirman los obtenidos por **Hidas (1995)** en el sentido de que no cumple la esperada homogeneidad de los cariotipos o bien de los grupos de cromosomas acrocéntricos como lo sugirieron **Dod y col (1989)**. Al igual que **Hidas**

pensamos que el proceso de homogeneización del ADN satélite, puede estar incompleto o en un estadio intermedio del proceso de evolución cromosómica bovina.

Además la aplicación de esta metodología puede ser de suma importancia de cara al estudio de las regiones heterocromáticas de los cromosomas metafásicos, e incluso puede permitir analizar específicamente alteraciones cromosómicas en las que estén implicados bloques heterocromáticos, como es el caso de la translocación 1/29.

En definitiva, la susceptibilidad de los cromosomas fijados a la acción de diferentes endonucleasas de restricción, seguida de tinción con Giemsa, proporciona una herramienta de gran gran

utilidad como alternativa a otros métodos de examen del ADN satélite altamente repetitivo (Miller y col. 1983). La necesidad de una alternativa surgió del hecho de que las técnicas de HIS (Hibridación in situ de ácidos nucleicos), aunque aplicados con éxito al estudio del ADN altamente repetitivo en los bovidos (Kurnit y col. 1973), presentaron como limitación mas importante las fuertes reacciones de hibridación cruzada del ADN satélite a consecuencia de las homologías existentes entre sus componentes (Frommer y col. 1982, Gosden y col. 1975., Cooke y Mckay 1978., Beauchamp y col. 1978).

#### **4.- RESPUESTA DE LOS NOR A LAS ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN**

La respuesta diferencial de los NOR al tratamiento con Hae III ha sido observada en una gran variedad de organismos (**Bianchi y Bianchi, 1987, Ueda y col., 1987, Cau y col, 1988, López Fernández y col., 1989 y Padilla y col., 1993**). El resultado es una tinción muy débil e incluso la ausencia total de tinción (huecos) (**Sanchez y col. 1990**). Por ésta razón, teniendo en cuenta la posición telomérica donde se localizan los NOR en la especie analizada en esta tesis, fue posible detectarlos como finos elementos muy digeridos sobre unos cromosomas y prácticamente imperceptibles en otros (ésta diferencia de efecto fue debido quizás a motivos puramente técnicos). Este efecto ha sido explicado por la alta frecuencia de secuencias ricas en GC en estas áreas cromosómicas (**Sanchez y col. 1990**). Más concretamente, ésta ausencia de tinción indicaría

una elevada frecuencia de dianas de restricción que provocó la práctica eliminación del telómero cromosómico. El resto de las endonucleasas utilizadas mostraron un efecto similar al que produjeron sobre el resto del cromosoma, indicando una escasa frecuencia de dianas de restricción.

En otras especies de vertebrados han sido observado resultados similares, en los que Hae III originó digestión intensa, mientras que otras endonucleasa de restricción como Alu I produjeron un ligero efecto con pocas o ningunas secuencias dianas en estas áreas cromosómicas (**Cau y col. 1988, Sanchez y col. 1990, Padilla y col. 1993**).

Esta similitud de efectos entre diferentes especies pueden ser explicados por la conservación de la organización de la estructura de la cromatina de las regiones NOR en los



vertebrados. Así, las cromatinas de los NOR presentan una organización en filamentos extendidos de estructura no-

nucleosómicas (**Derenzini y col. 1987**), que como sugirieron **Sanchez y col. (1990)** facilitaría el ataque enzimático.

## 5.- ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS

### 5.1 LA TRANSLOCACIÓN ROBERTSONIANA 1/29

En el transcurso de este trabajo no se han encontrado alteraciones cromosómicas de número ni estructurales, siendo la primera vez que se pone de manifiesto en una raza de las denominadas Criollas. Estos animales, además, muestran una alta fertilidad.

Los resultados obtenidos contrastan con los obtenidos por **Madriz y Muñoz (1991)** sobre 15 animales de la raza Criolla Rio Limón Venezolana, con baja fertilidad, en los que

observaron dos toros reproductores portadores de la Translocación Robertsoniana 1/29, responsable por demás de una reducción en la fertilidad de las hembras (**Gustavsson, 1969**). En la raza Criolla Uruguay, por otra parte, también se ha detectado la presencia de la misma translocación 1/29 (**Postiglioni y col. 1996**).

Se considera en general que los animales criollos americanos son descendientes de animales traídos desde la península Ibérica, donde todas las razas autóctonas analizadas de ganado vacuno presentan, en mayor o menor incidencia, la translocación robertsoniana

1/29 (**Arruga y Zarazaga 1987**). Esto nos llevaría a pensar, que las diferencias encontradas entre los distintos tipos de ganado Criollo pueden ser debidas a un efecto de deriva genética, analizando este hecho a la luz de los diferentes manejos genéticos.

Por otro lado, también sería posible considerar que la Translocación Robertsoniana 1/29 se incorporó al ganado bovino Criollo, por cruces con otras razas (**Igartúa y col. 1985**). La diferencia en nuestros trabajos estriba en que la población objeto de nuestro estudio son los únicos descendientes del Criollo Pampeano (ya extinto) (**Rodríguez C.A. y Martínez R.D. 1992**) y nos consta que no ha existido, por razones de su aislamiento geográfico, la posibilidad de la introducción de cromosomas de otras razas.

Es importante señalar que los animales criollos Venezolanos, han estado sometidos a un proceso selectivo por el hombre, a diferencia de los Criollos Argentinos biotipo Patagónico en los que sólo ha actuado, por razones de aislamiento geográfico, la selección natural, dando lugar a la población estudiada.

De todas las hipótesis del origen de la translocación la más aceptada es que esta ocurrió una vez y se trasmite en la población (**Gustavsson, 1984**). Además no hay evidencia de la aparición ex novo. Esto nos permite concluir que si los animales fundadores de este rebaño no eran portadores de la translocación 1/29 indudablemente no aparecerá, y, caso de haber existido animales portadores, obviamente, no hay que dejar de lado la deriva genética,

mecanismo por el cual una característica puede fijarse o perderse en poblaciones pequeñas. También podríamos concluir que, en éste último caso, la translocación, que según Gustavsson en su origen pudo representar una cierta ventaja adaptativa, en el grupo poblacional objeto de nuestro estudio y en las condiciones en el que se ha desarrollado a lo largo del tiempo, la translocación no representó una ventaja.

## 5.2 POLIMORFISMO CROMOSÓMICO

En el trabajo realizado hemos encontrado que dos reproductores machos eran portadores de un polimorfismo cromosómico, un anormal tamaño en el cromosoma sexual Y y a la vez una morfología más submetacéntrica que la el resto de animales machos. Este hecho es la primera vez que se

ha observado en una raza Criolla y particularmente en la raza Criolla Argentina.

Este polimorfismo no es muy frecuente en el ganado vacuno, aunque hay citas de haberse observado en varias razas. Así, en 1973, **Fechheimer** lo detectó por primera vez en la raza Ayrshire, siendo detectada posteriormente por **Cribiu y Popescu (1974)** en la raza Charolais y **Halnan y Watson (1982)** y **Desai (1987)** en otras razas. Referencias a razas bovina española las publicaron **Arruga y Zarazaga (1983)**.

Los resultados de la longitud relativa de nuestros animales (28,92) es más alto que el publicado en otras razas (**Gustavsson, 1969; Cribiu y Popescu, 1974; Cribiu, 1975**).

Obviamente las variaciones en la longitud de un cromosoma es debido a

variaciones en la cantidad de material genético como resultado de un reordenamiento estructural con incremento o pérdida de éste material. En nuestro caso, el estudio de las bandas G pone de relieve la imagen del patrón estándar, no observándose diferencias en las bandas del cromosoma Y.

En relación a los valores medios del índice centromérico y la razón entre brazos, estos dos animales presentan unos valores inferiores a los de aquellos tomados como control, que son el resto de animales analizados, concluyéndose que sus cromosomas Y son mucho más submetacéntricos.

Por último hay que decir que el mayor tamaño de estos cromosomas podría ser debido, como apuntan diversos autores, y a la vista de que no hay evidencias de reajustes estructurales, a un diferente grado de condensación de la cromatina. También podemos concluir a la vista de nuestros resultados, como bien proponen **Halnan y Watson** y otros autores siguen, que estos cromosomas pueden ser utilizados como cromosomas marcadores de la descendencia de los machos portadores, ya que hemos podido observar la presencia de éste cromosoma en seis hijos de uno de estos machos cruzados con hembras de otras razas.

## **VIII. CONCLUSIONES**

1.- El bovino Criollo Patagónico (*Bos taurus*. L.) conserva los patrones de bandas obtenidos por los métodos clásicos de bandeo cromosómico, no observándose diferencias con el resto de razas de esta especie.

2.- Sin embargo, en las medidas de los cromosomas se observan algunas diferencias con otras razas, siendo los cromosomas de los 11 primeros pares inferiores a los obtenidos por otros autores y los restantes mayores, incluidos los cromosomas sexuales X e Y, que son realmente diferentes.

3.- Una vez más, y por primera vez en esta raza, se observa un polimorfismo cromosómico, el correspondiente al tamaño del cromosoma sexual Y y de su forma, lo que lo transforma en un cromosoma marcador.

4.- No se ha encontrado ningún caso de translocación robertsoniana 1/29 en el grupo poblacional analizado, lo que nos permite concluir que si hubo en origen algún animal portador, no ha transmitido a la descendencia dicha anomalía o si la ha transmitido no ha representado ninguna ventaja en las circunstancias ambientales en las que se ha desarrollado la población. No hay que descartar, en todo caso, que haya desaparecido por un efecto de deriva genética.

5.- El uso de enzimas de restricción para el estudio del cromosoma eucariótico y concretamente del ganado vacuno, ha demostrado ser válido puesto que se obtienen patrones de bandas muy similares con los de otras técnicas clásicas, poniéndose de relieve que algunas de ellas tiene un efecto muy diferente,

incluso sobre la misma metafase.

6.- El número de intercambios de cromátidas hermanas es significativamente inferior al determinado en las razas analizadas hasta el momento, no encontrándose, al igual que en estas, diferencias significativas entre los sexos.

7.- El bajo número de intercambios encontrado en la raza estudiada, confirma que este hecho es indicativo de

sistemas de producción más naturales. Ello, por tanto, supondría una implicación práctica de los estudios sobre SCE a la hora de evaluar posibles efectos genotóxicos de contaminantes ambientales.

8.- Al igual que ocurre en otras especies animales, la raza objeto del presente trabajo presenta también un polimorfismo y una composición heterogénea de las regiones heterocromáticas.

## **IX. RESUMEN**



El análisis citogenético de los animales domésticos, concretamente en el ganado vacuno, permite determinar cambios cromosómicos, su incidencia y efectos. Generalmente estos están asociados con problemas de fertilidad y por lo tanto con un efecto en la producción animal. En la República Argentina existe una raza de ganado que se puede denominar autóctona, el denominado ganado bovino Criollo Argentino (*Bos taurus*, L.). Dentro de esta raza hay un grupo poblacional reducido, asilvestrado, aislado y que son los únicos descendientes del ya extinto bovino Criollo Pampeano, al cual denominamos bovino Criollo Argentino Patagónico.

Con objeto de conocer mejor las características de este ganado, nos propusimos, como primer paso, el estudio citogenético sistemático de esta población, por mantener a nuestro entender las características raciales originales. Así se han analizado un total de 52 animales, de los cuales, 32 fueron hembras y 20 machos. Para este estudio se aplicaron las técnicas habituales en citogenética animal, pero además se han estudiado los bandeos obtenidos con enzimas de restricción, evaluándose, al mismo tiempo, los resultados obtenidos en su uso en el ganado vacuno. Hemos observado, como en otras especies de animales en las que se han usado citogenéticamente estas enzimas, que algunas de

ellas producen un bandeo diferencial entre los cromosomas, mientras otras presentan una actividad muy variable. Entre las primeras se encuentra la enzima de restricción Hae III, que produjo un patrón de bandas similar al obtenido con las técnicas clásicas bandas GTG y entre las segundas podemos citar a Alu I, con una actividad muy diferente.

Los resultados del estudio han revelado también la no existencia, en el grupo poblacional analizado, de cambios cromosómicos tanto numéricos como estructurales, particularmente la translocación Robertsoniana 1/29. Si hubo en el tiempo algún animal portador de la translocación Robertsoniana 1/29 y que dió origen a este grupo poblacional en la región Patagónica, no la

transmitió a la descendencia o si lo hizo, desapareció a lo largo del tiempo por no representar una ventaja selectiva para esta población.

En el estudio realizado, se ha detectado, por primera vez en ésta raza, un polimorfismo en el cromosoma Y de dos toros, los cuales lo mostraban con un mayor tamaño y con una variación en el índice centromérico, resultando ser mucho más submetacéntrico. Este hecho confirma, una vez más, el papel como cromosoma marcador del cromosoma Y. Por otro lado se encontró que los once primeros pares cromosómicos tenían un menor tamaño relativo y el resto los cromosomas incluidos los sexuales X e Y tenían mayor tamaño relativo comparados con otras razas.

## **X. SUMMARY**

The domestic animals cytogenetic analysis, concretely in the bovine cattle, permits to determine chromosome changes, its incidence and effects. Generally these are associated with fertility problems and therefore with an effect in the animal production. In the Argentine Republic exists a cattle race that can be designated autochthonous, the called cattle Argentine Creole bovine (*Bos taurus*, L.). Within this breed there is a reduced and isolated feral group and that they are the only descendents of the already extinct Pampeano Creole cattle, which one we designate Argentine Patagónico Creole cattle.

With the purpose of better knowing the characteristics of this cattle, we proposed ourselves, as first step, the systematical cytogenetic study of this population, because, we understand that they keep the

original racial characteristics. In this way, a total of 52 animals were analyzed, of those 32 were female and 20 males. For this study, the routine cytogenetic techniques were applied, but in addition had been studied the bandings obtained with restriction enzymes, being evaluated at the same time, the results obtained using its in the bovine cattle. We have observed, as in other kinds of animals in which have been used cytogenetic enzymes, that some of they produce a differential banding between chromosomes, while other presents a very variable activity. Between the firsts we can find the restriction enzyme Hae III, which produced a similar bands standard to the one obtained with the classic technique bands GTG and between the seconds can be cited to Alu I, with a very different activity.

The results of the study

had also revealed the not existence, in the analyzed populational group, of chromosome changes as much numerical as structural, particularly the Robertsonian translocation 1/29. If there was in the time any animal bearing of the Robertsonian translocation 1/29 that had gave origin to this populational group in the Patagonia region, this one was not transmit to its descendents or if it was, disappeared along the time because do not represented a selective advantage for this population.

In the accomplished study, it has been detected, for the first

time in this race, a polymorphism in the Y chromosome of two bulls, those which were showing it a greater size and with a variation in the centromeric index, being much more submetacentric. This fact confirms, once again, the roll as chromosome pacing of the Y chromosome. On the other hand, it was found that the eleven first pars chromosome had a smaller relative size and the rest the chromosome included the sexual X and Y had greater relative size compared with other races.

## **XI. BIBLIOGRAFIA**

- Alfi, O.S., Donnel, G.N. y A. Derencsenyi (1973). C-banding of human chromosomes produced by Dnase. *Lancet*, 2:505.
- Arreghi, F.E. y T.C. Hsu (1971). Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics*, 10:81-86.
- Arruga M. Victoria y Zarazaga I., (1985)."Chromosomes studies in Spanish fighting bulls.", "Separatum de archivos de Zootecnia, vol.34, N°128, pgs.49-65"
- Arruga M. Victoria y Zarazaga I., (1986)."Study on segregation of 1/29 Robertsonian translocation in a Homozygous Bull Belonging to Retinta Breed.", "7th. Colloq. Cytogenet. Dom. Anim. Ann. Ann 1986.Pgs.50-58."
- Arruga, M. y Zarazaga, I. (1987). La Translocación Robertsoniana 1/29 en el Ganado Vacuno. Su incidencia en las razas Vacunas Españolas. *Genét. Ibér.*, 39: 61-75.
- Arruga, M.V. (1989). Evidence of Mendelian inheritance for NORs in Spanish common rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). En: *Cytogenetics of Animals* (C.R.E. Halnan, de.). CAB International.
- Babu, A. (1988). Heterogeneity of heterochromatin of human chromosome as demonstrated by restriction endonuclease treatment. En: *Heterochromatin: Molecular and Structural Aspects* (R.S. Verma, ed.). Cambridge University Press. Cambridge.
- Babu, A., Agarwal, A.K. y R.S. Verma (1988). A new

approach in recognition of heterochromatin regions of human chromosomes by means of restriction endonucleases. *Am. J. Hum. Genet.*, 42:60-65.

Beauchamp, R.S., Mitchell, A.R., Buckland, R.A. y C.J. Bostock (1978). Specific arrangements of human satellite III DNA sequences in human chromosomes. *Chromosoma*, 71:153-166.

Bianchi, M.S., Bianchi, N.O., Pantelias, G.E. y S. Wolff (1985). The mechanism and pattern of banding induced by endonucleases restriction in human chromosomes. *Chromosoma*, 91:131-136.

Bianchi, N.O. y M.S. Bianchi (1987). Analysis of the eukariotic chromosome organization with restriction endonuclease. *Em: Cytogenetics, Basic and*

*applied Aspects* (G. Obe and A. Basler, eds.). Springer. Berlin.

Bianchi, M. S., Bianchi, N. O., Gripenberg, U., Wessman, M. y S. Huuhtanen (1990). Characterization of the heterochromatin in moose (*Alces alces*) chromosomes. *Genetica*, 80:1-7.

Buckland, R.A y H.J. Evans (1978). Cytogenetics aspects of phylogeny in the bovidae II. C-banding. *Cytogenet. Cell Genet.*, 21:63-71.

Burkholder, G.D. y G.J. Schmidt (1986). Endonuclease banding of isolated mammalian metaphase chromosomes. *Exp. Cell. Res.*, 164:379-387.

Burkholder, G.D. (1989). Morphological and biochemical effects of endonucleases on isolated mammalian chromosomes in vitro. *Chromosoma*, 97:347-355.



- Busch, H., Lischwe, M., Michalik, J., Chan, P.K. y R.K. Busch (1982). Nucleolar proteins of special interest: silver staining proteins B23 and C23 and antigens of human tumour nucleoli. En: *The Nucleolus* (E.G. Jordan and C.A. Cullis, eds.). Cambridge University Press. Cambridge.
- Carrazzoni José A. (1998). *El Bovino Criollo*. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. Tomo LII N°16. Buenos Aires. Argentina.
- Caspersson, T. Lomakka, G. y L. Zech (1971). The fluorescence patterns of the human metaphase chromosomes-distinguishing characters and variability. *Hereditas*, 67:89-102.
- Catalá, A. Vidal-Rioja, L. y N.O. Bianchi (1981). Liver chromatin fractions in *Mus* and *Akodon*. The concept of constitutive heterochromatin. *Moll Cell Biochem*, 36:135-141.
- Catalán, J., C. Moreno y M.V. Arruga (1993). Sister chromatid exchanges induced by chloranphenicol on bovine lymphocytes. *Mutat. Res.* 319(1):11-18.
- Catalán, J., C. Moreno y M.V. Arruga (1995). Sister-chromatid exchange in cattle: breed, sex and BrDU dose effects. *Mutat. Res.* 331(2):205-211.
- Cau, A., Salvadori, S., Deiana, A.M., Bella, J.L. y R. Mezzanotte (1988). The Characterization Of *Murena helena* L. mitotic chromosomes: karyotype, C-banding, nucleolar organizer regions and in situ digestion with restriction endonucleases. *Cytogenetic. Cell. Genet.*, 47:223-226.
- Comings, D.E., Avelino, E. Okada, T.A. y Wyandt (1973). The mechanism of C- and G-

banding of chromosomes. *Exp. Cell Res.*, 77:469-493.

Cooke, H.J. y R.D.G. McKay (1978). Evolution of a human Y chromosome specific repeated sequence. *Cell*, 13:453-460.

Cribiu, E. P. (1975). Variation interraciale de la taille du chromosome Y chez *Bos taurus*. *Ann. Génét. Sél. Anim.* 7(2): 139-144.

Cribiu, E.P. y P. Popescu. (1974a). L'idiogramme de *Bos taurus* L. *Ann. Génét. Sél. Anim.* 6(3):291-296.

Cribiu, E.P. y P. Popescu. (1974b). Un cas de chromosome Y anormalement long chez *Bos taurus* L. *Ann. Génét. Sél. Anim.* 6(3):387-390.

Crossen, P.E., Pathak, D. y F.E. Arrighi (1975). A high study of the replication patterns

of chinese hamster chromosomes using sister chromatid differential staining techniques. *Chromosoma* (Ber.), 54:339-347.

Crossley D., y Clarke G., (1962). The application of tissue culture techniques to the chromosomal analysis of *Bos taurus*. *Genet. Res Camb.*, 3:167-168.

De Grouchy, J.; M Roubin y E. Passage (1964). Microtechnique pour l'étude des chromosomes humains à partir d'une culture de leucocytes sanguins. *Ann. Genet.* 7:45-46.

Dev, V.G., Warburton, D., Miller, D.A., Eelanger, B.F. y S. M. Beiser (1972). Consistent pattern of binding of antiadenosine antibodies to human metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.*, 74:288-293.

- Derenzini, M., Hernández-Verdún, D., Farabegoli, F., Pession, A. y F. Novello (1987). Structure of ribosomal genes of mammalian cells in situ. *Chromosoma*, 95:63-70.
- Desai, D.S. (1987). Studies on the Y chromosome of different breeds of bos taurus bulls. *Ind. J. Dairy Sci.* 40:52-54.
- Di Berardino, D., M.B. Lioi y L. Iannuzzi. (1985). Identification of nucleolus organizer chromosomes in cattle (*Bos taurus*, L.) by sequential silver staining + RBA banding. *Caryologia* 38(1):95-102.
- Dod, R., E. Mottez, E. Desmarais, F. Bonhomme y G. Roizes (1989). Concerted evolution of light satellite DNA in genus *Mus* implies amplification and homogeneization of large blocks of repeats. *Mol. Biol. Evol.* 6:478-491.
- Drets, M.E. y M.W. Saw (1971). Specific banding patterns of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68:2073-2077.
- Dutrillaux, B. (1975). Traitments discontinus par le BrdU et coloration par l'acridin orange: obtention de marquages R, Q et intermediaires. *Chromosoma (Ber.)*, 52:261-273.
- Dutrillaux, B. y J. Lejeune (1975). Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype human. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 372:2638-2640.
- Eldridge F. E. (1975). High frequency of a Robertsonian translocation in a herd of British White cattle. *Vet. Rec.* 96 :71-72 .
- Eldridge F. E., Harris N.B. y Koenig J.L.F. (1984). Chromosomes of young AI bulls. 6th European

Colloquium on Cytogenetics of domestic animals, Zurich, Suisse, July 16-20.1984, 59-67.

Elsbeth, M.J., Harrison, C.J., Allen, T.D. y R. Harris (1985). The structural basis for C banding. *Chromosoma*, 91:363-368.

Evans, K. J., Buckland, R. A. y Sumner, A. T. (1973). Chromosome Homology and heterocromatin in Goat, Sheep and  $O_x$  studied by banding techniques. *Chromosoma*, (Berl.) 42: 383-402.

Fechheimer, N.S. (1973). A cytogenetic survey of young bulls in the USA. *Vet. Rec.* 93:535-536.

Fernández García J.L.(1995). Estudio de la heterocromatina en cromosomas fijados de bóvidos domésticos (Bos taurus, Ovis aries y Capra hircus). Tesis Doctoral, Cáceres, Facultad de

Veterinaria, Universidad de Extremadura.

Foulley J. L. y Frebling J. (1985). Critères de detection indirecte des taureaux porteurs de la translocation 1/29 á partir des caryotypes de leurs descendants . *Genet. sel. Evol.* 17(3) :341-350 .

Frebling J., Foulley J.L., Berland H.M., Popescu C.P., Cribeu E.P. y Darre R. (1987), Résultats de l'enquête sur la fréquence de la trasloction 1/29 en race bovine Blonde d'Aquitaine. *Bull. Tech. CRZV INRA*, (67), 49-58.

Frommer, M., Prosser, J., Tkachuck, D., Reisner, A.H. y P.C. Vincent (1982). Simple repeated sequences in human satellite DNA. *Nucleic Acids Res.*, 10:547-563.

Gall, J.G y M.L. Pardue (1969). Formation and detection of RNA-DNA hibrid

- molecules in cytological preparations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63:378-383.
- Garnner, E. y H.J. Evans (1971). The relationship between patterns of DNA replications and of quinacrine fluorescence in the human chromosome complement. Chromosoma (Ber.), 35:326-341.
- Goodpasture, C. y S.E. Bloom (1975). Visualization of nucleolus organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. Chromosoma, 55:37-50.
- Gosálvez, J., Bella, J.L., López-Fernandes, C. y R. Mezzanotte (1987). Correlation between constitutive heterochromatin and restriction enzyme resistant chromatin in *Arciptera tornosi* (Orthoptera). Heredity, 59:173-180.
- Gosálvez, J., Sumner, A.T., López-Fernandes, C., Rossino, R., Goyanes, V. y R. Mezzanotte (1990). Electron microscopy and biochemical analysis of mouse metaphase chromosomes after digestion with restriction endonucleases. Chromosoma, 99:36-43.
- Gosden, J.R., Mitchell, A.R., Buckland, R.A., Clayton, R.P. y H.J. Evans (1975). The location of four human satellites DNAs on human chromosomes. Exp. Cell Res., 92:148-158.
- Gosden, J.R., Mitchell, A.R., Seuanez, H.N. y C.M. Gosden (1977). The distribution of sequences complementary to human satellite DNAs I, II and IV in the chromosome of chimpanzee (*Pan troglodytes*), Gorilla (*Gorilla gorilla*), and Orangutan (*Pongo pygmaeus*). Chromosoma (Ber.), 63:253-271.
- Gustavsson I. y G. Rockbon . (1964). Chromosome abnormality in three cases of

- lymphatic leukaemia in cattle .  
Nature . 203 :990-991
- Gustavsson I. (1969).  
Cytogenetics distribution and  
phenotypic effects of a  
translocation in Swedish cattle.  
Hereditas 63 :(1-2) 68-169 .
- Gustavsson I. (1970).  
Economic importance of a  
translocation in Swedish cattle.  
1 Europaisches kolloquium  
uber zytogenetik  
(chromosomopathologie) in  
veterinarmedizin und  
Saugetierkunde, Giessen .  
108-114 .
- Gustavsson I., (1971).  
Distribution of the 1/29  
translocation in the Art. Insem.  
bull population of Swedish Red  
and White cattle. Hereditas  
69:101-106
- Gustavsson I., (1975). New  
information on the reduced  
fertility of cattle whit the 1/29  
translocation. 2°Eur. Kolloq.  
uber zytogen. in  
veterinar.Tierycht und  
SaugetierkundeGiessen  
184-188"
- Gustavsson I. (1979).  
Distribution and effects of the  
1/29 Robertsonian  
translocation in cattle . Journal  
of Dairy Science. 62(5)  
:825-835
- Gustavsson, I. Hagelthorn, M.  
y L. Zech (1976). Recognition  
of the cattle chromosomes by  
the Q- and G-Banding  
techniques. Heredity  
(London), 82:157-166.
- Hancock, J.M. y A.T. Sumner  
(1982). The role of proteins in  
the production of different  
types of chromosome bands.  
Cytobios, 35:37-46.
- Halnan (1976). A cytogenetic  
survey of 1101 Australian  
cattle of 25 different breeds .  
Ann. Genet. Select. Anim. 8(2)  
:131-139 .

- Halnan, C.R.E. y J.I. Watson. (1982). Y chromosome variants in cattle *Bos taurus* and *Bos indicus*. *Ann. Génét. Sél. Anim.* 14(1):1-16.
- Halnan, C.R.E. (1989). Introduction: cytogenetics of animals. En: *Cytogenetics of Animals*. (C.R.E. Halnan,ed.) CAB International.
- Henderson, L.M. y A.N. Bruère (1977). Association of nucleolus organizer chromosomes in domestic sheep (*Ovis aries*, L.) shown by silver stainin. *Cytogenet. Cell Genet.* 19:326-334.
- Hidas, A. (1995). Heterochromatin heterogeneity revealed by restriction endonuclease digestion and subsequent C-banding on bovine metaphase chromosomes. *Hereditas* 122:285-288.
- Hidas, A y I. Gustavsson (1992). Restriction enzyme action on pig, cattle and horse metaphase chromosomes. 10th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals. Utrecht p 94-98.
- Holgado F.D. ; Sal Paz A. R.; de Sal Paz F. P. y Rabasa S. L. (1988). Mortalidad predestete en distintos genotipos bovinos. *Mendeliana* 8 (2):123-134.
- Hook E. B. (1977). Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90% , 95% and 99% confidence limits and coments on use . *An. J. Hum. Genet.* 29: 94-97 .
- Hörz, W., Hess, J. y H.G. Zachau (1974). Highly regular arrangement of restriction nuclease sensitivitiesites in rodents satellites DNAs. *Eur. J. Biochem.*, 54:501-512
- Howell, W.M. (1977). Visualization of ribosomal gene activity: silver stains protins associated with rRNA transcribed from oocyte

- Chromosomes. *Chromosoma*, 62:361-367.
- Howell, W.M., Hsu, T.C. y B.M. Block (1977). Visualization of centriolebodies using silver staining. *Chromosoma (Berl.)*, 65:9-20.
- Howell, W.M. y T.E. Denton (1976). Negative silver staining in A-T and satellite DNA-rich regions of human chromosomes. *Chromosoma (Berl.)*, 57:165-169.
- Hsu, T.C. y F.E. Arrighi (1971). Distribution of constitutive heterochromatin in mammalian chromosomes. *Chromosoma*, 34:234-253.
- Iannuzzi, L., G.P. Di Meo, A. Perucatti, L. Ferrara y I. Gustavsson (1991). Sister chromatid exchange in chromosomes of cattle from three different breeds reared under similar conditions. *Hereditas* 114(3):201-205.
- Ibsen, H. L. 1933. Cattle inheritance. I. Color Genetics 18: 441-480.
- Igartúa D. V. , Roldan E. R. S. y Vitullo A. D. 1985. Estudios citogenéticos en hembras bovinas con trastornos reproductivos. *Rev. Agr. Prod. Anim.* Vol 5(3-4): 175-181 .
- Inchausti D y Tagle E. (1946): *Bovinetecnia T. 1*, Buenos aires, El Ateneo.
- ISCN (1985). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (D.G. Harnden and H. P. Klinger, eds.) Basel. Karger.
- ISCNDA (1990). International System for Cytogenetic Nomenclature of Domestic Animals (ISCNDA, 1989). Di Bernardino, D.; H. Hayes; R. Fries y S. Long (eds).



Cytogenet Cell Genet, 53:65-79.

Kaftanovskaya, H. M. y O. L. Serov (1992). High-resolución G-banding of sheep chromosomes. J. Hred., 83:92-99.

Kaftanovskaya, H. M. y O. L. Serov (1994). High-resolución GTG-banded chromosomes of cattle, sheep, and goat: a comparative study. J. Hered., 85:395-400.

Kieffer M.N. y Cartwright T.C. (1986). Sex chromosome polymorphism in domestic cattle. J. Hered., 59:35-36.

Kim, M.A. Johanssman, R. y K.H. Grzeschik (1975). Giemsa staining of the sites replicating DNA early in human lymphocytes chromosomes. Cytogenet. cell Genet., 15:363-371.

Kovacs, A. (1984). Progressin eradication of the 1/29

Translocation of cattle in Hungary. 6th European Colloquium on Cytogenetics of domestic animals, Zurich, Suisse, July 16-20.1984, 52-58.

Kuo, M.T. (1982). Comparison of chromosomal structures isolated under different conditions. Exp. Cell Res., 138:221-229.

Kurnit, D.M., Shafit, y J.J. Maio (1973 ) Multiple satellite deoxyribonucleic acids in the calf and their relation to the sex chromosomes. J. Molec. Biol., 81:272-284.

Latt, S.A. (1976). Optical studies of metaphase chromosome organization. En: Annual Reviews of Biophysics and Bioengineering, vol. 5 (L.J. Mullins, ed.). Illus. Annual Reviews, inc. Palo Alto. California. USA.

Levan A.; K. Fredga y A.A. Sandberg.

- (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220.
- Lewin, B. (1985). Sistem that safeguard DNA. En: *Genes II*. (J. Wiley and sons, de.). Reverté, S.A. Barcelona.
- López Fernández, C., Gosalvez, J. y R. Mezzanotte (1989). Heterochromatin heterogeneity in *Oedipoda germanica* (Orthoptera) detected by in situ digestion with restriction endonuclease. *Heredity*, 62:269-277.
- MacGregor, H.C. y J. Varley (1983). Chromosome Banding. En: *Working with Animals Chromosomes*. (J. Wiley and sons, eds.). NEW york.
- Madriz M. L. y Muñoz G. (1991). Análisis cromosómico del ganado criollo venezolano. *Acta Científica Venezolana* 42: 266-269.
- Marki, U. y D.R. Osterhoff (1985). Different banding techniques for the study of bovine chromosomes. *J. South African Veterinary Association*, 56(2):81-83.
- Martínez R.D y Rodríguez C.A (1995): Avances en la conservación y estudio del bovino criollo argentino patagónico. En *Boletín de Información sobre recursos genéticos animales UNEP* FAO Nro. 15. Pág 57-66..
- Martínez R. D., Fernández E. N., Género E. R., y Rumiano F. J. L. El ganado bovino criollo en Argentina. *Archivos de Zootecnia*, En prensa.
- Mayr, B., W. Schnedl y D. Schweizer (1979). Paarungsverhalten der meiotischen Chromosomen beim Rind. *Z. Tierz. Züchtungsbiol.* 95:112-117.

- Mayr, B., Schweizer, D., Mendelak, M., Schleger, W., Kalat, M. y H. Auer (1985). Levels of conservation and variation of heterocromatin and nucleolus organizers in the bovidae. *Can. J. Genet. Cytol.*, 27:665-682.
- Mayr, B., Schleger, W. y H. Auer (1987). Frecuencias of Ag-NORs in the chromosomes of the cattle. *J. Hered.*, 78:206-207.
- Mayr B., Gruber, K., Brem, G. y G. Mayrhofer (1989). Genetic studies on nucleolus organizer regions (NORs) in cattle. *Genet. Res. Camb.*, 53:111-118.
- Melucci L y M.C Miquel (1986); El ganado criollo en cruzamientos con A. Angus en la región pampeana. En *Ganado Bovino Criollo Tomo 1 Orientación Gráfica Editora* Pág. 69-74.
- Mezzanotte, R., Ferrucci, L., Vanni, R. y U. Bianchi, (1983a). Selective digestion of human metaphase chromosomes by Alu I restriction endonuclease. *J. Histochem. Cytochem.*, 31:553-556.
- Mezzanotte, R., Bianchi, U., Vanni, R. y L. Ferrucci, (1983b). Chromatin organization and restriction nuclease activity on human metaphase chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 36:562-566.
- Mezzanotte, R., Ferrucci, L., Vanni, R. y A.T. Sumner (1985). Some factors affecting the action of restriction endonucleases on human metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.*, 161:247-253.
- Mezzanotte, R., Manconi, P.E., y L. Ferrucci, (1986). On the possibility of localizing in situ *Mus musculus* and *Drosophila virilis* satellites DNA by the AluI and EcoRI restriction

- endonucleases. *Genética*, 70:107-111.
- Miller, O.J., Miller D.A., Dev, V.G., Tantarvahi, y R.M. Croce (1976). Expression of human, and supresion of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cells hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73:4531-4535.
- Miller, D.A., Choi, Y. y O. Miller (1983). Chromosome localization of highly repetitive human DNA's and amplified ribosomal DNA with restriction enzymes. *Science*, 219:395-397.
- Miller, D.A., Gosden, J.R., Hastie, N.D. y H.J. Evans (1984). Mechanism of endonuclease banding of chromosomes. *Exp. Cell. Res.*, 155:294-298.
- Moraes J.C.F., Mattevi M.S., Salzano F.M., Poli J.L.E.H., y Erdtmann B. (1980). A cytogenetic survey of five breeds of cattle from Brazil. *J. Hered.* 71,146-148.
- Moreno Millán M.; J. V. Delgado Bermejo y F. Alonso García (1987). X trisomy in a Frisian cow with continuous oestrus. *Vet. Rec.* 121:167-168.
- Moreno Millán, M. (1988). Comparación de los cariotipos de poblaciones pertenecientes a los géneros *Ovis* y *Capra*. Tesis doctoral.
- Moreno Millán, M.; J.V. Delgado Bermejo y G. López Castillo (1989). An intersex horse with X-chromosome trisomy. *Veterinary Record.* 124:169-170.
- Moreno Millán M. y Rodero A., (1990). Estudio comparativo de los cromosomas de *Ovis aries* y *Capra Hircus* a partir de sus longitudes relativas. *Separatum*

de archivos de zootecnia, vol.39, N°144, pgs.153-163."

Moreno Millán M.; A. Rodero y F. J. Alonso (1991). Cytogenetic studies of Retinta breed cattle: incidence of the 1/29 translocation. ITEA. 87 A (2-3): 263-267 .

Moreno Millán M.; A. Rodero.; G. Lopez de la Torre., y I. Serrano (1992). Results of a screening of 1/29 translocation in Retinta breed cattle: Calving interval and reproductive rate in heterozygote cows for translocation. "In Memoriam" Prof. Martínez Gómez. De. Servicio de Publicaciones Univ. Córdoba.

Moreno Millán M.; A. Rodero; y J. Ocaña Quero. (1995). Evolución de la Translocación Robertsoniana 1/29 en la raza vacuna retinta en los últimos seis años . Arch. Zootec. 44: 173-178.

Nanda, I. y R. Raman (1981). Cytological similarity between the heterochromatin of the large X and Y chromosomes of the soft-furred field rat, *Millardia meltada* (family: Muridae). Cytogenet. Cell Genet., 30:77-82.

Ocaña Quero, J.M., R. Gómez Villamandos, M. Moreno Millán y J.M. Santisteban Valenzuela (1997). Sister chromatid exchanges induction in sheep peripheral blood mononuclear cells by helium-neon laser radiation. Mutat. Res. 377:69-75.

Pachmann, U. y R. Rigler (1972). A quantum yield of acridine interaction with DNA of definite base sequences. A basis for explanation of acridine bands in chromosomes. Exp. Cell Res. 72:602-608.

Padilla, J.A., Fernández-García, J.L., Rabasco, A., Martínez-Tracón, M.

- Rodriguez de Ledesma, I. y J.J. Pérez-Regadera (1993). Characterization of the karyotype of the tench (*Tinca tinca*, L.) and analysis of its chromosomal heterochromatic regions by C-banding, Ag-staining, and restriction endonuclease banding. *Cytogenet. Cell Genet.*, 62:220-223.
- Pardue, M.L. y J. Gall (1970). Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*, 168:1356-1358.
- Paris Conference (1971). Standardization in human cytogenetics Birth Defects: Original article Series 8(7):1-46.
- Perreti, D., Mezzanotte, R. y A.T. Sumner (1990). Unfixed and fixed human chromosomes show different staining patterns after restriction endonuclease digestion. *Hereditas*, 112:187-192.
- Pierpont, M.E. y J.J. Yunis (1977). Localization of chromosomal RNA in human G banded metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.*, 106:303-308.
- Pinheiro L.E.L., Ferrari I., Ferraz J.B.S., y Lobo R.B. (1981). High frequency of Robertsonian translocation in a Brazilian cattle breed. *Rev. Bras. Genet.*, 4,657-665.
- Popescu, C. P. (1980). Cytogenetics study on embryos sired by a bull of 1/29 translocation. 4th Eur. Colloq. *Cytogenet. Domest. Anim.* 182-186.
- Popescu, C. P. (1982). Cytogenetics in domestic animal production. 2<sup>nd</sup> World congress on Genetic applied to Livestock Production, Madrid, 375-384.
- Popescu, P.C. (1989). *Cytogénétique des*

- Mammifères d'Élevage. INRA. Paris.( ISBN:2-7380-0093-2).
- Potter, W.L. y P.C. Upton. (1979). Y chromosome morphology of cattle. Aust. Vet. J. 55:539-541.
- Postiglioni, A., Llambí, S., Gagliardi, G., de Bethencourt, M. (1996). Caracterización genética de los Bovinos Criollos del Uruguay. Arch. zootec. 45:209-213.
- Rabasa C., Alicia R. de Sal paz, F. Sal Paz, Frida Bergmann y S. L. Rabasa. 1976. Gen,tica de Pelajes en Bovinos Criollos. Mendeliana 1(2) (1976):81-90.
- Refsdal A.O., (1976). "Low fertility in daughters of bulls with 1/29 translocation.", "Acta Vet.Scand. 17:190-195"
- Rangel-Figueiredo, M.T., G. P. Di Meo y L. Iannuzzi (1995). Sister chromatid exchange (SCE) in cattle. a comparison between normal ans rob(1;29)-carrying karyotypes. Hereditas 123:125-129.
- Rodríguez CA; Martinez R.D\*; Rumiano F.; Rechimont R; Rabasa S.L. (1989); "Bovino Criollo Biotipo Patagónico – descripción y conservación-. En Actas XX Congreso Argentino de Genética Bahía Blanca Bs. As.
- Rodríguez C.A y Martínez R.D (1992): Bovino Criollo Argentino Patagónico. En Boletín de Información sobre recursos genéticos animales UNEP FAO Nro. 9. Pág 27-31.
- Rouse J..E. (1977). The criollo. Spanish Cattle in the Americas, University of Oklahoma.
- Sahasrabuddhe, C.G., Pathak, S. y T.C. Hsu (1978). Response of mammalian metaphase chromosomes to endonuclease digestion. Chromosoma, 69:331-338.

- Sal Paz F. (1986); El bovino criollo argentino: historia características y productividad. En Ganado Bovino Criollo Tomo I Orientación Gráfica Editora. Pág. 3-7.
- Sánchez, L., Martínez, P., Bouza, C. y A. Viñas (1990). Chromosomal heterochromatin differentiation in *Salmo trutta* With restriction enzymes. *Heredity*, 66:241-249.
- Schnedl, W. (1971). Analysis of the human karyotype using a reassociation technique. *Chromosoma*, 34:448-454.
- Seabright M. (1971). A rapid banding technique for human chromosomes. *Revs. Lancet* 2 :971-972 .
- Shapiro, I.M., Moar, m.H., Ohno, S. y G. Klein (1978). Acetic acid treatment denatures DNA while preserving chromosomal morphology during in situ hybridization procedures. *Exp. Cell Res.*, 115:411-414.
- Sharma, T. y R. Raman (1973). Variation of constitutive heterochromatin in the sex chromosomes of the rodent *Bandicota bengalensis bengalensis* (gay) *chromosoma*, 41:71-84.
- Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.*, 75:304-306.
- Sumner, A.T., Evans H.J. y R.A. Buckaland (1971). A new technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature*, 232:31-32.
- Sumner, A.T. y H.J. Evans (1973). Mechanism involved in the banding of chromosomes with quinacrine and Giemsa. II. The interaction of the dyes with the chromosomal



components. *Exp. cell Res.*,  
81:223-236.

Sumner, A.T. (1990).  
*Chromosome Banding*. Unwin  
Hayman. London.

Tschudi, P. (1984). 12 years of  
cytogenetic investigation in AI  
bulls in Switzerland. 6th  
European Colloquium on  
Cytogenetics of domestic  
animals, Zurich, Suisse, July  
16-20.1984, 40,42.

Ueda, T., Irie, S. y Y. Kato  
(1987). Longitudinal  
differentiation of indian  
muntjak as studied by  
restriction enzyme digestion, in  
situ hybridization with cloned

DNA probes and distamicin A  
plus DAPI fluorescence  
staining. *Chromosoma*,  
95:251-257.

Yunis, J.J. Kuo, M.T. y  
Saunders (1977). Localization  
of sequences specifying  
messenger RNA to light-  
staining G bands of human  
chromosomes. *Chromosoma*  
(Ber.), 38:341-365.

Zhang, S.Z. y W.F. Dong  
(1989). Human chromosome  
banding with restriction  
endonucleases Hae III, HinfI  
and PstI. *Science in China*  
(SerieB), 32(11): 1350-1360.

\* Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que de alguna manera han colaborado conmigo en la elaboración de este trabajo, ya que sin ellos no habría sido posible, y en especial:

\* A mi Director de tesis, el Prof. Dr. D. Miguel Moreno Millán, por el apoyo, confianza, dedicación, orientación, ánimo y entusiasmo para la realización y conclusión de la presente Tesis Doctoral.

\* A los miembros de las Cátedra de Genética de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora Argentina que me proporcionaron su ayuda de gran valor cuando más la he necesitado.

\*A los miembros de la Unidad de Veterinaria del Departamento de Genética de la Universidad de Córdoba por su apoyo y ayuda en todo momento.

