

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



INDUCCION DE BANDAS G EN EL  
CERDO (SUS SCROFA DOMESTICUS)

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

Sergio Luis Schweminski Benítez

A S E S O R :

M.V.Z. M.SCI. ROGELIO ALONSO MORALES

GUADALAJARA, JAL.

1986

## DEDICATORIAS

A la memoria de mi  
abuelo, Dr. Manuel  
Benítez y de todos  
mis seres queridos.

A mi esposa, Bertha Alicia,  
con quien comparto el  
amor y la alegría de vivir  
en un tiempo y espacio.

A mi madre y mis hermanos.  
con amor, respeto y  
admiración.

A mis tíos: Josefina y Héctor

Al Sr. Prolss y a la Sra.  
Tiessen del Consulado  
Alemán en Guadalajara;  
a la Sra. Weimann y  
Sra. Wallace de la Embajada  
en México de la República  
Federal de Alemania, por su  
ayuda invaluable para la  
realización del propósito  
educativo de mi vida.

Mi reconocimiento y gratitud  
a quienes hacen posible la  
Ayuda Social Alemana.

A mis verdaderos Maestros  
que influyeron decisivamente  
en mi enseñanza y educación  
durante mi vida escolar y  
estudiantil.

A mi maestro, asesor y  
amigo Rogelio Alonso  
M.V.Z. M. Sci., así como  
también a Daniel Villagomez  
M.V.Z., por su desinteresado  
apoyo y su amistad.

Al Pueblo de México,  
que con su contribución  
hacen posible la  
educación popular.

Y muy especialmente a  
mis hijos Illy Alicia y  
Dieter Alberto, que hoy  
son el mañana de mi  
esperanza.

## I N D I C E

	Pags.
I. INTRODUCCION	1 - 18
II. OBJETIVOS	19
III. MATERIAL Y METODOS	20 - 24
IV. RESULTADOS	25 - 46
V. DISCUSIONES.	47 - 61
VI. CONCLUSIONES	62 - 68
VII. RESUMEN	69
VIII. BIBLIOGRAFIA	70 - 74

## I. INTRODUCCION.

Con el descubrimiento que en los cromosomas residen los genes portadores de la Herencia en los organismos por Tomas Hunt Morgan en 1905, tomó un interés capital el desarrollo de la Investigación Citogenética en los Mamíferos (3). El rápido crecimiento de la Citogenética Humana es atribuible a un número importante de modificaciones técnicas, a través de la incorporación de métodos de otras áreas de la Biología y la Medicina (1).

Las alteraciones de los cromosomas sexuales asociada con una gran variedad de condiciones de intersexos, así como las trisomías asociadas con varios defectos del desarrollo, marcaron un hito entre los citogenetistas humanos y veterinarios. Como ejemplos tenemos los hallazgos clínicos que involucran aneuploidías cromosómicas, entre ellas: la Trisomía 21 asociada al Mongolismo en el hombre, demostrada por Leujene et. al. en 1959; el Síndrome de Klinefelter con constitución de los cromosomas sexuales XXY, descrito por Jacobs y Strong en 1959, y la delección del complemento cromosómico XO en la mujer con el Síndrome de Turner, demostrado por Ford et. al. en 1959 (1, 3).

Los refinamientos tecnológicos que facilitaron el crecimiento de la Citogenética, incluyen el pretratamiento con -

soluciones hipotónicas, realizado por Hsu en 1952, en donde demostró que la morfología de los cromosomas de mamíferos - podría mejorar grandemente con el choque hipotónico, y posteriormente combinada con los métodos de cultivo de tejidos para obtener células mitóticas realizado por Tjio y Levan - en 1956, demostrando que el número diploide en el hombre es de 46 cromosomas, aunado a las técnicas de cultivo de linfocitos de sangre periférica, realizado por Moorhead et. al. - en 1960. Junto con los procedimientos de secado al aire de cromosomas, la adaptación de la autorradiografía con timidina marcada, el uso de fluorocromos en células en interfase y en espermatozoides para detectar el cromosoma Y, así como el empleo de técnicas de bandeado cromosómico, han permitido un desarrollo sorprendente en la Citogenética Humana, habiéndose reconocido alteraciones en todos los cromosomas como causa de muerte temprana, retraso psicomotor, malformaciones y estados de infertilidad (3, 11, 20, 23, 24).

En contraparte, la Citogenética aplicada a los animales domésticos ha sido poco explotada, la relativa inacción - obviamente es debida a que las anormalidades son detectadas únicamente cuando los animales son severamente afectados en su valor comercial, además los criadores están inclinados a desecharlos rápidamente antes que averiguar la causa de las anormalidades, no existiendo Instituciones u Organizaciones que diagnostiquen, estudien y conserven a los animales do--

mésticos afectados cromosómicamente como existen en la Medicina Humana, igualmente los profesionistas veterinarios, - con excepción de pocos, han sido ignorantes o indiferentes a los grandes avances logrados en la Citogenética y su posible aplicación a los animales domésticos (1).

Un animal cromosómicamente defectuoso es de enorme valor para la Citogenética, a través de la cría experimental puede comprenderse la conducta de cromosomas defectuosos en la Mitosis y Meiosis, el efecto de los cariotipos desbalanceados sobre el desarrollo embrionario y la fisiología celular o corporal. De esta manera los animales afectados proporcionen buenos modelos experimentales para entender la fisiopatología de los desórdenes humanos y nacimientos defectuosos de etiología cromosómica. Por otra parte, si el modo de transmisión y las consecuencias genéticas de estos defectos no son delimitadas será incontrollable su diseminación en las poblaciones animales, afectando su reproducción, así como sus características productivas, repercutiendo en la salud del hombre y su estatus económico, ambos estrechamente dependientes de la salud animal (1).

Un punto en consideración es que los animales domésticos y sus cromosomas exhiben particularidades que los coloca como especies con idiosincrasia diferente al hombre, por lo tanto, la metodología debe ser evaluada y modificada para llegar a ser prácticas rutinarias en los estudios de ani

males domésticos (1).

Los defectos del desarrollo aparecen con relativa frecuencia en el Cerdo, involucrando defectos anatómicos (aplasia, hipoplasia o displasia de un órgano o parte de él) o defectos funcionales. Huston et. al en 1978, reportaron 144 defectos congénitos causados por anormalidades cromosómicas. En aproximadamente el 13% de los defectos la causa fué conocida o pensada como hereditaria, similarmente, conocidos agentes ambientales o teratogénicos fueron identificados como la causa de un 12% de los defectos, y la causa no fué conocida o clasificada como posiblemente hereditaria en un 75% de las condiciones defectuosas (20). Las causas por largo tiempo desconocidas, probablemente tengan algo que ver con las anormalidades estructurales o numéricas de los cromosomas. Los reportes indican que 5 de 1000 nacidos vivos en el hombre, padecen de aberraciones cromosómicas, cerca del 40% son aneuploides para los cromosomas sexuales, un 40% más son aneuploides autosómicos y el 20% restante es debido a desarreglos estructurales de los cromosomas (11).

La esterilidad, la infertilidad y la mortalidad embrionaria en los animales puede ser mediada por anomalías cromosómicas. La esterilidad en machos resulta de aneuploidías de los cromosomas sexuales, particularmente del complemento cromosómico  $2n$  XXY, ha sido reportado en porcinos, ovinos, bovinos y animales de compañía. La esterilidad en hembras-

con complemento cromosómico  $2n XO$ , ha sido reportada en bovinos, porcinos y equinos. La fertilidad reducida también es resultado de aberraciones cromosómicas, los desarreglos estructurales de segmentos cromosómicos portados por animales en estado heterocigótico, se expresan en la producción de gametos genéticamente desbalanceados, resultando en cigotos - que tienen baja viabilidad y que conducen a la muerte embrionaria temprana, manifestada en las marranas por ciclos estrales prolongados y reducción del tamaño de las camadas (11).

Los defectos del desarrollo en el Cerdo, son de significancia económica, ya que contribuyen a la infertilidad, causando mortalidad embrionaria y fetal, mortinatos, muerte neonatal y al predestete, además de retardo de los promedios - del crecimiento en los lechones sobrevivientes (20).

Del total de cigotos formados en la fecundación, aproximadamente un 40-45% de los embriones y fetos en la Cerda no sobreviven al nacimiento y del 5-7% se presentan como mortinatos, según el estudio realizado por Wrathall en 1971. Casi un 30-35% del total de embriones son perdidos durante el período embrionario y un 10% más durante el período fetal. - La mayor pérdida embrionaria ocurre durante la segunda semana de gestación, cuando el blastocito es formado, siendo también considerable hasta el fin de la tercer semana de gestación, según datos proporcionados por Perry y Rowlands en - - 1962. Por otra parte Morrow et. al en 1980, reportan que la

marrana muestra aproximadamente un 20-30% de muertes embrionarias y fetales (20, 23).

McFeely en 1967, detectó defectos cromosómicos en un 10% de los blastocitos examinados y un 2.3% adicional de blastocitos degenerados encontrados en marranas jóvenes a los 10 días después de la monta. En un estudio similar de 76 embriones de 25 días de edad, el 10.5% murieron y al menos el 1.3% manifestaron anomalía cromosómica (23).

Villagomez Zavala en 1984, en un estudio de cerdos con problemas reproductivos, encontró que de 21 hembras, 2 intersexos y un verraco, había 19 hembras infértiles o subinfértiles con un complemento cromosómico  $2n=38XX$ , pero 2 cerdas importadas del Canadá presentaron cariotipos anormales, una fué un mosaico  $2n\ 38XX/38XY$ , y la otra tuvo un complemento cromosómico  $2n\ 38XX/37X0$ . Uno de los intersexos fué clasificado como pseudohermafrodita masculino tras la evidencia de únicamente tejido testicular en las gónadas, sin embargo, ambos tuvieron cariotipos  $2n=38XX$ . El verraco con baja fertilidad también mostró un complemento cromosómico normal, pero reveló hipoplasia testicular bilateral en el estudio histopatológico (36).

Las anomalías del desarrollo probablemente explican casi un tercio de las muertes embrionarias, muchas asociadas con anomalías de la fertilidad, habitualmente gametos po

liploides debidos a defectos cromosómicos (20).

Priester et. al en 1970, de un estudio del Veterinary - Medical Data Program, encontraron que el Cerdo tiene la más alta proporción de defectos congénitos de todas las especies domésticas, principalmente de criptorquidismo, hernias umbilicales e inguinales y atresia anal. Selby et. al. en 1976, usaron datos de un estudio obtenido de los cuestionarios dirigidos por correo a los porcicultores en USA, estimaron que la ocurrencia de defectos congénitos en lechones fué de 0.67% siendo una probable subestimación, ya que aproximadamente el 75% de las respuestas, se reportaron sin defectos en todas ellas. Las más comunes malformaciones fueron siameses, atresia anal, miembros malformados, paladar hendido, hidrocefalos y craneo bifido. Muchos lechones mostraron anomalías múltiples. Smidt en 1972, encontró que los defectos más comunes en Holanda fueron atresia anal, hipoplasia miofibrilar y mioclonia congénita, hernias inguinales y escrotales e intersexos, en conjunto ocurren en un 1.5% en los lechones - principalmente de la raza Dutch Landrace (20).

Deeble en 1974, reportó únicamente un 0.03% de defectos hereditarios en la progenie de las primeras 20 camadas procreadas con inseminación artificial, utilizando semen procedente de verracos de las razas British Large White y Landrace. Los registros de progenie de la raza Landrace fueron - más malos que los de la raza Large White. Las más comunes -

condiciones defectuosas encontradas en los lechones fueron hipoplasia miofibrilar, hernias inguinales, atresia anal, cola deformada, pityriasis rosea y hernias umbilícales (20).

La variación de las malformaciones congénitas de un hato a otro, fué de 0.6% a 2.4% (con una media de 1.4%) en lechones al predestete, examinados a la necropsia en Dinamarca por Bille y Nielsen en 1977. Las más comunes condiciones defectuosas encontradas fueron atresia anal, defectos cardíacos y patas traseras contraídas. Mulley en 1977, en granjas porcinas del Este de Australia, encontró un promedio de 2.3% de defectos congénitos en un año. Los sementales utilizados en las cruzas fueron Large White y Landrace. Los defectos habituales fueron hipoplasia miofibri---lar, criptorquidismo y atresia anal (20).

Según las observaciones probablemente los defectos congénitos aparecerán en un mínimo de 2-3% de los lechones, - si todas las anormalidades son tomadas en cuenta, así como que ciertas razas o líneas raciales contribuirían más que otras (20).

Muchos mamíferos poseen un alto número diploide, y muchos cromosomas muestran tamaño y morfología similar en cariotipos convencionales, únicamente la aneuploidía y obvios desarreglos cromosómicos son distinguibles. Para la identificación inequívoca de trisomías o translocaciones en -

cromosomas específicos, se hizo necesario llegar a una mayor definición en el refinamiento de la metodología. Con el advenimiento de las técnicas de tinción que inducen bandas en los cromosomas, implementadas hacia finales de la década de los 60's y principios de la década de los 70's, fué posible reconocer con precisión a cada cromosoma individualmente, estableciéndose con ello un análisis exacto de cualquier desarreglo cromosómico. De tal modo los numerosos casos ambiguos fueron clasificados correctamente y conclusiones erróneas fueron corregidas (26).

El Cerdo es el mamífero doméstico con menor número de cromosomas ( $2n$  38), de los cuales se pueden identificar 6 pares sin usar bandas y todos al usar bandas. Además, reúne características tales como alta densidad de población; gran prolificidad de la marrana y corto intervalo generacional. Por lo tanto resulta ser el animal doméstico más adecuado para la experimentación, no solo para fines de investigación genética, sino con fines evolutivos y económicos (22).

Hay una gran diversidad en la literatura sobre el arreglo cromosómico del Cerdo. Para armar el cariotipo inicialmente, los cromosomas fueron alineados de acuerdo a su tamaño decreciente. En presentaciones más recientes el orden se establece considerando la posición del centrómero. Con el advenimiento de las técnicas de bandeo se hizo necesaria

la estandarización internacional del orden de los cromosomas en el cariotipo de los animales domésticos. Recientemente fué propuesto un sistema de nomenclatura que decimaliza cada región cromosómica del Cerdo, en base a las bandas G y Q, similar al que se emplea en los cromosomas humanos (12, 17).

Existen varios patrones de bandeo que pueden ser inducidos en los cromosomas: Bandas G, Q, C, R, T, CD, y NOR's. (3, 7, 8, 9, 26, 34). Las bandas G, aparecen en los cromosomas después de una serie de tratamientos químicos, que muy posiblemente llevan a una desnaturalización-renaturalización, donde grandes cantidades de proteínas no histónicas son eliminadas propiciando un rearrreglo de la cromatina y posteriormente es puesto en evidencia tras el tratamiento con el colorante Giemsa, ya que las tiazinas cargadas positivamente interactúan ionicamete a nivel molecular con los grupos fosfato libres a los lados del DNA, favoreciendo un depósito de colorante en las regiones del DNA donde fueron removidas las proteínas no histónicas y en menor grado en regiones del DNA donde los grupos fosfato han sido cubiertos por proteínas no histónicas renaturalizadas de naturaleza acídica (6, 7, 8, 9, 19). Este mecanismo revela segmentos cromosómicos con regiones de DNA ricas en pares de bases Adenina-Timina (bandas intensamente teñidas) y regiones ricas en pares de bases Guanina-Citosina (bandas ligeramen-

te teñidas). Los cromosomas realizan su replicación por regiones (replicones), que tienen distintos tiempos de aparición durante el transcurso de la fase S del ciclo celular - de células en interfase ( 7, 9, 26).

Mediante estudios finos de la replicación de los segmentos cromosómicos, se ha demostrado que las bandas G, son zonas de replicación tardía y se sospecha de que posean un tipo de heterocromatina intercalar, poco funcional para la expresión génica, conteniendo DNA de copia única o moderada-mente repetitivo (5, 6, 7, 9). Las bandas G, representan - una estructura básica de los cromosomas en metafase que puede ser resaltada. Y esta estructura básica se corresponde a la disposición cromomérica de los cromosomas meióticos en el paquiteno (6, 7, 8, 9).

El patrón de bandeo G y Q, sirve para la diferenciación longitudinal de los cromosomas, ambos tienen bandeos similares. Los patrones de bandeo G, que se tiñen intensamente - corresponden a las bandas Q brillantemente fluorescentes y - las bandas Q con nula fluorescencia corresponden al patrón - de bandas G teñido pálido, con la excepción del cromosoma Y, el cuál no es teñido densamente con la técnica de - bandeo G. Además las bandas G que se tiñen ligeramente con Giemsa, tienen correspondencia con las bandas R positivas - (1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 13, 26, 31, 37).

La revisión de la metodología técnica de los distintos-

procedimientos para inducir bandas G, son analizados de manera detallada en sólo una pequeñísima parte de los reportados en la literatura, ya por demás muy amplia, y en constante aumento. (Un panorama general sobre este detalle se localiza en la Tabla # 1).

Hageltorn, M. y Gustavsson, I. en 1973, indican que después de la evaluación de diferentes técnicas para revelar bandas G en el cariotipo porcino, el pretratamiento con Tripsina proporciona los más consistentes resultados. Ellos muestran también, que el bandeo G es similar al patrón con MQ, - incluso en el cromosoma Y, en contraste a lo reportado por Berger, T. en 1972. Igualmente puntualizan que el cromosoma 9 puede ser distinguido del X por una banda intensa y ancha en la mitad discal del brazo corto, comparada a la sobresaliente banda estrecha central en el brazo corto del X. En el brazo largo, el cromosoma X presenta a diferencia del cromosoma 9 un patrón de dos bandas más sobresalientes. Estos autores presentan un registro fotoeléctrico comparado de las bandas G y Q (14).

Hansen-Melander et. al. en 1974, inducen bandas G empleando Urea 4 M y ClNa 0.2% a una temperatura de 60°C por 3.5-9 Hrs. Igualmente prueban Tripsina 0.002% por 10 minutos a 37°C, y por otro lado prueban Tripsina-Verseno (50 ml. de H<sub>2</sub>O, 8 ml. de Tripsina 0.25% y 8 ml. de Verseno). En este último tratamiento, notan que el tiempo apropiado de incu

bación para obtener buenos resultados es dependiente de la edad de la mezcla Tripsina-Verseno, este método les da resultados más variables que el de Urea-ClNa, pero aquél es más rápido. Los autores comentan que los cromosomas porcinos responden desfavorablemente a los tratamientos comunmente usados para inducir bandas, siendo a menudo hinchada y distorsionada la morfología (16).

Hansen-Melander, E. y Melander, Y, en 1974 proponen en base al patrón de bandeo C y G en el Cerdo, otro sistema para el arreglo cariotípico el cuál comprende 5 grupos basados en la clasificación de cromosomas de Levan et. al. de 1964, que considera el valor de la relación entre brazos es de: M:1.0; m:1.0-1.7; sm:1.7-3.0; st:3.0-7.0; t:7.0-0.0 y T:0.0. El grupo A: consiste en un par de cromosomas sm grandes: el grupo B: en dos pares de cromosomas sm/st; el grupo C: siete pares incluyendo al X, cromosomas de tamaño mediano sm y m, además el par 6 exhibe a menudo una constricción secundaria; el grupo D: muestra tres pares de cromosomas cortos, el par 10 muestra una constricción secundaria en el brazo corto adyacente al centrómero, y el grupo E: consiste en seis pares de cromosomas T (17).

En 1976 en Reading, Inglaterra, se celebró la Ira. Conferencia Internacional para la Estandarización de Cariotipos - Bandeados en Animales Domésticos. Tuvo como objetivo principal identificar y describir los patrones de bandeo G en los-

cromosomas con suficiente detalle para permitir la inequívoca identificación de los cromosomas individuales de las siguientes especies: Bovino (*Bos taurus*); Oveja (*Ovis aries*); Cabra (*Capra hircus*); Caballo (*Equus caballus*); Gato (*Felis catus*); Conejo (*Orytolangus cuniculus*) y en el Cerdo (*Sus scrofa*) (12).

El sistema de nomenclatura usado en la Conferencia de Reading, se basó en el sistema desarrollado para la descripción de los cromosomas bandeados en el humano de la Conferencia de París en 1971 (12).

Los cromosomas son visualizados como consistiendo de una serie de bandas claras (aparentemente desteñidas) y bandas oscuras (áreas teñidas) y por definición sin interbandas. Los términos bandas claras y oscuras son calificados por el uso de los términos siguientes: "debil, ancho, sobresalientes y prominente". Los brazos cortos y largos son llamados "p" y "q" respectivamente. Las áreas particulares de los brazos son especificados por el uso de los adjetivos: "proximal, central y distal". Dos descripciones adicionales de la localización fueron usadas: "cercanos o adyacentes al centro mero y terminal" (12).

No se llegó a establecer un detallado sistema descriptivo del patrón de bandeo (un sistema con regiones marcadoras y numerando cada banda individualmente, de manera similar al

sistema utilizado en el humano) puesto que se estimó prematuro, ya que en ese momento poco trabajo había sido hecho en el mapeo de bandas de los animales domésticos (12).

En el Cerdo, los autosomas se clasifican por la posición del centrómero en 4 grupos: 1- Metacéntricos (m); submetracéntricos (sm); subtlocéntricos (st) y telocéntricos (t), éstos fueron acomodados en orden de tamaño decreciente. No se llegó a un acuerdo en la descripción del bandeo decreciente por las incongruencias para la descripción del cromosoma 9 y del cromosoma X, por su similar bandeo (12).

Las Recomendaciones del Cariotipo con Bandas G en el Cerdo como sigue:

CROMOSOMA No.	CARACTERISTICAS DISTINTIVAS.
1	p: Banda central clara. q: Dos bandas centrales oscuras.
2	p: Tinción oscura. q: Banda estrecha oscura cercana al centrómero. Banda clara proximal oscura distalmente.
3	p: Banda central oscura. q: Cinco bandas igualmente oscuras con tendencia a fusionarse.
4	p: Banda oscura cercana al centrómero. q: Dos bandas proximales oscuras. Mitad distal clara con banda oscura.
5	p: Banda oscura adyacente al centrómero. q: Banda oscura adyacente al centrómero. Banda central clara y dos bandas distales oscuras.

- 6 p: Banda central oscura.  
q: Banda clara proximal con dos estrechas -  
bandas oscuras.
- 7 p: Banda central oscura.  
q: Cinco bandas oscuras igualmente espaciadas, la 3ra. y 4ta. bandas con tendencia a fusionarse.
- 8 p: Dos bandas oscuras.  
q: Banda oscura ancha proximal. Dos bandas oscuras distales.
- 9 p: No resuelto.  
q: No resuelto.
- 10 p: Gran constricción secundaria. Dos bandas oscuras distalmente a la constricción, y pueden ser resueltas en tres bandas.  
q: Dos bandas oscuras.
- 11 p: Oscura banda ancha proximal. Estrecha -  
banda oscura distal.  
q: Dos bandas oscuras (Este cromosoma generalmente se tiñe más oscuro que el No. -  
12).
- 12 p: Banda oscura proximal. Estrecha banda -  
oscura distal.  
q: Dos bandas oscuras con tendencia a fusio  
narse.
- 13 p: Cuatro bandas oscuras que pueden ser sub  
divididas. Bandas oscuras anchas con lo  
calización distal.
- 14 q: Dos bandas oscuras proximales. Banda cen  
tral clara. Tres bandas oscuras distales  
igualmente separadas.
- 15 q: Ancha banda oscura proximal. Ancha banda  
clara central. Cuatro oscuras bandas dis  
tales igualmente espaciadas.
- 16 q: Dos oscuras bandas proximales. Distalmen  
te banda clara con oscura.
- 17 q: Ancha banda oscura adyacente al centróme  
ro. Distalmente banda clara con estrecha  
banda oscura.

- 18           q: Oscura banda central.
- X            p: No resuelto.  
              q: No resuelto.
- Y            p: Tinción oscura.  
              q: Estrecha banda oscura.

Rubes, J. y Lojda, L. en 1980, señalan que los patrones de bandas G en cromosomas de metafase tardía y media, permiten una identificación gruesa de los rearrreglos estructurales. Un examen más detallado puede ser llevado a cabo con cromosomas en metafase temprana, prometafase y/o profase tardía. Un número reducido de esas fases pueden ser obtenidas por los métodos convencionales de cultivo de sangre periférica arresando con colchicina. Con este fin, sincronizaron cultivos de linfocitos de sangre periférica por el método de Yunis de 1975, usando metrotexate, timidina y colcemida. También usan el método de Viegas-Pequignot de 1978, que emplea sólo timidina (28).

Se obtuvieron buenos resultados con ambos métodos. El método de Viegas-Pequignot es más simple y apropiado para aplicarlo en Cerdos. Ellos recomiendan las siguientes condiciones: 0.3 mgr/ml. de timidina agregada a los cultivos con 48 Hrs. de incubación, permitiendo que actúe por 15 Hrs. Después la timidina es removida y las células sembradas sólo con el medio por 4-5 Hrs. No usaron agentes citostáticos. Para el bandedo recomiendan bajas concentraciones de Tripsina (Difco 1:250), 0.1% en PBS por 5 segundos a temperatura am-

biénte, los cromosomas fueron teñidos con Giemsa 4% en Buffer de Fosfato pH 6.9 (28).

Lin, C.C. et. al. en 1980, empleando la técnica fluorescente de bandeos Q con el fluorocromo espermina bis-acridina (CNA)<sub>2</sub> S de Van de Sande de 1979, y bandas G con Tripsina, en cromosomas largos de metafase temprana, indican que es factible distinguir entre el cromosoma 9 y el X. Con bandas G el cromosoma X tiene una banda positiva localizada en la región central del brazo corto, mientras que el cromosoma 9 tiene dos bandas positivas, la principal localizada en el centro y la otra situada terminalmente en el brazo corto, además el brazo largo del cromosoma X presenta una pronunciada banda positiva en el tercio proximal, claramente diferenciada de una banda negativa localizada cerca del centrómero. En el cromosoma 9 casi toda la mitad proximal del brazo largo es positiva, dos bandas positivas, una localizada centralmente y otra en la región proximal son frecuentemente oscuras. El cromosoma X tiene, al igual que el cromosoma 9 una longitud promedio de 4.9  $\mu$ m; sin embargo la relación de brazos es distinta, 1.2 + 0.11 para el cromosoma 9 y 1.3 + 0.13 para el cromosoma X, siendo el cromosoma 9 más metacéntrico. Sus hallazgos apoyan las tempranas observaciones de Gustavsson et. al. de 1972 (21).

## 11. OBJETIVOS.

Este trabajo va encaminado a determinar cuales podrían ser las condiciones más apropiadas de las técnicas para inducir bandas G, reportadas en la bibliografía adecuadas al cerdo (Ver tabla No. 1), así como ensayar ciertas variantes de las mismas con respecto al tiempo y la temperatura- (Ver tabla No. 2)

## III. MATERIAL Y METODOS.

Las preparaciones cromosómicas se obtuvieron a partir de cultivos de linfocitos de sangre periférica de cerdos machos. Aproximadamente 10 ml. de sangre heparinizada fueron colectados de la vena yugular en cada uno de los 43 animales muestreados.

La técnica de cultivo utilizada fué una modificación de la técnica de Moorhead (24); donde 0.5 ml. de sangre completa heparinizada, se cultiva en condiciones de esterilidad en matraces Erlenmeyer de 125 ml., conteniendo: 8 ml. de medio de cultivo McCoy 5A modificado (Gibco), 2 ml. de suero fetal de ternera (Anchor), 0.3 ml. de fitohemaglutinina (Gibco) y 0.05 ml. de una solución de antibioticos (con una concentración final de 50 U.I. de penicilina y 50 ugrs. de estreptomycin/ml. de medio de cultivo). Los cultivos fueron incubados a 37°C por aproximadamente 72 horas.

El procedimiento para las preparaciones cromosómicas fué el siguiente: Previamente al término de la cosecha de células fué añadido 0.3 ml. de una solución de colchicina (con una concentración final de 4 ugrs./ml. de medio de cultivo) por 20 minutos. Después del tratamiento con colchicina, el medio de cultivo fué removido por centrifugación a 1500 rpm por 10 minutos, y los leucocitos fueron tratados -

con una solución hipotónica de KCl 0.075 M por un total de 30 minutos (20 minutos a 37°C y 10 minutos del centrifugado a 1500 rpm). El sobrenadante fué desechado y las células fueron fijadas con una solución preparada en fresco de metanol-ácido acético 3:1 por 10 minutos a temperatura ambiente, luego fué removido tras la centrifugación hasta dejar un volumen adecuado al botón celular, esta operación se realizó en 3 ocasiones. De 2 a 3 gotas de la solución resuspendida fueron depositadas sobre laminillas limpias y desengrasadas con alcohol o xileno, y se dejaron secar al aire a temperatura ambiente.

Una vez obtenidas las preparaciones cromosómicas se procedió a formar dos grupos: el primero con laminillas recientemente preparadas (entre 2 a 3 días) y el otro grupo con las laminillas envejecidas <sup>de</sup> con varios meses. Las técnicas de bandeado cromosómico para revelar el bandeo G, han sido previamente descritas con detalle en la Tabla No. 1. Los tratamientos ensayados tienen ligeras modificaciones (Ver detalle en la tabla No. 2), ordenados en 6 grupos:

- El grupo No. 1: Utilizó distintas concentraciones de Trip-sina (Gibco 1:250) en varios tiempos a temperatura ambiente y a 37°C.

- El grupo No. 2: Empleó distintas concentraciones de Urea a varios tiempos y diferentes temperaturas.

- El grupo No. 3: Usó NaOH 0.07 N (2.8 grs. de NaOH y 6.2 - grs. de ClNa/1000 ml. de Agua Destilada, pH 7.0) y Solución Salina Citratada (SSC) 12 x (105.2 grs. de ClNa y 52.9 grs. de Citrato Trisódico/1000 ml. de Agua Destilada, pH 7.0), - sin modificaciones en los tiempos y temperaturas de incubación.
- El grupo No. 4: Consistió también de NaOH 0.07 N, probados varios tratamientos a diferentes tiempos a la temperatura ambiente.
- El grupo No. 5: Ensayó Acido Tricloroacético (TCA) 0.25% a diferentes tiempos a temperatura ambiente y a 37°C.
- El grupo No. 6: Utilizó Acido Perclórico (PCA) 0.25%, a varios tiempos a temperatura ambiente y a 37°C.

En todos los tratamientos se empleó para teñir las preparaciones cromosómicas una solución Giemsa al 2% en buffer Sörensen (20.87 grs. de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ /1000 ml. de Agua Destilada y 9.53 grs. de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /1000 ml. de Agua Destilada, pH 7.0) - por espacio de 5 minutos.

Para cada tratamiento se analizó metafases tanto con cromosomas elongados como con cromosomas compactados. Registrando la morfología cromosómica y la calidad en la nitidez de las bandas inducidas. Además se efectuó un análisis de los resultados para sugerir cual es el método más senci-

llo en operación así como el que proporcionó resultados más reproducibles.

Para el análisis de las preparaciones cromosómicas bandeadas y teñidas, en el microscopio compuesto a 100x, fué determinado el número fijo de 20 metafases por cada variable, sumando un total de 3,785 metafases observadas, distribuídas de la siguiente forma: Tripsina 1,040 metafases; Urea 1,945 metafases; NaOH y SSC12x 160 metafases; NaOH 240 metafases; TCA 200 metafases y PCA 200 metafases. En cada una de estas metafases observadas fué señalada la tipificación de la estructura cromosómica tras el efecto del bandeo específico: Sin alteraciones morfológicas; hinchazón de los cromosomas; cromosomas plumosos; cromosomas despirilizados y cromosomas con sedimentos a su alrededor o más raramente encapsulamiento de los cromosomas en su membrana nuclear. También fué señalada en cada metafase observada la calidad del bandeo y la presentación de las bandas, atendiendo a la siguiente clasificación: No bandas en ninguno de los pares cromosómicos que componen la metafase usual; bandas presentes, pero no extensivas a todos los pares; bandas presentes, pero extensivas a todos los pares ambas clasificaciones con una deficiente definición de las bandas inducidas. Por otro lado, fueron tipificadas las metafases que mostraron buena definición, tanto de todos los cromosomas como de casi todos los pares. Los controles de cada tratamiento fueron las laminillas ensaya-

das para la prueba de cada cultivo, del que se prepararon -  
las laminillas para bandeo. Los controles no sufrieron tra-  
tamiento de bandeo alguno y solo fueron teñidos con el colo-  
rante giemsa, el número de laminillas control fué de 215. -  
Adicionalmente fué analizada la calidad de tinción de las la  
minillas bandeadas, con un tiempo fijo de 5 minutos de tin-  
ción.

Tabla No. 1 RESUMEN DE TECNICAS PARA INDUCIR BANDAS G<sub>1</sub>

Autos	Sudrajat <sup>1</sup> (1971)	Robert & Leide (1963)	Hughson & Gusterson (1973)	Hansen-Melander, Melander & Olin (1974)	Sporling & Womer (1972)	Sorger (1972)	Rand (1977)	Shriah (1972)	Kato & Yasuda (1972)	Hansen-Melander, Melander & Olin (1974)	Dreft & Shaw (1971)	Schnell (1971)	Rosen (1977)	Rosen (1977)
1a. Inducción	Tripsina (Difca) al 0.25 % en Solución Salina Inoculante, por 15-18 segundos	Tripsina (Difca) al 0.1 % en PBS, por 5 segundos a temperatura ambiente	Tripsina (Difca) al 0.045 % en solución isotónica balanceada libre de Ca <sup>++</sup> y Mg <sup>++</sup> por pocas minutos a 37°C	Tripsina al 0.002 % en solución GKN a 37°C por 15 minutos	Solución de Tripsina - Versam (3ml. de Tripsina al 0.25 % - 5 ml. de Versam "EDTA" al 2%) - 50 ml. de agua destilada, dejar enjuagar 50 minutos, por 2-3 minutos a temperatura ambiente.	Urea 8 M en K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.87 g./% pH 7.3, por 15-20 minutos, a temperatura ambiente.	Sulfato de Amonio 0.6M, por 5 minutos	Urea 8 M diluida 2:1 en Buffer Sorensen pH 8.8 a 37°C por 18 minutos	Urea 6 M - - Citr 2 M, pH 6 a 7, por 20 minutos a 37°C	240 grs. de Urea 4 M - 2 grs. de Citr, disueltos en 1000 ml. de agua destilada por 3.5 a 9 horas a 80°C.	Na OH 0.07 M en CI Na 0.112 M con pH 12, a temperatura ambiente por 30 segundos	Na OH 0.07 M a 20°C por 90 segundos	Sulfato de Amonio 0.5 M, por 5 minutos	Sulfato de Amonio 0.5 M, por 5 minutos
2a. Inducción	Dos veces en solución Salina Inoculante	En Agua Destilada		En Solución GKN por 30 segundos		En Agua Destilada	Tres veces en Buffer Sorensen pH 8.0	En Agua Corriente	En Agua Corriente	En una mezcla de 50 ml. de Agua Destilada + 3 ml. de Buffer de Fosfatos 0.05 M pH 8.8 por 30 segundos	Tres veces en 122 SSC, pH 7.0 por 5 a 10 minutos en cada ocasión	En Serie Alcohólica Ascendente (Etanol al 70 o/a y 95 o/a y Absoluta)	Tres veces en Buffer Sorensen pH 8.8	Tres veces en Buffer Sorensen pH 8.8
Lavado							Urea 3 M en Buffer Sorensen pH 8.0 por 3 minutos a 22°C				12 x SSC a 65°C por 50 a 72 horas	Buffer Sorensen pH 8.8 por 24 horas a 58 °C	TCA al 0.25 o/a (Acido Tricloro-Acético en Buffer Sorensen pH 8.0 por 10 minutos a 22°C)	PCA al 0.25 o/a (Acido Perclórico en Buffer Sorensen pH 8.0 por 10 minutos a 22°C)
Tinción	Leishman (D. M.) al 25 o/a en Buffer Sor pH 8.8, por 3 - 5 minutos	Giemsa al 4 o/a en Buffer Sorensen pH 8.8	Solución Giemsa (2 ml. de Giemsa concentrada en 100 ml. de Buffer Sorensen por 5 minutos)	Solución Giemsa (3 ml. de Giemsa concentrada + 3 ml. de Buffer de Fosfatos, pH 8.8 50 ml. de Agua Destilada) por 2 minutos		Giemsa Tamp. al 0.1 o/a, pH 8.7	Giemsa	Giemsa diluida 1:50 - 70 ml. en Buffer Sorensen pH 8.8 por 5 - 20 minutos a temperatura ambiente	Giemsa en Buffer Sorensen 1:40 ml. pH 7.0 por 5 minutos	Solución Giemsa (3 ml. de Giemsa concentrada + 3 ml. de Buffer de Fosfatos pH 8.8 + 50 ml. de Agua Destilada) por 2 minutos	Solución Giemsa (5 ml. de Giemsa concentrada, Curtin Sci Co. 3 ml. de Metanol Absoluta 3 ml. de Acido Clorico 0.1 M con 100 ml. de Agua Destilada, pH 6.5) por 5 minutos	Giemsa (Merck) pH 7.0 por 20 minutos	Giemsa	Giemsa
Lavado	En Buffer Sor pH 8.8		En una solución de 5 ml. de Buffer Sorensen - 95 ml. de Agua Destilada por 1 minuto a más	En Agua Corriente por 30 segundos						En Agua Corriente por 30 segundos				

TABLA No. 2  
RESUMEN DE TÉCNICAS MODIFICADAS PARA INICIAR BANDAS G

Grupo	Subgrupo	Tratamiento	Incubación	Temperatura
I	1	Tripolín 0.25 a/o en Solución Salina	3 5 10 Segundos 15 20 30	22 y 37° C.
	2	Tripolín 0.1 a/o en Solución Salina	3 5 Segundos 10 15	22 y 37° C.
	3	Tripolín 0.045 a/o en Solución Salina	30 Segundos 60 2 3 5 10 y 20 Minutos	22 y 37° C.
	4	Solución Tripolín-Verano Tripolín 0.03 a/o en EDTA al 0.24 a/o	1 1.5 2 2.5 Minutos 3 4	22 y 37° C.
	5	Tripolín 0.002 a/o en Solución Salina	3 5 10 Minutos 15 20	22 y 37° C.
	6	Tripolín 0.0005 a/o En Solución Glicerol Bufferada	3 5 15 Minutos 20 25 30	37° C.
II	1	Urea 8 M en Buffer Sorenson	5 10 15 Minutos 20 30 60	22 y 37° C.
	2	Urea 8 M en Buffer Sorenson	3 5 10 Minutos 15 30	22 y 37° C.
	3	Urea 8 M en CNa 2 M	5 10 20 30 Minutos 60 90	22 y 37° C.
	4	Urea 4 M en CNa	1 2 3.5 5 Horas 7 9	60° C.
	5	Pretratamiento con $\text{NH}_4\text{SO}_4$ 0.6 M	5 Minutos	22° C.
		Urea 3 M en Buffer Sorenson	2 3 5 Minutos 10 15	22 y 37° C.
III	1	Pretratamiento: $\text{NaOH}$ 0.07 en CNa 0.112 M	30 Segundos	20° C.
		Solución Salina Clorada: CNa 1.8 M y Clorato Triclórico 0.18 M	60 y 72 Horas	85° C.
IV	1	$\text{K}_2\text{O}_8$ 0.07 M	30 60 90 Segundos 120 180	22° C.
		Buffer Sorenson	24 Horas	50° C.
V	1	Pretratamiento: $\text{NH}_4\text{SO}_4$ 0.06 M	5 Minutos	22° C.
		TCA 0.25 a/o	3 5 10 15 Minutos 20	22 y 37° C.
VI	1	Pretratamiento: $\text{NH}_4\text{SO}_4$ 0.6 M	5 Minutos	22° C.
		PCA 0.25 a/o	3 5 10 Minutos 15 20	

## IV. RESULTADOS.

Los resultados aquí mencionados, se refieren en su totalidad a las laminillas que fueron preparadas en fresco y subsecuentemente bandeadas, pues las laminillas envejecidas no mostraron inducción de bandas. Por lo que más adelante, salvo necesidad implícita, no serán mencionadas.

Grupo 1.1 TRIPSINA 0.25% en Solución Salina, por 2,5, -  
10, 15, 20 y 30 segundos a 22°C y a 37°C.

Las preparaciones cromosómicas ensayadas, no tuvieron resultados satisfactorios, pues sólo el 2% de las metafases observadas mostraron buen bandeo, pero no fué extensivo a todos los pares. La característica general de este tratamiento es centralizada en la no inducción de bandas con un 41% - y en el mal bandeo de los cromosomas, tanto no extensivo como extensivo para todos los pares cromosómicos, obteniendo - respectivamente un 43 y un 14% de las metafases observadas.- La morfología cromosómica fué afectada principalmente por la hinchazón de las cromátides de una manera extrema, alcanzando un 44% de las metafases, y en menor grado la apariencia - cromosómica fué afectada por un 29% de metafases con cromosomas plumosos y un 13% de metafases con cromosomas despirilizados, otro tanto similar fué para las metafases que mantuvieron la morfología sin alteraciones.

No hubo una tendencia clara a ser superior el bandeo tanto a 22°C como a 37°C, siendo en cierta medida equiparables ambos tipos uno de otro, pero fué notoria la falta de una inducción correcta de las bandas, observando un bandeo brusco y desigual de las metafases, propiciando la distorsión cromosómica muy desventajosa para la observación de la definición. Las muy escasas metafases con bandeo de buena calidad fueron encontradas en la primera variable a 22°C, dentro de los 2 segundos de exposición, en cambio esta fase crítica de aparición de bandas fué encontrada entre los 5 y 10 segundos a 37°C, pero comparativamente de menor calidad óptica.

Grupo 1.2 TRIPSINA 0.1% en Agua Destilada, por 2,3,5, -  
10 y 15 segundos a 22°C y 37°C.

Las preparaciones cromosómicas no tuvieron resultados satisfactorios, mostrando tanto a 22°C como a 37°C una inducción muy pobre de bandas y algunas veces oculta bajo sobreteñido en los tiempos de 10 y 15 segundos a 22°C. La tendencia más relevante fué la inducción de patrones de bandeo pobres o algo difusos, encontrados con mayor frecuencia a 37°C principalmente a los 10 y 15 segundos. Hubo un 68% de metafases con morfología sin alteración y de éstas, gran parte corresponden a la variable de 22°C, además hubo un 25% de metafases con cromosomas hinchados, efecto que estuvo repartido en ambas temperaturas, por otro lado hubo un ligero efec-

to en la presentación de cromosomas plumosos. El tratamiento mostró un marcado 58% en el no bandeo de los cromosomas y un 37% de las metafases mostraron cromosomas con patrones difusos no extensivos a todos los pares, con un 4% de metafases con cromosomas de bandeos difusos para todos los cromosomas, ocurriendo preponderantemente a 37°C.

Grupo 1.3 TRIPSINA 0.045% en Solución Salina por 30 segundos, 1,2,3,5,10 y 20 minutos a 22°C y a 37°C.

Las preparaciones cromosómicas ensayadas, tuvieron efectos desventajosos, ya que hubo un adecuado bandeo en despreciable proporción, cercana al 1%, sumado a un 5% de metafases con cromosomas bien bandeados en su mayoría. Concentrándose las frecuencias más altas en metafases no bandeadas y mal bandeadas, pero no extensivas a todos los pares, alcanzando un 31 y 38% respectivamente. Un 25% de las metafases observadas, mostró un mal bandeo que abarcó a todos los pares, la morfología cromosómica fué conservada en un 34% de las metafases. Los mejores bandeos ocurrieron a 37°C a los 5 minutos donde fué mayor el número de metafases que mostraron cromosomas sin alteraciones morfológicas, pero esa y las demás variables mostraron gran número de cromosomas hinchados. A los 22°C, los bandeos aceptables no fueron visualizados y donde la apariencia cromosómica fué afec

tada notoriamente por la despirilización y el hallazgo de cromosomas plumosos.

Grupo 1.4 TRIPSINA-VERSENO por 1,1.5,2,2.5,3,4 minutos a 22°C y a 37°C.

Los cromosomas mostraron mejores bandeos a 22°C, principalmente a 1 minuto de exposición, aunque sobradamente en las demás variables fué posible observar una muy buena cantidad de metafases con patrones de bandeo completos 15% o incompletos 6%, pero con una notable calidad, pues la morfología cromosómica se mantuvo adecuada en más del 40% coexistiendo con un 31% y 19% respectivamente de cromosomas hinchados o plumosos. Señalando que las bandas fueron eficientemente inducidas en todos los cromosomas mostrando zonas bien delimitadas entre banda e interbandas. Por otro lado, la temperatura a 37°C fué muy desventajosa, pues indució escasamente patrones de bandeo, pero en cambio produjo una gran proporción de metafases no bandeadas, principalmente con cromosomas hinchados y en un menor grado plumosos.

Grupo 1.5 TRIPSINA 0.002% en Solución Salina por 3,5,10,15 y 20 minutos a 22°C y a 37°C.

Las preparaciones cromosómicas ensayadas, mostraron únicamente bandeos de calidad a los 3 minutos a 22°C, en general el bandeo produjo un 62% de metafases con cromosomas no-

bandeados, sumados al 31% de cromosomas mal bandeados para casi todos los cromosomas y un 4% de metafases bien definidas en sus bandeos pero no extensivo a todos los pares. La morfología sólo fué mantenida sin alteración en la primera variable del tratamiento a 22°C, pero las demás variables mostraron un 58% de metafases con cromosomas hinchados, un 22% de metafases con cromosomas plumosos y un 14% de cromosomas despirilizados.

Comparativamente fué superior el bandeo a 22°C sobre el de 37°C para producir bandeos adecuados, pero en cambio los bandeos mal definidos no extensivos para todos los cromosomas, se encontraron principalmente a 37°C, el no bandeo de los cromosomas aumentó a medida que fué incrementado el tiempo de exposición, principalmente a 22°C, en contraste las alteraciones en la morfología cromosómica no mostraron una tendencia a seguir, salvo la excepción ya mencionada.

Grupo 1.6 TRIPSINA 0.25% 1:500 en Solución Giemsa, por 3,5,15,20,25 y 30 minutos a 37°C.

Las preparaciones cromosómicas con 3 minutos de exposición, mostraron un aceptable bandeo, pero cuando paulatinamente fueron incrementados los tiempos del tratamiento, mostró un empobrecimiento hasta llegar a sólo indicios de bandas en alguno de los cromosomas. Se manifestó una tendencia a la hinchazón de la morfología, con esporádicas metafases -

plumosas con un 78 y 17% respectivamente, las bandas cuando fueron inducidas mostraron una apariencia uniformemente definida para todos los pares.

Grupo 2.1 UREA 8 M en Tampon Sørensen por 5,10,15,20, -  
30 y 60 minutos a 22°C y 37°C.

Las extensiones cromosómicas tratadas con esta alta concentración de urea, mostraron resultados muy homogéneos entre sí para todos los tiempos, tanto a temperatura ambiente como a 37°C, pero estos resultados fueron negativos en más del 81%, con apariencia desmesuradamente hinchada y con tefido muy pálido, sólo algunas metafases con un poco más del 16% mostraron alguna traza de bandas a lo largo de las cromátides, presentándose en forma muy irregular en cada metafase observada. La característica más notable de este tratamiento fué la gran hinchazón de las cromátides, que alcanzó cerca del 98% de las metafases observadas, así también lo fué la casi nula producción de bandas en los cromosomas de las metafases observadas.

Grupo 2.2 UREA 8 M 3:1 en Tampon Sørensen por 3,5,10, -  
15 y 30 minutos a 22°C y 37°C.

Las preparaciones cromosómicas tratadas mostraron en general que el bandeo fué evidente en más del 80% de las metafases observadas, aunque sólo el 5% de estas metafases mos-

traron bandeos completos para todos los cromosomas con eficaz definición de las bandas, sumado al 15% de las metafases bandeadas en casi todos los cromosomas y con buena nitidez en la mayoría de ellos. La inadecuada definición de las bandas, pero evidentes en todos los pares alcanzó más del 28%, aunque fué algo mayor del 31% las metafases, donde la definición fué incompleta para todos los pares y cerca del 20% de las metafases observadas no mostraron bandas ninguno de los cromosomas.

Los resultados comparativos entre la exposición de los cromosomas bajo temperatura ambiente y a 37°C, se balancea a favor de la primera, siendo más eficaz en la producción de bandas y en el nítido contorno de las mismas. Por otro lado, los tiempos de bandeo mejores fueron a 22°C, por 10 y principalmente a 15 minutos, aunque el bandeo fué evidente desde los 3 minutos, no obstante estas últimas variables fueron equiparables a los mismos tiempos en los tratamientos a 37°C, con respecto a la frecuencia de metafases de buena calidad, pero estas últimas manifestaron una desfavorable tendencia a inducir una mayor cantidad de metafases con cromosomas mal bandeados, así también como un alto grado de despirilización de las cromátides. Pero con resultados inversos en los tratamientos a 37°C, siendo respetablemente superiores para producir gran número de metafases, en las cuales la mayoría de los cromosomas mostraron inducción

de bandas, pero con variables grados de hinchazón de las cromátides.

A temperatura ambiente, la frecuencia de metafases con cromosomas hinchados aumentó a medida que fué incrementado el tiempo de exposición, aunque en los tiempos de 3 a 5 minutos; son manifiestas las metafases con cromosomas plumosos que muestran también hinchazón, pero con distorsión de la morfología, mostrando perfiles vellosos, esta característica fué inconstante en los demás tiempos de exposición, principalmente a los 15 y 10 minutos, cuando las metafases son claramente mejor bandeadas y a la vez en estas variables son más escasas las metafases no bandeadas, en cambio en las variables de 3 a 5 minutos hubo un efecto contrario. Cabe destacar que los sedimentos en algunas metafases fueron menos visibles mientras mayor fué el tiempo de exposición, independientemente de la temperatura ensayada.

El límite crítico del bandeo a 22°C, fué localizado hacia los 30 minutos, en cambio este límite fué más estrecho a 37°C, situándolo alrededor de los 15 minutos.

Grupo 2.3 UREA 5 M en ClNa 2 M por 5,10,20,30,60 y 90 minutos a 22°C y a 37°C.

Las preparaciones cromosómicas tratadas, mostraron una irregular inducción de los patrones de bandeo, pues sólo el-

2% de las metafases observadas fueron tipificadas como de buen bandeo para todos los pares y con nitidez y morfología cromosómica adecuada, proporcionando metafases donde los patrones fueron los mejores comparativamente a todos los tratamientos de urea, sumado a esto alrededor del 9% de metafases donde la mayor parte de los cromosomas están bien bandeados. En contraste el 42% de las metafases fueron tipificadas como mal bandeadas y de forma incompleta a todos los pares, aunado a este fenómeno hubo un 26% de metafases que no evidenciaron bandas, algo notable fué que, el 51% de las metafases observadas no mostraron alteraciones morfológicas desfavorables, localizándose este fenómeno en las variables de 5 y 10 minutos a 37°C, pero siendo mejores de modo abrupto a los 22°C, comenzando desde los 20 a los 90 minutos.

El nulo bandeo de los cromosomas se hizo presente de forma más marcada en todos los tiempos a 37°C, así mismo la despirilización de las cromátides junto con la aparición de cromosomas plumosos, fueron más notorios en esta temperatura. Por otro lado, la frecuencia de metafases que mostraron hinchazón fué mayormente localizada en todos los tiempos a 22°C, pero con tendencia a disminuir a medida que aumentó el tiempo de exposición.

A temperatura ambiente, la frecuencia de metafases bien bandeadas, tanto para todos los pares o para casi todos, fueron considerablemente mejores que a 37°C, del mismo modo

ocurrió con la frecuencia de metafases mal bandeadas para to dos los pares. En cambio la frecuencia de metafases mal ban deadas pero que no incluyó a todos los pares, fué superior - en la mayoría de los tiempos de exposición a 37°C. Las ban das de calidad fueron evidentes a partir de los 20 hasta los 69 minutos a 22°C, sin embargo a 37°C no hubo tendencia al - bandeado de calidad para todos los pares cromosómicos, salvo a 60 minutos únicamente.

Grupo 2.4 UREA 4 M en ClNa 0.034 M por 1,2,3.5,5,7 y 9- horas a 60°C.

Las preparaciones cromosómicas tratadas, mostraron un - 42% de metafases sin alteraciones cromosómicas, un 38% de - las metafases observadas mostraron cromosomas hinchados y en menor grado cromosomas despirilizados con un 18%, únicamente un 2% de las metafases mostraron cromosomas plumosos, princi palmente en la última variable. Las metafases hinchadas mos traron cromosomas teñidos pálidamente.

Las bandas se hicieron presentes en todas las variables, pero fueron mucho mejores entre los 3.5 y 5.5 horas. La ca lidad de las bandas fueron en un 38% bien bandeadas no exten sivo a todos los cromosomas un 12% de las metafases observa das mostraron buena definición en el bandeado y extensivo a to dos los pares. Un 25% de las metafases no mostraron bandas - y un 15% de las metafases tuvieron cromosomas mal bandeados,

pero no extensivo a todos los pares, un 10% de las metafases observadas también tuvieron cromosomas mal bandeados, pero - extensivos a todos los cromosomas.

Grupo 2.5 Pretratamiento con  $\text{NH}_4 \text{SO}_4$  0.6M por 5 minutos  
Urea 3M por 2,3,5,8,10,15 minutos a 22 y 37°C.

En este tratamiento es muy evidente que el uso del Sulfato de Amonio es benéfico para la limpieza del fondo de la laminilla y su calidad óptica al ser teñida, por esta razón - fué difícil observar los bandeos en los cromosomas, ya que - mostraron un excesivo sobreteñido, pero con notable claridad en los alrededores de los cromosomas. Lógicamente, el análisis de las metafases fué muy desventajoso para la observa----ción de las bandas cubiertas por el sobreteñido, resultando que un 92% de las metafases mostraron alguna inducción en----cubierta, pero fué notable que las bandas que se conservaron fueron visualizadas en las variables a 22°C, siendo más esca---sas a 37°C.

Este tratamiento permite hasta un 39% de metafases sin - alteraciones morfológicas desventajosas, coexistiendo con un 27% de metafases con cromosomas plumosos y sólo un 12% de - cromosomas hinchados. Los sedimentos son removidos totalmen---te a 37°C, pero persisten algunos casos a los 22°C.

Grupo 3. NaOH 0.07 N en ClNa 0.112 M 30 s. a 20°C SSC  
12 x 60 y 72 Hrs. a 65°C.

Las preparaciones cromosómicas ensayadas tuvieron una ex tremada sensibilidad a los tratamientos combinados de - - - NaOH/SSC, pues las extensiones cromosómicas mostraron la muy singular característica de aparentemente no contener metafases, aunque la laminilla control sin bandeado y teñida con - - Giemsa, mostraba una buena densidad de metafases. Este problema fué resuelto en parte, acrecentando sucesivamente los tiempos de tinción, llegando a más de 25 minutos. A partir de ese momento empezó a haber un depósito de colorante sobre el cristal de la laminilla tornándose de un color azul ultra mar-violáceo con vivos reflejos verde-rojizos, observables a simple vista, pero al microscopio óptico, mostró un ténue color azul claro. De esta forma logrando hacer visibles los - sitios de localización de metafases, sin embargo los cromomas se mostraron no coloreados y de apariencia vacía, solamente perfilados por el contraste con el fondo azul, idéntico fenómeno ocurrió con los núcleos de interfase que persistieron en las preparaciones cromosómicas.

De manera implícita quedó claro que los cromosomas "fantasmas" fueron debidos a una muy probable incapacidad para - fijar el colorante, ya que estos resultados fueron confirmados en repetidos ensayos, tanto con preparaciones frescas como envejecidas. Por otro lado, resultados idénticos ocurrie

ron en ensayos adicionales donde fué reducido el tiempo de incubado con la SSC 12X, a los tiempos de 50 y 40 horas.

Grupo 4-NaOH 0.07 N por 30,60,90,120 y 180 s.a 22°C.

Solución Tampón de Fosfatos Sörensen por 24 horas a 59°C.

Las preparaciones cromosómicas con 24 horas de envejecimiento mostraron una gran sensibilidad al tratamiento con NaOH, pues de las variantes del tiempo de exposición, únicamente la variable de 30 segundos mantuvo la morfología mínima indispensable para visualizar alguna lectura, mostrando cromosomas pálidos e hinchados y con tendencia a una severa despirilización de la cromatina, coexistiendo con cromosomas de morfología que rayan en los límites del bandeo G. En la mayoría de las metafases observadas el bandeo no fué visualizado, sólo en algunos casos mostraron indicios muy difusos del patrón G, principalmente en los cromosomas 2,6,13 y 16. Ópticamente las bandas no mantuvieron un nítido contorno y sus perfiles fueron muy irregulares o la inducción de bandas no se hizo evidente. La característica más notable de esta variable fué la inclinación a presentar en los cromosomas, regiones centroméricas densamente teñidas de forma parcial o total, a la manera de bandas C crudas.

Los resultados de las otras preparaciones cromosómicas con 24 horas de envejecimiento mostraron una digestión com-

pleta de cromosomas y núcleos de interfase, revelando un patrón muy homogéneo, con la apariencia de "barrido en líneas", por la digestión extremada.

Las preparaciones cromosómicas con un envejecimiento mayor de 3 meses indujeron el mismo patrón de "barrido en líneas", pero mostrando de forma general mayor resistencia a la desnaturalización, ocurriendo a partir de la variable de 120 segundos. Por otro lado las demás variables observadas muestran también regiones densamente teñidas adyacentes al centrómero, contrastada por la palidez del resto de ambas cromátidas homólogas, en algunas metafases incluso fué posible encontrar la heteropicnosis peculiar de los brazos largos en el cromosoma Y. El grado de hinchazón de la morfología cromosómica es mayor que en las laminillas con menos envejecimiento, así también la despirilización.

Ambos grupos requirieron de tiempos mayores de tinción Giemsa (más de 20 minutos), aún así, mostraron poca afinidad al colorante, observándose cromosomas muy pálidos.

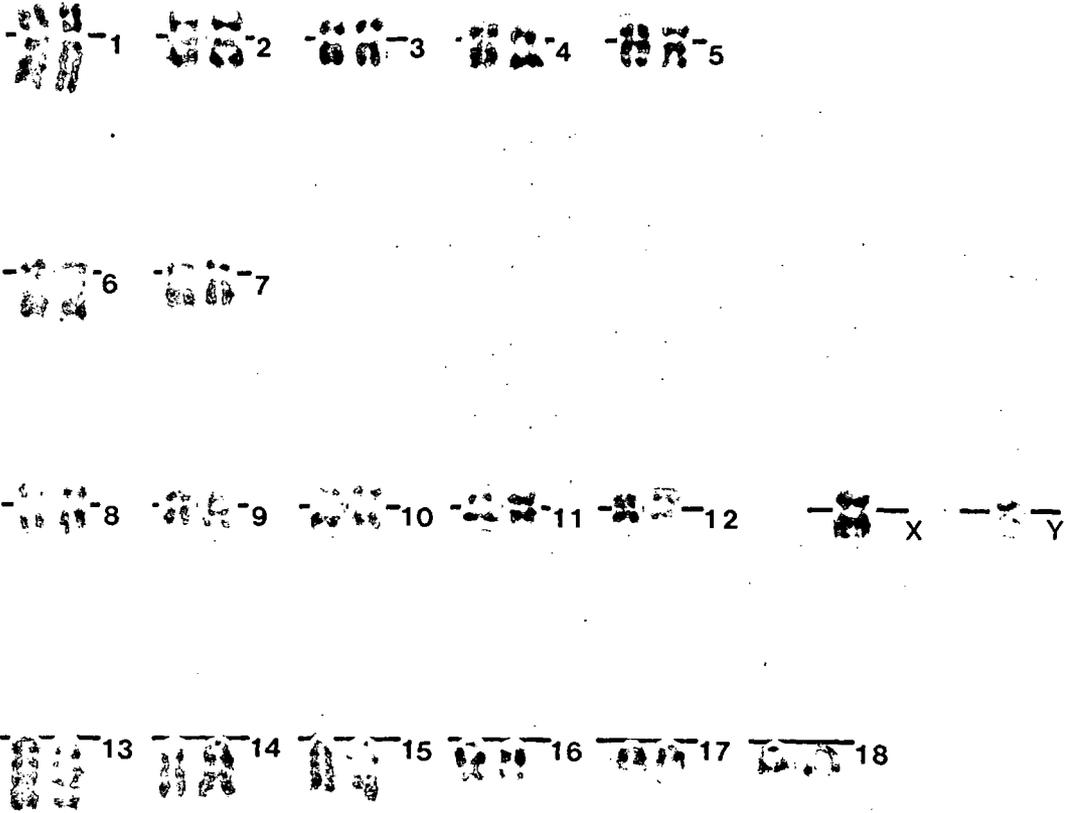
Adicionalmente se ensayó la variable de 10 segundos con NaOH, para comprobar la tendencia en la transformación de patrones con bandas G difusas a bandas C crudas, mostrando que menores tiempos de incubado (menos de 10 segundos) son necesarios para llegar a un patrón de bandeado G más aceptable.

Grupos 5 y 6 Pretratamiento con sulfato de amonio 0.6M a 22°C por 5 minutos.

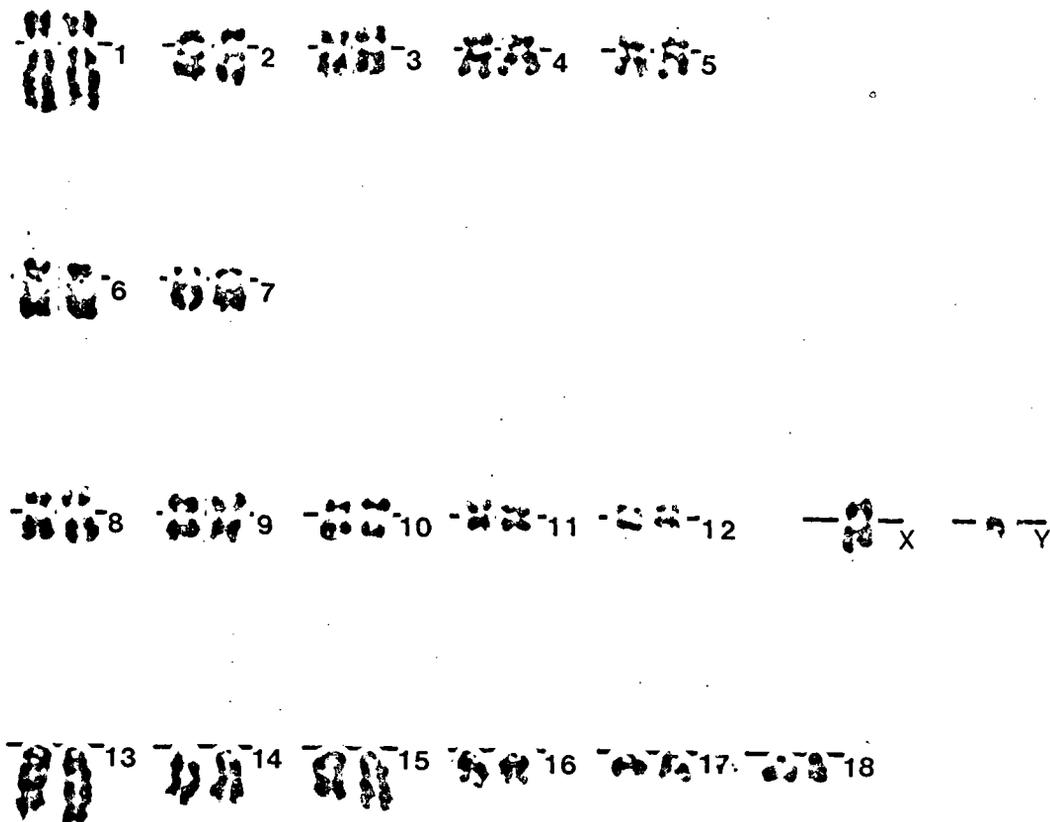
Tratamiento con PCA o TCA al 10%, ambos - por 3,5,10,15 y 20 minutos tanto a 22°C - como a 37°C.

Todas las variables en ambos grupos tuvieron algo más - del 98% de las metafases observadas, un remarcado sobreteñi - do que ocultó en más de las veces los patrones de bandeo, - salvo muy escasas metafases con teñido deficiente, hicieron patente las bandas, la morfología cromosómica se mantuvo - sin alteraciones en más del 84% y el resto mostró indicios - de hinchazón.

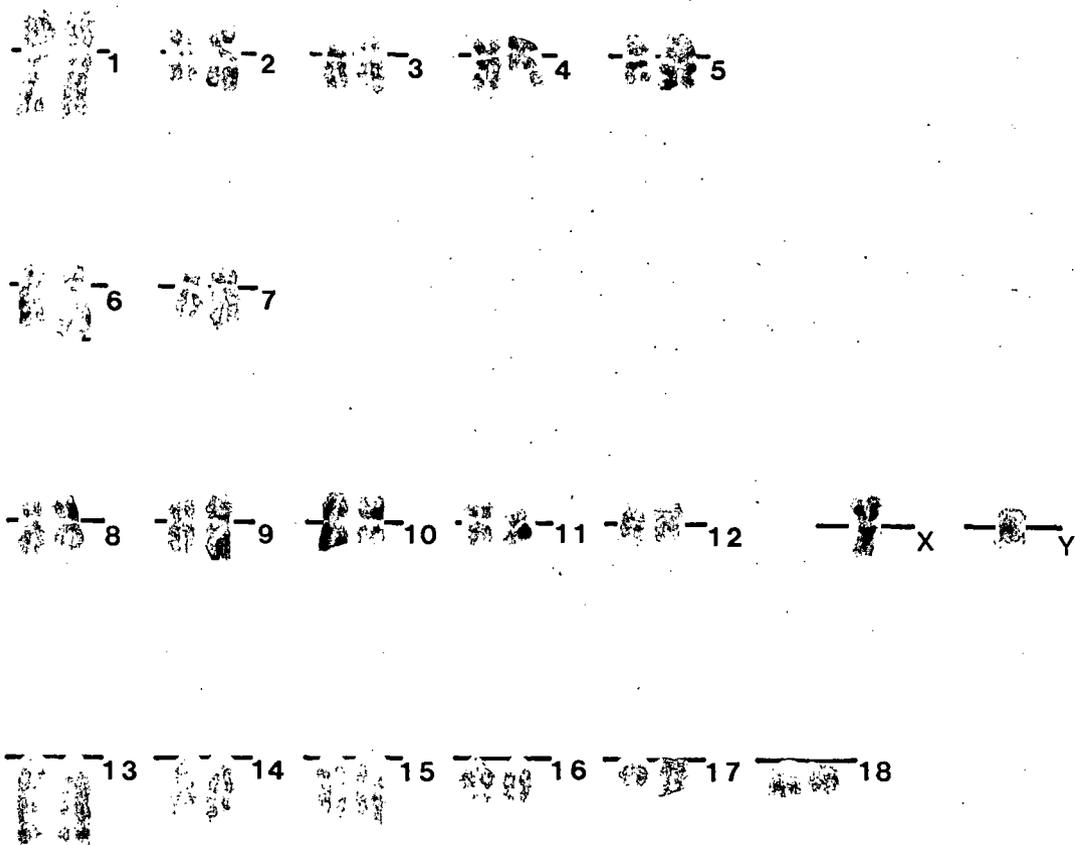
No hubo cambios sensibles en los resultados, que pudie - ran servir para compararlos y sugerir qué bandeo es mejor - con respecto a la temperatura, ya que a 22°C como a los - - 37°C, el sobreteñido se mantuvo inalterable cubriendo los - posibles cambios en la calidad de los patrones de bandeo.



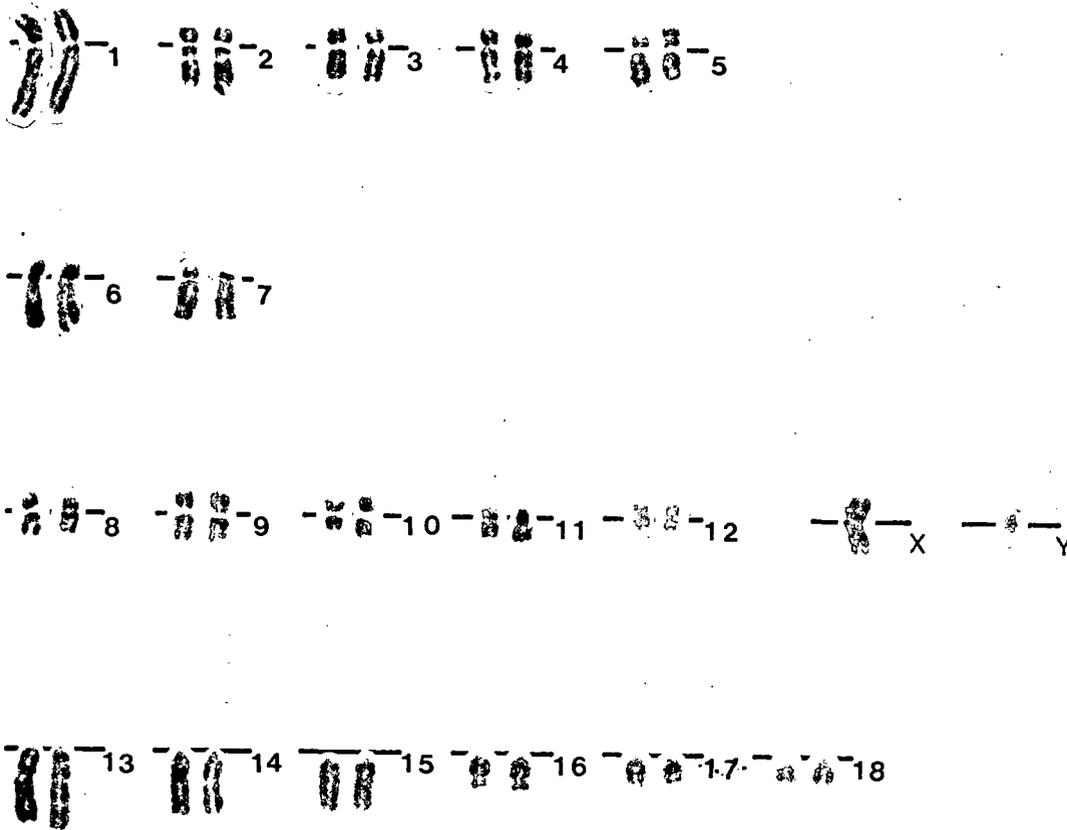
Cariotipo No. 1. Cromosomas del cerdo doméstico, mostrando el patrón de bandeado G, por el método con Tripsina-Verseno 0.03% por un minuto a 22°C.



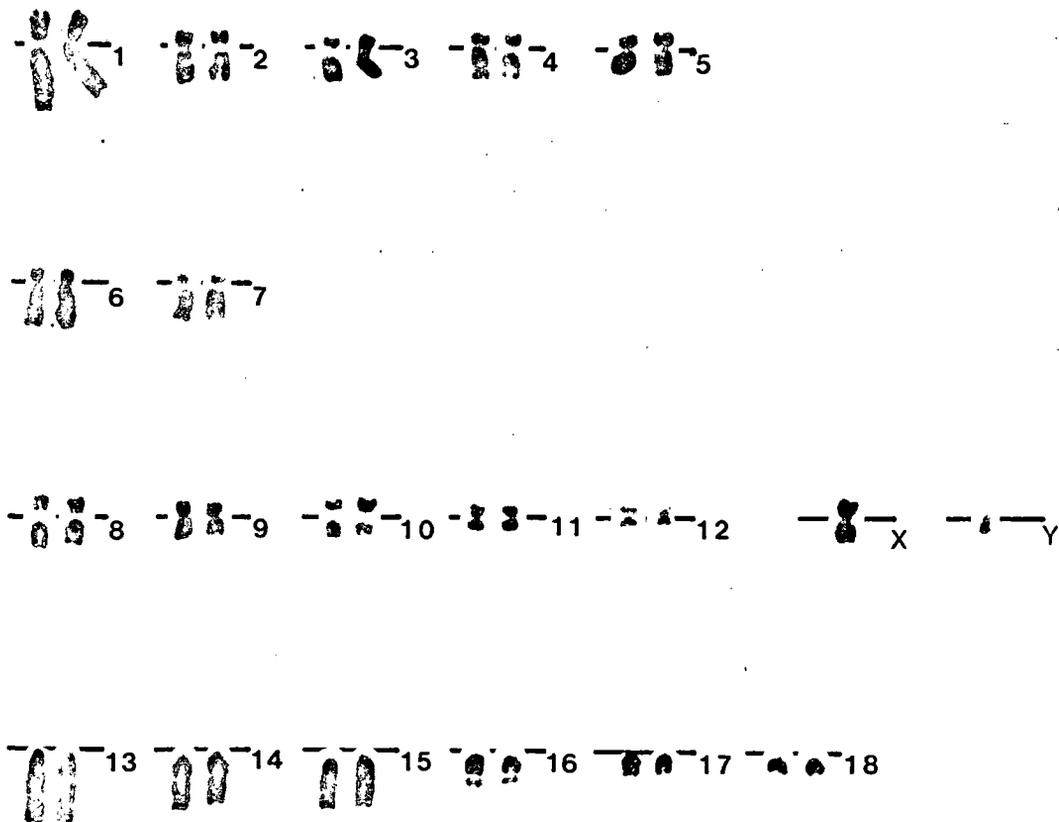
Cariotipo No. 2. Cromosomas del cerdo doméstico, mostrando el patrón de bandeado G, por el método con Tripsina-Verseno 0.03% por 2 minutos a 22°C.



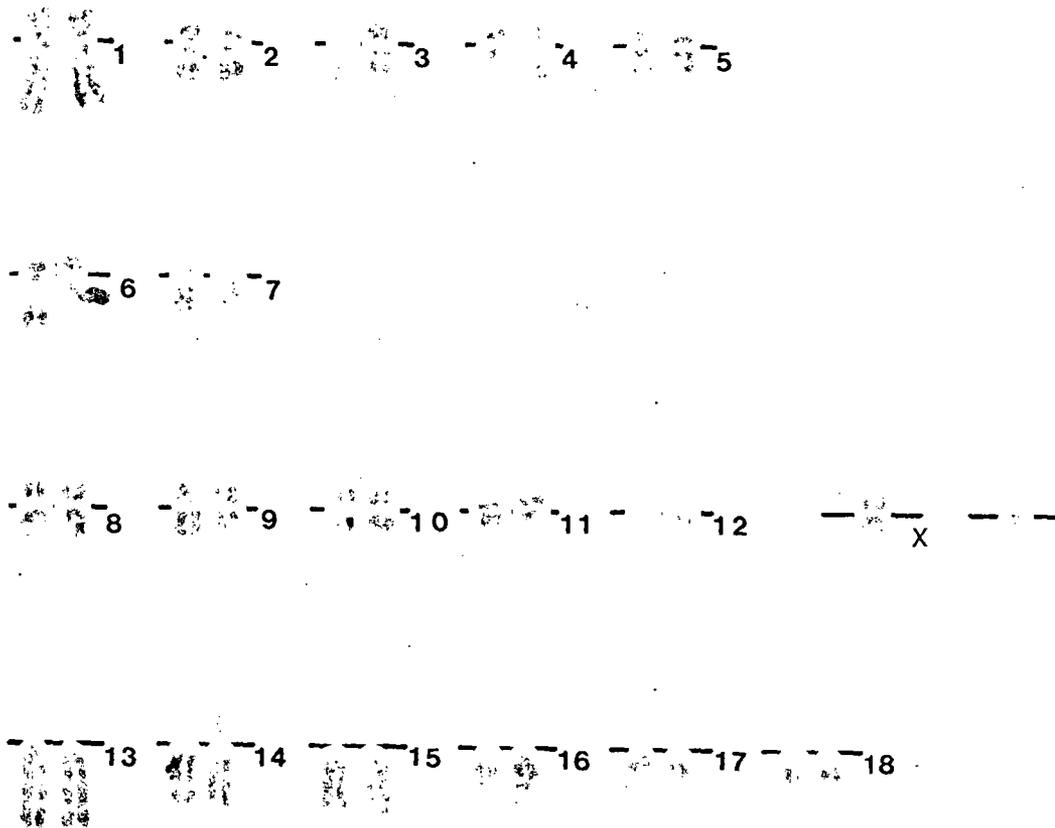
Cariotipo No. 3. Cromosomas del cerdo doméstico mostrando el patrón de bandeado G, por el método con NaOH 0.07N por 10 segundos a 22°C, seguido de una incubación en Buffer Sörensen a 59°C por 24 hrs.



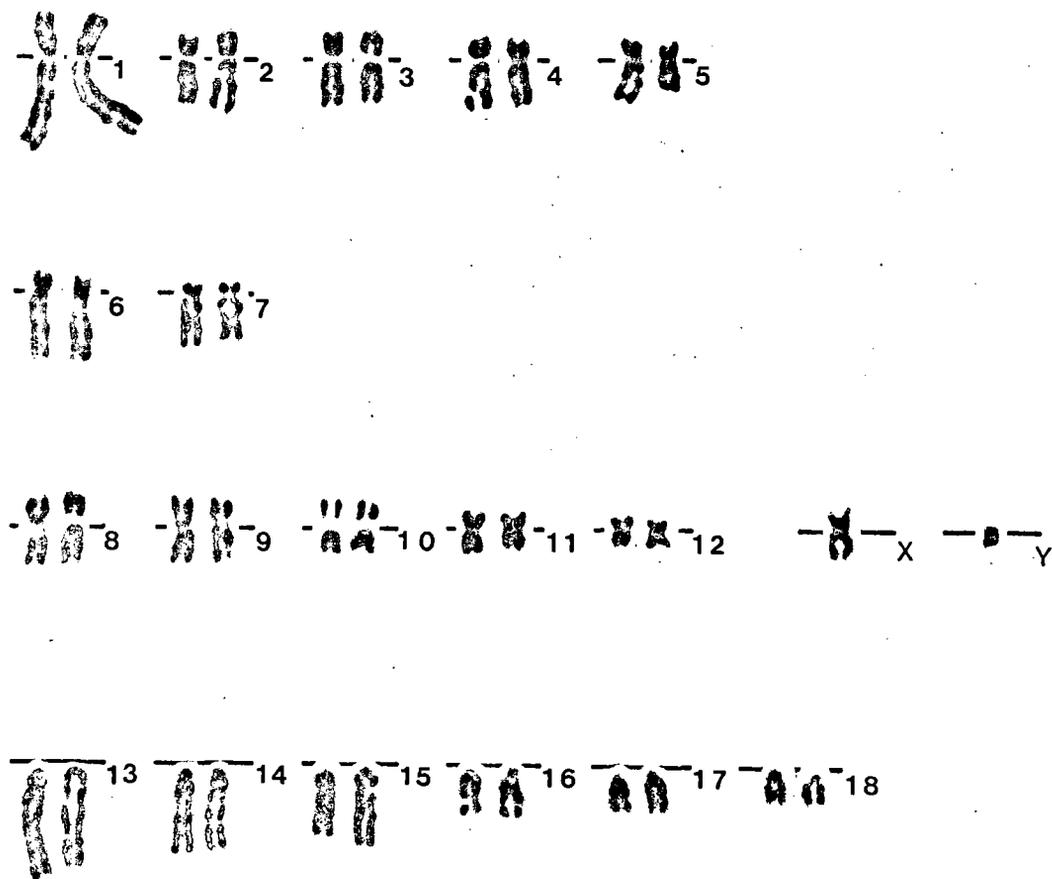
Cariotipo No. 4. Cromosomas del cerdo doméstico mostrando el patrón de bandeo G, por el método con Urea 5M en ClNa 2M por 60 minutos a 22°C.



Cariotipo No. 5. Cromosomas del cerdo doméstico, mostrando el patrón de bandeo G, por el método con Urea 5M en ClNa 2M por 30 minutos a 22°C,



Cariotipo No. 6. Cromosomas del cerdo doméstico mostrando el patrón de bandeado G, por el método con Urea 5M en ClNa 2M por 60 minutos a 37°C.



Cariotipo No. 7. Cromosomas del cerdo doméstico mostrando el patrón de bandeado G, por el método con Urea 4M en ClNa 0.034M por 3.5 horas a 60°C.

## V. DISCUSIONES.

Seabright en 1971 (33), utilizó tripsina 0.25% en solución salina por 10 a 15 segundos, para inducir bandas en cromosomas humanos, señalando que como en otras técnicas la nitidez del patrón de bandeo, varía de metafase en metafase, pero encuentran una alta proporción de metafases que son satisfactorias. Por otro lado señaló que las preparaciones almacenadas hasta por un año proporcionan patrones de bandeo comparables a los observados con las preparaciones hechas recientemente.

Los resultados obtenidos por nosotros, también muestran la variación de los patrones de bandeo en metafases de una misma laminilla, pero en cuanto a la nitidez es muy deficiente y los mejores patrones de bandeo no fueron extensivos a todos los cromosomas, así como la morfología fué muy afectada mostrando efectos drásticos, posiblemente debidos a la severidad de este tratamiento y estos resultados no mejoran sensiblemente con la utilización de la temperatura ambiente o a 37°C. Parece ser, que los tiempos más cortos por debajo de los 2 segundos sean algo más suaves y permitan mejores patrones de bandeo, dada la correlación directa entre el tiempo de exposición, concentración del reactivo y la temperatura, pero de manera inversa a la sensibilidad especie-específica de los cromosomas. Por otro lado las preparaciones cro

mosómicas con más de 3 meses de envejecimiento no mostraron la más ligera inducción de bandas.

Hageltorn y Gustavsson en 1973 (14), utilizaron tripsina 0.045% en solución salina, por pocos minutos a 37°C en cromosomas porcinos, y encontraron patrones de bandeo muy similares a los inducidos por medio del tratamiento Q.

Nuestros resultados muestran un efecto muy irregular en la inducción del bandeo, pero la morfología cromosómica es -destacadamente óptima, ya que el tratamiento pareció ser muy suave y proporcionar un patrón adecuado, siendo factible mejores inducciones al extender los tiempos de exposición, de otra manera estos resultados estarán demasiado influenciados por las condiciones técnicas utilizadas.

Rubes y Lojda en 1980 (28), utilizaron tripsina 0.1% en tampon PBS a 22°C por espacio de 5 segundos y obtuvieron patrones de bandeo G en cromosomas porcinos. El efecto tan -desfavorable en el bandeo realizado por nosotros puede ser -atribuible a la falta de sales de solución, ya que esta variación determinada en el diseño experimental tiene efectos negativos, ya que posiblemente estas sales afectan la calidad del bandeo, principalmente por la falta de iones Na de -los cuales es conocido su efecto benéfico, pues propicia alguna interacción molecular no muy clara. Esta sugerencia es apoyada por los resultados de las variables tripsina-ClNa y-

urea-ClNa que dan mejores resultados y ocupan un mecanismo muy similar sino idéntico.

Sperling y Wiesner en 1972 (35), utilizaron tripsina 0.25% 1:500 en solución de tinción Leishman por 20 minutos en cromosomas humanos y de gorila, camello, etc., obtuvieron bandeos adecuados, cercanamente idénticos a los que se obtienen con SSC, no obstante, después de la digestión triptica, las bandas fueron mucho más nítidas y más fáciles de distinguir entre cromosomas similares.

Los resultados obtenidos con la modificación de la tinción Leishmann por la Giemsa, fueron aceptables, especialmente los obtenidos a los 3 minutos de exposición, sin embargo el teñido en exceso en los tiempos largos, fué desventajoso, por ocultar la adecuada observación de bandas bajo sobreteñido, y tiempos más cortos evitaron inducir eficazmente el patrón G. dada la dificultad de extender los tratamientos y de verificar si en el tiempo recomendado por nosotros, principiaba o finalizaba la fase crítica de aparición de bandas, pero en contraste su simplicidad metodológica fué ideal.

Hansen-Melander y Olin en 1974 (16), utilizaron tripsina 0.002% por 10 minutos a 37°C y además ensayaron una solución tripsina-verseno, que fué envejecida por espacio de 50 minutos antes de usarla, propiciando un tratamiento de 2 minutos, pero cuando la solución se dejó envejecer por tres horas,

el tratamiento fué incrementado hasta 3 minutos. En ambos - tratamientos se ensayaron sobre cromosomas del cerdo y de - conejo. Los autores mencionan la aparición de patrones G- en ambos tratamientos, pero la distorsión cromosómica se hizo presente.

Nuestros resultados son muy favorecidos por los métodos recomendados por los autores. El bandeo obtenido es significativamente aceptable con un máximo de nitidez, aunque - también fué patente obtener la desventajosa distorsión de - la morfología, que parece ser una característica de los bandeos con tripsina.

Berger en 1972 (2), usando urea 8M en tampon Sörensen, - obtuvo patrones de bandeo G en cromosomas porcinos, comparables a los inducidos por otras técnicas, confirmando la diferencia entre cada par homólogo. En los resultados obtenidos, no es evidente la razón por la cual, con esta técnica - en ninguna de sus variables tanto a 22°C como a 37°C no ha - ya habido éxito en la inducción de bandas, mostrando un - - gran porcentaje de cromosomas pálidos no bandeados y en raras ocasiones con algún indicio en la traza del bandeo en - cromosomas aislados. Es sugerente que en las condiciones - técnicas utilizadas por nosotros no sea posible reproducir - los resultados.

Shiraishi e Yosida en 1972 (32), utilizando urea 8 M -

3:1 en tampon Sörensen por 10 minutos a 37°C, sobre cromosomas humanos, notan que el grado de contracción influye decisivamente en la inducción de bandas, pues cromosomas elongados muestran muchas bandas que en el curso de la contracción cromosómica se fusionan entre sí, en cambio cuando los cromosomas llegan a estar muy compactados, la observación del bandeo es difícil por la enérgica tinción que sufren, en menos-cabo de la claridad y nitidez, de esta forma recomiendan una compactación moderada en un rango de 10u para el cromosoma #1. Por otro lado, encuentra por arriba de los 10 minutos, señalando que las laminillas muy recientes entre 24 y 48 horas de envejecimiento mostraron un bandeo óptimo a este tiempo en cambio laminillas muy frescas sólo necesitaron entre 2 a 3 segundos a 37°C. En general notan que tratamientos cortos muestran bandas no muy claras y tratamientos largos indujeron una apariencia plumosa o lanuda. Haciendo hincapié en la calidad de la tinción así como en la duración del teñido dado que son dos factores críticos para la buena observación pues un sobretratamiento obscurecería la apariencia del bandeo.

En los resultados obtenidos en este trabajo muestran patrones de bandeo tanto a temperatura ambiente como a 37°C, no obstante mejores resultados fueron obtenidos a 22°C dentro de las variables de 3 a 15 minutos, siendo mucho mejores a los 10 minutos, en bandeos más largos no fueron encontra-

das aceptables, pero la inducción de bandas discretas permaneció. En cambio a 37°C el rango de presentación de bandas fué mucho más estrecho, ocurriendo solo entre los 3 a 10 minutos, pero en ambas variables en la temperatura fué notorio una significativa cantidad de metafases con cromosomas plumosos y en menor grado hinchados o despirilizados. Comparativamente el umbral de aparición de bandas no coincidió con el del humano, posiblemente a cualidades específicas diferentes para ambas especies, por otro lado, ciertamente el bandeo de cromosomas compactados es más desventajoso para la identificación de algunos pares homólogos en el cerdo, principalmente los cromosomas números 4, 5, 8, 9 y X, pero en menor grado los cromosomas números 3, Y, 11 y 12.

Kato e Yosida en 1972 (18), en un estudio citogenético del hamster chino, usando urea 5M en ClNa 2M por 20 minutos a 37°C, producía patrones de bandeo G similares a los inducidos por otros métodos, resaltaron que una incubación más - - allá de una hora producía bandas exiguas, pero tratamientos cortos comunmente revelaban la estructura espiral de los cromosomas y notaron que únicamente con el calentamiento moderado de la solución de uso, hizo evidente el patrón de bandeo-G, afirmando por esta razón que la temperatura a 37°C es indispensable para producir bandas.

En nuestros resultados este tratamiento es uno de los más reproducibles, pero con nosotros no fué indispensable la temperatura mencionada, ya que coexistieron bandeos aceptables en las dos variantes en la temperatura, en un rango de 20 a 60 minutos para los 22°C y sólo a los 60 minutos en la variable de 37°C. En general las bandas inducidas fueron discretas, con morfología algo hinchada y en menor grado metafases plumosas o despirilizadas. Otra vez es patente la diferente sensibilidad a los tratamientos en dos especies distintas.

Hansen-Melander et. al. en 1974 (16), realizaron un estudio en cromosomas de cerdo y de conejo utilizando urea 4M en ClNa 0.034M, comentan que la capacidad de la urea para producir bandas fué probada por Kato y Moriwaki en 1972, utilizando una solución de urea 4M con ClNa 2M, pero ellos sugieren que de acuerdo a sus experiencias, la concentración del ClNa podría ser reducida considerablemente, la presencia de pequeñas cantidades de iones sodio, mejoró la tinción, mientras que una alta concentración puede afectar la morfología cromosómica desfavorablemente. Por otra parte, la temperatura y la duración del tratamiento recomendado por Kato y Moriwaki fué a 30°C por 1/2 a 1 hora, pero esta recomendación sólo les produce trazas en el bandeo y recomiendan un mínimo de exposición al reactivo de 3.5 horas a 60°C el tratamiento puede llegar hasta 9 horas, ayudando al ban-

deo algunas veces, si no es extendido por más de 12 horas. - Este método no tan facil produce distorsiones cromosómicas - o metafases con cromosomas lanudos, comunes de los tratamientos alcalinos o con tripsina.

Los resultados obtenidos por nosotros con este tratamiento fueron reproducibles, aunque metodológicamente sea más - retardado por las largas exposiciones y el uso de altas temperaturas. La aparición de bandas ocurrió en todas las variables de 1 a 9 horas, la morfología se conservó mucho mejor ya que no hubo distorsión en la morfología cromosómica, - en cambio sí hubo una buena cantidad de metafases hinchadas-teñidas pálidamente y más raramente fueron observadas metafases despirilizadas, aunque su frecuencia aumentó en la última variable que también mostró cromosomas plumosos. La calidad de estas bandas comparativamente al tratamiento con urea 5M en ClNa 2M, pero en menoscabo fueron muy irregulares. Queda claro que los bandeos pueden ocurrir a diferentes temperaturas y explica en parte los resultados tan heterogéneos de los demás subgrupos que usan urea.

Rønne y Sandermann en 1977 (27), realizaron un estudio - en cromosomas humanos, utilizando un tratamiento preliminar-con sulfato de amonio .6 M por 5 minutos a 22°C, seguida de una incubación en urea 3M por 5 minutos a temperatura ambiente, notaron que este método fué el menos confiable de los ensayados por ellos, pero normalmente produce bandeo en los -

cromosomas, las bandas son altamente distintivas separadas por interbandas no teñidas. No obstante los cromosomas tratados son extremadamente sensibles al agente, ya que un ligero sobretratamiento produce cromosomas pálidos o no teñidos, efecto similar a lo observado con el tratamiento con tripsina.

Los resultados obtenidos son muy desfavorables para obtener bandas, tanto a la temperatura ambiente como a 37°C, aunque esta última enfrenta mayor dificultad. El grueso de las metafases tuvieron cromosomas con bandas discretas no siempre presentes, se observaron cromosomas plumosos o hinchados, pero en general fué difícil observar los patrones de bandeo, por la muy notable mejoría de la coloración resultado del pretratamiento con sulfato de amonio, de esta manera la tinción estándar utilizada en este trabajo fué desventajosa, pues produjo sobreteñidos, sumado a la baja concentración de la urea, que no permitió una buena inducción o por el contrario, que llegaron a ser muy cortos los tiempos ensayados, aunado a que el umbral de aparición de bandas es por lo visto distinto entre una especie y otra.

Los mismos autores ensayaron también el ácido tricloroacético TCA 0.25% y el ácido perclórico PCA 0.25%, ambos por 10 minutos a 22°C en cromosomas humanos (27), señalan el sulfato de amonio no induce bandas por sí sólo, no obstante encuentran que tratamientos cortos con 0.6 M, mejoran

la tinción y reducen la contaminación de fondo. Encuentran que la técnica TCA produce bandas iguales o de calidad superior a las obtenidas con la técnica ASG, la cual señalan que es mucho más complicada, además que la inducción de bandas en los cromosomas tratados son revelados en un amplio rango de concentración, tiempo y temperatura.

En los tratamientos que usamos el sulfato de amonio como agente preliminar, mostraron la limpieza de residuos, sedimentos o detritos celulares de las laminillas, que impiden la posterior acción del reactivo de manera uniforme protegiendo a uno o a varios cromosomas de los efectos durante la inducción, desventaja que produce bandeos mal definidos o más comunmente falta de bandas en los cromosomas. Por otro lado permite una mejorada tinción, produciendo teñidos mucho mas claros y definidos, pero por esta última razón, debe ser monitoriado el tiempo de tinción para que sea el adecuado y no por el contrario fijar de antemano un tiempo determinado, dado que el sensible cambio efectuado en la afinidad al colorante giemsa, puede producir sobreteñidos, fenómeno que fué determinante para impedir la adecuada observación y con ello el análisis de los patrones de bandeo G por ésto los resultados obtenidos en estos grupos son muy subjetivos, haciendo la aclaración pertinente, la evidencia de discretas bandas ocultas tras un homogéneo sobreteñido es posible. Los efectos reales de estos tratamientos podrán ser observados te---

niendo en cuenta la utilización del sulfato de amonio y el monitoreo de la tinción.

Los resultados obtenidos por Schnedl en 1971 (30), con el tratamiento de NaOH 0.07 N en cromosomas humanos, señala que el bandeo G fué únicamente aparente con tratamientos cortos, en un rango de 90-120 segundos, además añade, que si el tratamiento mencionado es alargado entre 4 a 5 minutos, no se presentan las características bandas, y en su lugar solamente son teñidas las regiones centroméricas de los cromosomas y la parte distal del cromosoma Y. También recomiendan que las laminillas no tengan más de 2 meses de envejecimiento al ser tratadas. Por otro lado Drets y Shaw en 1971 (10), en un tratamiento combinado de NaOH/SSC en cromosomas humanos, observaron que un excesivo tratamiento con el NaOH, por alrededor de 1 minuto, producía cromosomas con apariencia plumosa y con morfología hinchada, que se tiñen pálidamente.

Claramente es delineado un punto crítico que delimita el bandeo G y la incipiente aparición de bandas C. Los resultados obtenidos en este trabajo siguen esta pauta, pero en los cromosomas del cerdo, se sitúan los límites críticos en un rango mucho menor, entre 10-30 segundos, y aún así, se deberá ir a tiempos más cortos para encontrar bandeos óptimos. Del mismo modo sucede con las bandas C, ya que el punto crítico de aparición encontrado es a los 90 segundos-

en el cerdo, concordando proporcionalmente a los resultados obtenidos en el humano, pero las bandas C observadas son de mala calidad óptica.

La hipótesis del mecanismo efectuado es que, el agente alcalino produce una desnaturalización de las proteínas no-histónicas y algo de DNA, principalmente de las fracciones correspondientes a la eucromatina y en menor grado de las fracciones heterocromáticas, después es seguido por un proceso de renaturalización de algunas proteínas, ocurrido durante el incubado en el tampon fosfatado (6). Esto va en concordancia con las observaciones tempranas de Schnedl (29) donde cromosomas tratados sólo con el NaOH sin incubar en el tampon Sörensen y teñidos con giemsa no mostraron un patrón de bandeo visible.

De manera sutil, la organización estructural interna del cromosoma es evidenciada por los distintos tipos de cromatina, que pueden llegar a ser patentes tras los tratamientos químicos. En las regiones cromosómicas con alta concentración de DNA moderadamente repetitivo, rico en bases nitrogenadas de adenina y timina asociadas a las nucleoproteínas histónicas y no histónicas representan a la heterocromatina intercalar, medianamente compactada en el cromosoma, vienen a ser las bandas G positivas. Así mismo, las regiones del DNA no repetitivo, rico en bases nitrogenadas de guanina citosina, representan a la eucromatina, que se en-

cuentra laxamente compactada en el cromosoma y que durante el bandeo G sufre la extracción mayor de nucleoproteínas y DNA, pero con una subsiguiente reasociación y una renaturalización parcial de proteínas no histonas sobre los sitios activos para el colorante giemsa, creando regiones de interbanda teñidas pálidamente, equivalentes a las bandas G negativas. Por otro lado, las regiones del DNA con gran concentración de secuencias altamente repetitivas, ricas también en bases nitrogenadas de adenina y timina asociadas igualmente a las nucleoproteínas, pero mayormente compactadas en el cromosoma, específicamente en las regiones centroméricas, salvo la excepción del cromosoma sexual Y, que también abarca a toda la parte distal del brazo largo, representan a la heterocromatina centromérica.

Cada tipo de cromatina lógicamente, presenta distintos grados de resistencia a los agentes químicos, debido a su índice de compactación y a la asociación proteica, intrínseca del proceso de contracción de la fibra de DNA, permitiendo sensibles diferencias en los límites críticos a la desnaturalización y a la destrucción del DNA. De esta manera la secuencia de eventos producida, permite deducir que en el tratamiento usual para inducir patrones G, la estructura más rápida y fácilmente afectable sea la eucromatina, que por su laxa compactación sea directamente afectada por el reactivo, pero a la vez, las regiones heterocromáticas muestren menor,

sensibilidad a la exposición, y cuando el tratamiento es inusualmente severo, ya sea por la concentración del reactivo o por la larga exposición al mismo, la heterocromatina intercalar es afectada, sin embargo, esta desnaturalización puede llegar a mostrar a la heterocromatina centromérica inafectada evidenciando sólo bandas C.

Sin embargo, parece ser que la aparición de los límites críticos en la sensibilidad a los tratamientos, tanto para producir bandas G como C, en el cerdo guarda amplias diferencias con respecto a humanos y otras especies (15), siendo posible un fenómeno especie-específico, dada la gran sensibilidad mostrada de los cromosomas porcinos a los tratamientos - puestas a punto para otras especies.

Como ha sido anteriormente mencionado, el bandeo G puede ser inducido por una buena variedad de tratamientos químico-enzimáticos, que comparados los efectos ocasionados en los cromosomas, muestran claramente un efecto único en común, en detrimento de los efectos específicos de cada tratamiento. Este efecto es la degradación parcial o total de un sinnúmero de proteínas no histonas, cargadas positivamente y unidas no covalentemente al DNA. Esta extracción ocurre selectivamente a lo largo del cromosoma y estas proteínas tienen un rango de peso molecular, entre 20,000 a 98,000 daltons mientras que la remoción de las histonas no ocurre, salvo la histona H-1, extraída parcialmente en la fijación. (4).

El tratamiento con tripsina, permite la degradación de péptidos de tamaño variable, siendo en general, las proteínas no histónicas totalmente sensibles, particularmente - - aquellas con un alto peso molecular, el clivaje ocurre en - un número limitado de sitios, ayudado por la remoción selectiva de grandes cadenas oligopépticas (4, 19).

El tratamiento con urea extrae una mayor variedad de proteínas no histónicas que el tratamiento con SSC, las proteínas afectadas son sólo parcialmente extraídas, y mantienen un rango de 20,000 a 90,000 daltons. En cambio la solución salina citratada extrae proteínas no histónicas con rangos de 28,000 a 95,000 daltons (4).

## VI. CONCLUSIONES.

Los métodos de cultivo en el cerdo y en los demás animales domésticos, deben ser estandarizados con mayor precisión para obtener resultados que confiadamente sean altamente reproducibles en las condiciones especiales en que se trabaja en cada laboratorio, pues la notable variabilidad revelada por esta labor, aconseja poner en claro la relación de efectos entre la cantidad de linfocitos sembrados con las concentraciones finales de fitohemaglutinina y colchicina para la obtención de metafases de buena calidad, así como también buen número de éstas.

La primera condición para obtener extensiones cromosómicas con un bandeo de calidad óptima, no solo depende de las técnicas de bandeo utilizadas, sino de la calidad de los cultivos, ya que ésto influye sobre la densidad y calidad de las metafases; el grado medio de contracción cromosómica y en la adecuada separación entre los cromosomas, que en conjunto determinan en menor o mayor grado una buena parte de las variaciones observadas en las técnicas ensayadas.

Por otro lado, fué confirmada la observación de Comings (8), en donde resultados positivos logrados en una especie, pueden no funcionar en otras especies, y aún más, técnicas ensayadas en una especie dada en un laboratorio determinado, puede que tengan pobres o nulos resultados en otros la-

boratorios. Pero la adecuación de la técnica con respecto a las concentraciones de los reactivos usados, así también el tiempo y la temperatura de exposición son posibles de obtener en cualquier especie.

En este trabajo al igual que en otros, se observó que existían variaciones en una misma preparación, en referencia a que no todas las metafases presentan la misma calidad en el bandeo, pero aún así, fué posible encontrar una notable peculiaridad en la sensibilidad observada para los cromosomas del cerdo con respecto a otras especies, principalmente humanos, sugiriendo que los cromosomas porcinos parecen poseer una mayor sensibilidad a los tratamientos químicos, que los cromosomas humanos, la naturaleza de este fenómeno no es muy clara.

Las técnicas de bandeo previamente reportadas para ser usadas en cromosomas porcinos, también mostraron variaciones, pero fueron mas consistentes en la producción de bandas, que las técnicas puestas a punto para otras especies, con la excepción del método de Berger (2), que reporta la utilización de altas concentraciones de urea y que nosotros no pudimos reproducir. En cambio las técnicas de Hansen-Melander et. al. (16), que usan tripsina o bien urea nos proporcionaron resultados positivos y muy reproducibles.

Fué confirmada la cualidad del sulfato de amonio como

agente útil en trataminentos preliminares, ya que mejora el teñido y la limpieza del fondo, pero cuando es usado, parece ser aconsejable utilizar tiempos más cortos en la tinción de las extensiones cromosómicas, para evitar el sobreteñido de los cromosomas.

Es muy evidente que las técnicas que utilizan enzimas - proteolíticas sean mucho más rápidas en su realización, debido a su manejo más sencillo, además mantiene una amplia variabilidad, que para fines específicos puede ser una ventaja por brindar una mayor versatilidad, sin embargo para nuestros propósitos fué considerada una desventaja. Otros factores además de la concentración del reactivo, temperatura y tiempo de exposición, influyen sobre los resultados, que con siderados son: las mezclas de la enzima con sales de sodio - o EDTA, que proporcionan resultados diferentes entre sí, y con respecto al uso de la enzima sin mezcla de sales, únicamente en solución en el agua destilada, otros factores que deben ser considerados son: El envejecimiento de la solución de uso, al igual que el envejecimiento de las preparaciones cromosómicas.

Otra desventaja propia de las técnicas que utilizan tripina como agente desnaturalizante es su tendencia a producir distorsiones en la morfología cromosómica en cantidades significativas, revelando bandeos muy desiguales. Este efecto resultó ser directamente proporcional a la concentración del

reactivo, de modo que concentraciones preferentemente bajas pueden llegar a atenuar esta desventaja. Las concentraciones altas de tripsina provocan resultados bruscos, que alteran severamente la morfología cromosómica, estos resultados guardan parecido con los obtenidos por vía del NaOH. Por otro lado, la utilización de sales en solución, principalmente  $\text{ClNa}$ , permite patrones de bandeo más homogéneos y mejorados que los obtenidos sólo con la enzima en agua destilada. El método de tripsina-verseno muestra que a esa concentración las cualidades quelantes del EDTA son beneficiosas para el bandeo y que juntas muestran buenas posibilidades de bandeos óptimos, aunque la conformación es algo afectada. Por regla general, la temperatura acelera la reactividad de la enzima, que sumada a la concentración produce un efecto aditivo, que para nuestro caso fueron desfavorables, mientras que el efecto suave que permite la temperatura ambiente fué en casi la mayoría de las ocasiones benéfico, pero en ambas los patrones de bandeo fueron evidentes.

Las técnicas que utilizan urea, comparadas con las que utilizan tripsina, muestran resultados más ventajosos en lo referente al efecto que producen sobre la morfología cromosómica, sólo evidenciando una ligera hinchazón de las cromátidas, que mejora la calidad óptica de las bandas, si éstas se hacen presentes. Las bandas son más remarcadas y nítidas que en las técnicas que utilizan tripsina, pero las interban

das son menos notables, ventaja clara para las técnicas que usan tripsina. Por otra parte, las técnicas que utilizan urea son de un procedimiento mucho más elaborado.

La temperatura no parece influir de manera determinante en la técnica de Kato et. al. (18), pues coexisten bandeos aceptables tanto a 37°C, en cambio en la técnica de Rønne (27), donde se usa urea a bajas concentraciones, es confirmada la sugerencia de los 22°C. Por otro lado, los bandeos con urea parecen mejorar cuando son utilizadas sales en solución principalmente con ClNa y en especial a bajas concentraciones. La técnica de urea es superior a las técnicas que utilizan solución salina citratada, pues en la primera las bandas llegan a ser más evidentes y claras, mientras que en las técnicas con solución salina citratada 2x, son de procedimientos demasiado elaborados y sus bandas son menos notables. (15)

El NaOH sólo y principalmente combinado con SSC12x fué extremadamente negativo para el bando cromosómico, ya que las técnicas que utilizan alcalis hacen más patentes el patrón de bandeo C que el patrón de bandeo G o ninguno, y cuando se logran obtener los patrones G son de una calidad demasiado pobre, debido a la gran reactividad que tiene el NaOH como agente desnaturalizante.

Las técnicas que utilizan PCA y principalmente las que -

utilizan TCA, no quedaron completamente claros sus resultados, pues mostraron bandeos que se encontraron bajo sobreteñido con el colorante giemsa, debido posiblemente a la influencia del sulfato de amonio.

Es de notar también, que la calidad de la tinción y el tiempo de teñido son críticos para observar el bandeo, no parece ser muy convincente el hecho de homogenizar el tiempo de teñido, ya que las observaciones indican que de acuerdo a cada tratamiento fué patente la falta o exceso de teñido, perfilando ciertas características particulares del proceso químico ocurrido en las diferentes técnicas.

El factor de envejecimiento de las laminillas mostró amplias diferencias, las laminillas frescas proporcionan una extensa variabilidad de resultados, pero al fin presentan bandas, mientras en contraparte las laminillas almacenadas por más de 3 meses, mostraron siempre una gran resistencia a los diversos tratamientos sin poderse bandear. Las causas de este proceso no quedan claras, pero por un lado parece que el factor envejecimiento de las preparaciones debe situarse en un rango más corto que el aquí ensayado. Señalando que un intervalo más reciente estaría dentro de un lapso de menos de 2 meses a 5 días después de la preparación.

En síntesis a lo anteriormente señalado, encontramos que el tratamiento con tripsina más eficiente para producir

bandas, en nuestro caso fué la técnica tripsina-verseno (0.03%) por 1 a 2 minutos a 22°C. Por otro lado, el mejor tratamiento de bandeo con urea fué con la técnica a 5 M en ClNa 2 M por 20 a 60 minutos a 22°C, y la técnica con urea-4 M en ClNa 0.034 por 3.5-5.5 horas a 60°C. Los métodos que utilizan tripsina y urea fueron en general mejor reproducibles con respecto a los demás reactivos, pero en ambos solamente fueron evidentes los patrones de bandeo en las preparaciones recientes.

## VII RESUMEN.

Tras obtener cultivos de linfocitos de sangre periférica del cerdo doméstico, se ensayaron varios tratamientos para inducir patrones de bandeo G en los cromosomas. Los efectos de los tratamientos fueron analizados de acuerdo a las alteraciones morfológicas sufridas durante la inducción y a la calidad de las bandas producidas.

Las mejores técnicas para obtener bandas G, de entre las ensayadas fueron: las técnicas que usan tripsina, de ejecución rápida con bandeos aceptables pero con distorsiones morfológicas comunes. Las técnicas que utilizan urea, principalmente las que usan ClNa son las más reproducibles, inducen buenos bandeos, sin grandes distorsiones, pero son más elaboradas.

Los tratamientos específicos de estas técnicas con mejores resultados son: el método tripsina-verseno (0.03%) por 1-2 minutos a 22° C; urea 5M en ClNa 2M por 20-60 minutos a 22°C y urea 4M en ClNa 0.034 por 3.5-5.5 horas a 60°C.

## VIII. BIBLIOGRAFIA.

1. Basrur, P.K. (1974). Innovations in Cytogenetics and Applications to Domestic Animals. 1er. Congreso Mundial de Genética Aplicada a la Producción Ganadera. - Ed. Garsi, (Madrid). 1:215-227.
2. Berger, R. (1972). Etude du Caryotype du Porc avec - une Nouvelle Technique. Exp. Cell Res. 75:298-300.
3. Bruere, A.N. (1974). The Discovery and Biological Consequences of some important Chromosome Anomalies in Populations of Domestic Animals. 1er. Congreso Mundial de Genética Aplicada a la Producción Ganadera. Ed. Garsi (Madrid). 1:151-175.
4. Burkholder, G.D. and Duczek, L.L. (1982). The Effect of Chromosome Banding Techniques on the Proteins of Isolated Chromosomes. Chromosoma, (Berlín). 87:425-435.
5. Church, R.B. (1974). Molecular and Reproductive Biology in Animal Genetics. Genetics. 78:511-524.
6. Comings, D.E. Avelino, E., Okada, T.A. and Wyandt, - - H.E. (1973). The Mechanism of C- and G-Banding of - - Chromosomes. Exp. Cell Res. 77:469-493.
7. Comings, D.E. (1978). Mechanisms of Chromosome Banding and Implications for Chromosome Structure. Ann. Rev. Genet. 12:25-46.
8. Comings, D.E. (1978). Methods and Mechanisms of Chromosome Banding. Methods in Cell Biology. Vol. XVII. - - Chromatin and Chromosomal Protein Research II. Ed. - Stein, G. Stein, J. and Kleinsmith, L.J. Academic Press 115-132.

9. De Robertis, E.D.P. y De Robertis, E.M.F. (1981). *Biología Celular y Molecular*. Décima Edición. Ed. El Ateneo: 315-545.
10. Drets, M.E. and Shaw, M.W. (1971). Specific Banding - Patterns of Human Chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 68:2073-2077.
11. Fecheimer, N.S. (1979). Cytogenetics in Animal Production *J. Dairy Sci.* 62:844-853.
12. Ford, C.E., Pollock, D.L. and Gustavsson, I. (1980). - Proceedings of the First International Conference for - the Standardisation of Banded Karyotypes of the Domestic Animals, (Reading, England). *Hereditas.* 92:145-162.
13. Gustavsson, I., Hageltorn, M., Johansson, C. and Zech, L. (1972). Identification of the Pig Chromosomes by - the Quinacrine Mustard Fluorescence Technique. *Exp. - Cell. Res.* 70:471-474.
14. Hageltorn, M. and Gustavsson, I. (1973). Giemsa stain - ing patterns for identification of the Pig Mitotic - - Chromosomes. *Hereditas.* 75:144-146.
15. Halnan, C.R.E. (1976). Chromosome Banding: A modified method for consistent G-banding in Cattle, Horses and - Buffaloes. *Vet. Rec.* 98:358.
16. Hansen-Melander, E., Melander, Y. and Olin, N.L. (1974) Chromosome preparation by air drying at low temperature and Giemsa banding procedures. *Hereditas.* 76:35-40.
17. Hansen-Melander, E. and Melander, Y. (1974). The Karyotype of the Pig. *Hereditas.* 77:149-158.

18. Kato, H. and Yosida, T.H. (1972). Banding Patterns of Chinese Hamster Chromosomes revealed by New Techniques. *Chromosoma*, (Berlín). 36:272-280.
19. Khalid, G., Neumann, H., Flemans, R.J. and Hayhoc, F.G.J (1979). A comparative study of chromosome G-banding - using Trypsin, Papain, and pretreatment with Emulphog<sup>e</sup> ne. *J. of Cli. Path.* 32:482-487.
20. Leman, A.D., Glock, R.D., Mengeling, W.L., Penny, R.H.C. Scholl, E. and Straw, B. (1981). *Diseases of Swine*. - Fifth Edition, Iowa State University Press. 617-627.
21. Lin, C.C., Biedermann, B.M., Jamro, H.K., Hawthorne, - A.B. and Church, R.B. (1980). Porcine (*Sus scrofa domestica*) Chromosome Identification and Suggested Nomenclature. *Can. J. Genet. Cytol.* 22:103-116.
22. McConnell, J., Feckheimer, N.S. and Gilmore, L.O. - - (1963). Somatic Chromosomes of the Domestic Pig. *J. - Ani. Sci.* 22:374-379.
23. Morrow, D.E. (1980). *Current Therapy in Theriogenology* First Edition. Saunders. 117-152.
24. Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellman, J., Battips, D.M and Hungerford, D.A. (1960). Chromosome preparations- of leukocytes cultured from peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 20:613-616.
25. Onne, M., Boye, H.A. and Sandermann, J. (1977). RNA'se induced bands in Human Chromosomes. *Hereditas.* 85:85--88.
26. Pathak, S. (1979). Cytogenetic Research Techniques in- Human and Laboratory Animals that can be applied most-

- profitably to Livestock. *J. Dairy Sci.* 62:836-843.
27. Rönne, M. and Sandermann, J. (1977). Simple methods to induce banding in Human Chromosomes. *Hereditas.* 86:- 151-154.
  28. Rubes, J. and Lojda, L. (1980). Studies on G-bands of some Chromosomes of the Pig. 4th. Eur. Collog. Cytogenet. Domesti. Anim. 360-363.
  29. Schnedl, W. (1971). Analysis of the Human Karyotype -- using a Reassociation Technique. *Chromosome*, (Berlin). 34:448-454.
  30. Schnedl, W. (1971). Banding Pattern of Human Chromosomes. *Nature*. (London). *New Biol.* 233:93-94.
  31. Schedl, W. (1974). Banding Patterns in Chromosomes. *Int. Rev. Cytol.* 4:237-272.
  32. Shiraishi, Y. and Yosida, T.H. (1972). Banding Pattern Analysis of Human Chromosomes by use of a Urea Treatment Technique. *Chromosoma*, (Berlin). 37:75-83.
  33. Seabright, M. (1971). A rapid Banding Technique for Human Chromosomes. *Lancet.* (2):971-972.
  34. Sumner, A.T., Evans, H.J. and Buckland, R.A. (1971). New Technique for Distinguishing between Human Chromosomes. *Nature*, (London). *New Biol.* 232:31-32.
  35. Sperling K. and Wiesner, R. (1972). A Rapid Banding Technique for Routine use in Human and Comparative Cytogenetics. *Humangenetik.* 15:349-353.
  36. Villagomez, D.A.F. (1984). Analisis Citogenético en Cerdos con Problemas Reproductivos. Tesis. Universidad

de Guadalajara. 43-47.

37. Weisblum, B. and L. de Haseth, P.L. (1972). Quinacrine, A Chromosome Stain Specific for Deoxyadenylate-Deoxythymudylate-Rich Regions in DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA). 69:629-632.